



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:

**“El antígeno NcSRS2 de *Neospora caninum*: su aplicación en el diagnóstico y
estrategias de prevención”**

TESISTA: Lucía María Campero

DIRECTORES: Dra. María Cecilia Venturini

Dra. Diana Bacigalupe

CODIRECTOR: Dr. Gereon Schares

LUGAR DE TRABAJO: Laboratorio de Inmunoparasitología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata

MIEMBROS DEL JURADO:

Dr. Sergio Angel

Dr. Prando Moore

Dr. Gabriel Travería

2016

DEDICATORIA

A mis padres

*Enseñarás a volar,
pero no volarán tu vuelo.
Enseñarás a soñar,
pero no soñarán tu sueño.
Enseñarás a vivir,
pero no vivirán tu vida.
Sin embargo...
en cada vuelo,
en cada vida,
en cada sueño,
perdurará siempre la huella
del camino enseñado.*

Madre Teresa de Calcuta

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

A mis directoras y codirector:

María Cecilia Venturini, por todo su apoyo, su delicadeza y cuidados. Agradezco la formación profesional, docente y la calidad humana que siempre me brindó y me enseñó. Su confianza y apoyo me han impulsado a finalizar este trabajo de tesis.

Diana Bacigalupe, por enseñarme y ayudarme a trabajar en el laboratorio, por su paciencia, guía y afecto.

Gereon Schares, por recibirme en Alemania y siempre brindarme su apoyo, y por enseñarme el valor del tiempo.

A mis compañeros de trabajo y colegas:

A todos los integrantes del LAINPA, por recibirme y permitirme formarme en lo que para mí ha sido una nueva carrera. Magdalena Rambeaud, por ayudarme en el ensayo de vacunas en ratones y las tantas correcciones de trabajos. Juan Unzaga, por realizar los controles bacteriológicos de las vacunas del ensayo. Andrea Dellarupe, por mantener la cepa para el desafío en el ensayo de vacunas. Isidoro y Selva, por su excelente trabajo técnico. Una mención especial para Isidoro, cuya compañía y ayuda sin importar día ni hora siempre conté. Lore, mi gran amiga, por compartir tantas risas y alegrías juntas. Laurita, gracias por tu sentido de responsabilidad y compromiso. Lais, agradezco tus consejos en los momentos indicados y tu guía profesional. Gastón, por enseñarme el sentido de la practicidad,

por tu ayuda constante y tu pensamiento crítico. Diego, amigo gracias por ser tal cual sos. Marianita y Sebas, por su compañerismo diario.

Estela Bonzo por brindarme apoyo en los análisis estadísticos.

Lieselotte Minke, por el entrenamiento recibido en cromatografía de afinidad e *Immunoblot* en mi pasantía en Friedrich-Loeffler-Institut en Alemania.

Prando Moore, por ayudarme en los estudios HP e IHQ de este trabajo de tesis. Por tus consejos, paciencia y dedicación hacia mí.

A mis amigos:

Fercho y Jesús, porque me han acompañado desde la amistad y el cariño a lo largo de los años.

A mis afectos:

Mis padres, valoro el sacrificio que siempre hicieron para permitir mi formación. Gracias papá por toda tu ayuda y consejos, siempre serás mi guía y admiración. A mamá, incondicional, siempre presente.

Mis hermanas, Mery y Angie, nuestro cariño sabe cruzar fronteras.

Agustín, mi compañero y amor, porque siempre que vuelvo a casa encuentro tu sonrisa. Gracias por entenderme, y aún así, amarme.

LMC

Citas bibliográficas correspondientes a las publicaciones parciales del trabajo de tesis

- Presentaciones a congresos

Campero LM, Minke L, Hecker Y, Bacigalupe D, Rambeaud M, Moore PD, Campero CM, Schares G, Venturini MC. Immunoreactivity of sera from naturally and experimentally infected cows (Nc-6 Argentina, Nc-1) to *Neospora caninum* immunodominant antigens. Apicomplexa in Farm animals International meeting, 2012, p. 120, Lisboa, Portugal.

Campero LM, Bacigalupe D, Rambeaud M, Campero CM, Venturini MC. Importancia de la proteína nativa NcSRS2 de *Neospora caninum* en el diagnóstico de la neosporosis bovina. XXVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología, 2013, p. 54, Rosario, Argentina.

Campero LM, Rambeaud M, Bacigalupe D, Moré G, Moore DP, Campero CM, Schares G, Venturini MC. Evaluación de una prueba de ELISA con el antígeno nativo P38 de *Neospora caninum* para el diagnóstico de la neosporosis bovina. XX Reunión Científico Técnica, 2014, p.52, San Miguel de Tucumán, Argentina.

Rambeaud M, **Campero LM**, Dellarupe A, Moré GA, Moore DP, Fort M, Echaide I, Campero CM, Venturini MC. Evaluación inter e intra- laboratorio de un panel de sueros provenientes de bovinos infectados natural y experimentalmente con *Neospora caninum*. XX Reunión Científico Técnica, 2014, p.72, San Miguel de Tucumán, Argentina.

Campero LM, Rambeaud M, Moré G, Bacigalupe D, Dellarupe A, Zamorano P, Unzaga JM, Venturini MC. Evaluación de una prueba de ELISA-p38 en la identificación y diferenciación de animales vacunados e infectados con *Neospora caninum* en modelo murino. XXVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología, 2015. CABA, Argentina.

- **Trabajos publicados**

Campero LM, Minke L, Moré G, Rambeaud M, Bacigalupe D, Moore P, Hecker Y, Campero C, Schares G, Venturini MC. Evaluation and comparison of serological methods for detection of bovine neosporosis in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. 47:295-301. doi:10.1016/j.ram.2015.07.002.

Citas bibliográficas correspondientes a las publicaciones parciales relacionadas indirectamente con el trabajo de tesis

- Presentaciones a congresos

Campero LM, Konrad JL, Pardini L, Moré G, Bacigalupe D, Campero CM, Venturini MC. Seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* y *Sarcocystis* spp. en búfalas de Corrientes, Chaco y Formosa. IX Congreso de Protozoología y Enfermedades Parasitarias, 2011. Revista Médica de Rosario, volumen 77, p.S82. Mar del Plata, Argentina.

Campero LM, Minke L, Hecker Y, Bacigalupe D, Rambeaud M, Moore DP, Campero CM, Schares G, Venturini MC. Immunoreactivity of sera from naturally and experimentally infected cows (Nc-6 Argentina, Nc-1) to *Neospora caninum* immunodominant antigens. Apicomplexa in Farm animals, International meeting. 2012, Lisboa, p.120, Lisboa, Portugal.

- Trabajos publicados

Bacigalupe D, Basso W, Caspe SG, Moré G, Lischinsky L, Gos ML, Leunda M, **Campero L**, Moore DP, Schares G, Campero CM, Venturini MC. *Neospora caninum* NC-6 Argentina induces fetopathy in both serologically positive and negative experimentally inoculated pregnant dams. Parasitol Res. 2013; 112:2585-2592.

Konrad JL, **Campero LM**, Caspe SG, Brihuega B, Draghi G, Moore DP, Crudeli GA, Venturini MC, Campero CM. Detection of antibodies against *Brucella abortus*,

Leptospira spp. and Apicomplexa protozoa in water buffaloes in the Northeast of Argentina. Trop Anim Health Prod. 2013; 45:1751-1756.

Campero LM, Venturini MC, Moore DP, Massola L, Lagomarsino H, García B, Bacigalupe D, Rambeaud M, Pardini L, Leunda MR, Schares G, Campero CM. Isolation and molecular characterization of a new *Neospora caninum* isolate from cattle in Argentina. Exp Parasitol. 2015; 155:8-12.

INDICE DE CONTENIDOS

TÍTULO: EL ANTÍGENO NCSRS2 DE <i>NEOSPORA CANINUM</i> : SU APLICACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO Y ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN	1
PALABRAS CLAVES.....	1
RESUMEN	1
TITLE: NCSRS2 ANTIGEN OF <i>NEOSPORA CANINUM</i> : IT'S APPLICATION IN THE DIAGNOSIS AND PREVENTION STRATEGIES.....	5
KEYWORDS.....	5
ABSTRACT.....	5
CAPITULO I: GENERALIDADES.....	8
1.1. Historia.....	8
1.2. Prevalencia, pérdidas económicas y situación epidemiológica de <i>N. caninum</i> en el país	9
1.3. Medidas de control.....	10
1.4. Ciclo de vida e infección	12
1.5. Hospedadores intermediarios	14
1.6. Modos de transmisión.....	15
1.7. Respuesta inmune en bovinos durante la gestación.....	16
1.8. Patogénesis del aborto	18
1.9. Patrón de abortos	19
1.10. Diagnóstico del aborto y la enfermedad.....	20
1.11. Diagnóstico serológico.....	22

2. OBJETIVOS.....	27
Objetivos generales	27
Objetivos específicos	27
3. HIPÓTESIS MÁS RELEVANTES	28
CAPÍTULO II: EVALUACIÓN DE UNA PRUEBA DE ELISA INDIRECTA CON EL ANTÍGENO NCSRS2 (P38) DE <i>NEOSPORA CANINUM</i> PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA NEOSPOROSIS BOVINA EN ARGENTINA.....	
1. INTRODUCCIÓN	29
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
2.1. Sueros bovinos	33
2.2. Formación del estándar relativo de comparación (ERC)	33
2.2.1. Prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	34
2.2.2. Prueba de Immunoblot (IB).....	35
2.3. Purificación de la proteína NcSRS2 de <i>N. caninum</i> mediante cromatografía de afinidad	36
2.4. Análisis de la pureza de proteína NcSRS2 de <i>N. caninum</i>	37
2.5. Prueba de ELISA-p38 para el diagnóstico de la neosporosis bovina.....	38
2.6. Análisis de datos.....	39
3. RESULTADOS.....	40
3.1. Purificación de la proteína p38.....	40
3.2. Evaluación de la prueba de ELISA-p38: concordancia entre las pruebas de referencia.....	41
3.3. Comparación entre pruebas serológicas según el criterio de la “Mayoría de las pruebas”	41

3.4. Sensibilidad y especificidad relativa para la prueba de ELISA-p38	41
3.5. Análisis de los sueros bovinos experimentales	42
3.6. Patrón de detección de antígenos inmunodominantes de <i>N. caninum</i> detectados por IB	42
4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	43
TABLAS Y FIGURAS DEL CAPÍTULO II	48
CAPÍTULO III: EVALUACIÓN DE LA PRUEBA DE ELISA-P38 EN LA IDENTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE ANIMALES INFECTADOS Y VACUNADOS EN UN MODELO MURINO	57
1. INTRODUCCIÓN	57
2. MATERIALES Y MÉTODOS	63
2.1. Diseño experimental	63
2.2. Ratones	65
2.3. Elaboración de vacunas y desafío	66
2.4. Adyuvante Montanide™ ISA 206 y elaboración de vacunas	67
2.5. SDS-PAGE e IB de los inmunógenos	68
2.6. Respuesta inmune humoral: detección de IgG por la prueba de IFI	68
2.7. Respuesta inmune humoral: medición de anticuerpos anti-p38 por la prueba de ELISA-p38	69
2.8. Respuesta inmune celular previa y posterior al desafío: medición de IL-4	70
2.8.1. Procesado del bazo de ratones para medición de la inmunidad celular	70
2.8.2. Medición de las citoquinas IL-4 e IFN γ	72
2.9. Análisis de la severidad de lesiones e inmunohistoquímica en los órganos de los ratones	72

2.10. Análisis de datos	75
3. RESULTADOS.....	75
3.1. SDS-PAGE e IB de los inmunógenos	75
3.2. Respuesta inmune humoral: detección de IgG por la prueba de IFI	76
3.3. Respuesta inmune humoral: medición de anticuerpos anti-p38 por la prueba de ELISA-p38	76
3.4. Respuesta inmune celular previa y posterior al desafío: medición de IL-4	77
3.5. Análisis de la severidad de lesiones e inmunohistoquímica en los órganos de los ratones.....	77
4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	78
TABLAS Y FIGURAS DEL CAPÍTULO III	85
CONCLUSIONES FINALES	103
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
Anexos de técnicas y soluciones	132

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS:

ACTH: hormona adrenocorticotrópica

ADN: ácido desoxirribonucleico

ANOVA: test de análisis de varianza

AUC: área bajo la curva

CPA: células presentadoras de antígeno

DIVA: diferenciación de animales vacunados de infectados

EE.UU: Estados Unidos de América

ELISA: enzimoimmunoensayo

ERC: estándar relativo de comparación

FSC-1: factor estimulante de colonia 1

FSC-GM: factor estimulante de colonia de granulocitos y macrófagos

g: gravedad

gr: gramos

HD: hospedador definitivo

HI: hospedador intermediario

hs: horas

IB: immunoblot

IDAs: antígenos inmunodominantes

IFI: inmunofluorescencia indirecta

IHQ: inmunohistoquímica

Ig: inmunoglobulina

IFN γ : interferón gamma

IL: interleuquina

kDa: kilodalton

l: litro

M: molar

min: minuto

ml: mililitro

mm: milímetro

ng: nanogramos

OIE: oficina internacional de epizootias

PBS: solución buffer salina de fosfatos

PCR: reacción de la polimerasa en cadena

pg: picogramos

pH: potencial de hidrógeno, medida de acidez o alcalinidad de un medio

PVDF: fluoruro de polivinilideno

p38: proteína de 38 kDa

ROC: característica operativa del receptor

SC: subcutáneo

SNC: sistema nervioso central

spi: semana post-infección

TGF- β : factor de crecimiento beta

Th1: linfocitos T helper perfil 1

Th2: linfocitos T helper perfil 2

US\$: dólar americano

μ g: microgramos

μ l: microlitros

TÍTULO: EL ANTÍGENO NCSRS2 DE *NEOSPORA CANINUM*: SU APLICACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO Y ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN

PALABRAS CLAVES:

Neospora caninum, bovinos, NcSRS2 (p38), ELISA-p38, Argentina, DIVA (diferenciación de animales infectados de vacunados).

RESUMEN

Neospora caninum es un parásito protozoo responsable de abortos y pérdidas económicas en bovinos. La realización de un diagnóstico serológico preciso y con resultados comparables obtenidos por diferentes pruebas contribuye al manejo de este problema y a encarar medidas de control.

Los objetivos de este trabajo fueron evaluar una prueba de ELISA con el antígeno nativo NcSRS2 (p38) de *N. caninum* para el diagnóstico de la neosporosis bovina en Argentina. Asimismo, se analizó el desempeño de la prueba de ELISA-p38 para identificar y diferenciar ratones inmunizados con una vacuna oleosa de *N. caninum* elaborada con lisado completo de proteínas solubles y otra sin p38. Se evaluó la protección conferida por esas vacunas frente al desafío con una cepa de alta virulencia en el modelo murino.

Se purificó la proteína p38 utilizada para el ELISA mediante cromatografía de afinidad, a partir de columnas de sefarosa con el anticuerpo monoclonal 4.15.15 (IgG2a). La prueba se evaluó localmente con sueros de bovinos naturalmente expuestos de Argentina ($n= 336$) y de bovinos experimentalmente infectados ($n= 36$). Los sueros que resultaron positivos o negativos a las pruebas de

Inmunofluorescencia inidirecta (IFI) e *Immunoblot* (IB) fueron considerados como Estándares Relativos de Comparación (ERC) para evaluar la prueba de ELISA-p38. Se determinó la concordancia, sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) relativa por medio del análisis de caracterísitica operativa del receptor (ROC) de la prueba de ELISA-p38 respecto al ERC.

El ERC se conformó por 94 sueros positivos y 231 sueros negativos a las pruebas de IFI e IB ($n= 325$). El análisis ROC determinó que la prueba de ELISA-p38 fue altamente precisa (área bajo la curva, AUC= 0,982) usando el punto de corte 0,0905 (índice). La Se y Sp relativa del ELISA-p38 fue 97,8% y 99,5%, respectivamente, con una concordancia casi perfecta ($k= 0,97$) respecto al ERC. La prueba de ELISA-p38 evaluada localmente ha demostrado un buen desempeño y una adecuada *performance* para el diagnóstico de la neosporosis bovina en Argentina.

Se vacunaron ratones BALB/c con un lisado completo de proteínas solubles de *N. caninum* (**VC**), y con un lisado de proteínas solubles sin p38 (**VS/p38**), y se incluyeron grupos controles PBS (**C**) y adyuvante (**CA**). En los grupos **VC**, **VS/p38** y **CA** se utilizó el adyuvante Montanide™ ISA 206 (Seppic, Francia). Los sueros del grupo **VC** se consideraron como equivalentes a los que se producirían en una infección natural con las proteínas completas del protozoo cuando se realizaron las evaluaciones serológicas previas al desafío. Al día 35 todos los ratones se desafiaron por vía SC con 2×10^6 taquizoítos vivos/ratón del aislamiento NC-Spain 7 de *N. caninum*. Se realizó la extracción de sangre en los días 13 y 34, para analizar la producción de anticuerpos mediante IFI y ELISA-p38. En el día 34, se sacrificaron 3 ratones de cada grupo con el fin de medir los parámetros inmunes específicos

previo al desafío. Los ratones restantes de cada grupo se sacrificaron al final del ensayo (día 65). Se evaluó la respuesta inmune celular y la protección conferida por las vacunas por medio del cultivo de células esplénicas; obtención de sangre para serología y cerebro, pulmón, corazón, hígado y riñón para histopatología e inmunohistoquímica. La respuesta inmune celular fue evaluada por la medición de la producción *in vitro* de la citoquina IL-4 utilizando un kit comercial de ELISA. Se evaluó el grado de severidad de las lesiones microscópicas en los cerebros y otros órganos según un puntaje asignado.

