



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO
DE CULTIVO CELULAR PARA LA
PRODUCCIÓN DE ANTÍGENOS DE
UNA CEPA DE *Neospora caninum*
AISLADA EN BOVINOS”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN PARASITOLOGÍA EN
ANIMALES DOMÉSTICOS Y SILVESTRES

LUCY ELIZABETH PLASENCIA PADILLA

LIMA - PERÚ

2018

ASESOR

PhD. Mg. MV. Marcos Enrique Serrano Martínez

JURADO DE TESIS

DRA. Clarisa Elizabeth Hinostroza Meza
PRESIDENTE

DRA. Maritza Mercedes Calderón Sánchez
VOCAL

MG. Galy Juana Mendoza Torres
SECRETARIO (A)

DEDICATORIA

A mi hijo, porque eres el amor de mi vida y sigo aprendiendo de ti.

A mi madre Lucy, por haberme enseñado a tener valores y ser una persona de
bien.

A mi padre Gary, por la perseverancia y la constancia que me inculcó, para salir
adelante.

A mi esposo Marco, por la fortaleza que entregas y el amor que como familia
tenemos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Facultad de Veterinaria y Zootecnia
y el Laboratorio de Parasitología, por permitirme trabajar mi tesis en mi alma
mater.

A la Universidad Complutense de Madrid España por realizar mis capacitaciones
en el área de cultivo celular y la donación de células para la investigación.

El Dr. Enrique Serrano por encargarme esta investigación y confiar en mí para
desarrollarla.

El Dr. Manuel Tantaleán, por los consejos y asesorías para mejorar mi tesis.

FUENTES DE FINANCIAMIENTOS

Financiado por el Fondo para la innovación, la Ciencia y la Tecnología (FINCyT) con la investigación llamada “Obtención y caracterización del primer aislado de *Neospora caninum* causante de abortos y mortalidad neonatal en la producción bovina lechera del Perú, con fines inmunodiagnóstico y vacunal.” Con código de proyecto: 167-PNICP-PIAP-2015.

ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO DE CULTIVO CELULAR PARA LA PRODUCCIÓN DE ANTÍGENOS DE UNA CEPA DE *Neospora caninum* AISLADA EN BOVINO

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.inta.gob.ar Fuente de Internet	1%
2	archrazi.areeo.ac.ir Fuente de Internet	1%
3	link.springer.com Fuente de Internet	1%
4	Submitted to University of Nottingham Trabajo del estudiante	1%
5	siis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	1%
6	zienjournals.com Fuente de Internet	1%
7	en.saluvetinnova.com Fuente de Internet	<1%
8	psasir.upm.edu.my Fuente de Internet	<1%

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	
ABSTRACT	
I. INTRODUCCIÓN	01
II. OBJETIVOS	04
2.1 OBJETIVO GENERAL	
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
III HIPÓTESIS	05
IV JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	06
V. MARCO TEÓRICO	07
5.1 ANTECEDENTES	07
5.2 GENERALIDADES	08
5.2.1 DEFINICIÓN DE LA ENFERMEDAD DE NEOSPOROSIS BOVINA	08
5.2.2 AGENTE ETIOLÓGICO	
5.2.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE <i>Neospora caninum</i>	09
5.2.4 CICLO BIOLÓGICO	10
5.2.5 MECANISMO DE TRANSMISIÓN DE <i>Neospora caninum</i>	12
5.2.6 LESIONES Y SIGNOS DE LA ENFERMEDAD	13
5.2.7 EPIDEMIOLOGÍA	14
5.2.8 DIAGNÓSTICOS	16
5.2.9 CULTIVO CELULAR DE <i>Neospora caninum</i>	17
VI METODOLOGÍA	20
6. 1 LÍNEA CELULARES EMPLEADAS	20
6. 2 CONSIDERACIONES ÉTICAS	20
6. 3 RECOLECCIÓN DE DATOS	20
6. 4 PROCESO DE MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS <i>in vitro</i>	21
6.5 OBTENCIÓN DE TAQUIZOITOS DE <i>Neospora Caninum</i> EN CULTIVO CELULAR	22

6. 6 CONSERVACIÓN DE LÍNEAS CELULARES	22
6. 7 PURIFICACIÓN DE TAQUIZOITOS DE <i>Neospora caninum</i> PARA LA OBTENCIÓN DE ANTÍGENO	23
6.8 MUESTRAS PARA PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	24
6.9 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	22
7. ANÁLISIS DE DATOS	25
VII RESULTADOS	27
VII DISCUSIÓN	29
IX CONCLUSIONES	34
X RECOMENDACIONES	35
XI REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍA	36
XII GLOSARIO	50
XIII ANEXOS	

LISTA DE REACTIVOS

LISTA DE FIGURAS

Imagen 1: Imágenes sobre el mantenimiento de la línea célula Vero.

Imagen 2: Mantenimiento de la cepa *Neospora caninum*.

Imagen 3: Pases en la línea célula Vero

Imagen 4: Pases en la cepa *Neospora caninum* de origen bovino.

Imagen 5: Protocolo de congelamiento de líneas celulares Vero y *Neospora caninum*.

Imagen 6: Protocolo de descongelamiento de la cepa *Neospora caninum*.

Imagen 7: Imágenes sobre el protocolo de producción de antígeno.

Imagen 8: Protocolo de purificación de la cepa *Neospora caninum*.

PROTOCOLOS

A.1 Procedimiento de mantenimiento de la línea celular Vero

A.2 Procesos de Mantenimiento de la cepa *Neospora caninum*

B.1. Pase de línea celular Vero

B.2. Pases de infección de cultivo celular Vero con la cepa *N. caninum*

NC1

- C.1. Congelación de línea celular Vero
- C.2. Congelación de *Neospora caninum* NC1
- D.1. Descongelación de células Vero
- D.2. Descongelación de *Neospora caninum* NC1
- E.1. Producción de antígeno *Neospora caninum* NC1
- E.2. Purificación del antígeno

LISTADO DE ABREVIATURA

Sigla	Significado
ADN/DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMEN	Medio modificado Dulbecco's Eagle
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
EDTA	Ácido etilendiaminotetra acético
ELISA	Ensayo por inmuno absorción ligado a enzimas
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
h	Horas
mg	Miligramo
ml	Mililitro
NC	<i>Neospora caninum</i> (Prefijo)
O₂	Oxígeno
PBS	Tampón fosfatado salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Coficiente indicador de alcalinidad o acidez en una solución
SFB	Suero fetal bovino
SP1	Cepa parasitaria de <i>Neospora caninum</i>
ug	Microgramo
ul	Microlitros
UI	Unidades internacionales
UV	Radiación ultravioleta
1x	Concentración 1%
10x	Concentración 10%
10X	Objetivo de aumento de diez
40X	Objetivo de aumento de cuarenta

RESUMEN

Neospora caninum es considerada una enfermedad parasitaria importante, debido a que genera pérdidas económicas en el ganado bovino provocando problemas reproductivos como abortos. Se considera una enfermedad de importancia en la ganadería de leche y de carne, por lo que aún se siguen estudiando métodos de control y de diagnóstico con fines inmunovacunales. El presente estudio tuvo como objetivo producir antígeno de *Neospora caninum* mediante el cultivo celular con la línea celular Vero a partir de la cepa de *Neospora caninum* NC1. Con este fin se emplearon la técnica de cultivo celular extranjera para *Neospora caninum* por primera vez en nuestro país y la universidad FAVEZ UPCH, observando al inicio dificultad en el mantenimiento y la producción de la cepa parasitaria, se abordó protocolos de bioseguridad y asepsia que fueron de importancia para la continuidad del proyecto, finalizando en la estabilidad de ambas células. Se obtuvo la producción de antígeno de *Neospora caninum* NC1 consiguiendo una cantidad próxima ideal para ser utilizada como muestra en IFI. Sin embargo, se encontró fluorescencia completa del taquizoito tras la observación, pero en baja concentración a lo esperado. Se sugiere para complementar la purificación de antígeno puedan añadirse el método de sonicación y columnas para obtener un de antígeno puro.

PALABRAS CLAVES

CULTIVO CELULAR, NEOSPOA CANINUM, AISLAMIENTO, ANTÍGENOS, BOVINO.

ABSTRACT

Neospora caninum is considered an important parasitic disease, because it generates economic losses in cattle causing reproductive problems such as abortions. It is considered an important disease in dairy and beef cattle, so control and diagnostic methods for immuno-vaccinal purposes are still being studied. The objective of the present study was to produce *Neospora caninum* antigen by cell culture with the Vero cell line from the *Neospora caninum* strain NC1. To this end, the foreign cell culture technique for *Neospora caninum* was used for the first time in our country and the FAVEZ - UPCH, observing at the beginning difficulty in the maintenance and production of the parasitic strain, biosafety and asepsis protocols were addressed of importance for the continuity of the project, ending in the stability of both cells. The production of *Neospora caninum* NC1 antigen was obtained, an ideal near quantity to be used as a sample in IFI. However, complete fluorescence of the tachyzoite was found after observation, but in low concentration as expected. It is suggested to complement the purification of antigen can be added the sonication method and columns to obtain a pure antigen.

KEY WORDS

CELL CULTURE, NEOSPORA CANINUM, ISOLATION, ANTIGEN, CATTLE.

I. INTRODUCCIÓN

La Neosporosis bovina es una enfermedad parasitaria provocada por *Neospora caninum*, un protozooario aplicomplejo de amplia distribución e importancia en la producción bovina de leche y carne, sin embargo, puede presentarse en otros rumiantes y camélidos sudamericanos. El agente es causante principal de pérdidas reproductivas embrionarias durante el primer tercio de la gestación y abortos en el segundo trimestre (Dubey, 2003). Se ha observado su distribución cosmopolita, sobre todo por su transmisión vertical que perpetua la enfermedad por generaciones, registrando estimaciones entre 12 a 40% de fetos infectados y abortados a nivel mundial por *Neospora caninum* (Dubey *et al.*, 2007).

La enfermedad ha provocado pérdidas millonarias de forma anual en la producción bovina en California, EE. UU (Anderson *et al.*, 1991; Barr *et al.*, 1998), y sólo en países europeos se encuentra una gran difusión con prevalencias mayores, como en España donde se ha observado prevalencias intrarebaño de entre 50% a 100% (Bartels *et al.*, 2006) y Suecia con un 8,3% (Frossling *et al.*, 2008).

En Perú la producción de bovinos de fin lechero y de engorde refiere la de mayor producción con 250,000 cabezas de ganado sólo en Lima (INEI, 1994) encontrándose en ascenso anualmente. Se han observado una diversidad de seroprevalencias de *Neospora caninum* en bovinos, tan sólo en Lima un 29,6% (Silva *et al.*, 2002), Junín un 46,7% (Granadoz *et al.*, 2014), Puno un 18,1% (Atoccsa *et al.*, 2005) y Amazonas con 40,4% (Quevedo *et al.*, 2003).

La neosporosis bovina se puede transmitir en dos formas, siendo la transmisión vertical o transplacentaria (transmisión de madre a crías); y la transmisión horizontal por ingesta de ooquistes del parásito en alimento y/o agua contaminada (Dubey *et al.*, 2006). Los abortos son característicos de la enfermedad, pero se han presentado otras

consecuencias sobre el feto, como muerte y reabsorción en el útero, momificación o autólisis (Dubey, 2005), el nacimiento de terneros muertos, sobrevivientes con sintomatología nerviosa (ataxia) (Dubey y Schares, 2006) o nacerían clínicamente asintomáticos, pero congénitamente infectados (Hemphill, 1999; Buxton et al, 2002). Estudios revelan que hasta un 95% de crías nacidas de madres serológicamente positivas pueden estar infectadas congénitamente y permanecer clínicamente sanas y/o asintomáticas siendo portadoras de la enfermedad (Paré *et al*, 1996).

Para el diagnóstico de la neosporosis bovina se han empleado muestras *in vivo* y el post mortem para el rebaño completo (Ortega-Mora *et al*, 2006). Las técnicas más utilizadas están basadas en la detección de anticuerpos específicos con el uso de suero de animales sospechosos, dentro de estos se encuentra pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI), ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) y pruebas de aglutinación (Bjorkman y Ugglá, 1999). Otras técnicas como la histopatología e inmunohistoquímica han tenido moderado éxito en la identificación de cambios tisulares o lesiones específicas de la enfermedad en fetos abortados (Dubey y Shares, 2006), pero existe la posibilidad de reacción cruzada con *Toxoplasma gondii* (van Maanen *et al*, 2004). Gran parte de estas pruebas son importadas de origen argentino, europeo y americano, por lo que dependen de un stock, tiempo de llegada y financiamiento. Sin embargo, el elaborar antígenos de *Neospora caninum* mediante cultivo *in vitro* facilitaría la realización de pruebas diagnósticas para bovinos u otras especies afectadas, prescindiría del costo de importación y proveería antígenos útiles para ensayos vacunales de protección.

Por tanto, es necesario primero desarrollar estudios de aislamiento *in vivo* del parásito autóctono del Perú, utilizando murinos experimentalmente infectados. Para ello se requiere mantener la cepa viable bajo condiciones óptimas de cultivo celular, que además permita realizar estudios de sus características ultra estructurales y de invasión, para la

búsqueda de potenciales antígenos vacunales que contribuyan al control epidemiológico en rebaños afectados del Perú.

El objetivo del presente estudio fue producir antígenos de *Neospora caninum* mediante la optimización de una técnica de cultivo celular utilizando la línea celular Vero a partir de la cepa *Neospora caninum* NC1, para posteriormente evaluar su utilidad mediante la técnica de inmunofluorescencia (IFI) para detectar anticuerpos que reconozcan el antígeno parasitario producido.

II. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Producir antígeno de *Neospora caninum* mediante el cultivo celular con línea celular Vero a partir de la cepa *Neospora caninum* NC1.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la técnica de conservación, cultivo y mantenimiento usando línea celular Vero y la cepa *Neospora caninum* NC1.
- Evaluar la producción de antígeno de *Neospora caninum* utilizando la línea celular Vero.
- Evaluar la calidad de antígeno de *Neospora caninum* mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

III. HIPÓTESIS

- La técnica de cultivo empleada con la línea celular Vero permitirá un crecimiento óptimo de la cepa *Neospora caninum* NC1.
- El cultivo de *Neospora caninum* NC1 en la línea celular Vero permitirá obtener antígeno de buena calidad para el desarrollo de pruebas inmunológicas como la inmunofluorescencia indirecta (IFI).

IV. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La neosporosis representa un problema no solamente reproductivo debido a su importancia económica por las pérdidas generadas en el área de producción animal, si no por su distribución a nivel mundial sobre todo afectando al ganado lechero, en el cual se incluye a nuestro país. En Perú y otros países, si bien se realizan controles epidemiológicos no se cumplen las normativas de prevención, lo que acentúa la presencia de la enfermedad y la perpetuación en el hato, haciendo difícil su control y facilitando su diseminación.

Se realizan pruebas diagnósticas por serología, pero de origen extranjero, lo que demanda un financiamiento que pocos pueden emplear en nuestro país, ya que además dependen de un stock y la importación de los mismos. En la actualidad en el Perú, no se han realizado investigaciones en cultivo celular para *Neospora caninum*, además de la producción de antígenos, los cuales, se han obtenido aislados oriundos en otros países que ya han sido notificados mundialmente y forman parte de investigaciones para candidatos vacunales en búsqueda del control de la enfermedad.

Por todo lo anterior mencionado, la presente investigación pretende realizar estudios de cultivo celular de *Neospora caninum* in vitro, optimizando una técnica mediante la utilización de la línea celular Vero y la cepa *Neospora caninum* NC1, para finalmente purificar antígenos evaluar su antigenicidad en la prueba de IFI. Esto facilitará la información sobre los procesos y protocolos de cultivo, producción de antígenos propios que se puedan emplear posteriormente para disminuir su costo para el aislamiento, conservación y mantenimiento de cepas autóctonas para futuras investigaciones en el contexto de diagnóstico y candidatos vacunales.

V. MARCO TEÓRICO

5.1 ANTECEDENTES

En las primeras investigaciones en cultivo celular en países extranjeros, los taquizoitos de *N. caninum* se cultivaron en monocitos y células endoteliales de arteria cardiopulmonar de bovinos (Lindsay y Dubey, 1989). Sin embargo actualmente se requiere la producción del parásito *in vitro* para su mantenimiento, productividad y conservación, empleando una diversidad de líneas celulares estables como Vero, Marc-145 y entre otras (Dubey *et al.*, 2002).

