



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

TÍTULO DEL TRABAJO:

“Tricomonosis bovina: caracterización de cepas prevalentes en la provincia de La Pampa e inmunoprofilaxis de la enfermedad mediante el empleo de vacunas experimentales en vaquillonas”

TESISTA: Fuchs Lumila Ivana

DIRECTOR: Dr. Carlos Manuel Campero, INTA EEA Balcarce

CODIRECTOR: Dra. Diana Bacigalupe, FCV, UNLP

LUGAR DE TRABAJO: Laboratorio de Parasitología, INTA Anguil, La Pampa

MIEMBROS DEL JURADO:

Dra Claudia María Lützel Schwab

Dr Jorge Roberto Romero

Dr Gabriel Eduardo Travería

Año 2017

DEDICATORIA

A mi hijo Lauti

A mi amor Ruly

A mamá y papá

A mi hermana Vera

A mis sobrinos Dino y Ana

AGRADECIMIENTOS

A tantas personas que me acompañaron en esta etapa de mi vida:

En primer lugar, a mi Director Carlos Campero, a Marcelo Fort y a mi codirectora Diana Bacigalupe por haberme dado la posibilidad de poder realizar el Doctorado, brindándome toda su experiencia tanto laboral como personal, su tiempo y su paciencia!

A mis compañeras y amigas de oficina: Vale y María, que fueron las cómplices de horas de escritura, discusión, llantos y risas y entendían que pasaba sin ni siquiera hablarnos...

A Cari que estuvo al lado mío en cada ensayo, muestreo, cultivo de cepas y en cada momento que necesite de su ayuda, siempre con alegría y entusiasmo! A Flor, por sus consejos que siempre me dieron ánimo, su buen humor y por su incondicional ayuda en la realización de perfiles de proteínas y Western Blot.

A mis compañeros de Sanidad: a Hugo por su gran aporte en la realización de la serología de las muestras de suero y mucus de todos los ensayos y por su ayuda y paciencia en los trabajos arduos de manga! A Ramón, por el cuidado y dedicación que puso en el bioterio de los conejos sin dejar que les faltara nada en ningún momento! A Lucas por su gran colaboración en los trabajos a campo y en el sangrado de conejos.

A Dorita Cano, por recibirme siempre tan amablemente y enseñarme el “abc” en el mundo de la elaboración de vacunas y preparación de antígenos.

A todos “los chicos de Ganadería” que estuvieron a cargo de la organización y encierre de las vaquillonas de los ensayos desarrollados y que gracias a su responsabilidad y predisposición hicieron que los días de campo fueran un día ameno y de compañerismo!

A Pablo Vazquez y a Jorge Oyhenart por haber dedicado tantas horas de su tiempo en enseñarme estadística y análisis de datos y lograr, después de un arduo trabajo la tan ansiada publicación!

Al Dr Ignacio Echaide por sus correcciones y sugerencias.

A la Dra Patricia Zamorano por proveerme el adyuvante Oleoso ISA 206 y a la Dra Eder Romero por realizar la formulación de la vacuna con arqueosomas.

También quiero agradecer especialmente al Dr Luis Ortega Mora por haberme dado la posibilidad de realizar una pasantía en la Universidad Complutense de Madrid, España. A Esther Collantes-Fernandez y a Susana Pedraza-Díaz por haberme enseñado a incursionar en el mundo de los microsátélites y la variabilidad genética. Y a todo su equipo de SALUVET, que resultaron ser personas maravillosas tanto en lo profesional como en lo personal y me hicieron sentir como en casa durante mi estadía allí. Gracias a todos por haberme ayudado y acompañado en todo momento haciendo de este viaje una experiencia hermosa!

Gracias a mi gente...

A Ruly, mi amor y compañero de la vida, gracias por escucharme y estar al lado mío siempre, aceptándome tal cual soy...

A la luz de mi vida, mi hijo Lauti, que sin saber, desde su inocencia y dulzura siempre me dio fuerzas para no bajar los brazos!

A mi papá y mi mamá que me dieron la posibilidad de poder estudiar y en quienes siempre encontré palabras reconfortantes y de aliento para seguir adelante y lograr los objetivos que me planteaba.

A mi hermana Vera, por entenderme y “rescatarme” cada vez que se me complicaba un día...

A mis sobrinos Dino y Ana, por brindarme ese cariño puro que es el mimo al alma que a veces se necesita.

A mis suegros Mirta y Antonio por ser niños incondicionales al momento de necesitar más tiempo para la escritura, o cualquier tarea que quedara pendiente.

Gracias a Dios, por este logro.

Este trabajo de Tesis Doctoral fue financiado por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), el en el marco del Programa de Posgrado y Perfeccionamiento bajo la Resolución N° 743/12 autorizado por la Resolución 953/09.

Citas bibliográficas correspondientes a las publicaciones parciales del trabajo de tesis

Presentaciones a Congresos

Fuchs L, Fort M, Gimenez H, Bonetti C, Baldone V, Cano D, Campero C. 2011. Systemic immune response in heifers vaccinated with different *Tritrichomonas foetus* vaccines. Poster presentado en: 23th Congreso Internacional de Parasitología de la "WAAVP". Bs As, Argentina. Agosto de 2011.

Fuchs L, Fort M, Gimenez H, Bonetti C, Baldone V, Cano D, Campero C. 2011. Duration of infection in heifers vaccinated with different *Tritrichomonas foetus* vaccines. Poster presentado en: 23th Congreso Internacional de Parasitología de la "WAAVP". Bs As, Argentina. Agosto de 2011.

Pedraza-Díaz S, Arranz-Solís D, Gómez-Couso H, **Fuchs L**, Fort M, Rengifo-Herrera C, Navarro-Lozano V, Ortega Mora L, Collantes Fernández E. 2015. Multilocus analysis reveals further genetic differences between *Tritrichomonas foetus* and other trichomonads. Poster presentado en: 25 th Congreso Internacional de Parasitología de la "WAAVP". Londres, Inglaterra. Agosto de 2015.

Fuchs L, Gracia Martínez F, Pedraza-Díaz S, Oyhenart J, Campero C, Ramirez R, Fort M, Ortega Mora L. 2016. Diversidad genética en cepas de *Tritrichomonas foetus* provenientes de ganado bovino utilizando marcadores moleculares. Poster presentado en: XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología y XIV Congreso Argentino de Microbiología ALAM-CAM 2016, IV Congreso Latinoamericano de Microbiología de Medicamentos y Cosméticos-CLAMME y la Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y Otras Micobacteriosis (SLAMTB). Santa Fe, Argentina. Septiembre de 2016.

Trabajos publicados

Vázquez P, Fort M, Otermin H, Goyeneche P, Sago J, Baldone V, **Fuchs L**, Rojas M, Campero C. 2012. Enfermedades de transmisión sexual en La Pampa, Argentina: impacto del plan de control provincial. Vet Arg (29): 292.

Fuchs L, Fort M, Cano D, Bonetti C, Giménez H, Vázquez P, Baldone V, Rojas M, Campero C. 2014. Evaluación de vacunas experimentales a *Tritrichomonas foetus* aplicada en vaquillonas.

Boletín de Divulgación Técnica INTA: Avances en investigación en Salud Pública Veterinaria en la Provincia de la Pampa, Argentina.

Fuchs L, Fort M, Cano D, Bonetti C, Giménez H, Vázquez P, Bacigalupe D, Breccia J, Campero CM, Oyhenart JA. 2017. Clearance of *Tritrichomonas foetus* in experimentally infected heifers protected with vaccines based on killed-*T. foetus* with different adjuvants. *Vaccine* 35(9): 1341-1346.

Tabla de contenido

Tricomonosis bovina: caracterización de cepas prevalentes en la provincia de La Pampa (Argentina) e inmunoprofilaxis de la enfermedad mediante el empleo de vacunas experimentales en vaquillonas	1
Resumen	1
Palabras claves	1
Bovine Trichomonosis: characterization of the prevalent strains in La Pampa province (Argentina) and immunoprophylaxis of the disease using experimental vaccines in heifers..	5
Key words.....	5
Abstract	5
Capítulo I.....	9
Introducción general	9
1.1 Características generales de <i>Tritrichomonas foetus</i>	9
1.2. Variación antigénica	12
1.3. Presencia de <i>Tritrichomonas</i> sp. en diferentes especies	13
1.4. Tricomonosis en bovinos	14
1.4.1. Patología genital.....	15
Macho.....	15
Hembra	15
1.4.2. Mecanismos patogénicos	17
1.4.3. Respuesta inmunitaria natural a la infección por <i>T. foetus</i>	19
Hembra	19
Macho.....	21
1.5. Prevalencia de la enfermedad.....	21
1.5.1. Situación de la enfermedad en la provincia de La Pampa	23
1.6. Diagnóstico	26
1.7. Medidas de control	28
1.8. Inmunoprofilaxis.....	29

1.8.1. Vacunas a célula entera de <i>T. foetus</i>	30
1.8.2. Vacunas a subunidades de <i>T. foetus</i>	32
1.8.3. Comparación entre vacunas a célula entera y a subunidades.....	33
1.8.4. Vacunas en toros	34
2. Objetivos	36
Objetivos generales	36
Objetivos específicos	36
3. Hipótesis más relevantes	38
Capítulo II	40
Desarrollo de vacunas experimentales a <i>T. foetus</i> utilizando diferentes adyuvantes en su formulación	40
1. Introducción	40
2. Materiales y Métodos	45
2.1. Selección de la cepa de <i>T. foetus</i> , cultivos y producción de antígeno.....	45
2.2. Preparación de las vacunas experimentales	46
2.3. Dosis de vacuna.....	47
2.4. Bovinos y diseño experimental.....	47
2.5. Muestreos y cultivos referencias.....	49
2.6. Sincronización del estro y desafío intravaginal	50
2.7. Test de ELISA para detectar anticuerpos a <i>T. foetus</i>	50
2.8. Análisis estadístico	52
3. Resultados	52
3.1. Control clínico	52
3.2. Duración de la infección genital.....	53
3.3. Respuesta inmunitaria humoral sistémica.....	54
3.4. Respuesta inmunitaria humoral local	54
4. Discusión	55
Tablas y Figuras del Capítulo II	64

Capítulo III.....	70
Efecto de una tercer dosis de vacuna experimental a <i>T. foetus</i> aplicada por vía vaginal en vaquillonas previamente vacunadas por vía subcutánea.....	70
1. Introducción.....	70
2. Materiales y Métodos.....	72
2.1. Bovinos y diseño experimental.....	73
3. Resultados.....	73
3.1. Control clínico.....	73
3.2. Duración de la infección genital	74
3.3. Respuesta inmunitaria humoral sistémica.....	75
3.4. Respuesta inmunitaria humoral local.....	75
4. Discusión	76
Tablas y Figuras del Capítulo III.....	82
Capítulo IV.....	86
Desarrollo y evaluación de una vacuna experimental a célula entera de <i>Tritrichomonas suis</i> en vaquillonas	86
1. Introducción	86
2. Materiales y Métodos	90
2.1. Selección de la cepa de <i>T. suis</i> , cultivos y producción de antígeno.....	90
2.2. Adyuvantes y vacunas	91
2.3. Bovinos y diseño experimental.....	91
3. Resultados	92
3.1. Control clínico	92
3.2. Duración de la infección genital.....	92
3.3. Respuesta inmunitaria humoral sistémica	93
3.4. Respuesta inmunitaria humoral local	93
4. Discusión	93
Tablas y Figuras del Capítulo IV.....	97
Capítulo V	101

Caracterización antigénica de cepas de <i>T. foetus</i> aisladas de toros en la provincia de La Pampa	101
1. Introducción	101
2. Materiales y Métodos	103
2.1. Procedencia de las muestras	103
2.2. Cultivo de muestras	104
2.3. Western Blot	104
3. Resultados	106
4. Discusión	107
Tablas y Figuras del Capítulo V	110
Capítulo VI	112
Caracterización molecular de cepas de <i>T. foetus</i> aisladas de toros en la provincia de La Pampa	112
1. Introducción	112
2. Materiales y Métodos	114
2.1. Procedencia de las muestras.....	115
2.2. Amplificación y secuenciación de los primers GADPH2, MS5 y MS10	115
3. Resultados	117
4. Discusión	119
Tablas y Figuras del Capítulo VI	122
Conclusiones	125
Referencias bibliográficas	128
Anexo 1: Soluciones	161

Abreviaturas y Símbolos

ADN: ácido desoxirribonucleico

BPA: Prueba del Antígeno bufferado en Placa

CIH: caldo infusión hígado

cm: centímetros

CPA: células presentadoras de antígenos

hs: horas

ISCOM: complejos inmunoestimulantes

IV: intravaginal

KDa: kilodalton

Kg: kilogramos

L: litro

mA: miliamperes

MCV: mucus cérvico vaginal

mg: miligramos

min: minutos

ml: mililitro

nm: nanómetros

°C: grados Celsius

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal.

p/v: peso en volumen

pb: pares de bases

PCEV: Programa de Control y Erradicación de enfermedades Venéreas

PBS: solución buffer salina de fosfatos

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

pd: pos desafío

ppdv: pos primer dosis de vacuna

rpm: revoluciones por minuto
rRNA: ácido desoxirribonucleico
SC: subcutánea
seg: segundos
TBS: Buffer salino de Tris
Th1: linfocitos T helper perfil 1
Th2: linfocitos T helper perfil 2
ul: microlitros
um: micrómetro
v/v: volumen en volumen
V: voltios
vDVB: diarrea viral bovina
w/o/w: agua en aceite en agua
w/o: agua en aceite

Tricomonosis bovina: caracterización de cepas prevalentes en la provincia de La Pampa (Argentina) e inmunoprofilaxis de la enfermedad mediante el empleo de vacunas experimentales en vaquillonas.

Palabras claves: *Tritrichomonas foetus*, adyuvantes, vacunas, bovino, variabilidad molecular.

Resumen

La tricomonosis bovina es una enfermedad de transmisión sexual causada por el protozoo flagelado *Tritrichomonas foetus*. En la hembra, la enfermedad se manifiesta or ciclos estrales irregulares, pérdidas embrionarias y fetales tempranas y piómetras. En el macho, la infección es asintomática y no afecta la calidad seminal ni la libido.

Este trabajo tuvo dos objetivos fundamentales. Primero, se evaluó el efecto protector de vacunas a base de célula entera de *T. foetus* en vaquillonas, para mejorar el conocimiento de la respuesta inmunitaria y favorecer el control de la enfermedad. Segundo, se caracterizaron las cepas de *T. foetus* obtenidas de casos naturales de infección en toros de la provincia de La Pampa, para ampliar el conocimiento sobre la especie y así poder formular vacunas con los antígenos adecuados.

Para evaluar el efecto protector de vacunas se elaboró una vacuna experimental a célula entera de *T. foetus* utilizando diferentes adyuvantes en su formulación. Para ello se conformaron 7 grupos de vaquillonas según el adyuvante utilizado: grupo O (n=10) con adyuvante oleoso ISA 206, grupo Al (n=10) con hidróxido de aluminio, grupo S (n=11) con saponina Quil-A, grupo SAl (n=11) con la combinación de hidróxido de aluminio y Quil-A y grupo A (n=11) con arqueosomas. También se incluyeron en el estudio un grupo de vaquillonas Ci (n=11) sin inmunizar pero con desafío y un grupo CNI no inmunizado ni desafiado (n=11). Las vaquillonas fueron inmunizadas mediante la aplicación de dos dosis subcutáneas (SC) más una dosis intravaginal, aplicada en el lumen de la vagina. Posteriormente, estos animales fueron desafiados experimentalmente con un inóculo *T. foetus*.

El análisis de los resultados de este ensayo determinó que la formulación de los dos adyuvantes combinados SAl (hidróxido de aluminio y Quil-A) tuvo el mejor desempeño para la liberación de la infección genital (promedio 37 días) con una adecuada respuesta inmunitaria a IgG. Esta combinación de adyuvantes fue más eficaz que las formulaciones con un sólo adyuvante para la liberación de la infección genital, a saber: Al (59,4 días), S (49,9 días), O (50,1 días) y A (85 días).

En un segundo ensayo, se evaluó el efecto de la aplicación de una dosis intravaginal de vacuna experimental a *T. foetus* en la protección conferida a vaquillonas. Para ello, las vaquillonas inmunizadas recibieron la tercera dosis de vacuna de modo variable. Las vaquillonas se dividieron en los siguientes grupos: el grupo SC (n=12) recibió sólo las 2 dosis subcutáneas; el grupo IL (n=12) recibió 2 dosis subcutáneas y la tercera dosis de modo intravaginal aplicada en el lumen de la vagina. Por último, otro grupo, SM (n=12) recibió 2

dosis subcutáneas, mientras que la tercera dosis se aplicó en la submucosa de la vagina. Posteriormente, todas las vaquillonas fueron desafiadas artificialmente con un inóculo de *T. foetus*. También se incluyeron en el estudio un grupo de vaquillonas Ci (n=9) que no fueron inmunizadas pero si desafiadas y un grupo CNI (n=12), no inmunizado ni desafiado. Tanto los animales del grupo SC como los del grupo IL tuvieron similar promedio de días de infección (51 y 50 días respectivamente). El grupo SM, tuvo la mejor respuesta en la eliminación de la infección genital (45 días promedio). Aunque los animales de los 3 grupos presentaron diferencias significativas con respecto al grupo Control Infección, no tuvieron diferencias estadísticas entre sí en la liberación de la infección. Independientemente de la vía empleada para aplicar un refuerzo intravaginal, la respuesta local tras las inmunizaciones no se observó en los niveles de anticuerpos a IgA en ninguno de los casos.

También se realizó un ensayo experimental para establecer si una vacuna elaborada con antígeno a célula entera de *Tritrichomonas suis* aplicada a vaquillonas lograba inducir una respuesta inmunitaria humoral y acortar el período de infección genital luego del desafío con *T. foetus*. Para ello se inmunizaron 10 vaquillonas con 2 dosis subcutáneas y una tercera dosis intraluminal, y posteriormente fueron desafiadas con *T. foetus* por vía vaginal. Los resultados demostraron que la utilización de esta vacuna acortó el periodo de infección a un promedio de 56 días en los animales inmunizados, y generó una respuesta inmunitaria humoral tras su aplicación. Las vaquillonas eliminaron la infección genital antes que las hembras del grupo Control Infección, en los que persistió la enfermedad hasta finalizar el ensayo a los 98 días posdesafío. Pese a dicha tendencia, al comparar los tiempos promedio de infección de ambos grupos, no se observaron diferencias significativas.

La segunda etapa de esta Tesis se focalizó en caracterizar cepas de *T. foetus* aisladas de toros naturalmente infectados provenientes de la provincia de La Pampa. Para ello se analizaron un total de doce aislamientos de *T. foetus* procedentes de toros ubicados en diferentes departamentos de la provincia. El análisis antigénico realizado mediante la técnica de Western Blot demostró la existencia de patrones de bandas similares para todas las cepas en estudio, con mayor número de bandas de pesos moleculares elevados (entre los 100 y 250 kDa). Por el contrario, no se visualizaron bandas de bajo peso molecular al enfrentar las mencionadas cepas con los sueros hiperinmunitarios obtenidos de vaquillonas inmunizadas con *T. foetus* o *T. suis* respectivamente.

Por último, la caracterización molecular de cepas de *T. foetus* se realizó mediante la utilización de los microsatélites MS5, MS10 y el gen *gap2*, que codifica para la enzima GADPH (GADPH2). Se determinó la presencia de 3 patrones genéticos bien diferenciados para los distintos aislamientos: el ATB en 10 de las cepas, el CCBL en 3 y el CCB en una de las cepas. Estos resultados evidenciaron la existencia de variabilidad genética entre cepas de *T. foetus* provenientes de aislamientos de toros naturalmente infectados de Argentina y representan el primer trabajo efectuado con dicha técnica en cepas de *T. foetus* provenientes de bovinos naturalmente infectados del país.

Bovine Trichomonosis: characterization of the prevalent strains in La Pampa province (Argentina) and immunoprophylaxis of the disease using experimental vaccines in heifers.

Key words: *T. foetus*, adjuvants, vaccines, bovine, molecular variability.

Abstract

Bovine trichomonosis is a venereal disease caused by the flagellate protozoan *Tritrichomonas foetus*. In females, the disease is evident by irregular estrous cycles, early embryonic and fetal death, and pyometra. In males, the infection is asymptomatic and does not affect seminal quality or libido.

The objectives of this work were twofold. First, the protective effect of *T. foetus* whole-cell vaccines in heifers were evaluated, to improve on the knowledge about their immune response and to increase control of the disease. Second, *T. foetus* strains obtained from naturally infected bulls in La Pampa province were characterized, thus expanding the knowledge about the species and allowing the design of vaccines with suitable antigens.

To evaluate their protecting efficacy, *T. foetus* whole-cell killed, experimental vaccines were formulated using different adjuvants, O group (n=10) with oil ISA 206, AI (n=10) aluminum hydroxide, S (n=11), with saponin Quil-A, SAI (n=11) with a combination of aluminum hydroxide and saponin Quil-A, finally, group A (n=11) with archaeosomes. A group of heifers Ci non-immunized but challenged (n=11) and other control group CNI (n=11) without

immunization or challenge were also included in the study. Two subcutaneous and one intravaginal (in the lumen) doses were applied and later they were challenged with *T. foetus*. The vaccine that proved to be the most effective in clearing the infection was the one formulated with the combination of aluminum hydroxide and Quil-A, showing an average time of infection clearance of 37 days and presenting a good immune response to IgG. This combination of adjuvants proved to be more effective than preparations with only one adjuvant, either Al (59.4 days), S (49.9 days), O (50.1 days) or A (85 days).

In a second trial, the protection conferred to heifers by the inoculation of an intravaginal dose of the *T. foetus* experimental vaccine was tested. In this case, the mode of administration of the third dose was variable. One group (n=12) of heifers received only two subcutaneous doses. A second group (n=12) received two subcutaneous doses and a third dose intravaginally, applied to the lumen of the vagina. The last group (n=12) received two subcutaneous doses, whereas the third dose was administered to the submucosa of the vagina and later they were challenged with *T. foetus*. A group of heifers Ci (n=9) non-immunized but challenged and other control group CNI (n=12) without immunization or challenge were also included in the study. In the group that was immunized only systemically as well as in the one that received intraluminal reinforcement the infection lasted, on average, a similar number of days (51 and 50 days, respectively). The group immunized with a third submucosal dose presented the best response in the clearance of the genital infection (45 days average). Although the animals of the three groups exhibited significant differences with respect to the Control Infection group, there were no statistical differences between them in the clearance of the infection. Regardless of the route used to apply intravaginal reinforcement, the local

response following immunizations was not observed in the levels of antibodies to IgA of any of the cases.

On the other hand, an experimental trial was also developed to determine if a vaccine prepared with a whole cell antigen of *Tritrichomonas suis* inoculated to heifers was effective in inducing a humoral immune response, and shortening the period of genital infection after the challenge with *T. fetus*. In this case, 10 heifers were immunized with two subcutaneous and one intraluminal dose, and later they were challenged with *T. fetus*. The results showed that the use of this vaccine shortened the period of infection to an average of 56 days in the immunized animals, and generated a humoral immune response after its application. Heifers were clear of the genital infection earlier than animals in the Control Infection group, in which the disease persisted until the end of the trial. However, when comparing the mean infection times, no significant differences between the two groups were observed.

The second phase of this thesis focused on the characterization of the *T. fetus* strains isolated from naturally infected bulls from La Pampa province. Twelve isolates of *T. fetus* obtained from preputial samples of bulls from different departments were analyzed. The antigenic analysis by Western Blot demonstrated the existence of similar patterns of bands for all the strains under study, with a greater number of bands of elevated molecular weights (greater than 250 kDa). In contrast, low molecular weight bands were not observed when confronting the aforementioned strains with the hyperimmune sera obtained from heifers immunized with *T. fetus* or *T. suis*.

Finally, the molecular characterization of strains of *T. fetus* was performed using microsatellites MS5 and MS10 and the *gap2* gene, which codes for the enzyme GADPH (GADPH2). The presence of three well-differentiated genetic patterns was determined for the

different isolates: ATB in 10 of the strains, CCBL in three of the strains and CCB in one of the strains. These results indicate the existence of genetic variability among strains of *T. foetus* from isolates of naturally infected bulls from Argentina, and represent the first finding among strains of *T. foetus* from bovines using the aforementioned molecular markers.

Capítulo I

Introducción general

1.1 Características generales de *Tritrichomonas foetus*

Tritrichomonas foetus (*T. foetus*) es un protozoo que varía entre los 9 a 18 μm de largo y los 4 a 8 μm de ancho y tiene forma piriforme. Presenta 3 flagelos que miden de 11 a 17 μm de largo, un flagelo posterior de 16 μm y una membrana ondulante que recorre todo el cuerpo formando de 2 a cinco ondulaciones (Honinberg, 1978; Mattos y col., 1997; Rae, 2006) que le permiten realizar un movimiento vibrante característico.

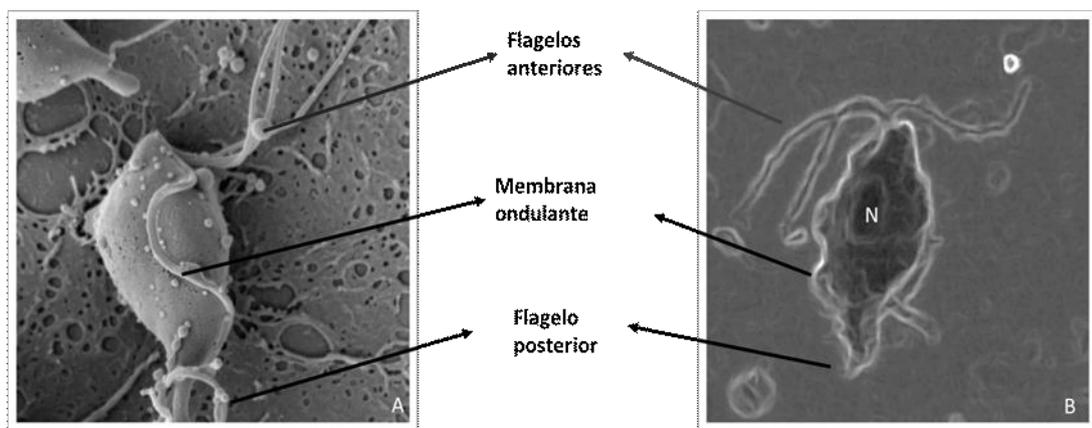


Figura 1. Esquema de *T. foetus* en el que se indican sus estructuras características. A) Microfotografía electrónica de barrido (CRIBABB, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca). B) Microfotografía de *T. foetus* en microscopio óptico (1000X).

Actualmente este parásito se clasifica taxonómicamente en el Dominio Eucariota, Reino Protista, Supergrupo Excavata dentro del grupo Parabasálidos, Orden Tritrichomonadida, Flia *Tritrichomonadidae* (Adl y col., 2005) (Figura 2).

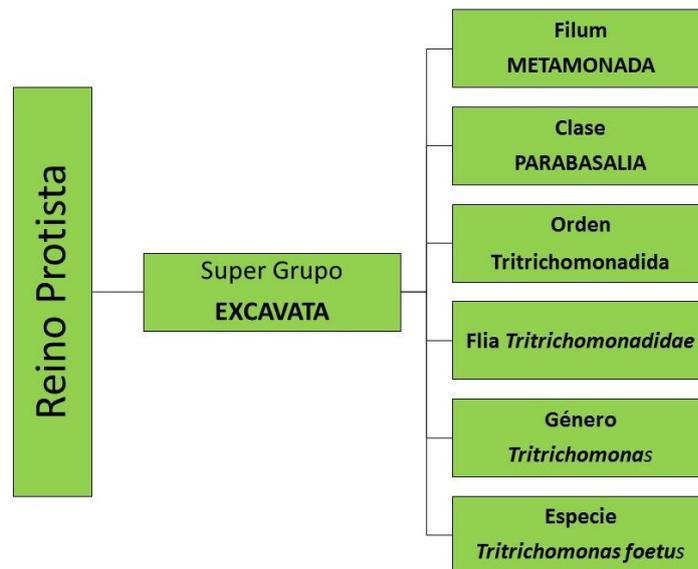


Figura 2. Taxonomía de *Tritrichomonas foetus* (Adl y col., 2005).

Como todos los eucariotas, *T. foetus* posee un núcleo verdadero que es elíptico u ovoide y se encuentra en posición excéntrica. Presentan un complejo de Golgi bien desarrollado que se asocia con las raicillas de los flagelos (Benchimol y col., 1993; Morgado Díaz y col., 1996). Posee también citoesqueleto y una organela característica: el blefaroplasto que está formado por los gránulos basales denominados kinetosomas que se conectan con los flagelos (Benchimol y col., 1993; Mattos y col., 1997). Desde el blefaroplasto surge el axostilo, que es una estructura tubular prominente que se curva alrededor del núcleo y pasa longitudinalmente a través del parásito emergiendo en una corta proyección caudal

(Honinberg, 1978; Lun y Gajadhar, 1999), y la costa, que es un cuerpo basal que corre por debajo de la membrana ondulante (Benchimol y col., 1993; Mattos y col., 1997).

T. foetus carece de mitocondrias y los mecanismos metabólicos de glicólisis y producción de ATP anaeróbica del piruvato y malato son realizados mediante una organela de doble membrana denominada hidrogenosoma. Este sistema le permite adaptarse a vivir en condiciones de anaerobiosis o microaerofilia (Honigberg y col., 1978, Benchimol y col., 1996). Si bien los hidrogenosomas tienen una función similar a la de las mitocondrias, los mismos carecen de genoma propio, cadena respiratoria y citocromos (Honigberg y col., 1978; Benchimol y col., 1996). Las características diferenciales de las mitocondrias e hidrogenosomas han sido motivo de numerosos estudios en los últimos años por aportar información referida a la evolución de los eucariotas (Embley y col., 2003; Hellemond y col., 2003).

La reproducción de *T. foetus* es asexual, se divide por fisión binaria longitudinal con una mitosis en la que los husos mitóticos son extranucleares (Cavalier-Smith, 1993). Hasta el presente se identificaron dos formas de *T. foetus*: una en un estado de trofozoíto caracterizada por ser elongada y constituir la mayor parte de la población normal, y la otra forma, llamada pseudoquística o endoflagelar, ovalada, que se evidencia cuando las condiciones del medio donde está el protozoo resultan desfavorables, como pueden ser una temperatura hostil y/o deficiencias nutricionales (Honigberg y col., 1971; Mattos y col., 1997; Benchimol y col., 1996). También esta forma se observó por el efecto de drogas o sustancias que modifican su estructura natural (Castro y col., 2016). Al analizar muestras prepuciales de toros naturalmente infectados mediante microscopía electrónica, se observó un mayor porcentaje de formas pseudoquísticas que de trofozoítos (Pereira-Neves y col., 2011). Se ha

demostrado que el paso de una forma a otra es un proceso reversible, ya que al cambiar las condiciones de modo favorable, el pseudoquiste vuelve a transformarse en trofozoíto y viceversa.

Estudios realizados en los últimos años revelaron la existencia de cambios en la organización del citoesqueleto que posibilitan la permeabilidad del parásito ante diferentes condiciones (de Andrade y col., 2015). Por otra parte, Pereira-Neves y col. (2015), documentaron la presencia del proteosoma 20S en *T. foetus* y revelaron la existencia de una relación entre la forma endoflagelar que adquiere el parásito y el incremento en la actividad enzimática de dicho proteosoma.

1.2. Variación antigénica

La variación antigénica es un mecanismo de evasión de la respuesta inmunitaria, utilizado por algunos organismos patógenos, que les permite sobrevivir a pesar de la presencia de anticuerpos específicos contra ellos. Este mecanismo ha merecido especial atención ya que esta variación en los epítopes específicos de superficie es crucial al momento de formular vacunas que sean capaces de controlar o disminuir la enfermedad (Corbeil y col., 2003).

Inicialmente se describieron 3 serotipos de *T. foetus*: var. brisbane, var. belfast y var. manley (Elder, 1964; Clark, 1971). BonDurant y Honigberg (1994) también las identificaron mediante técnicas de aglutinación y hemoaglutinación pasiva. Sin embargo, dicha clasificación perdió importancia luego de que se demostrara que la infección con las distintas cepas no influían en desarrollo de inmunidad hacia *T. foetus*, ya que las vaquillonas vacunadas con

cualquiera de estos serotipos desarrollaban resistencia tanto para la cepa homóloga como para los cepas heterólogas (BonDurant y Honigberg, 1994).

1.3. Presencia de *Tritrichomonas* sp. en diferentes especies

T. foetus provoca la Tricomonosis Genital Bovina (TGB), una enfermedad de transmisión sexual cuyo hospedador definitivo es el bovino (*Bos taurus* y *Bos indicus*) aunque ha sido ocasionalmente aislada del búfalo, equino, cerdo y roedores (Honigberg, 1978; McCool y col., 1987; BonDurant y Honigberg, 1994; Felleisen, 1999). También existen registros de aislamientos ocasionales en humanos (Okamoto y col., 1998; Suzuki y col., 2016).

Además, se ha determinado su presencia en perros (Gookin y col., 2005; Grellet y col., 2010) y en felinos (Kessel, 1928), confirmándose posteriormente que es el agente causal de la diarrea crónica en el gato doméstico (Gookin y col., 1999; Levy y col., 2003; Tolbert y Gookin, 2009). Mediante análisis moleculares comparativos entre aislamientos de *T. foetus* provenientes de bovinos y felinos se demostró que si bien presentan grandes similitudes, existe variabilidad suficiente entre ambos aislamientos como para ubicarlos en 2 genotipos diferentes: “el genotipo felino” y “el genotipo bovino” (Slapeta y col., 2010; Reinmann y col., 2012).