Mediante la prueba IFI se detectaron anticuerpos en los grupos inmunizados (**VC** y **VS/p38**) previo al desafío, mientras que con la prueba de ELISA-p38, se detectaron anticuerpos solo en el grupo inmunizado con el lisado completo de proteínas solubles (**VC**). En los sueros de los ratones inmunizados con lisado completo de proteínas solubles se detectaron anticuerpos, mientras que en el suero de los ratones inmunizados con proteínas solubles sin proteína p38, no se detectaron anticuerpos, resultando serológicamente negativos a la prueba de ELISA-p38. Se estableció un punto de corte de 0,0932 (índice) para una Se y Sp relativa de 100%, con un valor perfecto de AUC para la prueba de ELISA-p38. La prueba de ELISA-p38 en el modelo murino permitió identificar y diferenciar a los ratones inmunizados con y sin la proteína p38 de *N. caninum*.

Al comparar la concentración de IL-4 en los sobrenadantes de los grupos inmunizados con lisado completo de proteínas solubles y sin p38 previo al desafío, se detectaron niveles superiores de IL-4 para el primer grupo con respecto al segundo.

Los ratones inmunizados con la vacuna oleosa de *N. caninum* sin p38 tuvieron mayor severidad de lesiones en cerebro y pulmón, por lo que se considera que el preparado vacunal sin p38 no otorgó suficiente protección frente al desafío con una cepa de alta virulencia. Por lo tanto, la presencia de esta proteína sería necesaria para generar una respuesta inmune protectora. Sería importante investigar otras proteínas que no estén directamente relacionadas con la protección y analizar su potencial uso como indicadores para la diferenciación de animales vacunados de infectados.

TITLE: NCSRS2 ANTIGEN OF *NEOSPORA CANINUM*: IT'S APPLICATION IN THE DIAGNOSIS AND PREVENTION STRATEGIES

KEYWORDS:

Neospora caninum, bovine, NcSRS2 (p38), ELISA-p38, Argentina, DIVA (diferentiating infected from vaccinated animals).

ABSTRACT

Neospora caninum is a protozoan parasite responsible for bovine abortion and important economic losses in cattle worldwide. The accurate diagnosis of neosporosis is essential for management and control measures.

The aims of the present work were to evaluate an ELISA test using the NcSRS2 (p38) native antigen of *N. caninum* for the diagnosis of bovine neosporosis in Argentina. In addition, the performance of the p38-ELISA in identifying and differentiating immunized mice with an oily *N. caninum* vaccine elaborated with complete lysate of soluble proteins and another without p38 was analyzed. Vaccine protection towards challenge with a high virulent strain was evaluated in a mouse model.

The p38 protein was purified by affinity chromatography using monoclonal antibody 4.15.26 (IgG2a). The test was locally evaluated with sera from naturally exposed cattle from Argentina ($n= 336$) and from experimentally infected cattle ($n= 36$). Serum samples testing either positive or negative by indirect fluorescence antibody test (IFAT) and Immunoblot (IB) were considered as Relative Standard of

Comparison (RSC), used for p38-ELISA evaluation. Agreement, sensitivity (Se) and specificity (Sp) relative values were determined by ROC analysis relative to RSC.

The RSC consisted of 94 sera that tested positive and 231 sera that tested negative by both IFAT and IB ($n= 325$). ROC analysis revealed that p38-ELISA was highly accurate (AUC=0.982) according to RSC with a cut-off index of 0.0905. Relative Se and Sp of p38-ELISA were 97.8% and 99.5% respectively, and agreement between RSC and p38-ELISA was almost perfect ($k= 0.97$). The p38-ELISA test locally evaluated has shown accurate performance for the diagnosis of bovine neosporosis in Argentina.

BALB/c mice were vaccinated with complete lysate of soluble proteins of *N. caninum* (**VC**) and with lysate of soluble proteins without p38 (**VS/p38**), PBS (**C**) and adjuvant (**CA**) control groups were included. MontanideTM ISA 206 (Seppic, France) adjuvant was used in groups **VC**, **VS/p38** and **CA**. Sera from group **VC** analyzed before challenge were considered as equivalent to those that would develop in a natural infection with complete protozoan proteins. At day 35 all groups were subcutaneously challenged with 2×10^6 tachyzoites/mouse of NC-Spain 7 strain of *N. caninum*. Blood samples were taken at days 13 and 34 to measure antibody production by IFAT and p38-ELISA. At day 34, three mice of each group were sacrificed to measure specific immune parameters before challenge. The remaining mice were sacrificed at the end of the assay (day 65). Cellular immunity and vaccine protection were evaluated by spleen cells culture, blood for serologic assays and brain, lungs, heart, liver and kidneys for histopathological and immunohistochemistry studies. Cellular immune response was evaluated by *in vitro* measurement of IL-4

production with a commercial ELISA kit. Disease severity in brain and other organs was measured according lesions scores assigned.

IFAT detected antibodies in immunized groups (**VC** and **VS/p38**) before challenge, while p38-ELISA test only detected antibodies in the immunized with complete lysate of soluble proteins group (**VC**). Therefore, p38-ELISA detected antibodies in sera from mice immunized with complete lysate of soluble proteins, and there was no antibody detection in sera from mice immunized with lysate of soluble proteins without p38. A cut-off index value of 0.0932 for a relative Se and Sp of 100% was established with a perfect AUC value for p38-ELISA. The p38-ELISA test allowed identification and differentiation of mice immunized with and without p38 protein of *N. caninum* in mouse model.

When IL-4 concentration was compared between immunized groups with complete lysate of soluble proteins and without p38 before challenge, higher levels of IL-4 were detected in the former group.

Mice immunized with the oily *N. caninum* vaccine without p38 had more severe lesions in brain and lungs; therefore, this formulation without p38 protein did not confer enough protection towards challenge with a high virulent strain. The presence of this protein would be necessary to induce a protective immune response. It would be important to investigate other proteins that are not directly related to protection and to analyze its potential use as indicators for the differentiation of infected from vaccinated animals.

CAPITULO I: GENERALIDADES

1.1. Historia

Neospora caninum es un endoparásito protozoo del Phylum Apicomplexa (Bjerkas y col., 1984; Dubey y col., 2007) de la familia Sarcocystidae, estrechamente relacionado con otros parásitos como *Toxoplasma gondii*.

N. caninum fue descrito por primera vez en el año 1984 en perros de Noruega con signología neuromuscular (Bjerkas y col., 1984) y luego en terneros con mieloencefalitis (O'Toole y Jeffrey, 1987; Parish y col., 1987). Inicialmente, fue descrito como un esporozoo formador de quistes no identificado y/o comúnmente confundido con *T. gondii*. En 1988, Dubey y col. aislaron al parásito *in vitro*, designando al nuevo microorganismo como una nueva especie *N. caninum*, estructuralmente distinto al resto de los parásitos coccidios descritos al momento (Dubey y col., 1988a; 1988b). El primer reporte de la enfermedad en fetos bovinos se realizó mediante el uso de la inmunohistoquímica (IHQ) (Thilsted y Dubey, 1989) como método diagnóstico.

Utilizando herramientas diagnósticas como la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la IHQ, Bjerkas y Dubey confirmaron que los parásitos identificados en los perros de Noruega en el año 1984 eran efectivamente *N. caninum* (Dubey y Schares, 2011). Actualmente, *N. caninum* es considerado uno de los principales agentes causales de abortos en bovinos de rodeos para carne y leche provocando pérdidas económicas considerables en el país y en el mundo (Dubey y Schares, 2011; Reichel y col, 2013).

1.2. Prevalencia, pérdidas económicas y situación epidemiológica de *N. caninum* en el país

Los abortos y la mortalidad neonatal ocasionan severas pérdidas económicas, siendo la neosporosis una de las principales causas de abortos en el bovino (Dubey y Schares, 2011). Dentro de las pérdidas económicas deben considerarse las relativas al aborto, aumento de la tasa de rechazo, menor producción láctea, aumento del intervalo entre partos, caída del stock, gastos diagnósticos y honorarios profesionales (Reichel y col., 2013; Campero, 2014).

En Argentina, los trabajos seroepidemiológicos en rodeos para leche y carne con antecedentes de abortos determinaron seroprevalencias de un 51,5% y 21,7%, respectivamente (Venturini y col., 1995; Venturini y col., 1999; Moore y col., 2002).

El impacto y las pérdidas reproductivas que la neosporosis ocasiona en el ganado vacuno en Argentina se estimaron superiores a los 80 millones de dólares anuales (Campero y col., 2003a). Un trabajo reciente en la región de la Pampa Húmeda estimó pérdidas económicas anuales de aproximadamente 44 y 13 millones US\$ teniendo como base porcentajes de abortos del 16,5% y 6,7% en rodeos lecheros y para carne, respectivamente (Moore y col., 2013). Para la misma zona, se estimó una prevalencia a *N. caninum* de 20,5% y 7% en rodeos para leche y carne respectivamente, a partir de un estudio seroepidemiológico con 4334 sueros analizados. Más aún, los autores concluyen que los rodeos lecheros tienen un riesgo de infección 3,5 veces superior que rodeos para carne, en relación al manejo intensivo en la industria lechera (Fort y col., 2015). Sin embargo no debe desestimarse el impacto económico de *N. caninum* en sistemas productivos intensivos para carne. De hecho, en un estudio de caracterización de episodios de

abortos en 2 rodeos para carne en la provincia de Buenos Aires, se registraron ambos patrones de abortos, endémicos y epidémicos. En el rodeo con tormenta de abortos los animales eran vaquillonas de primera gestación y la carga animal era alta, ambos considerados como factores de riesgo (Calandra y col., 2014).

Existe un limitado número de aislamientos de *N. caninum* a nivel mundial, principalmente debido a la dificultad y susceptibilidad de crecimiento del parásito (Dubey y Schares, 2006). En Argentina, hasta el momento se reportaron 3 aislamientos de *N. caninum* de distintos orígenes, cuyos patrones moleculares fueron confirmados por microsatélites. El aislamiento NC6- Argentina (Basso y col., 2001) obtenido a partir de ooquistes hallados en la materia fecal de un perro infectado naturalmente, cuya patogenicidad ha sido caracterizada tanto *in vitro* como *in vivo* en ratones y bovinos (Bacigalupe y col. 2013; Hecker y col., 2013; Dellarupe y col., 2014a; 2014b). Basso y col. (2014) aislaron *N. caninum* de tejidos de un cervato axis (*Axis axis*) del zoológico de La Plata (NC-Axis) que había muerto a los 14 días de vida con un cuadro clínico de debilidad y ataxia. Recientemente, se obtuvo el primer aislamiento de origen bovino a partir de un ternero asintomático pero congénitamente infectado, proveniente de un rodeo para leche de la provincia de Córdoba, denominado NC-Argentina LP1 (Campero y col., 2015). Según resultados parciales obtenidos del análisis de microsatélites, permitirían confirmar un nuevo aislamiento de origen bovino proveniente de un feto de un rodeo para carne de la provincia de Buenos Aires (datos sin publicar).

1.3. Medidas de control

Se han propuesto diferentes estrategias de control basadas en la relación costo-beneficio a nivel de rodeo. Si la prevalencia de la enfermedad en un rodeo fuera baja, podría ser más caro tratar de eliminar la enfermedad que convivir con ella (Campero, 2014). No obstante, para aquellos rodeos con prevalencias mayores (>21%), se considera que la vacunación sería la medida más rentable (Reichel y Ellis, 2006).

La única vacuna comercial (Bovilis Neoguard™) para *N. caninum* que estuvo disponible en algunos países fue retirada del mercado debido a su variable eficacia (Weston y col., 2012; Reichel y col., 2015). Por lo tanto, hasta el presente, no existen vacunas comerciales disponibles ni tratamientos con medicamentos efectivos para el control de la neosporosis bovina.

Las medidas de control se basan exclusivamente en medidas de manejo (Almería y López-Gatius, 2013; Weber y col., 2013; Campero, 2014; Reichel y col., 2015). Se recomienda evitar la transmisión horizontal limitando el acceso de los perros al alimento y agua que consume el ganado bovino para impedir la posible diseminación de ooquistes a través de la materia fecal. También es importante eliminar fetos abortados y placentas para evitar la ingestión de posibles tejidos infectados con *N. caninum* por parte de los hospedadores definitivos.

Con respecto a la vía de transmisión vertical, se recomienda realizar la reposición con animales seronegativos y eliminar los animales seropositivos al igual que vacas que sufrieron abortos. No obstante, esta medida solamente es rentable desde el punto de vista económico si la seroprevalencia es baja (Campero, 2014). Asimismo es posible comparar serológicamente un grupo de hembras que hayan

experimentado abortos con otro grupo que no hayan abortado, dentro del mismo rodeo.

Tampoco existe en el mercado ningún tratamiento medicamentoso seguro y efectivo para controlar la infección con *N. caninum*. Se ha investigado el efecto de compuestos coccidiostáticos como el toltrazuril, ponazuril, combinación de sulfaziadina con trimetoprim y toltrazuril. Un trabajo reciente estudió el efecto de la hidroxinatpoquinona buparvaquone en un modelo de ratona gestante experimentalmente infectadas con la cepa NC-Spain7. Se reportó una reducción de la transmisión vertical y signología clínica en las crías del grupo de madres tratadas, sin embargo, en los cerebros de las madres se detectó ADN de *N. caninum* (Müller y col., 2016).

No obstante, no se puede descartar el efecto residual de dichos fármacos en la leche o carne de los animales tratados (Campero, 2014; Monney y Hemphill, 2014).

1.4. Ciclo de vida e infección

Neospora caninum es un organismo de vida endocelular con un ciclo heteroxeno. Sus hospedadores definitivos (HD) hasta el presente son los cánidos como el perro (McAllister y col., 1998; Basso y col., 2001), el coyote (Gondim y col., 2004), el dingo (King y col., 2010) y el lobo gris (Dubey y col., 2011; 2014), los que eliminan ooquistes no esporulados en la materia fecal. Por esta vía contaminan los alimentos y el agua que consume el ganado. Los ooquistes son resistentes al ambiente y son claves en la epidemiología de la neosporosis (Uzeda y col., 2007;

Bandini y col., 2011). La sintomatología en el perro se caracteriza por parálisis del tren posterior y afecciones del SNC.

El ciclo de vida de *N. caninum* está caracterizado por tres estadios parasitarios: taquizoítos, bradizoítos (en el interior de los quistes tisulares) y esporozoítos (contenidos en los esporocistos dentro del ooquiste). Los taquizoítos y quistes tisulares son estadios intracelulares de los hospedadores infectados (Dubey y col., 2006). Los taquizoítos de *N. caninum* tienen forma de semiluna, de aproximadamente 6 x 2 μm y carecen de gránulos de amilopectina (Dubey y col., 2006). Pueden estar en distintos tipos celulares y cada célula hospedadora puede contener varios taquizoítos, alojados dentro de la vacuola parasitófora en el citoplasma. Cada taquizoíto puede tener de 6-16 roptrias con contenido electrodenso, algunas de las que se extienden posteriormente al núcleo (Dubey y col., 2002). Los taquizoítos se caracterizan por su rápida división asexual intracelular, multiplicándose en la fase aguda de la enfermedad.

Los quistes tisulares son redondos u ovoides, su tamaño varía considerablemente, dependiendo del número de bradizoítos que alojen en su interior (Dubey y col., 2006). En los perros se han registrado quistes tisulares de hasta 107 μm de diámetro con una pared de 4 μm de espesor (Dubey y col., 2002). En bovinos, los quistes tisulares se encuentran en cerebro y en la médula espinal donde raramente exceden los 50 μm de diámetro con una pared < 2,5 μm de espesor (Dubey y col., 1989; 2006). La presencia de quistes tisulares caracteriza la fase crónica de la enfermedad. Los bradizoítos de 8 x 2 μm (Dubey y col., 2002) poseen núcleo terminal y contienen algunos gránulos de amilopectina, a diferencia de los

taquizoítos (Dubey y col., 2006). También suelen encontrarse quistes tisulares en tejido extraneural como en músculo esquelético (Peters y col., 2001).

Los ooquistes son estadios resistentes en el medio ambiente eliminados en estado no esporulado en la materia fecal del HD, donde pueden llegar a esporular en tan sólo 24 hrs (Lindsay y col., 1999). Los ooquistes no esporulados de *N. caninum* tienen forma oval, con 11,7-12,4 μm de longitud x 10,6-12,0 μm de ancho. Una vez esporulados adquieren forma esférica o subsférica con 11,7 μm de longitud x 11,3 μm de ancho, de pared lisa de 0,6-0,8 μm de espesor, sin micrópilo. En su interior se encuentran 2 esporocistos elipsoidales (8,4 x 6,1 μm) con 4 esporozoítos cada uno (6,5 μm x 2 μm) de forma alargada (Lindsay y col., 1999).