La línea celular Vero proviene de Japón (1962), creada de un cultivo primario de células de riñón de mono verde africano adulto (*Cercopitheazs aethiops*) A comparación de otras, ha sido empleada en varios estudios de cultivo de parásitos (Andrade *et al.*, 2010), virus y bacterias; incluyendo para la fabricación de vacunas (Oxford *et al.*, 1987) como de la poliomielitis y rabia humana (Kistner *et al.*, 1998). El cultivo celular de *Neospora caninum* ha permitido obtener un estudio detallado de las características estructurales e incluso mecanismos de invasión y adhesión del parásito favoreciendo su replicación *in vitro* y siendo utilizado en futuros estudios experimentales (Hemphill *et al.*, 1996).

A partir de ello, se ha realizado la producción de antígenos para pruebas diagnósticas que se utilizan en la actualidad, estudios sobre la conversión de taquizoitos-bradizoitos y la formación de quistes tisulares *in vitro* (Weiss *et al.*, 1999). Se han realizado además estudios sobre su manipulación genética y aislamientos en murinos de laboratorio para preservar las cepas vivas (Howe *et al.*, 1997; Howe y Sibley, 1997; Beckers *et al.*, 1997), y ensayos de eficacia farmacológica para posibles tratamientos (Lindsay y Dubey, 1989; Lindsay *et al.*, 1993). Incluso el cultivo celular ha permitido que en la actualidad se comercialice una vacuna frente a este parásito, la cual es formulada con taquizoitos muertos de la cepa Nc-Nowra (Miller *et al.*, 2002), que ha demostrado eficacia parcial para la

prevención de abortos en estudios experimentales (Romero *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2007). Sin embargo, sólo ha sido utilizado en Europa y aún continúan las mejoras en su desarrollo. Es así que faltan más investigaciones sobre otras variedades de cepas y posibles vacunas para el control epidemiológico de la enfermedad.

5.2 GENERALIDADES

5.2.1 DEFINICIÓN DE LA ENFERMEDAD DE NEOSPOROSIS BOVINA

La Neosporosis bovina es causada por *Neospora caninum*. Fue descrita en los años ochenta por primera vez en Noruega en un caso de encefalomiелitis y polimiositis mortal en un canino (Bjerkas y Dubey, 1991). Realizando una investigación se identificó quistes en tejido nervioso, el cual era muy similar al protozoo *Toxoplasma gondii* (Bjerkas y Presthus, 1989). A finales de los ochenta, se menciona y se detalla la identificación de *Neospora caninum* por primera vez.

La neosporosis bovina es considerada una enfermedad parasitaria de importancia y distribución mundial, que genera pérdidas económicas en los rebaños bovinos causando abortos (Anderson *et al.*, 1991; Barr *et al.*, 1992; Thornton *et al.*, 1991), mortalidad neonatal, nacimiento de terneros con sintomatología neuromuscular o terneros asintomáticos, pero crónicamente infectados, diseminando la enfermedad de manera silenciosa (Dubey, 1999; Dubey y Schares, 2006; Ortega-Mora *et al.*, 2006).

5.2.2 AGENTE ETIOLÓGICO

Según Dubey y Lindsay, 1996, *Neospora caninum* es un protozoo el cual se encuentra en el:

Phylum: Apicomplexa

Clase: Sporozoea
Subclase: Coccidia
Orden: Eucoccidia
Suborden: Eimeriina
Familia: Sarcocystidae
Género: *Neospora*
Especie: *caninum*

5.2.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

En *Neospora caninum* se han identificado 3 estadios en el ciclo biológico: taquizoítos, bradizoítos que se encuentran dentro de los quistes tisulares y los esporozoítos que se encuentran en el interior de los ooquistes.

Los taquizoítos de *N. caninum* tienen una alta tasa de replicación, son capaces de infectar diversos tipos de órganos y tejidos, tales como cerebro, médula ósea, corazón, pulmón, hígado, riñón, membranas fetales, músculo esquelético, placenta y piel (Dubey y Lindsay, 1996; Maley *et al*, 2003; Almería *et al*, 2004; Dubey *et al.*, 2006). La rápida división de éstos lleva a la lisis de la célula hospedadora y a su distribución por todo el organismo, provocando situaciones patológicas típicas de una infección aguda. Los taquizoítos son capaces de transformarse en bradizoítos en el hospedador intermediario. Pueden ser ovoides, con forma de luna o algo globulares y miden entre 3-7 μm de largo y 1-5 μm de ancho, dependiendo del momento de la división en que se encuentren (Dubey *et al.*, 2002; Dubey *et al.*, 2004).

Los bradizoítos son los responsables de la fase crónica de la infección y se caracterizan por su escasa o nula tasa de replicación y por su capacidad de permanecer latentes en la célula infectada dentro de quistes tisulares (Dubey, 1999).

Tienen aproximadamente 6-8 μm de longitud por 1-1,8 μm de anchura y contienen las mismas organelas que los taquizoítos, aunque en los bradizoítos el número de roptrias es menor y tienen más gránulos de amilopectina (Speer y Dubey, 1989). El hallazgo de quistes tisulares en infecciones naturales ha confirmado el tropismo por el tejido nervioso en infecciones naturales y experimentales (Peters *et al.*, 2000; Dubey *et al.*, 2002) y en menor grado por el tejido muscular en el ganado bovino y en perros infectados naturalmente (Peters *et al.*, 2000; Dubey *et al.*, 2004). pared tiene un grosor de 0,6-0,8 μm , no presentando cuerpo de Stieda. A su vez, en el interior de cada esporoquiste se encuentran 4 esporozoítos (6,5 μm de longitud por 2,0 μm de anchura), de forma alargada, y el cuerpo residual esporoquístico (Lindsay *et al.*, 1999).

Los ooquistes de *N. caninum* son morfológicamente similares a los de *T. gondii* y *H. heydorni*; tienen forma esférica o subesférica y su tamaño medio es de 11,7 μm de longitud y 11,3 μm de anchura. La pared del ooquiste es lisa, de 0,6-0,8 μm de espesor y no contiene micropilo. En su interior se encuentran dos esporoquistes elipsoidales (8,4 μm de longitud por 6,1 μm de anchura), cuya pared tiene un grosor de 0,6-0,8 μm , no presentando cuerpo de Stieda. A su vez, en el interior de cada esporoquiste se encuentran 4 esporozoítos (6,5 μm de longitud por 2,0 μm de anchura), de forma alargada, y el cuerpo residual esporoquístico (Lindsay *et al.*, 1999).

5.2.4 CICLO BIOLÓGICO

Su ciclo biológico es heteroxeno, está compuesto por dos tipos de hospedadores, a fin de poder completar la fase sexual se encuentran los cánidos domésticos (McAllister *et al.*, 1998) y silvestres como hospederos definitivos (Gondim *et al.*, 2004; King *et al.*, 2010), en los cuales se desarrollan los ooquistes que son eliminados junto con las heces al medio ambiente hasta su esporulación (Peters *et al.*, 2000; Dubey *et al.*, 2002).

Los cánidos inicialmente ingieren tejidos de los hospedadores intermediarios infectados para posteriormente eliminar ooquistes en sus heces (Basso *et al.*, 2001; Slapeta *et al.*, 2002; McGarry *et al.*, 2003). Una vez expuestos al ambiente, estos ooquistes iniciarían su proceso de esporulación que en condiciones óptimas se realizaría a las 24 horas tras su eliminación (Lindsay *et al.*, 1999) estando infectivos a los tres días (McAllister *et al.*, 1998); sin embargo, no se conoce con exactitud la fase entero-epitelial de *N. caninum*, sólo se menciona que se realizarían las fases de gametogonia y singamia para la producción de ooquistes en el hospedero definitivo (Williams *et al.*, 2009).

En la fase asexual participa el hospedero intermediario, siendo los rumiantes como ganado equino, ovino (Dubey y Lindsay, 1990), caprinos (Barr *et al.*, 1992) y los bovinos principalmente, hasta los mismos cánidos, en el cual se desarrollan las fases de taquizoitos y bradizoitos (Dubey *et al.*, 2006; Gondim *et al.*, 2004; King *et al.*, 2010; McAllister *et al.*, 1998). Se ha visto que afecta otros animales de producción como alpacas, llamas (Moya *et al.*, 2003) y otros camélidos sudamericanos.

Posterior a la ingesta de ooquistes esporulados, se produce la liberación de los esporozoítos que parasitan el lumen intestinal, transformándose en taquizoitos y multiplicándose en ganglios linfáticos mesentéricos para su distribución sistémica (Dubey *et al.*, 2006; Lindsay *et al.*, 1999). En una fase crónica, la respuesta inmunitaria del hospedador favorece que los taquizoitos se diferencien en bradizoitos formando los microquistes o quistes tisulares que se localizan de preferencia en tejido nervioso (Barr *et al.*, 1992; Dubey *et al.*, 1988; Kobayashi *et al.*, 2001), aunque también pueden encontrarse en el tejido muscular esquelético (Peters *et al.*, 2001). Los quistes tisulares conservan los bradizoitos en su interior con capacidad infectante durante períodos largos (Lindsay y Dubey, 1989). Es así como durante la gestación se produce la reactivación de los bradizoitos que se diferencian en taquizoitos y pueden cruzar la placenta e infectar al feto en desarrollo (Williams *et al.*, 2009).

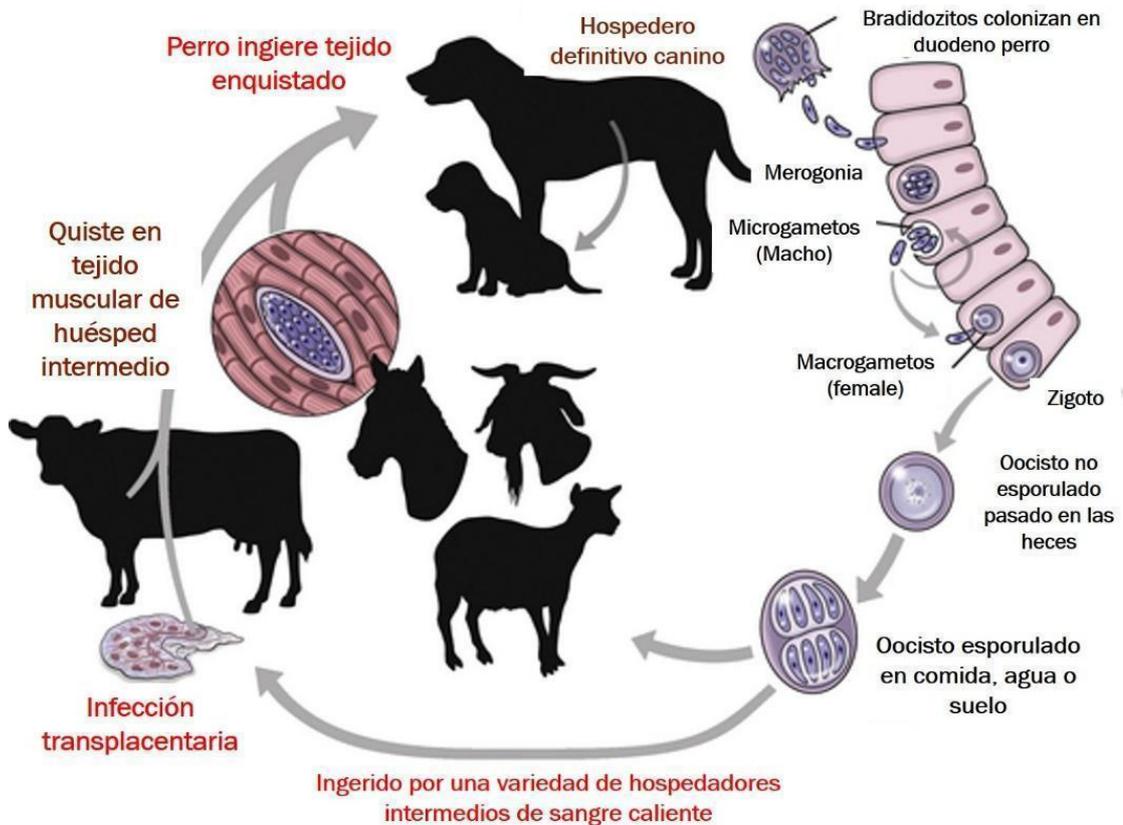


Figura 1. Ciclo biológico del *N. caninum*

Fuente: Veterian Key <https://veteriankey.com/neosporosis/>

5.2.5 MECANISMO DE TRANSMISIÓN

La neosporosis bovina se puede transmitir en dos formas más frecuentes, siendo la transmisión vertical o transplacentaria (transmisión de madre a crías); y la transmisión horizontal por ingesta de ooquistes del parásito (Dubey *et al.*, 2006).

La transmisión vertical transplacentaria es una de las principales vías de infección por el cual se mantendría la neosporosis endémica (Barr *et al.*, 1992) y favorecería la propagación de la enfermedad de esta forma (Anderson *et al.*, 2000). Este modo de transmisión transplacentaria origina la presencia de abortos y el nacimiento de crías congénitamente infectadas, que presentan o no sintomatología nerviosa (Barr *et al.*, 1992), perpetuando la enfermedad intrarebaño (Anderson *et al.*, 2000).

La transmisión horizontal realizada por la ingesta de ooquistes esporulados que ingresan a torrente sanguíneo y atraviesan la placenta infectando al feto (Dubey, 2003). Los canes mantienen un estrecho contacto con los bovinos en producción, ya que muchas veces ayudan a dirigir el ganado, esto lo hace relevante para la diseminación de la enfermedad (Vega *et al.*, 2010). Estudios revelan que los abortos epidémicos pueden tener origen de infección post natal y que al estar presentes los canes aumentaría más el riesgo de ocurrir brotes de la enfermedad en el hato (Bartels *et al.*, 2006; Hobson *et al.*, 2005; Schares *et al.*, 2004).

Por otro lado, el ganado que es infectado cumple un papel importante debido a que permanece infectado de por vida y puede transmitir la infección en las siguientes gestaciones (Barr *et al.*, 1992; Piergili *et al.*, 2003) o de forma intermitente (Boulton *et al.*, 1995; Guy *et al.*, 2001; Wouda *et al.*, 1998) permaneciendo la infección en el rebaño.

5.2.6 LESIONES Y SIGNOS DE LA ENFERMEDAD

La neosporosis bovina se caracteriza clínicamente por abortos en vacas gestantes (Buxton *et al.*, 2002), en su mayoría puede ocurrir a partir del quinto mes de gestación, además de que las infecciones naturales pueden presentarse al tercer mes de gestación (Anderson *et al.*, 1991; Bildfell *et al.*, 1994; Duivenvoorden y Lusi, 1995).

Los abortos pueden presentarse en cualquier época del año y de forma esporádica, endémica o epidémica produciendo pérdidas económicas en el hato (Anderson *et al.*, 2000; Schares *et al.*, 2004). Los fetos abortados pueden encontrarse auto líticos y algunos pueden llegar a ser momificados (Dubey, 2005), si algún ternero sobrevive al nacimiento pueden ser clínicamente asintomático, pero congénitamente infectado (Anderson *et al.*, 2000).

Las lesiones más comunes en fetos se encuentran en el sistema nervioso central, el corazón e hígado (Anderson *et al.*, 1991; Barr *et al.*, 1992; Dubey *et al.*, 1999) y se

acompañan con múltiples focos de infiltrado no supurativo y de necrosis multifocal rodeada de células inflamatorias (Collantes-Fernández *et al.*, 2006; Dubey *et al.*, 2006), siendo la encefalomiелitis la lesión más frecuente (Anderson *et al.*, 2000).

Los animales que sobreviven al nacimiento, con más de dos meses de edad, pueden presentar signos clínicos compatibles con afecciones neuromusculares, apareciendo a los 4 - 5 días después del parto, aunque éstos pueden retrasarse hasta transcurridas dos semanas del nacimiento (Dubey y Lahunta, 1993; Dubey, 1999). Algunos de los signos que presentan son ligera incoordinación, parálisis completa, debilidad, dificultad para levantarse, y pueden empeorar hasta la total parálisis y muerte del animal (Dubey *et al.*, 1993). En terneros mayores de 8 meses seropositivos se ha observado miocarditis y miositis (Piergili *et al.*, 2003; Sawada *et al.*, 2000).

En los casos más graves se puede observar malformaciones en la espina dorsal, estrechamiento de la médula espinal, hidrocefalia y neumonía (Bryan *et al.*, 1994; Gunning *et al.*, 1994).

5.2.7 EPIDEMIOLOGÍA

Actualmente, existen diversos estudios que confirman la presencia de la infección por *Neospora caninum* en ganado bovino adulto en distintas partes del mundo, obteniéndose tasas de prevalencias variadas y según el tipo de producción pecuaria bovina de leche o carne (Dubey *et al.*, 2007).