Por otra parte, *Tritrichomonas suis* (*T. suis*) también es un parásito estrechamente relacionado con *T. foetus*. Se lo puede encontrar en la cavidad nasal y en el tracto digestivo de porcinos. Aunque la presencia de este parásito es muy frecuente, el mismo no es patógeno para el porcino, o sólo está asociado a casos de rinitis leve (Felleisen, 1999). Si bien *T. foetus*

y *T. suis* fueron originalmente descritas como especies diferentes en hospedadores específicos, en los últimos años se ha demostrado que están muy emparentadas filogenéticamente, presentando mínimas diferencias a nivel molecular (Reimann y col., 2012; Mueller y col., 2015).

Asimismo, *Tritrichomonas mobilensis*, es un parásito intestinal que habita en los monos ardilla (Pindak y col., 1985). Durante los años 90 existió la teoría que sugería que *T. mobilensis*, *T. foetus* y *T. suis* eran la misma especie (Felleisen, 1997; Kleina y col., 2004). Es por ello que estos grupos de investigadores analizaron la región ITS y el gen 5.8 rRNA y encontraron que *T. foetus* y *T. suis* tenían secuencias similares, mientras que sólo se encontró una sustitución en la región ITS2 para *T. mobilensis*. Posteriormente, Felleisen (1998), evaluó polimorfismos en el ADN de las 3 especies, determinando que *T. mobilensis* es genéticamente diferente a las otras 2 especies. Midlej y col. (2011) compararon la morfología, ultraestructura y la actividad endocítica entre *T. foetus* y *T. mobilensis* y determinaron diferencias en sus hidrogenosomas y en su comportamiento endocítico, reforzando de este modo la hipótesis de que pertenecen a especies diferentes.

1.4. *Tricomonosis en bovinos*

La enfermedad afecta el área genital de los bovinos y produce en la hembra vaginitis, endometritis, mortalidad embrionaria, abortos y ocasionales piómetras. En el macho, la infección cursa en forma asintomática sin afectar la calidad seminal ni la libido. Los toros permanecen infectados toda su vida. Los signos de la enfermedad en el rodeo se basan en

repetición de servicios con celos irregulares (debido a las pérdidas embrionarias y fetales), baja tasa de preñez y presencia de preñeces tardías (BonDurant, 1997).

1.4.1. Patología genital

Macho

T. foetus coloniza exclusivamente los estratos superficiales de la mucosa de la cavidad prepucial, incluyendo las criptas penianas, fornix y la parte distal de la uretra (Parsonson y col., 1974; Campero y col., 1993; Rhyan y col., 1999). La enfermedad se presenta con mayor frecuencia en los toros adultos y viejos, aunque también está presente en toros jóvenes (Campero, 2000). Si bien *T. foetus* no produce lesiones genitales, los antígenos parasitarios son captados y procesados en la mucosa prepucial en forma similar a lo que ocurre en la mucosa genital de las hembras. Aunque se ha descrito que *T. foetus* puede producir una leve balanopostitis (Parsonson y col., 1974; Campero y col., 1988; Rhyan y col., 1999), clínicamente la tricomonosis bovina en el macho cursa en forma asintomática y en toros mayores de 4 a 5 años es rara la recuperación espontánea (Clark, 1971). Dicho fenómeno hace del toro una fuente permanente de infección y transmisión en el rodeo (BonDurant, 1997; Campero, 2000; Campero, 2000a).

Hembra

T. foetus produce una pérdida precoz de la preñez que se extiende desde la muerte embrionaria o fetal hasta el día 120 de gestación, ocasionando infertilidad transitoria,

descargas uterinas, piómetras y abortos tardíos ocasionales (5-6 meses de gestación) (Clark, 1971; Parsonson y col., 1976; Rhyan y col., 1988; Rhyan y col., 1995).

Luego del servicio con un toro infectado, *T. foetus* invade la vagina induciendo una respuesta inflamatoria leve, caracterizada por la proliferación de linfocitos, macrófagos y células plasmáticas en la lámina propia vaginal (Parsonson y col., 1976; Campero y col., 1993; Anderson y col., 1996) persistiendo en las secreciones genitales por 13 a 28 semanas. También coloniza tempranamente el cérvix, útero y oviducto, y la placenta y feto durante la gestación generando una endometritis de moderada a severa, con presencia de agregados linfocitos y células inflamatorias en el estrato compacto (Parsonson y col., 1976; Campero y col., 1993; Anderson y col., 1996).

T. foetus no es invasiva y se adhiere superficialmente al epitelio endometrial siendo rodeada por células inflamatorias y detritus celulares (Parsonson y col., 1976; Campero y col., 1993; Anderson y col., 1996). Por otra parte, el parásito puede infectar ocasionalmente el útero preñado en la preñez avanzada (Rhyan y col., 1995), e inclusive, llegar a término con la gestación y parir un ternero normal. A estas vacas se las llama "carrier" o portadoras crónicas, y la enfermedad puede persistir en ellas durante 6 a 9 semanas posparto (Skirrow, 1987; Mancebo y col., 1995). Este fenómeno determina que dichas vacas sean una importante fuente de infección para el rodeo en el servicio siguiente (Skirrow, 1987; Mancebo y col., 1995).

1.4.2. Mecanismos patogénicos

Los mismos involucran la adhesión de *T. foetus* al epitelio de los órganos genitales, la posterior colonización y el efecto citotóxico.

La adhesión inicial está determinada por la interacción entre las moléculas de la membrana plasmática del protozoo y la de las células epiteliales del hospedador (Corbeil y col., 1989; Felleisen, 1999; Singh y col., 1999).

Además, *T. foetus* posee endo y exoenzimas que incluyen beta-galactosidasas (Vella y Greenwell 1997) y glicosidasas que destruyen la capa de mucina genital (Connaris y Greenwell, 1997), y neuromidasas localizadas en la periferia del protozoo que facilitan la adhesión celular del parásito (Dias Filho y col., 1999). Sin embargo, la cisteín-proteasa extracelular es la enzima de mayor importancia en la patogénesis de *T. foetus* (Mallison y col., 1995) ya que degrada diferentes proteínas del hospedador como el fibrinógeno, fibronectina, albúmina y lactoferrina. Este último componente ayuda al protozoo en la adquisición de hierro, la adherencia celular y la desintegración de la matriz extracelular epitelial (Talbot y col., 1991). Además, ésta proteasa favorece la evasión de la respuesta inmunitaria humoral al degradar isotipos de IgG y el complemento (Kania y col., 2001).

Aunque está claro que la infección por *T. foetus* puede ocasionar infertilidad permanente o transitoria en vacas, el mecanismo molecular por medio del cual coloniza las superficies mucosas no está bien definido. Está comprobado que el parásito se adhiere y provoca daño en los cultivos de células epiteliales vaginales y uterinas (Singh y col., 2004), inhibe su división (Silva-Filho y de Souza, 1988), causa inflamación en el útero (Parsonson y

col., 1976; Anderson y col., 1996), invade tejidos placentarios del bovino (Rhyan y col., 1988) y produce enzimas capaces de dañar tejidos (Burguess y col., 1990).

Por otra parte, mediante la fertilización *in vitro*, Bielanski y col. (2004) determinaron que *T. foetus* no tenía efecto perjudicial sobre la fertilización y desarrollo embrionario cuando se utilizaban un número limitado de parásitos. Se demostró que el riesgo potencial de transmisión por dicha vía era poco probable, debido a la escasa supervivencia del protozoo en el medio de cultivo de las fertilizaciones *in vitro*.

Benchimol y col. (2006), evaluaron los efectos que *T. foetus* podría provocar en los órganos reproductivos usando como modelo oviductos bovinos frescos. Estos autores determinaron que *T. foetus* se adhería a lugares específicos en el oviducto, con mayor preferencia a las células ciliadas dentro de los pliegues profundos del epitelio. Por el contrario, no se observaron tricomonidos en áreas cercanas al lumen. Luego de la interacción con *T. foetus*, las células en el oviducto cambiaron su morfología, mostrando condensación nuclear e intensa vacuolización, signo evidentes de muerte celular. Los cambios nucleares observados luego de la interacción de *T. foetus* pueden deberse a la activación de diferentes proteasas (endonucleasas) durante el proceso de muerte. Los autores relacionaron estos resultados con un cuadro típico de falla reproductiva (Benchimol y col., 2006). Posteriormente, Benchimol y col. (2007) demostraron que la exposición de los ovocitos a *T. foetus* provocó una rápida adhesión de los tricomonidos a la zona pelúcida y a las células cúmulos de los mismos, generando un efecto perjudicial sobre la fertilización y el desarrollo de los embriones. Aunque estos hallazgos difieren con los descritos por Bielanski y col. (2004), hay que destacar que Benchimol y col. (2007) sugieren que es necesario un gran número de parásitos para provocar

daño en las células reproductivas. Finalmente, Woudwyk y col. (2015), estudiaron en un modelo murino (ratón BALB/c), la relación entre la proliferación y muerte celular en el endometrio infectado con *T. foetus* con la muerte del embrión. Los resultados hallados sugieren que en animales infectados puede desencadenarse la apoptosis celular por los efectos citotóxicos provocados por *T. foetus*, pudiendo ser éste uno de los mecanismos responsable de las fallas en la implantación y la pérdida embrionaria temprana que ocurre durante la infección.

1.4.3. Respuesta inmunitaria natural a la infección por *T. foetus*

Hembra

T. foetus coloniza la vagina, cérvix y útero durante la primera semana de infección y sobrevive en el tracto genital durante 90 a 190 días (Clark y col., 1977; Skirrow y BonDurant, 1990) aunque puede extenderse hasta los 9 meses posparto (Skirrow, 1987; Mancebo y col., 1995) constituyéndose así la vaca portadora o “carrier”. Los antígenos de *T. foetus* son captados y presentados por células epiteliales, macrófagos o células de Langerhans a nivel basal del epitelio de la vagina y/o útero (Corbeil y col., 1998; Corbeil y BonDurant, 2001). Luego, entre los 56 a 70 días posinfección se desarrolla una respuesta inmunitaria local con estructuras muy similares a los folículos linfoides, ubicados en la submucosa de la vagina, oviducto y útero. Los mismos se denominan agregados linfoides y representan verdaderos sitios de inducción local encargados de procesar antígenos de *T. foetus* y producir IgA (Corbeil y col., 1998; Corbeil y BonDurant, 2001) e IgG1 (Skirrow y BonDurant, 1990a). Entre los 49 a 63 días posinfección con *T. foetus* en la vagina y entre los 70 a 84 días en el útero, ya se detecta

aumento de IgA e IgG1 específicas (Skirrow y BonDurant, 1990). Ambas inmunoglobulinas tienen diferentes propiedades para eliminar los organismos patógenos y son de relevancia cuando se planifica el empleo de vacunaciones estratégicas contra las enfermedades venéreas (Campero, 2000).

La función primaria de la IgG1 es opsonizar el protozoo y facilitar su fagocitosis por parte de los macrófagos y polimorfonucleares que expresan en su superficie receptores para IgG (Butt y col., 1993). Los niveles posinfección de otras inmunoglobulinas como IgG2 e IgM en las secreciones genitales son insignificantes (Skirrow y BonDurant, 1990). Debido a la aparición tardía, la respuesta inmunitaria natural local inducida por *T. foetus* es inefectiva para prevenir las pérdidas reproductivas (Gault y col., 1995). Por lo tanto, la presencia del parásito en el tracto genital luego de los 70 días posinfección se relaciona con las pérdidas fetales tempranas (Anderson y col., 1996).

La respuesta inmunitaria sistémica natural generada por *T. foetus* se caracteriza por niveles insignificantes de IgG1 y IgG2 séricos, los cuales no tienen efecto para evitar la pérdida reproductiva (Skirrow 1987; Skirrow y BonDurant, 1990). Si bien la exposición a *T. foetus* en el área genital del bovino induce a la formación de anticuerpos locales, los mismos no son suficientes para liberar de la infección al hospedador en forma permanente. La hembra que se infecta por primera vez, adquiere un cierto grado de inmunidad transitoria, que en el mejor de los casos no supera los 9 meses, pudiéndose luego reinfectar hasta 3-4 veces en la vida útil del vientre en el rodeo (Clark y col., 1983).

Macho

T. foetus coloniza la cavidad prepucial y sus antígenos superficiales son reconocidos a nivel de las mucosa peneana y prepucial, lo cual induce un incremento local de IgG1, IgM, IgA y en menor cuantía IgG2 con presencia de agregados linfocitos específicos en la submucosa (Campero, 1988; Rhyan y col., 1999). Sin embargo, la respuesta inmunitaria natural genital del macho contra *T. foetus* carece de efecto protector o curativo y el protozoo puede habitar el tracto genital por años o incluso toda la vida, especialmente en toros mayores de 5 años (Clark, 1971; BonDurant, 1997; Campero y col, 1983).

1.5. Prevalencia de la enfermedad

La TGB ha sido controlada en la mayoría de los países utilizando la inseminación artificial (IA), el control sanitario del semen y la faena de los toros infectados. Sin embargo, en países ganaderos con explotación extensiva donde se utiliza el servicio natural, como en nuestro país, la enfermedad continúa siendo un problema.

En el noroeste de España se estimó una prevalencia de 2,9% (2/70) de toros infectados con *T. foetus* (Martin-Gomez y col., 1998). Más recientemente, se determinó una infección del 32% (33/103) para toros y del 41,4% (27/65) para rodeos de la raza Asturiana de la Montaña (Mendoza-Ibarra y col., 2012). Por otra parte, el mismo equipo de trabajo, determinó un porcentaje mucho menor de infección en rodeos bovinos de la raza Asturiana de los Valles (Mendoza-Ibarra y col., 2013) sugiriendo tras estos hallazgos, que la prevalencia a tricomonosis depende principalmente del tipo de manejo que se realice en el rodeo.

En otros países, como Canadá, se determinó un 6% de infección para toros (Riley y col., 1995). En California, Estados Unidos, se realizó un relevamiento en el que el 15,8% (9/57) de los rodeos presentaron al menos un toro infectado (BonDurant y col., 1990). Asimismo, en Florida, se determinaron prevalencias del 30,4% (18/59) para rodeos (Rae y col., 2004).

En Argentina, la enfermedad es endémica y existen registros de la misma en varias provincias. En la provincia de Buenos Aires, se determinaron prevalencias a nivel de rodeo del 28% (Perez y col., 2006). En la provincia de Santiago del Estero se hallaron infecciones en un 1,2% de los toros y en un 28,5% de los rodeos examinados (Neuman y col., 2013). Para la provincia de Salta las prevalencias encontradas fueron del 0,9% y del 1,8% para toros y rodeos respectivamente (Neuman y col., 2010).

Por otra parte, Campero y Martínez (2010), recopilaron información proveniente de diferentes laboratorios privados y oficiales de distintos puntos del país (Tabla 1).

Tabla 1. Prevalencias a *T. foetus* en rodeos y toros de diferentes regiones.

Procedencia de los datos	Año	Prevalencia en rodeos	Prevalencia en toros
INTA Salta (Salta)	2008/2009	23,2%	2,3%
Fundación Coprosamen (Mendoza)	2008	---	3,4%
Laboratorio Ladvco (Corrientes)	2007/2009	23,1%	0,6%
Plan Toros (Buenos Aires)	2006	7,0%	2,0%
Laboratorio Alvarez (Buenos Aires)	2008	5,8%	0,8%
Laboratorio 9 de julio (Buenos Aires)	2008	---	1,0%
Laboratorio Rauch (Buenos Aires)	2008	17,3%	4,6%
Laboratorio de Diagnóstico Veterinario La Plata (Buenos Aires)	2007/2009	14,4%	2,7%
Laboratorio Azul (Buenos Aires)	2007/2009	23,1%	0,8%
Laboratorio Serivet, Balcarce (Buenos Aires)	2008	12,2%	0,9%
Laboratorio Bahía Blanca (Buenos Aires)	2008	3,1%	0,4%

1.5.1. Situación de la enfermedad en la provincia de La Pampa

La enfermedad en la provincia de La Pampa fue inicialmente evaluada mediante la implementación de planes sanitarios regionales (Control de las enfermedades venéreas en rodeos bovinos de productores de pequeña escala en la provincia de La Pampa, SECTIP, Cofecyt, 2006). Fort y col. (2004) realizaron un importante relevamiento de tricomonosis bovina en el período 2000-2003 que abarcó el centro-este de la provincia de La Pampa. El porcentaje de rodeos que presentaron al menos un animal positivo a *T. foetus* varió entre el 13% y el 18% durante este periodo. Si bien se registró una tendencia a la reducción de los rodeos positivos a través de los años, la misma no fue significativa. La prevalencia de la enfermedad en toros varió entre el 1,3% al 3,6% siendo ésta una diferencia significativa.

A partir del año 2006, se implementó en la provincia de La Pampa, el Programa para el control y erradicación de las Enfermedades Venéreas en toros (PCEV). Dicho Programa, de carácter obligatorio y progresivo, cubrió todos los departamentos de la provincia en el año 2008 (Senasa N° 358/2008).

Al comienzo del Programa, en el año 2006, el porcentaje de rodeos positivos a tricomonosis en la provincia de La Pampa era del 8%, siendo la zona del oeste pampeano la que presentaba mayor prevalencia a la enfermedad (Figura 1).

Zona	Nº rodeos	Porcentaje de rodeos positivos
1	2580	5%
2	946	12.6%
3	350	19.1%
Total	3876	8.1%

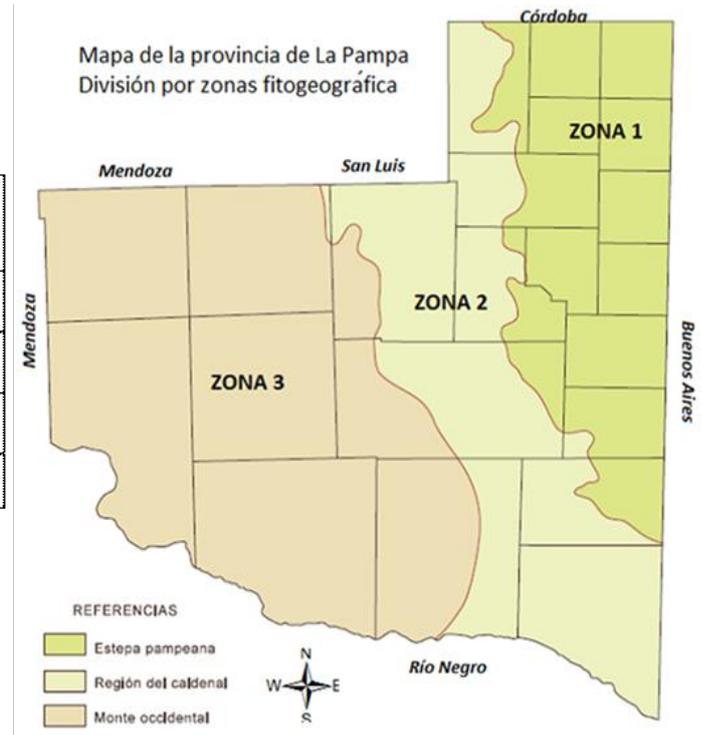


Figura 1. Rodeos positivos a Tricomonosis en la provincia de La Pampa en el año 2006.

En el 2008, se registraron prevalencias del 10% para rodeos y de 2,6% para toros. Se debe destacar que estos resultados se obtuvieron luego de muestrear el 62% del total de toros existentes en la provincia. En el año 2009 se detectaron prevalencias mucho menores que las del año anterior, aunque disminuyó el número de animales muestreados (42% del total de toros). Esto se debió a que el Programa no fue obligatorio ese año por declararse emergencia agropecuaria debido a la sequía que existió en la provincia en dicho periodo. A partir del año 2010, la prevalencia en rodeos se mantuvo estable con variaciones que oscilaron entre el 2,4% y el 3,4%. En toros, el porcentaje de toros positivos disminuyó a partir del año 2012 registrándose valores de entre el 0,6% (año 2016) y 0,86% (año 2013). Los porcentajes de

rodeos y de toros muestreados fueron aumentando hasta llegar al 90% de animales analizados en el año 2016 (Fort y col., 2016) (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de rodeos y toros positivos a Tricomosis en el periodo 2007-2014.

Año	Rodeos revisados	Porcentaje (*)	Prevalencia	Toros revisado	Porcentaje (**)	Prevalencia
2008	4105	47%	10%	43731	62%	2,6%
2009	2352	27%	4,0%	22894	42%	1,0%
2010	4078	64%	3,4%	30521	60%	1,0%
2011	5167	79%	3,3%	35234	74%	1,2%
2012	5588	82%	2,4%	37650	76%	0,7%
2013	5777	83%	3,0%	40225	78%	0,9%
2014	5863	84%	2,4%	42215	84%	0,7%
2015	5516	78%	2,9%	41908	78%	0,7%
2016	6400	89%	2,4%	46000	90%	0,6%

(*) Porcentaje de rodeos revisados

(**) Porcentaje de toros revisados

Vázquez y col. (2012) evaluaron el impacto del PCEV tras cinco años de haber sido implementado, determinando que se habían diagnosticado el 60% de la población de toros en el año 2010 y que las zonas sur y oeste fueron las áreas con mayor prevalencia para tricomonosis (4,3% y 6%, respectivamente). Los autores también observaron una disminución de la enfermedad del 83% en los toros y de un 86% en los rodeos, tras realizar el seguimiento de 40 rodeos bovinos desde el 2006 al 2010.

Molina y col. (2013) recabaron la información surgida del PCEV y consideraron la distribución espacio-temporal de la enfermedad en La Pampa para el año 2010 sobre 29.178 toros pertenecientes a 3.766 rodeos. Determinaron una prevalencia del 1,1% para toros y del 5% para rodeos, siendo el sur de la provincia el área geográfica de mayor riesgo de la enfermedad.

En la actualidad, las prevalencias existentes para tricomonosis en la provincia no superan el 2,4% en rodeos y el 0,6% en toros, focalizándose principalmente en el oeste pampeano. En base a los resultados expuestos y luego de 10 años de haberse implementado el PCEV, la enfermedad ha sido exitosamente controlada pudiéndose ya pensar en una etapa de erradicación.

Si se considera que el stock bovino en el país cuenta con 52,6 millones de cabezas y que 3,2 de éstas permanecen en la provincia de La Pampa (datos del SENASA de abril del año 2016, www.senasa.gov.ar) es importante mantener políticas de acción que respalden el Control Sanitario de bovinos para poder seguir controlando las enfermedades reproductivas, que son uno de los factores limitantes en la producción.

1.6. Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad se realiza mediante el cultivo e identificación de *T. foetus*. Las muestras a partir de las cuales se puede identificar el parásito son: mucus cérvico-vaginal (MCV) o muestras de líquido placentario en hembras, contenido estomacal de los fetos abortados, o a partir de muestras prepuciales en toros (Campero, 1985; BonDurant, 1997; Kittel y col., 1998; Lun y col., 2000).

Las muestras son sembradas en medio de cultivo e incubadas a 37°C en atmósfera aeróbica y examinadas diariamente durante 7 días con microscopio óptico a un aumento de 100X (BonDurant, 1997). Los medios de cultivo para *T. foetus* deben ser sensibles, específicos, y capaces de evitar la proliferación de bacterias que puedan inhibir el crecimiento de las mismas. Los más utilizados son: el medio de Diamond (Diamond, 1957; OIE, 2016), Caldo

infusión hígado (Campero, 1986), Plastridge o Shutherland (Martínez y col., 1985; Terzolo y col., 1992), Oxoid (OIE, 2016) e InPouch (InPouch System TF CA, USA) (Borchardt y col., 1992; OIE, 2016). Se han realizado trabajos que compararon la eficiencia de diferentes medios de cultivo. Lun y col. (2000), determinaron igual sensibilidad para los medios de Caldo infusión hígado, Diamond e InPouch. Por otra parte, Parker y col. (2003), hallaron mejor sensibilidad en el medio InPouch que el medio de Diamond.

La sensibilidad del diagnóstico con un solo muestreo en toros con esta metodología es de aproximadamente el 70% (Perez y col., 2006; Fort y col., 2016). Es debido a ello que se recomienda un mínimo de dos raspajes negativos con intervalos de 15 a 21 días para considerar a un toro libre de la infección y hasta cuatro muestreos si el macho proviene de un rodeo donde la enfermedad es endémica (Campero y col., 1983; Terzolo y col., 1992).

Actualmente la especificidad del cultivo para *T. foetus* está cuestionada debido a que se ha determinado el crecimiento de otros microorganismos en los mismos, lo que genera falsos resultados positivos al momento del diagnóstico (Campero y col., 2003; Cobo y col., 2003; Parker y col., 2003). Estos parásitos se clasifican en otros géneros como son: *Tetratrichomonas* sp., *Pentatrichomonas* sp., *Pseudotrichomonas* sp., los cuales son habitantes ocasionales de las cavidad prepucial (Cobo y col., 2003). A la observación microscópica común, estos microorganismos son indistinguibles con *T. foetus*, por lo que es necesario la confirmación del diagnóstico mediante otras técnicas como la PCR (Cadena en Reacción de la Polimerasa) (Felleisen, 1997; Felleisen, 1998), qPCR (PCR en tiempo real) (Wilson y col., 2017), microscopía electrónica (Benchimol, 2004) u otras técnicas tintoriales o inmunohistoquímica (Monteavaro y col., 2000). El diagnóstico de *T. foetus* por PCR se basa en la identificación de dos secuencias específicas de genes de la porción 5.8S rARN y regiones internas laterales ITS1 e ITS2

(Felleisen, 1997). La aplicación de la técnica de PCR ofrece varias ventajas, como mayor sensibilidad y rapidez en el diagnóstico y también el hecho de que los microorganismos de la muestra no necesitan ser viables. De todos modos, hay múltiples factores que influyen en la detección de microorganismos por PCR como son: la calidad de la muestra, la especificidad de los cebadores y una correcta extracción de ADN (OIE, 2016). Esta técnica resulta una innovación importante en el diagnóstico y se debería aplicar de rutina a los aislamientos positivos provenientes de los medios de cultivo a los fines de confirmar la existencia de *T. foetus* (Campero y col., 2003).

1.7. Medidas de control

Para ello es primordial el conocimiento de la epizootiología de la enfermedad, a saber (Campero, 2005):

- Mantener la población de toros jóvenes, eliminar los toros luego del cuarto año de servicio dado su mayor riesgo de adquirir la enfermedad.
- Realizar el muestreo de los toros un mes antes de la temporada de servicio y vender aquellos toros que resulten positivos a tricomonosis.
- Tener dos cultivos negativos en todos los toros que ingresen a servicio.
- Dar servicio a vaquillonas con toros vírgenes muestreados y negativos.
- Hacer diagnóstico de preñez a todas las vacas y vaquillonas, 60 días después de terminado el servicio y eliminar a las vacías.

- En el caso de ingreso de hembras al rodeo, garantizar que las mismas procedan de rodeos libres de la enfermedad.
- No utilizar toros “prestados”.
- Mantener los alambrados linderos e internos en buen estado.

1.8. Inmunoprofilaxis

Si bien la respuesta inmunitaria natural generada en las hembras bovinas para eliminar la infección genital por *T. foetus* es sólida en los primeros meses posinfección, la misma disminuye con el tiempo. Estos hallazgos motivaron investigaciones para el desarrollo de vacunas con antígenos de *T. foetus* desde épocas tempranas (Morgan, 1947). Posteriormente, se realizaron estudios en hembras vacunadas con diferentes antígenos de *T. foetus* (Morgan, 1947; Clark, 1971; BonDurant y col., 1993; Hudson y col., 1993; Anderson y col., 1996; Campero y col., 1998; Campero y col., 1999; Voyich y col., 2001; Cobo y col., 2004; Riccio y col., 2008).

La inmunización en hembras contra *T. foetus* induce una respuesta humoral genital caracterizada por la producción de IgA e IgG1 similar a la que ocurre naturalmente, pero más temprana, de mayor cuantía (BonDurant y col., 1993; Voyich y col., 2001a), y asociada con la eliminación del parásito (Corbeil y col., 1998).

Los estudios sobre la patogénesis de la enfermedad, determinaron que las pérdidas fetales ocurren luego de 63 días posinfección (Parsonson y col., 1976; Rhyan y col., 1988). Por lo tanto, las vacunas formuladas para la tricomonosis bovina deben ser capaces de generar

una respuesta inmunitaria capaz de eliminar a *T. foetus* del tracto reproductivo antes de que ocurra el daño fetal, aproximadamente entre los días 60-70 posinfección (Parsonson y col., 1976).

Cuando se produce la infección con *T. foetus*, acontecen una serie de mecanismos que son necesarios para inducir la respuesta inmunitaria más eficiente. Una vacuna atenuada viva simularía una infección natural y podría inducir dicha respuesta. Aunque por lo general estas vacunas son muy efectivas, tienen varias desventajas potenciales y no pueden considerarse para estas enfermedades. La alternativa es la vacuna a célula muerta. De todos modos, una vacuna de este tipo, administrada por una ruta no natural (vía subcutánea o intramuscular) puede no proveer los estímulos necesarios para inducir una inmunidad de protección.

1.8.1. Vacunas a célula entera de T. foetus

Las vacunas elaboradas con célula entera utilizan todo el parásito sin distinción de componentes antigénicos específicos. Por ser relativamente fácil su elaboración, las vacunas con antígeno de célula entera inactivadas fueron las primeras en desarrollarse en diferentes formulaciones. Se realizaron varias experiencias en vaquillonas aplicando vacunas sistémicamente y realizando el desafío con toros infectados (Herr y col., 1991; Gault y col., 1995; Riccio y col., 2008). En todos los ensayos, se observó una reducción en el tiempo de infección de las hembras vacunadas en comparación con los animales no vacunados. Sin embargo, sólo Riccio y col. (2008) observaron un mayor porcentaje de preñez en hembras vacunadas en comparación con las del grupo control.

Actualmente existe en el mercado internacional una vacuna comercial elaborada a base de célula entera de *T. foetus* que se presenta combinada con *Campylobacter* sp. y *Leptospira* sp. (TrichGuard Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc, St. Joseph, MO, USA). En trabajos experimentales realizados hace algunos años, se determinó que si bien la aplicación de la misma reducía el periodo de infección en los animales inmunizados, no lograba evitar las pérdidas reproductivas generadas por *T. foetus* (Kvasnicka y col., 1989; 1992; Schnackel y col., 1989; Cobo y col., 2004; Fort y col., 2004).

Recientemente, Palomares y col. (2017) aplicaron una vacuna comercial (TrichGuard) en vaquillonas y determinaron una importante respuesta inmunitaria a IgG en sueros, fluidos vaginales y uterinos en los animales inmunizados. También se detectaron mayores niveles de anticuerpos en la técnica de Elisa cuando se fijaron subunidades de *T. foetus* que cuando se fijaron las células enteras del parásito.

Edmondson y col. (2017), evaluaron la eficacia de la vacuna comercial (TrichGuard) en vaquillonas. Para ello se inmunizaron un grupo de animales con 2 dosis subcutáneas y se consideró un grupo control sin inmunizar. Posinmunización, todos los animales se desafiaron con un inóculo de *T. foetus* y finalmente se incorporaron toros libres de la enfermedad durante 49 días. Como resultado del ensayo se detectaron mayores porcentaje de preñez (95% vs 70%), de parición (50% vs 20%) y menores porcentaje de pérdidas fetales (47% vs 71%) en las vaquillonas inmunizadas con respecto a las del grupo sin inmunizar evidenciando de este modo un buen desempeño de la vacuna utilizada.

En nuestro país también se comercializa una vacuna contra la tricomonosis (Tricovac, Laboratorio Biotandil, Argentina) aunque su aplicación no ha logrado evitar la infección genital ni mejorar los índices reproductivos (Vispo y col., 2011).

Baltzell y col. (2013), realizaron una revisión bibliográfica donde se evaluó la eficacia de vacunas a célula entera para prevenir y controlar la tricomonosis en el bovino. De un total de 334 trabajos, sólo se consideraron 10 como relevantes para el estudio. Del análisis de estos trabajos, los autores concluyeron que existe limitada o nula evidencia de que las vacunas disminuyan la infección en vaquillonas aunque establecieron una relación entre la vacunación y la disminución de abortos. Al analizar la calidad de la información que describe el impacto de vacunación sobre el riesgo de aborto, se observó que esta fue escasa, al igual que la calidad de evidencia para evaluar la duración de la infección. Debido a la parcialidad de los datos publicados, el autor sugiere que probablemente exista una sobreestimación de la eficacia de estas vacunas.

1.8.2. Vacunas a subunidades de *T. foetus*

Las vacunas a subunidades de *T. foetus* se caracterizan por contener sólo un fragmento del agente infeccioso con antígenos seleccionados por inducir una respuesta inmunitaria protectora (BonDurant y col., 1993; Campero y col., 1998; Corbeil y col., 1998; Campero y col., 1999). Se han desarrollado en forma experimental vacunas a subunidades que contienen desde la totalidad de la membrana de *T. foetus* (Campero y col., 1998; Campero y col., 1999) hasta glicoproteínas específicas (BonDurant y col., 1993; Corbeil y col., 1998) y lipofosfoglicanos (Shaia y col., 1998; Voyich y col., 2001).

Campero y col. (1999), determinaron un tiempo promedio de infección menor en animales inmunizados con vacunas a base de membrana de *T. foetus* que en animales sin inmunizar, aunque no se reflejaron diferencias significativas entre ambos grupos en los porcentajes de preñez obtenidos a los 45 y 60 días postservicio. Las hembras fueron desafiadas por vía intravaginal y luego tuvieron servicio con toros libres de infección para determinar preñez. Asimismo, cuando se utilizó como inmunógeno el antígeno de superficie de TF1.17, si bien los animales inmunizados se liberaron de la infección en menor tiempo que los animales del grupo control luego del desafío intravaginal, existieron animales que permanecieron infectados hasta la semana 9 posdesafío (BonDurant y col., 1993; Corbeil y col., 1998) momento muy cercano al periodo crítico donde se producen las pérdidas reproductivas por la enfermedad.