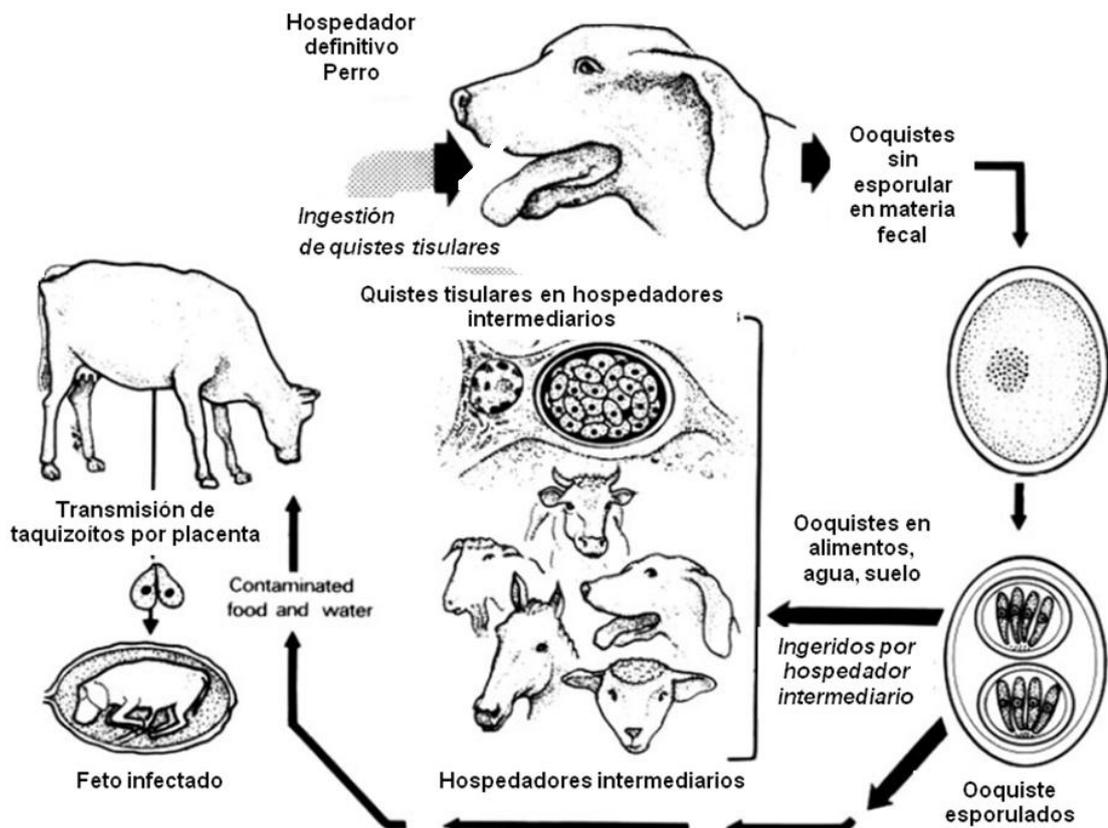


Figura 1: Ciclo de vida de *N. caninum* (adaptado de Dubey y col., 2007)

1.5. Hospedadores intermedios

Varios rumiantes actúan como hospedadores intermediarios (HI) entre ellos, el ganado bovino, caprino, ovino, ciervos y búfalos (Dubey y col., 2007). Cuando el HI ingiere los ooquistes esporulados presentes en pasturas y aguas contaminadas, se suceden los estadios de taquizoítos y la ulterior formación de quistes tisulares observados en el SNC y en el tejido esquelético (Peters y col., 2001; Dubey y col., 2004). Si el HD ingiere tejidos con dichos quistes u ooquistes del medio, se infectará, completando el ciclo.

1.6. Modos de transmisión

Existen dos vías de transmisión de *N. caninum* en los hospedadores: horizontal y vertical. La transmisión horizontal ocurre cuando un animal se infecta ya sea por la ingesta de taquizoítos y/o quistes tisulares o bien por consumir agua o alimentos contaminados con ooquistes esporulados. La transmisión vertical (transplacentaria, congénita) ocurre en la preñez cuando el feto adquiere la infección de su madre y suele ser la vía de transmisión más común y efectiva en el bovino, habiéndose reportado eficiencias de hasta un 95% (Davison y col., 1999; Dubey y col., 2007; Dubey y Schares, 2011). Según el origen de esta infección transplacentaria, se dice que la transmisión es “exógena”, cuando una madre virgen a la enfermedad se infecta al ingerir pasturas o agua contaminadas con ooquistes esporulados de el medio ambiente, y la transmisión es “endógena” cuando el feto se infecta como consecuencia de una posible reactivación de una infección crónica latente de la madre (recrudescencia) (Trees y Williams, 2005). La tasa de transmisión endógena puede disminuir en sucesivas preñeces, indicando cierto grado de inmunidad (Dubey y col., 2007). Si bien en ambos casos, el feto infectado

puede ser abortado, generalmente entre el 3^{er}-4^{to} y 8^{vo} mes de gestación, en la transmisión transplacentaria endógena en la mayoría de los casos nacen terneros sanos pero congénitamente infectados o persistentemente infectados (Paré y col., 1996). La transmisión vertical contribuye significativamente a la persistencia de la neosporosis en los rodeos, permitiendo su propagación en sucesivas generaciones (Dubey y col., 2006). No obstante, la infección con *N. caninum* no puede ser sostenida exclusivamente en los rodeos sin la existencia de la transmisión horizontal (French y col., 1999). En este aspecto existen pocos trabajos concluyentes respecto a la viabilidad de los ooquistes en el medio (Alves Neto y col., 2011).

La vía de transmisión venérea para *N. caninum* es considerada poco probable, Serrano-Martínez y col. (2007) observaron seroconversión en vaquillonas dependiendo exclusivamente de la concentración de taquizoítos inoculados intrauterinamente en infecciones experimentales. Se detectó escasa cantidad de ADN de *N. caninum* en semen de toros utilizados en el servicio natural (Ortega-Mora y col., 2003; Caetano-da-Silva y col., 2004; Ferre y col., 2005), por lo que es poco probable esta vía de transmisión en condiciones de campo. Más aún, vacas inseminadas con semen congelado contaminado con taquizoítos de *N. caninum* no adquirieron la infección (Canada y col., 2006).

1.7. Respuesta inmune en bovinos durante la gestación

En la evolución de los mamíferos, son múltiples los mecanismos inmunológicos desarrollados para evitar el rechazo del feto por la madre durante la gestación. La placenta del bovino es de tipo cotiledonaria con aproximadamente 80 a 120 placentomas. Cada placentoma está compuesto por una carúncula materna y

un cotiledón fetal haciendo que exista una verdadera red vascular de íntimo contacto (vellosidades fetales) que conectan e interdigitan proyectándose desde el endometrio uterino (Dubey y col., 2006). Durante la preñez, la respuesta inmune materna se modifica para generar un microambiente dominado por citoquinas “beneficiosas” como las hemopoyéticas (FSC-1, y FSC-GM), citoquinas reguladoras (TGF- β , IL10) y citoquinas propias del perfil Th2 (IL-4 e IL-5) (Entrican, 2002). Los microorganismos patógenos de vida intracelular, como *N. caninum*, estimulan una respuesta inmune adaptativa de tipo celular en el hospedador, lo que implica la generación de citoquinas que pudieran resultar “perjudiciales” para la preñez como lo son las citoquinas propias del perfil Th1 (IFN γ , IL-2, y TNF- α) (Entrican, 2002). Estas citoquinas son estimuladas por la infección con *N. caninum* con el objeto de contener y eliminar al agente patógeno. No obstante, generan un desequilibrio respecto a las citoquinas del perfil Th2, pudiendo resultar en el aborto del feto (Innes y col., 2002; Quinn y col., 2002). Si bien la respuesta generada por la presencia de *N. caninum* afecta al feto induciendo el aborto, favorece la supervivencia de la madre permitiendo posteriores preñeces (Innes y col., 2005). Se ha comprobado que la infección con *N. caninum* no compromete la fertilidad de la vaca (López-Gatius y col., 2005).

También se ha sugerido que una infección e inflamación placentaria liberarían prostaglandinas que inducen la luteólisis, causando una contracción uterina prematura y la consecuente expulsión del feto (Dubey y col., 2006). Bajos niveles de oxígeno en la gestación tardía pueden llevar a la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) fetal, produciendo una estimulación precoz adrenal y el desencadenamiento de la cascada de mecanismo de inducción al parto. Altas

concentraciones de cortisol fetal pueden inducir la producción de estrógenos y prostaglandina $F2\alpha$ placentarios, resultando en una regresión luteal y una disminución en la secreción placentaria de progesterona. Se especula que alguno de estos mecanismos podrían ser responsable de los abortos tardíos o nacimientos prematuros de terneros infectados con *N. caninum* (Dubey y col., 2006).

1.8. Patogénesis del aborto

La fisiopatología del aborto es parcialmente conocida (Dubey y Schares, 2011). Los abortos suelen ocurrir desde el segundo trimestre hacia el final de la gestación, sin embargo la mayoría de los abortos asociados a *N. caninum* ocurren en el tercio medio a los 5-7 meses de gestación (Mooney y Hemphill, 2014). Tras una parasitemia, *N. caninum* se localiza en el septo caruncular antes de atravesar las vellosidades placentarias del feto (Maley y col., 2003; Macaldowie y col., 2004; Dubey y Schares, 2011). Para que ocurra el aborto, el feto o su placenta deben ser dañados afectando la viabilidad fetal. El daño placentario inducido por el parásito puede hacer peligrar la supervivencia del feto o causar la liberación de prostaglandinas maternas que causen luteólisis y el aborto. El daño fetal puede deberse a la multiplicación de *N. caninum* en el feto, por insuficiencia de oxígeno y nutrientes o bien por daño placentario (Monney y Hemphill, 2014). Como resultado, el sistema inmune materno contribuye a la expulsión fetal por la liberación de citoquinas proinflamatorias maternas a nivel placentario (Dubey y col., 2006; Innes, 2007; Monney y Hemphill, 2014).

La ocurrencia del aborto depende del momento de la gestación en que ocurre la transmisión de la enfermedad al feto. A medida que aumenta la edad gestacional,

también lo hace la probabilidad de transmisión, ya que durante el último tercio de gestación existe un mayor grado de vascularización y permeabilidad de la placenta (Dubey y Schares, 2011). Durante el primer trimestre gestacional, el feto es vulnerable debido a que su sistema inmune aún no está desarrollado y por lo tanto, no es capaz de montar una respuesta inmune capaz de controlar la multiplicación del parásito. No obstante, hacia el tercio medio y final de la gestación, el sistema inmune del feto será capaz de reconocer y responder frente a microorganismos y de este modo desarrollar una respuesta inmune frente a *N. caninum* (Andrianarivo y col., 2001; Almería y col., 2003; Bartley y col., 2004; Innes y col., 2005). La misma puede o no ser suficiente para lograr su supervivencia. En los terneros persistentemente infectados, la transmisión ocurre en el último trimestre de gestación (Innes y col., 2005).

1.9. Patrón de abortos

Los abortos bovinos asociados a *N. caninum* pueden ser epidémicos o endémicos (Moen y col., 1998; Björkman y col., 2003). Los abortos epidémicos ocurren cuando la tormenta de abortos es temporaria y $\geq 10\%$ de las vacas en riesgo (58 a 260 días de gestación al inicio de la tormenta de abortos) abortan dentro de un corto período de tiempo de 4 a 8 semanas (Moen y col., 1998; Wouda y col., 1999; Schares y col., 2002; Dubey y col., 2007; Basso y col., 2010). En cambio, los abortos endémicos ocurren en forma de goteo y persisten durante varios meses o inclusive años.

Los abortos epidémicos se relacionan a una primo-infección de madres vírgenes a la enfermedad, que tras la ingesta de alimento o agua contaminada con

ooquistes de *N. caninum*, transmiten la enfermedad al feto (transmisión transplacentaria exógena) (McAllister y col., 2000; Williams y col., 2009). Los ooquistes se liberan en el intestino delgado donde los esporozoítos atraviesan el epitelio intestinal, pasando al estado de taquizoítos y luego se multiplican, posiblemente en los linfonódulos mesentéricos. Desde allí, llegan a la circulación donde la parasitemia resultante lleva a la diseminación de *N. caninum* a todo el organismo inclusive al útero (Dubey y col., 2006). Dado que las vacas preñadas quedan expuestas a una fuente común de contaminación con ooquistes, la transmisión transplacentaria exógena y los abortos resultantes ocurren en un corto período de tiempo (Dubey y col., 2007). En rodeos con abortos epidémicos, la respuesta inmune en las vacas abortadas se caracteriza por la presencia de anticuerpos IgG de baja avidéz, lo que sugeriría una infección reciente (McAllister y col., 2000; Schares y col., 2002; Dubey y col., 2007).

Los abortos endémicos se relacionan con la transmisión transplacentaria endógena, por reactivación de una infección crónica latente en una madre (Dubey y col., 2007; Williams y col., 2009). Este fenómeno de recrudescencia ocurriría debido a los cambios inmunológicos registrados durante la preñez. En la mitad del período gestacional se modifica la inmunidad, habiéndose detectado *in vitro*, una menor regulación de la respuesta celular con menor proliferación celular en respuesta a un antígeno específico de *N. caninum* y menor producción de IFN γ (Innes y col., 2001). Estos hallazgos permiten especular que la preñez llevaría a una reactivación de quistes tisulares de *N. caninum* con liberación de los bradizoítos (Dubey y col., 2006).

1.10. Diagnóstico del aborto y la enfermedad

La información diagnóstica respecto al rol de *N. caninum* en el aborto se puede evaluar a nivel de rodeo o individual, por medio del análisis de fetos abortados y con el uso de pruebas serológicas capaces de detectar anticuerpos en las madres y su progenie. Para obtener información respecto a la causa de abortos en rodeos, es necesario recurrir a una batería de técnicas diagnósticas, ya que en la mayoría de los casos la aplicación individual de una prueba no aporta suficiente información concluyente. Se pueden examinar histológicamente el tejido fetal (cerebro, pulmón, corazón e hígado y músculos esqueléticos) y la placenta en búsqueda de lesiones microscópicas características de la enfermedad. También es posible detectar al parásito de modo directo con la IHQ o las técnicas de biología molecular como la PCR, que detecta ADN parasitario. No obstante, la IHQ tiene una sensibilidad limitada, por lo que la PCR puede ser una opción más directa para la detección del parásito. Se pueden utilizar técnicas de cultivo celular e infección experimental de animales de laboratorio para aislar *N. caninum* a partir de fetos abortados. Posteriormente es posible multiplicar y caracterizar dichos aislamientos. Sin embargo, la obtención de aislamientos de *N. caninum* es difícil y poco exitosa, motivo por el cual el número de aislamientos a nivel mundial es limitado (Dubey y Schares, 2006). Si bien el aislamiento indica la infección por *N. caninum* aunque no sea la causa del aborto, no se realiza de modo rutinario.

Para la detección de anticuerpos específicos en fluidos fetales pueden utilizarse técnicas serológicas, como la IFI y/o el *immunoblot* (IB). Esta posibilidad dependerá de la edad del feto y la madurez de su sistema inmune. Así los fetos con mayor tiempo de gestación tendrán mayor probabilidad de generar anticuerpos y dar

resultados seropositivos por estas pruebas. No obstante, una serología fetal negativa no necesariamente indica ausencia de infección (Dubey y Schares, 2006).

A nivel de rodeo, la infección puede ser diagnosticada mediante la detección de anticuerpos específicos a *N. caninum* en suero o leche. Si bien la detección mediante PCR en sangre y semen ha sido utilizada, no es confiable como técnica de rutina, pues depende de la concentración de taquizoítos que se hallen en dichos fluidos, lo que dependerá del estado de parasitemia. En cuanto a la aplicación de pruebas de Enzimoimmunoensayo (ELISA) de avidéz, la detección de anticuerpos de baja avidéz podrían ser indicativos de una infección reciente asociada a abortos epidémicos, mientras que la detección anticuerpos de alta avidéz suelen hallarse en animales que han contraído la infección previamente y se encuentran en un estadio crónico (Schaes y col., 2002). Tras una infección primaria, la respuesta de anticuerpos específicos se caracteriza por una baja avidéz inicial que va aumentando a medida que progresa la infección en el tiempo. De este modo, la medición de la avidéz de la respuesta de anticuerpos provee información sobre el momento en que ocurrió la infección primaria.

Si se desea analizar el estado de un rodeo y la principal vía de transmisión es importante considerar el estado serológico en tándem de la madre y la cría y el rol de la transmisión transplacentaria endógena y exógena (Paré y col., 1996; Schares y col., 1999). Para ello, se debe extraer sangre de los terneros antes que ingieran calostro para evitar que los anticuerpos maternos interfieran en el diagnóstico, generando resultados falsos positivos.

1.11. Diagnóstico serológico

Las pruebas serológicas pueden realizarse en animales vivos y proveen información indirecta sobre el estado de la infección. La capacidad de una prueba para distinguir entre individuos infectados y no infectados se basa en su sensibilidad y especificidad diagnóstica. La sensibilidad, desde el punto de vista epidemiológico, se define como la proporción de individuos infectados correctamente identificados, es decir la capacidad de una prueba para detectar verdaderos positivos. La especificidad es la capacidad de detectar animales verdaderamente negativos, es decir animales no infectados. En la medida que aumenta la sensibilidad lo hace en detrimento de la especificidad. Ambas variables pueden manejarse por medio de la elección de diferentes puntos de corte ya que según su aplicación una mayor especificidad o sensibilidad serán necesarias (Álvarez García y col., 2003; Dubey y Schares, 2006).

Una nueva prueba diagnóstica debe ser estandarizada según un método de referencia establecido, conocido como “*gold standard*”. En muchos casos el “*gold standard*” está representado por la detección del microorganismo, lo que implica el aislamiento del mismo. Esta posibilidad no es común para algunos parásitos, como es el caso de *N. caninum*, por lo que se puede hacer referencia a otras pruebas serológicas, denominadas “Estándar Relativo de Comparación” (ERC) (Anon, 2008; OIE, 2014). Para *N. caninum*, la IFI es considerada como una prueba de referencia y frecuentemente la más utilizada para el diagnóstico y estandarización de nuevas pruebas serológicas (Dubey y Schares, 2006).

Para la detección de anticuerpos anti-*N. caninum* se pueden utilizar las siguientes pruebas diagnósticas:

- **IFI:** es la primer prueba serológica que fue utilizada para la detección de anticuerpos para *N. caninum* (Dubey y col., 1988a). Se basa en la interacción del antígeno (taquizoítos completos de *N. caninum*) colocado en cada área marcada de un portaobjeto *ad hoc* al cual se le agrega el suero problema diluido. La reacción antígeno-anticuerpo se visualiza con el uso de un conjugado anti-inmunoglobulina y anti-especie específico marcado con fluoresceína y la lectura se realiza en un microscopio de fluorescencia. Para la técnica se requiere de un personal entrenado y experimentado y la lectura guarda cierto grado de subjetividad debido a que es interpretada por el operador. El punto de corte utilizado para IFI depende de una variedad de factores, que se relacionan con el objetivo del estudio a realizar. Usualmente los puntos de corte varían entre laboratorios, pero suelen utilizarse 1:50 para perros, y entre 1:100-1:640 para bovinos adultos y 1:25 para fetos y terneras de reposición (Björkman y Uggla, 1999; Dubey y Schares, 2006).