En Estados Unidos, California, la neosporosis ha provocado pérdidas de 35 millones de dólares anuales en producción bovina (Anderson *et al.*, 1991; Barr *et al.*, 1998). Sólo en España se han encontrado prevalencias en fetos abortados de 22 a 58% según técnicas aplicadas para su diagnóstico (Pereira-Bueno *et al.*, 2003). En los años noventa se encontró prevalencias moderadas y altas de infección en ganado bovino español de carne con un 55% y de leche con un 83% (Quintanilla- Gonzalo *et al.*, 1999). Se considera a

España como el país con mayor seroprevalencia intrarrebaño teniendo entre el 50% y 100% de infectados (Bartels *et al.*, 2006).

En la zona de norte y centro de España se ha encontrado una tasa de infección fetal entre 10,7% y 38,8% de un total de 80 fetos. (Pereira-Bueno *et al.*, 2003). Dubey y colaboradores (2007) mencionan que las estimaciones son entre un 12% y 40% de fetos abordados a nivel mundial estarían infectados por *Neospora caninum*.

En el 2008, Frossling y colaboradores detectaron prevalencias moderadas en ganado lechero de Suecia con un 8,3% y en el 2012 (Miltrea y colaboradores) a encontró una alta prevalencia en granjas del sur de Rumania con 40,3% como media.

En el Perú, existe una gran cantidad de establos lecheros y de engorde, sólo en Lima se contaba en el año 1994 (INEI) con aproximadamente 250,000 cabezas de ganado, siendo la raza más frecuente Holstein y Brown Swinns. En el año 2001, la producción de establos lecheros contó con 578,000 cabezas de ganado equivalente al 12% del hato nacional (MINAG, 2001; Gamarra, 2001), siendo este número en ascenso anualmente.

En nuestro país, se menciona que existe una tasa mensual de abortos en vacas y vaquillonas de 1.0% y 0.5% respectivamente (Perulactea, 2011), la que anualmente representa registro de pérdida económica para los establos de media a alta producción, siendo mayores en producciones extensivas. Se han observado seroprevalencias de *Neospora caninum* en bovinos de diferentes lugares de nuestro país utilizando la técnica de inmunofluorescencia indirecta y ELISA, como en el valle de Lima con 29.6% (90/304) (Silva *et al.*, 2002), Junín con 12.4% (45/ 347) (Puray *et al.*, 2006), Junín 46.7% (85/182) (Granadoz *et al.*, 2012), Puno con 18.1% (76/419) (Atoccsa *et al.*, 2005), Amazonas con 40.4% (107/265) (Quevedo *et al.*, 2003).

En nuestro país se manejan programas de control epidemiológico contra ciertas enfermedades, como la hidatidosis controlando la cantidad de perros por hato, su

presencia aumentaría el riesgo de presentar enfermedades del hato (Puray *et al.*, 2006), así también enfermedades concomitantes como diarrea viral bovina (DVB), rinotraqueitis infecciosa bovina (RIB), que pueden acentuar la presencia de casos de neosporosis bovina por su participación inmunosupresora (Bjorkman *et al.*, 1999). En otros países, se realiza prevención contra enfermedades abortivas como brucelosis y leptospirosis, eliminando las vacas positivas y con abortos repetitivos (Pattucci *et al.*, 1999), sin embargo, aún existe un gran número de agentes causantes de abortos que permanecen sin investigar. La falta de medidas higiénicas sanitarias y control epidemiológico contribuyen a acentuar la enfermedad por *N. caninum* en las explotaciones sea intensivas o extensivas en los establos. Las medidas que se deberían emplear por falta de logística y coste, es el control serológico en hembras para reposición, no dejar las hijas de vacas positivas a *N. caninum*, eliminar rápidamente las placentas, fetos y animales muertos para evitar ingestión por carnívoros y así eliminar la fuente de infección (Granadoz *et al.*, 2012; Barr *et al.*, 1998; Anderson *et al.*, 2000; Dubey, 2003).

5.2.8 DIAGNÓSTICO

El empleo de pruebas diagnósticas serológicas específicas ha permitido diferenciar a *N. caninum* de otras especies gracias a su diferente composición antigénica. Las características morfológicas y biológicas de *N. caninum* lo relacionan estrechamente con *T. gondii*. Este último posee un amplio espectro de hospedadores y una gran facilidad para ser mantenido *in vitro* en diferentes tipos celulares, mientras que *N. caninum* presenta cualidades similares, aunque su espectro de hospedadores es más reducido. No obstante, se ha demostrado que ambos protozoarios difieren tanto en su estructura (Lindsay *et al.*, 1993) como en su composición genética y antigénica, hospedadores intermediarios, control inmunológico, tropismo tisular y comportamiento *in vitro* (Ellis *et al.*, 1994; Guo y Johnson, 1995; Hemphill *et al.*, 1999).

La detección de anticuerpos específicos frente al parásito se ha realizado en suero sanguíneo utilizando las técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI), ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) y pruebas de aglutinación (Bjorkman y Ugglá, 1999), pruebas que son utilizadas para confirmar y contrastar puntos de corte con el inmunoblot (Álvarez-García *et al.*, 2003; von Blumroeder *et al.*, 2004).

Investigaciones para desarrollo de vacunas y quimioterapéuticos contra *N. caninum*, utilizan pruebas moleculares como PCR (Reacción de cadena de la polimerasa), demostrando tener una mayor sensibilidad y especificidad, permitiendo identificar y cuantificar el ADN; así mismo, favorece en la detección patológica y epidemiológica de la enfermedad (Muller *et al.*, 2002; Ortega-Mora *et al.*, 2003; Cannas *et al.*, 2003; Esposito *et al.*, 2005).

El uso de técnicas como histopatología e inmunohistoquímica tiene moderado éxito en la identificación de cambios tisulares o lesiones específicas de la enfermedad para detectar el parásito en fetos abortados (Dubey y Schares, 2006); según otros estudios existe una posibilidad de tener resultados falsos positivos con *T. gondii* por reacciones cruzadas (van Maanen *et al.*, 2004).

5.2.9 CULTIVO CELULAR DE *Neospora caninum*

Las primeras investigaciones reportan que los taquizoítos de *N. caninum* se podían cultivar en monocitos y células endoteliales de arteria cardiopulmonar de bovinos (Lindsay y Dubey, 1989). Más tarde, comenzaron a utilizarse para el cultivo *in vitro* de *Neospora* varias líneas celulares estables: Vero, Marc-145, células de riñón bovino y fibroblastos de piel humana (Dubey *et al.*, 2002).

Los taquizoítos pueden mantenerse mediante un pasaje continuado en cultivo celular sin pérdida aparente de su infectividad para el modelo de ratón, manteniendo su

infectividad para los cultivos celulares tras su conservación en nitrógeno líquido (Dubey *et al.*, 2002).

En los cultivos celulares se aprecia que, tras las primeras 24 horas, aparecen de 4 taquizoítos por célula invadida. La invasión celular finaliza transcurridos 45-60 minutos post infección, comenzando entonces la primera endodiogenia, la cual genera en 8-10 horas la primera generación de taquizoítos, en un día y medio de la post infección se observan células infectadas con más de 10 taquizoítos incluidos en el interior de una vacuola parasitófora bien desarrollada. Seguidamente, el número de taquizoítos se multiplica exponencialmente pudiendo observarse más de 100 en una misma célula a los 4 días post infección. El efecto citopático se observa a los 3 días post infección, apreciándose la destrucción de las células infectadas de la monocapa, y observando la destrucción del tapiz celular a los 4-6 días post infección. (Hemphill *et al.*, 1996; Sundermann y Estridge, 1999).

El cultivo *in vitro* de los taquizoítos ha permitido el estudio de las características ultra estructurales del parásito y de los mecanismos de adhesión e invasión celular (Hemphill *et al.*, 1996). A partir de ellos se ha realizado su manipulación genética (Howe y Sibley, 1997; Beckers *et al.*, 1997), y ensayos de eficacia farmacológica (Lindsay y Dubey, 1989; Lindsay *et al.*, 1993; Lindsay *et al.*, 1999).

El cultivo celular también se ha empleado como fuente de producción de antígeno en el desarrollo de pruebas diagnósticas, en el estudio de la conversión taquizoíto-bradizoíto y en la producción *in vitro* de bradizoítos. En este sentido, Weiss *et al.* (1999), describieron la formación de quistes tisulares con bradizoítos *in vitro*, aunque con bajo rendimiento.

Buscando prevenir la enfermedad, se han empleado vacunas comerciales de taquizoitos muertos de cultivo celular (Bovilis® Neoguard de Intervet) demostrando una eficacia parcial en la prevención de abortos en el ganado bovino de forma experimental. Debido a su limitado tiempo de vida y el costo elevado de producción, no ha sido la mejor

alternativa. Por otro lado, se siguen realizando más hallazgos sobre nuevas variables del parásito en diferentes países por lo que es un factor a tomar en cuenta, sobre todo el uso de vacunas en aquellos casos de transmisión vertical (Innes *et al.*, 2001; Romero *et al.*, 2004).

VI. METODOLOGÍA

6. 1 LÍNEA CELULARES EMPLEADAS

En el estudio se utilizó una línea celular donada células Vero, procedente de fibroblastos de riñón de mono (Higashi *et al.*, 1967), empleada para el mantenimiento, y la cepa *Neospora caninum* NC1 para la producción de traquizoito (Dr. Luis M. Ortega- Mora, Universidad Complutense de Madrid, España).

El estudio se desarrolló en el Laboratorio de Parasitología Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima - Perú.

Se emplearon las técnicas de cultivo celular (Ammerman *et al.*, 2008) modificada del laboratorio de sanidad animal experimental de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid a cargo del Dr. Luis M. Ortega-Mora.

6. 2 CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente estudio no consideró la utilización de animales, ya que se basó en el cultivo *in vitro* de células. Asimismo, la investigación formó parte del Proyecto de Investigación financiado por el FINCyT titulado “Obtención y caracterización del primer aislado de *Neospora caninum* causante de abortos y mortalidad neonatal en la producción bovina lechera del Perú, con fines inmunodiagnóstico y vacunal.” Con código de proyecto: 167-PNICP-PIAP-2015.

6. 3 RECOLECCIÓN DE DATOS

Se tuvieron cuatro botes de células: dos de la línea celular Vero (75cm²) con pase N°33, con una cantidad células de 15×10^5 y dos del parásito *Neospora caninum* NC1 (75cm²)

con pase N° 17, con una cantidad parásitos de $0,25 \times 10^5$ las que se encontraban creciendo en células Vero con pase N° 33 de 15×10^5 .

6. 4 PROCESO DE MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS *in vitro*

Para el crecimiento de la línea celular Vero se utilizaron botes de cultivo de 25cm^2 , se realizó mantenimiento y procedió a lavar con PBS 1x. Se empleó un medio de cultivo líquido DMEM (Himedia®) enriquecido con Suero fetal bovino (SFB) (Sigma®) al 10% y antibiótico penicilina, estreptomycin y anfotericina B al 1% (Himedia®) para prevenir posibles contaminaciones de origen bacteriano y fúngico. El medio preparado previamente en condiciones estériles bajo una cabina de flujo laminar, se guardó en alícuotas a -20°C hasta su posterior uso. Para el mantenimiento y multiplicación de *Neospora caninum* NC1, se utilizó el mismo medio enriqueciéndolo con SFB (Sigma®) al 2% y el mismo antibiótico al 1%. Ambas líneas se mantuvieron en la incubadora (VS-2050C®) a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO_2 .

El mantenimiento de ambas líneas celulares se realizó dos veces por semana utilizando frascos de 25 y 75cm^2 , para los pases seriados de taquizoitos de *Neospora caninum* NC1, en los que se sembraron 5×10^5 células y 30×10^5 , respectivamente. Para realizar los pases continuos de la monocapa de la línea celular Vero, se hizo cuando fueran confluentes, se lavó con el tampón fosfato salino (PBS) y se utilizó la solución de tripsina y posterior re suspensión en el medio de cultivo adecuado. El número y la viabilidad de las células se determinó utilizando una dilución 1:2 de azul de tripano al 0,05%. Para el recuento de células se utilizó un hemocitómetro (cámara de Neubauer) y la viabilidad fue evaluada basándonos en la captación selectiva de este colorante por parte de las células con la membrana alterada (Ver Anexo).

6. 5 OBTENCIÓN DE TAQUIZOITOS DE *Neospora Caninum* EN CULTIVO CELULAR

El aislado fue mantenido en el laboratorio mediante pases seriados en la línea Vero, en incubación a 37°C en una atmosfera con 5% de CO₂. Un día anterior a la infección del cultivo celular con taquizoitos de *Neospora caninum* se sembraron las células (10 x 10⁵/frasco de 75cm²) utilizando medio de cultivo DMEM (Himedia®) enriqueciéndolo con SFB (Sigma®) al 2%. Los taquizoitos se recogieron cuando al menos un 80% del tapiz celular estaba destruido (3- 4 días). El pase del parásito se realizó dos veces a la semana. Se utilizaron rascadores de plásticos para despegar los restos de tapiz celular con taquizoitos en su interior. La viabilidad de los taquizoitos se evaluó por la captación selectiva del colorante azul de tripano y para su recuento se empleó la cámara de Neubauer (Ver Anexo).

6. 6 CONSERVACIÓN DE LÍNEAS CELULARES

Los pases de los aislados se conservaron en criopreservación en nitrógeno líquido hasta su utilización (NC1). Para ello el sobrenadante se centrifugó a 1350 x g por 15 minutos, evaluando después el número y la viabilidad de los taquizoitos. El sedimento se re suspendió con SFB frío y la suspensión se distribuyó en viales de congelación de 1,5 ml alcanzando una concentración final de 10⁷ taquizoitos/ml. Se añadió el protector DMSO (10%) y se guardó a -80% máximo por 5 días, luego se almacenó a -196 °C en nitrógeno líquido.

Cuando se descongeló los viales, el contenido se mezcló lentamente con 4 ml del medio DMEM (Himedia®) y se centrifugó (1350 x g por 15 min) para eliminar el DMSO. El sedimento se re suspendió con medio DMEM al 2% (Himedia®) y visualizó la formación de taquizoitos entre 8 a 10 días.

6. 7 PURIFICACIÓN DE TAQUIZOITOS DE *Neospora caninum* PARA LA OBTENCIÓN DE ANTÍGENO

Los taquizoitos de *Neospora caninum* NC1 obtenidos en cultivo celular fueron purificados para ser utilizados en la prueba de inmunofluorescencia (IFI), para ello se usaron parásitos enteros siguiendo el protocolo descrito por Tress y colaboradores (1993).

El sobrenadante del cultivo celular que contenían taquizoitos se pasó por una aguja de 23 G x 1” y luego por 25G x 5/8” para romper las células y liberar los parásitos que hubieran. Luego fueron lavados con PBS frío en proporción 1:2 y se centrifugó a 600 x g por 15min a 4°C, luego se pasó la muestra por un filtro de 5 μ m (Biotech) para eliminar células y restos celulares. Realizándose posteriormente el recuento, no sólo de los taquizoitos sino también de las células que debían llegar a ser el 20%, comprobándose la ausencia de contaminación celular.

En un último lavado con PBS, el sedimento fue re suspendido en esta solución tampón hasta conseguir una concentración final de 10^7 taquizoitos/ml a la que se añadió formaldehído al 0,5%. Los taquizoitos formalinizados fueron distribuidos en alícuotas y almacenados a 4°C o -20°C hasta su utilización para IFI.

6. 8 MUESTRAS PARA PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

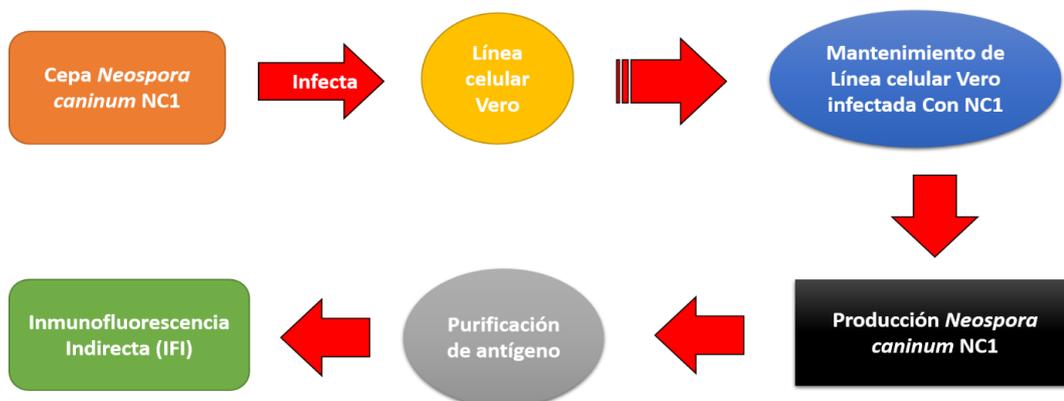
Se empleó la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizada por Tress y colaboradores (1993) y modificada (Laboratorio de Parasitología de la Universidad Complutense de Madrid, España). Para estos se emplearon 20 muestras positivas de bovinos adultos confirmados en IFI previo, diagnosticados previamente, provenientes de la provincia de Cañete, en una dilución de 1:50 y 1:100, utilizando los taquizoitos

producidos *in vitro* como antígeno (propio) y un conjugado comercial anti-Ig G de bovino (VMRD, EE. UU.).