Voyich y col. (2001) formularon una vacuna elaborada con la adhesina Tf 190 de *T. foetus* y observaron una mayor respuesta inmunitaria sistémica de IgG1 e IgG2 en los animales inmunizados por vía subcutánea que en los animales del grupo control. Por el contrario, tras la infección experimental, dicha diferencia no se observó en los animales inmunizados por vía intranasal, aunque éstos presentaron una tasa de infección mucho menor con respecto a los animales del grupo control.

1.8.3. Comparación entre vacunas a célula entera y a subunidades

En varios trabajos experimentales se formularon y compararon los efectos de vacunas a célula entera y vacunas a subunidades. En general, no se encontraron grandes diferencias entre el uso de las mismas, ya que ambos tipos de vacunas reducían el tiempo de infección de

los animales vacunados en contraposición a los controles. Hudson y col. (1993), observaron un mejor comportamiento en las vacunas a célula entera aplicada dos veces que en vacunas formuladas con fragmentos de membrana aplicadas sólo una vez.

Campero y col. (1998) realizaron un ensayo probando una vacuna comercial (Trichguard 5VL, Fort Dodge, USA) a célula entera de *T. foetus* y otra experimental a base de membrana de *T. foetus* en vaquillonas y posteriormente las desafiaron con servicio natural con un toro infectado. Si bien no se observaron diferencias significativas en los parámetros reproductivos, ambos grupos vacunados mostraron una buena respuesta inmunitaria.

Cobo y col. (2002), utilizaron una vacuna experimental a célula entera y otra a base de membrana de *T. foetus* en vaquillonas que posteriormente fueron desafiadas con un toro naturalmente infectado. Se determinó una mayor eficacia en la vacuna a membrana de *T. foetus* en comparación con la vacuna a célula entera, ya que los animales presentaron una menor duración de la infección genital (60 días promedio vs 63 días), mayor tasa de preñez (6/12 vs 3/12) y menor tasa de mortalidad fetal (3/12 vs 4/12). Estos parámetros fueron estadísticamente diferentes entre los animales inmunizados con la vacuna a base de membrana y los animales del grupo control.

1.8.4. Vacunas en toros

La inmunidad inducida por antígenos de *T. foetus* en toros ha sido poco investigada. La inmunización por vía subcutánea con membranas glicoproteicas demostró cierto grado de eficacia para la eliminación rápida del protozoo (Clark y col., 1984; Campero y col., 1988; Campero y col., 1990). Más concretamente, una vacuna elaborada a base de la membrana

celular de *T. foetus* aplicada en toros por vía subcutánea, fue capaz de estimular un aumento de inmunoglobulinas en sangre y, en menor medida, en el plasma seminal siendo los anticuerpos más relevantes del isotipo IgA, seguidos por IgG1 e IgG2. Sin embargo, no se observó una respuesta humoral en fluidos prepuciales (Campero y col., 1990).

Por otro lado, Herr y col. (1991) no obtuvieron resultados satisfactorios tras la aplicación de vacunas experimentales a célula entera de *T. foetus* y adyuvante oleoso en toros naturalmente infectados, ya que el 62% de ellos siguieron infectados tras la aplicación de 2 dosis intramusculares.

Recientemente, Cobo y col. (2009) demostraron que existe una mayor producción de anticuerpos IgG1 e IgG2 en las secreciones prepuciales y en la sangre de toros adultos vacunados vía subcutánea con una vacuna a célula entera de *T. foetus* y desafiados por vía intraprepucial con *T. foetus*. En este ensayo, los toros inmunizados no se infectaron con *T. foetus* tras el desafío experimental, en contraposición a los no vacunados que permanecieron infectados durante todo el ensayo.

2. Objetivos

Objetivos generales

- Evaluar el efecto protector de vacunas a base de célula entera de *T. foetus* en vaquillonas, para mejorar el conocimiento de la respuesta inmunitaria y favorecer el control de la enfermedad.
- Caracterizar cepas de *T. foetus* obtenidas de casos naturales de infección en toros de la provincia de La Pampa.

Objetivos específicos

- Evaluar la duración de la infección genital en vaquillonas inmunizadas con vacunas experimentales, diseñadas con antígenos inactivados de célula entera de *T. foetus* y diferentes adyuvantes.
- Caracterizar la respuesta inmunitaria humoral (sérica y en fluidos genitales) en vaquillonas inmunizadas con dichas vacunas.
- Determinar la mejor combinación de antígeno y adyuvante para la formulación de una vacuna efectiva a *T. foetus*

-Evaluar la persistencia de la infección y la respuesta inmunitaria en vaquillonas, tras la aplicación de un refuerzo intravaginal con una vacuna experimental a *T. foetus*.

-Determinar si una vacuna elaborada con antígeno a célula entera de *T. suis* aplicada a vaquillonas, logra inducir una respuesta inmunitaria humoral y acortar el período de infección genital luego del desafío con *T. foetus*.

-Realizar una caracterización antigénica de cepas de *T. foetus*, aisladas de toros naturalmente infectados provenientes de la provincia de La Pampa.

-Realizar una caracterización molecular de cepas de *T. foetus*, aisladas de toros naturalmente infectados provenientes de la provincia de La Pampa.

3. Hipótesis más relevantes

-El tiempo de eliminación de la infección genital posdesafío intravaginal con *T. foetus* en vaquillonas inmunizadas por las vías subcutánea e intraluminal, varía según los inmunógenos experimentales utilizados.

-El empleo de diferentes adyuvantes en vacunas con antígeno a célula entera de *T. foetus* produce diferente intensidad en el patrón de la respuesta inmunitaria humoral.

-La aplicación de un refuerzo intravaginal de una vacuna experimental a *T. foetus* en vaquillonas produce un acortamiento en la infección y genera un estímulo local de relevancia en la respuesta inmunitaria.

-La administración de una vacuna experimental en vaquillonas a base de antígeno de *T. suis* y posterior desafío con *T. foetus* intravaginal, produce un acortamiento de la infección genital e induce una respuesta inmunitaria humoral.

- Existe variabilidad antigénica entre las distintas cepas de *T. foetus* obtenidas de muestreos prepucciales de toros con infección natural pertenecientes a rodeos de la provincia de La Pampa.

-Existe variabilidad molecular entre las distintas cepas de *T. foetus* obtenidas de muestreos prepucciales de toros con infección natural pertenecientes a rodeos de la provincia de La Pampa.

Capítulo II

Desarrollo de vacunas experimentales a *T. foetus* utilizando diferentes adyuvantes en su formulación.

Objetivo A: Evaluar la duración de la infección genital en vaquillonas inmunizadas con vacunas experimentales diseñadas con antígenos inactivados de célula entera de *T. foetus* y diferentes adyuvantes.

Objetivo B: Caracterizar la respuesta inmunitaria humoral (sérica y en fluidos genitales) en vaquillonas inmunizadas con dichas vacunas.

Objetivo C: Determinar la mejor combinación de antígeno y adyuvante para la formulación de una vacuna efectiva a *T. foetus*.

1. Introducción

Al planificar el desarrollo de una vacuna, es esencial conocer el tipo de respuesta inmunitaria que ésta es capaz de inducir y seleccionar un adyuvante adecuado que maximice la respuesta inmunitaria sin ocasionar efectos adversos.

La mayoría de los adyuvantes que se utilizan en la elaboración de vacunas son compuestos químicos, con componentes microbianos o proteínas de mamíferos. En general, los adyuvantes mejoran la presentación del antígeno, le dan mayor estabilidad o actúan como

inmumoduladores. Un adyuvante puede tener más de una función, por ejemplo pueden ayudar a preservar la estructura del antígeno, mejorar el efecto de una vacuna e incrementar su vida útil.

Los adyuvantes que influyen en la presentación de antígenos pueden afectar estos complejos procesos en numerosos puntos. Durante la respuesta inmunitaria, los antígenos de vacunas son captados por células dendríticas y células presentadoras de antígenos (CPA) para ser transportados hasta los linfonódulos cercanos al punto de inoculación y luego ser procesados e iniciar la compleja respuesta inmunitaria. Las CPA (las células dendríticas, los macrófagos y las células B), procesan dichos antígenos y los presentan a los linfocitos T asociados a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Cualquier adyuvante que pueda mejorar la captación del antígeno por parte de estas células, incrementar la coestimulación de las moléculas del CMH, o mejorar la migración de células a los linfonódulos, puede mejorar la respuesta inmunitaria iniciada (Spickler y Roth, 2003). Los adyuvantes tienen un rol preponderante modulando la respuesta inmunitaria celular y humoral.

Los adyuvantes más ampliamente utilizados en las vacunas veterinarias son las emulsiones de aceite mineral (del tipo aceite en agua o agua en aceite) y los adsorbentes (hidróxido y fosfato de aluminio). En algunos casos, se emplean liposomas, saponinas, vitamina E, complejos inmunoestimulantes (ISCOM), así como diferentes emulsiones de origen vegetal o animal.

El hidróxido de aluminio potencia principalmente la respuesta inmunitaria del tipo Th2 favoreciendo la producción de anticuerpos de la clase IgE, así como reacciones alérgicas (Veien y col., 1986). Está cargado positivamente, por lo que puede adsorber débilmente a las

proteínas básicas. El grado de adsorción depende de la naturaleza y concentración del antígeno, de la presencia de sales e iones buffer y del pH de la mezcla resultante (Stewart-Tull, 1989). Las fuerzas de atracción electrostáticas y las interacciones hidrofóbicas son las responsables de la adsorción de los antígenos a los adyuvantes que contienen aluminio (Al-Shakshir y col., 1995).

El adyuvante incompleto de Freund es una emulsión (w/o) que estimula una respuesta inmunitaria principalmente Th2 (Brunner y col., 2010) y se ha utilizado durante más de 50 años en la producción de antisueros en animales (Freund, 1956). Es empleado con frecuencia cuando se dispone de cantidades limitadas de antígeno o cuando éstos presentan baja inmunogenicidad. Este tipo de adyuvante puede formar depósitos de antígeno de larga duración que se van liberando lentamente y generan así una importante inmunidad (Spickler y Roth, 2003). Es utilizado generalmente en vacunas para animales y se utilizan cuando se necesita un adyuvante fuerte y donde la inflamación que éste ocasiona no es un inconveniente. Actualmente, existe una tendencia para restringir su uso y utilizar otros adyuvantes que generan menores reacciones adversas y son más fáciles de manipular (Spickler y Roth, 2003).

En el grupo de los adyuvantes oleosos se puede mencionar el aceite mineral Montanide ISA 206 a los fines de usarse en formulaciones con antígenos suspendidos en fase acuosa. El mismo contiene ésteres del ácido octadecenoico y anhidromanitol (Barnett y col., 1996). Estas emulsiones que se forman tienen baja viscosidad con capacidad de aumentar la respuesta inmunitaria humoral. El antígeno en la fase acuosa externa es accesible inmediatamente al sistema inmunitario, siendo el antígeno de la fase acuosa interna liberado

lentamente. Ganne y col. (1994), utilizaron el ISA 206 en una vacuna con adenovirus recombinante contra la pseudorabia en roedores. Los autores lograron inducir niveles de IgG1, IgG2, IgG2b e IgG3 en comparación con la formulación sin adyuvante. Posteriormente, el ISA 206 (w/o/w) y otro de similar formulación, el ISA 25 (o/w) se utilizaron en vacunas génicas a Herpes Virus Bovino-1 (Langellotti y col., 2007). Las emulsiones oleosas como ISA 25 e ISA 206 pueden ser eficazmente captadas por las CPA con aumento en la respuesta proliferativa de los macrófagos y otras células relacionadas (Hamilton y col., 2000).

Actualmente, existen adyuvantes de origen biológico como las saponinas, cuyos principios activos son extraídos del árbol *Quillaja saponaria*. El extracto crudo de la corteza de este árbol es una saponina. El Quil-A es una sustancia parcialmente purificada de dicho extracto, usado en medicina veterinaria en vacunas para bovinos, porcinos, equinos, perros y gatos. Las saponinas inducen importante respuesta del tipo Th1 y Th2. Este adyuvante se ha utilizado para la elaboración de vacunas para el control de la hidatidosis en ovinos, caprinos y bovinos (Lightowlers y col., 2004) con buenos resultados. También se utilizó una vacuna recombinante con resultados promisorios usando este adyuvante para el control de *Taenia multiceps* en ovinos. El Quil-A fue utilizado, junto a otros inmunopotenciadores, en la elaboración de una vacuna comercial contra el virus de la diarrea viral bovina (vDVB) (Pfizer Animal Health, 2004).

En la actualidad es frecuente el empleo de los denominados “sistemas de transporte de antígenos” que si bien no son adyuvantes, en la mayoría de los casos, actúan como tales. Estos productos se definen como vehículos de origen biológico, capaces de potenciar la inmunogenicidad de los antígenos gracias a su capacidad de interacción entre éstos y el

sistema inmunitario (Kersten y Hirschberg, 2004). Entre ellos se pueden mencionar a los complejos inmuno estimulantes (ISCOM), nanopartículas de 40 nm aproximadamente, hechas a base de lípidos (fosfolípidos y colesterol), saponinas y antígeno (Morein y col., 2004). Su administración puede ser parenteral o mucosa, promoviendo eficientemente la respuesta Th1 y Th2. Se han ensayado numerosas vacunas experimentales utilizando ISCOM y se ha probado su capacidad de protección en varias especies incluyendo infecciones crónicas y persistentes como el virus de la inmunodeficiencia en humanos (HIV-1) y el virus de la inmunodeficiencia en simios (SIV) e infecciones causadas por Herpes virus en diferentes especies (Morein y Abusugra, 2004).

Otro sistema de transporte de antígenos son los liposomas, vesículas compuesta de fosfolípidos o arqueolípidos que presentan una gran versatilidad en cuanto a su composición, tamaño, características físico-químicas e inmunológicas. Dentro del grupo de liposomas, se encuentran los arqueosomas (ARQ) que son vesículas formadas en base a lípidos polares totales provenientes de diferentes bacterias del Dominio Archea (Kates, 1992). Estos arqueosomas producen una importante respuesta humoral en roedores (Gonzalez y col., 2009) aunque su efecto en bovinos aún no ha sido investigado.

En la mayoría de los trabajos experimentales de *T. foetus* desarrollados en la Argentina, el adyuvante utilizado en la preparación de vacunas, ya sea a célula entera o de membrana, ha sido el adyuvante oleoso Arlacel-Marcol. En todos ellos, se observó un incremento de los niveles de IgG luego de las aplicaciones de las dosis evidenciando diferencias significativas con respecto a los grupos controles no inmunizados (Campero y col., 1999; Cobo y col., 2004; Riccio y col., 2008) y facilitando la eliminación temprana de la infección. Corbeil y Bon Durant

(2001) formularon vacunas a *T. foetus* utilizando el Quil-A como adyuvante obteniendo buena respuesta inmunitaria en los animales inmunizados.

2. Materiales y Métodos

2.1. Selección de la cepa de T. foetus, cultivos y producción de antígeno

Para la elaboración de la vacuna se utilizó una cepa de referencia de *T. foetus* denominada B1 (Laboratorio de Patología Veterinaria, Dr. Carlos Campero, INTA, Balcarce) aislada de una vaca con piómetra, la cual fue utilizada en trabajos previos (Campero y col., 1999; Cobo y col., 2004; Riccio y col, 2008). Se obtuvieron cultivos axénicos de *T. foetus* en Caldo Infusión Hígado (CIH) suplementado con el 10% de suero equino estéril (Campero, 1986) y los siguientes antibióticos: 1g/L de estreptomicina, 1000UI/L de ampicilina, 1200 mg/L de lincomicina y 12,5 mg/L de anfotericina B. Se estableció un inóculo adecuado y se incubó estérilmente en aerobiosis a 37°C por 24 hs. Posteriormente, dicha cepa se sembró en volúmenes de 1000 ml de medio CIH para su propagación y se incubó por 24-48 hs a 37°C, alcanzando en dicho tiempo su faz logarítmica de crecimiento (Campero, 1986; Cobo y col., 2002). Luego, los cultivos se centrifugaron a 3000 rpm, se descartó el sobrenadante y se realizaron 2 lavajes con PBS (Anexo 1) de 10 min cada uno a 3000 rpm. Finalmente, las células se inactivaron con formaldehído al 0,1% (Clark y col., 1983). La esterilidad de los cultivos se comprobó mediante siembra del inóculo en placas de agar sangre en aerobiosis, durante 24 hs a 37°C (Anexo 1).

La dosis antigénica para cada vacuna se estandarizó mediante el conteo con la cámara de Neubauer a una concentración final de 1×10^8 células viables/ml de *T. foetus*.

2.2. Preparación de las vacunas experimentales

Se utilizaron diferentes preparaciones de adyuvantes (Tabla 1), a saber:

Saponina (S): solución stock (20 mg/ml) de saponina Quil-A (Brenntag Lab., Dinamarca) preparada según indicaciones del fabricante y conservada a -20°C . EL Quil-A se mezcló con la suspensión de células de *T. foetus* llegando a una concentración final de 0,4 mg/ml.

Hidróxido de aluminio (Al): el gel de hidróxido de aluminio (gentilmente donado por Laboratorio Tecnovax SA, Argentina) fue agregado a la suspensión de antígeno gota a gota. Posteriormente, se mantuvo en continua agitación (agitador orbital, Arcano, China) durante 12 hs a 4°C según especificaciones técnicas del laboratorio proveedor, hasta lograr una concentración final del 6% p/v (Figura 1).

Saponina-Hidróxido de aluminio (SAI): se preparó la suspensión celular y se mezcló con el Quil-A (0,4 mg/ml). Posteriormente, se agregó a ésta suspensión el hidróxido de aluminio gota a gota hasta llegar a una concentración final del 6% p/v, agitando durante 12 hs a 4°C .

Aceite Mineral (O): el adyuvante Montanide ISA 206 (Seppic Inc., Francia, gentilmente cedido por la Dra. Patricia Zamorano, INTA, Castelar) fue agitado vigorosamente a 30°C y el antígeno fue agregado gota a gota hasta llegar a una concentración final de 50% v/v. La concentración final fue agitada durante 10 min a 30°C y luego se llevó a la temperatura de 15°C . La

estabilidad de la emulsión se evaluó por la suspensión de una gota sobre la superficie de una solución acuosa (Moncada y col., 1993).

Arqueosomas (A): Se utilizaron arqueosomas obtenidos como nanopartículas derivados de los lípidos polares totales de *Halorubrum tebenquichense* (Gonzalez y col., 2009). Estos consistieron en vesículas oligolamelares de unos 500 nm diámetro, y potenciales Z de -35 mV, determinados por dispersión elástica de luz (Nano Z Sizer, Malvern, Inglaterra). Cada dosis comprendió una masa de arqueosomas de unos 25 mg de arqueolípidos conteniendo 1 mg de proteínas de *T. foetus*. Esta preparación fue elaborada en la Universidad Nacional de Quilmes bajo la dirección de la Dra. Eder Romero.

2.3. Dosis de vacuna

El volumen de las dosis fue estandarizado a 5 ml. En ambos casos, se completó el volumen final con el adyuvante correspondiente. Las dosis fueron fraccionadas bajo campana de flujo laminar en forma estéril (Figura 1).

Se realizaron los controles de esterilidad de las preparaciones experimentales mediante siembras en agar sangre en aerobiosis (Anexo 1).

2.4. Bovinos y diseño experimental

Se utilizaron 75 vaquillonas vírgenes de 15-18 meses de edad, Aberdeen Angus y sus cruza, en buen estado corporal, ginecológicamente aptas y con actividad ovárica cíclica, provenientes de rodeos libres de brucelosis, campylobacteriosis y tricomonosis. Cuatro meses previos al inicio del ensayo, los animales fueron inmunizados con una vacuna comercial

inactivada contra IBR, BVD; PI3, *Pasteurella* sp., *Moraxella* sp. e *Histophilus somni* (Lab. Pfizer, serie 070, vencimiento: 04/10). La aplicación se realizó por vía subcutánea en dos dosis con 30 días de intervalo.

Durante el ensayo experimental, los animales se mantuvieron en una condición corporal (CC) de 6 (escala del 1 al 9) (Corah, 1989). Las vaquillonas permanecieron en lotes de praderas artificiales con agua de adecuada calidad *ad libitum* y con calidad y disponibilidad forrajera para mantener dicha CC.

Las vaquillonas se sangraron para determinar su negatividad a brucelosis mediante la Prueba del Antígeno bufferado en Placa (BPA). Se constató también que las mismas fueran previamente negativas a tricomonosis y campylobacteriosis mediante 2 muestreos de mucus cérvico vaginal (MCV) (Campero, 1985; Campero, 1986).

Los animales se distribuyeron al azar en 7 grupos según el tipo de adyuvante utilizado en la vacuna experimental. La conformación de los grupos, número de vaquillonas y protocolo de tratamientos están resumidos en la Tabla 1.

La vacunación consistió en 2 dosis subcutáneas (SC) en la tabla del cuello y una tercer dosis intravaginal (IV) aplicada con pipeta de Cassou en el lumen de la vagina (Riccio y col., 2008). Las inmunizaciones se realizaron con intervalos de 20 días, efectuando diariamente observaciones clínicas a los fines de evaluar los eventuales efectos adversos generales y locales pos vacunación. Para constatar la reacción local en el punto de aplicación subcutánea, se midió el espesor de la piel del cuello mediante un calibre registrándose la información hasta el momento del desafío.

Las vaquillonas del grupo control no infección (CNI) no fueron inmunizadas ni desafiadas experimentalmente. Los animales del grupo control infección (Ci) no fueron vacunados, pero fueron desafiados intravaginalmente con un inóculo de *T. foetus* (Sección 2.6).

El diseño experimental de este capítulo fue evaluado y aprobado por el Cicual (Comité Internacional del Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, 21/10/10).

2.5. Muestras y cultivos referencias

Se extrajeron muestras de suero y de MCV de todas las vaquillonas. El MCV se recolectó de la parte final del cérvix y craneal de la vagina, mediante la pipeta de Cassou (Figura 2) (Terzolo y col., 1992) al comienzo del ensayo y luego, cada 14 días tras haberse realizado el desafío experimental, hasta el final del ensayo. Las muestras extraídas fueron sembradas *in situ* en CIH, cultivadas en estufa a 37°C y examinadas microscópicamente durante 7 días de incubación. En forma similar, se recolectó una alícuota del MCV en 2 ml de PBS (Anexo 1) y se conservó a -20°C hasta el momento de su procesamiento para la determinación de IgA. Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción de la vena yugular al momento de las inmunizaciones, al día 0 (día del desafío) y luego, cada 14 días, hasta la finalización del ensayo, a los 148 días pos primer dosis de vacuna (ppdv). Los sueros extraídos se mantuvieron a -20°C hasta ser utilizados para la detección de anticuerpos.

2.6. Sincronización del estro y desafío intravaginal

A fines de representar lo que ocurre naturalmente, previo a la infección, las vaquillonas fueron sincronizadas mediante la aplicación de dos inyecciones intramusculares (500 ug) de una prostaglandina análoga a la F2 α (Estrumate, Schering-Plough, Alemania) aplicadas con 11 días de intervalo.

Luego de 10 días de haberse realizado la última inmunización intravaginal, los animales de los grupos S, AI, SAI, O y A fueron desafiados experimentalmente por vía intravaginal en el lumen de la vagina con 2 ml de *T. foetus* ($1,5 \times 10^6$ células viables/ml). En dicha instancia, las vaquillonas del grupo Ci también fueron vaginalmente desafiadas con similar volumen y dosis de *T. foetus* como se mencionó previamente.

2.7. Test de ELISA para detectar anticuerpos a *T. foetus*

Se determinaron los anticuerpos IgG de *T. foetus* en suero sanguíneo e IgA en MCV mediante el test de ELISA indirecto (Cobo y col., 2002; Cobo y col., 2004). Para ambos tipos de muestras, se utilizaron placas de 96 pocillos de poliestireno (Immulon[®] 1B Flat botton microtiter Plates-Labsystems, USA) las cuales se sensibilizaron con 50 μ l por pocillo de una suspensión de organismos enteros de *T. foetus* B1, suspendidos en PBS y a una concentración de 4×10^6 cel/ml. Las placas se incubaron por 4 horas a 22 $^{\circ}$ C, posteriormente se escurrieron sobre toallas de papel absorbente, se les agregó 50 μ l por pocillo de etanol al 96%, luego se eliminó el exceso de etanol y se incubaron a 22 $^{\circ}$ C durante una noche, almacenándose las placas sensibilizadas hasta su uso a -20 $^{\circ}$ C. Previo a su uso, las placas se bloquearon con 100 μ l por pocillo con PBS, Tween 20 y gelatina (PBS Tw-g) (Anexo 1) durante 2 horas a 37 $^{\circ}$ C. Los

sueros de las vaquillonas se analizaron por duplicado a la dilución 1:1000 en PBS Tw-g incubando por una hora en estufa de 22°C, posteriormente, las placas se escurrieron y lavaron x 3 con PBS-Tw (Anexo 1).

Las muestras de MCV se homogeneizaron y sonicaron bajo refrigeración con una potencia del 80% durante 20 seg (Sonics Vibra Cell, Newtown, USA). Las mismas se analizaron por duplicado a la dilución 1:50 en PBS-Tw-g agregando 100 µl/pocillo e incubadas 1 h a 37°C.

Previo al test de ELISA, se titularon los anticuerpos secundarios para determinar las diluciones óptimas, respectivamente. En todos los casos se utilizaron muestras de sueros y de MCV controles positivos y negativos, respectivamente, perteneciente a bovinos hiperinmunizados con *T. foetus* y bovinos sin contacto previo. Para las determinaciones séricas, se utilizó un anticuerpo IgG de conejo anti bovino conjugado con peroxidasa (Sigma, cod. 096k4854, St. Louis, MO, USA) diluido 1:5000 en PBS-Tw-g (Anexo 1).

Para determinar la presencia de IgA en el MCV se utilizó un anticuerpo anti-IgA bovino producido en conejo (Bethyl, cod A10-108-8, TX, USA) diluido 1:2000 en PBS-Tw-g (Anexo 1).

En ambos casos, los anticuerpos secundarios se agregaron a razón de 100 µl/pocillo incubando las placas durante 30 minutos a 37°C. Como cromógeno se utilizó una solución 40 mM de ABTS pH 4.5 [2,2'-azino-die (3-etilbenzotiazolin sulfonato)] (Sigma, St. Louis, MO, USA). Las placas se leyeron con un lector de ELISA (ELISA Multiskan EX, Labsystems, Helsinki, Finland) con filtros de 405 nm y las absorbancias obtenidas se expresaron como densidades ópticas (DO).

2.8. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados con el paquete de software R (cran.r-project.org). Las diferencias entre los niveles de inmunoglobulinas entre los grupos vacunados fueron evaluadas con el Test de Kruskal-Wallis con un análisis posterior de las diferencias significativas con el test de Tukey-Kramer (Nemenyi). Los tiempos acumulativos en la eliminación de la infección fueron calculados por el método Kaplan-Meier. La significancia estadística de las diferencias obtenidas fueron testeadas por el método log Rank con rho igual a 0 o 1.

3. Resultados

3.1. Control clínico

Las vaquillonas utilizadas en este ensayo no manifestaron signos clínicos generales ni anomalías durante todo el periodo estudiado. Únicamente se observó una respuesta inflamatoria local en el punto de aplicación de la vacuna SC con formación de granulomas en todas las vaquillonas del grupo inmunizado con el adyuvante oleoso (O). Dicha inflamación se detectó entre la segunda y tercer semana pppv. La reacción inflamatoria de tipo granulomatosa se caracterizó por su consistencia firme, sin contenido fluido, con un tamaño que se incrementó luego de la aplicación de la 2ª dosis de vacuna (desde 2x1 cm hasta 4x9 cm). Los granulomas disminuyeron su tamaño desapareciendo a los 60 días pppv. No se observaron reacciones adversas en el área genital de ninguna de las vaquillonas luego de la aplicación intravaginal de la vacuna ni luego del desafío experimental por dicha vía con *T. foetus*.

3.2. Duración de la infección genital

Todos los animales desafiados experimentalmente resultaron positivos al cultivo de MCV en el día 14 posdesafío (pd). Sin embargo la persistencia de la infección fue variable en los diferentes grupos. En el grupo Ci, la totalidad de los animales permanecieron infectados hasta el día 42 pd. A partir de esta fecha, las vaquillonas de este grupo comenzaron a eliminar la infección y sólo 2/11 (18%) permanecieron infectadas hasta el final del ensayo (día 98 pd) (Tabla 2).

En el grupo A, la mayoría de los animales permanecieron infectados hasta los 56 días pd y al finalizar el ensayo aún persistía la enfermedad en 4/11 vaquillonas (36%). Como en este grupo los animales se comportaron de igual modo que el grupo Ci, se decidió no incorporarlos en los análisis estadísticos que se realizaron.

El análisis de Kaplan-Meier mostró tasas variables en la disminución de la infección en los diferentes grupos, con tiempos promedio que variaron desde los 70 días en los animales del Ci a un tiempo promedio de 37 días para el grupo SAI. El test generalizado de Wilcoxon evidenció que al menos un tratamiento experimental fue significativamente diferente del grupo Ci reflejando un valor de $p= 0,00594$. De todos modos, los grupos vacunados fueron analizados individualmente con el grupo Ci. De esta comparación surgió que el grupo AI (59 días) no tuvo diferencias significativas con respecto al Ci ($p= 0,194$), mientras que el grupo O (50 días) y el grupo S (50 días) tuvieron un significativo incremento en la tasa de desaparición de la infección ($p= 0,01$ y $p= 0,004$, respectivamente). Además, la combinación de la saponina y el hidróxido de aluminio (SAI) presentaron una mejor respuesta reduciendo el tiempo de infección a 37 días ($p= 0,00009$) (Tabla 3).

3.3. Respuesta inmunitaria humoral sistémica

Los animales del grupo CNI tuvieron concentraciones basales de IgG a lo largo de todo el ensayo (datos no mostrados). Los animales del grupo Ci evidenciaron las mismas concentraciones basales hasta el día de la infección, luego de dicha instancia se observó un incremento lento y continuo de los niveles de IgG (Figura 3). Con excepción del grupo Al y el grupo A (no mostrado), los niveles de IgG de los grupos vacunados aumentaron luego de la primera dosis de vacuna llegando a su máximo valor luego de ser aplicada la segunda dosis SC. A partir del día 14 pd se observó un estancamiento de dichos valores, los que se mantuvieron durante todo el ensayo. Estadísticamente, al considerar el periodo que va desde la infección experimental (día 0 pd) hasta el día 28 pd, los grupos O, S y SAl mostraron diferencias significativas en los valores de IgG en comparación a los valores del grupo Ci, mientras que para el grupo Al, las concentraciones fueron intermedias pero sin presentar diferencias significativas con el Ci (Tabla 4, Figura 3). Las vaquillonas del grupo Al, luego del día 28 pd tuvieron niveles de IgG mayores a los del grupo control. De todos modos, en comparación con los otros adyuvantes, el hidróxido de aluminio no indujo una mayor respuesta humoral (Figura 3).

3.4. Respuesta inmunitaria humoral local

El perfil de anticuerpos en la respuesta inmunitaria humoral local fue muy diferente al encontrado en la inmunidad humoral sistémica. En este caso, no se observó que la aplicación de una tercera dosis intravaginal tuviera efecto en la concentración de IgA en el MCV, manteniéndose valores similares en todos los grupos (Figura 3).

Asimismo, se observó un marcado aumento de IgA a los 14 días pd luego de haberse realizado la infección experimental con *T. foetus*, la cual se mantuvo en los días posteriores a la infección. Aunque los patrones de anticuerpos se comportaron de igual modo para todos los grupos vacunados sin presentar diferencias significativas, la concentración de IgA de los grupos O, S y SAI mostró una tendencia de valores mayores a los hallados para el grupo Ci, Al y A (Tabla 4, Figura 3).

Las absorbancias detectadas en el MCV de las vaquillonas del grupo A no tuvieron diferencias significativas con los animales del grupo Ci en ninguno de los muestreos realizados.

4. Discusión

En el presente capítulo se evaluó la eficiencia de vacunas elaboradas a célula entera de *T. foetus* con diferentes adyuvantes. Para ello, se inmunizaron vaquillonas que posteriormente fueron infectadas experimentalmente con *T. foetus* y se analizó la persistencia a la infección que las mismas presentaron a lo largo de todo el ensayo. Con el desarrollo de este ensayo se cumplió con el objetivo “A” planteado en este capítulo que fue:

“Evaluar la duración de la infección genital en vaquillonas inmunizadas con vacunas experimentales diseñadas con antígenos inactivados de célula entera de T. foetus y diferentes adyuvantes”.

En primera instancia, se observó que tras la aplicación de dichas vacunas experimentales, ninguna logró evitar la colonización de *T. foetus*. Estos resultados son coincidentes con otros trabajos experimentales (Corbeil y col., 1998; Campero y col., 1999;

Cobo y col., 2004, Edmonson y col., 2017). Por otro lado, este hallazgo permite confirmar la capacidad de la cepa de *T. foetus* empleada en el desafío intravaginal para colonizar el tracto genital de las vaquillonas desafiadas.

Edmonson y col. (2017) evaluaron la eficacia de una vacuna comercial (TrichGuard, USA) en vaquillonas y determinaron que tanto las que habían sido inmunizadas como las pertenecientes al grupo control sin inmunizar resultaron positivas a *T. foetus* por la técnica de PCR luego del desafío a los 38 días posteriores a la inmunización. A pesar de que los animales se infectaron, se determinó que la aplicación de esta vacuna indujo cierto grado de protección, evidenciado por un aumento en los índices de preñez y parición.