- **Aglutinación directa:** el fundamento de la prueba radica en que taquizoítos intactos tratados con formalina aglutinan frente a la presencia de anticuerpos específicos en el suero problema. La prueba modificada detecta únicamente anticuerpos de isotipo IgG debido a que tanto IgM se destruyen con la adición del agente reductor mercaptoetanol. Se requiere de grandes cantidades de taquizoítos para que la reacción sea visible al ojo desnudo en el fondo de los pocillos de una policubeta. Debido a su sencillez y versatilidad, la prueba de aglutinación directa tiene el potencial de ser utilizada para el diagnóstico de distintas especies ya que no requiere del uso de un conjugado anti-especie, lo que tendría una gran aplicación para el diagnóstico en especies silvestres (Björkman y Uggla, 1999; Dubey y Schares, 2006).

- **ELISA indirecto:** el fundamento de esta prueba radica en demostrar la presencia de anticuerpos dirigidos hacia un agente infeccioso en particular. El antígeno conocido, ya sea completo o tratado, de manera de exponer antígenos de superficie y/o citoplasmáticos, es usado para cubrir los pocillos de una policubeta y aquellos antígenos de naturaleza proteica se unen con firmeza a este material por adsorción. Schares y col. (2000) desarrollaron una prueba de ELISA *in-house* indirecta con el antígeno nativo NcSRS2 exclusivo del estadio de taquizoítos de 38 kDa denominado p38. El suero problema diluido se incuba, se lava y para detectar la presencia de anticuerpos se utiliza al igual que en IFI, un conjugado compuesto por una anti-inmunoglobulina anti-especie específica, pero en este caso está ligada químicamente a una enzima. Este complejo unido al anticuerpo del suero problema, actúa sobre un sustrato en presencia de un cromógeno. Por eso el producto de la reacción, dada por la presencia de anticuerpos, se evidenciará por un cambio de color. Se utiliza un espectrofotómetro para medir las densidades ópticas (DO) de la reacción de color. La ventaja del ELISA sobre la IFI radica en que el registro de la reacción se realiza de un modo objetivo por medio de un espectrofotómetro y la prueba puede ser automatizada. Además es una prueba adecuada para analizar un gran número de muestras (Björkman y Uggla, 1999; Dubey y Schares, 2006).

- **ELISA de competición:** es una prueba de ELISA indirecta en la cual se usan anticuerpos monoclonales los cuales compiten con los anticuerpos presentes en el suero problema por un determinado epítipo del antígeno. Si el suero problema posee anticuerpos dirigidos hacia el mismo epítipo que los anticuerpos monoclonales la DO será menor en pocillos que contengan una mezcla de anticuerpos monoclonales. Por el contrario si en el suero problema no se detectan

anticuerpos, los anticuerpos monoclonales se unirán a los epitopes y por lo tanto darán una reacción de color. El resultado suele ser presentado como porcentaje de inhibición por el suero problema. Una ventaja de esta variante de ELISA consiste en que estima el nivel de anticuerpos para un epítipo particular, siendo más específico que el ELISA convencional. Además, requiere únicamente del anticuerpo monoclonal anti-ratón (usualmente los anticuerpos monoclonales se producen en ratones) y no de un conjugado específico, lo que hace que esta prueba sea muy versátil para su utilización en diferentes especies (Björkman y Uggla, 1999; Dubey y Schares, 2006).

Immunoblot: se basa en la interacción del antígeno que se ha separado por su peso relativo en una electroforesis y que ha sido inmunotransferido a una membrana de nitrocelulosa o PVDF. Esta membrana se enfrenta a un suero problema diluido y la reacción antígeno-anticuerpo se visualiza con el uso de un conjugado anti-inmunoglobulina y anti-especie específico marcado con enzima. Para la lectura se analiza la detección de inmunoreacción hacia antígenos inmunodominantes (IDAs), por ejemplo el antígeno de 38 kDa. Debido a que el IB es una prueba laboriosa, es utilizada como confirmatoria ya que posee una alta sensibilidad y especificidad.

2. OBJETIVOS

Objetivos generales

- Desarrollar un método serológico de diagnóstico eficaz para la identificación de animales infectados con *N. caninum* evaluando su aplicación en la diferenciación con animales vacunados.

Objetivos específicos

- Desarrollar una prueba de ELISA utilizando la proteína nativa p38 de *N. caninum* para evaluar sueros bovinos obtenidos en Argentina.
- Analizar el desempeño de la prueba de ELISA-p38 para identificar y diferenciar ratones inmunizados con una vacuna oleosa de *N. caninum* elaborada con lisado de proteínas completo y otra sin p38.
- Evaluar la protección conferida por esas vacunas frente al desafío con una cepa de alta virulencia en el modelo murino.

3. HIPÓTESIS MÁS RELEVANTES

- Los anticuerpos de sueros de animales infectados natural y experimentalmente con *N. caninum* son capaces de unirse a la proteína p38
- La ausencia de p38 en un preparado vacunal permite diferenciar animales infectados de animales vacunados.

CAPÍTULO II: EVALUACIÓN DE UNA PRUEBA DE ELISA INDIRECTA CON EL ANTÍGENO NCSRS2 (P38) DE *NEOSPORA CANINUM* PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA NEOSPOROSIS BOVINA EN ARGENTINA

1. INTRODUCCIÓN

Debido al impacto económico y pérdidas reproductivas que la neosporosis ocasiona en la industria ganadera de nuestro país (Campero y col., 2003a; Moore y col., 2013) y en el mundo, resulta de importancia el estudio de técnicas de diagnóstico de la enfermedad. Para confirmar que un aborto fue causado por *N. caninum* es importante demostrar la presencia del agente causal y realizar los diagnósticos diferenciales con otros agentes infecciosos abortigénicos del bovino (*i.e.* brucelosis, leptospirosis, campylobacteriosis, diarrea viral bovina, tricomonosis, etc.) (Campero y col., 2003b; Dubey y col., 2006; Campero, 2014). Existen múltiples técnicas para el diagnóstico, algunas basadas en la demostración directa del protozoo como la IHQ, técnicas de biología molecular (PCR) y el aislamiento *in vivo* o *in vitro*. Los métodos indirectos se fundamentan en la detección de anticuerpos, siendo la técnica de mayor difusión y frecuentemente utilizada como prueba de referencia la IFI, a pesar de la subjetividad parcial en la lectura de los resultados y del tiempo que insume la técnica. En un trabajo realizado por Wilkowsky y col. (2011) se desarrolló y evaluó una prueba denominada APIA (applied printing immunoassay) basada en la reacción de los sueros hacia la proteína recombinante Nc-SAG1, considerándola como una herramienta diagnóstica rápida y de screening, sin embargo tuvo una baja sensibilidad (85%) no permitiendo la cuantificación de los niveles de anticuerpos en las muestras problema. También se han desarrollado

numerosas pruebas de ELISA ya sea en forma experimental y/o comerciales para la detección de anticuerpos específicos, cuya sensibilidad es adecuada y la especificidad elevada (Dubey y Schares, 2006; 2011). Las ventajas de aplicar dicha técnica radican en su sencillez, rapidez de realización y fácil interpretación de los resultados. Si bien se han utilizado ELISAs *in house* en estudios epidemiológicos regionales (Echaide y col., 1998; 2002), no hay datos publicados de validación de pruebas de ELISA elaboradas y desarrolladas en la Argentina. La utilización de pruebas de ELISA para el diagnóstico de la neosporosis en nuestro país sería muy práctico, pero no se ha difundido ya que las pruebas de ELISA comerciales existentes son importadas, implicando un elevado costo y grandes tiempos de espera de importación. Por otra parte, el uso de pruebas diagnósticas *in-house* (caseras) no estandarizadas pueden ocasionar confusiones en la interpretación de resultados y dificultar el diagnóstico serológico y la posibilidad de realizar comparaciones confiables de resultados entre laboratorios diagnósticos. Por lo expuesto, es fundamental contar con adecuadas herramientas diagnósticas estandarizadas localmente para mejorar el control de la enfermedad, dada la ausencia de tratamientos medicamentosos y vacunas que eviten la infección.

El desarrollo de reactivos confiables para la identificación de *N. caninum* y el diagnóstico depende de la caracterización de antígenos específicos. Las proteínas de superficie de parásitos intracelulares obligados desempeñan un rol crítico en la infección ya que reconocen receptores en la superficie de la célula hospedadora (Hemphill y col., 1999) y representan el punto inicial de contacto con los componentes del sistema inmune del hospedador.

Se han realizado numerosos estudios con el propósito de identificar y caracterizar proteínas presentes en los distintos estadios de *N. caninum* que participan en las interacciones entre el parásito y la célula hospedadora. Se identificó el antígeno de superficie exclusivo del estadio de taquizoítos de *N. caninum* de un peso molecular relativo de 38 kDa, denominado NcSRS2, debido al grado de similitud con el antígeno de superficie de *T. gondii* perteneciente a la familia de antígenos SAG1 relacionado a la secuencia 2 (SRS2) (Hemphill y col., 1999; Schares y col., 2000). En la literatura científica se utiliza el término de antígeno p38 de *N. caninum* para referirse al antígeno NcSRS2. El mismo, fue utilizado como herramienta en el análisis y diagnóstico de la neosporosis bovina y también se ha evaluado su uso en otras especies animales.

Schares y col. (2000) desarrollaron una prueba de ELISA *in-house* indirecta con el antígeno nativo p38 (ELISA-p38) para discriminar abortos bovinos asociados a *N. caninum*. Dicha prueba se fundamenta en una mayor detección de niveles de anticuerpos anti-p38 en vacas abortadas respecto a vacas seropositivas no abortadas. Se definieron puntos de corte variados según el patrón de abortos analizado, detectándose mayores índices de anticuerpos anti-p38 en sueros provenientes de animales de rodeos con abortos endémicos respecto a los pertenecientes a animales de rodeos con abortos epidémicos. Asimismo, y de modo complementario, se modificó esta prueba de ELISA-p38 con la adición de un tratamiento con urea (8 M) con el fin de analizar la avidéz (ELISA-p38 de avidéz) (Schares y col., 2002); y de discriminar abortos epidémicos de endémicos. En la respuesta inmune, la avidéz aumenta a medida que se extiende el intervalo entre la infección y el momento de realizar el examen serológico, registrándose anticuerpos

de menor avidéz en infecciones recientes (asociadas con abortos epidémicos) a diferencia de los anticuerpos de mayor avidéz hallados en muestras de vacas con abortos endémicos (Schaes y col., 2002).

La prueba de ELISA-p38 fue evaluada también para la detección anticuerpos anti-*N. caninum* en bovinos a partir de muestras de leche (Schaes y col., 2005). La capacidad diagnóstica de la prueba fue óptima y se obtuvo una concordancia muy buena ($k= 0,85$) al comparar los resultados con los obtenidos por la prueba con respecto a los sueros de las mismas vacas analizadas.

La capacidad diagnóstica de pruebas de ELISA basadas en el antígeno p38 de *N. caninum* se analizó en otras especies animales, como en el diseño de pruebas de ELISA para el diagnóstico de la neosporosis en perros, ovinos y camélidos sudamericanos (Wolf y col., 2005; Andreotti y col., 2009; Hosseininejad y col., 2010).

Por lo tanto, el antígeno p38 de *N. caninum* ha sido utilizado y evaluado en múltiples pruebas de ELISA con diversos objetivos y especies animales. Si bien se han obtenido resultados de valores diagnósticos adecuados, es necesario estandarizar localmente una prueba diagnóstica al modificar las condiciones y los objetivos de la misma (OIE, 2014).

El objetivo de este capítulo fue evaluar una prueba de ELISA utilizando la proteína nativa de 38 kDa de taquizoítos de *N. caninum* para el diagnóstico de la enfermedad a partir de un panel de sueros bovinos proveniente de animales naturalmente expuestos y experimentalmente infectados, previamente analizados por las pruebas serológicas de IFI e IB. Los resultados serológicos de dichas pruebas conformaron el “Estándar Relativo de Comparación” (OIE, 2014) que se utilizó para la estandarizar la prueba de ELISA-p38 en nuestro medio para la

identificación de bovinos infectados. Adicionalmente, se comparó la *performance* diagnóstica y concordancia de las 3 pruebas serológicas: IFI, IB y ELISA-p38 a partir del mismo panel de sueros.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Sueros bovinos

Se utilizaron 372 sueros bovinos: 36 sueros provenientes de animales infectados experimentalmente (muestreados en diferentes momentos) y 336 sueros de bovinos naturalmente expuestos a *N. caninum*. Los sueros experimentales (gentilmente cedidos por la Dra. Hecker, INTA Balcarce) derivaron de 3 vaquillonas inoculadas por vía intravenosa con taquizoítos del aislamiento NC-6 Argentina (Basso y col., 2001) de *N. caninum* (controles positivos) y de 3 vaquillonas inoculadas por vía subcutánea con PBS (controles negativos) (Hecker y col., 2013). Las 6 vaquillonas fueron sangradas a las 0, 2^a, 3^a, 5^a, 9^a, 13^a semanas post-infección (spi). Los 336 sueros de bovinos naturalmente expuestos a *N. caninum* varían en su origen y explotación (gentilmente cedidos por los Dres. Moré G, Moore D y Campero CM, Lab. de Inmunoparasitología, FCV, UNLP e INTA, Balcarce). De los sueros provenientes de explotaciones lecheras: 218 pertenecían a bovinos de rodeos ubicados en la provincia de Santa Fe y 74 a bovinos de un rodeo de la provincia de Buenos Aires (37 pares de sueros de terneros precalostrales-madre) (Moré y col., 2009). También se incluyeron 44 sueros de un rodeo para carne de la provincia de Buenos Aires.

2.2. Formación del estándar relativo de comparación (ERC)

Se evaluó la prueba de ELISA-p38 en ausencia de un *gold standard* para *N. caninum* utilizando un “Estándar Relativo de Comparación” (ERC) (Anon, 2008). El ERC se conformó a partir de sueros bovinos que resultaron positivos o negativos a las dos pruebas serológicas de IFI e IB. Los sueros que resultaron positivos a una prueba y negativos a otra (resultados discordantes entre las 2 pruebas) fueron descartados y no se incluyeron en el ERC (Álvarez-García y col., 2013).

2.2.1. Prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Se utilizaron taquizoítos de *N. caninum* del aislamiento NC-1 fijados a portaobjetos de 15 áreas (MP Biomedicals, Santa Ana, EE.UU) como antígeno, obtenidos de cultivo en células Vero (ver Anexos 2-5). Las muestras de sueros se diluyeron en PBS en base dos a partir de una dilución de 1:25 hasta título final. Se incluyeron sueros controles positivos y negativos provenientes de infecciones experimentales cedidos por los Drs. Schares G y Campero CM. Se colocaron 15 μ l de cada dilución del suero por área del portaobjeto los cuales se incubaron durante 30 min a 37°C en cámara húmeda. Luego se realizó un lavado en agitación de 10 min en una solución buffer de carbonatos. Posteriormente se colocaron 15 μ l de conjugado anti-IgG de bovino marcado con fluoresceína (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU) diluido 1:100 en PBS en cada área del portaobjeto. Se incubaron las muestras durante 30 min a 37°C en cámara húmeda y luego se realizó un lavado en agitación de 10 min en una solución buffer de carbonatos. Finalmente, se colocó la solución de montaje (ver Anexo 6) y los portaobjetos se observaron con el microscopio de fluorescencia (Leica, Wetzlar, Alemania). Se consideró como criterio de positividad a sueros con título \geq 1:25 con presencia de fluorescencia periférica

completa en los taquizoítos (Paré y col., 1995; Moré y col., 2008; Schares y col., 2000).

2.2.2. Prueba de Immunoblot (IB)

Se utilizaron como antígeno membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) con taquizoítos de *N. caninum* del aislamiento NC-1 (ver Anexos 2 y 3) obtenidas mediante corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida al 12,5% con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) en condiciones no reducidas e inmunotransferidas (ver Anexos 6-8), conservándose las membranas a -20°C hasta su uso. Al momento de su utilización las membranas se cortaron en tiras de 2-3 mm de ancho por muestra a analizar. Se incubaron en solución de bloqueo (ver Anexo 8) durante 30 min en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se descartó la solución de bloqueo utilizada y se agregó la muestra de suero diluida 1:100 en solución de bloqueo, incubándose por 60 min a temperatura ambiente. Se incluyeron sueros controles positivos y negativos provenientes de infecciones experimentales como se mencionó en 2.2.1. Se realizaron 5 lavados de 2 min cada uno con la solución de lavado y se incubaron durante 60 min con el conjugado anti-IgG bovina unida a peroxidasa (Jackson Immunoresearch Lab. Inc., PA, EE.UU) diluido 1:1000 en PBS. Se realizaron 3 lavados de 2 min con solución de lavado y 2 lavados de 2 min con PBS. Posteriormente se incubó con el sustrato durante 20 min y se detuvo la reacción con agua destilada. Tanto las incubaciones como los lavados se realizaron en agitación y a temperatura ambiente. Las tiras de membrana se dejaron secar sobre papel filtro para observar la reacción hacia los antígenos inmunodominantes (IDAs) de pesos moleculares relativos de 19, 29, 30, 33 y 37

kDa. Se consideró una muestra como positiva cuando se detectó reacción a dos o más IDAs (Schaes y col., 1999; 2000; Staubli y col., 2006).