6.9 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

Se utilizaron los taquizoitos formalinizados en suspensión de 30×10^7 y se depositó 9 μ l en cada pocillo de una porta objetivos de inmunofluorescencia de 12 pocillos de 4 mm de diámetro. Luego se dejó secar a temperatura ambiente y se fijó con acetona durante 10 minutos a -20°C . Se añadió los sueros problema (muestra) en diluciones con PBS (9 μ l) y se incubó a 30 minutos en cámara húmeda a 37°C . Se realizó un lavado con PBS de 10 minutos, en agitación. Se incubó con el conjugado por 30 minutos a 37°C en cámara húmeda protegido de la luz. Se lavó con PBS por 10 minutos y en agitación. Posteriormente se montó con una resina Fluoprep (Biomérieux) y un cubreobjetos de 24 x 60 mm. Los pocillos fueron examinados con un microscopio de inmunofluorescencia a 40x. Se consideró positiva la muestra de suero donde se observó la fluorescencia completa en todo el borde del parásito.

Figura 2: Flujograma del trabajo de investigación



Esquema de procesos, los cuales se desarrollaron en el estudio, desde la infección con la cepa *Neospora caninum* NC1 a la línea celular Vero, hasta la purificación del antígeno y ser probado en el examen de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Cada uno de los procedimientos se detalla en la sección Anexos.

7. ANÁLISIS DE DATOS

- Se determinó la **viabilidad de la cepa *Neospora caninum***, aquellos botes de cultivos con la línea celular Vero que se infectaron, los cuales en incubación en un determinado tiempo se observaron el desarrollo de las formas parasitarias (vacuolas parasitóforas, granos de café y taquizoitos).

% Viabilidad de la cepa= Número de botes de cultivos parasitados x 100 de

$$\frac{\text{Neospora caninum}}{\text{Número total de botes de cultivos infectados inicialmente}}$$

Se determinó la **viabilidad post conservación de la cepa de *Neospora caninum***, en aquellos viales de la cepa que post descongelación en un determinado tiempo de incubación en los botes de cultivo, se observó el desarrollo de formas parasitarias (vacuolas parasitóforas, granos de café y taquizoitos).

% viabilidad post conservación = Número de botes infectados post descongelación

$$\frac{\text{x 100 de la cepa } Neospora caninum}{\text{Número total de botes infectados post descongelación}}$$

Se determinó el porcentaje de antígeno purificado a partir del cultivo celular, se realizó el recuento por campo de los taquizoitos formalinizados y las células Vero.

Porcentaje de antígeno purificado = Número de taquizoitos recuperados post
filtración por campo x 100

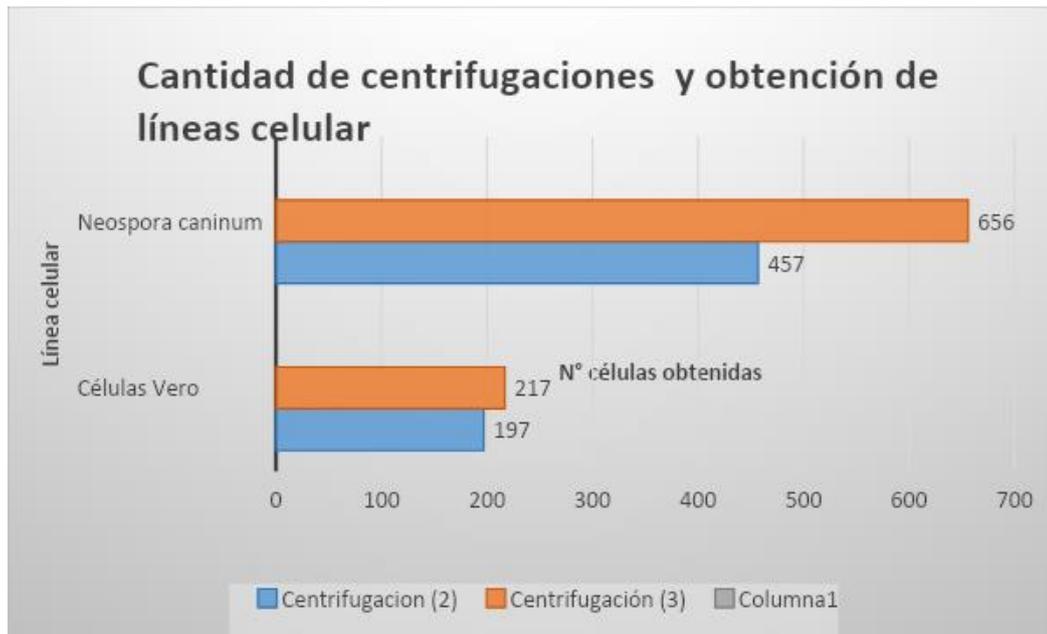
Número total células observadas por campo

VII. RESULTADOS

Se obtuvo con el empleo de la técnica de cultivo celular, una viabilidad de la cepa de *Neospora caninum* NC1 del 69.44% (25/36), realizando el pase continuo del parásito *in vitro* con uso de la línea celular Vero. Se realizaron hasta un total de 12 generaciones de la cepa, hasta conseguir el número de pase 29, y se utilizaron hasta 36 botes infectados.

En cuanto a la conservación de las líneas celulares, se observó la viabilidad del vial de la cepa *Neospora caninum* NC1 en su descongelación y mantenimiento en cultivo usando la línea celular Vero, hasta la visualización de formas parasitarias (vacuola parasitófora y taquizoitos) para definir su estabilidad. Se obtuvo un 67.50% (27/40) de viales viables con las cuales se pudo realizar la infección de las posteriores generaciones de células Vero, observándose a partir de los 10 días las primeras vacuolas parasitóforas. Siendo sólo un 32.50% (13/40) los viales no viables, dado que no se observó el desarrollo de ninguna de las formas parasitarias. Sólo se realizó la congelación de 8 generaciones, y el resto se empleó para el pase continuo infeccioso en la línea celular Vero.

En cuanto a la purificación del antígeno, se obtuvo cerca de un 70% (69.88%) de taquizoitos y el resto fue celular (30.12%), usando sólo 8 botes parasitados de 75cm² (promedio celular por campo/ 654), utilizando dos repeticiones de centrifugación con la técnica antes mencionada. Sin embargo, a medida que se utiliza mayor cantidad de botes de cultivo parasitado (10) (promedio celular por campo /873), y mayor cantidad de repeticiones en centrífuga (hasta tres veces) se obtuvo mayor cantidad de taquizoitos 217/ 873 (75.14%) y resto celular 656/873 (24.86%).



Gráfica 2. Centrifugaciones para la obtención de ambas células. En la gráfica, se observa que, a medida, de mayor cantidad de centrifugaciones era proporcional a obtener mayor cantidad de cepa *Neospora caninum* NC1.

Sobre la técnica de purificación, se obtuvieron hasta 15 viales formalinizados de la cepa *Neospora caninum* NC1 para ser usados en la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Se utilizaron hasta 20 muestras serológicas positivas de bovinos, comprendiendo positivas aquellas que tienen fluorescencia completa del parásito y negativas aquellas que se observaron en rojo o parcialmente fluorescente. Se utilizó en dos diluciones de muestra 1:50 (10 muestras) y 1:100 (10 muestras). Se observó fluorescencia completa en los taquizoitos formalizado del estudio, sin embargo, se observó poca concentración de los taquizoitos.

VIII. DISCUSIÓN

En el presente estudio produjo y purificó antígenos de *Neospora caninum* NC1 por primera vez en Perú, optimizando una técnica de cultivo celular con el empleo de la línea celular Vero, para comprobar satisfactoriamente la antigenicidad de los parásitos mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Según los resultados de la experiencia de cultivo celular con la línea celular Vero y la cepa *Neospora caninum* NC1, se tuvo al inicio dificultades para el desarrollo del mantenimiento y productividad de la cepa, como errores en la manipulación, errores de cálculos, contaminación y falta de material de trabajo y equipos. Se observó una viabilidad cerca del 70%, permitiendo superar las expectativas iniciales. La línea celular Vero ha sido utilizada en otros estudios, con una variabilidad de agentes, como parásitos, virus y bacterias; incluso ha servido para estudios de fabricación de vacunas como la poliomelitis y la rabia humana (Andrade *et al*, 2010; Oxford *et al*, 1987; Kistner *et al*, 1998). Se pudo mantener la cepa hasta conseguir una producción considerable, a pesar de las dificultades, se menciona que esta que la línea celular Vero es versátil y maneja una variable suplementación de medio de cultivos, se adapta rápidamente según el tipo de estudio y tiene gran resistencia y durabilidad (Yusilawati *et al*, 2010). Por lo que se logró observar un tapiz homogéneo continuo y estable. Sin embargo, otros autores mencionan que *Neospora caninum* puede observarse sin complicaciones utilizando otras líneas celulares como tapiz de base e incluso células de superficie (Lv *et al.*, 2010; Kargar *et al.*, 2013). Tal como se ha trabajado con las células Marc – 145, observando más del 80% de viabilidad de crecimiento del parásito con la cepa *Neospora caninum* infectando la monocapa del tapiz (Regidor-Cerrillo *et al*, 2011), a comparación de lo que se obtuvo en el presente estudio.

En la contaminación presente en el estudio, se realizó un diagnóstico de cultivo microbiológico encontrando entero bacterias. Afectó a ambas células inicialmente, pero la célula más afectada fue la cepa parasitaria (NC1). Razón por la cual se optó con aumentar la concentración del antibiótico (1,5%) y aplicar estrictamente los protocolos de bioseguridad y de asepsia durante el resto del estudio. Posteriormente, se pudo mantener estable el cultivo de la cepa para dar inicio a la producción de antígeno. En otros estudios, reportan otros agentes contaminantes como micoplasma, este tiene rápida multiplicación en cultivos por hacinamiento, se dificulta en diagnosticar y puede ocasionar pérdida de cultivos completos, se emplean pruebas rápidas (kit) para su diagnóstico con un 99% de sensibilidad y especificidad (Mariotti *et al.*, 2008; Taylor-Robinson *et al.*, 1991). Uno de los factores a tener en cuenta que puede dispersar la contaminación es tener una sola incubadora, como en el estudio para ambas células, ya que el microambiente sin protocolos de asepsia puede desencadenar una contaminación masiva.

Hubo reactivos y materiales que no se pudieron conseguir y se emplearon otros durante el mantenimiento y pases de las células. Se empleó Tripsina -EDTA. 0.25% Tripsina- EDTA (10X). Estéril. (Gibco® by Life Technologies), a comparación del que se utiliza en Europa, Tripsina más PEM, aunque la funcionalidad es la misma con variaciones en la concentración se pudo emplear satisfactoriamente.

En la técnica de pases de infección con *Neospora caninum* NC1 a la línea celular Vero, se utilizan en Europa los raspadores para remover la monocapa de forma homogénea de forma eficiente; en nuestro caso se utilizó sólo la pipeta de 5ml estéril la que se tuvo dificultades en usar debido a que no es plana la base y se dejaba espacio sin tocar en las esquinas del bote de cultivo, esto pudo provocar que no se captara la mayor capacidad de contenido influyendo en los resultados de recuperación posiblemente.

En el estudio se pudo trabajar con el medio líquido DMEM, a comparación del que se usa en Europa que es el polvo y se suspenden y esteriliza. El medio líquido ya está estéril y

para utilizar, este tiene mayor concentración que el medio MEM, se suplementó con suero fetal bovino (SFB) en concentraciones de 2% y 10%, y además se añadió 1% antibiótico inicialmente (1000 UI Penicilina, 10mg de Estreptomicina y 25 ug de Anfotericina B). Posteriormente, se aumentó a 1,5% por la contaminación inicial en el estudio. El medio es de suma importancia, por su vital función en el ambiente *in vitro*, su selección y suplementación es un diseño específico según los requerimientos del estudio (Sato y Kan, 2001). Saadatnia y colaboradores en el 2010, optimizaron el rendimiento, la pureza y la viabilidad de los taquizoitos de *T. gondii*, obteniendo parámetros medibles y confiables del cultivo con células Vero utilizando medio de cultivo DMEM, concluyendo que es un medio de cultivo compatible para el desarrollo de *Neospora caninum*, por la gran similitud de varios caracteres estructurales y fisiológicos entre ambos.

En cuanto al desarrollo del parásito post infección con las células Vero, se observó en siete días, y los siguientes pases de esta generación a partir del cuarto día. Sin embargo, al realizar la descongelación del parásito y post infección se observó a partir de los 10 días post inoculación, desarrollando las vacuolas parasitóforas, los granos de café (división) y taquizoitos. Los resultados discrepan de otros autores, que encontraron en pases continuos la infección celular (primeras 24 horas), posteriormente se genera en 8-10 horas la primera generación de taquizoitos (Hemphill *et al.*, 1999; Sundermann y Estridge, 1999). Además, mencionan que en un día y medio de la post infección se observan células infectadas con vacuolas parasitóforas con más de 10 taquizoitos dentro. Al quinto día post infección se observa la destrucción de la monocapa y el tapiz entero. Esto refiere que la replicación del parásito es constante dentro un microambiente en condiciones ideales que facilitan su replicación clonal con una eficiencia de la tasa poblacional celular parasitaria *in vitro* (Pérez - Zaballos *et al.*, 2005). Es posible que, los cambios micro ambientales y factores externos sean condicionantes para el desenvolvimiento del parásito en el estudio, así como el tipo de cepa, siendo las cepas más virulentas Nc-Liverpool y NC-Sp7; y los de menor

virulencia dentro de ellos Nc-Sp1 a comparación de Nc-1 (Pereira García-Melo *et al.*, 2010; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2008; Rojo-Montejo *et al.*, 2009). Esto se tendría en consideración en nuestros resultados debido a que la cepa demostró ser infectiva, pero con baja tasa de infección celular, como lo demostrado en el estudio.

En la conservación de las células, se observó la viabilidad del vial de la cepa *Neospora caninum* NC1 desde su descongelación, esto define su estabilidad, hasta observar formas parasitarias como vacuolas parasitóforas, “granos de café” y taquizoitos activos. Se obtuvo más del 65% de viales que, tras su descongelación y mantenimiento post infección en cultivo, se observaron a partir de los 10 días las primeras vacuolas parasitóforas. No se obtuvo más del 80% de viabilidad en la descongelación de las células, ya que al utilizar el DMSO como criopreservantes es posible que haya aumentado las pérdidas celulares por su manipulación a comparación del uso de glicerol como mencionó Siddiqui y colaboradores en otros estudios (2015). Factores que se deben de tomar en cuenta son: el tiempo para reducir las pérdidas en este proceso al reactivar los viales, la temperatura del medio de cultivo y la destreza del operario para la técnica. Esto concuerda con la importancia de la técnica, debido a que, si existió una buena conservación de las células en nitrógeno líquido, no perderán su infectividad, su estructura y características durante el cultivo celular y en los pases *in vivo* tras la congelación (Dubey *et al.*, 2002; Speer y Dubey, 1989; Lindsay *et al.*, 1993).