Campero y col. (1999) al realizar la infección experimental en vaquillonas con la misma cepa de *T. foetus* utilizada en la presente tesis, constataron que algunas hembras no se infectaron, tanto en el grupo vacunado (2/12) como en el grupo control (2/13). De igual modo, BonDurant y col. (1993) determinaron que un animal (1/8) no logró infectarse luego de realizar la infección experimental con *T. foetus*. Sin embargo, se debe aclarar que la dosis que utilizaron estos autores para la infección experimental fue menor que la utilizada en el presente ensayo, por lo que podría especularse que ello pudo haber ocasionado dicha diferencia.

Por otra parte, en la mayoría de los ensayos en donde se utilizó el servicio natural con toros infectados con *T. foetus* como metodología de desafío natural, no todos los animales contrajeron la enfermedad (Gault y col., 1995; Campero y col., 1998; Riccio y col., 2008). Dicho comportamiento en los animales dificulta el estudio de la efectividad de vacunas, ya que posiblemente la carga parasitaria del toro disminuya tras las sucesivas montas y no logre

infectar a todos los animales en estudio. Es por ello que en muchos de estos ensayos, el servicio natural debió complementarse con un desafío extra, intravaginal (BonDurant y col., 1993; Corbeil y col., 1998). Una de las desventajas que existe en el hecho de utilizar un toro infectado con *T. foetus* para infectar varias hembras, es que podría existir una reducción en el número de protozoos en la mucosa peneana y prepucial (Cobo y col., 2002) disminuyendo de este modo la capacidad de infección a las vaquillonas del rodeo. En base a los mencionados comentarios, en el presente trabajo se decidió realizar las infecciones en las vaquillonas únicamente bajo la forma de desafío intravaginal con cultivos viables de *T. foetus*.

Se destaca que la formulación donde se combinó el hidróxido de aluminio con Quil-A redujo la duración de la infección genital de un modo considerable (37 días). Estos datos son similares a los hallados por Campero y col. (1999) que obtuvieron un promedio de infección de 35 días para un grupo inmunizado utilizando una vacuna a membrana de *T. foetus*. Esta combinación de adyuvantes fue más eficaz que las preparaciones con sólo un adyuvante, ya sea hidróxido de aluminio (59,4 días), saponina (49,9 días), aceite oleoso (50,1 días) o arqueosomas (85 días).

El hidróxido de aluminio estimula la respuesta del tipo humoral, la secreción de citoquinas Il-5 y la producción de IgG1 e IgE. Por el contrario no estimula la respuesta celular. Las sales de aluminio convierten los antígenos solubles en partículas pequeñas que son captadas por las células presentadoras de antígenos (Brunner y col., 2010). También hay estudios que sugieren que las sales de aluminio promueven la formación de un depósito de antígeno en el sitio de inoculación de donde es liberado lentamente (Blagowechnsky, 1938).

El Quil-A es una saponina parcialmente purificada, capaz de inducir una respuesta tanto humoral como celular (Sun y col., 2009).

De acuerdo a los resultados encontrados en este trabajo, se podría especular que la combinación de los adyuvantes Quil-A e hidróxido de aluminio producirían un efecto “booster” sobre el sistema inmunitario. Ambos adyuvantes, podrían haber estimulado de un modo sinérgico la producción de anticuerpos IgG, generando de esta manera, una potente respuesta inmunitaria que facilitó la eliminación de *T. foetus* de un modo precoz del tracto genital.

La vacuna formulada sólo con Quil-A también resultó efectiva para la eliminación de la infección, ya que logró que a los 42 días pd sólo existieran 4 animales infectados de los 11 vacunados. Los mismos fueron eliminando la infección paulatinamente hasta el día 84 pd, cuando resultaron negativos en su totalidad. Estos resultados coinciden con los encontrados por Corbeil y col. (1998) en cuyo ensayo utilizaron el Quil- A como adyuvante en la formulación de una vacuna a *T. foetus*, logrando una pronta eliminación de la infección parasitaria (en las primeras 5 semanas) comparada con el grupo control, aunque dichos autores no evaluaron otros adyuvantes como en el presente trabajo.

Por otra parte, la vacuna formulada con hidróxido de aluminio (grupo Al), generó una respuesta inmunitaria suficiente para que los animales inmunizados resultaran libres de la infección al finalizar el ensayo (98 días pd), pero de acción más lenta que el Quil-A, ya que a los 42 días pd, el 60% de los animales (6/10) aún permanecían infectados.

Dentro del grupo de animales inmunizados con el adyuvante oleoso existieron vaquillonas que continuaron aún infectadas con *T. foetus* al momento de finalizar el ensayo

(98 pd). En los primeros muestreos posdesafío, la mayoría de los animales lograron liberarse de la infección genital, quedando sólo 3/10 animales infectados a los 42 días pd. Este número de infectados se mantuvo en el siguiente muestreo y al finalizar el ensayo a los 98 días pd, sólo una vaquillona permanecía aún infectada. A pesar de que el número de animales fue limitado, estos resultados representan un 10% de la muestra total. Sería necesario realizar nuevos estudios con mayor cantidad de animales para determinar si la persistencia de la infección obedeció a factores intrínsecos del animal, o al escaso efecto generado por el adyuvante en la vacuna.

Todas las vaquillonas vacunadas del grupo O desarrollaron granulomas en el punto de inoculación en el tejido subcutáneo de modo posterior a la inmunización, a diferencia de los demás grupos donde no se observaron reacciones secundarias. Los granulomas desaparecieron a los 60 días posvacunación sin dejar secuelas locales. Estos hallazgos concuerdan con los de otros autores (Riccio y col., 2008) quienes registraron una leve reacción local luego de la aplicación de la segunda dosis subcutánea de una vacuna experimental de base oleosa, aunque en este caso la misma desapareció mucho antes (3 semanas después de la aplicación de la vacuna). Campero y col. (1998) observaron una importante respuesta local del tipo granulomatosa tras aplicar una vacuna con adyuvante oleoso en la submucosa vaginal. La misma desapareció luego de 2 semanas. En el presente ensayo no se evidenciaron reacciones adversas al utilizar la vía intravaginal en ninguno de los animales inmunizados, posiblemente debido a que la dosis de vacuna correspondiente se aplicó en el lumen vaginal mientras que Campero y col. (1998) la aplicaron en la submucosa de la vagina.

La formulación de vacunas utilizando arqueosomas como adyuvante no indujo protección contra la infección genital en la mayoría de los animales experimentales, en ningún momento del ensayo, quienes se comportaron en forma similar a los animales del grupo Ci. Al día 42 pd, 9/11 animales permanecían infectados y 4 animales permanecieron infectados hasta finalizar el ensayo. Aunque este adyuvante demostró ser efectivo en roedores (Gonzales y col., 2009), su utilización en vaquillonas no había sido probada hasta el presente trabajo, encontrándose que su aplicación no indujo la respuesta inmunitaria esperada. Este resultado puede deberse a que la concentración de arqueolípidos utilizada podría haber sido insuficiente para esta especie, o bien que el antígeno utilizado fuera el adecuado para este tipo de adyuvante. Es conveniente por ello, reconsiderar su uso, evaluar la particulación antigénica y la preparación del inmunógeno, vía de aplicación y dosis adecuada para su eventual aplicación como adyuvante en bovinos.

Los resultados presentados en este capítulo ofrecen información útil sobre el comportamiento y los efectos provocados por diferentes adyuvantes sobre la respuesta inmunitaria protectora contra la infección por *T. foetus*. Este es el primer ensayo en el que se evalúan los efectos de diferentes adyuvantes, por lo que no se puede comparar con los trabajos realizados previamente en el país, ya que el adyuvante utilizado por excelencia en todos los ensayos experimentales con *T. foetus* fue del tipo oleoso (Arlacel-Marcol) (Campero y col., 1998; Cobo y col., 2002; Cobo y col., 2004; Riccio y col., 2008).

En este capítulo también se evaluaron la respuesta inmunitaria humoral sistémica y local de las vaquillonas inmunizadas respondiendo de este modo al Objetivo "B" que planteaba:

“Caracterizar la respuesta inmunitaria humoral (sérica y en fluidos genitales) en vaquillonas inmunizadas con estas vacunas”.

En los animales del grupo Ci se observó que la concentración de anticuerpos específicos (IgG) se incrementó lentamente desde el momento de la infección y su concentración llegó a los niveles máximos cuando la mayoría de las vaquillonas ya se habían liberado de la infección. Todos los animales de los grupos vacunados, presentaron un incremento en los niveles de anticuerpos IgG anti *T. foetus* luego de la aplicación de la primera dosis de vacuna. Esta respuesta se fue incrementando hasta llegar a su valor máximo a los 21 días pos 2^o dosis de vacuna, coincidiendo con otras observaciones previas (Kvasnicka y col., 1989; Campero y col., 1998; Corbeil y col., 2001; Cobo y col., 2002; Fort y col., 2004). Los animales inmunizados con adyuvantes S, O y la combinación SAI fueron los que desarrollaron los mayores títulos de anticuerpos específicos, sin diferencias significativas entre ellos. La mayoría de estos animales eliminaron tempranamente la infección. Aunque los títulos de IgG hallados en los sueros ofrecen una medida útil que puede relacionarse con la capacidad de un animal para la eliminación de una infección, en este ensayo, no se pudo trazar una relación directa entre estos dos parámetros.

Cabe mencionar la situación particular de dos de los animales del grupo O, que fueron los que más tiempo permanecieron infectados (Identificación: N^o32/32 y N^o25/278). Los mismos presentaron títulos a IgG más bajos que el resto de los animales del grupo a lo largo de todo el ensayo. Esto, sumado a que el primero de estos animales presentó el granuloma más prominente (9x4 cm) luego de las inmunizaciones, permitiría inferir que la formación de

granulomas temporales podría interactuar negativamente en la producción de IgG1 específica, interfiriendo en la eliminación temprana de la infección genital.

La aplicación de una tercera dosis intravaginal en el lumen no implicó en ninguno de los animales inmunizados una mayor producción de IgA inmediatamente posterior a la inmunización. Sin embargo, existió una respuesta local tras la descarga experimental con *T. foetus*, siendo más notoria en los grupos SAI, O y S aunque sin diferencias significativas entre los tratamientos para la mayoría de los puntos muestrales (Figura 3). Sólo a los 28 días pd existió una respuesta al estímulo antigénico vaginal en los animales de los grupos SAI, O y S que fue significativamente mayor con respecto al resto de los grupos experimentales ($p < 0,05$). Estos hallazgos coinciden con la mayoría de los trabajos realizados en el tema, en los que no se observa un aumento inmediato de los niveles de IgA luego de la aplicación del refuerzo intravaginal, pero éstos aumentan luego de realizarse la infección experimental (Corbeil y col., 2001; Cobo y col., 2002; Riccio y col., 2008).

Ante lo anteriormente expuesto se puede, finalmente, contestar al objetivo “C” que es: *“Determinar cuál es la mejor combinación entre antígeno y adyuvante para la formulación de una vacuna efectiva a T. foetus”*.

Si se considera que la presencia de *T. foetus* en el tracto genital en las hembras bovinas a los 70 días posinfección está directamente relacionada con las pérdidas fetales (Parsonson y col., 1976), una vacuna adecuada debería eliminar la infección genital antes de dicho periodo crítico en al menos el 90% de las hembras bovinas. Dicho paradigma debería ser cumplido por cualquier vacuna comercial específica para el control de la tricomonosis bovina.

En el presente trabajo, la vacuna que incluyó la combinación de los adyuvantes Quil-A e hidróxido de aluminio (SAI), superó dicho umbral de exigencia consiguiendo la eliminación total de la infección genital al día 56 posdesafío. La vacuna formulada con el adyuvante Quil-A también logró superar este umbral ya que el 91% de los animales inmunizados se liberó de la infección antes del día 70 pd (Tabla 2). Las otras formulaciones, sólo lograron eliminar la infección como máximo en un 80% de las vaquillonas para dicho período.

Asimismo esta respuesta efectiva por parte del grupo SAI, estuvo acompañada de una respuesta inmunitaria humoral con elevados niveles de IgG séricos. Aunque estos parámetros no pudieron ser directamente relacionados, en este caso, la producción de IgG fue notoria tras la aplicación de las 2 primeras inmunizaciones, marcando diferencias significativas con los demás grupos. Luego, los niveles de anticuerpos se mantuvieron estables a lo largo de todo el ensayo.

Por otra parte, en las vaquillonas del grupo SAI hubo diferencias significativas entre los niveles de IgA con respecto a las hembras de los demás grupos al menos en un periodo muestreado (28 días pd) (Tabla 4).

En base a la importante reducción en el tiempo de infección en los animales vacunados con el antígeno a célula entera de *T. foetus* con la combinación de los adyuvantes Quil-A e hidróxido de aluminio, se puede concluir que ésta fue la formulación más exitosa en el presente ensayo experimental. Estos resultados alientan el desarrollo de nuevas estrategias vacunales contra *T. foetus*, prestando especial atención tanto al antígeno como al adyuvante utilizados en su formulación, a fin de obtener una protección adecuada.

Tablas y Figuras del Capítulo II

Tablas

Tabla 1. Número de vaquillonas asignadas al azar en diferentes grupos experimentales según sus tratamientos.

Grupo	Vaquillonas (n)	Adyuvante/Desafío
CNI	11	Sin vacunar/Sin desafiar
Ci	11	Sin vacunar/Desafío vaginal
O	10	50% v/v Montanide ISA 206 VG/Desafío vaginal
Al	10	6% p/v hidróxido de aluminio/Desafío vaginal
S	11	0.4 mg/ml Quil-A/Desafío vaginal
SAI	11	0.4 mg/ml Quil-A/6% p/v hidróxido de aluminio/Desafío vaginal
A	11	25 mg de arqueolípidos de <i>Halorubrum tebenquichense</i> / Desafío vaginal

Tabla 2. Tiempo de persistencia a la infección de *T. foetus* en cultivos de MCV de vaquillonas vacunadas con dos dosis SC y una dosis IV de *T. foetus* inactivada (1×10^8 células), formuladas con diferentes adyuvantes y posteriormente desafiadas con una dosis de 3×10^6 células de *T. foetus*. Ci: no vacunadas, SAI: saponina e hidróxido de aluminio, S: saponina, O: adyuvante oleoso, Al: hidróxido de aluminio, A: arqueosomas.

Animal N°	Grupo	Días posdesafío							
		0	14	28	42	56	70	84	98
9/9	Ci	-	+	+	+	-	-	-	-
14/300	Ci	-	+	+	+	+	-	-	-
27/277	Ci	-	+	+	+	-	-	-	-
30/273	Ci	-	+	+	+	+	+	-	-
31/271	Ci	-	+	+	+	+	-	-	-
170/62	Ci	-	+	+	+	+	-	-	-
176/68	Ci	-	+	+	+	+	+	+	+
314/44	Ci	-	+	+	+	+	+	-	-
315/45	Ci	-	+	+	+	+	-	-	-
326/57	Ci	-	+	+	+	+	+	+	+
114/054	Ci	-	+	+	+	-	-	-	-
Animales infectados		0/11	11/11	11/11	11/11	8/11	4/11	2/11	2/11
% infectividad		0	100%	100%	100%	73%	36%	18%	18%

Animal N°	Grupo	Días posdesafío							
		0	14	28	42	56	70	84	98
16/289	SAI	-	+	-	-	-	-	-	-
119/119	SAI	-	+	-	-	-	-	-	-
134/403	SAI	-	+	+	-	-	-	-	-
147/147	SAI	-	+	-	-	-	-	-	-
177/69	SAI	-	+	+	+	-	-	-	-
179/71	SAI	-	+	+	-	-	-	-	-
286/286	SAI	-	+	+	+	-	-	-	-
308/38	SAI	-	+	+	+	-	-	-	-
323/53	SAI	-	+	-	-	-	-	-	-
324/55	SAI	-	+	+	-	-	-	-	-
03/83	SAI	-	+	+	-	-	-	-	-
Animales infectados		0/11	11/11	7/11	3/11	0/11	0/11	0/11	0/11
% infectividad		0	100%	64%	27%	0	0	0	0

Animal N°	Grupo	Días posdesafío							
		0	14	28	42	56	70	84	98
12/298	S	-	+	+	-	-	-	-	-
19/286	S	-	+	-	-	-	-	-	-
34/264	S	-	+	+	-	-	-	-	-
40/92	S	-	+	+	+	-	-	-	-
55/285	S	-	+	+	+	-	-	-	-
143/74	S	-	+	+	+	+	-	-	-
149/78	S	-	+	-	-	-	-	-	-
309/39	S	-	+	+	-	-	-	-	-
316/46	S	-	+	+	-	-	-	-	-
67/67	S	-	+	+	+	+	+	-	-
80/80	S	-	+	+	-	-	-	-	-
Animales infectados		0/11	11/11	9/11	4/11	2/11	1/11	0/11	0/11
% infectividad		0	100%	82%	36%	18%	9%	0	0

Animal N°	Grupo	Días posdesafío							
		0	14	28	42	56	70	84	98
22/282	O	-	+	-	-	-	-	-	-
25/278	O	-	+	+	+	+	+	+	+
32/262	O	-	+	+	-	-	-	-	-
37/267	O	-	+	+	-	-	-	-	-
106/106	O	-	+	-	-	-	-	-	-
142/73	O	-	+	+	-	-	-	-	-
313/43	O	-	+	+	-	-	-	-	-
320/50	O	-	+	+	+	+	-	-	-
32/32	O	-	+	+	+	+	+	+	-
78/78	O	-	+	-	-	-	-	-	-
Animales infectados		0/10	10/10	7/10	3/10	3/10	2/10	2/10	1/10
% infectividad		0	100%	70%	30%	30%	20%	20%	10%

Días posdesafío

Animal N°	Grupo	0	14	28	42	56	70	84	98
02/81	Al	-	+	+	-	-	-	-	-
13/299	Al	-	+	+	-	-	-	-	-
16/16	Al	-	+	+	+	-	-	-	-
35/265	Al	-	+	-	-	-	-	-	-
64/64	Al	-	+	+	+	+	-	-	-
174/66	Al	-	+	+	+	+	-	-	-
301/31	Al	-	+	+	+	+	+	+	-
303/33	Al	-	+	+	-	-	-	-	-
311/41	Al	-	+	+	+	+	+	+	-
2/2	Al	-	+	+	+	+	-	-	-
Animales infectados		0/10	10/10	9/10	6/10	5/10	2/10	2/10	0/10
% infectividad		0	100%	90%	60%	50%	20%	20%	0

Días posdesafío

Animal N°	Grupo	14	28	42	56	70	84	98	
04/84	A	-	+	+	+	+	+	+	
07/292	A	-	+	+	+	+	+	+	
21/283	A	-	+	+	+	+	+	-	
171/63	A	-	+	+	+	+	-	-	
175/67	A	-	+	+	-	-	-	-	
178/70	A	-	+	+	+	+	-	-	
305/35	A	-	+	+	+	+	-	-	
306/36	A	-	+	+	+	+	-	-	
329/90	A	-	+	+	+	+	+	+	
330/61	A	-	+	+	+	+	+	+	
65 /65	A	-	+	-	-	-	-	-	
Animales infectados		0/11	11/11	10/11	9/11	9/11	8/11	5/11	4/11
% infectividad		0	100%	91%	82%	82%	73%	45%	36%

Tabla 3. Tiempo de eliminación de la infección genital de *T. foetus* en vaquillonas infectadas experimentalmente, analizado mediante Kaplan Meier. La persistencia a la infección genital se evaluó en vaquillonas vacunadas con dos dosis SC y una dosis IV de *T. foetus* inactivada (1×10^8 células), formuladas con diferentes adyuvantes y luego y desafiadas con una dosis de 3×10^6 células de *T. foetus*. Los asteriscos destacan los valores significativos en los diferentes grupos. Ci: no vacunadas, O: adyuvante oleoso, Al: hidróxido de aluminio, S: saponina, SAl: saponina e hidróxido de aluminio.

Liberación de la infección		
Grupo	Días promedio	Significancia (p)
Ci	70,4	-
O	50,1	0,0151*
Al	59,4	0,194 -
S	49,9	0,00392 **
SAI	37,2	0,0000953*****

Tabla 4. Niveles de IgG e IgA expresados en densidades ópticas (DO) en vaquillonas vacunadas con dos dosis SC y una dosis IV de *T. foetus* inactivada (1×10^8 células) formuladas con diferentes adyuvantes y posteriormente desafiadas con una dosis de 3×10^6 células de *T. foetus*. Las absorbancias fueron evaluados a los días 0 (día de infección), 14 y 28 días pd. Los asteriscos destacan los valores significativos en los diferentes grupos, Ci: no vacunadas, O: adyuvante oleoso, Al: hidróxido de aluminio, S: saponina, SAI: saponina e hidróxido de aluminio.

Grupo	0		14		28	
	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA
Ci	0,33(ds=0,16)	0,20(ds=0,24)	0,52(ds=0,30)	0,05(ds=0,12)	0,73(ds=0,50)	0,55(ds=0,26)
O	1,57(ds=0,39) p=0,0051 **	0,40(ds=0,16) 0,99 -	1,52(ds=0,35) 0,0009 ***	0,30(ds=0,10) 1 -	1,61(ds=0,39) 0,001 **	0,89(ds=0,43) 0,097 -
Al	0,89(ds=0,14) 0,6086 -	0,13(ds=0,30) 0,88 -	0,90(ds=0,17) 0,956 -	0,27(ds=0,18) 0,836 -	1,24(ds=0,22) 0,401 -	0,73(ds=0,47) 0,397 -
S	1,51(ds=0,35) 0,0002 ***	0,25(ds=0,27) 0,99 -	1,49(ds=0,45) 0,0022 **	0,58(ds=0,36) 0,301 -	1,52(ds=0,59) 0,009 **	0,88(ds=0,28) 0,138 -
SAI	1,29(dv=0,18) 0,000088 ****	0,28(dv=0,10) 0,97 -	1,37(dv=0,09) 0,0071 **	0,32(dv=0,27) 0,758 -	1,45(dv=0,29) 0,023 *	0,98(dv=0,23) 0,018 *

Figuras

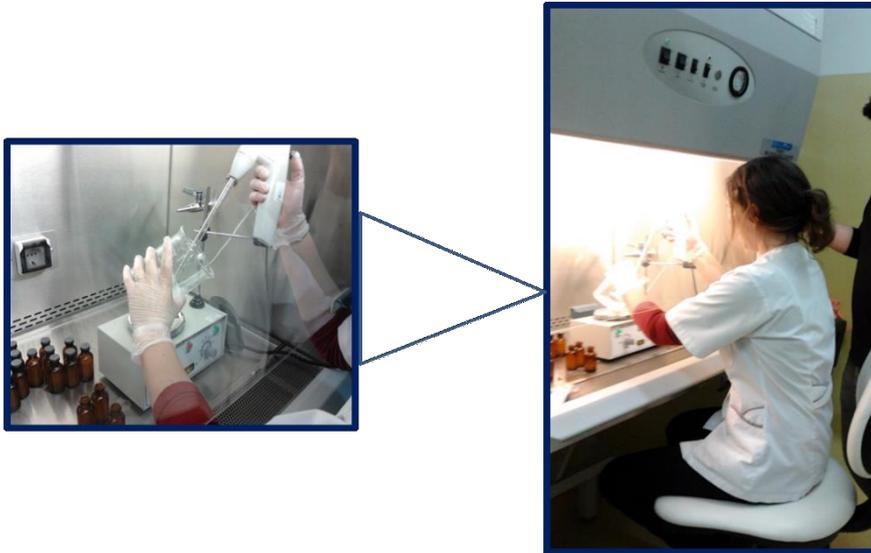


Figura 1. Preparación de adyuvantes para la formulación de vacunas experimentales a *T. foetus* mediante agitación bajo flujo laminar.

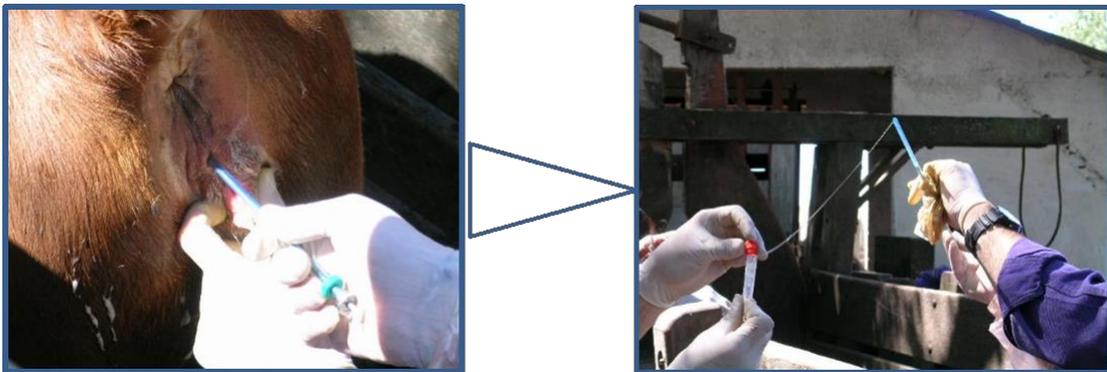


Figura 2. Extracción de muestras de MCV de la parte craneal de la vagina en vaquillonas con la pipeta de Cassou.

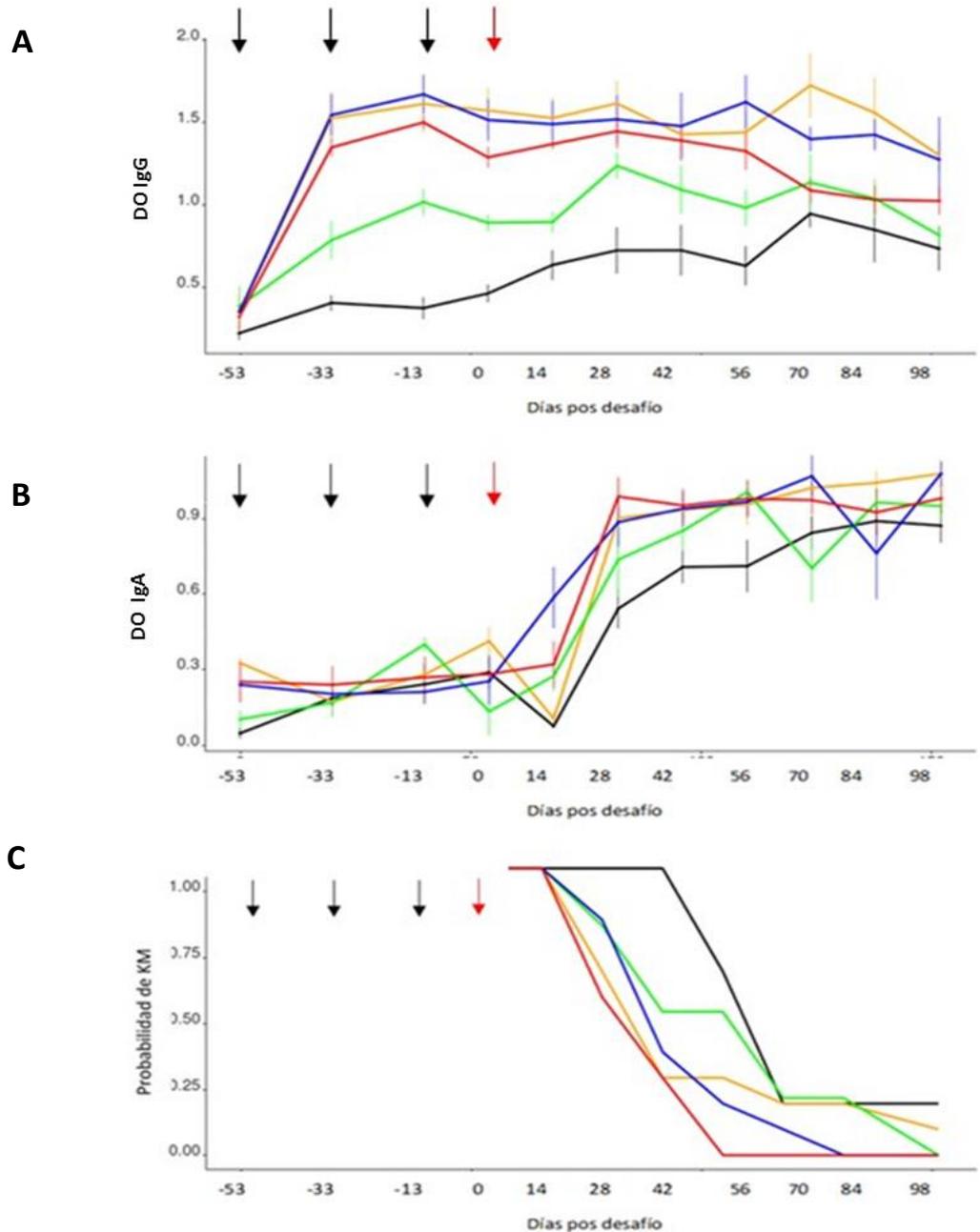


Figura 3. Respuesta inmunitaria y tiempos de eliminación de la infección de *T. foetus* en vaquillonas inmunizadas con vacuna a célula entera de *T. foetus* inactivada formulada con diferentes adyuvantes y desafiadas con una dosis de 3×10^6 células de *T. foetus*. Los valores de IgG en suero (A) y de IgA en MCV (B) expresados como densidades ópticas (DO) se muestran en paralelo con el test de supervivencia de Kaplan Meier (C). Los tiempos de las inmunizaciones subcutáneas (SC) e intravaginales (V) están indicados en la parte superior del gráfico con flechas negras y la flecha roja indica el momento del desafío. — Ci: no vacunadas, — O: adyuvante oleoso, — Al: hidróxido de aluminio, — S: saponina, — SAl: saponina e hidróxido de aluminio.

Capítulo III

Efecto de una tercer dosis de vacuna experimental a *T. foetus* aplicada por vía vaginal en vaquillonas previamente vacunadas por vía subcutánea

Objetivo: Evaluar la persistencia a la infección y la respuesta inmunitaria humoral en vaquillonas, tras la aplicación de una dosis de vacuna experimental a *T. foetus* por vía intravaginal.

1. Introducción

Al momento de elaborar una vacuna efectiva para controlar la tricomonosis, es de suma importancia considerar la vía de aplicación, ya que de ello depende el tipo de respuesta inmunitaria que se promoverá para proteger a los animales inmunizados contra una eventual infección. La inmunización intravaginal con *T. foetus* en hembras induce una respuesta humoral caracterizada por la presencia de IgA e IgG1 a nivel genital, similar a la que ocurre naturalmente, pero de aparición más temprana y efectiva (BonDurant y col., 1993). Sin embargo el rol que cumplen dichos anticuerpos en la protección contra este parásito, aún no está del todo claro. La IgA es la inmunoglobulina más importante en la protección de las superficies mucosas.

Tradicionalmente, se ha utilizado la inmunización por vía subcutánea (SC) para la aplicación de vacunas comerciales o experimentales contra *T. foetus*, basado en el hecho de que la producción de IgG, generada a través de la estimulación del sistema inmunológico

central, es transportada desde el plasma a las secreciones genitales, otorgando protección contra el parásito a nivel local en las hembras bovinas vacunadas (Corbeil y col., 1998; Corbeil y col., 2001).

Sin embargo, algunos trabajos experimentales han utilizado la inmunización por vía vaginal como complemento a la inmunización SC, por su potencial capacidad de generar una respuesta *in situ* (Mulira y col., 1994; Corbeil y col., 1998; Cobo y col., 2002).

Corbeil y col. (1998), determinaron que la inmunización sistémica sumada a la aplicación de un refuerzo vacunal intravaginal estimulaba la respuesta de IgA, mientras que la inmunización sólo por vía sistémica inducía, la producción de IgG en secreciones genitales, tanto en roedores como en vaquillonas. Cobo y col. (2002) obtuvieron resultados similares en vaquillonas, tras aplicar un refuerzo en el lumen vaginal, hallando un importante incremento de IgA en las secreciones vaginales posinfección. En estos ensayos (Corbeil y col., 1998; Cobo y col., 2002), los animales inmunizados eliminaron la infección genital antes que los animales del grupo control, aunque éstas no fueron diferencias estadísticamente significativas.

Con el objetivo de determinar si el sistema inmunitario de mucosas podría ser estimulado para inducir protección en el tracto genital, Corbeil y col. (2001) reprodujeron la experiencia realizada (Corbeil y col., 1998) utilizando un refuerzo por vía intranasal en lugar de la tradicional vía intravaginal. Nuevamente, la IgA predominó en las secreciones vaginales de los grupos con el refuerzo intranasal, mientras que la IgG1 predominó en las que recibieron un refuerzo sistémico. En ambos grupos inmunizados por vía mucosa, las vaquillonas se liberaron de la infección antes que el grupo no inmunizado, aunque sin diferencias estadísticamente significativas entre sí. De este modo se evidenció que tanto los animales inmunizados tanto por vía intravaginal como por la vía intranasal, generaron IgA vaginal,

sugiriendo que tanto la IgA como la IgG actúan eficazmente en la protección y eliminación de la infección genital (Corbeil y col., 2001).

Riccio y col. (2008) hallaron resultados similares tras comparar el efecto de una vacuna a célula entera contra *T. foetus* aplicada por la vía intravaginal y la vía intranasal.

Sin embargo, Voyich y col. (2001), no obtuvieron respuesta local tras la inmunización de vaquillonas por vía subcutánea o intranasal, aunque se observó en este segundo grupo una tasa de infección menor a la del grupo control. La producción sistémica de IgG1 e IgG2, sólo se observó en animales inmunizados por vía subcutánea.

El objetivo de este capítulo fue: “Evaluar la persistencia de la infección y la respuesta inmunitaria en vaquillonas, tras la aplicación de un refuerzo intravaginal con una vacuna experimental a *T. foetus*”.