2.3. Purificación de la proteína NcSRS2 de *N. caninum* mediante cromatografía de afinidad

La purificación de la proteína de superficie NcSRS2 (p38) de taquizoítos de *N. caninum* se realizó mediante cromatografía de afinidad. El proceso de purificación se basó en la unión específica de la proteína p38 con el anticuerpo monoclonal 4.15.15 (IgG2a) producido en ratones acoplado a una columna de Sefarosa 4B (Pharmacia Biotech, Upssala, Suecia) (Fig. 1) gentilmente cedida por el Dr. Gereon Schaes (FLI, Alemania). Dicho anticuerpo monoclonal reconoce a un epítopo del antígeno p38 presente en los taquizoítos de *N. caninum*. Para que la purificación resulte exitosa fue necesario utilizar pellets de *N. caninum* de aproximadamente 2×10^9 taquizoítos totales para una circulación en la columna de sefarosa. Se utilizaron pellets obtenidos de cultivo celular del aislamiento NC-1 (Dubey y col., 1988b) (ver Anexo 3). Para ello, se cultivaron 5 botellas de 75 cm² y 3 botellas de 25 cm² infectadas con taquizoítos de la cepa NC-1 que fueron cosechadas al 80% de células infectadas. Posteriormente se recolectaron los cultivos de las botellas mediante raspados en un tubo de 50 ml, se pasó el contenido por filtros de PVDF de 5 µm (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) para eliminar los restos celulares que pudieran existir. Luego se realizó el recuento de los taquizoítos con la cámara de Neubauer y se centrifugó a 1000 g por 10 min descartando el sobrenadante. Se congeló el pellet de taquizoítos a -20 °C hasta su posterior uso.

Previo a la purificación por cromatografía de afinidad, se resuspendió el pellet de taquizoítos en 10 ml de PBS- 0,5% Tritón X-100 y se sonicó 90 seg a 50% de ciclos activos (Omni International, Kennesaw, EE.UU) realizando dicha actividad en hielo para no alterar la conformación de la proteína por el calor generado en el proceso de sonicación. Se tomó una gota del sonicado entre portaobjeto y cubreobjeto al microscopio óptico a 400x para corroborar la destrucción total de los taquizoítos. Se centrifugó a 13000 g por 30 min a 4°C. Se aplicó el sobrenadante resultante con las proteínas solubles a la columna de sefarosa, previamente equilibrada con PBS- 0,1% Tritón X-100. Se dejó recircular el sobrenadante durante 60 min y se realizaron 3 lavados con 10 ml de PBS y otros 3 lavados con 10 ml de PBS- 0,1% Tritón. Se aplicó una solución de glicina 0,1 M (pH 2,6) para la elución, a modo de romper la unión específica entre la proteína p38 y el anticuerpo monoclonal. Se recolectaron las eluciones en viales de 0,5 ml conteniendo una solución de Tris 1 M y PBS 10X para neutralizar el pH (Fig. 1). Luego se congelaron los viales con la proteína p38 a -20°C hasta su posterior uso.

2.4. Análisis de la pureza de proteína NcSRS2 de *N. caninum*

La pureza de la proteína p38 se comprobó mediante la corrida electroforética de las eluciones obtenidas en la cromatografía de afinidad en geles de poliacrilamida al 12,5% en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Se realizó la inmunotransferencia a membranas de PVDF las cuales se tiñeron con Tinción de Tinta China (ver Anexo 6). Se seleccionaron las eluciones donde se detectó la presencia de la proteína p38 sin ningún otro resto proteico para ser utilizadas en la prueba de ELISA-p38.

2.5. Prueba de ELISA-p38 para el diagnóstico de la neosporosis bovina

Se diluyó la proteína p38 en un buffer de bicarbonato de sodio 0,1 M (pH 8,3) y se sensibilizó la placa de ELISA (concentración: 1,5 ng/pocillo) (Polysorp-Immunon-Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU) con 120 µl/pocillo durante 60 min a 37°C. Se realizaron 3 lavados de 300 µl/pocillo con la solución de lavado (ver Anexo 9). Las placas se incubaron con 100 µl/pocillo de solución de bloqueo (ver Anexo 9) durante 30 min a 37 °C. Posteriormente se vaciaron los pocillos y se les agregó 100 µl/pocillo de cada muestra de suero bovino por duplicado diluida 1:200 en la solución de bloqueo y se incubaron las placas por 30 min a 37°C. Se incluyeron sueros bovinos controles positivos y negativos dejando un par de pocillos vacíos (blanco) por placa. El suero control positivo utilizado provino de una vaquillona infectada y el suero control negativo de una vaca pre-infección (cedidos gentilmente por el Dr. Schares FLI, Alemania) (Scharés y col., 2000). Las placas se lavaron 3 veces con solución de lavado y luego se agregaron 100 µl/pocillo del conjugado anticuerpo monoclonal biotinilado anti-IgG bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU) (ver Anexo 9) diluido 1:2000, incubándose luego durante 30 min a 37°C. Luego se realizaron 3 lavados y se le agregaron 100 µl/pocillo del conjugado extravidin-peroxidasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU) (ver Anexo 9) diluido 1:4000, y se incubaron durante 30 min a 37°C. Posteriormente las placas se lavaron 3 veces con solución de lavado y se realizaron 2 lavados extra con agua destilada para eliminar restos de detergentes. Se agregó 100 µl/pocillo del sustrato (100 µg/ml 3,3',5,5'-tetrametilbencidina- 0,004% de peróxido de hidrógeno en una solución de 0,2 M de acetato de sodio y 0,2 M de ácido cítrico) (ver Anexo 9) durante 15 min a 37°C. Finalmente se detuvo la reacción con 50µl/pocillo de ácido sulfúrico (ver Anexo

9). Los valores de densidad óptica (DO) se leyeron en un lector de ELISA (Thermo, Labsystems MS Multiskan, Waltham, EE.UU) a 492 nm y con un filtro de referencia de 620 nm.

Para descartar las variaciones diarias del análisis, los resultados se expresaron como índices de ELISA. El valor del índice de cada muestra se realizó según el cálculo de cada una de las densidades ópticas obtenidas del duplicado de cada muestra: $VM_n = (DO_n - N) / (P - N)$. Donde: VM_n es el valor de la muestra para la densidad óptica n ; DO_n es el valor de DO de un duplicado de la muestra; N es el promedio de DO del control negativo; P es el promedio de DO del control positivo. Luego se calculó el promedio de las dos VM_n obtenidas para cada muestra, resultando en el valor del índice final de la muestra (Schaes y col., 2000).

2.6. Análisis de datos

Los sueros positivos o negativos a las pruebas de IFI e IB fueron considerados como ERC para la evaluación de la prueba de ELISA-p38 (Anon, 2008). Se calculó el punto de corte óptimo donde los valores de sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) relativa sean mayores utilizando un intervalo de confianza del 95%. También se realizó analizó la curva de características de tipo receptor-operador (ROC) para la prueba de ELISA-p38 utilizando el software Medcalc (versión 13.0). Según una guía arbitraria para el análisis ROC, el área bajo la curva (AUC) fue evaluada como: no informativa (AUC= 0,5), poco precisa ($>0,5$ AUC $\leq 0,7$), moderadamente precisa ($>0,7$ AUC $\leq 0,9$), altamente precisa ($>0,9$ AUC ≤ 1) y perfecta (AUC= 1) (Swets, 1988).

Se evaluó la concordancia entre las pruebas serológicas: IFI- IB y ERC-ELISA p-38 mediante el estadístico kappa (k) con el uso del software Epidat (versión 3.1 Organización Panamericana de la Salud y Xunta de Galicia, Consellería de Sanidade). La concordancia se analizó como: pobre ($k= 0$), leve ($k= 0-0,20$), aceptable ($k= 0,21-0,40$), moderada ($k= 0,41-0,60$); considerable ($k= 0,61-0,80$); casi perfecta ($k > 0,81$) (Conraths y Schares, 2006).

Se evaluó el coeficiente de correlación intraclase (Epidat 4.1, Organización Panamericana de la Salud y Xunta de Galicia, Consellería de Sanidade) como una medida de reproducibilidad de la prueba de ELISA-p38 considerando: pobre ($CCI < 0,4$), aceptable ($CCI = 0,4-0,74$) y excelente ($CCI \geq 0,75$) (Fleiss, 1986).

Se analizó con el método gráfico de Bland–Altman la media entre DO de los duplicados frente a la diferencia absoluta entre los 2 valores, y los límites de concordancia a una distancia superior e inferior de 1,96 desvío estándar (Bland y Altman, 1999).

Debido a la ausencia de una prueba “*gold standard*” para la neosporosis bovina, la comparación de la *performance* diagnóstica de las 3 pruebas serológicas se analizó en relación al criterio *gold standard* de la “Mayoría de las pruebas” (Von Blumröder y col., 2004; Álvarez-García y col., 2013).

3. RESULTADOS

3.1. Purificación de la proteína p38

Se logró purificar la proteína p38 de *N. caninum*, confirmada mediante la tinción con Tinta China de las eluciones corridas en SDS-PAGE e inmunotransferidas (Fig. 2).

3.2. Evaluación de la prueba de ELISA-p38: concordancia entre las pruebas de referencia

Se detectaron anticuerpos anti-*N. caninum* en 31% (104/336), 28% (95/336), y 27% (93/336) de los sueros de los bovinos naturalmente expuestos por las pruebas de IFI, IB y ELISA-p38, respectivamente. El ERC se conformó por 94 sueros que resultaron positivos y 231 sueros que resultaron negativos a ambas pruebas de IFI e IB ($n= 325$) (Tabla 1). La concordancia entre las pruebas de IFI e IB fue casi perfecta ($k= 0,92$). De los 325 sueros bovinos que conformaron el ERC, 92 sueros de los 94 positivos del ERC resultaron positivos por la prueba de ELISA-p38 y 230 de 231 sueros negativos del ERC resultaron negativos por la prueba de ELISA-p38 (Tabla 2). La concordancia entre el ERC y la prueba de ELISA-p38 fue casi perfecta ($k= 0,97$).

3.3. Comparación entre pruebas serológicas según el criterio de la “Mayoría de las pruebas”

Los valores de Se y Sp para las pruebas calculados en relación al criterio basado en la decisión de la “Mayoría de las pruebas” fueron elevados (>95%). El acuerdo de cada prueba con respecto dicho criterio fue casi perfecto (Tabla 3).

3.4. Sensibilidad y especificidad relativa para la prueba de ELISA-p38

Los valores de Se y Sp relativas para la prueba de ELISA-p38 sobre los 325 sueros concordantes por IFI e IB fueron de 97,8% y 99,5%, respectivamente, utilizando un punto de corte de 0,0905 (índice) (Fig. 3). El área bajo la curva fue altamente precisa con un valor AUC= 0,982 en relación al ERC (Fig. 4).

El CCI fue de 0,9755 ($IC_{95\%} = 0,9701-0,97981$), considerándose un valor de reproducibilidad excelente.

En la figura 5 se utiliza el método gráfico de Bland y Altman para graficar la diferencia entre los valores de DO de cada duplicado versus la media de las DO.

3.5. Análisis de los sueros bovinos experimentales

Se detectó seroconversión en las muestras de las vaquillonas inoculadas experimentalmente en la 2^a spi con un título de IFI promedio de 1:400. El título de IFI se incrementó hacia la 3^a spi y se mantuvo hasta la 9^a spi y luego descendió en la 13^a spi (Fig. 6). La prueba de IB evidenció reacciones positivas en los sueros de las vaquillonas experimentalmente infectadas en la 2^a, 3^a, 5^a, 9^a y 13^a spi. La prueba de ELISA-p38 detectó los valores de índices más altos en la 3^a spi; sin embargo en la 2^a spi los valores de índice detectados fueron por debajo del punto de corte de la prueba (Fig. 6).

Los sueros de las vaquillonas inoculadas con PBS resultaron negativas en todos los tiempos de muestreo por las pruebas de IFI, IB y ELISA-p38.

3.6. Patrón de detección de antígenos inmunodominantes de *N. caninum* detectados por IB

El antígeno de 37 kDa y el de 29 kDa fueron detectados en el 100% y 98% de los animales seropositivos naturalmente expuestos, respectivamente. Los IDAs de 30 y 33 kDa fueron reconocidos con mayor frecuencia e intensidad en las muestras con títulos de IFI ≥ 400 en el 78% y 68% de los animales seropositivos, respectivamente. Se detectó reacción con la proteína de 19 kDa en el 70% de los

sueros de animales seropositivos, principalmente con títulos de IFI ≥ 100 . Se detectó inmunoreacción hacia una proteína de peso molecular de aproximadamente ~ 26 kDa en el 13% de animales seropositivos, con títulos altos de IFI ≥ 3200 . Se detectó similar patrón antigénico de bandas al comparar los sueros de animales inoculados experimentalmente con los sueros de animales naturalmente expuestos (Fig. 7A). Se evidenció una relación entre un aumento del título de IFI y una mayor intensidad y diversidad en el reconocimiento de IDAs (Fig. 7B).

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Se evaluó una prueba *in-house* de ELISA indirecta basada en el antígeno nativo NcSRS2 (p38) de *N. caninum*, que fue obtenido mediante cromatografía de afinidad. Debido a la ausencia de un *gold-standard* para *N. caninum* se utilizó un ERC (Anon, 2008; OIE, 2014) para determinar las características diagnósticas de la prueba ELISA-p38 en nuestro medio. Las pruebas utilizadas para definir el resultado serológico de las muestras del ERC fueron la IFI y el IB. La prueba de IFI es considerada de referencia para el diagnóstico de *N. caninum* (Ortega-Mora y col., 2006), mientras que el IB es confirmatorio para muestras con resultados inconclusos y/o dudosos por otras pruebas (Dubey y Schares, 2006). Por lo tanto, el uso de ambas pruebas combinó la alta sensibilidad de la IFI con la elevada especificidad del IB, caracterizando con mayor certeza las muestras utilizadas para evaluar la prueba de ELISA-p38.

El panel de sueros utilizado para evaluar el ELISA-p38 en nuestro medio, provenía de bovinos experimentalmente infectados y naturalmente expuestos de Argentina, ya que no es recomendable evaluar nuevas pruebas diagnósticas

exclusivamente con sueros de animales experimentales debido a que las situaciones detectadas en las infecciones experimentales no necesariamente reflejan lo que ocurre en la naturaleza (Wapenaar y col., 2007; Álvarez-García y col., 2013; OIE 2014).

Si bien la prueba de ELISA-p38 ya fue evaluada para el diagnóstico de la neosporosis bovina demostrando ser eficiente y robusta como prueba serológica (Schares y col., 2000), su re-evaluación previo a la implementación como herramienta diagnóstica en una región geográfica distinta es un requisito (Greiner y Gardner, 2000; OIE, 2014). En este sentido, la evaluación con sueros de bovinos locales es necesaria debido a que cada región se caracteriza por una situación epidemiológica particular respecto a una enfermedad. En este trabajo, se determinó un nuevo punto de corte para la prueba de ELISA-p38 (índice= 0,0905) donde se alcanzaron valores de Se y Sp relativa de 97,8% y 99,5%, respectivamente. La concordancia entre el ELISA-p38 y el ERC fue casi perfecta y de este modo sustentando con mayor solidez la prueba evaluada. Sin embargo, se detectaron diferencias al comparar este punto de corte con el utilizado para la misma prueba en Europa. En un estudio de estandarización de pruebas serológicas para el diagnóstico de la neosporosis bovina realizado entre varios países europeos (Von Blumröder y col., 2004) se estandarizó un punto de corte $\geq 0,04$ (índice) para valores de Se y Sp de 99% para la prueba de ELISA-p38. Al aplicar este punto de corte, la Sp relativa de la prueba de ELISA-p38 desciende a 92,6% (datos no mostrados). Por lo tanto, se refuerza la importancia de evaluar localmente pruebas diagnósticas que ya hayan sido validadas para otras regiones, previo a su incorporación en la rutina diagnóstica en un nuevo medio.

Sobre la base de los resultados obtenidos en este trabajo, se concluye que la prueba evaluada y estandarizada localmente resultó en valores diagnósticos óptimos, sustentando su uso en nuestro medio. Más aún, al analizar las muestras seropositivas a IB, se detectó que las reacciones hacia el antígeno de 37kDa estaban presentes en el 100% de los sueros positivos; destacando la importancia de dicho antígeno en las infecciones por *N. caninum* y en el diagnóstico de la enfermedad en los bovinos.

Al evaluar los sueros de los bovinos experimentalmente infectados a la 2^{da} spi con la prueba de ELISA-p38, los valores índices se ubicaron por debajo del punto de corte de la prueba. Estas mismas muestras resultaron positivas por IFI e IB. Probablemente, el punto de corte de la prueba de ELISA-p38 pudo haber subestimado las IgG de baja avidéz desarrolladas en infecciones recientes o tempranas (Schaes y col., 2002; Basso y col., 2010). Al contemplar el uso de un punto de corte menor que permitiera detectar a estos animales seropositivos a la 2^{da} spi, la Sp de la prueba se reducía considerablemente (datos no mostrados). Sería interesante evaluar dichos sueros mediante una prueba de ELISA-p38 de avidéz, incorporando un tratamiento con urea para analizar los valores de avidéz resultantes.

Presuntamente, los bovinos están infectados con distintas cepas de *N. caninum*, cuya inmunogenicidad podría variar. Sin embargo, en nuestro estudio, se observó similar patrón antigénico de bandas en los sueros de los animales naturalmente expuestos y de animales experimentalmente infectados. Este resultado es relevante para la elección de antígenos de importancia en el diagnóstico y en especial para el desarrollo y validación de pruebas serológicas elaboradas en

distintas regiones geográficas donde los bovinos pudieran estar expuestos a diferentes cepas de *N. caninum*.

Se detectó la presencia de un antígeno de peso relativo de ~26 kDa en algunos sueros bovinos con títulos de IFI ≥ 3200 . La inmunoreacción hacia el mismo podría indicar animales con elevado nivel de anticuerpos específicos para *N. caninum*, como ocurre en vacas que sufrieron recrudescencia, vacas que abortaron por *N. caninum*, o vacas y/o terneros que evidencien transmisión vertical. Sería importante estudiar el rol de este antígeno en el desarrollo de la enfermedad.