En la purificación del antígeno, se manejó con los botes de cultivo de 75cm² con 4 a 5 días de post infección, se pudo obtener cerca del 75% de taquizoitos y el resto fue celular, usando hasta 10 botes infectivos, con tres repeticiones de centrifugación de la técnica antes mencionada. El resultado fue lo más cercano que se obtuvo a los parámetros que indica Trees y colaboradores (1993), con un 20% en resto células y el 80% son antígeno. Estos viales formalinizados, se utilizaron para ser probados en la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI), con 20 muestras serológicas positivas confirmadas de bovinos, en

diluciones de muestra de 1:50 y 1:100. Se obtuvo la fluorescencia completa de los taquizoitos fijados, poco intensa y se observó una cantidad reducida de taquizoitos por pocillo a comparación del utilizado como estándar. Es posible que el realizar el procedimiento de purificación de forma manual a comparación de la automatizada, haya sido uno de los factores para la obtención de una cantidad final de taquizoitos reducida y acompañada de células. Otros factores a tomar en cuenta son, el no utilizar raspadores y sólo pipetas para la liberación del tapiz de la monocapa, la capacidad virulenta de la cepa, el número de centrifugaciones realizadas, errores en el conteo celular, el porcentaje de formol utilizado para preservar los taquizoitos, y no contar con el equipo para el procedimiento de purificación, sean aquellos que limitaron la obtención de mayor concentración del parásito. Otros estudios, realizan adicionalmente a este proceso, el uso del sonicador para romper enlaces de células y el parásito, así mismo para una mejor purificación completa sin restos celulares se utiliza las columnas PD-10 (Sephadex G-25) (GE-Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), obteniendo taquizoitos puros a gran concentración y posteriormente se utilizan los antígenos para pruebas diagnósticas diversas (Hemphill *et al*, 1996). Esta técnica completa es manejada en Europa como parte de los protocolos y procedimientos a conseguir una purificación de antígeno neospora. Esto servirá para producir antígenos propios que sirvan a su vez para hacer diagnóstico y caracterizar proteínas antigénicas que sirvan como candidatos vacunales primero en modelos de laboratorio (ratón, conejo) y luego en campo. Para evaluar modelos de infectividad, respuesta inmune que permiten comprender mejor la interacción y por ende direccionar o diseñar una mejor terapéutica.

IX. CONCLUSIONES

Se realizaron modificaciones en la técnica de cultivo celular para el desarrollo del mantenimiento y la producción de la cepa de *Neospora caninum* NC1 en un tapiz de células Vero.

El antígeno producido en el estudio reveló fluorescencia completa del taquizoito, pero no se obtuvo la concentración deseada para ser usada en la Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

La contaminación bacteriana y la falta de protocolos de bioseguridad y asepsia fueron los factores que se presentaron inicialmente como impedimento para el desarrollo del estudio.

X. RECOMENDACIONES

Se recomienda implementar el equipo de sonicador y empleo de columnas (GE-Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) para realizar de forma completa la purificación del antígeno.

Se sugiere emplear glicerol en vez del DMSO para obtener menor pérdida de células al descongelamiento.

Se debe implementar protocolos de asepsia, biocontaminación de forma exclusiva para cada procedimiento de cultivo celular y así evitar contaminaciones futuras.

Emplear otro tipo de células para el crecimiento del parásito, para ampliar las variedades de desenvolvimiento de la cepa NC1.

Se sugiere conservar la cepa parasitaria en forma *in vitro* en murinos de laboratorio de forma experimental.

Se sugiere proseguir con lo estudiado y realizar mayores investigaciones sobre el tema, dado que es la primera vez en Perú que se ha realizado el estudio y comprende una gran información para dar inicio a la búsqueda de la cepa autóctona del Perú.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Anderson, M. L., Blanchard, P. C., Barr, B. C., Dubey, J. P., Hoffman, R. L., Conrad, P. A. (1991).** Neospora-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 198(2), 241-244.
2. **Anderson, M., Andrianarivo, A., Conrad, P. (2000).** Neosporosis in cattle. *Anim Reprod Sci*, (60-61) 417–431.
3. **Andrade, L. O., Galvao, L. M., Meirelles, M de N., Chiari, E., Pena, S. D., Macedo, A. M. (2010).** Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an in vitro study. *The Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(6), 834-837.
4. **Almería, S., Calvete, C., Pages, A., Gauss, C., Dubey, J. P. (2004).** Factors affecting the seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from Spain. *Veterinary Parasitology*, 123(3-4), 265-270.
5. **Álvarez-García, G., Collantes-Fernández, E., Costas, E., Rebordosa, X., Ortega-Mora, L. M. (2003).** Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods in bovine neosporosis. *Veterinary Research*, 34(3), 341-352.
6. **Ammerman, N. C., Beier-Sexton, M., Azad, A. F. (2008).** Growth and maintenance of Vero cell lines. *Current Protocols in Microbiol*, 10, Appendix–4E.doi: 10.1002/9780471729259.mca04es11.
7. **Atocsa, J., Chávez, A., Casas, E., Falcón, N. (2005).** Seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos lecheros criados al pastoreo en la provincia de Melgar-Puno. *Revista de Investigación Veterinaria del Perú*, 16(1), 70-75.

8. **Barr, B.C., Anderson, M.L., Woods, L.W., Dubey, J. P., Conrad, P.A. (1992).** Neospora-like protozoal infections associated with abortion in goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 4(3), 365-367.
9. **Barr, B.C, Dubey, J.P., Lindsay, D., Reynolds, J., Wells, S. (1998).** Neosporosis: its prevalence and economic impact. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, (20), 1-16.
10. **Bartels, C.J., Arnaiz-Seco, J.I., Ruiz-Santa-Quitera, A., Björkman, C., Frössling, J., von Blumröder, D., Conraths, F.J., Shares, G., Wouda, W., Ortega-Mora, L.M. (2006).** Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. *Vet Parasitol* 137(1-2), 17-27.
11. **Basso, W., Venturini, L., Venturini, M., Hill, M., Kwok. O., Shen, J. Dubey. (2001).** First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *J. Parasitol.* 87: 612-618.
12. **Beckers, C., Wakefield, T., Joiner, K., (1997).** The expression of Toxoplasma proteins in *Neospora caninum* and the identification of a gene encoding a novel rhostry protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* 89, 209–223.
13. **Bildfell, R., Davidson, J., Dubey, J. (1994).** Neospora-induced protozoal bovine abortion in Prince Edward Island. *Can Vet J*, 35(2), 122.
14. **Bjerkas, I., Dubey, J. (1991).** Evidence that *Neospora caninum* is identical to the Toxoplasma-like parasite of Norwegian dogs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 32(3), 407-410.
15. **Bjerkas, I., Presthus, J. (1989).** The neuropathology in toxoplasmosis-like infection caused by a newly recognized cyst-forming sporozoon in dogs. *APMIS*, 97(5), 459-468.
16. **Bjorkman, C., Uggl, A. (1999).** Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *International Journal for Parasitology*, 29(10), 1497-1507.

17. **Bryan, L.A., Gajadhar, A.A., Dubey, J.P., Haines, D.M. (1994).** Bovine neonatal encephalomyelitis associated with a *Neospora* sp. protozoan. *Can. Vet. J.* 35 (2), 111.
18. **Boulton, J., Gill, P., Cook, R., Fraser, G., Harper, P., Dubey, J. (1995).** Bovine *Neospora* abortion in north-eastern New South Wales. *Aust Vet J*, 72, 119-120.
19. **Buxton, D., McAllister, M., Dubey, J. (2002).** The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends in Parasitology*, 18 (12) 546-552.
20. **Cannas, A., Naguleswaran, A., Muller, N., Eperon, S., Gottstein, B., Hemphill, A. (2003).** Vaccination of mice against experimental *Neospora caninum* infection using Nc. *Parasitology*, 126(4), 303-312.
21. **Collantes-Fernández, E., Arrighi, R. B., Álvarez-García, G., Weidner, J. M., Regidor-Cerrillo, J., Boothroyd, J. C., Ortega-Mora, L. M., Barragan, A. (2012).** Infected dendritic cells facilitate systemic dissemination and transplacental passage of the obligate intracellular parasite *Neospora caninum* in mice. *PLOS ONE*, 7(3), e32123. doi: org/10.1371/journal.pone.0032123
22. **Collantes-Fernandez, E., Rodriguez-Bertos, A., Arnaiz-Seco, I., Moreno, B., Aduriz, G., Ortega-Mora, L. (2006).** Influence of the stage of pregnancy on *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions in aborted bovine fetuses. *Theriogenology*. 65, 629-641.
23. **Doverskog, M., Ljunggren, J., Ohman, L., Haggstrom, L. (1997).** Physiology of cultured animal cells. *Journal of Biotechnology*, 59(1-2), 103-115.
24. **Dubey, J., Hattel, J., Lindsay, A., Topper, D. (1988).** Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 193, 1259-1263.
25. **Dubey, J. (1999).** Neosporosis in cattle: biology and economic impact. *Journals- American Veterinary Medical Association*, 214(8) 1160-1163.

26. **Dubey, J.P., (2005).** Neosporosis in cattle. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 21 (2), 473-483.
27. **Dubey, J.P., Barr, B.C., Barta, J.R., Bjerkas, I., Björkman, C., Blagburn, B.L., Bowman, D.D., Buxton, D., Ellis, J.T., Gottstein, B., Hemphill, A., Hill, D.E., Howe, D.K., Jenkins, M.C., Kobayashi, Y., Koudela, B., Marsh, A., Mattsson, J.G., McAllister, M.M., Modrý, D., Omata, Y., Sibley, L.D., Speer, C.A., Trees, A.J., Ugglá, A., Upton, S., Williams, D.J, Lindsay, D.S. (2002).** Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *International Journal for Parasitology*, 32(8), 929-946.
28. **Dubey, J.P., Buxton, D., Wouda, W. (2006).** Pathogenesis of bovine neosporosis. *Journal of Comparative Pathology*, 134(4) 267-289.
29. **Dubey, J. P, Lahunta, A. (1993).** Neosporosis associated congenital limb deformities in a calf. *Applied Parasitology*, 34, 229-233.
30. **Dubey, J.P., Lindsay, D.S. (1990).** *Neospora caninum* induced abortion in sheep. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2(3), 230-233.
31. **Dubey, J.P., Lindsay, D.S. (1996).** A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*, 67(1-2), 1-59.
32. **Dubey J.P., (2003).** Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean journal of parasitology* 41 (1), 1-16.
33. **Dubey, J.P., Schares, G. (2006).** Diagnosis of bovine neosporosis. *Veterinary Parasitology*. 140(1-2), 1-34.
34. **Dubey, J.P., Schares, G., Ortega-Mora, L., (2007).** Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(2), 323-367.
35. **Dubey, J.P., Sreekumar, C., Knickman, E., Miska, K.B., Vianna, M.C., Kwok, O.K., Hill, D.E., Jenkins, M.C., Lindsay, D.S., Greene, C.E. (2004).** Biologic,

- morphologic, and molecular characterization of *Neospora caninum* isolates from littermate dogs. *International Journal for Parasitology*, 34(10), 1157-1167.
36. **Duivenvoorden, J., Lusi, P. (1995).** Neospora abortions in eastern Ontario dairy herds. *Can Vet J.* 36, 323.
37. **Ellis, J., Luton, K., Baverstock, P.R., Brindley, P.J., Nimmo, K.A., Johnson, A.M. (1994).** The phylogeny of *Neospora caninum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 64(2), 303-311.
38. **Esposito, M., Stettler, R., Moores, S. L., Pidathala, C., Muller, N., Stachulski, A., Berry, N. G., Rossignol, J. F., Hemphill, A. (2005).** In vitro efficacies of nitazoxanide and other thiazolides against *Neospora caninum* tachyzoites reveal antiparasitic activity independent of the nitro group. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 49(9), 3715-3723.
39. **Ferre, I., Aduriz, G., Del-Pozo, I., Regidor-Cerrillo, J., Atxaerandio, R., Collantesfernández, E., Hurtado, A., Ugarte-garagalza, C., Ortega-Mora, L.M. (2005).** Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. *Theriogenology*, 63, 1504–1518.
40. **Frossling, J., Lindberg, Ann., Nodtvedt, A., Björkman, C. (2008).** Spatial analysis of *Neospora caninum* distribution in dairy cattle from Sweden. *Geospatial Health* 3(1), 39-45.
41. **Gamarra, M. (2001).** Situación actual y perspectivas de la ganadería lechera en la cuenca de Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias de Perú*, 12 (2), 1-13.
42. **Granadoz, S., Rivera, H., Casas, E., Suárez, F., Arana, C., Chávez, A. (2014).** Seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos lecheros de cuatro distritos del valle de Mantaro, Junín. *Rev Inv Vet Perú*.25 (1): 58-64.
43. **Gondim, L., McAllister, M. M., Mateus-Pinilla, N. E., Pitt, W. C., Mech, L. D., Nelson, M. E. (2004).** Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. *Journal of Parasitology*, 90(6), 1361-1365.

44. **Gunning, R, Gumbrell, R., Jeffrey, M. (1994).** Neospora infection and congenital ataxia in calves. *The Veterinary Record*, 134 (21), 558
45. **Guo, Z., Johnson, A. (1995).** Genetic comparison of *Neospora caninum* with Toxoplasma and Sarcocystis by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. *Parasitology Research*, 81(5), 365-370.
46. **Guy, C., Williams, D., Kelly, D., McGarry, J., Guy, F., Björkman, C., Smith, R., Trees, A. (2001).** *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. *The Veterinary Record*, 149, 443-449.
47. **Hemphill, A., Gottstein, B., Kaufmann, H. (1996).** Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. *Parasitology*, 112(2), 183-197.
48. **Hemphill A, Fuchs N, Sonda S, Hehl A. (1999).** The antigenic composition of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, 29(8), 1175-1188.
49. **Higashi, N., Matsumoto, A., Tabaka, K., Nagatomo, Y. (1967).** Electrón microscope study of development of Chikungunya virus in green monkey Kidney (VERO) cells. *Virology*, 33, 55-69.
50. **Hobson, J., Duffield, T., Kelton, D., Lissemore, K., Hietala, S., Leslie, K. (2005).** Risk factors associated with *Neospora caninum* abortion in Ontario Holstein dairy herds. *Vet. Parasitol*, 127, 177–188.
51. **Howe, D., Sibley, L., (1997).** Development of molecular genetics for *Neospora caninum*: a complementary system to *Toxoplasma gondii*. *Methods: A companion to methods in enzymology*, 13, 123–133.
52. **Instituto Nacional de Estadística e Informática. (1994).** Manual del Empadronador: III Censo Nacional Agropecuario. (p.96). Lima: Dirección Técnica de Censos y Encuestas.
53. **Innes, E. A., Wright, S. E., Maley, S., Rae, A., Schock, A., Kirvar, E., Bartley, P., Hamilton, C., Carey, I. M., Buxton, D. (2001).** Protection against vertical

- transmission in bovine neosporosis. *International Journal for Parasitology*, 31(13), 1523-1534.
54. **Kargar, M., Mojaver, S., Namavari, M., Sayari, M., Rahimian, A. (2003)** Suspension culture of *Neospora caninum* by *Theileria annulata* infected cell line. *Trop Biomed*, 30, 349-354.
 55. **King, J. S., Šlapeta, J., Jenkins, D. J., Al-Qassab, S. E., Ellis, J. T., Windsor, P. A. (2010)**. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, 40(8), 945-950.
 56. **Kistner, O., Barrett, P.N., Mundt, W., Reiter, M., Schober-Bendixen, S., Darner, F. (1998)**. Development of a mammalian cell (Vero) derived candidate influenza virus vaccine. *Vaccine*, 16(9-10), 960-968.
 57. **Kobayashi, Y., Yamada, M., Omata, Y., Koyama, T., Saito, A., Matsuda, T., Okuyama, K., Fujimoto, S., Furuoka, H., Matsui, T., (2001)**. Naturally-occurring *Neospora caninum* infection in an adult sheep and her twin fetuses. *J Parasitol*, 87, 434–436.
 58. **Lindsay, D.S., Dubey, J.P. (1989)**. In vitro development of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) from dogs. *Journal of Parasitology*, 75(1), 163–165.
 59. **Lindsay, D. S., Speer, C.A, Toivio-Kinnucan, M.A., Dubey, J.P., Blagburn, B.L. (1993)**. Use of infected cultured cells to compare ultrastructural features of *Neospora caninum* from dogs and *Toxoplasma gondii*. *American Journal of Veterinary Research*, 54(1), 103-106.
 60. **Lindsay, D., Upton, S., Dubey, J. (1999)**. A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. *Int J Parasitol.* 29, 1521–1523.
 61. **Lv, Q., Xing, S., Gong, P., Chang, L., Bian, Z., Wang, L., Zhang, X., Li, J. (2015)**. A 78 kDa host cell invasion protein of *Neospora caninum* as a potential vaccine candidate. *Experimental parasitology*, 148, 56 - 65

62. **Maley, S.W., Buxton, D., Rae, A.G., Wright, S.E., Schock, A., Bartley, P.M., Esteban-Redondo, I., Swales, C., Hamilton, C., Sales, J., Innes, E.A. (2003).** The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at mid-gestation. *Journal of Comparative Pathology*, 129(2-3), 186-195.
63. **Mariotti, E., Mirabelli, P., Di Noto, R., Fortunato, G., Salvatore, F. (2008).** Rapid detection of mycoplasma in continuous cell lines using a selective biochemical test. *Leuk Res*, 32(2), 323-326.
64. **McAllister, M.M., Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Jolley, W.R., Wills, R. A., McGuire, A.M. (1998).** Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, 28(9), 1473-1478.
65. **McGarry, J., Stockton, C., Williams, D., Trees, A., (2003).** Protracted shedding of oocysts of *Neospora caninum* by a naturally infected foxhound. *J. Parasitol*, 89, 628–630.
66. **Miller, C., Quinn, H., Windsor, P., Ellis, P. (2002).** Characterisation of the first Australian isolate of *Neospora caninum* from cattle. *Australian Vet. J.* 80, 620-625
67. **Ministerio de agricultura y riego (2001).** Censo nacional de unidades especializadas de producción pecuaria intensiva (UEPPI) 2000. (p.143). Lima.
68. **Miró G, Alonso A, Frisuelos C, Martín L. (1999).** Etiología y biología. En: *Patología de la reproducción de etiología parasitaria (II): Neosporosis*. Rev. Aula Veterinaria Bovis, 88, 11-17.
69. **Mitreá, I., Enachescu, V., Radulescu, R., Ionita, M. (2012).** Seroprevalence of *Neospora caninum* infection on dairy cattle in farms from southern Romania. *Journal of Parasitology*, 98, 69-72
70. **Moore, D.P. (2005).** Neosporosis in South America. *Veterinary Parasitology*, 127(2), 87-97pp.