La escasa respuesta local observada en el ensayo experimental anterior (Sección 3.4., Capítulo II) tras aplicar un refuerzo intravaginal en el lumen de la vagina, generó el interrogante sobre si esta metodología podría haber generado menor exposición del antígeno al sistema inmunitario, disminuyendo de este modo la producción de anticuerpos IgA. Es por este motivo, que en este Capítulo no solo se estudió el efecto provocado por la aplicación de un refuerzo intravaginal sino también el modo en que el mismo fue aplicado, considerando dos vías de aplicación del el refuerzo vacunal: intraluminal (IL) y submucosa (SM).

2. Materiales y Métodos

Para la elaboración de la vacuna se utilizó la misma cepa y metodología descrita previamente (Sección 2.1., Capítulo II). El adyuvante utilizado en la formulación fue una

combinación de hidróxido de aluminio y Quil-A (Sección 2.2., Capítulo II) y la dosis final de la vacuna fue de 5 ml.

2.1. Bovinos y diseño experimental

Se emplearon 60 vaquillonas vírgenes de 15-18 meses de edad, de la misma raza y condiciones sanitarias que las descritas con anterioridad (Sección 2.4., Capítulo II).

Los animales se distribuyeron al azar en 5 grupos según la vía de inmunización utilizada para la aplicación de la tercera dosis intravaginal. Las vaquillonas del grupo SC recibieron solamente 2 dosis subcutáneas, las del grupo IL recibieron 2 dosis subcutáneas y la tercera dosis se aplicó mediante pipeta de Cassou en el lumen de la vagina, y los animales del grupo SM fueron inmunizados con 2 dosis subcutáneas y la tercera dosis se inyectó en la pared de la vagina, en la submucosa, con jeringa de tuberculina y aguja Nº 15x5 (2,5 ml de cada lado) La conformación de los grupos, número de vaquillonas y tratamientos están resumidos en la Tabla 1.

El resto del diseño experimental y el análisis estadístico del presente ensayo se realizaron con igual metodología a la ya descrita (Secciones 2.5., 2.6., 2.7. y 2.8., Capítulo II).

3. Resultados

3.1. Control clínico

Las vaquillonas utilizadas en este ensayo no manifestaron signos clínicos ni anomalías durante todo el periodo estudiado. La aplicación de la vacuna, ya sea por vía

subcutánea o vaginal, no desarrolló ningún tipo de reacción adversa local (granuloma), ni sistémica.

3.2. Duración de la infección genital

Todos los animales desafiados experimentalmente resultaron positivos al cultivo de MCV a los 14 días posteriores a la infección. En el grupo Ci la mayoría de los animales (8/9) permanecieron infectados hasta el día 42 pd, para ir liberándose de la infección progresivamente, quedando con 2 animales infectados al finalizar el ensayo (84 días pd) (Tabla 2).

Los grupos experimentales SM e IL lograron eliminar totalmente la infección a los 70 días pd, mientras que el grupo SC, mantuvo un animal infectado hasta los 70 días, el cual luego resultó negativo a la infección a los 84 días pd.

El análisis de Kaplan Meier mostró una tasa de disminución de la infección con tiempos promedio que variaron desde 68 días para el grupo Ci, 51 días para el grupo SC, 50 días para el grupo IL y de 45 días para el grupo SM (Tabla 3, Figura 1). El test generalizado de Wilcoxon mostró diferencias significativas para las tasas de eliminación de la infección de todos los grupos vacunados comparados con el grupo Ci. Los grupos SC e IL mostraron valores de $p=0,01$ y $0,02$ respectivamente. El grupo SM fue el que mostró el valor p más significativo ($p=0,004$). Sin embargo, no existieron diferencias significativas entre los grupos inmunizados (Tabla 3).

3.3. Respuesta inmunitaria humoral sistémica

Los animales del grupo CNI mantuvieron concentraciones basales de IgG a lo largo de todo el ensayo. Los animales del grupo Ci presentaron las mismas concentraciones basales hasta el momento de la infección, luego de ello se observó un aumento de los niveles de IgG. Si bien todos los animales de los grupos experimentales presentaron un aumento de los niveles de IgG luego de las inmunizaciones, los mismos fueron bajos. Sólo los grupos IL y SC alcanzaron sus DO máximas en esta instancia (DO de 0,96 y 0,60 respectivamente) (datos no mostrados). Por otro lado, los animales del grupo SM no evidenciaron niveles de IgG > 0,40 a lo largo de todo el ensayo. No se observaron diferencias significativas con respecto al grupo Ci.

3.4. Respuesta inmunitaria humoral local

Los patrones de anticuerpos a IgA del MCV de los grupos inmunizados no mostraron diferencias significativas a lo largo del ensayo. De todos modos, éstos presentaron mayores niveles de inmunoglobulinas que los animales del grupo Ci (Figura 1).

La respuesta inmunitaria local de anticuerpos IgA no se vio reflejada tras la aplicación de ninguna de las dosis de vacunas. Por el contrario, recién comenzó a observarse una respuesta local, luego de realizarse la infección experimental, a los 28 días de haberse realizado la descarga. En esta instancia el mayor nivel a IgA lo presentaron las vaquillonas del grupo SM (DO=0,88). Asimismo, los niveles de anticuerpos del isotipo IgA en el grupo SC y en el grupo IL fueron similares entre sí y levemente mayores a los del grupo Ci, pero sin presentar diferencias significativas con éste.

4. Discusión

Todos los animales de los grupos inmunizados resultaron libres de infección al finalizar el ensayo a los 84 días pd, a diferencia del grupo Ci que permaneció con el 22% (2/9) de las vaquillonas infectadas en esta instancia.

Asimismo, tanto el grupo que fue inmunizado sistémicamente (SC) como el que recibió un refuerzo intraluminal (IL) tuvieron similar promedio en la duración de la infección (51 y 50 días promedio, respectivamente). El grupo inmunizado con una tercera dosis submucosa (SM), presentó la mejor respuesta en la eliminación de la infección genital (45 días promedio). Aunque los 3 grupos inmunizados presentaron diferencias significativas con respecto al grupo Ci, no resultaron diferentes estadísticamente entre sí en lo referido a la eliminación de la infección. Esta información es similar a la hallada en trabajos previos (Corbeil y col., 1998; Cobo y col., 2002).

Por otra parte, hay que mencionar, que a los 56 días pd, todas las vaquillonas de los grupos permanecían con animales infectados. Tanto los animales del grupo IL, como los del grupo SM, presentaron una vaquillona infectada (1/12) en este periodo, mientras que las vaquillonas del grupo SC, tenían 2 animales infectados (2/12) en dicha etapa (Tabla 2).

Esta información difiere de la obtenida en el ensayo de vacunas experimentales previamente descrito en el Capítulo II (Sección 3.2.), donde el grupo SAI, al que se le aplicó la 3ª dosis por vía intraluminal, logró liberarse de la infección a los 56 días pd. El promedio de infección del grupo SAI en la primera experiencia fue de 37 días, mientras que en el presente ensayo fue de 50 días promedio.

Si bien el desarrollo de ambas experiencias fue similar en cuanto al diseño experimental y procedimientos, hay que mencionar que en el presente ensayo, todas las vacunas fueron elaboradas y mantenidas a 4°C hasta que se realizaron las inmunizaciones. Por el contrario, en el ensayo descrito en el Capítulo II, las vacunas se prepararon el día previo a cada inmunización. Esto podría explicar de cierta manera las diferencias encontradas en los tiempos de infección en vaquillonas inmunizadas con vacunas similares en uno y otro ensayo. El hecho de que las vacunas en el presente ensayo hayan permanecido un tiempo prolongado en heladera (60 días) pudo haber afectado su estabilidad. Es importante considerar este punto en investigaciones futuras y así poder elaborar una vacuna que sea lo suficientemente estable y robusta.

Por otra parte, los resultados obtenidos en la respuesta inmunitaria humoral de las vaquillonas inmunizadas no fueron los esperados. Aunque existió una respuesta sistémica a IgG en los animales inmunizados de todos los grupos, la misma fue escasa, sin presentar diferencias con respecto al grupo Ci en ningún momento del ensayo. Esta información difiere con lo hallado por otros autores (Corbeil y col., 1998, Cobo y col., 2002; Riccio y col., 2008). Tampoco se corresponden con los resultados obtenidos en el ensayo previamente desarrollado (Sección 3.3., Capítulo II).

Con estos resultados no se puede relacionar la rápida eliminación de la infección que tuvieron los grupos inmunizados con la inmunidad conferida por las vacunas. Es más, las vaquillonas del grupo SM que fueron las que antes se liberaron de la infección genital, fueron las que presentaron menores niveles de IgG entre los grupos inmunizados. Al igual que en el

caso del ensayo de adyuvantes previamente descrito, no se pudieron trazar relaciones lineales entre estos parámetros.

Por lo antes expuesto, se debe considerar la posibilidad que hayan existido problemas técnicos en la determinación de anticuerpos mediante la prueba de ELISA durante la fijación de las células a la placa y que ello haya afectado los resultados. Si bien este procedimiento se realizó con protozoos enteros vivos a una concentración final conocida (4×10^6 cel/ml), luego de la adición de los microorganismos, las placas se incubaron durante 4 horas a temperatura ambiente y luego se continuó con el proceso de fijación mediante la adición de etanol (Sección 2.7., Capítulo II). En este lapso pudo haber variado la concentración final de *T. foetus* sembrada en cada placa, fijando menos antígeno del necesario y en consecuencia, detectando niveles de anticuerpos a IgG menores a los que realmente existieron.

Aunque esta metodología de fijación de células enteras para la técnica de ELISA ha sido ampliamente utilizada por otros investigadores (BonDurant y col., 1993; Corbeil y col., 2005,) con resultados satisfactorios, otros autores (Agnew y col., 2008) detectaron en esta técnica la existencia de alteraciones o “ruido” con VE altos en los pocillos utilizados como control, sugiriendo que ello pudiera deberse a reacciones inespecíficas. En coincidencia a lo antes mencionado, en el presente trabajo, algunos sueros de animales pertenecientes al grupo Ci presentaron VE similares a los de los grupos inmunizados.

Más aún, Ikeda y col. (1995) determinaron que el antígeno inmunopurificado de *T. foetus* (TF1.17) utilizado en la técnica de ELISA eliminaba este ruido y detectaba una buena respuesta de anticuerpos específicos en vagina y útero. En el presente trabajo no se utilizó el mencionado antígeno TF1.17.

Recientemente, Palomares y col. (2017) evaluaron la respuesta inmunitaria de una vacuna comercial a *T. foetus* utilizando la técnica del ELISA indirecto tanto en placas sensibilizadas con célula entera a *T. foetus*, como con antígeno de TF 1.17, encontrando mejores resultados cuando se usaron estas últimas.

Resultaría de interés, en el futuro, lograr estandarizar el método de fijación del antígeno, logrando una concentración óptima del mismo que facilite la correcta determinación de los anticuerpos en estudio, dando así mayor confiabilidad a la técnica en cuestión.

Por último, la respuesta inmunitaria local no se vio reflejada en ninguno de los animales de los grupos experimentales luego de las inmunizaciones, aunque si existió un aumento de anticuerpos IgA considerable luego del desafío experimental, coincidiendo esta información con la obtenida por otros autores (Corbeil y col., 1998; Cobo y col., 2002). Dicho comportamiento se evidenció a partir de los 28 días pd mientras que en el ensayo anterior (Sección 3.4., Capítulo II), la misma se produjo entre los 14 días y los 28 días pd. Esta respuesta más tardía en el presente ensayo pudo haber influido también en la permanencia de animales infectados al día 56 pd.

En base a los análisis de la información brindada, se observa que, independientemente de la vía empleada para aplicar un refuerzo intravaginal, la respuesta inmunitaria local tras las inmunizaciones no se evidenció en ninguno de los casos. Aunque la respuesta inmunitaria local generada por los animales del grupo SM fue mayor a la correspondiente a la de los grupos SC y IL, la misma no resultó significativa, ni tampoco se vio reflejada en la eliminación de la

infección, ya que tanto el grupo SM como el IL se liberaron de la infección al mismo tiempo (día 70 pd).

De todos modos, hay que destacar que el tiempo promedio de infección en el grupo SM fue menor que el del grupo IL, sugiriendo una tendencia a liberarse de la infección genital antes que los animales de los otros grupos inmunizados. Sería conveniente realizar nuevos trabajos al respecto para reconsiderar el empleo de la vía vaginal como refuerzo inmunológico. Otro punto a tener en cuenta es si el adyuvante utilizado en esta oportunidad fue el adecuado o si para la aplicación por esta vía debería haberse empleado un adyuvante con propiedades diferentes.

Por todo lo expuesto, es importante, de aquí en adelante, tener en cuenta estos factores al momento de diseñar y elaborar una vacuna y un plan de vacunación, para poder lograr de este modo su óptimo desempeño a campo.

Finalmente, se concluye que los resultados obtenidos no son categóricos para confirmar o refutar la hipótesis que suponía que: “la aplicación de un refuerzo de la vacuna intravaginal en vaquillonas primovacunadas produciría un estímulo en la respuesta inmunitaria”.

Sin embargo, es importante resaltar que en esta oportunidad se evaluó el efecto de la aplicación de un refuerzo intravaginal determinando la persistencia a la infección y la respuesta inmunitaria, tanto local como sistémica. Si bien, esta es una temática que ha sido estudiada por varios investigadores, en la mayoría de los trabajos realizados, se enfatizó el estudio de la respuesta inmunitaria generada tras la aplicación de vacunas en lugar de su efecto en el acortamiento del periodo de infección en los animales experimentales (Corbeil y

col., 1998; Voyich y col., 2001; Cobo y col., 2002). Aunque la respuesta humoral desarrollada ante una inmunización es importante, se ha demostrado en ambos ensayos desarrollados en esta Tesis que no existe una correlación lineal entre la respuesta conferida por las vacunas y la persistencia de la infección. El análisis de ambos parámetros aporta información sobre el rol de los anticuerpos en el desarrollo de la inmunidad contra *T. foetus*

Tablas y Figuras del Capítulo III

Tablas

Tabla 1. Vaquillonas asignadas al azar en diferentes grupos experimentales según la vía de inmunización utilizada.

Grupo	Vaquillonas (n)	Vía de inmunización
CNI	12	Sin vacunar- Sin desafiar
Ci	9	Sin vacunar- Desafío vaginal
SC	12	2 dosis subcutáneas
IL	12	2 dosis subcutáneas - 3º dosis Vaginal Intraluminal
SM	12	2 dosis subcutáneas - 3º dosis Vaginal Submucosa

Tabla 2. Persistencia de la infección de *T. foetus* en cultivos de MCV de vaquillonas inmunizadas con 3 dosis de *T. foetus* (1×10^8) utilizando diferentes vías de administración y posteriormente desafiadas experimentalmente con una dosis de 3×10^6 células de *T. foetus*. Ci: no vacunadas, SC: sólo 2 dosis subcutáneas, IL: 2 dosis subcutáneas y 1 dosis intraluminal en vagina, SM: 2 dosis subcutáneas y 1 dosis en submucosa de vagina.

Animal N°	Grupo	Días posdesafío						
		0	14	28	42	56	70	84
001/217	Ci	-	+	+	+	+	+	+
025/194	Ci	-	+	+	+	+	+	+
041/232	Ci	-	+	+	+	+	-	-
042/208	Ci	-	+	+	+	-	-	-
112/198	Ci	-	+	+	+	+	+	-
930/222	Ci	-	+	+	+	-	+	-
933/173	Ci	-	+	+	-	-	-	-
101/235	Ci	-	+	+	+	+	-	-
102/233	Ci	-	+	+	+	-	-	-
Total infectados		0/9	9/9	9/9	8/9	5/9	4/9	2/9
% Infectividad		0	100%	100%	89%	55%	44%	22%

Días posdesafío

Animal N°	Grupo	Días posdesafío						
		0	14	28	42	56	70	84
41/226	IL	-	+	+	-	-	-	-
43/213	IL	-	+	+	-	-	-	-
44/234	IL	-	+	+	+	-	-	-
45/250	IL	-	+	+	+	-	-	-
46/216	IL	-	+	+	+	-	-	-
47/243	IL	-	+	+	-	-	-	-
48/244	IL	-	+	+	-	-	-	-
50/219	IL	-	+	+	-	-	-	-
51/201	IL	-	+	+	+	-	-	-
52/248	IL	-	+	+	+	+	-	-
53/249	IL	-	+	+	+	-	-	-
196/199	IL	-	+	+	-	-	-	-
Total infectados		0/9	12/12	12/12	6/12	1/12	0/12	0/12
% Infectividad			100%	100%	50%	8%	0	0

Días posdesafío

Animal N°	Grupo	Días posdesafío						
		0	14	28	42	56	70	84
54/221	SM	-	+	+	+	-	-	-
57/228	SM	-	+	+	-	-	-	-
58/215	SM	-	+	+	-	-	-	-
59/237	SM	-	+	+	+	+	-	-
60/218	SM	-	+	+	+	-	-	-
61/220	SM	-	+	+	+	-	-	-
62/225	SM	-	+	-	-	-	-	-
64/239	SM	-	+	-	-	-	-	-
65/230	SM	-	+	+	-	-	-	-
66/210	SM	-	+	+	-	-	-	-
174/241	SM	-	+	+	-	-	-	-
68/195	SM	-	+	+	-	-	-	-
Total infectadas			12/12	10/12	4/12	1/12	0/12	0/12
% Infectividad			100%	83%	33%	8%	0%	0%

Días posdesafío

Animal N°	Grupo	Días posdesafío						
		0	14	28	42	56	70	84
69/203	SC	-	+	+	-	-	-	-
73/209	SC	-	+	+	-	-	-	-
75/223	SC	-	+	-	-	-	-	-
77/197	SC	-	+	+	+	+	-	-
78/245	SC	-	+	+	-	-	-	-
79/207	SC	-	+	+	-	-	-	-
83/236	SC	-	+	+	+	-	-	-
84/247	SC	-	+	+	+	-	-	-
85/246	SC	-	+	+	+	-	-	-

86/238	SC	-	+	+	+	+	+	-
87/211	SC	-	+	+	+	-	-	-
88/172	SC	-	+	+	-	-	-	-
Total infectadas			12/12	11/12	6/12	2/12	1/12	0/12
% Infectividad			100%	92%	50%	17%	0%	0%

Tabla 3. Tiempo de eliminación de la infección genital de *T. foetus* en vaquillonas infectadas experimentalmente, analizado mediante Kaplan Meier. La persistencia a la infección se evaluó en vaquillonas inmunizadas con 3 dosis de *T. foetus* (1×10^8) utilizando diferentes vías de inmunización y posteriormente desafiadas experimentalmente con una dosis de 3×10^6 células de *T. foetus*. Los asteriscos destacan los valores significativos en los diferentes grupos. Ci: no vacunadas, SC: 2 dosis subcutáneas, IL: 2 dosis subcutáneas y 1 dosis intraluminal en vagina, SM: 2 dosis subcutáneas y 1 dosis en submucosa de vagina.

Liberación de la infección		
Grupo	Días promedio	Significancia (p)
Ci	68	-
SC	50	0,01*
IL	51	0,02*
SM	45	0,004**

Figuras

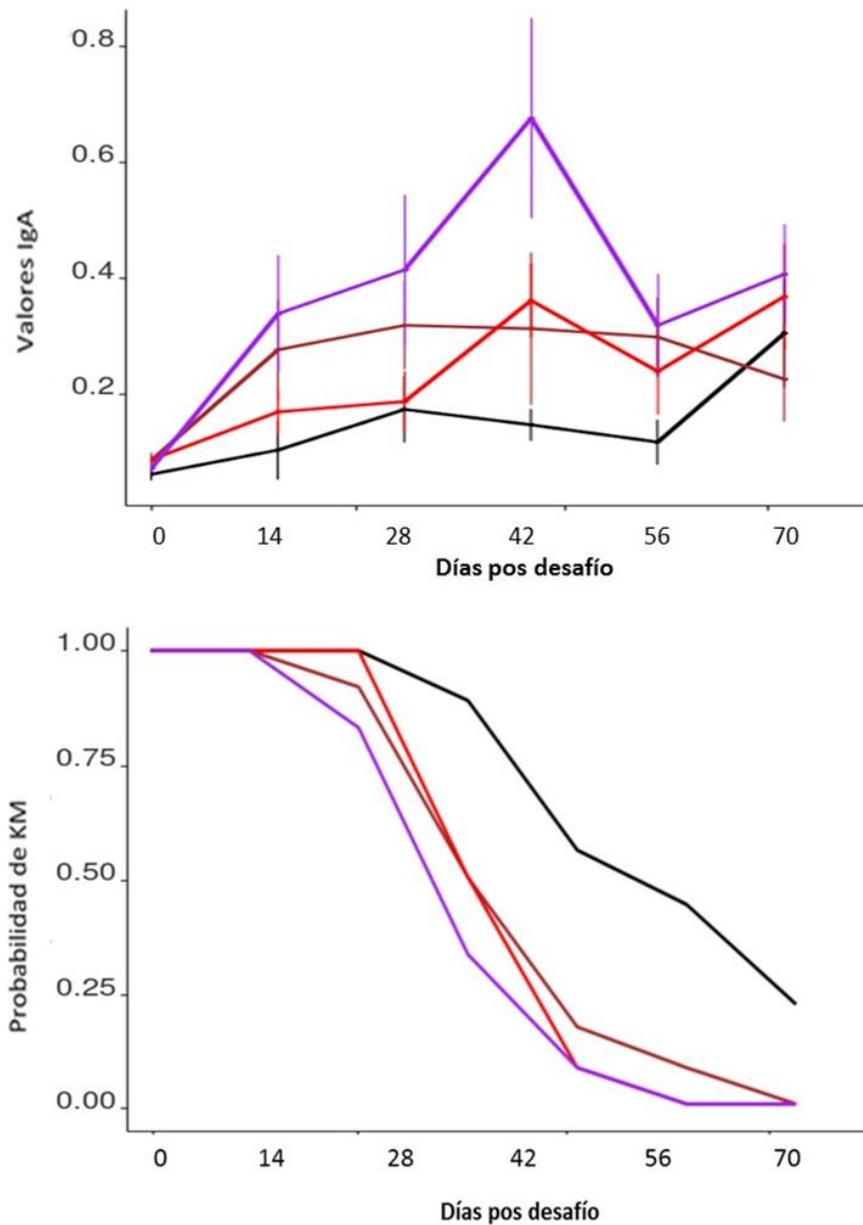


Figura 1. Respuesta inmunitaria local y tiempo de eliminación de la infección por *T. foetus* en vaquillonas inmunizadas con vacuna a célula entera de *T. foetus* utilizando diferentes vías de inmunización y posteriormente desafiadas experimentalmente con una dosis de 3×10^6 células de *T. foetus*. Los valores de IgA en MCV se muestran en paralelo con la evaluación de Kaplan Meier para la eliminación de la infección. — Ci: no vacunadas, — SC: 2 dosis subcutáneas, — IL: 2 dosis subcutáneas y 1 dosis intraluminal en vagina — SM: 2 dosis subcutáneas y 1 dosis en submucosa de vagina.

Capítulo IV

Desarrollo y evaluación de una vacuna experimental a célula entera de *Tritrichomonas suis* en vaquillonas.

Objetivo: Determinar si una vacuna elaborada con antígeno a célula entera de *Tritrichomonas suis* aplicada a vaquillonas logra inducir una respuesta inmunitaria humoral y acortar el período de infección genital luego del desafío con *T. foetus*.

1. Introducción

Tritrichomonas suis (*T. suis*) (Gruby y Delafond, 1843), es un parásito estrechamente relacionado con *T. foetus*. Se lo puede encontrar en la cavidad nasal y en el tracto digestivo (estómago, intestino delgado, colon y ciego) de porcinos. Aunque la presencia de este parásito es frecuente, el mismo no es patógeno para el porcino o sólo está asociado a casos de rinitis leve (Felleisen, 1999).

Si bien *T. foetus* y *T. suis* fueron originalmente descritas como especies diferentes que habitan en hospedadores específicos, posteriormente se desarrollaron múltiples investigaciones con el objetivo de determinar si correspondían a la misma especie o no. Se realizaron estudios detallados sobre la morfología (Switzer, 1951; Hibler y col., 1960), propiedades fisiológicas (Lindblom, 1961; Mattos y col., 1997) y características antigénicas (Robertson, 1960; De Carli y Guerrero, 1975; 1977) entre *T. suis* y *T. foetus* que revelaron una estrecha similitud entre ambos organismos. Robertson (1960), determinó que si bien la

mayoría de los antígenos proteicos estudiados fueron comunes para todas las cepas de *T. foetus* y *T. suis*, el antígeno proteico principal fue sólo compartido parcialmente. Asimismo, Xu y col. (1998), caracterizaron cepas de *T. foetus* y *T. suis* mediante el recuento y la observación morfológica de cromosomas en metafase, determinando finalmente que todas las cepas eran idénticas.

Posteriormente se realizaron análisis moleculares comparativos de rRNA genómico y análisis mediante la técnica de RAPD (Amplificación aleatoria de ADN polimórfico) de estas dos especies (Felleisen, 1997, 1998). En coincidencia con otros análisis, se observó que no existían diferencias entre ambos parásitos sugiriendo de este modo que eran distintas cepas de la misma especie, pero aisladas de distintos hospedadores y potencialmente caracterizadas por diferencias en la patogenicidad. Tachezy y col. (2002), no hallaron diferencias entre ambas especies utilizando 3 métodos diferentes de análisis de multilocus de ADN: RFLP (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción), RAPDs y una PCR basada en el análisis de repeticiones de ADN de longitud variable. Los análisis de las secuencias del fragmento variable de 502 pb de ADN y la secuencia del gen ribosomal 16S tampoco revelaron diferencias específicas entre las cepas bovinas y porcinas (Tachezy y col., 2002).

Slapeta y col. (2012), no hallaron diferencias entre ambas especies al comparar 10 genes codificantes para cisteín-proteasas involucradas en la patogénesis de la enfermedad generada por *T. foetus*. Reinmann y col. (2012) determinaron diferencias genéticas entre *T. foetus* felina y bovina y confirmaron que tanto *T. suis* como *T. mobilensis* estaban filogenéticamente muy cercanas a *T. foetus* bovina.

Asimismo, la genotipificación del multilocus y el análisis comparativo del transcriptoma revelaron que *T. foetus* aislada de gato y de bovino, eran genéticamente diferentes refiriéndolas como el "genotipo felino" y el "genotipo bovino", respectivamente (Slapeta y col., 2010). Por su parte, Doi y col. (2013) determinaron, mediante el análisis de secuencias de 8 muestras positivas a *T. suis*, que 7 de ellas correspondían al "genotipo bovino" mientras que solo una pertenecía al "genotipo felino".

Recientemente, Morin-Adeline y col. (2015), realizaron la genotipificación de multilocus de *T. foetus* aislada de porcino, determinando que esta se agrupó junto el "genotipo bovino". Para poder comparar que grado de similitud existía entre ambas especies, se realizó una librería del transcriptomas de secuencias de ARN de *T. foetus* porcina (PIG30/1). A través de este análisis comparativo, se determinó que la especie *T. foetus* porcina compartió mayor números de genes con *T. foetus* bovina que con *T. foetus* felina. De igual modo, al comparar los factores de virulencia, se determinó que la *T. foetus* porcina transcribió preferencialmente la cisteín-proteasa CP8 (como *T. foetus* bovina), más que la CP7, detectada para la *T. foetus* felina.

En contraposición a lo desarrollado, el estudio de la patogenicidad y la infección cruzada de ambas especies no han sido tan ampliamente abordados en estos últimos años como lo han sido la morfología, la ultraestructura o la diversidad genética. Se realizaron trabajos en la década del 50, en los que se logró infectar vaquillonas con *T. suis* (Fitzgerald y col., 1958; Kerr, 1958) y cerdos con *T. foetus* (Fitzgerald y col., 1958). Tras este hallazgo, el mencionado autor sugirió la posibilidad de que existiera una infección natural en el tracto genital bovino con tricomónidos porcinos cuando cerdos y vacas convivían en una misma área

o en áreas adyacentes. Sin embargo, Mueller y col., (2015) detectaron *T. foetus* en la materia fecal de porcinos que estaban en contacto con bovinos sin antecedente de tricomonosis, sugiriendo de este modo que la transmisión cruzada es poco probable entre especies. Por otra parte, Cobo y col., (2001) no lograron infectar experimentalmente a 9 vaquillonas con una cepa de *T. suis* de referencia y observaron escasa respuesta inmunitaria sistémica mediante la técnica de ELISA.

Lo hallazgos previamente mencionados manifiestan que si bien ambos parásitos presentan grandes similitudes y se hallan filogenéticamente muy cercanos, la infección cruzada sólo se ha comprobado en trabajos realizado hace varios años (Fitzgerald y col., 1958; Kerr, 1958) y no ha sido exitosa en trabajos más recientes ni se ha se podido demostrar en estudios realizados a campo (Mueller y col., 2015).

Dado que el desarrollo central de esta Tesis es la elaboración de vacunas experimentales y el análisis de sus efectos, resultó de interés estudiar la inmunidad provocada por *T. suis* en el bovino luego de la aplicación de una vacuna experimental, y de este modo, generar información útil para la interpretación de los mecanismos de infección e inmunidad de esta especie.

El objetivo de este capítulo fue “Determinar si una vacuna elaborada con antígeno a célula entera de *Tritrichomonas suis* aplicada a vaquillonas logra inducir una respuesta inmunitaria humoral y acortar el período de infección genital luego del desafío con *T. foetus*”

2. Materiales y Métodos

La elaboración de esta vacuna experimental fue realizada en simultáneo con las formulaciones de las vacunas del ensayo descrito en el Capítulo II de la presente Tesis.

Dado que la utilización de grandes animales para experimentación resulta de alto costo de mantenimiento y requiere de un gran esfuerzo humano, hubiese sido difícil desarrollar este ensayo en forma individual, por tal motivo, se contempló en el diseño experimental, la realización en conjunto de ambas experiencias. Los grupos CNI, Ci y el grupo SAI con los que se compararon los resultados de este ensayo son los mismos que los descritos en el Capítulo II.

Con la finalidad de facilitar la lectura e interpretación de los resultados obtenidos, y dado que el desarrollo de una vacuna a *T. suis* se planteó como un objetivo diferente, es que esta información se presentó en un capítulo separado.

2.1. Selección de la cepa de *T. suis*, cultivos y producción de antígeno

Para la elaboración de la vacuna de *T. suis* se cultivó una cepa de referencia (American Type Culture Collection No.30169, ATCC, Rockville, MD, USA) en CIH, siguiendo los pasos de preparación de la masa antigénica, concentración, inactivación y pruebas de esterilidad del mismo modo que se realizó para *T. foetus* (Sección 2.1., Capítulo II). La dosis antigénica para cada vacuna se estandarizó mediante el conteo con cámara de Neubauer a una concentración final de 1×10^8 células viables/ml.

Asimismo, el cultivo y producción de antígeno de *T. foetus*, se realizó como se describió previamente (Sección 2.1., Capítulo II).

2.2. Adyuvantes y vacunas

Tanto la vacuna a *T. suis* como la vacuna a *T. foetus* se formularon con la combinación de los adyuvantes Quil-A (Brenntag Lab., Dinamarca) e hidróxido de aluminio (gentilmente cedido por Laboratorio Tecnovax SA, Argentina) siguiendo igual metodología que la descripta anteriormente (Sección 2.2., 2.3., Capítulo II).

2.3. Bovinos y diseño experimental

Se emplearon 43 vaquillonas vírgenes de 15-18 meses de edad, Aberdeen Angus y sus cruza mantenidas en iguales condiciones que las previamente mencionadas (Sección 2.4., Capítulo II). El número de vaquillonas por grupo, los grupos control y el procedimiento están resumidos en la Tabla 1.

La vacunación consistió en la aplicación de 2 dosis subcutáneas (SC) en la tabla del cuello y una tercer dosis intravaginal (IV) aplicada con pipeta de Cassou en el lumen de la vagina (Riccio y col., 2008). Las inmunizaciones se realizaron con intervalos de 20 días, efectuando diariamente observaciones clínicas pos vacunación de los animales a los fines de evaluar los eventuales efectos adversos generales y locales.

La extracción de muestras, la sincronización del estro y posterior desafío intravaginal con *T. foetus* así como la determinación de anticuerpos y el análisis estadístico fueron descriptos previamente (Secciones 2.5., 2.6., 2.7. y 2.8, Capítulo II).

3. Resultados

3.1. Control clínico

Las vaquillonas utilizadas en el presente ensayo no manifestaron signos clínicos ni anomalías durante el periodo en estudio. La aplicación de las vacunas no provocó ninguna reacción adversa local ni general.

3.2. Duración de la infección genital

Todas las vaquillonas desafiadas experimentalmente con *T. foetus* resultaron positivas al cultivo de MCV en el día 14 pd. La persistencia de la infección fue variable. En el grupo Ci todos los animales permanecieron infectados hasta el día 42 pd inclusive y 2 de ellos permanecieron positivos hasta el final del ensayo (98 días pd). Los animales correspondientes al grupo Ts también permanecieron infectados en su totalidad hasta el día 42 pd pero lograron liberarse totalmente de la infección al día 70 pd. Por otra parte, cabe resaltar que en el grupo SAI (ver Capítulo II), la eliminación de la infección genital comenzó a los 28 días pd y en el día 56 pd, ningún animal presentó infección (Tabla 2).

El análisis de Kaplan Meier mostró una tasa de infección de 56 días promedio para el grupo Ts, de 37 días para el grupo SAI y de 70 días para el grupo Ci (Figura 1). El test de Wilcoxon realizado para estos 3 grupos evidenció que al menos uno de ellos resultó

estadísticamente diferente ($p= 0,000792$). De todos modos, cuando se compararon el grupo Ts con el Ci no se observaron diferencias significativas entre ellos ($p= 0,32$).