Se determinó la *performance* diagnóstica de IFI, IB y ELISA-p38 en relación al criterio basado en la decisión de la “Mayoría de las pruebas” (Von Blumröder y col., 2002; Álvarez-García y col., 2013) que demostró elevados valores de Se y Sp para cada una de las pruebas. Sobre la base de los resultados, la prueba de IFI fue muy sensible y detectó estados tempranos de infección en las vaquillonas experimentalmente infectadas. Sin embargo, sería necesario analizar un mayor número de muestras para determinar la capacidad de dicha prueba en la detección temprana de infección por *N. caninum*, ya que en este estudio solamente se analizaron 3 animales experimentales. La prueba de ELISA-p38 mostró una *performance* diagnóstica precisa y sería una herramienta diagnóstica rápida y práctica para estudios a gran escala a nivel de rodeos.

Sería recomendable utilizar el IB como prueba confirmatoria para muestras con resultados dudosos respecto a otras pruebas. Los resultados del IB son considerados inequívocos, debido a su elevada Se y Sp, siendo comparable con nuestros resultados ya que el IB fue la prueba con los valores diagnósticos más elevados. Sin embargo, su uso suele estar restringido a laboratorios de referencia

debido a que es una técnica laboriosa, que consume tiempo y requiere de equipamiento y personal entrenado.

Basado en los resultados obtenidos en el presente trabajo, sería aplicable el uso de la prueba ELISA-p38 para relevamientos seroepidemiológicos en escala y para determinar la presencia de la enfermedad en rodeos de Argentina. Sería útil para la rutina de diagnóstico de la enfermedad dada su alta Se y Sp relativa, además de la rapidez y automatización del procedimiento. Más aún, considerando los tiempos de importación y costos de los kits de ELISA comerciales disponibles en el mercado, fomentar la producción de pruebas diagnósticas elaboradas y evaluadas localmente en el país, resulta una alternativa práctica en términos económicos y diagnósticos, siendo aplicable su uso a las campañas de control y prevención de la neosporosis bovina a nivel nacional.

TABLAS Y FIGURAS DEL CAPÍTULO II

Tablas

Tabla 1. Distribución de sueros positivos y negativos por IFI e IB y conformación del estándar relativo de comparación (ERC).

	IFI		
	Positivos	Negativos	Total
IB			
Positivos	94	1	95
Negativos	10	231	241
Total	104	232	336

Tabla 2. Resultados de la prueba de ELISA-p38 en relación al estándar relativo de comparación (ERC).

	ELISA-p38		
	Positivos	Negativos	Total
ERC			
Positivos	92	2	94
Negativos	1	230	231
Total	93	232	325

Tabla 3. Valores de sensibilidad, especificidad y concordancia (*k*) relativos al criterio basado en la decisión de la “ Mayoría de las pruebas” .

Pruebas serológicas	Mayoría de las pruebas		
	Sensibilidad, 95% (IC)	Especificidad, 95%(IC)	k, 95%(IC)
IFI	100 (99,47- 100)	95,87 (93,15-98,58)	0,93 (0,88- 0,97)
IB	100 (99,47- 100)	99,59 (98,57-100)	0,99 (0,98- 1)
ELISA-p38	97,87 (94,42- 100)	99,59 (98,57-100)	0,98 (0,95- 1)

Figuras

Figura 1. Columna de sefarosa con el anticuerpo monoclonal 4.15.15 específico para la proteína p38 de *N. caninum* (izquierda) y elución y recolección de la proteína p38 (derecha).

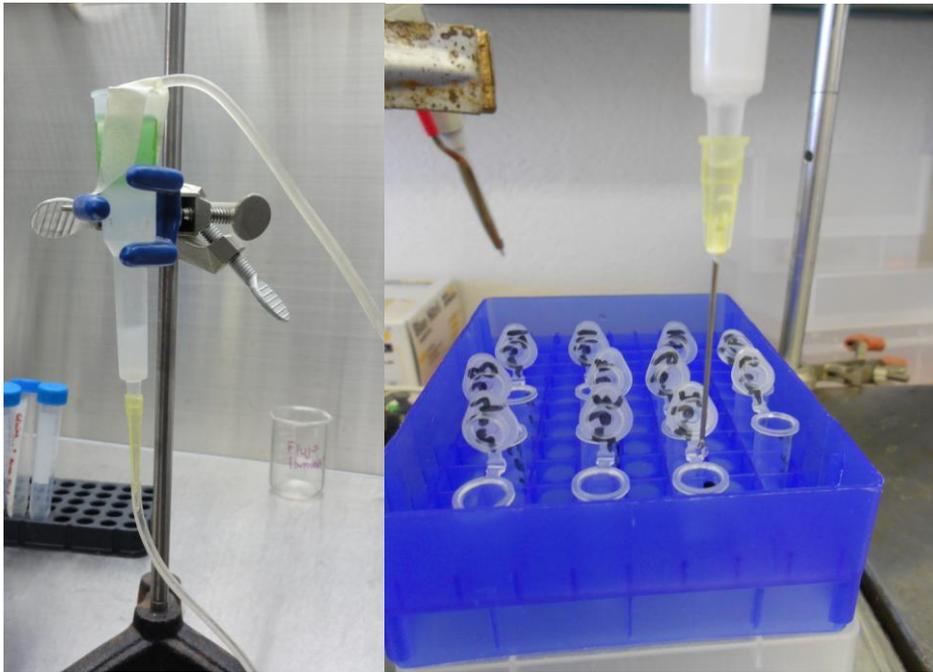
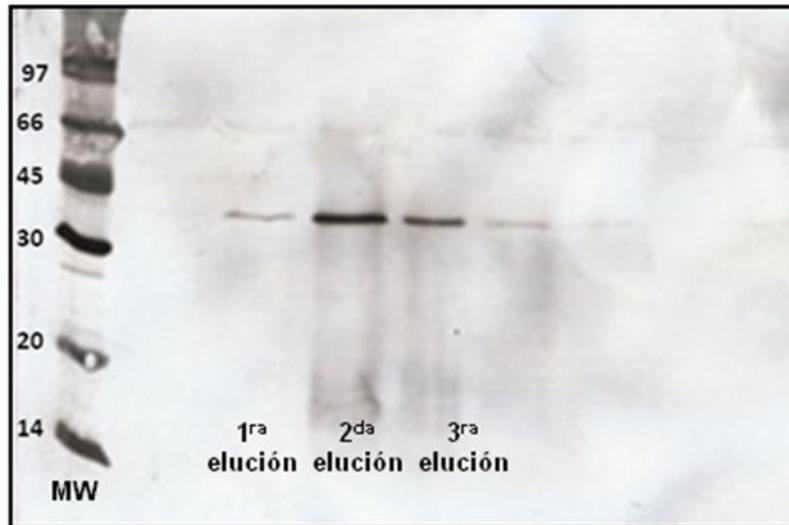
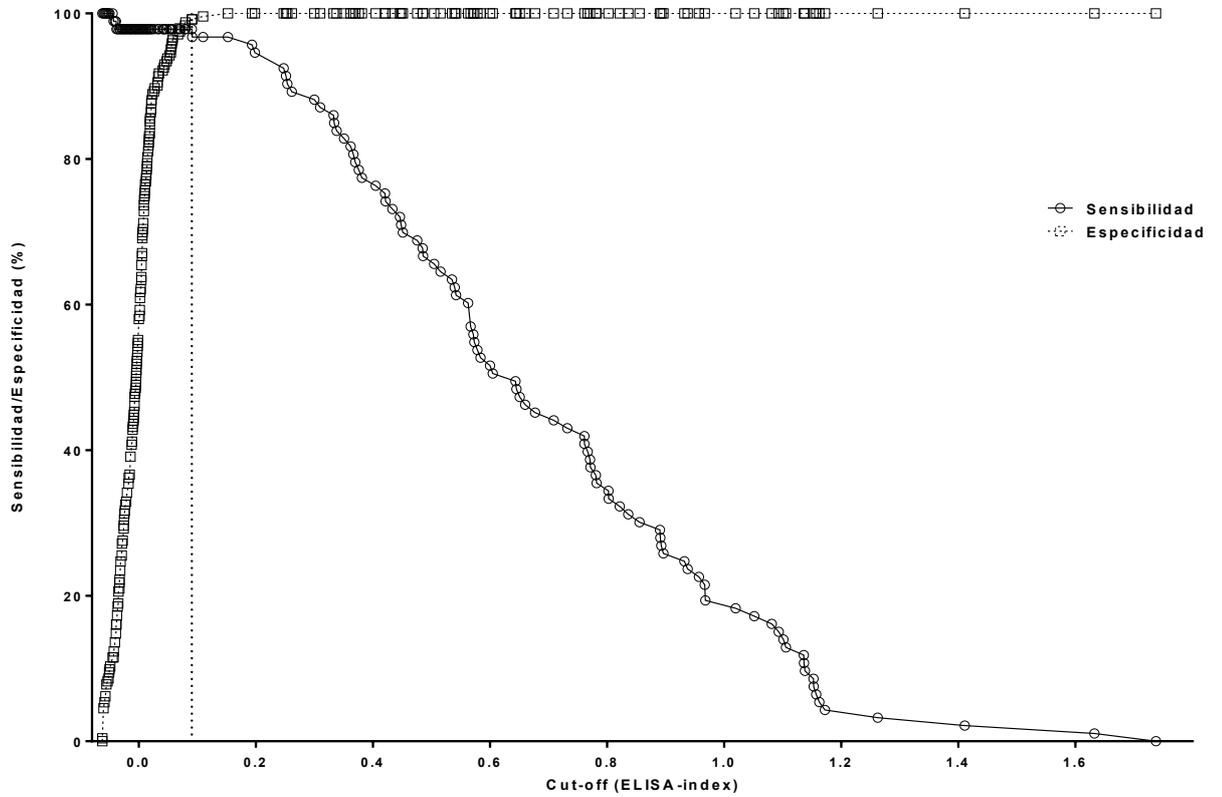


Figura 2. Pureza de las eluciones visualizada mediante tinción con Tinta China.



*se puede observar que en las eluciones 2 y 3 se detecta la proteína p38 sin restos proteícos.

Figura 3. Sensibilidad y especificidad relativa a distintos puntos de corte para la prueba de ELISA-p38 según el análisis ROC.



* Línea punteada vertical indica el punto de corte= 0,0905.

Figura 4. Curva ROC de la prueba de ELISA-p38 con sueros del estándar relativo de comparación. Área bajo la curva (AUC)= 0,982; [0,96 a 0,99] (IC_{95%}).

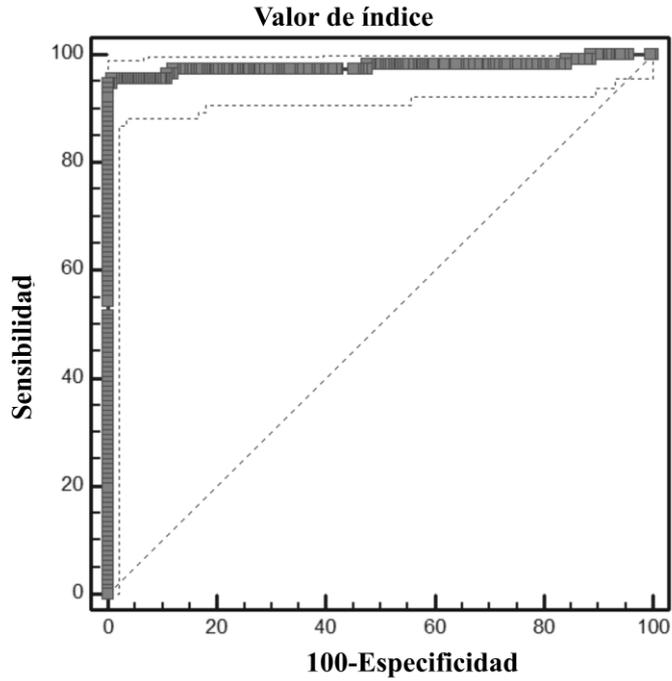


Figura 5. Comparación entre la media de las DO de las muestras frente a la diferencia absoluta entre las DO de cada duplicado para la prueba de ELISA-p38 en bovinos por el método gráfico Bland-Altman.

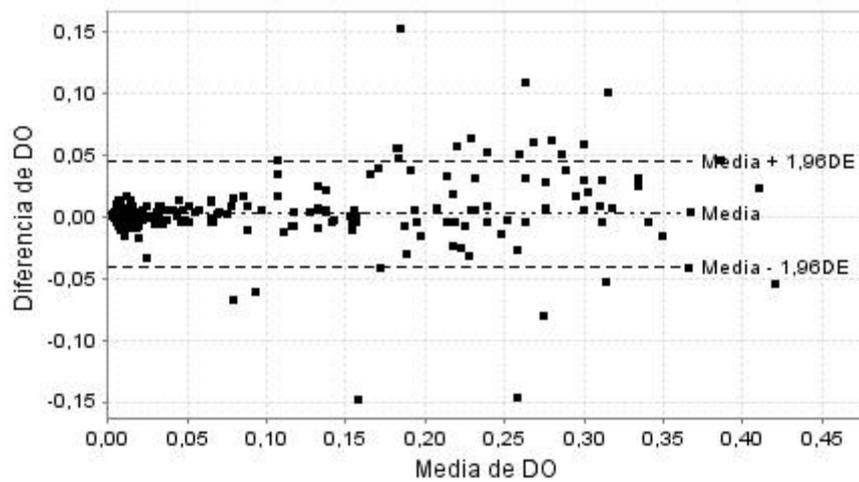


Figura 6. Evolución de anticuerpos (media) en sueros de vaquillonas experimentalmente infectadas según las pruebas de IFI y ELISA p38. Cada punto representa el valor de la media y las barras de error el desvío estándar de la media (SEM).

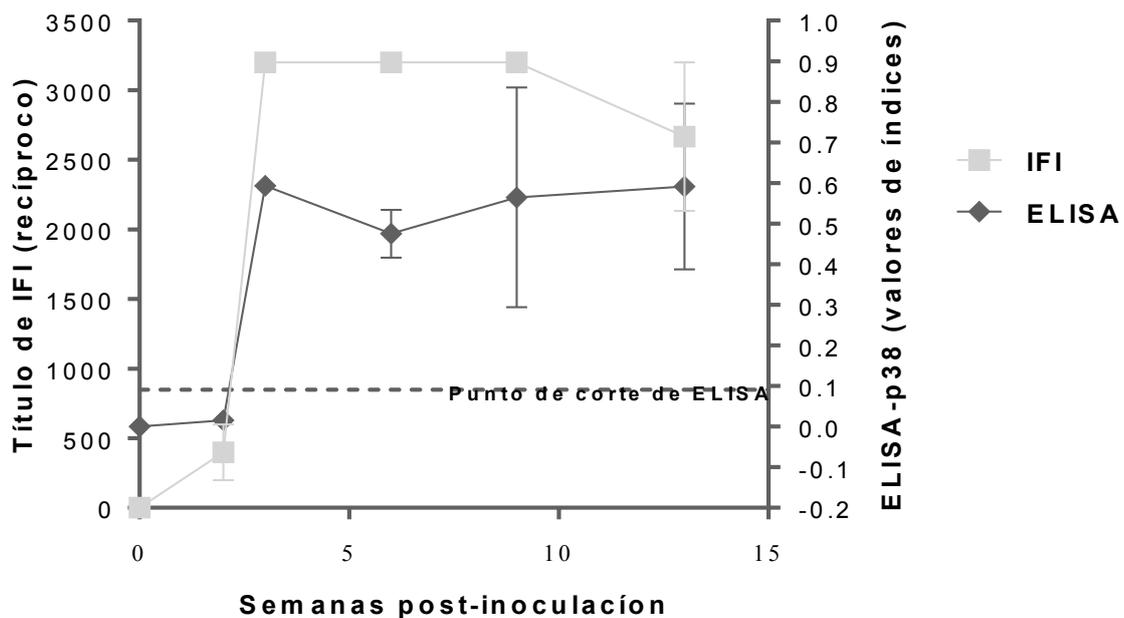
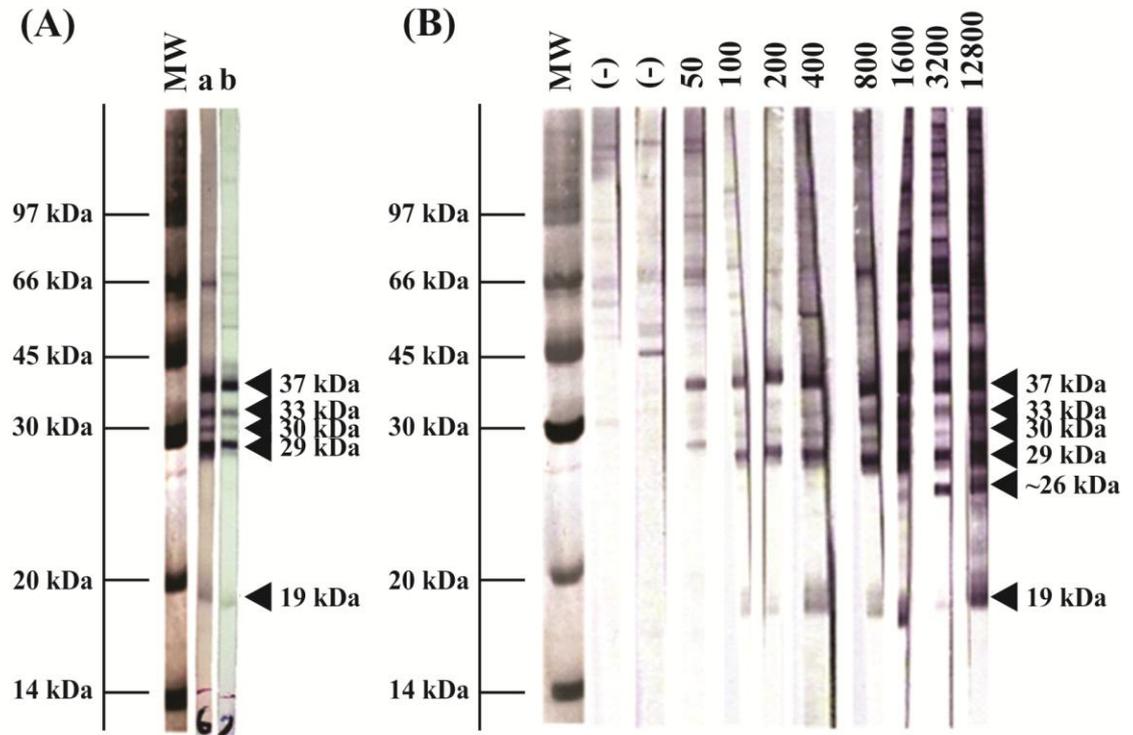


Figura 7. Patrón de antígenos inmunodominantes (IDAs).