71. **Moya, R., Chávez, A., Casas, E., Serrano, E., Falcón, N., Pezo, D. (2003).**
Seroprevalencia de *Neospora caninum* en llamas de la provincia de Melgar, Puno.
Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 14(2), 155-160pp.
72. **Muller, N., Vonlaufen, N., Gianinazzi, C., Leib, S. L., Hemphill, A. (2002).**
Application of real-time fluorescent PCR for quantitative assessment of *Neospora caninum* infections in organotypic slice cultures of rat central nervous system tissue. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(1), 252-255.
73. **Ortega-Mora, L. M., Fernández-García, A., Gómez-Bautista, M. (2006).**
Diagnosis of bovine neosporosis: Recent advances and perspectives. *Acta Parasitologica*, 51(1), 1-14.
74. **Ortega-Mora, L. M., Ferre, I., Del Pozo, I., Caetano-da-Silva, A., Collantes-Fernández, E., Regidor- Cerrillo, J., Ugarte-Garagalza, C., Aduriz, G. (2003).**
Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. *Veterinary Parasitology*, 117(4), 301-308.
75. **Oxford, J. S., Corcoran, T., Knott, R., Bates, J., Bartolomei, O., Major, D., Newman, R. W., Yates, P., Robertson, J., Webster, R. G., Schild G C. (1987).** Serological studies with influenza A (H1N1) viruses cultivated in eggs or in a canine kidney cell line (MDCK). *Bull World Health Organ*, 65(2), 181–187.
76. **Paré, J., Thurmond, M., Hietala, M. (1996).** Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. *Can.J.Vet.Res.* 60:133-139.
77. **Patitucci, A., Pérez, M., Luders, C., Ratto, M., Dumont, A. (1999).** Evidencia serológica de infección por *Neospora caninum* en rebaños lecheros del sur de Chile. *Arch Med Ve*, 31, 215-218.
78. **Pereira-Bueno, J., Quintanilla-Gozaolo, A., Pérez-Pérez, V., Espi-Felgueroso, A., Álvarez-García, G., Collantes-Fernández, E., Ortega-Mora, L. (2003).**

- Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. *Vet Parasitol*, 111, 143-152
79. **Pereira García- Melo, D., Regidor-Cerillo, J., Collantes-Fernández, E., Ortega –Mora, L. M. (2010).** Pathogenic characterization in mice of *Neospora caninum* isolates obtained from asymptomatic calves. *Parasitology*, 137(7), 1057-1068.
80. **Pérez-Zaballos, F.J, Ortega-Mora, L.M, Álvarez-García, G., Collantes-Fernandez, E., Navarro-Lozano, V., García- Villada, L., Costas, E. (2005).** Adaptation of *Neospora Caninum* isolates to cell-culture changes: An argument in favor of its clonal population structure. *J. Parasitol.* 91(3): 507-510.
81. **Perulactea. (2011).** Lima: Blog Personal Hans Andresen (Internet (15 diciembre 2011). Disponible en: <http://www.handresen.perulactea.com/2009/05/19/capitulo-8-problemas-reproductivos/>
82. **Peters, M., Wagner, F., Schares, G. (2000).** Canine neosporosis: clinical and pathological findings and first isolation of *Neospora caninum* in Germany. *Parasitology Research*, 86(1), 1-7.
83. **Peters, M., Lutkefels, E., Heckerroth, A., Schares, G. (2001).** Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. *Int J Parasitol*, 31, 1144–1148.
84. **Piergili, F., Pasquali, P., Diaferia, M., Mangili, V., Rosignoli, L. (2003).** *Neospora caninum* infection and congenital transmisión: serological and parasitological study of cow up to the fourth gestation. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 50 (8), 399-404.
85. **Puray, N., Chávez, A., Casas, E., Falcón, N., Casas, G. (2006).** Prevalencia de *Neospora caninum* en bovinos de una empresa ganadera de la Sierra Central del Perú. *Rev Inv Vet Perú*, 17, 189-194.

86. **Quevedo, V., Chávez, A., Rivera H., Casas., E; Serrano, E. (2003).** Neosporosis en bovinos lecheros en dos distritos de la provincia de Chachapoyas. *Rev. Inv. Vet., Perú.* (14), 33-37.
87. **Quintanilla-Gozalo, A., Pereira-Bueno, J., Tabarés, E., Innes, E.A., González-Paniello, R., Ortega-Mora, L.M. (1999).** Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Spain. *Int. J. Parasitol.* 29, 1201-1208.
88. **Regidor-Cerrillo, J. Gómez-Bautista, M., Pereira-Bueno, J., Aduriz, G., Navarro-Lozano, V., Risco-Castillo, V., Fernandez-García, A., Pedraza-Díaz, S., Ortega-Mora, L, M. (2008).** Isolation and genetic characterization of *Neospora caninum* from asymptomatic calves in Spain. *Parasitology*, 135(14), 1651–1659.
89. **Regidor- Cerrillo, J., Gómez- Bautista, M., Sodupe, I., Aduriz, G., Álvarez-García, G., Del Pozo, I., Ortega-Mora, L. (2011).** *In vitro* invasion efficiency and intracellular proliferation rate comprise virulence - related phenotypic traits of *Neospora caninum*. *Veterinary research*, 42 (1), 41.
90. **Rojo-Montejo, S., Zabala-Martínez, J., Vázquez-Moreno, E., Collantes-Fernández, E., Loste- Montoya, J. M., Ortega-Mora, L. M. (2009).** Relevancia de la transmisión horizontal de *Neospora caninum* en rebaños bovinos españoles. XIV Congreso Internacional ANEMBE de Medicina Bovina. España- La Coruña: Comunicación oral.
91. **Romero, J. J., Pérez, E., Frankena, K. (2004).** Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rican dairy cows under field conditions. *Veterinary Parasitology*, 123(3-4), 149-159.
92. **Saadatnia, G., Haj Ghani, H., Khoo, B. Y., Maimunah, A., Rabmah, N. (2010).** Optimization of *Toxoplasma gondii* cultivation in Vero cell line. *Tropical Biomedicine*, 27(1), 125-130.

93. **Saltzman, W. M. (2004).** Tissue engineering: principles for the design of replacement organs and tissues. Oxford: Oxford University Press.
94. **Schares, G., Bärwald, A., Staubach, C., Ziller, M., Klöss, D., Schröder, R., Labohm, R., Drager, K., Fasen, W., Hess, R., Conraths, F. (2004).** Potential risk factors for bovine *Neospora caninum* infection in Germany are not under the control of the farmers. *J Parasitol*, 129 (3), 301-309.
95. **Slapeta, J., Modry, D., Kyselova, I., Horejs, R., Lukes, J., Koudela, B., (2002).** Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. *Vet. Parasitol.* 109, 157-167.
96. **Sato, J. D., Kan, M. (2001).** Media for culture of mammalian cells. *Curr Protoc cell Biol*, 1:1-2.
97. **Siddiqui, M. S., Giasuddin, M., Chowdhury, S., Islam, M. R., Chowdhury, E. H. (2015).** Comparative effectiveness of dimethyl sulphoxide (DMSO) and glycerol as cryoprotective agent in preserving Vero cells. *Bangladesh Veterinarian*, 32(2), 35 – 41.
98. **Sawada, M., Kondo, H., Tomioka, Y., Park, C., Morita, T., Shimada, A., Umemura, T. (2000).** Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected adult dairy cow. *Vet Parasitol*, 90(3), 247–252.
99. **Serrano-Martinez, E., Collantes-Fernandez, E., Chavez-Velasquez, A., Rodriguez-Bertos, A., Casas-Astos, E., Risco-Castillo, V., Rosadio-Alcantara, R., Ortega-Mora, L. M. (2007).** Evaluation of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in alpaca (*Vicugna pacos*) and llama (*Lama glama*) aborted foetuses from Peru. *Veterinary Parasitology*, 150, 39-45.
100. **Silva, P., Chávez, A., Rivera, H., Casas, E. (2002).** Seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos lecheros del valle de Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 13(2), 51-55.

101. **Speer, C. A., Dubey, J.P. (1989).** Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum*. *The Journal of Protozoology*, 36(5), 458- 463.
102. **Sundermann, C., Estridge, B. (1999).** Growth of and competition between *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in vitro. 29(10), 1725-1732.
103. **Taylor-Robinson, D., Daviest, H. A., Sarathchandrat, P., Furr, P. M. (1991).** Intracellular location of mycoplasmas in cultured cells demonstrated by immunocytochemistry and electron microscopy. *International Journal of Experimental Pathology*, 72(6), 705–714.
104. **Thornton, R.N., Thompson, E.J., Dubey, J.P. (1991).** Neospora abortion in New Zealand cattle. *The New Zealand Veterinary Journal*. 39(4), 129-133.
105. **Trees, A. J., Guy, F., Tennant, B. J., Balfour, A. H., Dubey, J. P. (1993).** Prevalence antibodies to *Neospora caninum* in a population of urban dog in England. *Veterinary Record*, 132(6), 125-126.
106. **van Maanen, C., Wouda, W., Schares, G., von Blumroeder, D., Conraths, F. J., Norton, R., Williams, D. J., Esteban-Redondo, I., Innes, E. A., Mattsson, J. G., Bjorkman, C., Fernández-García, A., Ortega-Mora, L. M., Muller, N., Sager, H., Hemphill, A. (2004).** An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. *Veterinary Parasitology*, 126(4), 351-364.
107. **von Blumroeder D, Schares G, Norton R, Williams D J, Esteban-Redondo I, Wright S, Bjorkman C, Frossling J, Risco-Castillo V, Fernández-García A, Ortega-Mora L M, Sager H., Hemphill A, van Maanen C, Wouda W, Conraths F. J. (2004).** Comparison and standardization of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in bovines. *Veterinary Parasitology*, 120(1-2), 11-22.

108. **Vega, L., Chávez, A., Falcón, N., Casas, E., Puray, N. (2010).** Prevalencia de *Neospora caninum* en perros pastores de una empresa ganadera de la sierra sur del Perú. *Rev. Invest. Vet.*, 21, 80-86
109. **Weiss, L. M., Ma, Y., Halonen, S., McAllister, Zhang, Y. (1999).** The in vitro development of *Neospora caninum* bradyzoites. *Int. J. Parasitol.* 29:1713–1723.
110. **Williams, D., Guy, C., Smith, R., Ellis, J., Björkman, C., Reichel, M., Trees, A. (2007).** Immunization of cattle with live tachyzoites of *Neospora caninum* confers protection against fetal death. *Infection and immunity*, 75 (3), 1343 – 1348.
111. **Williams, D., Hartley, C., Bjorkman, C., Trees, A. (2009).** Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* – how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. *Parasitology*, 136, 1895–1900.
112. **Wouda, W., Moen, A., Schukken, Y. (1998).** Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. *Theriogenology*, 49, 1311–1316.
113. **Yusilawati, A. N., Nurul, H. S., Maizirwan, M., Hamzah, M. S., Iis, S. (2010).** The growth study of Vero cells in different type of microcarrier. *Materials Sciences and Applications*, 1, 261-266.

XII. GLOSARIO

Alícuota. - Cantidad que se toma de un volumen inicial o de una masa para ser usada en el laboratorio

Antígeno. - Molécula capaz de desencadenar una reacción inmunológica de anticuerpos

Bisel. - Borde de aguja que está cortado oblicuamente punzo cortante

Confluyente. - Alta densidad de células adherentes. Medida de proliferación celular

Decantar. - Eliminar por trasvasación las impurezas o cuerpos extraños luego de un precipitado

In vitro. - Técnica para realizar un determinado experimento en un tubo de ensayo o generalmente en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.

Mono capa. - Aquellas células que crecen adheridas sobre un soporte sólido.

Semiconfluyente. - Mediana densidad de células adherentes

Pleomórficas. - Aparición de dos o más formas estructurales de un organismo durante su ciclo de vida.

Poligonales. - Forma geométrica plana de composición finita con segmentos rectos consecutivos que encierran una región en el plano.

Purificación. - Capacidad de colectar células o moléculas con fin diagnóstico

Sedimento. - Es un conjunto de sólidos que se depositan en el fondo de un recipiente

Sobrenadante. - En su conjunto soluciones que permanecen tras la formación de un precipitado

Viabilidad. - Capacidad de supervivencia celular ante un microambiente nuevo y bajo evaluación.

Tripsinización. - Proceso por el cual se rompe los enlaces de proteínas mediante hidrólisis

XIII. ANEXOS

LISTA DE REACTIVOS

Tampón PBS 10x

NaCl 80gr.
KCl 3gr.
Na₂HPO₄ x H₂O 1,8gr.
N₂H₂PO₄ 0,2gr.

Medio de cultivo para línea celular Vero

Medio líquido DMEN 500ml
SFB 2% (10ml)
Antibiótico 1% (5ml)

Medio de cultivo para cepa SPN1

Medio líquido DMEN 500ml
SFB 10% (50ml)
Antibiótico 1% (5ml)

SFB inactivo

Activación con baño María a 56°C
Alícuota en tubo cónico de 50ml
Refrigerar a -20°C

XIV. LISTA DE FIGURAS

Imagen 1: Mantenimiento de la línea célula Vero

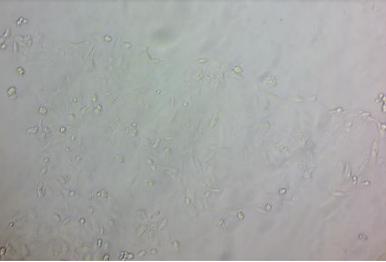
		
<p>Imagen A. Preparación de materiales, reactivos en cámara de flujo laminar.</p>	<p>Imagen B. Observación de botes en Microscopio invertido.</p>	<p>Imagen C. Observación de tapiz joven formando una monocapa.</p>
		
<p>Imagen D. Cambio de medio de cultivo nuevo.</p>	<p>Imagen E. Bote con medio de cultivo adecuado para el crecimiento de las células Vero</p>	<p>Imagen F. Primeros mantenimientos de botes de cultivo con línea celular Vero.</p>

Imagen 2: Mantenimiento de la cepa *Neospora caninum*

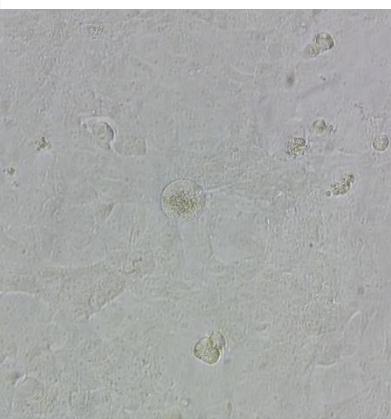
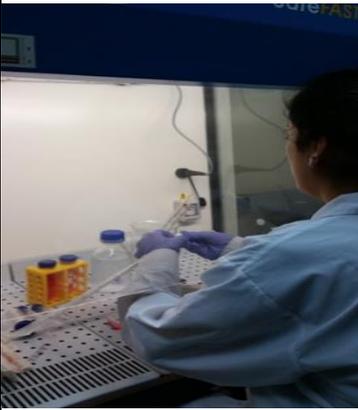
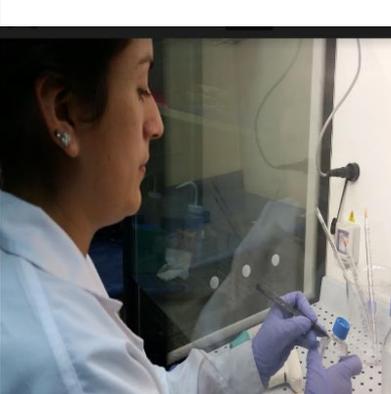
		