3.3. Respuesta inmunitaria humoral sistémica

Las vaquillonas del grupo CNI tuvieron concentraciones basales de IgG durante todo el ensayo. Tanto en el grupo Ts como en el grupo SAI, los animales presentaron niveles de anticuerpos ascendentes luego de la 1^o y 2^o inmunización, llegando a su valor máximo de IgG luego de ésta última. Luego los niveles de anticuerpos se mantuvieron estables a lo largo del ensayo (Figura 1).

Estadísticamente, los grupos inmunizados mostraron diferencias significativas en los valores de IgG con respecto al Ci, en los días 0 y 14 pd, mientras que para el día 28 pd sólo el grupo SAI fue diferente al grupo Ci (Tabla 3).

3.4. Respuesta inmunitaria humoral local

No se observó aumento de anticuerpos IgA en las muestras de MCV en ninguno de los grupos tras realizarse las inmunizaciones. Sin embargo, fue evidente un incremento de los niveles de IgA luego de la infección experimental con *T. foetus*. Se observaron diferencias significativas tanto en el grupo SAI como en el grupo Ts con respecto al Ci para el día 14 pd y sólo en el grupo Ts con respecto al Ci en el día 28 pd ($p < 0,05$) (Tabla 3, Figura 1).

4. Discusión

En este ensayo la preparación de las vacunas y el adyuvante utilizado fueron similares para las formulaciones de *T. suis* y *T. foetus*, al igual que el procedimiento en las inmunizaciones y el posterior desafío. Las vaquillonas del grupo Ts se liberaron antes de la infección genital que los animales del grupo Ci, en los que persistió la infección hasta finalizar el ensayo (98 días pd). Sin embargo, al comparar los tiempos promedio de infección genital, no existieron diferencias significativas entre ambos grupos (56 días para el grupo Ts y 70 días de infección para el Ci). Por otro lado, el grupo SAI evidenció diferencias significativas en la liberación de la infección en comparación con el grupo Ci. Cabe destacar que los animales del grupo SAI se liberaron totalmente de la infección al día 56 pd, mientras que las vaquillonas del grupo Ts permanecían aún con la mitad de los animales infectados en esta instancia (Tabla 2).

Si bien la cantidad de antígeno utilizado en la formulación de ambas vacunas se ubicó en el rango de los 1×10^8 cel/ml, para el caso de *T. foetus*, la concentración final de antígeno en la dosis de vacuna fue de 9×10^8 cel/ml, mientras que para *T. suis* fue de 2×10^8 cel/ml. Podría especularse que esta diferencia en la concentración antigénica quizás haya inducido una mayor respuesta inmunitaria en los animales del grupo SAI y de este modo, facilitar una pronta eliminación de la infección genital de este grupo. Otro factor que pudo haber favorecido este comportamiento en los animales del grupo SAI fue que la infección experimental se realizó con *T. foetus*. Es factible que los animales inmunizados con el antígeno de *T. foetus* (SAI), reaccionaran de un modo más específico que los inmunizados con *T. suis* (Ts) por tratarse de similar antígeno.

Sería interesante en futuros estudios, unificar la dosis de vacuna a utilizar y realizar el desafío con *T. foetus* y *T. suis* en diferentes grupos de animales, para así poder comprobar que reactividad específica genera cada una.

Si bien se ha demostrado una gran similitud entre *T. foetus* y *T. suis* (De Carli y Guerrero, 1975; 1977), también se ha observado antigenicidad diferente. Robertson (1960), encontró similitudes en las cepas aisladas de bovinos y cerdos pero también determinó una clara distinción en la constitución de sus antígenos de polisacáridos, también halló similitudes y diferencias entre cepas de *T. suis*. Otros autores, también han encontrado diferencias entre las cepas de *T. foetus* mediante el análisis de perfiles antigénicos (Huang y col., 1989; Monteavaro y col., 1999). Por lo tanto, es factible pensar en la existencia de un patrón antigénico diferente entre las cepas *T. foetus* y *T. suis* utilizadas en el presente ensayo, explicando de este modo la respuesta diferencial de los animales frente a las diferentes cepas (ver Capítulo V).

La respuesta de anticuerpos generada por la vacuna a *T. suis* fue levemente menor que en las vaquillonas inmunizadas con *T. foetus*. Sólo se observaron diferencias significativas a los 28 días pd. En este último periodo mencionado, se constató que el 26% de las vaquillonas del grupo SAI estaban libres de la infección, mientras que en el grupo Ts todas las vaquillonas permanecían aún infectadas (Tabla 2).

Es importante destacar que para la detección de anticuerpos IgG e IgA se utilizaron células enteras de *T. foetus* para el fijado a las placas en la técnica de ELISA. Este procedimiento pudo haber favorecido una reacción antígeno/anticuerpo más específica en los

animales inmunizados con el antígeno a *T. foetus* (grupo SAI) que en los vacunados con *T. suis* (grupo Ts).

Finalmente, si bien se han realizado trabajos que comprobaron la infección cruzada infectando vaquillonas con *T. suis* (Fitzgerald y col., 1958; Kerr, 1958) y cerdos con *T. foetus* (Fitzgerald y col., 1958), no se encontraron referencias de trabajos nacionales o extranjeros sobre la aplicación de una vacuna a *T. suis* en vaquillonas.

Si bien los resultados observados en este capítulo aportan información novedosa sobre el uso de una vacuna a *T. suis* y su efecto en el acortamiento del tiempo de infección se requieren trabajos adicionales para confirmar los resultados de la presente Tesis.

Tablas y Figuras del Capítulo IV

Tablas

Tabla 1. Vaquillonas asignadas al azar en diferentes grupos experimentales según tratamientos.

Grupo	Vaquillonas (n)	Antígeno/Desafío con <i>T. foetus</i>
CNI	11	Sin vacunar - Sin desafiar
Ci	11	Sin vacunar - Desafío vaginal
Ts	10	<i>T. suis</i> - Desafío vaginal
SAI	11	<i>T. foetus</i> - Desafío vaginal

Tabla 2. Tiempo de persistencia a la infección de *T. foetus* en cultivos de MCV de vaquillonas vacunadas con dos dosis SC y una dosis IV de *T. foetus* inactivada (1×10^8 células), formuladas con diferentes antígenos y posteriormente desafiadas con una dosis de 3×10^6 células de *T. foetus*. Ci: no vacunadas, SAI: vacuna con *T. foetus*, Ts: vacuna con *T. suis*.

Animal Nº	Grupo	Días posdesafío							
		0	14	28	42	56	70	84	98
9/9	Ci	-	+	+	+	-	-	-	-
14/300	Ci	-	+	+	+	+	-	-	-
27/277	Ci	-	+	+	+	-	-	-	-
30/273	Ci	-	+	+	+	+	+	-	-
31/271	Ci	-	+	+	+	+	-	-	-
170/62	Ci	-	+	+	+	+	-	-	-
176/68	Ci	-	+	+	+	+	+	+	+
314/44	Ci	-	+	+	+	+	+	-	-
315/45	Ci	-	+	+	+	+	-	-	-
326/57	Ci	-	+	+	+	+	+	+	+
114/054	Ci	-	+	+	+	-	-	-	-
Total		0/11	11/11	11/11	11/11	8/11	4/11	2/11	2/11
%Infectividad		0	100%	100%	100%	73%	36%	18%	18%

Animal N°	Grupo	Días posdesafío							
		0	14	28	42	56	70	84	98
16/289	SAI	-	+	-	-	-	-	-	-
119/119	SAI	-	+	-	-	-	-	-	-
134/403	SAI	-	+	+	-	-	-	-	-
147/147	SAI	-	+	-	-	-	-	-	-
177/69	SAI	-	+	+	+	-	-	-	-
179/71	SAI	-	+	+	-	-	-	-	-
286/286	SAI	-	+	+	+	-	-	-	-
308/38	SAI	-	+	+	+	-	-	-	-
323/53	SAI	-	+	-	-	-	-	-	-
324/55	SAI	-	+	+	-	-	-	-	-
03/83	SAI	-	+	+	-	-	-	-	-
Total		0/11	11/11	7/11	3/11	0/11	0/11	0/11	0/11
%Infectividad		0	100%	64%	27%	0	0	0	0

Animal N°	Grupo	Días posdesafío							
		0	14	28	42	56	70	84	98
05/85	Ts	-	+	+	-	-	-	-	-
08/291	Ts	-	+	+	+	+	-	-	-
20/284	Ts	-	+	+	+	+	-	-	-
24/280	Ts	-	+	+	+	-	-	-	-
29/274	Ts	-	+	+	+	+	-	-	-
304/81	Ts	-	+	+	+	-	-	-	-
307/37	Ts	-	+	+	+	-	-	-	-
317/47	Ts	-	+	+	+	+	-	-	-
318/48	Ts	-	+	+	-	-	-	-	-
321/51	Ts	-	+	+	+	+	-	-	-
Total		0/10	10/10	10/10	8/10	5/10	0/10	0/10	0/10
%Infectividad		0	100%	100%	80%	50%	0	0	0

Tabla 3. Niveles de IgG e IgA expresados en densidades ópticas (DO) en suero y en MCV de vaquillonas vacunadas con dos dosis SC y una dosis IV de *T. foetus* inactivadas (1×10^8 células) y posteriormente desafiadas experimentalmente con una dosis de 3×10^6 células de *T. foetus*. Las DO fueron evaluadas a los días 0 (día de infección), 14 y 28 días pd. Los asteriscos destacan los valores significativos en los diferentes grupos con respecto al grupo Ci. Ci: no vacunadas, Ts: *T. suis*, SAI: *T. foetus*.

Grupo	Días pos infección					
	0		14		28	
	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA
Ci	0,33(ds=0,16)	0,20(ds=0,24)	0,52(ds=0,30)	0,05(ds=0,12)	0,73(ds=0,50)	0,55(ds=0,26)
	1,11(ds=0,29)	0,45(ds=0,11)	1,19(ds=0,27)	0,43(ds=0,09)	1,03(ds=0,39)	0,79(ds=0,23)
Ts	0,0006	0,099	0,001	0,025	0,291	0,027
	***	-	**	*	-	*
SAI	1,29(ds=0,18)	0,28(ds=0,10)	1,37(ds=0,09)	0,32(ds=0,27)	1,45(ds=0,29)	0,98(ds=0,23)
	0,000088	0,97	0,0071	0,758	0,023	0,018
	****	-	**	-	*	*

Figuras

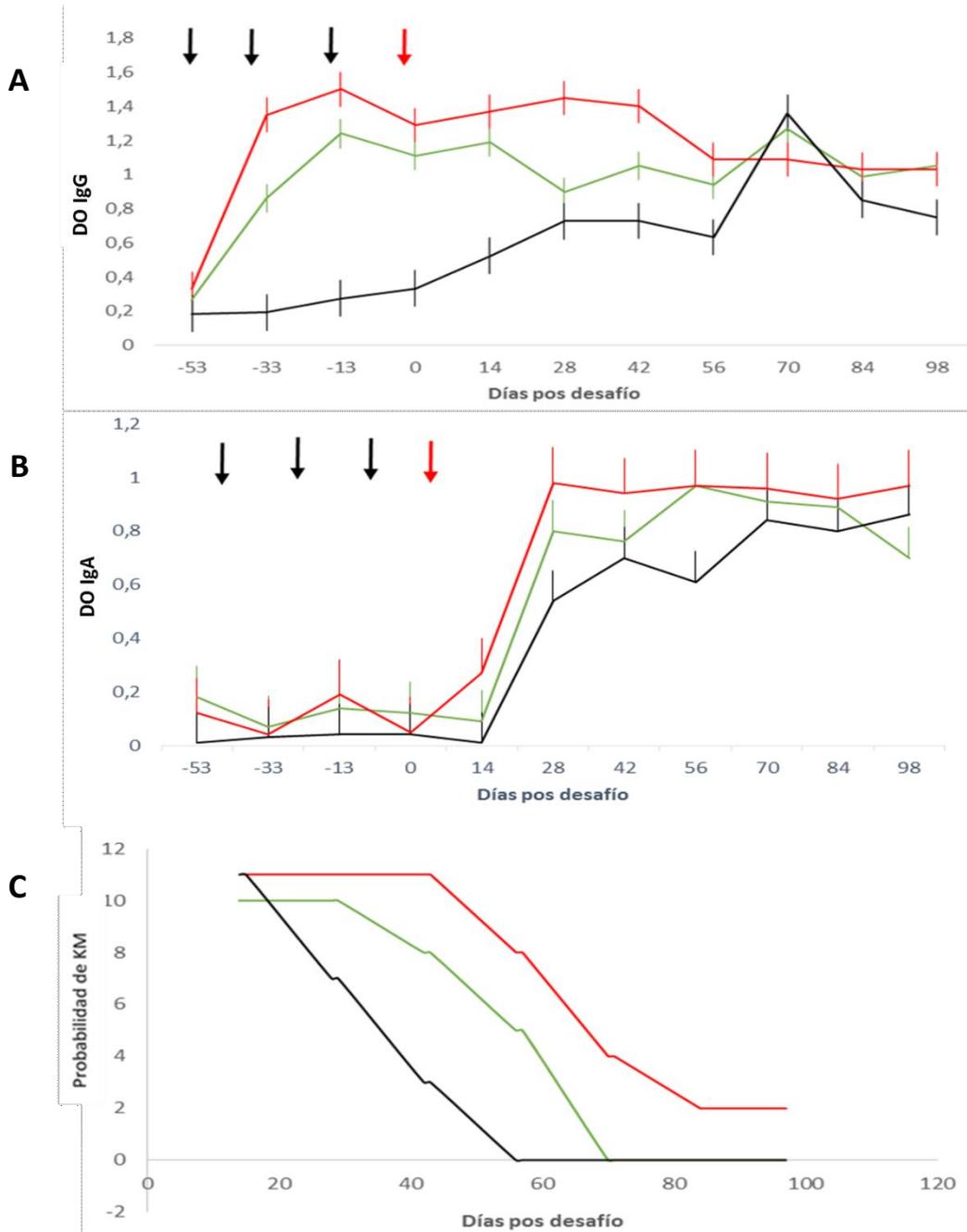


Figura 1. Respuesta inmunitaria y eliminación de la infección genital de *T. foetus* en vaquillonas inmunizadas con diferentes antígenos. Los valores de IgG en suero (A) y la IgA en MCV (B) expresados en densidades ópticas (DO) se muestran en paralelo con la evaluación de Kaplan Meier para la eliminación de la infección (C). Los tiempos de las inmunizaciones subcutáneas (SC) e intravaginales (V) están indicadas en la parte superior del gráfico con flechas negras y las flechas rojas indican el momento del desafío. — Ci: no vacunadas, — SAL: *T. foetus*, — Ts: *T. suis*.

Capítulo V

Caracterización antigénica de cepas de *T. foetus* aisladas de toros en la provincia de La Pampa

Objetivo: Realizar una caracterización antigénica de cepas de *T. foetus*, aisladas de toros naturalmente infectados, provenientes de la provincia de La Pampa.

1. Introducción

El estudio de la variabilidad antigénica en *T. foetus* ha sido abordado desde hace varios años teniendo en cuenta diferentes puntos de vista. En los años 90, se focalizó principalmente en la caracterización de antígenos específicos de la especie que resultaran promisorios para su incorporación en la formulación de vacunas (Hall y col., 1986; Corbeil y col., 1989; Hodgson 1990; Ikeda y col., 1993).

Hall y col. (1986) hallaron que los antígenos de *T. foetus* formaban parte de un gran complejo de 55 a 60 bandas proteicas con pesos moleculares que variaban desde los 25 kDa hasta los 220 kDa. De estas bandas, 38 fueron identificadas como probables antígenos en el mismo rango de peso molecular. La gran similitud de los perfiles de la proteína total entre los distintos aislamientos de *T. foetus* y la similitud en los perfiles antigénicos revelados por antisueros, demostraron una importante reacción antigénica cruzada entre los distintos aislamientos de *T. foetus* (Huang y col., 1989).

Hodgson y col. (1990), caracterizaron 4 anticuerpos monoclonales mediante la inmunización de ratones infectados con *T. foetus*. De éstos anticuerpos, 2 no reaccionaron con la superficie del parásito (TF 3.8 y TF 3.2) y los 2 restantes resultaron reactivos (TF 1.17 y TF 1.15). Se determinó que estos últimos mediaban la fijación del complemento y prevenían la adherencia de los microorganismos a las células epiteliales vaginales bovinas, por lo que podían ser capaces de inducir una respuesta inmunitaria protectora.

Posteriormente, Ikeda y col. (1993), investigaron el grado de conservación del antígeno TF 1.17 en 36 aislamientos de *T. foetus* de Argentina, Costa Rica y Estados Unidos, usando anticuerpos monoclonales a TF 1.15 y TF 1.17. De estas 36 cepas, 32 resultaron positivas con el anticuerpo TF 1.17 y la totalidad de las cepas reaccionaron con el anticuerpo a TF 1.15, revelando así que este antígeno se mantenía conservado.

Gault y col. (1999), localizaron y caracterizaron proteínas de superficie específicas de *T. foetus* tras enfrentarlas con un suero policlonal de conejo anti-*T. foetus*. Posteriormente, se realizó la técnica de Inmunotransferencia (Western Blot) entre estas proteínas y los mocos vaginales de animales vacunados e infectados con *T. foetus*, determinando que estas proteínas eran estructuras conservadas que estimulaban una respuesta inmunitaria local, por lo cual los autores propusieron la producción de estas proteínas en forma recombinante y su incorporación a una vacuna.

En Argentina, Monteavaro y col. (1999) analizaron 14 aislamientos de *T. foetus* mediante la técnica de SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico). Estos autores determinaron un perfil de 34 bandas predominantes, distribuidas entre los 29 y 150 kDa y un conjunto de 5 a 11 proteínas que se identificaban con claridad, dentro

del rango de los 45 a 97 kDa. Mediante la técnica de Western Blot, y utilizando suero de conejo anti-*T. foetus*, se identificaron 26 bandas con predominio de un antígeno de 50 kDa en todas las cepas analizadas.

Dado que en el país es escaso el conocimiento referido a la variabilidad antigénica de *T. foetus*, y que, esta información podría aportar al momento de elegir un antígeno para la formulación de vacunas, es que se propuso realizar una caracterización antigénica de cepas de *T. foetus*, aisladas de toros naturalmente infectados provenientes de la provincia de La Pampa.

2. Materiales y Métodos

2.1. Procedencia de las muestras

Se analizaron un total de doce aislamientos de *T. foetus* provenientes de muestras prepucciales obtenidas de toros pertenecientes a diferentes departamentos de la provincia de La Pampa (Tabla 1). Estos muestreos se realizaron en el marco del PCEV (Programa de Control y Erradicación de Enfermedades Venéreas).

También se incluyeron en el análisis, la cepa de referencia B1 (Argentina), utilizada en los ensayos previamente descritos, la cepa B1 recuperada de una vaquillona infectada experimentalmente (B1a) y una cepa de referencia de *T. suis* (American Type Culture Collection No.30169, ATCC, Rockville, MD, USA), utilizada en la vacuna experimental desarrollada en el Capítulo IV de esta Tesis. Asimismo se incorporó al análisis un clon de la cepa N° 12 (Tabla 1), que se obtuvo mediante la siembra de un inóculo de 5×10^3 *T. foetus*/ml

en medio sólido de CIH con una concentración del 1% de agar y fue incubado en anaerobiosis durante 3 días a 37°C.

2.2. Cultivo de muestras

Las cepas se cultivaron en CIH (Campero, 1986) suplementado con el 10% de suero equino estéril y los antibióticos previamente mencionados (Sección 2.1., Capítulo II). Para el crecimiento de las cepas, se siguió igual metodología a la descrita previamente (Sección 2.1., Capítulo II) hasta obtener un inóculo de 2×10^7 cel/ml. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 14.000 rpm, a 4°C durante 5 min (ultracentrífuga Thermo Electron Corporation, Micro CL 21R, Alemania). Luego, se descartó el sobrenadante y se realizaron dos nuevos lavados con PBS (Anexo 1), centrifugando a 14.000 rpm durante 10 min.

2.3. Western Blot

Para la obtención de las proteínas totales se resuspendió cada uno de los pellet de las cepas de *T. foetus* de interés (Tabla 1) en 2 ml de TBS pH 7,6 (Anexo 1). Luego se sometieron a tres ciclos de congelado y descongelado seguido por siete ciclos de sonicado de 15 seg cada uno a 4°C, a una amplitud de 80% (Sonics Vibra Cell, Newtown, USA). Finalmente, las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm durante 20 min a 4°C para remover sustancias insolubles. Posteriormente se recuperó el sobrenadante, al cual se le agregaron 100 ul de TBS y 20 ul de Buffer de muestra 5X (Anexo 1) y se calentaron durante 5 min a 100°C para desnaturalizar las proteínas (BIO-RAD Laboratories Inc. General Protocol of Western Blotting). La corrida electroforética se realizó en geles de poliacrilamida al 12% con dodecilsulfato sódico (SDS-

PAGE) en condiciones reductoras (Anexo 1). Se sembraron 20 μ l de cada muestra por calle y se realizó la electroforesis durante 1 h a un amperaje constante (90 mA).

Posteriormente, los geles fueron transferidos a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF), previamente activadas con etanol e hidratadas en buffer de transferencia (20% de metanol- v/v, 25mM de Tris Base, 192mM de glicina, pH 8,3), a temperatura ambiente en un aparato de Inmunoblotting (Mini Protean II, Bio-Rad, USA) a voltaje constante (40 V) durante toda la noche. Luego, la membrana de PVDF se transfirió a una solución de bloqueo (SB) compuesta de un buffer Tris salino (TBS pH 7,5), 0,05% Tween 20 (TBS-T) (Anexo 1) y 4% de leche descremada y se incubó con agitación durante 1h a temperatura ambiente (Towbin y col., 1979).

Como anticuerpos primarios se utilizaron: un “pool” de sueros (P1) de todas las vaquillonas (muestreos del 1º al 4º) inmunizadas con la vacuna SAI (Sección 2.1., 2.2., Capítulo II); un “pool” de sueros (P2) de los animales inmunizados con la vacuna Ts (Sección 2.2., Capítulo IV); y un tercer pool de sueros (P3) proveniente de las vaquillonas sin inmunizar (CNI) (Sección 2.4., Capítulo II).

Las cepas de *T. foetus* fueron enfrentadas con estos sueros diluidos 1:1000 en TBS-T a e incubadas con agitación durante 1 h a temperatura ambiente.

Posteriormente, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T y una vez con TBS, e incubadas con agitación durante 1 h con el anticuerpo secundario anti-IgG bovino marcado con peroxidasa (A5295, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) previamente diluido 1/10000 con solución de bloqueo. Finalmente las membranas fueron lavadas tres veces en TBS-T, una vez con TBS y reveladas con el sustrato BCIP/NBT (B6404, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA). Las imágenes fueron fotografiadas y archivadas hasta su análisis (Wilson y col., 1978).

3. Resultados

El patrón de bandas proteicas que se observó tanto en las cepas enfrentadas con el pool de sueros P1 como en las enfrentadas con el pool P2 se ubicó en un rango de entre 65 kDa y 350 kDa, destacándose entre 7 y 11 bandas no distribuidas de modo uniforme en todas las cepas (Figura 1).

Se observó un patrón similar de bandas proteicas en todas las cepas, con predominio de proteínas con pesos moleculares mayores a los 250 kDa, más prominente en algunas cepas que en otras (Figura 1).

De todos modos se pueden apreciar algunas diferencias mínimas. Cuando se utilizó el pool de sueros P1, se observó un mayor número de bandas con pesos moleculares de entre 150 kDa y 250 kDa en las cepas 2, 3, 5 y 7, que no fueron detectables en las demás cepas. Las proteínas más prominentes se observaron entre los 100 kDa y 250 kDa, aunque no fue posible distinguir el número de bandas existentes. En la cepa denominada 3, se encontró una banda de 60 kDa que no se observó en las otras cepas.

Cuando las proteínas de las diferentes cepas se enfrentaron con el pool de sueros P2, se identificó un mayor número de proteínas sólo en la cepa 3. La proteína de 200 kDa reconocida por P1 en algunas cepas sólo fue reconocida por P2 en las cepas 3 y 12 (Figura 1). Entre las otras cepas se observó el mismo patrón de bandas proteicas, similar al patrón obtenido tras enfrentarlas con P1.

Cuando las cepas se enfrentaron con el pool P3, correspondientes a animales control sin inmunizar ni desafiar, se visualizaron algunas bandas inespecíficas en el rango de los 150 y 250 kDa (Figura 1).

Por otra parte, para la cepa de *T. suis*, se observó un patrón similar de bandas tras enfrentarlos con los pools P1 y P2 aunque las bandas correspondientes a proteínas de 100 y 200 kDa fueron más nítidas cuando se las enfrentó con P2. Estas bandas reconocidas en *T. suis* también se observaron en las cepas de *T. foetus* analizadas. No se observaron diferencias entre la cepa 12 y su clon, ni tampoco entre la cepa de referencia B1 y la cepa recuperada de vaquillona tras el desafío realizado con la misma (B1a).

4. Discusión

El análisis realizado en los aislamientos de *T. foetus* de toros de la provincia de La Pampa demostró la existencia de patrones de bandas similares para todas las cepas en estudio, con mayor número de bandas de pesos moleculares elevados (entre 100 y 250 kDa). Por el contrario, no se visualizaron bandas de bajo peso molecular al enfrentar las mencionadas cepas con los 2 sueros hiperinmunes utilizados (P1 y P2).

Estos resultados difieren de los observados por otros autores. Hall y col. (1986) encontraron en una cepa de *T. foetus* un perfil proteico con mayor número de bandas (entre 55 y 60) ubicadas entre los 25 kDa y los 220 kDa, tras enfrentar las cepas con un suero hiperinmunitario obtenido de bovino. Huang y col. (1989) obtuvieron similares resultados en 6 aislamientos de *T. foetus* expuestos a sueros de conejo y de vaquillona como anticuerpos primarios.

Asimismo, Monteavaro y col. (1999) visualizaron 34 bandas proteicas distribuidas en un rango molecular de 29 a 150 kDa, mientras que por Western Blot se identificaron alrededor de 26 bandas distribuidas entre estos mismos pesos moleculares. Si bien en este último

trabajo el anticuerpo primario anti-*Trichomonas* se obtuvo en conejo, ha quedado demostrado en otros estudios (Alderete, 1983; Hall y col., 1986; Gault y col., 1999) que tanto el suero de conejo como el de bovino, generan una respuesta inmunitaria a proteínas de similar peso molecular, por lo que esta información es también comparable a la obtenida en el presente Capítulo.

En el presente trabajo, las proteínas identificadas resultaron de mayor peso molecular al hallado en otros trabajos. Por otra parte, cabe destacar, que todas las cepas analizadas en esta oportunidad reflejaron patrones de proteínas similares entre sí, en coincidencia con trabajos previamente citados (Huang y col., 1989; Monteavaro y col. 1999).

Tanto la cepa 12 y su clon, como la cepa de referencia B1 y la misma cepa recuperada de una vaquillona (B1a) no presentaron diferencias en sus perfiles antigénicos. Por lo que se demuestra que en ambos casos, las cepas no se modificaron tras los procedimientos realizados. Estos resultados coinciden por los hallados por Alderete (1983) quien no encontró diferencias en la composición de proteínas de cepas de *T. vaginalis* mantenidas en cultivo por un tiempo prolongado, ni en colonias clonadas de la misma.

La estrecha similitud que existe entre *T. foetus* y *T. suis* ya sea en su morfología, características antigénicas (Robertson, 1960; De Carli y Guerrero, 1975; 1977) y genéticas (Felleisen, 1998; Tachezy y col., 2002; Slapeta y col., 2012) ha sido corroborada mediante la realización de numerosas investigaciones (ver Capítulo IV).

Trabajos realizados por Robertson (1960) y De Carli y Guerrero (1975, 1977) determinaron reacciones cruzadas entre ambas especies demostrando varios antígenos

compartidos por ambas especies, así como también antígenos diferenciales en cada una de ellas (ver Capítulo IV).

Con los resultados obtenidos en el presente Capítulo no se puede confirmar la existencia de diferente antigenicidad entre *T. foetus* y *T. suis*, por el contrario, estos hallazgos refuerzan el concepto de que ambas especies presentan antígenos similares y reflejan similar respuesta antigénica en coincidencia a lo descrito previamente en otros trabajos (Tachezy y col., 2002; Lun y col., 2005)

Finalmente, se podría aseverar que al momento de formular una vacuna efectiva dirigida a *T. foetus*, si bien la selección de un antígeno adecuado es importante, no sería necesario evaluar en esta instancia la respuesta antigénica generada por las mismas. Al ser similares y responder de modo semejante frente a sueros hiperinmunitarios de vaquillonas inmunizadas con diferentes cepas, se podría sugerir que cualquier cepa a *T. foetus* aislada y cultivada en el modo correcto, podría ser capaz de generar la inmunogenicidad necesaria para controlar la invasión del parásito. De todos modos, sería necesario hacer un relevamiento con un mayor número de cepas de diversas procedencias para poder corroborar estos hallazgos.

Tablas y Figuras del Capítulo V

Tablas

Tabla 1. Identificación y procedencia de cepas de *T. foetus* aisladas de toros de la provincia de La Pampa.

Cepas	Protocolo	Localidad	Departamento
1	76635	Carro Quemado	Loventué
2	76549	Lihuel Calel	Lihuel Calel
3	76533	Algarrobo del Aguila	Chicalcó
4	51626	Abramo	Hucal
5	72336	Santa Rosa	Capital
6	72386	Puelén	Puelén
7	55677	General Acha	Utracán
8	74722	Limay Mahuida	Limay Mahuida
9	52682	Puelches	Curacó
10	55627	Guatraché	Guatraché
11	51717	Maisonave	Realicó
12	52694	Limay Mahuida	Limay Mahuida

Figuras

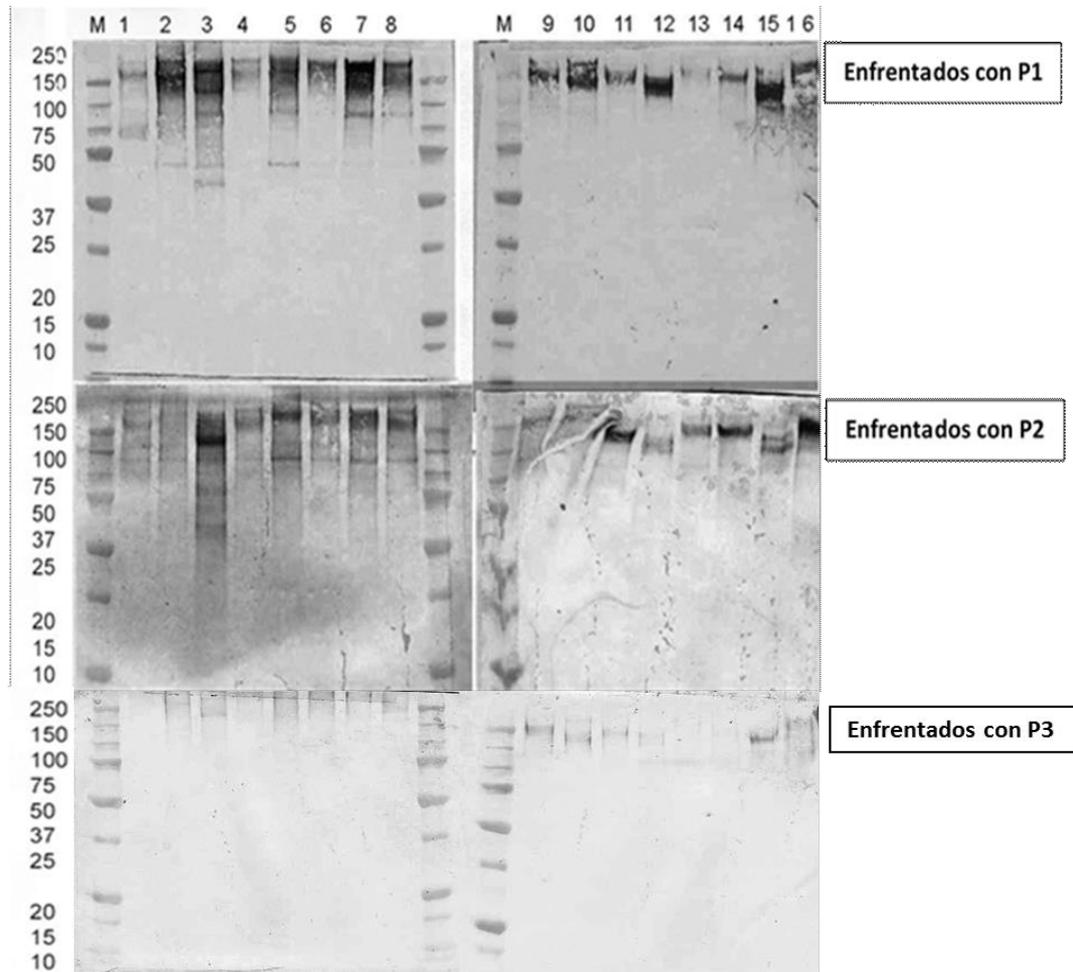


Figura 1. Western Blot realizado en cepas de *T. foetus* y *T. suis* enfrentadas con un pool de sueros hiperinmunes a *T. foetus* (P1) y un pool de sueros hiperinmunes a *T. suis* (P2) respectivamente. M: marcador de peso molecular, Calle 1: cepa 76635, calle 2: 76549, calle 3: 76533, calle 4: 52694 (clon), calle 5: cepa 51626, calle 6: *T. suis*, calle 7: 72336, calle 8: 72386, calle 9: cepa 55677, calle 10: 74722, calle 11: cepa 52682, calle 12: B1a, calle 13: cepa 55627, calle 14: cepa 51717, calle 15: B1, calle 16: 52694.