* (A) sueros de bovinos naturalmente expuestos e infectados experimentalmente; (B) sueros de bovinos naturalmente expuestos a distintos títulos de IFI. MW= peso molecular; a= vaca naturalmente expuesta; b= vaquillona experimentalmente infectada; (-)= vacas seronegativas; el título de IFI está expresado a la inversa en el margen superior.

CAPÍTULO III: EVALUACIÓN DE LA PRUEBA DE ELISA-P38 EN LA IDENTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE ANIMALES INFECTADOS Y VACUNADOS EN UN MODELO MURINO

1. INTRODUCCIÓN

Una vacuna eficiente para *N. caninum* debería proteger del aborto a la hembra bovina preñada y evitar la transmisión vertical. Para ello, tendría que estimular la inmunidad protectora celular y la humoral (Williams y col., 2007; Mooney y Hemphil, 2014) y diferenciar entre animales infectados y animales vacunados mediante pruebas serológicas apropiadas (Dubey y col., 2007; Reichel y col., 2015).

Hasta ahora, no existen vacunas comerciales disponibles ni tratamientos medicamentosos efectivos para el control de la neosporosis bovina, por lo que las medidas de control se basan principalmente en medidas de manejo (Almería y col., 2013; Weber y col., 2013; Campero, 2014; Reichel y col., 2015).

Por lo expuesto, resulta de interés desarrollar una vacuna para mejorar el control y la prevención de la enfermedad. Los avances en las investigaciones en los últimos años de estudios sugieren el empleo de vacunas vivas con el uso de cepas naturalmente atenuadas (Williams y col., 2007; Reichel y col., 2015). Diferentes autores son concluyentes sobre eficacia hallada al utilizar vacunas vivas en la reducción de la transmisión vertical frente a desafíos con cepas virulentas en bovinos (Rojo-Montejo y col., 2013; Weber y col., 2013). Sin embargo, se deben considerar los posibles inconvenientes que implican el uso de este tipo de vacunas, relacionados con la posible reversión de la virulencia, la limitada vida útil, la persistencia de los anticuerpos vacunales y la dificultad de diferenciación de

animales infectados y vacunados (Reichel y col., 2015). Pero también se debe considerar que tienen numerosas ventajas, ya que simulan el estado de infección en el animal y por lo tanto la respuesta inmune más adecuada.

Se han empleado diversos modelos animales para evaluar vacunas a *N. caninum*. En nuestro país se han realizado diferentes ensayos con vacunas experimentales realizados en bovinos y en modelos murinos (Moore y col., 2005; 2011; Hecker y col., 2013; 2014; Mansilla y col., 2012; 2013; 2015). Sin embargo, los resultados han sido variables y por eso no resultaría factible el desarrollo inmediato de un producto comercial exitoso. Idealmente, los estudios experimentales de vacunación para el control de la neosporosis deberían realizarse en la especie de interés, es decir en los bovinos, pero esta posibilidad tiene algunas limitantes. Factores tales como los elevados costos económicos por el valor de los bovinos y su mantenimiento y su largo período de gestación, han hecho necesario que se consideren otras especies como modelos alternativos.

El empleo de ratones (*Mus musculus*) como animal experimental ha sido ampliamente estudiado (Lindsay y col., 1995). Existe una mayor susceptibilidad en las cepas de ratones endocriadas (BALB/c, C57BL/6) a la infección por *N. caninum* que las cepas de ratones exocriadas (Dubey y Lindsay, 1996; Dubey y Schares, 2006; Ramamoorthy y col., 2007). También se han empleado meriones (*Meriones unguiculatus*) como animales experimentales debido a su susceptibilidad a la infección por *N. caninum* (Dubey y Lindsay, 2000; Dubey y Schares, 2006). Las ratas son resistentes a la infección por *N. caninum* y podrían ser utilizadas si reciben un tratamiento inmunosupresor previo. Los conejos son utilizados principalmente para la producción de sueros hiperinmunes anti-*Neospora*, debido a su capacidad de

supervivencia frente a altas dosis infectantes (Lindsay y Dubey, 1989; Monney y Hemphil, 2014). También se ha trabajado con pequeños rumiantes como las ovejas y las cabras, que son susceptibles a la infección por *N. caninum*, ya que en la naturaleza son hospedadores intermediarios (Buxton y col., 1998; Arranz-Solís y col., 2015; Syed-Hussain y col., 2015). Estos pequeños rumiantes tienen la ventaja sobre los bovinos de tener un menor período de gestación, menor costo inicial y mayor facilidad en el mantenimiento siendo por ello un buen modelo animal para evaluar la transmisión transplacentaria endógena.

Las vacunas convencionales pueden ser vivas (atenuadas o modificadas) o muertas (inactivas). En los últimos años, debido al gran avance en el campo de la ingeniería genética surgieron las vacunas denominadas de nueva generación. Estas vacunas pueden ser a subunidades, elaboradas con proteínas inactivas del protozoo o bien en el uso de proteínas sintéticas, ya sea por obtención de fracciones inmunodominantes esenciales para generar la respuesta inmune específica o por fabricación sintética de proteínas específicas, respectivamente.

También existen las vacunas vivas de nueva generación que pueden ser: deleteadas, recombinantes o termosensibles. Las vacunas marcadas o deleteadas identificadas con su sigla en inglés DIVA (*differentiate infected from vaccinated animales*) poseen determinadas características en su diseño que en conjunto con una prueba diagnóstica específica permitan la posibilidad de diferenciar serológicamente a los animales vacunados de los animales que sufren una infección natural. Finalmente cabe mencionar las vacunas en ADN, en las que el ADN purificado que contiene el gen de la proteína capaz de generar una respuesta

inmune protectora se inserta en un plásmido que hace de vector específico (Bernagozzi y col., 2014).

Las vacunas inactivadas ofrecen la ventaja del bajo riesgo de reversión de su virulencia. No obstante, inducen una menor respuesta inmune, debiéndose administrar varias dosis de refuerzo para conseguir una inmunización completa, y deben ser co-administradas con adyuvantes que potencien la respuesta inmune deseada.

Los adyuvantes más utilizados en medicina veterinaria son las sales de aluminio y las emulsiones oleosas (Spickler y Roth, 2003). Las sales de aluminio inducen una respuesta Th2 y son inmunomoduladoras, han sido ampliamente utilizados en vacunas dada su seguridad. Las emulsiones oleosas inducen respuesta Th2 y Th1 así como la activación de linfocitos T citotóxicos (Aucouturier y col., 2001; Spickler y Roth, 2005; Hecker y col., 2012). El antígeno se encuentra protegido por el componente aceitoso de la digestión enzimática (Aucouturier y col., 2001). Según el tipo de emulsión, pueden desarrollarse reacciones adversas en el sitio de inoculación y granulomas. Estos procesos inflamatorios generan reclutamiento de células presentadoras de antígeno (CPA) como las células dendríticas y los macrófagos, y debido a interacciones entre el surfactante de la emulsión y la membrana celular, favorece el procesamiento del antígeno por parte de las CPA (Aucouturier y col., 2001; Langellotti y col., 2011) Las emulsiones se clasifican en: agua en aceite (W/O), aceite en agua (O/W) y doble emulsión agua en aceite (W/O/W). La emulsión agua en aceite (*i.e.* adyuvante incompleto de Freund, Montanide ISA 773, Montanide ISA 50, Montanide ISA 70) es de liberación lenta del antígeno y por lo tanto, capaz de generar inmunidad a largo plazo, sin embargo, al

ser muy viscosa puede desarrollarse inflamación en el sitio de inoculación (Aucouturier y col., 2001; Spickler y Roth, 2005). En contraposición, en la emulsión aceite en agua (*i.e.* MF59, Montanide ISA 25) la liberación del antígeno es más rápida y genera una respuesta inmune a corto plazo. El antígeno puede liberarse en ganglio linfático, debido a la capacidad de las microgotas de aceite en transportar el antígeno a linfonódulos cercanos. En las emulsiones doble emulsión agua en aceite (*i.e.* Montanide ISA 206 utilizado en este trabajo) la liberación del antígeno es intermedia respecto a las mencionadas, otorgando inmunidad a corto y largo plazo (Aucouturier y col., 2001; Spickler y Roth, 2005). Se ha utilizado en Argentina en vacunas contra aftosa, demostrando una efectiva respuesta humoral y celular (Langellotti y col., 2011).

Se han realizado numerosos ensayos con inmunógenos experimentales de *N. caninum* evaluando la respuesta inmunitaria y el grado de protección para controlar la infección en ratones y bovinos con resultados variables (Hecker y col., 2012).

En la actualidad se han desarrollado diversos sistemas de transporte de antígenos como los liposomas, adyuvantes sintéticos, saponinas, y complejos inmunoestimulantes que han sido utilizados en ensayos de vacunas para *N. caninum* (Hecker y col., 2012).

También se han diseñado vacunas a subunidades basadas en antígenos que intervienen en la adhesión e invasión celular (antígenos de superficie, micronemas, roptrias o de gránulos densos). Su uso no es exclusivo en vacunas monovalentes (una única subunidad o antígeno) ya que las vacunas polivalentes que son el resultado de la combinación de distintos antígenos, han demostrado una mayor protección (Mooney y Hemphill, 2014). Monney y col. (2011) reportaron una

adecuada protección a *N. caninum* en un modelo de neosporosis cerebral en ratones inmunizados con una vacuna polivalente basada en los epitopes NcMIC1, NcMIC3 y NcROP2 (recNcMIC3-1-R) formulada con el adyuvante saponina. Sin embargo, al probar dicha vacuna en un modelo de ratona gestante, no impidió la transmisión vertical y se detectó una escasa protección contra la infección cerebral (Monney y col., 2012). Se observó además que la protección otorgada en el modelo no gestante en ratón se debió a una respuesta mixta Th1/Th2, mientras que en el modelo de ratona gestante predominó una respuesta Th2. Al intentar potenciar una respuesta Th1 con el uso del adyuvante incompleto de Freund, no se logró el balance adecuado entre las respuestas, generándose una respuesta Th1 exacerbada (Monney y col., 2013).

Baszler y col. (2000) reportaron que la vacunación en ratones BALB/c con antígeno soluble utilizando adyuvante completo de Freund o vesículas surfactantes no-iónicas exacerbó los signos clínicos nerviosos y originó una inadecuada respuesta inmunitaria predominantemente de tipo Th2.

Con respecto a las vacunas vivas, Marugán-Hernández y col (2011a) diseñaron una vacuna viva transgénica basada en taquizoítos con capacidad de expresar de modo constitutivo el antígeno de bradizoíto NcSAG4. Al inmunizar ratones con dicha cepa transgénica, se detectó protección frente a la transmisión vertical tras un desafío con la cepa de elevada virulencia NC-Liv (Marugán-Hernández y col., 2011b).

Rojo-Montejo y col., (2012) utilizaron una vacuna viva elaborada con una cepa naturalmente atenuada NC-Spain 1H. Los autores detectaron una protección completa frente a la infección cerebral y una reducción del 86% de la transmisión

congénita al inmunizar con una dosis reducida en un modelo de ratona gestante. El nivel de protección se relacionó con la respuesta Th1 predominante desarrollada por los ratones.

Por lo expuesto, se deben tener en cuenta varias consideraciones al diseñar una vacuna: la elección de la especie animal que dependerá de los recursos y disponibilidad, el modelo experimental (cerebral o gestante), según el objetivo a evaluar la formulación de la vacuna, la elección del adyuvante si fuera necesario y la dosis de inmunización, la cepa de desafío y disposición de una prueba inmunoserológica que permita diferenciar a los animales vacunados de los infectados.

El objetivo de este capítulo fue evaluar la prueba de ELISA-p38 para identificar y diferenciar animales infectados con *N. caninum*, de animales vacunados experimentalmente, en un modelo murino. Para eso, se elaboraron vacunas con el lisado completo de proteínas solubles de *N. caninum* y por otra parte con el lisado completo al que se le extrajo la proteína nativa p38. Se analizaron la respuesta inmune humoral y celular y la protección de las vacunas, frente al desafío con una cepa de *N. caninum* de alta virulencia, mediante el análisis de lesiones en varios órganos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Diseño experimental

Se formaron 4 grupos de 10 ratones (*Mus musculus*) distribuidos al azar (Fig. 1):

Grupo VC: vacunado completo con 35 ug de proteínas solubles totales de *N.caninum*

Grupo VS/p38: vacunado con 35 ug de proteínas solubles sin p38

Grupo CA: control adyuvante

Grupo C: control PBS

En los grupos **VC**, **VS/p38** y **CA** se utilizó el adyuvante Montanide™ ISA 206 (Seppic, Francia). Los sueros del grupo **VC** se consideraron como equivalentes a los que se producirían en una infección natural con las proteínas completas del protozoo cuando se realizaron evaluaciones serológicas previas al desafío.

Los ratones de los grupos **VC** y **VS/p38** se inmunizaron por vía subcutánea (SC) en dos ocasiones con un intervalo de dos semanas (días 0 y 14). Los animales de los grupos **C** y **CA** se trataron en los días 0 y 14. Al día 35 todos los grupos, se desafiaron los ratones por vía SC con una dosis de 2×10^6 taquizoítos vivos/ratón del aislamiento NC-Spain 7 de *N. caninum* (Regidor-Cerrillo y col., 2008). Se realizó la extracción de sangre en los días 13 y 34, para analizar la producción de anticuerpos mediante IFI y ELISA-p38. En el día 34, se sacrificaron 3 ratones de cada grupo con el fin de medir los parámetros inmunes específicos previo al desafío. Los ratones restantes de cada grupo (7) se sacrificaron al final del ensayo (día 65). Se evaluó la respuesta inmune celular y la protección conferida por las vacunas. Para eso, al realizar las necropsias se obtuvieron muestras de bazo para cultivos de células esplénicas; sangre para serología y cerebro, pulmón, corazón, hígado y riñón para histopatología (HP) e inmunohistoquímica (IHQ). La respuesta inmune celular fue evaluada por la medición de la producción *in vitro* de las citoquina IL-4 utilizando kits comerciales de ELISA (Thermo Scientific, Waltham, EE.UU). El

análisis histopatológico se realizó mediante procedimiento de rutina con la fijación de los órganos en formol bufferado al 10% y tinción con hematoxilina y eosina (H/E). Se evaluó el grado de severidad de las lesiones microscópicas en los cerebros (Collantes-Fernández y col., 2004; Pereira García-Melo y col., 2010; Mansilla y col., 2012) y otros órganos según un puntaje asignado.

2.2. Ratones

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 (27/9/2011).

Se utilizaron 40 ratones hembras BALB/c cuyos progenitores proceden del National Institute of Health (EE.UU), de 6 semanas de edad y de 20-24 gr peso promedio, provistos por el Bioterio del Laboratorio de Animales de Experimentación, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. Los ratones eran libres de patógenos específicos (SPF): virales, parasitarios y bacterianos comunes, de acuerdo con los resultados de los procedimientos de diagnóstico de rutina y control sanitario realizados por el bioterio responsable.

Los animales fueron alojados en el Bioterio del Laboratorio de Inmunoparasitología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, en cajas de policarbonato de 20 x 30 cm con cama de viruta estéril en un ambiente controlado con ciclos de 12 hs de luz y 12 hs oscuridad y con alimento balanceado específico para roedores y agua *ad libitum*. Se mantuvo una carga animal de 5 ratones por caja. Los animales fueron manejados de manera de minimizar las condiciones de estrés a lo largo de todo el experimento.

2.3. Elaboración de vacunas y desafío

Las proteínas utilizadas para las vacunaciones a los ratones de los grupos **VC** y **VS/p38** derivaron del aislamiento NC-1 mantenido en cultivo celular (ver Anexo 3). Las proteínas solubles totales inoculadas en los ratones del grupo **VC** se obtuvieron a partir de taquizoítos ($4,6 \times 10^8$) purificados con columnas de Sephadex (PD-10 Desalting Columns, GE Healthcare) y se sonicaron (Omni International, Kennesaw, EE.UU) en baño con hielo (4 ciclos, 1 min/ciclo, potencia 3). Se corroboró la ruptura total de los taquizoítos mediante la observación directa en microscopio óptico a 400X. Se centrifugó a 10000 g durante 30 min a 4°C para la obtención de las proteínas solubles presentes en el sobrenadante resultante (Baszler y col., 2000). Las proteínas solubles se cuantificaron con el kit comercial (Bicinchoninic acid assay, BCA; Pierce, Rockford, EE.UU) según las indicaciones del fabricante (ver Anexo 11). Dicho material se conservó a -20°C hasta su uso. Para la formulación de la vacuna se utilizaron 35 µg de proteínas solubles totales. Como se mencionó en el diseño experimental, previo al desafío, los anticuerpos generados por proteínas totales se consideraron como equivalentes a los que se producirían en una infección natural.