<p>Imagen A. Preparación de materiales, reactivos en cámara de flujo laminar</p>	<p>Imagen B. Observación de botes de cultivo con el microscopio electrónico.</p>	<p>Imagen C. Observación de un bote de células Vero con una vacuola parasitófora en formación.</p>
		
<p>Imagen D. Eliminación de medio de cultivo viejo por decantación.</p>	<p>Imagen E. Colocación de medio de cultivo nuevo.</p>	<p>Imagen F. Rotulación de fecha de cambio de medio de cultivo.</p>

Imagen 3: Pases en la línea célula Vero

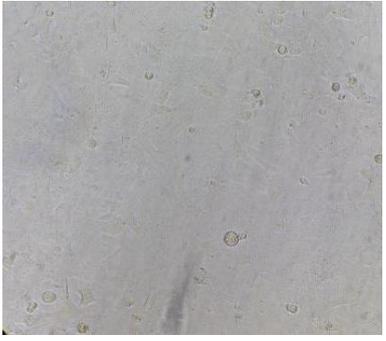
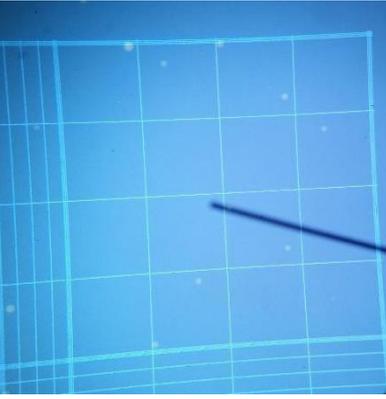
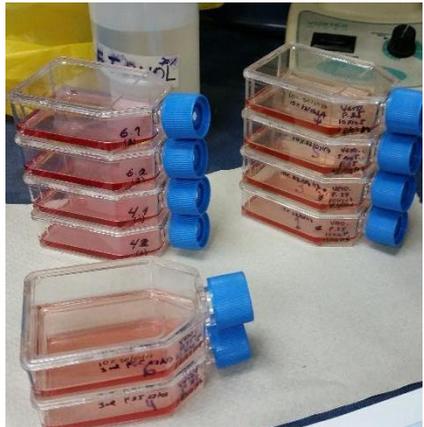
		
<p>Imagen A. Preparación de materiales, reactivos en cámara de flujo laminar.</p>	<p>Imagen B. Observación de línea celular Vero de monocapa confluyente</p>	<p>Imagen C. Eliminación de medio de cultivo antiguo.</p>
		
<p>Imagen D. Tripsinización de botes en cámara de CO₂.</p>	<p>Imagen E. Conteo de células viables en la cámara de Neubauer.</p>	<p>Imagen F. Botes de células nuevas para ser usados posteriormente.</p>

Imagen 4: Pases en la cepa *Neospora caninum* de origen bovino.

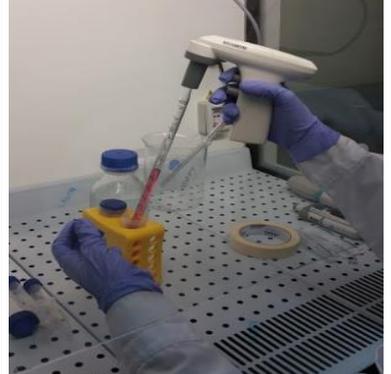
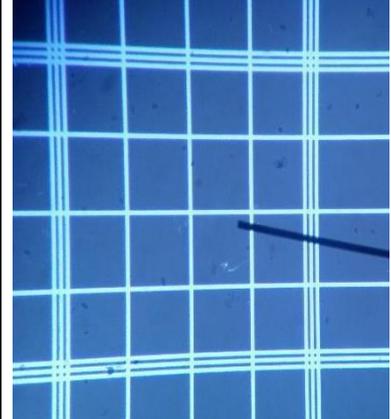
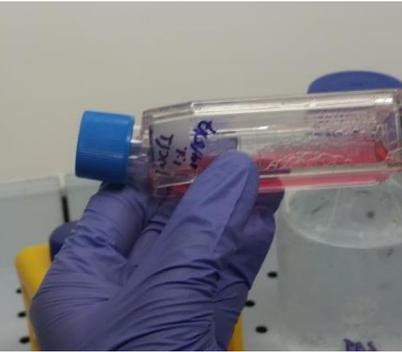
		
<p>Imagen A. Preparación de materiales, reactivos en cámara de flujo laminar.</p>	<p>Imagen B. Observación de bote de cultivo con vacuola parasitóforas formadas y taquizoitos en monocapa.</p>	<p>Imagen C. Remoción de la monocapa parasitaria vertiéndolo en un tubo cónico.</p>
		
<p>Imagen D. Conteo de taquizoitos en la cámara Neubauer.</p>	<p>Imagen E. Rotulación de inóculo infeccioso de NC en nuevo bote de línea celular vero.</p>	<p>Imagen F. Botes de cultivo iniciales infectados.</p>

Imagen 5: Protocolo de congelamiento de líneas celulares Vero y *Neospora caninum*.

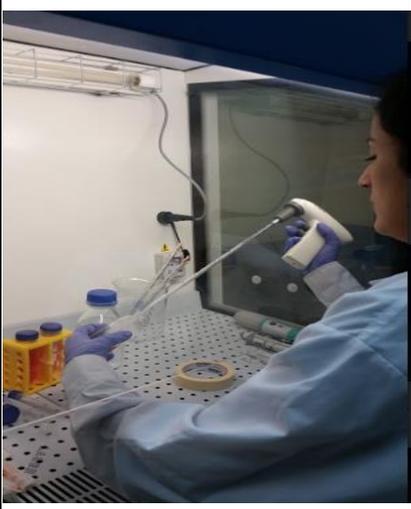
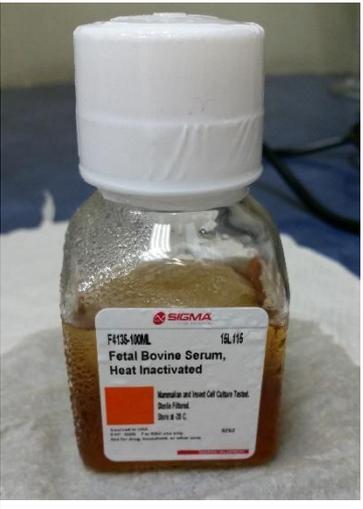
		
<p>Imagen A. Preparación de materiales, reactivos en cámara de flujo laminar.</p>	<p>Imagen B. Utilización de DMSO para el congelamiento celular.</p>	<p>Imagen C. Materiales utilizados para congelamiento de la línea celular Vero.</p>
		
<p>Imagen D. Preparación de muestra para ser colocado en los crioviales.</p>	<p>Imagen E. Utilización de Suero fetal bovino helado.</p>	<p>Imagen F. Conservación de crioviales en nitrógeno líquido.</p>

Imagen 6: Protocolo de descongelamiento de la cepa *Neospora caninum*.

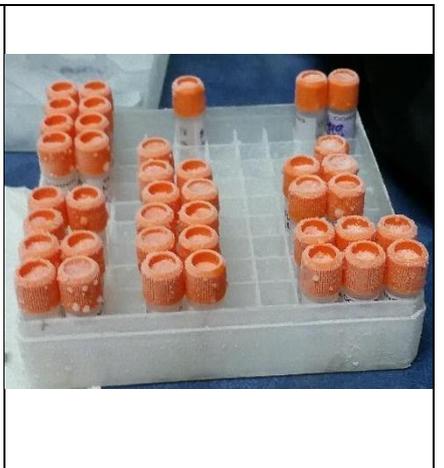
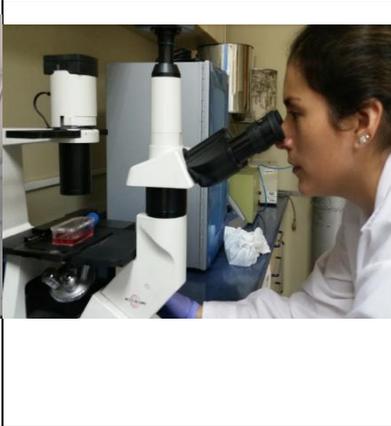
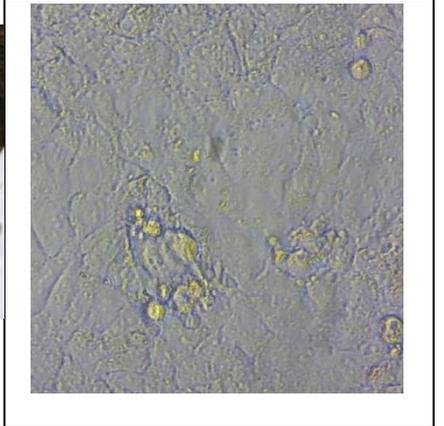
		
<p>Imagen A. Preparación de materiales, reactivos en cámara de flujo laminar</p>	<p>Imagen B. Botes de línea celular para ser infectados por el vial descongelado.</p>	<p>Imagen C. Viales con taquizoitos por descongelar.</p>
		
<p>Imagen D. Botes con inóculo descongelado.</p>	<p>Imagen E. Observación constante hasta el desarrollo de las fases parasitarias.</p>	<p>Imagen F. Observación de crecimiento parasitario.</p>

Tabla 7: Protocolo de producción de antígeno

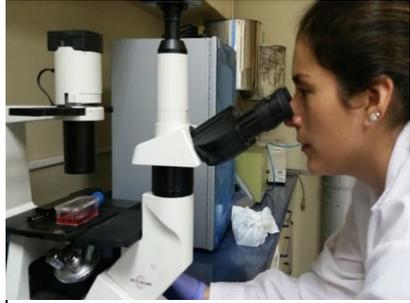
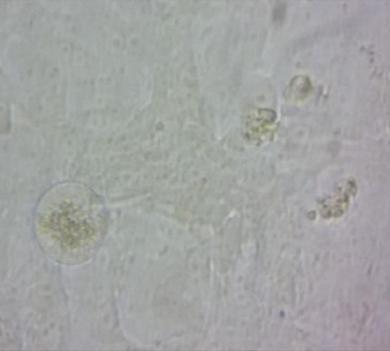
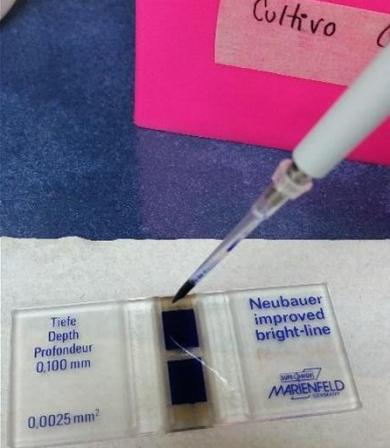
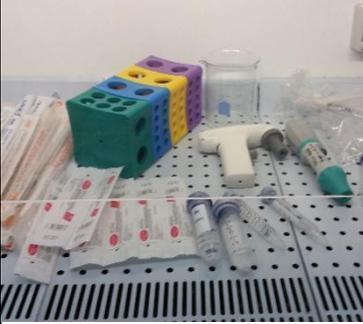
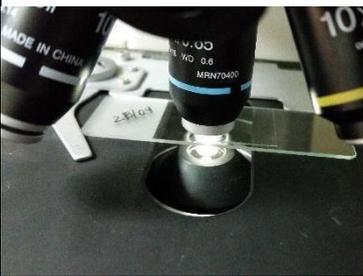
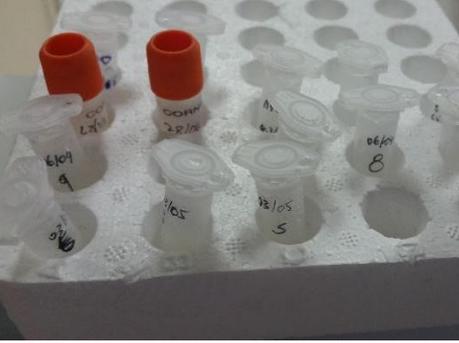
		
<p>Imagen A. Preparación de materiales, reactivos en cámara de flujo laminar</p>	<p>Imagen B. Uso de botes de cultivo de 75cm² para la producción de parásitos.</p>	<p>Imagen C. Observación de botes de cultivo infectado.</p>
		
<p>Imagen D. Observación de un 80% de la monocapa infectada de taquizoitos flotantes.</p>	<p>Imagen E. Conteo de parásitos viables en la cámara de Neubauer</p>	<p>Imagen F. Observación de crecimiento parasitario en botes infectados por el microscopio electrónico</p>

Imagen 8: Protocolo de purificación de la cepa *Neospora caninum*

		
<p>Imagen A. Preparación de materiales, reactivos en cámara de flujo laminar</p>	<p>Imagen B. Observación de monocapa infectada de 80 a 90% para realizar la purificación.</p>	<p>Imagen C. Post centrifugación de viales con taquizoitos.</p>
		
<p>Imagen D. Observación post purificación de la muestra.</p>	<p>Imagen E. Conteo de taquizoitos en microscopio electrónico post purificación.</p>	<p>Imagen F. Refrigeración de viales con taquizoitos purificados para su uso en IFI.</p>



PROTOCOLO DE MANTENIMIENTO, PASES,
PRODUCCIÓN DE LOS CULTIVOS *in vitro* Y PURIFICACIÓN DE
ANTÍGENO

A.1 Procedimiento de mantenimiento de la línea celular Vero

- a) Se colocó los botes de cultivo de 25cm² y se realizó mantenimiento y procedió a lavar con 5ml de solución de PBS 1x utilizando una pipeta de vidrio 5ml junto con el pipetus y se procedió a eliminar el medio de cultivo en un beaker estéril y así mismo una vez usada la pipeta se eliminó.
- b) Inmediatamente después, se procedió a colocar un volumen de 8 ml del medio de cultivo DMEN con SFB al 10% y antibiótico al 1% con ayuda de una pipeta estéril de 10ml y el pipetus, y así mismo una vez usada la pipeta se eliminó.
- c) Luego se observó nuevamente por el microscopio para verificar todo y se colocó en la incubadora (VS-2050C®) a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂.

A.2 Procesos de Mantenimiento de la cepa *Neospora caninum*

- a) Realizado lo anterior, se colocó los botes de cultivo de 25cm² con línea celular Vero para ser infectada con la cepa parasitaria. Se procedió a lavar los botes con 5ml de solución de PBS 1x utilizando una pipeta de vidrio estéril de 5ml junto con el pipetus y se procedió a eliminar el medio de cultivo en un beaker estéril.
- b) Inmediatamente después, se colocó un volumen de 8 ml del medio de cultivo DMEN con SFB al 2% con ayuda de una pipeta estéril de 10ml y el pipetus, y así mismo una vez usada la pipeta se eliminó.

- c) Posteriormente, se colocó el frasco de cultivo dentro de la incubadora de CO₂ para su preservación y observación al microscopio invertido.

B.1. Pase de línea celular Vero

- d) Se rotuló primero los botes nuevos de 25cm² para ser utilizado en la línea celular Vero. Se agregó 8ml de medio de cultivo temperado DMEN con SFB al 10% y antibiótico al 1% con una pipeta de 10ml, luego de usar la pipeta se elimina en el beaker. Estos se colocaron en la incubadora (VS-2050C®) a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂ para ser utilizado posteriormente.
- a) Con el bote escogido se procedió a eliminar el medio de cultivo por decantación al beaker, luego se lavó con 5ml de solución de PBS 1x utilizando una pipeta de vidrio 5ml junto con el pipetus, luego se procedió a eliminar el medio de cultivo en un beaker estéril. Se eliminó la pipeta utilizada en el beaker.
- b) Luego se colocó 1,5 ml de tripsina EDTA 1% al bote de cultivo con ayuda de una pipeta de 2 ml y el pipetus, posteriormente se eliminó la pipeta usada. Inmediatamente se colocó en la incubadora a 37°C en incubadora de CO₂ del 5% por 5 minutos.
- c) Inmediatamente después se re suspendió con un volumen de 3 ml del medio de cultivo DMEN al 10% con ayuda de una pipeta estéril de 5 ml y el pipetus. Luego con la misma pipeta se absorbió toda la muestra y la colocó en un tubo cónico de 50ml. Se procedió a colocar en un Vortex para que se homogenice la muestra.