Capítulo VI

Caracterización molecular de cepas de *T. foetus* aisladas de toros en la provincia de La Pampa

Objetivo: Realizar una caracterización molecular de cepas de *T. foetus* aisladas de toros naturalmente infectados provenientes de la provincia de La Pampa.

1. Introducción

El desarrollo de nuevas técnicas moleculares permitió establecer similitudes y diferencias a nivel de especie entre aislamientos de *T. foetus* y otras especies de tricomónidos provenientes de otros hospedadores (Riley y col., 1991; Felleisen 1997; 1998; Tachezy y col., 2002). Estos avances aportaron a la clasificación taxonómica de la especie y permitieron entender parcialmente la relación filogenética que existe entre ellas (Slapeta y col., 2010; Reinmann y col., 2012).

Riley y col. (1991), utilizaron la técnica de repeticiones de longitud variable (VLR) como marcadores genéticos para caracterizar a *T. vaginalis*. Posteriormente, se determinaron diferencias genéticas o polimorfismos en aislamientos de *T. foetus* provenientes de bovinos utilizando similares marcadores moleculares (Riley y col., 1995). También se realizaron trabajos que utilizaron las técnicas de análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y la de ampliación aleatoria de ADN polimórfico (RAPDs) para determinar

diferencias entre *T. foetus* y otras especies relacionadas, hallando diferencias consistentes al comparar especies (Riley y col., 1991; Felleisen 1997; 1998; Tachezy y col., 2002).

Taquezy y col. (2002) caracterizaron cepas de *T. foetus* provenientes de bovinos y cepas de *T. suis* y de *T. mobilensis*. Las mismas fueron indistinguibles unas de otras en cuanto a tamaños de amplicones, sin embargo, tras la secuenciación de un amplicón de 502 pb se revelaron secuencias idénticas entre *T. foetus* y *T. suis* pero levemente diferentes (5 nucleótidos) en *T. mobilensis*. Por su parte, Slapeta y col. (2010), compararon aislamientos de *T. foetus* obtenidas de felinos y de bovinos. Tras la secuenciación de las regiones de 320 pb, observaron 11 diferencias consistentes entre aislamientos bovinos y felinos. Sin embargo, el uso de estas técnicas resultó limitado al momento de estudiar la variabilidad genética existente en poblaciones de la misma especie. Es por ello que fue necesario desarrollar nuevos marcadores genéticos que resultaran más específicos para realizar estas determinaciones.

La secuenciación del genoma entero de *T. vaginalis* (<http://trichdb.org/trichdb>) (Carlton y col., 2007) facilitó el desarrollo de estos nuevos marcadores genéticos capaces de determinar diferencias entre especies y entre poblaciones de la misma especie. Un ejemplo de ello, es el desarrollo de microsatélites que actualmente se utilizan para determinar diferencias genéticas a nivel de especie.

Los microsatélites son repeticiones cortas de nucleótidos (2-6 pb) que se encuentran en todos los eucariotas (Field y Wills, 1996). Estas secuencias muestran polimorfismos de variada longitud debido a los cambios que existen en sus unidades repetidas de ADN y son frecuentemente multialélicos para cada locus. Se expresan de modo codominante y están ampliamente distribuidos en el genoma de eucariotas. Es por ello que estos marcadores

aportan mucha información en estudios genéticos. Los microsatélites se han utilizado para estudios extensivos de genotipificación de alta resolución de especies de Apicomplejos como *Toxoplasma gondii* (Ajzenberg y col., 2002); *Cryptosporidium parvum* y *Cryptosporidium hominis* (Mallon y col., 2003); *Plasmodium falciparum* (Anderson y col., 2000) y *Neospora caninum* (Regidor-Cerrillo, 2006). Por su parte, Conrad y col. (2011) y Malik y col. (2011) identificaron secuencias candidatas para genotipificar *T. vaginalis* en base a microsatélites. Ambos autores encontraron polimorfismos en diferentes aislamientos de esta especie destacando de este modo la compleja naturaleza del parásito.

Considerando la escasa información regional referida a la variabilidad genética de *T. foetus* y que dicho conocimiento podría aportar información adicional al momento de la utilización de un antígeno ideal para la formulación de vacunas, resultó de interés realizar la caracterización molecular de cepas de *T. foetus* aisladas de toros naturalmente infectados de la provincia de La Pampa.

2. Materiales y Métodos

Este Capítulo fue desarrollado por la Doctorando en el Departamento de Sanidad Animal (SALUVET) de la Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid, España, bajo la supervisión de la Dra Susana Pedraza-Díaz y la Dra Esther Collantes-Fernandez y su equipo de trabajo y bajo la dirección general del Dr Luis Ortega Mora.

2.1. Procedencia de las muestras

Se analizaron mediante microsatélites los mismos aislamientos de *T. foetus* que previamente fueron analizados antigénicamente (Sección 2.1, Tabla 1, Capítulo V). La Tabla se reproduce en este capítulo para facilitar su lectura (Tabla 1). En esta oportunidad también se estudiaron: el clon de la cepa N° 12 (Tabla 1), la cepa de referencia B1 (Argentina) utilizada en los ensayos previamente descritos y la misma cepa recuperada de una vaquillona infectada experimentalmente con ésta (B1a). Por último se incluyó al estudio una cepa de *T. foetus* proveniente de un toro naturalmente infectado de España.

El cultivo de las cepas y la obtención del pellet final se ha descrito previamente (Sección 2.2, Capítulo V).

2.2. Amplificación y secuenciación de los primers *GADPH2*, *MS5* y *MS10*

La extracción de ADN de las muestras se realizó mediante el empleo de un kit comercial (DNA Easy Tissue Kit Qiagen, Hilden, Alemania).

A los fines de confirmar la identidad de los aislamientos, se realizó la técnica de PCR empleando los primers específicos para el gen ARN 5.8S ribosomales (rRNA) de *T. foetus* (Felleisen, 1997). La reacción de amplificación se realizó en un termociclador (Ivema T-18, Bs As, Argentina) y los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% y detectado mediante Gel Red Nucleic Acid (Biotium, Inc., USA).

Posteriormente, se seleccionaron 5.004 secuencias depositadas en el GenBank que fueron analizadas como posibles candidatas para la amplificación de microsatélites usando el software TROLL (Tandem Repeat Occurrence Locator) y el programa de TRF (Tandem Repeats

Finder). Inicialmente se seleccionaron 6 marcadores genéticos (TFMS3, TFMS5, TFMS6, TFMS7 and TFMS10 y el gen *gap2*) para comparar aislamientos bovinos, felinos y cepas de referencia de *T. foetus*, *T. mobilensis*, *T. suis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Pentatrichomonas hominis*. Finalmente para el presente análisis se utilizó el gen *gap2*, que codifica para la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) de *T. foetus* de 809 pb (TF-GAPDH21F: GTCGCTGTTACGATCTTTG, TF-GAPDH21R: ATTGGCTCGTCAGTGTAGCC, el microsatélite MS5 con 297 pb (TFMS5F: TTGGAGGTTGAATTGGTTCCG, TFMS5R: ATTGTGGATCGGGGTATGG) y el MS10 de 425 pb (TFM10F: AACGACAAAGGGATCTTCATC, TFMS10R: CTGTTGACGCTTTCTTACGC). El diseño de los primers fue realizado por la Dra. Susana Pedraza-Díaz (Grupo SALUVET, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid, España).

Para las reacciones se utilizaron: 5 ul de ADN, solución buffer 10 x, 50 mM de MgCl₂, 2,5 mM de dNTPs, 2 ul de cada primers 10 uM y 5U/ul de la enzima ADN EcoTaq Polimerasa (volumen final de 50 ul por reacción). Para llevar a cabo la reacción de GADPH2 se utilizó un termociclador (Primus, Erlangen, Alemania) con un programa que consistió en 5 min de desnaturalización inicial a 94°C, 35 ciclos de: 30 seg a 94°C, 45 seg 52°C, 30 seg a 72°C y 5 min de extensión final a 72°C. Para el caso de los microsatélites MS5 y MS10 la reacción se realizó en termociclador (Eppendorf, Hamburg, Alemania) con un programa de 5 min de desnaturalización inicial a 94°C y 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 54°C, 1 min a 72°C, y 10 min a 72°C con una pausa a 4°C con una extensión final a 72°C. Estos protocolos fueron realizados por la Dra. Susana Pedraza-Díaz (Grupo SALUVET, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid, España). La electroforesis se realizó con 5 µl del producto de PCR en gel de agarosa con bromuro de etidio al 1% en 0,5 x de TBE (Anexo 1).

Los productos resultantes de la PCR se purificaron con un kit comercial (GeneClean, Turbo Kit, Qbiogene, Inc., Carlsbad, CA, USA). Se midió la cantidad de ADN en nanofotómetro (Implen, Múnich, Alemania) y se realizaron las diluciones correspondientes para obtener 120 ng o 240 ng en 6 μ l para la secuenciación de productos de PCR de tamaño <500 pb y 500-1000 pb respectivamente, en el Centro de Secuenciación de la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid, España. Para el envío de muestras para la secuenciación, se añadió 1 μ l de los primers TFR1 o TFR2 en una concentración 5 μ M a los productos previamente purificados.

Las secuencias fueron analizadas con el programa BioEdit y los alineamientos resultantes se analizaron a través del Programa informático ClustalW.

3. Resultados

Inicialmente se evaluaron quince pares de primers estimando que podrían amplificar correctamente secuencias polimórficas para *T. foetus*. De estos se seleccionaron finalmente los microsatélites MS5, MS10 y GADPH2 por presentar mayor cantidad de polimorfismos (Pedraza-Díaz y col., 2015).

Todas las cepas analizadas demostraron una banda única de tamaño semejante al esperado (Figura 1). Se analizaron un total de 15 cepas, todas amplificaron para los marcadores GADPH2, MS5 y MS10 (Figura 1). La secuenciación de bandas amplificadas para cada cepa utilizando los marcadores moleculares previamente mencionados, demostró la existencia de dos alternativas para cada marcador y un total de tres genotipos en las cepas de

T. foetus obtenidas de toros de la provincia de La Pampa. En el fragmento amplificado del gen GADPH2, se halló en la posición 100, la presencia de adenina (A) o citosina (C) en 10 y 5 de los aislamientos respectivamente (Tabla 1, Figura 1). Para el marcador MS5 se observaron también dos formas diferentes en las mismas cepas que las mencionadas previamente: con la presencia de timina (T) o C en la posición 70 (Tabla 1, Figura 1). Para el microsatélite MS10 se observaron 4 aislamientos con la inserción de un fragmento de 59 pb en posición 121 del fragmento amplificado (BL) y los 11 aislamientos restantes sin esta inserción (B) (Figura 1).

El genotipo ATB resultante de la combinación de tres secuencias polimórficas analizadas fue hallado en 10 de las 15 cepas estudiadas, convirtiéndose en el tipo mayoritario. En segundo lugar, el genotipo CCBL fue determinado en 3 de los aislamientos y finalmente un genotipo CCB se observó en un único aislamiento (Figura 2). Ninguna de las cepas estudiadas procedentes de la provincia de La Pampa ni la cepa de referencia aislada de la provincia de Buenos Aires (B1) mostró un patrón idéntico a la cepa perteneciente a España cuyo genotipo fue ACB, que resultó mayoritario (resultados no publicados).

Un análisis de distribución de estos genotipos en las cepas aisladas de toros de la provincia de la Pampa se observa en la Figura 2. El genotipo mayoritario, ATB, se registró en los aislamientos provenientes de toros de departamentos que en su mayoría no limitan con otras provincias (Figura 2). El patrón genético CCBL, encontrado en la cepa B1 de referencia (originaria de la provincia de Buenos Aires) fue idéntico al hallado en 2 aislamientos provenientes de toros de los departamentos de Lihuel Calel y Puelén, ambos limítrofes con la provincia de Río Negro (Figura 2). Finalmente el genotipo CCB se determinó para una sola cepa aislada de un toro del departamento Realicó, que limita con la provincia de Córdoba (Figura 2).

4. Discusión

El análisis realizado mediante los marcadores GADPH2, MS5 y MS10 determinó la existencia de 3 patrones genéticos bien diferenciados para los distintos aislamientos: el ATB en 10 de las cepas, el CCBL en 3 y el CCB en una de las cepas.

Tanto la cepa 52694 como su clon (cepa 12, Tabla 2) presentaron el mismo patrón genético. Asimismo, la cepa de referencia (B1) y su pasaje por vaquillona (B1a), también presentaron un patrón genético idéntico. Este hallazgo demuestra la estabilidad genética de las cepas tras los sucesivos pasajes en cultivo en el laboratorio luego de las infecciones experimentales. La variabilidad hallada en las cepas analizadas obedeció netamente a diferencias genéticas propias de cada aislamiento, y no a la manipulación en el laboratorio.

Es interesante destacar que ninguna de las cepas presentó el mismo genotipo de la cepa de referencia de España (ACB). Sumado a ello, se observaron diferentes patrones genéticos en los aislamientos de la provincia. Los genotipos menos frecuentes fueron el CCBL hallado en los aislamientos de los toros de los departamentos de Puelén y Lihuel Calel y el CCB, ubicado en Realicó, todos departamentos que se encuentran al límite con otras provincias. Además la cepa de referencia (B1) proveniente de Buenos Aires, también presentó el patrón genético CCBL. Con esta información se podría especular sobre la existencia de una correlación entre los diferentes patrones genéticos para *T. foetus* y la distribución geográfica de los toros de quienes se aislaron.

Sin embargo, hay que mencionar que no se analizaron cepas de *T. foetus* procedentes de los departamentos del este de La Pampa (Figura 2), lo cuales también limitan con rodeos

vecinos de otras provincias. Ello podría haber aportado más información en genotipos presentes en zonas geográficamente diferentes. Sumado a esto, el número de muestras procesadas fue limitado, ya que se analizó sólo un aislamiento proveniente de un rodeo por departamento. Por cuestiones presupuestarias y por el alto costo que implicaba la secuenciación de los mencionados microsatélites, es que sólo se pudieron procesar este número de aislamientos.

Los resultados del presente trabajo evidenciaron la existencia de variabilidad genética entre aislamientos de cepas de *T. foetus* provenientes de toros naturalmente infectados de Argentina utilizando los mencionados marcadores moleculares.

Previamente, Riley y col. (1995) determinaron la existencia de variaciones genéticas o polimorfismos entre aislamientos de *T. foetus* provenientes de toros utilizando múltiples técnicas moleculares (T17 PCR, análisis mediante RAPD, TCO-1CR) pero no incluyeron en su estudio el uso de microsatélites.

Si bien la Dra Pedraza Díaz junto a su equipo de trabajo (SALUVET, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid, España), determinaron diferencias entre cepas de *T. foetus*, *T. suis*, *T. gallinarum* y *T. mobilensis* y también entre cepas de *T. foetus* provenientes de felinos y bovinos utilizando los mismos microsatélites que en el presente estudio (Pedraza-Díaz y col., 2015), hasta el desarrollo de esta experiencia, no se habían analizado cepas de *T. foetus* en la búsqueda de diferencias a nivel intra-especie en aislamientos provenientes de bovinos.

Sería conveniente realizar futuros estudios que contemplen un mayor número de aislamientos de diferentes regiones geográficas de nuestro país para confirmar así la presencia de los genotipos descritos en esta tesis.

La utilización de estos marcadores moleculares permitiría determinar en el futuro las relaciones filogenéticas entre los diferentes aislamientos de *T. foetus* y profundizar los respectivos estudios epidemiológicos de la especie.

Tablas y Figuras del Capítulo VI

Tablas

Tabla 1. Origen de los aislamientos de *T. foetus* e identificación del genotipo para los marcadores moleculares GAPDH2, MS5 y MS10. Las alternativas genéticas para cada marcador se muestran como: A (adenina), C (citosina), T (timina), con la inserción de un fragmento de 59 pb en posición 121 del fragmento amplificado (BL) y sin esta inserción (B).

Cepas	Protocolo	Localidad	Departamento	GAPDH2	MS5	MS10
1	76635	Carro Quemado	Loventué	A	T	B
2	76549	Lihuel Calel	Lihuel Calel	C	C	BL
3	76533	Algarrobo del Aguila	Chicalcó	A	T	B
4	51626	Abramo	Hucal	A	T	B
5	72336	Santa Rosa	Capital	A	T	B
6	72386	Puelén	Puelén	C	C	BL
7	55677	General Acha	Utracán	A	T	B
8	74722	Limay Mahuida	Limay Mahuida	A	T	B
9	52682	Puelches	Curacó	A	T	B
10	55627	Guatraché	Guatraché	A	T	B
11	51717	Maisonave	Realicó	C	C	B
12	52694	Limay Mahuida	Limay Mahuida	A	T	B

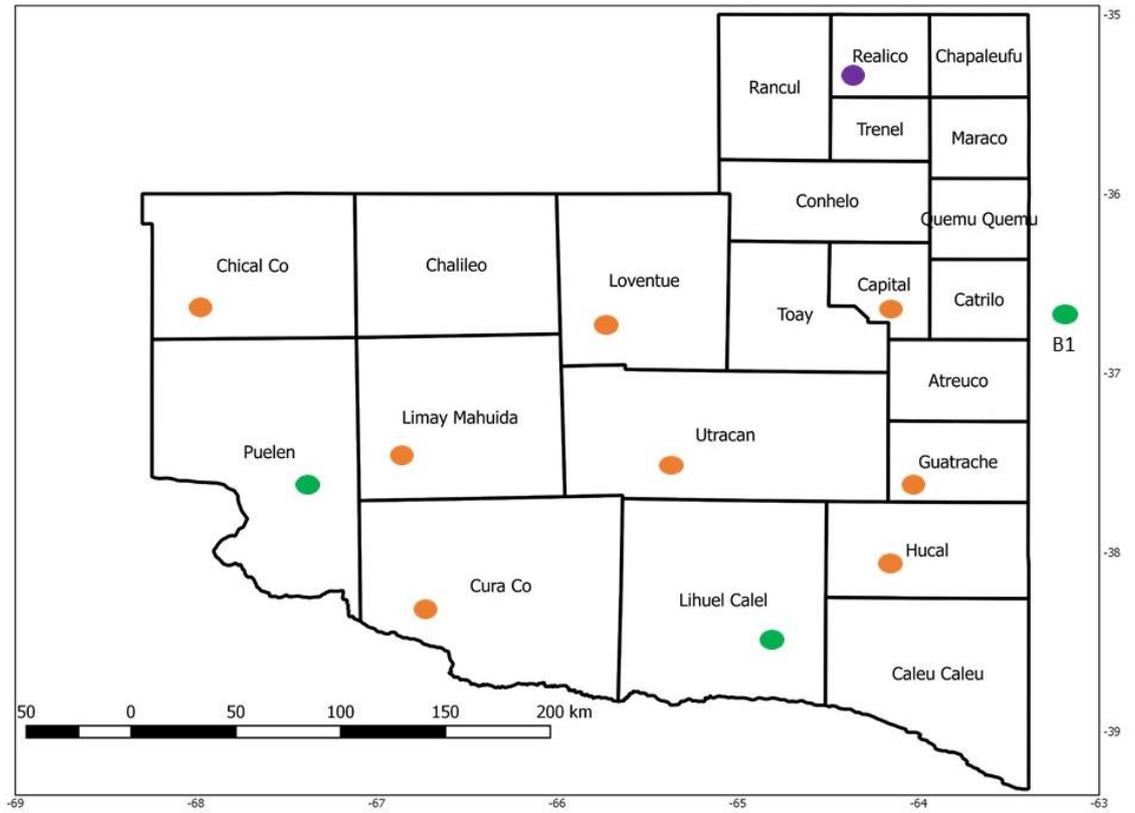


Figura 2. Distribución geográfica de los distintos genotipos para los marcadores moleculares GADPH2, MS5 y MS10: ATB ●, CCB ●, CCBL ●, hallados en cepas de *T. foetus* obtenidas de toros con infecciones naturales ubicados en rodeos de la provincia de La Pampa.

Conclusiones

- La aplicación de una vacuna experimental a base de célula entera de *T. foetus* disminuyó el tiempo de infección en vaquillonas desafiadas con la cepa homóloga por vía vaginal, evidenciándose diferentes periodos de eliminación de la infección genital según el adyuvante utilizado.
- El modelo experimental de vaquillonas utilizado en la presente tesis con la inducción del estro al momento del desafío, dosis y vía experimental de infección, así como la secuencia de las dosis subcutáneas, resulta adecuado para la evaluación de vacunas contra organismos que producen enfermedades de transmisión sexual (ETS) en el bovino.
- La vacuna experimental combinada con el adyuvante hidróxido de aluminio y el Quil-A fue la que mejor desempeño tuvo para la eliminación de la infección genital, con un tiempo promedio de infección de 37 días y con una adecuada respuesta inmunitaria mediada por IgG.
- La aplicación de una tercera dosis de vacuna por vía intravaginal, ya sea por vía intraluminal o submucosa, no generó un mayor estímulo de la respuesta inmunitaria ni influyó en el tiempo de eliminación de la infección. Sin embargo hay que destacar que el comportamiento en la vacuna formulada con hidróxido de aluminio y Quil-A fue

diferente en los 2 experimentos desarrollados mostrando diferentes tiempos en la liberación de la infección (37 vs 50 días) por lo que esta comparación es relativa y es posible que las condiciones en las que se conservó la vacuna en una y otra experiencia haya influido en estos resultados.

- No se pudo trazar una relación directa entre los niveles de anticuerpos IgG e IgA con la capacidad de un animal de liberarse de la infección genital, en ninguno de los ensayos desarrollados.

- La aplicación de una vacuna experimental a *T. suis* en vaquillonas acortó el periodo de infección de las mismas tras ser desafiadas con *T. foetus* y generó una respuesta inmunitaria humoral tras su aplicación. De todos modos, ambos parámetros mostraron valores menores a los obtenidos cuando se utilizó la vacuna que contenía *T. foetus* como antígeno.

- El análisis antigénico de cepas de *T. foetus* aisladas de toros en la provincia de La Pampa, demostró la existencia de patrones de proteínas similares para todas las cepas en estudio, con predominio de proteínas de pesos moleculares elevados (entre 100 y 250 KDa) tras enfrentarlas con los sueros hiperinmunitarios obtenidos de vaquillonas inmunizadas con *T. foetus* o *T. suis*, respectivamente.

- En base al análisis realizado se concluyó que las cepas de *T. foetus* y *T. suis* son idénticas por presentar similar patrón de componentes proteicos, reforzando de este modo el concepto de que se trata de la misma especie.
- Se determinó la existencia de 3 patrones genéticos bien diferenciados en las cepas de *T. foetus* de la provincia de La Pampa: ATB, CCBL y CCB, mediante el empleo de marcadores moleculares (GAPDH2, MS5 y MS10) siendo mayoritario el genotipo ATB.
- El escaso número de aislamientos analizados no permite confirmar la existencia de variabilidad genética en diferentes áreas geográficas de la provincia de La Pampa.

Referencias bibliográficas

Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, Mccourt RM, Mendoza L, Moestrup O, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor MF. 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol* 52: 399-451.

Agnew D, Corbeil LB, Munson L, Byrne BA, BonDurant RH. 2008. A pregnant mouse model for bovine *Tritrichomonas foetus* infection. *Vet Pathol* 45: 849-864.

Ajzenberg D, Bañuls A, Tibayrenc M y Dardé M. 2002. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *Intern J Parasitol* 32(1): 27-38.

Alderete JF. 1983. Antigen analysis of several pathogenic strains of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 39: 1041-1047.

Al-Shakshir RH, Regnier Fe, White JL, Hem SL. 1995. Contribution of electrostatic and hydrophobic interactions to the adoption of proteins by aluminium-containing adjuvants. *Vaccine*: 13: 41-44.

Anderson M, BonDurant R, Corbeil R, Corbeil, LB. 1996. Immune and inflammatory responses to reproductive tract infection with *Tritrichomonas foetus* in immunized and control heifers. J Parasitol 82: 594-600.

Anderson T, Haubold B, Williams J, Richardson L, Mollinedo, R, Bockarie, Velez I. 2000. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Mol Biol Evol 17(10): 1467-1482.

Baltzell P, Newton H, O'Connor AM. 2013. A critical review and meta-analysis of the efficacy of whole-cell killed *Tritrichomonas foetus* vaccines in beef cattle. J Vet Intern Med 27(4): 760-770.

Barnett P, Pullen L, Doel W. 1996. International bank for foot-and-mouth disease vaccine: assessment of Montanide ISA 25 and ISA 206, two commercially available oil adjuvants. Vaccine 14: 1187-1189.

Benchimol M, Kachar B, de Souza W.1993. The structural organization of the pathogenic protozoan *Tritrichomonas foetus* as seen in replicas of quick frozen, freeze-fractured and deep etched cells. Biol Cell. 77: 289-295.

Benchimol M, Johnson PJ, de Souza W. 1996. Morphogenesis of the hydrogenosome: an ultrastructural study. *Biol Cell* 87: 197-205.

Benchimol M. 2004. Trichomonads under microscopy. *Microsc. Microanal.* 10(5): 528-550.

Benchimol M, Dias A, Fontes R. 2006. Interaction of *Tritrichomonas foetus* and the bovine oviduct in an organ culture model. *Vet Parasitol.* 10,140(3-4): 244-250.

Benchimol M, da Silva Fontes R, Burla Dias A. 2007. *Tritrichomonas foetus* damages bovine oocytes in vitro. *Vet Res.* 38(3): 399-408.

Bielanski A, Ghazi D, Phipps-Toodd B. 2004. Observations on the fertilization and development of preimplantation bovine embryos in vitro in the presence of *Tritrichomonas foetus* *Theriogen* 61:821-829.

Blagowchensky, N. 1938. Durée de séjour de l'antigène dans l'organisme et immunité. *Rev Immunol Parasitol* 4: 161.

BonDurant R, Anderson ML, Blanchard P, Hird D, Dayane-Elmi C, Palmer C, Sischo W, Suther D, UTtterback W, Weigler BJ. 1990. Prevalence of trichomoniasis among California beef herds. *J Am Vet Med Assoc* 196: 1590-1593.

BonDurant R, Corbeil R, Corbeil LB. 1993. Immunization of virgin cows with surface antigen TF1.17 of *Tritrichomonas foetus*. *Infect Immun.* 61: 1385-1394.

BonDurant R y Honinberg B. 1994. Trichomonads of veterinary importance. In: Kreier JP, editor. *Parasitic Protozoa*, volume 9, 2^o edition. San Diego, CA. Academic Press: 136-162.

BonDurant R. 1997. Pathogenesis, diagnosis, and management of trichomoniasis in cattle. *Vet Clin of N America: Food animal Practice* 13: 345-361.

Borchardt K, Norman B, Thomas M, Harmon W. 1992. Evaluation of a new culture method for diagnosing *Tritrichomonas foetus* infection. *Vet Medicine* 87: 104-112.

Brunner R, Jensen-Jarolim E, Pali-Schöll I. 2010. The ABC of clinical and experimental adjuvants-A brief overview. *Immunol Lett* 128(1): 29-35.

Burgess D, Knoblock K, Daugherty T, Robertson P. 1990. Cytotoxic and hemolytic effect of *Tritrichomonas foetus* on mammalian cells. *Infect Immun* 58(11): 3627-3632.

Butt, BM; Besser, TE; Senger, PL; Widders, PR. 1993. Specific antibody to *Haemophilus somnus* in the bovine uterus following intramuscular immunization. *Infect Immun* 61: 2558-2562.

Campero CM, Palladino MR, Villar JA. 1983. Actualización sobre Trichomoniasis Bovina. *Rev Arg Prod Anim* 3: 387-432.

Campero CM. 1985. Medios de transporte para *Tritrichomonas foetus*. *Rev Med Vet* 66: 200-209.

Campero CM, Catena MC, Medina D. 1986. Caldo infusión hígado para el cultivo de *Tritrichomonas foetus*. *Vet Arg* 3: 80-81.

Campero, CM. 1988. Inflammation of the accessory sex glands and immunopathological studies of the genitalia of the bull. PhD Thesis. Graduate School of Tropical Veterinary Science, James Cook University of North Queensland.

Campero CM, Hirst RG, Ladds PW, Vaughan JA; Emer DL, Watson DL. 1990. Measurement of antibody in serum and genital fluids of bulls by ELISA after vaccination and challenge with *Tritrichomonas foetus*. Aust Vet J 67: 175-178.

Campero CM, Patitucci A, Medina D. 1993. Tricomoniasis bovina: infección experimental y natural en hembras. Vet Arg 10: 662-670.

Campero CM, Medina D, Rossetti O, Marcovecchio F, Cosentino B, Marccone J, Carracino M. 1998. Vacunación subcutánea e intravaginal contra tricomoniasis en vaquillonas. Rev Med Vet 79: 347-353.

Campero CM, Rossetti O, Medina D, Bretschneider G, Roppel M. 1999. Inmunización en vaquillonas mediante vacuna de membrana de *Tritrichomonas foetus*. Vet Arg 154: 250-262.

Campero CM. 2000. Las enfermedades reproductivas de los bovinos: ayer y hoy. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria, Anales. 53: 88-112.

Campero CM. 2000a. Inmunidad local e inmunopatología de las enfermedades venéreas en el tracto genital bovino. Libro de la Segunda Reunión Argentina de Patología Veterinaria, 27-29

de septiembre del 2000, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina.

Campero CM, Rodriguez Dubra C, Bolondi A, Cacciato C, Cobo E, Perez S, Odeón A, Cipolla A, BonDurant RH. 2003. Two-step (culture and PCR) diagnostic approach for differentiation of non-*T. foetus* trichomonads from genitalia of virgin beef bulls in Argentina. *Vet Parasitol* 112: 167-175.

Campero CM. 2005. Consideraciones sobre la Tricomoniasis y Campylobacteriosis bovina. *Rev Col Vet Prov Bs As* 32: 47-51.

Campero CM y Martínez A. 2010. Jornadas de actualización en Enfermedades de los bovinos. Azul. Bs. As. p: 9.

Carlton J, Hirt R, Silva J, Delcher A, Schatz M, Zhao Q, Wortman J, Bidwell S, Alsmark U, Besteiro S, Sicheritz-Ponten T, Noel C, Dacks J, Foster P, Simillion C, Van de Peer Y, Miranda-Saavedra D, Barton G, Westrop G, Müller S, Dessi D, Fiori PL, Ren Q, Paulsen I, Zhang H, Bastida-Corcuera FD, Simoes-Barbosa A, Brown M, Hayes R, Mukherjee M, Okumura CY, Schneider R, Smith A, Vanacova S, Villalvazo M, Haas BJ, Perteua M, Feldblyum T, Utterback T, Shu C, Osoegawa K, de Jong PJ, Hrdy I, Horvathova L, Zubacova Z, Dolezal P, Malik S, Logsdon JM Jr, Henze K, Gupta A, Wang CC, Dunne RL, Upcroft JA, Upcroft P, White O, Salzberg S, Tang P, Chiu CH, Lee Y,

Embley T, Coombs G, Mottram J, Tachezy J, Fraser-Liggett C, Johnson PJ. 2007. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* 315(5809): 207-212.

Castro C, Menna-Barreto RF, Fernandes N de S, Saboia-Vahia L, Dias-Lopes G, Britto C Cuervo P, De Jesus JB. 2016. Iron-modulated pseudocyst formation in *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol* 143(8): 1034-1042.

Cavalier-Smith T. 1993. Kingdom Protozoa and its 18 phyla. *Microbiol Rev* 57: 953-994.

Clark BL. 1971. Venereal disease of cattle. Published by the University of Sidney, the post Graduate foundation in Veterinary Science. *Vet. Review*. Nº11: 5-25

Clark BL, Dufty J, Parsonson I. 1977. Studies on the transmission of *Tritrichomonas foetus*. *Aust Vet J* 53: 170-172.

Clark BL, Dufty JH, Parsonson IM. 1983. The effect of *Tritrichomonas foetus* infection on calving rates in beef cattle. *Aust Vet J* 60: 71-74.

Clark BL, Emery DL, Dufty JH. 1984. Therapeutic immunisation of bulls with the membranes and glycoproteins of *Tritrichomonas foetus* var. brisbane. Aust Vet J 61: 65-66.

Cobo ER, Cano D, Campero CM. 2001. Experimental infection with *Tritrichomonas suis* in heifers. Vet Parasitol 99: 73-78.

Cobo ER, Cano D, Rossetti O, Campero CM. 2002. Heifers immunized with whole-cell and membrane vaccines against *Tritrichomonas foetus* and naturally challenged with an infected bull. Vet Parasitol 109: 169-184.

Cobo E, Campero CM, Mariante R, Benchimol M. 2003. Ultrastructural study of a tetratrachomonad species isolated from preputial smegma of virgin bulls. Vet Parasitol 117: 195-211.

Cobo, ER; Morsella, C; Cano, D; Cipolla, A; Campero, CM. 2004. Immunization in heifers with dual vaccines containing *Tritrichomonas foetus* and *Campylobacter fetus* antigens using systemic and mucosal routes. Theriogenol 62: 1367-1382.

Cobo E, Corbeil LB, Gershwin L, BonDurant RH. 2009. Preputial cellular antibody responses bulls vaccinated and/or challenged with *Trichomonas foetus*. Vaccine 28(2): 361-370.

Connaris S y Greenwell P. 1997. Glycosidases in mucin-dwelling protozoans. *Glycoconj J* 14: 879-882.

Conrad M, Zubacova Z, Dunn L, Upcroft J, Sullivan S, Tachezy J, Carlton J. 2011. Microsatellite polymorphism in the sexually transmitted human pathogen *Trichomonas vaginalis* indicates a genetically diverse parasite. *Mol Biochem Parasitol* 175(1): 30-38.