- d) Se procedió al conteo de células y su viabilidad, se colectó 100 *ul* y 900 *ul* de tripán azul 0,05%, se coloca en el Vortex para homogenizar la muestra. Se contó utilizando un microscopio óptico y una cámara de Neubauer.
- e) Para el conteo, se utilizó una micropipeta de 10 *ul*, se absorbió 9*ul* de la mezcla, y se colocó este en ambas hemicámaras de la cámara de Neubauer.
- f) Se realizó la siguiente fórmula:

$$F = N/8 \times 10 \times 10^4 = N1 \times 10^5$$

F= Fórmula

N= Número total de conteo de células

10= Factor de dilución

10⁴ = Factor de la cámara

N1= Número de células/ ml

- a) La viabilidad fue evaluada por la captación selectiva del tripán azul, aquellas células de color azul tienen la membrana celular alterada y se definían como inactivas o muertas. Aquellas que tienen color cremoso y eran refringentes fueron consideradas como que las células estaban vivas.
- b) Se obtuvo la cantidad deseada de células, se utilizó una pipeta estéril de 1ml y el pipeteador para colocar el número de células en un nuevo bote de cultivo que se hizo al inicio.

B.2. Pases de infección de cultivo celular Vero con la cepa *N. caninum* NC1

- a) Se rotula los botes de células Vero que se iban a infectar, y se procedió a lavar con 5ml de solución de PBS 1x utilizando una pipeta estéril de 5ml junto con el pipeteador, luego se absorbió el medio para ser eliminado en el beaker estéril y una vez usado la pipeta se eliminó en el mismo beaker.

- b) Inmediatamente después, se procedió a colocar un volumen de 8 ml del medio de cultivo DMEN con SFB al 2% y antibiótico al 1% con ayuda de una pipeta estéril de 10ml y el pipetus, y así mismo una vez usada la pipeta se eliminó en el beaker. Este luego se observó nuevamente por el microscopio para verificar todo y se colocó en la incubadora (VS-2050C®) a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂ hasta su posterior uso.
- c) En el bote de línea celular Vero parasitada con *Neospora caninum* NC SPN1, se eliminó el medio de cultivo por decantación al beaker estéril. Luego se lavó con PBS 1x con una pipeta de 5ml y se eliminó el contenido por decantación nuevamente al beaker estéril.
- d) Luego se utilizó una pipeta estéril de 5ml se colocó en el bote 3 ml de medio de cultivo DMEN de SFB al 2% y antibiótico al 1% a temperatura ambiente.
- e) Con una pipeta estéril de 5ml se comenzó a raspar la monocapa hasta desprenderla en su totalidad, y con la misma pipeta se absorbió toda la muestra y se colocó en un tubo cónico de 50ml.
- f) Este contenido del tubo cónico es pasado por una jeringa de 1ml con aguja de 25G x 5/8" estéril, haciendo presión con el bisel de la aguja contra las paredes del tubo. Este procedimiento debe hacerse al menos unas 5 veces. Realizado esto, se eliminó la jeringa y aguja en el beaker estéril.
- g) Con una pipeta estéril 1ml, se colectó 100ul de la muestra y se mezcló con la alícuota de tripán azul 0.05% (1:10; 100ul de muestra y 900ul de tripán azul) para observar su viabilidad y el número de estos.
- h) Posteriormente, con una micropipeta de 10ul, se colectó 9ul de la muestra y se colocó en la hemicámara de la cámara de Neubauer vista en microscopio óptico a 40x, se mide la viabilidad basándose en captación selectiva de este colorante por parte de la membrana celular del parásito. Si se observó de color oscuro

azulado en forma de plátano es un parásito muerto, y si es de color amarillo con forma de plátano y en movimiento es un parasito vivo.

- i) Se aplicó la siguiente fórmula para determinar la cantidad de parásitos a inocular:

$$F = N/2 \times 10 \times 10^4 = N1 \times 10^5$$

F= Fórmula

N= Número total de conteo de células

10= Factor de dilución

10⁴ = Factor de la cámara

N1= Número de parásitos/ ml

- j) Luego de calcular la cantidad de los parásitos, con una pipeta estéril de 2ml se colectó la cantidad determinada de parásitos del tubo cónico anterior. Se procedió luego con la misma pipeta a depositar este inoculo al frasco de cultivo con células línea Vero que se preparó en un inicio.
- k) Finalmente, se colocó en el frasco de cultivo de línea celular Vero infectado con NC SPN1 dentro de la incubadora de CO₂ con una temperatura de 37°C a una atmósfera de 5% de CO₂ para su preservación.

C.1. Congelación de línea celular Vero

- a) El bote de células de línea Vero escogido, se realiza el mismo procedimiento de mantenimiento anteriormente explicado y el proceso de tripsinización dentro de la cámara de flujo laminar previa esterilización. Realizado estos procedimientos, se obtuvo la muestra en un tubo cónico, se colocó en un Vortex para homogenizar la muestra. Luego con una pipeta estéril de 1ml, se colectó

100ul de la muestra y se mezcló con la alícuota de tripán azul 0.05% (1:10; 100ul de muestra y 900ul de tripán azul) para observar su viabilidad y el número de estos en un microscopio eléctrico.

- b) Posteriormente, con una micropipeta estéril de 10ul, se colectó 9ul de la muestra y se colocó en la hemicámara de la cámara de Neubauer vista en microscopio óptico a 10X.
- c) Se realizó la siguiente fórmula:

$$F = N/8 \times 10 \times 10^4 = N1 \times 10^5$$

F= Fórmula

N= Número total de conteo de células

10= Factor de dilución

10⁴ = Factor de la cámara

N1= Número de células/ ml

- d) La viabilidad fue evaluada por la captación selectiva del tripán azul, aquellas células de color azul tienen la membrana celular alterada y se definen como inactivas o muertas. Aquellas que tuvieron color cremoso y eran refringentes se consideró que estaban vivas.
- e) Verificado esto, se procedió a centrifugar a las células Vero a 1250g por 15 minutos a 4°C. Luego se eliminó el sobrenadante. Se re suspendió el sedimento con suero fetal bovino filtrado frío – SFB (500 ul/vial) sin DMSO.
- f) Esta muestra se divide entre los números de crioviales que tenemos (3 x 10⁶) y se añade la misma cantidad de SFB al DMSO 20% (todo este tiempo se trabajó dentro una cubeta de hielo) y se llevó de inmediato a la congeladora de -80°C.
- g) Finalmente, se preservó los viales a -80°C durante 24 horas y luego se cambió a crio preservación a -196°C en el tanque de Nitrógeno líquido (Chart ®).

Posteriormente a los 3 a 5 días, se descongeló para observar la viabilidad de las células.

C.2. Congelación de *Neospora caninum* NC1

- h) El bote de células de línea Vero infectadas con NC1 escogido, se realizó el mismo procedimiento de mantenimiento anteriormente explicado y el proceso de remover el tapiz infectado con una pipeta estéril, dentro de la cámara de flujo laminar previa esterilización. Realizados estos procedimientos, se obtuvo la muestra en un tubo cónico, se colocó en un Vortex para homogenizar la muestra. Luego con una jeringa de 1ml con aguja de 25G x 5/8" estéril, se hizo pasar el contenido de la muestra, haciendo presión con el bisel de la aguja contra las paredes del tubo. Este procedimiento se hizo al menos unas 3 veces. Posterior a esto, se eliminó la jeringa y aguja en el beaker estéril.
- i) Con una pipeta estéril de 1ml, se colectó 100ul de la muestra y se mezcló con la alícuota de tripán azul 0.05% (1:10; 100ul de muestra y 900ul de tripán azul) para observar su viabilidad y el número de estos.
- j) Posteriormente, con una micropipeta de 10ul, se colectó 9ul de la muestra y se colocó en la hemicámara de la cámara de Neubauer vista en microscopio óptico a 40x, se midió la viabilidad basándose en captación selectiva de este colorante por parte de la membrana celular del parásito. Se observó de color oscuro azulado en forma de plátano es un parásito muerto, y si es de color amarillo con forma de plátano y en movimiento es un parásito vivo.
- k) Se aplicó la siguiente fórmula para determinar la cantidad de parásitos a inocular, se basa en el conteo de ambas hemicámaras entre el factor 2, este resultado es la media del recuento multiplicado por el factor de dilución y el factor de la cámara, obteniéndose el número de células por ml que se inoculará.

$$F = N/2 \times 10 \times 10^4 = N1 \times 10^5$$

F= Fórmula

N= Número total de conteo de células

10= Factor de dilución

10⁴ = Factor de la cámara

N1= Número de parásitos/ ml

- l) Verificado esto, se procedió a centrifugar el tubo cónico, a 1250g por 15 minutos a 4°C. Luego se elimina el sobrenadante. Se re suspendió el sedimento con suero fetal bovino filtrado frío – SFB (500 ul/vial) sin DMSO.
- m) Esta muestra se dividió entre los números de crioviales que tenemos (3 x 10⁶) y se añadió la misma cantidad de SFB al DMSO 20% (todo este tiempo se trabajó dentro una cubeta de hielo) y se llevó de inmediato a la congeladora de -80°C.

D.1. Descongelación de células Vero

- a) Se necesitó un bote de cultivo de 25cm² vacío nuevo, el cual se rotuló, y con una pipeta estéril de 10ml, se agregó 8ml de medio de cultivo DMEN con SFB al 10% y antibióticos al 1% temperado. Posteriormente, se le colocó el bote de cultivo en la incubadora de CO₂ a temperatura de 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂ hasta su posterior uso.
- b) Una vez teniendo los viales de crio preservación de línea celular Vero seleccionados, se procedió a retirar rápidamente del tanque de nitrógeno líquido (Chart ®).

- c) Estos viales se desenroscaron, con una pipeta estéril de 2ml se agregó el medio DMEN al 10% a una temperatura de 37°C de forma inmediata, y se homogenizó.
- d) Con la misma pipeta de 2ml, se colectó toda la muestra en un tubo cónico de 50ml estéril junto con 4ml de medio de cultivo DMEN con SFB al 10% y antibiótico al 1% a temperatura ambiente. Luego este tubo cónico se procedió a centrifugar a 1250 x g, 15 minutos.
- e) Se eliminó el sobrenadante, y el sedimento se re suspendió con 2 ml de medio DMEN con SFB al 10% y antibiótico al 1% a temperatura ambiente, y se homogenizó.
- f) Finalmente, con una pipeta estéril de 5ml, se colectó el total de muestra del tubo cónico y se inoculó en uno de los botes nuevos preparado anteriormente. Este procedimiento se realizó con cada uno de los crioviales por descongelar.
- g) Posterior a esto, se colocó dentro de la incubadora de CO₂ con una temperatura de 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂ para su preservación. Durante los siguientes días la observación fue constante al microscopio invertido hasta evidenciar el crecimiento y la multiplicación de las células.

D.2. Descongelación de *Neospora caninum* NC1

- a) Se necesitó un bote de cultivo con la línea Vero sin infectar y se rotuló. Se procedió a lavar con 5ml de solución de PBS1x utilizando una pipeta de vidrio 5ml junto con el pipetus. Se procedió a eliminar el medio de cultivo en un beaker estéril y así mismo una vez usada la pipeta se eliminó en el beaker.
- e) Inmediatamente después se cambió de medio, por lo que se procedió a colocar un volumen de 8 ml del medio de cultivo DMEN con SFB al 10% y antibiótico al 1% con ayuda de una pipeta estéril de 10ml y el pipetus, y así mismo una vez usada la pipeta se eliminó en el beaker. Luego se colocó en la incubadora

(VS-2050C®) a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂ hasta que se disponga de esta.

- b) Una vez teniendo los viales de crio preservación de cepa NC SPN1 se procedió a retirar rápidamente del tanque de nitrógeno líquido (Chart ®). Estos viales se desenroscaron, con una pipeta estéril de 2ml se agregó el medio DMEN al 10% a una temperatura de 37°C de forma inmediata, y se homogenizó.
- c) Con la misma pipeta de 2ml, se colectó toda la muestra en un tubo cónico de 50ml estéril junto con 4ml de medio de cultivo DMEN con SFB al 10% y antibiótico al 1% a temperatura ambiente. Luego este tubo cónico se procedió a centrifugar a 1350 g x 15 minutos.
- d) Luego se eliminó el sobrenadante, y el sedimento con una pipeta de 5ml se colectó para re suspender con 2 ml de medio DMEN con SFB al 10% y antibiótico al 1% a temperatura ambiente, y se homogenizó.
- e) Finalmente, con una pipeta estéril de 5ml, se colectó el total de muestra del tubo cónico y se inoculó en uno de los botes nuevos preparado anteriormente. Este procedimiento se realizó con cada uno de los crioviales por descongelar.

E.1. Producción de antígeno *Neospora caninum* NC1

- a) Para la producción de antígenos se utilizó botes de cultivo de 75cm², en los cuales se pueden producir una gran carga parasitaria. Para producir esto se realizó el procedimiento de pases en medio de cultivo de línea celular Vero infectada con NC SPN1, en la cual se utilizó una carga parasitaria de 30 x 10⁶.
- b) Cuando se observó gran carga parasitaria, como vacuolas maduras y taquizoitos, se procedió a eliminar el medio de cultivo por decantación en un beaker estéril, y con una pipeta estéril de 10ml se colectó 5ml de PBS 1x estéril

para lavar internamente el bote de cultivo. Con la misma pipeta estéril se absorbió la muestra y se eliminó en el beaker estéril junto con la pipeta.

- c) Luego con una pipeta estéril de 5ml se colectó 2ml de medio de cultivo DMEN al 10% y se raspa la monocapa hasta desprenderla en su totalidad. Con la misma pipeta de 5ml, se colectó la muestra y se depositó a un tubo cónico de 50ml.
- d) Este contenido fue pasado por una jeringa de 1ml con aguja de 25G x 5/8" estéril, haciendo presión con el bisel de la aguja contra las paredes del tubo. Este procedimiento se hizo al menos unas 5 veces. Realizado esto, se eliminó la jeringa y aguja en el beaker estéril.
- e) Con una pipeta estéril de 1ml, se colectó 100ul de la muestra y se mezcló con la alícuota de tripán azul 0.05% (1:10; 100ul de muestra y 900ul de tripán azul) para observar su viabilidad y el número de estos.
- f) Posteriormente, con una micropipeta de 10ul, se colectó 9ul de la muestra y se colocó en la hemicámara de la cámara de Neubauer y vista en microscopio óptico a 40X, se midió la viabilidad basándose en captación selectiva de este colorante por parte de la membrana celular del parásito. Se observó de color oscuro azulado en forma de plátano se define como un parasito muerto y si tuvieron color amarillo con forma de plátano y en movimiento es un parásito vivo.
- g) Se aplicó la siguiente fórmula para determinar la cantidad de parásitos a inocular, se basa en el conteo de ambas hemicámaras entre el factor 2, este resultado es la media del recuento multiplicado por el factor de dilución y el factor de la cámara, obteniendo el número de parásitos y de células, los cuales posteriormente se utilizaron para realizar la purificación de antígenos.

E.2. Purificación del antígeno

- a) Una vez realizado lo anterior mencionado (producción de antígeno), se observó en el recuento de estas células que el número de estas que deben ser al menos 2% con respecto al número de taquizoitos.
- b) Con una pipeta estéril de 10ml se colocó PBS 1x estéril frío en la cantidad de 1:2 por cantidad de muestra.
- c) Se procedió a filtrar el contenido del tubo cónico, utilizando una jeringa de 5 ml estéril y una aguja de 23 G x 1" estéril se hizo pasar el contenido a otro tubo cónico estéril nuevo. Luego el contenido se pasó por una nueva jeringa de 5ml con aguja de 25G x 5/8" estéril y fue recolectado en otro tubo cónico nuevo.
- d) Posteriormente, con una nueva jeringa estéril de 5ml y con ayuda de un filtro de 5 μ m se filtró todo el contenido y se colectó en un nuevo tubo cónico de 50ml estéril.
- e) El tubo cónico con la muestra se procedió a centrifugar a 4°C por 600g por 15 minutos, se realizó inicialmente 2 veces y luego 3 veces, para obtener menor conteo de células.
- f) Al obtener el sedimento, se eliminó el sobrenadante por decantación y para re suspender la muestra se utilizó una pipeta estéril de 1ml y agregó 1ml de PBS1x filtrado y frío para re suspender.
- g) Luego se calculó la cantidad de PBS1x que se añade para alcanzar una concentración de taquizoitos de 10⁷/ml y se repartió en un vial Eppendorf de 2.0ml.
- h) Finalmente, cuando se obtuvo la cantidad deseada esta se dividió en viales de 1.5ml, se añadió 5 μ l de formaldehído de 0.5% a cada vial y se almacenó en refrigeración a temperaturas del 4°C.