Corah LR. 1989. Body condition: an indicator of the nutritional status. *Agri Practice* 10: 25.

Corbeil L, Hodgson J, Jones D, Corbeil R, Widders P, Stephens L. 1989. Adherence of *Tritrichomonas foetus* to bovine vaginal epithelial cells. *Infec Imm* 57(7): 2158-2165.

Corbeil LB, Anderson M, Corbeil R, Eddow J, BonDurant, R. 1998. Female reproductive tract immunity in bovine trichomoniasis. *Am J Reprod Immunol* 39: 189-198.

Corbeil LB y BonDurant R. 2001. Immunity to bovine reproductive infections. *Vet Clin of N Am Food Anim Prac* 17: 567-583.

Corbeil LB, Campero CM, Rhyan J, BonDurant R. 2003. Vaccines against sexually transmitted diseases. *Reprod Biol Endocrin* 1(1): 118.

Corbeil LB, Campero CM, Rhyan J, Anderson M, Gershwin L, Agnew D, Munson L, Bondurant RH. 2005. Uterine mast cells and immunoglobulin-E antibody responses during clearance of *Tritrichomonas foetus*. *Vet Pathol* 42(3): 282-90.

de Andrade R, de Souza W, Benchimol M. 2015. Changes in the structural organization of the cytoskeleton of *Tritrichomonas foetus* during trophozoite-pseudocyst transformation. *Micron* 73: 28-35.

De Carli GA y Guerrero J. 1975. Comparação antigênica entre *Trichomonas suis* e *Tritrichomonas foetus*. Imunofluorescência indireta (IFI). *Rev Microbiol (S. Paulo)* 6: 55-58.

De Carli GA, Guerrero J. 1977. Antigenic comparison between *Tritrichomonas suis* and *Tritrichomonas foetus* III. Immuno-electrophoresis (IEF). *Rev Microbiol* 8: 107-109.

Diamond L. 1957. The establishment of various *Trichomonas* of animals and man in axenic cultures. *J Parasitol* 43: 488-490.

Dias Filho B, Benchimol M, Andrade A, Angluster J, De Souza W. 1999. Purification and immunocytochemical localization of neuraminidase from *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol* 118: 17-25.

Doi J, Abe N, Oku Y. 2013. Molecular survey of *Tritrichomonas suis* (= *T. foetus*) 'cat' and 'cattle' genotypes in pigs in Japan. *J Vet Med Sci* 75(4): 475-479.

Edmondson MA, Joiner K, Spencer J, Riddell K, Rodning S, Gard J, Givens M. 2017. Impact of a killed *Tritrichomonas foetus* vaccine on clearance of the organism and subsequent fertility of heifers following experimental inoculation. *Theriogenol* 90: 245-251.

Elder JK. 1964. Examination of twelve strains of *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller) isolated in Queensland and the description of a new serotype, *T. foetus* var. *Brisbane*. *Qd J Agric Sci* 21: 193-203.

Embley M, der Giezen M, Horner DS, Dyal PL, Foster P. 2003. Mitochondria and hydrogenosomes are two forms of the same fundamental organelle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358(1429): 191-203.

Felleisen RS. 1997. Comparative sequence analysis of 5.8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. *Parasitol* 115 (Pt 2): 111-119.

Felleisen RS. 1998. Comparative genetic analysis of tritrichomonadid protozoa by the random amplified polymorphic DNA technique. *Parasitol Res* 84: 153-156.

Felleisen RS. 1999. Host-parasite interaction in bovine infection with *Tritrichomonas foetus*. *Microbes Infect* 1: 807-816.

Field D y Wills C. 1996. Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. *Proceedings of the Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 263(1367):209-215.

Fitzgerald P, Johnson A, Thorne J, Hammond D. 1958. Experimental infections of the bovine genital system with trichomonads from the digestive tracts of swine. *Am J Vet Res* 19: 775-779.

Fort M, Rojas M, Perez L, Esaín F. 2004. El Control de la Trichomoniasis genital bovina en siete departamentos de la provincia de La Pampa durante el periodo 2000-2003. *Publicación Técnica INTA Nº 58*. Pag: 9-12.

Fort M, Dubié D, Sago A, Goyeneche P, Benini A, Fernández E, Collantes-Fernández E, Moreno Gonzalo J, Ortega-Mora L. 2016. Evaluación de un programa para el control de la tricomonosis bovina en la provincia de La Pampa, Argentina. XXI Congreso internacional de Medicina Bovina. (ANEMBE). Santiago de Compostela. España.

Freund J. 1956. The mode of action of immunological adjuvants. *Adv Tuberc Res* 7:130-148.

Ganne V, Eloit M, Laval A, Adam M, Trouve G. 1994. Enhancement of the efficacy of a replication-defective adenovirus-vectored vaccine by the addition of oil adjuvants. *Vaccine* 12 (13): 1190-1196.

Gault R, Kvasnicka W, Hanks D, Hanks M, Hall M. 1995. Specific antibodies in serum and vaginal mucus of heifers inoculated with a vaccine containing *Tritrichomonas foetus*. *Am J Vet Res* 56: 454-459.

Gault R, Hall M, Kvasnicka W, Hanks D. 1999. Characterization of antigenic proteins from *Tritrichomonas foetus* recognized by antibodies in rabbit serum, bovine serum and bovine cervicovaginal mucus. *J Parasitol* 85 (2): 244-251.

Gonzalez R, Higa L, Cutrullis A, Bilen M, Morelli I, Roncaglia D, Corral R, Morilla M, Petray P, Romero, E. 2009. Archaesomes made up *Halorubrum tebenquichense* total polar lipids: a new source of adjuvancy. *BMC Biotechnology* 9:71.

Gookin JL, Breitschwerdt EB, Levy MG, Gager RB, Benrud JG. 1999. Diarrhea associated with trichomonosis in cats. *J Am Vet Med Assoc* 215: 1450-1454.

Gookin JL, Birkenheuer AJ, St John V, Spector M, Levy MG. 2005. Molecular characterization of trichomonads from feces of dogs with diarrhea. *J Parasitol* 91 (4): 939-943.

Grellet A, Bickel T, Polack B, Boogaerts C, Casseleux G, Biourge V, Grandjean D. 2010. Prevalence of *Tritrichomonas foetus* in puppies from French breeding kennels. *J Vet Intern Med* 24: 1572.

Gruby D y Delafond HM. 1843. Recherches sur les animalcules se développant en grand nombre dans l'estomac et dans les intestins, pendant la digestion des animaux herbivores et carnivores, Extrait D'une note, *Comptes Rendus de l'Académie Scienc Paris* 17: 1304-1308.

Hall M, Huang J, Ota R, Redelman D, Hanks D, Taylor R. 1986. Characterization of *Trichomonas foetus* antigens, using bovine antiserum. *Am J Vet Res* 47: 2549-2553.

Hamilton J, Byrne R, Whitty G. 2000. Particulate adjuvants can induce macrophage survival, DNA synthesis, and a synergistic proliferative response to GM-CSF and CSF-1. *J Leukoc Biol* 67: 226-232.

Hellemond J, van der Klei A, van Weelden S, Tielens A. 2003. Biochemical and evolutionary aspects of anaerobically functioning mitochondria. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358(1429): 205-213.

Herr S, Ribeiro LM, Classen E, Myburgh JG. 1991. A reduction in the duration of infection with *Tritrichomonas foetus* following vaccination in heifers and the failure to demonstrate a curative effect in infected bulls. *Onderstepoort J Vet Res* 58: 41-45.

Hibler C, Hammond D, Caskey F, Johnson AE, Fitzgerald P. 1960. The morphology and incidence of the trichomonads of swine, *Tritrichomonas suis* (Gruby y Delafond), *Tritrichomonas rotunda* n, sp. and *Trichomonas buttreyi* n, sp. *J. Protozool* 7: 159-171.

Hodgson J, Jones D, Widders P, Corbeil LB. 1990. Characterization of *Tritrichomonas foetus* antigens by use of monoclonal antibodies. *Infect Immun* 58: 3078-3083.

Honigberg B, Mattern C, Daniel W. 1971. Fine structure of the mastigont system in *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller). *J Protozool* 18: 183-198.

Honinberg B. 1978. Trichomonads of veterinary importance. *Paras Prot* 2: 163-273.

Huang J, Hanks D, Kvasnicka W. 1989. Antigenic relationships among fields plates of *Trichomonas foetus* from cattle. *Am J Vet Res* 50: 1064-1068.

Hudson D, Ball L, Cheney J, Mortimer R, Bowen B, Marsh D, Peetz R. 1993. Testing of trichomoniasis vaccine in heifers mated to infected bulls. *Theriogenol* 39: 937-943.

Ikeda J, BonDurant RH, Campero CM, Corbeil LB. 1993. Conservation of a protective surface antigen of *Tritrichomonas foetus*. *J Clin Microbiol* 31: 3289-3295.

Ikeda J, BonDurant RH, Corbeil LB. 1995. Bovine vaginal antibody responses to immunoaffinity-purified surface antigen of *Tritrichomonas foetus*. *J Clin Microbiol* 33: 1158-1163.

Kania S, Reed S, Thomford J, BonDurant R, Hirata K, Corbeil R, North M, Corbeil L. 2001. Degradation of bovine complement C3 by trichomonad extracellular proteinase. *Immun Immunopath* 78: 83-96.

Kates M. 1992. Archaeobacterial lipids: structure, biosynthesis and function. in the *Archaeobact: Biochem Biotech* Vol 58. Edited by: Danson M, Hough D, Lunt G, London. Portland Press and Chapel Hill: 51-77.

Kerr WR. 1958. Experiments in cattle with *Trichomonas suis*. Vet Rec 70: 613-615.

Kersten G y Hirschberg H. 2004. Antigen delivery systems. Expert Rev 3(4): 453-462.

Kessel JF. 1928. Trichomoniasis in kittens. Trans R Soc Trop Med Hyg 22: 61–80.

Kittel D, Campero CM, Van Hoosear K, Rhyan J, BonDurant RH. 1998. Comparison of diagnostic methods for detection of active infection with *Tritrichomonas foetus* in beef heifers. J Am Vet Med Assoc 213: 519-522.

Kleina P, Bettim-Bandinelli J, Bonatto S, Benchimol M, Bogo M. 2004. Molecular phylogeny of *Trichomonadidae* family inferred from ITS-1, 5.8 S rRNA and ITS-2 sequences. Inter J Parasitol 34(8): 963-970.

Kvasnicka W, Taylor R, Huang J, Hanks D, Tronstad R, Bosomworht A, Hall M. 1989. Investigations of the incidence of bovine trichomoniasis in Nevada and of the efficacy of immunizing cattle with vaccines containing *Tritrichomona foetus*. Theriogenol 31: 963-971.

Kvasnicka W, Hanks D, Huang J, Hall M, Sandblom D, Chu H, Chavez L, Acree W. 1992. Clinical evaluation of the efficacy of inoculating cattle with a vaccine containing *Tritrichomonas foetus*. Am J Vet Res 53: 2023-2027.

Langellotti C, Pappalardo JS, Mognini C, Quattrocchi V, Cebrian I, Taboga O, Zamorano P. 2007. Modulation of the immune response induced by a genetic vaccine against Bovine Herpes Virus (BoHV-1) using different adjuvants. Winter Symposium, Innate Immunity and Novel Vaccines. Organizer: University Biochemistry and Molecular Biology Foundation. Florida. USA.

Levy M, Gookin J, Poore M, Birkenheuer A, Dykstra M, Litaker RW. 2003. *Tritrichomonas foetus* and not *Pentatrichomonas hominis* is the etiologic agent of feline trichomonal diarrhea. J Parasitol 89: 99-104.

Lightowlers MW, Heath DD. 2004. Immunity and vaccine control of *Echinococcus granulosus* infection in animal intermediate hosts. Parasitologia 46(1-2): 27-31.

Lindblom GP. 1961. Carbohydrate metabolism of trichomonads: growth, respiration, and enzyme activity in four species. J Protozool 8: 139-150.

Lun Z y Gajadhar A. 1999. A simple and rapid method for staining *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas vaginalis*. J Vet Diagn Invest 11(5): 471-474.

Lun Z, Parker S, Gajadhar AA. 2000. Comparison of growth rates of *Tritrichomonas foetus* isolates from various geographic regions using three different culture media. Vet Parasitol 89: 199-208.

Lun Z, Chen XG, Zhu XQ, Li XR, Xie MQ. 2005. Are *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas suis* synonyms? Trends Parasitol 21 (3), 122-125.

Malik S, Brochu C, Bilic I, Yuan J, Hess M, Logsdon Jr J, M, Carlton JM. 2011. Phylogeny of parasitic parabasalids and free-living relatives inferred from conventional markers vs. Rpb1, a single-copy gene. PLoS One, 6(6): e20774.

Mallinson D, Livingstone J, Appleton K, Lees S, Coombs G, North M. 1995. Multiple cysteine proteinases of the pathogenic protozoon *Tritrichomonas foetus*: identification of seven diverse and differentially expressed genes. Microbiol 141(12): 3077-3085.

Mallon M, MacLeod A, Wastling J, Smith H, Reilly B, Tait A. 2003. Population structures and the role of genetic exchange in the zoonotic pathogen *Cryptosporidium parvum*. J Mol Evol 56: 407-417.

Mancebo O, Russo A, Carabajal L, Monzon C. 1995. Persistence of *Tritrichomonas foetus* in naturally infected cows and heifers in Argentina. *Vet Parasitol* 59: 7-11.

Martínez AH, Bardon JC, Nosedá RP, Cordeviola J. 1985. Diagnóstico de trichomoniasis en toros. Propuesta de un esquema de diagnóstico. *Vet Arg* 2: 966-977.

Martin-Gomez S, Gonzalez-Paniello, R, Pereira-Bueno J, Ortega-Mora LM. 1998. Prevalence of *Tritrichomonas foetus* infection in beef bulls in northwestern Spain. *Vet Parasitol* 75: 265-268.

Mattos A, Sole-Cava AM, DeCarli G y Benchimol M. 1997. Fine structure and isozymic characterization of trichomonadid protozoa. *Parasitol Res* 83: 290-295.

McCool CJ, Gilham MP, Wolfe SG, Simpson M, Olm T. 1987. Prevalence of *Trichomonas* and *Campylobacter fetus* subsp *fetus* in the Australian swamp buffalo population. *Technote* 47: 1-5.

Mendoza-Ibarra J, Pedraza-Díaz S, García-Peña F, Rojo-Montejo S, Ruiz-Santa-Quiteria J, San Miguel-Ibáñez E, Navarro-Lozano V, Ortega-Mora LM, Osorod K, Collantes-Fernandez E. 2012. High prevalence of *Tritrichomonas foetus* Infection in Asturiana de La Montaña beef cattle kept in extensive conditions in northern Spain. *Vet J* 193(1): 146-151.

Mendoza-Ibarra, J, Ortega-Mora LM, Pedraza-Díaz, S, Rojo-Montejo S, Ruiz-Santa-Quiteria JA, García-Peña F, Navarro-Lozano V, Cuevas-Martína M, Osorod K, Collantes-Fernández E. 2013. Differences in the prevalence of *Tritrichomonas foetus* infection in beef cattle farmed under extensive conditions in Northern Spain. *Vet J* 196(3): 547-549.

Midlej V, Pereira-Neves A, Wilges Kist L, Reis Bogo M, Benchimol M. 2011. Ultrastructural features of *Tritrichomonas mobilensis* and comparison with *Tritrichomonas foetus*. *Vet Parasitol* 182(2-4): 171-180.

Molina L, Perea J, Meglia J, Angón E, García A. 2013. Spatial and temporal epidemiology of bovine trichomoniasis and bovine genital campylobacteriosis in La Pampa province (Argentina) *Prevent Vet Med* (110): 388-394.

Moncada C, Torres V, Israel Y. 1993. Simple method for the preparation of antigen emulsions for immunization. *J Immunol Meth* 162:133-140.

Monteavaro C, Soto P, Catena M, Parma A, Echevarría H. 1999. Análisis antigénico de diferentes cepas de *Tritrichomonas foetus*. *Rev Med Vet* 80(3): 178-181.

Monteavaro C, Soto P, Echeverría H, Catena M, Portiansky E, Gimeno E. 2000. Immunohistochemical detection of *Tritrichomonas foetus* in experimentally infected mice. *Pesq Vet Bras* 20: 43-46.

Morein B, Hu K, Abusugra I. 2004. Current status and potencial application of ISCOMs in veterinary medicine. *Adv Drug Deliv Reviews* 56: 1367-1382.

Morgado Díaz J, Monteiro-Leal LH, de Souza W. 1996. *Tritrichomonas foetus*: Isolation and characterization of the Golgi complex. *Exp Parasitol* 83: 174-183.

Morgan BB. 1947. Vaccination studies on bovine trichomoniasis. *Am J Vet Res* 8: 54-56.

Morin-Adeline V, Mueller K, Conesa A, Šlapeta J. 2015. Comparative RNA-seq analysis of the *Tritrichomonas foetus* PIG30/1 isolate from pigs reveals close association with *Tritrichomonas foetus* BP-4 isolate 'bovine genotype'. *Vet Parasitol* 212(3-4): 111-117.

Mueller K, Morin-Adeline V, Gilchrist K, Brown G, Šlapeta J. 2015. High prevalence of *Tritrichomonas foetus* 'bovine genotype' in faecal samples from domestic pigs at a farm where bovine trichomonosis has not been reported for over 30 years. *Vet Parasitol* 212(3-4): 105-110.

Mulira G y Saunders J. 1994. Immune response of heifers to vaginal submucosal or subcutaneous vaccination and intravaginal challenge with *Ureaplasma diversum*. *Can J Vet Res* 58(2): 109-113. Naiman BM, Alt D, Bolin CA, Zuerner R, Baldwin CL. 2001. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and gammadelta T lymphocytes. *Infect Immun* 69: 7550-7558.

Neumann R, Salatin A, Gaido A, Clement M, Aguirre D. 2010. Prevalencia de trichomonosis y campylobacteriosis bovinas en rodeos de pequeños ganaderos de la provincia de Salta. Libro de resúmenes XVIII Reunión Científico Técnica. AAVLD. E15.

Neumann R, Arguello G, Salatin A, Aguirre D. 2013. Prevalencia de tricomonosis bovina y campylobacteriosis genital bovina en rodeos de cría de los departamentos Jiménez y Pellegrini, Santiago del Estero. XXXVI Reunión de AAPA. Corrientes. Argentina.

OIE. World Organisation for Animal Health. 2016. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. En *Terrestrial Manual*. Cap. 2.3.6: 526-533. (www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual).

Okamoto S, Wakui M, Kobayashi H, Sato N, Ishida A, Tanabe M, Takeuchi T, Fukshima S, Yamada T, Ikeda Y. 1998. *Tritrichomonas foetus* meningoencephalitis after allogenic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transpl* 21: 89-91.

Palomares R, Hurley D, Crum L, Rollin E, Collop T, Williard A, Felton J, Parrish J, Corbeil L. 2017. Serum, uterine, and vaginal mucosal IgG antibody responses against *Tritrichomonas foetus* after administration of a commercial killed whole *T. foetus* vaccine in beef cows. *Theriogenol* (87): 235-241.

Parker S, Campbell J, Ribble C, Gajadhar A. 2003. Sample collection factors affect the sensitivity of the diagnostic test for *Tritrichomonas foetus* in bulls. *Can J Vet Res* 67(2): 138-141.

Parsonson IM, Clark BL, Dufty J. 1974. The pathogenesis of *Tritrichomonas foetus* infection in the bull. *Aust Vet J* 50: 421-423.

Parsonson I, Clark B, Dufty J. 1976. Early pathogenesis and pathology of *Tritrichomonas foetus* infection in virgin heifers. *J Comp Pathol* 86: 59-66.

Pedraza-Díaz S, Arranz-Solís D, Gómez-Couso H, Fuchs L, Fort M, Rengifo-Herrera C, Navarro-Lozano V, Ortega Mora L, Collantes Fernández E. 2015. Multilocus analysis reveals further genetic differences between *Tritrichomonas foetus* and other trichomonads. 25 th Congreso Internacional de Parasitología de la WAAVP. Londres, Inglaterra.

Pereira-Neves A, Campero CM, Martínez A, Benchimol M. 2011. Identification of *Tritrichomonas foetus* pseudocysts in fresh preputial secretion samples from bulls. *Vet Parasitol* 175(1-2): 1-8.

Pereira-Neves A, Gonzaga L, Menna-Barreto RFS, Benchimol M. 2015. Characterisation of 20S proteasome in *Tritrichomonas foetus* and its role during the cell cycle and transformation into endoflagellar form. *Plos One* 10(6): e0129165.

Perez A, Cobo E, Martínez A, Campero CM, Spath E. 2006. Bayesian estimation of *Tritrichomonas foetus* diagnostic test sensitivity and specificity in range beef bulls. *Vet Parasitol* 142: 159-162.

Pfizer Animal Health. 2004. Next generation Present-A adjuvant system: Key to enhanced protection conferred by BVDV (Types 1 and 2) components of cattle master gold. *Technical Bulletin*.

Pindak F, Pindak M, Abee C, Gardner W. 1985. Detection and cultivation of intestinal trichomonads of squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Am J of Primatol* 9(3): 197-205.

Rae O, Crews JE, Greiner EC, Donovan GA. 2004. Epidemiology of *Tritrichomonas foetus* in beef bull populations in Florida. *Theriogenol* 61: 605-618.

Rae O, Crews J. 2006. *Tritrichomonas foetus*. *Vet Clin Food Anim* 22: 595-611.

Regidor-Cerrillo J, Pedraza-Díaz S, Gómez-Bautista M, Ortega-Mora L. 2006. Multilocus microsatellite analysis reveals extensive genetic diversity in *Neospora caninum*. *J Parasitol* 92(3): 517-524.

Reinmann K, Müller N, Kuhnert P, Campero CM, Leitsch D, Hess M, Henning K, Fort M, Müller J, Gottstein B, Frey CF. 2012. *Tritrichomonas foetus* isolates from cats and cattle show minor genetic differences in unrelated loci ITS-2 and EF-1 alpha. *Vet Parasitol* 185: 138-144.

Rhyan J, Stackhouse L, Quinn W. 1988. Fetal and placental lesions in bovine abortion due to *Tritrichomonas foetus*. *Vet Pathol* 25: 350-355.

Rhyan J, Blanchard P, Kvasnicka W, Hall M, Hanks D. 1995. Tissue-invasive *Tritrichomonas foetus* in four aborted bovine fetuses. *J Vet Diag Invest* 7: 409-412.

Rhyan J, Wilson K, Wagner B, Anderson M, BonDurant RH, Burgess D, Mutwiri G, Corbeil LB. 1999. Demonstration of *Tritrichomonas foetus* in the external genitalia and of specific antibodies in preputial secretions of naturally infected bulls. *Vet Pathol* 36: 406-411.

Riccio M, Achilles M, Cano D, Lázaro L, Cano A, Campero CM. 2008. Respuesta inmune humoral en vaquillonas vacunadas contra *Trichomonas foetus* y desafiadas con toros infectados. *Rev Vet* 19(2): 101-108.

Riley D, Samadpour M, Krieger J. 1991. Detection of variable DNA repeats in diverse eukaryotic microorganisms by a single set of polymerase chain reaction primers. *J Clin Microbiol* 29(12): 2746-2751.

Riley D, Wagner B, Polley L, Krieger JN. 1995. PCR-Based study of conserved and variable DNA sequences of *Tritrichomonas foetus* isolated from Saskatchewan, Canada. *J Clin Microbiol* 33: 1308-1313.

Robertson M. 1960. The antigens of *Trichomonas foetus* isolated from cows and pigs. *J Hyg Camb* 58: 207-213.

Schnackel J, Wallace B, Kvasnicka W, Hanks D, Hall M. 1989. *Tritrichomonas foetus* vaccine immunogenicity trial. *Agri Practice* 10 (6):11-14.

Shaia C, Voyich, Gillis J, Singh B, Burgess D. 1998. Purification and expression of the Tf190 adhesin in *Tritrichomonas foetus*. *Infect Immun* 66 (3): 1100-1105.

Silva Filho F, de Souza W, Lopes JD. 1988. Presence of laminin-binding proteins in trichomonads and their role in adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(21):8042-8046.

Singh B, Lucas J, Beach D, Shin S, Gilbert R. 1999. Adhesion of *Tritrichomonas foetus* to bovine vaginal epithelial cells. *Infect Immun* 67: 3847-3854.

Singh B, Lucas J, Hayes G 2004. *Tritrichomonas foetus* induces apoptotic cell death in bovine vaginal epithelial cells. *Infect Immun* 72(7): 4151-4158.

Skirrow SZ. 1987. Identification of trichomonad-carrier cows. *J Am Vet Med Assoc* 191: 553-554.

Skirrow SZ y BonDurant RH. 1990. Induced *Tritrichomonas foetus* infection in beef heifers. *J Am Vet Med Assoc* 196: 885-889.

Skirrow SZ y BonDurant RH. 1990a. Immunoglobulin isotype of specific antibodies in reproductive tract secretions and sera in *Tritrichomonas foetus*-infected heifers. Am J Vet Res 51: 645-653.

Slapeta J, Craig S, McDonnell D, Emery D. 2010. *Tritrichomonas foetus* from domestic cats and cattle are genetically distinct. Exp Parasitol 126: 209-213.

Slapeta J, Müller N, Stack CM, Walker G, Lew-Tabor A, Tachezy J, Frey CF. 2012. Comparative analysis of *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller, 1928) cat genotype, *T. foetus* (Riedmüller, 1928) cattle genotype and *Tritrichomonas suis* (Davaine, 1875) at 10 DNA loci. Int J Parasitol 42(13-14): 1143-1149.

Spickler A y Roth, J. 2003. Adjuvants in Veterinary vaccines: modes of action and adverse effects. J of Vet Internal Med 17: 273-281.

Stewart-Tull D. 1989. Recommendations for the assessment of adjuvants (immunopotentiators). En: Gregoriadis G, Allison AC, Poste G, eds. Immunological adjuvants and vaccines. New York: Plenum: 213-226.

Sun H, Xie Y, Ye Y. 2009. Advances in saponin-based adjuvants. Vaccine 27 (12): 1787-1796.

Suzuki J, Kobayashi S, Osuka H, Kawahata D, Oishi T, Sekiguchi, K, Iwata, S. 2016. Characterization of a human isolate of *Tritrichomonas foetus* (cattle/swine genotype) infected by a zoonotic opportunistic infection. J of Vet Med Sci 78(4): 633-640.

Switzer WP. 1951. Atrophic rhinitis and trichomonads. Vet Med 46: 478-481.

Tachezy J, Tachezy R, Hampl V, Šedinová M, Vaňáčková Š, Vrlík M, Ranst M, van Flegr J, Kulda J. 2002. Cattle pathogen *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller, 1928) and pig commensal *Tritrichomonas suis* (Gruby & Delafond, 1843) belong to the same species. J Eukaryotic Microb 49(2): 154-163.

Talbot J, Nielsen K, Corbeil L. 1991. Cleavage of reproductive secretions by extracellular proteinases of *Tritrichomonas foetus*. Can J Microb 37: 384-390.

Terzolo HR, Argento E, Catena M, Cipolla A, Martínez AH, Tejada G, Villa C, Bentancort L, Campero CM, Cordeviola J, Pasini M. Procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la campylobacteriosis y tricomoniasis genital bovina. 1992. Documento de la Comisión Científica Permanente de Enfermedades Venéreas de los Bovinos. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico. Centro Regional Buenos Aires Sur, INTA Balcarce: 4-5.

Tolbert MK y Gookin J. 2009. *Tritrichomonas foetus*: A new agent of feline diarrhea. *Compend Contin Educ Vet* 31(8): 374-381.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl Acad Sci USA* 76 (9): 4350-4354.

Vázquez P, Fort M, Otermin H, Goyeneche P, Sago J, Baldone V, Fuchs L, Rojas M, Campero C. 2012. Enfermedades de transmisión sexual en La Pampa, Argentina: impacto del plan de control provincial. *Vet Arg* (29): 292.

Vella M y Greenwell P. 1997, Purification and partial characterization of betagalactosidase from *Tritrichomonas foetus*. *Glycoconj J* 14: 883-887.

Veien NK, Hattel T, Justesen O, Norholm A. 1986. Aluminium allergy. *Cont Dermat* 15:295-297.

Vispo P, Prieto P, Stahringer R. 2011. Empleo de una vacuna comercial contra la Trichomonosis en un rodeo Brangus Infectado Naturalmente. *Vet Arg* 28(283).

Voyich JM, Ansotegui S, Bailey J, Burgess DE. 2001. Antibody responses of cattle immunized with the Tf190 adhesin of *Tritrichomonas foetus*. Clin Diagn Lab Immunol 8: 1120-1125.

Voyich JM, Palecanda A, Burgess DE. 2001a. Antigen-specific T-cell responses in cattle immunized with antigens of *Tritrichomonas foetus*. J Parasitol 87: 1040-1048.

Wilson J, Wilson L, deRiel J, Villa-Komaroff L, Efstratiadis A, Forget B, Weissman S. 1978. Nucleic Acids Res 5: 563-581.

Wilson D, Thomas J, Amanda W, Chelsea H, Bunnell J, Rood K, Van Wettere A. 2017. Estimation of the trichomonad concentration in beef bull preputial samples and resultant population effect of pooling on detection of *Tritrichomonas foetus* using qPCR. J Vet Sci Technol 8: 434.

Woudwyk M, Zanuzzi C, Nishida F, Gimeno E, Soto P, Monteavaro C, Barbeito C 2015. Apoptosis and cell proliferation in the mouse model of embryonic death induced by *Tritrichomonas foetus* infection. Exp Parasitol 156: 32-36.

Xu W, Lun Z. R, Gajadhar A. 1998. Chromosome numbers of *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas suis*. Vet Parasitol 78(4): 247-251.

Anexo 1: Soluciones

PBS (Solución Salina Bufferada)

Cloruro de sodio: 8 gr

Cloruro de potasio: 0,2 gr

Sodio fosfato dibásico anhidro: 1,15 gr

Potasio fosfato monobásico anhidro: 0,2 gr

Agua destilada: 1000 ml

PBS Tween 20%

PBS stock: 98 ml

Tween 20: 2 ml

PBS Tween 20%-gelatina

Al PBS Tween 20 se agrega 0,5 % de gelatina (Sigma Aldrich, Alemania).

TBS (Buffer salino de Tris)

Tris Base: 50 mM

Cloruro de sodio (Na Cl): 150 mM

Ajustar pH con ácido clorhídrico hasta 7,6

Agua destilada: c.s.p 1L

TBS-T

A la solución de TBS previamente descrita se le agrega 0,05% Tween 20.

Agar Sangre

Blood Agar Base No. 2 (N° Catálogo: CM0271, Oxoid, Hampshire, England): preparar como indica el envase.

Una vez autoclavado dejar entibiar hasta una temperatura de 38°C y agregar 7% de sangre equina estéril por litro de medio. Finalmente plaquear.

TBE 10X

Tris Base: 109 gr

Ácido Bórico: 55 gr

EDTA: 4,65 gr

Agua destilada: 1000 ml

SDS-PAGE**Solución Acrilamida: Bisacrilamida (30:0,8) (Solución A)**

Se pesan 30 gr de acrilamida y 0,8 de bisacrilamida. Luego, se llevó a un volumen final de 100 ml con agua destilada.

Buffer 4x 1,5 M Tris pH 8,8 (Solución B)

A 36,3 gr de Tris Base se le agregó 170 ml de agua y se ajustó a pH 8,8 con HCL 6 M. Luego, se llevó a un volumen final de 200 ml con agua destilada.

Buffer 4x 0,5 M Tris pH 6,8 (Solución C)

A 12,1 gr de Tris Base se le agregó 170 ml de H₂O destilada y se ajustó el pH a 6,8. Luego, se llevó a un volumen final de 200 ml con agua destilada.

Amonio Persulfato (APS) 10% (w/v)

N° Catálogo: V3131 Lote: 0000102489 (Promega, Madison, USA) preparado en agua destilada.

Buffer de muestra para condiciones reductoras (5X)

Tris pH 6,8: 1,25 ml

SDS 10%: 2 ml

Beta-mercaptoetanol: 0,5 ml

Glicerol: 2 ml

Agua destilada: 4,25 ml

Azul de bromofenol: 0,2%

Buffer de electroforesis (10x)

Tris Base: 30,2 gr

Glicina: 144 gr

SDS: 10 gr

Agua destilada: 1 L

N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)

N° Catálogo: 17919 Lote: 1396922 (Thermo Scientific, USA)

Sodio Dodecyl Sulfate (SDS) 10 % (w/v)

N° Catalogo: H5113 Lote 306562 (Promega, Madison, USA) preparado en agua destilada.

Solución de tñido de Coomasie Blue

Coomasie Blue: 0,125%

Metanol: 50%

Ácido acético: 10%

Luego se llevó a un volumen de 500 ml de agua destilada.

Solución de desteñido I

50% de metanol / 10% ácido acético. Luego, se llevó a un volumen de 500 ml con agua destilada.

Solución de desteñido II

5% de metanol / 7% ácido acético. Luego, se llevó a un volumen de 500 ml con agua destilada.

Gel de poliacrilamida 12%**Gel de concentración:**

Agua destilada: 4,0 ml

Solución A: 3,3 ml

Solución B: 2,5 ml

SDS 10 %: 0,1 ml

APS 10 %: 0,1 ml

TEMED: 0,004 ml

Gel de corrida

Agua destilada: 3,4 ml

Solución A: 0,83 ml

Solución C: 0,63 ml

SDS 10 %: 0,05 ml

APS 10 %: 0,05 ml

TEMED: 0,005 ml