El remanente de proteínas solubles de *N. caninum* **sin p38** utilizado para la inmunización de los ratones del grupo **VS/p38** se obtuvo como resultado de la purificación de la proteína p38 por cromatografía de afinidad (ver Capítulo II, sección 2.3). Una vez recirculadas las proteínas solubles totales por la columna de cromatografía, se conservó el remanente resultante que contendría todas las proteínas solubles de *N. caninum* excepto la proteína p38, captada por los anticuerpos monoclonales anti-p38 incluidos en la columna. Para asegurar la ausencia de la proteína p38 de dicho remanente, se realizó un máximo de tres

recirculaciones por la columna por cromatografía de afinidad. Luego de cada recirculación, una alícuota del remanente se sometió a una electroforesis en geles de poliacrilamida al 12,5% con SDS en condiciones no reductoras, seguido de inmunotransferencia (ver Anexo 6). Se realizó una prueba de *Immunoblot* (IB) a las proteínas del remanente con los dos anticuerpos monoclonales anti-p38: mAb 4.15.15 y 5.2.15 (Schaes y col., 2000) (ver Anexo 8). Para la elaboración de la vacuna experimental del grupo **VS/p38** se utilizaron sólo aquellos remanentes donde no se evidenció reacción hacia ninguno de los dos anticuerpos monoclonales en el IB (Fig. 3). Se cuantificó el contenido proteico del remanente con el kit comercial (Bicinchoninic acid assay, BCA; Pierce, Rockford, EE.UU) según las indicaciones del fabricante (ver Anexo 11). Se conservó a -20°C hasta su uso. Para la formulación de la vacuna se utilizaron 35 µg de proteínas.

Para el desafío se utilizaron taquizoítos derivados del aislamiento NC-Spain 7 (gentilmente cedido por el Dr. Luis Ortega Mora, SALUVET, España) mantenidos en cultivo celular (ver Anexo 3). Al momento del desafío, se cuantificaron los taquizoítos viables en cámara de Neubauer con azul tripán diluido 1:10. Se preparó una dosis de 2×10^6 taquizoítos/ratón resuspendidos en un volumen de 300 µl de PBS por dosis de desafío que se inoculó por vía SC. Durante las inoculaciones se mantuvieron las vacunas en hielo para asegurar la viabilidad de los taquizoítos.

2.4. Adyuvante Montanide™ ISA 206 y elaboración de vacunas

Se utilizó el adyuvante Montanide™ ISA 206 (Sepic Inc., Francia, gentilmente cedido por la Dra. Patricia Zamorano, INTA Castelar). Se realizó la emulsión del adyuvante con las proteínas para los grupos **VC** y **VS/p38** manteniendo una

proporción de 1:1 (v/v) siguiendo las instrucciones del proveedor. Para el grupo **CA** se inocularon 300 µl de adyuvante por ratón. Se realizaron los controles de esterilidad mediante cultivo microbiológico de todas las formulaciones inoculadas gentilmente realizados por el Dr. Juan Manuel Unzaga (Lab. de Inmunoparasitología, FCV, UNLP).

2.5. SDS-PAGE e IB de los inmunógenos

Se obtuvieron alícuotas de las vacunas elaboradas con el lisado completo de proteínas solubles (grupo **VC**) y con el lisado de proteínas solubles del remanente sin p38 (grupo **VS/p38**). Se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12,5% con SDS en condiciones no reducidas (ver Anexo 6) (Ortega-Mora y col., 2007). Se transfirieron a membranas de PVDF y se realizó la prueba de IB (ver Anexo 8) utilizando un suero control positivo de una vaquillona infectada experimentalmente (1:100) con el fin de evidenciar la diversidad de antígenos inmunodominantes (IDAs) presentes en los inmunógenos.

2.6. Respuesta inmune humoral: detección de IgG por la prueba de IFI

Los sueros de los ratones obtenidos por extracción de la vena maxilar *in vivo* o punción cardíaca *post-mortem* a lo largo del ensayo, fueron diluidos en PBS a partir de 1:25 hasta título final. Las diluciones se colocaron en las áreas de los portaobjetos que contenían antígeno de *N. caninum* del aislamiento NC-1 (ver Anexos 3-5). Se utilizaron sueros controles de ratones positivos y negativos. Se incubaron a 37°C durante 30 min en cámara húmeda. Se realizó un lavado de 10 min con buffer de carbonatos, en agitación. Se colocó un conjugado anti-IgG de

ratón (Sigma, St. Louis, EE.UU) unida al fluorocromo isotiocianato de fluoresceína diluido 1:100 en PBS y se incubó por 30 min a 37° C, en cámara húmeda. Se lavó con buffer de carbonatos durante 10 min en agitación y se montó con solución de montaje (ver Anexo 5). Se consideró positiva hasta la última dilución del suero donde se observó fluorescencia completa en todo el borde del parásito (Paré y col., 1995).

2.7. Respuesta inmune humoral: medición de anticuerpos anti-p38 por la prueba de ELISA-p38

Se analizaron los sueros de los ratones de los 4 grupos que se obtuvieron a los días 13 y 34 del inicio del ensayo, previo al desafío por la prueba de ELISA-p38. Para ello, se diluyó la proteína p38 en un buffer de bicarbonato de sodio 0,1 M (ver Anexo 9) y se sensibilizó la placa de ELISA (Polysorp-Immunon-Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU) con 120 µl/pocillo (concentración: 1,5 ng/pocillo) durante 60 min a 37°C. Se realizaron 3 lavados de 300 µl/pocillo con la solución de lavado (ver Anexo 9). La placa se incubó con 100 µl/pocillo de solución de bloqueo (ver Anexo 9) durante 60 min a 37 °C. Se vaciaron los pocillos y se agregaron 100 µl/pocillo de cada muestra de suero de ratón por duplicado y se incubó 30 min a 37°C. Los sueros fueron diluidos 1:200 en solución de bloqueo. Se incluyeron sueros controles positivos y negativos y se dejó un par de pocillos vacíos (blanco) por placa. Se realizaron 3 lavados y luego se agregó 100 µl/pocillo del conjugado anti-IgG ratón unido a peroxidasa (Jackson Immunoresearch Lab. Inc., PA, EE.UU) diluido 1:1000 durante 30 min a 37°C. Se realizaron 3 lavados con solución de lavado seguidos de 3 lavados con agua destilada para eliminar restos de detergente. Se agregaron 100 µl/pocillo del sustrato (3,3',5,5'-tetrametilbencidina y 0,004% H₂O₂ en 0,2M de

acetato de sodio y 0,2M ácido cítrico) durante 15 min a 37°C. Se detuvo la reacción con 50µl/pocillo de ácido sulfúrico (ver Anexo 9). Los valores de densidad ópticas (DO) se leyeron en un lector de ELISA (Labsystems MS Multiskan, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EE.UU) a 492 nm y con un filtro de referencia de 620 nm.

El valor del índice de cada muestra se realizó según el cálculo de cada una de las densidades ópticas obtenidas del duplicado de cada muestra como se indica en la sección 2.5 del Capítulo II.

2.8. Respuesta inmune celular previa y posterior al desafío: medición de IL-4

2.8.1. Procesado del bazo de ratones para medición de la inmunidad celular

El cultivo de células esplénicas se realizó a partir de los bazos de los ratones sacrificados a los días 34 y 65 del ensayo. Tres ratones de cada grupo se sacrificaron al día 34, mientras que los restantes ratones se sacrificaron al día 65, momento final del ensayo.

El bazo fue extraído y se procesó esterilmente bajo el flujo laminar. Se colocó una porción del órgano equivalente a la mitad aproximadamente, en una placa de Petri con 6 ml de medio RPMI con 10% de SFB. La muestra se procesó bajo el flujo laminar y refrigerado a 4°C mediante la inmersión en hielo para evitar la degradación celular. Con la ayuda de un par de portaobjetos esmerilados estériles se comprimió la mitad del bazo humedecido con el medio, hasta lograr la mayor desintegración posible del tejido. Se recolectó el macerado en un tubo de 15 ml estéril, sin incluir los restos de tejidos y material fibroso y se centrifugó a 250 g durante 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 ml de medio con 10% de

SFB, desintegrando el pellet completamente. Se le adicionó 1 ml de solución de buffer de lisis (cloruro de amonio al 0,83 %; ver Anexo 10) con el fin de hemolizar los glóbulos rojos. Se invirtió suavemente el tubo un par de veces, con el fin de mezclar las soluciones y se recubrió con papel aluminio para protegerlo de la luz dejándolo reposar 5 min a temperatura ambiente. Se agregó 4 ml de medio con 10% de SFB y se lo centrifugó a 250 g por 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 6 ml de medio con SFB al 10%. Se centrifugó y el pellet resultante se resuspendió en 1 ml de medio con 10% de SFB. Se obtuvieron 10 µl de dicha suspensión y se diluyeron con 90 µl de azul tripán al 0,5 % realizando el conteo de las células esplénicas viables en la cámara de Neubauer. Se sembraron en placas para cultivo de 96 pocillos a una concentración de 2×10^5 células viables en 200 µl de medio por pocillo (Ribeiro y col., 2009).

Se realizaron por triplicado los siguientes tratamientos para cada bazo de ratón procesado de los 4 grupos experimentales:

- 1- Estimulación con proteínas solubles: estimulación con 5 µg de proteínas solubles/pocillo obtenidas a partir del sonicado de taquizoítos del aislamiento NC-1 (Ribeiro y col., 2009).
- 2- Control positivo: estimulación con concanavalina A (Biorad, California, EE.UU) en una concentración final de 5 µg/ml (Ribeiro y col., 2009).
- 3- Control negativo: sin tratamiento, células de bazo sembradas en medio con 10% de SFB (Ribeiro y col., 2009).

Se mantuvieron las placas en una estufa de cultivo a 37°C con 5% de CO₂ durante 72 hs (Baszler y col., 2000; Ribeiro y col., 2009) y luego se recolectaron los sobrenadantes y se conservaron a -20 °C hasta su uso.

Todo el material utilizado para el procesamiento del bazo se realizó en forma estéril.

2.8.2. Medición de las citoquinas IL-4 e IFN γ

A partir de los sobrenadantes recolectados a las 72 hs del cultivo de esplenocitos se midió la producción de la citoquina: IL-4. Se utilizó el kit de ELISA comercial: Mouse IL-4 ELISA Kit (N° catálogo: EMIL4) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EE.UU) y se siguieron las instrucciones del proveedor. La medición de IL-4 se realizó sobre un pool de los triplicados de cada tratamiento por ratón, y se realizó una dilución de 1:2 de cada muestra para evitar que la medición excediera el rango del kit (ver Anexo 12). No fue posible realizar la medición de IFN γ ya que el kit solicitado, Mouse IFN gamma ELISA Kit (N° catálogo: EM1001), no ingresó al país hasta la presentación de este manuscrito.

2.9. Análisis de la severidad de lesiones e inmunohistoquímica en los órganos de los ratones

Diferentes órganos (cerebro, pulmón, corazón, hígado y riñón) fueron conservados en formol bufferado al 10% y procesados en el Laboratorio de Patología Veterinaria, INTA Balcarce (gentileza del Dr. DP Moore). Se realizó el análisis histopatológico mediante procedimiento de rutina y tinción con H/E. Se evaluó la severidad de las lesiones histopatológicas según un esquema de puntuación (Collantes-Fernández y col., 2004; Pereira García-Melo y col., 2010; Mansilla y col., 2012):

Puntaje asignado	Descripción patológica en cerebro
0	Sin lesiones
1	Encefalitis no supurativa leve y gliosis focal
2	Encefalitis no supurativa moderada, manguitos perivasculares y necrosis incipiente
3	Encefalitis no supurativa severa, necrosis, infiltrado inflamatorio no supurativo con presencia de abundantes macrófagos

Puntaje asignado	Descripción patológica en pulmón, corazón, hígado y riñón
0	Sin lesiones
1	Infiltrado inflamatorio no supurativo leve
2	Infiltrado inflamatorio no supurativo moderado
3	Infiltrado inflamatorio no supurativo severo, necrosis y/o calcificación

Los tejidos teñidos con H/E seleccionados sobre la base de las lesiones histopatológicas fueron posteriormente analizados por IHQ, con la técnica de Avidin-Biotina Complex (ABC, Vectastain, Peroxidasa Elite ABC PK-601, Vector Lab., Burlingame, EE.UU) según protocolo del Laboratorio de Patología Veterinaria del INTA Balcarce (Campero y col., 1998; 2003b) (ver Anexo 13).

Brevemente, los tejidos seleccionados se cortaron en secciones 3-5 μm de espesor con micrótomo y fueron montadas en portaobjetos cargados negativamente (ProbeOn Plus, Fisher Biotech, Pittsburgh, EE.UU), posteriormente desparafinados por pasajes por xilol y alcohol de diferentes graduaciones. Las secciones se trataron con solución de peróxido de hidrógeno pH 7,2 en metanol durante 15 min a 37°C para inhibir la actividad de la peroxidasa endógena. Las muestras luego fueron pasadas por alcohol (alcohol 95°, dos pasajes de 2 min y por alcohol 70°, un pasaje de 2 min) y finalmente 5 min en agua bidestilada. Se realizó el tratamiento enzimático con el fin de desenmascarar antígenos mediante una solución de pepsina. Para bloquear las uniones inespecíficas, las muestras fueron incubadas con una solución de caseína bloqueante durante 10 minutos. Posteriormente, los cortes fueron lavados con solución salina tamponada estéril (SSTE) e incubados durante 40 min a 37°C con suero primario anti-*Neospora* producido en conejo (gentilmente cedidos por el Dr. Mark Anderson, UC Davis, Davis, EE.UU) diluido 1:300 en SSTE. El exceso de anticuerpos no unidos fue eliminado mediante lavajes con SSTE y luego se le agregó suero de cabra biotinilado anti-conejo y se incubó durante 20 min a 37°C. Seguidamente, se realizó un lavado con SSTE estéril y se agregó el complejo avidina-biotina (ABC) y se incubó por 20 min a 37°C. Posteriormente, se lavaron los portaobjetos nuevamente con solución SSTE y se expusieron al agente sustrato- cromógeno (3-amino-9- etilcarbazol, H_2O_2 ; AEC Substrate-Chromogen, DAKO, Carpintería, EE.UU). Finalmente, se lavaron una vez más las secciones y se tiñeron con hematoxilina de Mayer, previamente filtrada, haciendo el viraje con la solución de Scott. Para cada de tinción se utilizaron tejidos controles positivos y negativos según protocolo del Laboratorio (Campero y col.,

1998). Las muestras teñidas fueron montadas con bálsamo sintético (Crystal/mount, Biomeda Corp, Foster City, EE.UU) incubadas a 75°C por 23 min para la polimerización y finalmente las secciones fueron cubiertas con cubreobjetos. Las muestras procesadas fueron observadas en un microscopio binocular de campo claro.

2.10. Análisis de datos

Los valores de Se, Sp, punto de corte, AUC y coeficiente de correlación intraclase para la prueba de ELISA-p38 se calculó como se indica en el punto 2.6 del Capítulo II.

Se utilizó, la prueba de ANOVA de una vía, y si fuera necesario, seguida por el test de múltiples comparaciones de Tukey para comparar la respuesta inmune por determinación de citoquina IL-4, IgG y anticuerpos anti-p38. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis seguido de una prueba no paramétrica de múltiples comparaciones para analizar la severidad de las lesiones histopatológicas (Rojo-Montejo y col., 2012). La significación estadística para todos los análisis se estableció en $P < 0,05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 5 v.5.01 (San Diego, CA, EE.UU).

3. RESULTADOS

3.1. SDS-PAGE e IB de los inmunógenos

La detección de IDAs por IB con el suero control positivo de una vaquillona infectada experimentalmente, permitió reconocer los IDAs de pesos moleculares relativos: 19, 29, 30, 33 y 37 kDa (Fig. 2A) presentes en el inmunógeno de la vacuna

del grupo **VC** y de los IDAs de pesos moleculares: 19, 29, 30 y 33 kDa (Fig. 2B) presentes en el inmunógeno de la vacuna del grupo **VS/p38**.

No se detectó reacción en el IB con los dos anticuerpos monoclonales anti-p38 cuando se utilizó el antígeno elaborado a partir del remanente sin p38 utilizado para inmunizar los ratones del grupo **VS/p38** (Fig. 3).

3.2. Respuesta inmune humoral: detección de IgG por la prueba de IFI

Los ratones de los grupos **C** y **CA** fueron negativos y los de los grupos **VC** y **VS/p38** fueron positivos a la prueba de IFI para la detección de IgG previo al desafío (días 13 y 34). Los grupos **VC** y **VS/p38** presentaron diferencias significativas ($P=0,0002$ y $P<0,0001$, respectivamente) en el título de anticuerpos en los dos momentos del sangrado (Fig. 4A).

Al final del ensayo (día 65) no se hallaron diferencias significativas en el título de anticuerpos entre los 4 grupos ($P=0,2891$; ANOVA de una vía) siendo todos positivos a la prueba de IFI (Fig. 4B).

3.3. Respuesta inmune humoral: medición de anticuerpos anti-p38 por la prueba de ELISA-p38

Se analizó la respuesta humoral desarrollada por los ratones de los 4 grupos y se estableció un valor de corte de 0,0932 (índice) (equivalente a una DO= 0,025), para una Se y Sp relativa de 100%, con un valor perfecto de AUC de (AUC= 1) ($IC_{95\%}=0,921-1,0$) para la prueba de ELISA-p38 (Fig. 5 y 6). Se encontraron diferencias significativas en la producción de anticuerpos anti-p38 entre los 4 grupos ($P<0,0001$), siendo el grupo **VC** positivo a la prueba de ELISA-p38, y los grupos **C**,

CA y **VS/p38** negativos a dicha prueba (Fig. 7) previo al desafío. No se hallaron diferencias en los valores de los índices registrados para los grupos **C**, **CA** y **VS/p38** ($P= 0,44$).

El coeficiente de correlación intraclase fue de 0,8743 ($IC_{95\%}= 0,7833- 0,9287$), considerándose un valor de reproducibilidad excelente.

3.4. Respuesta inmune celular previa y posterior al desafío: medición de IL 4

Se encontraron diferencias significativas en la concentración de IL-4 en los sobrenadantes de los esplenocitos provenientes de los bazo de los ratones de los diferentes grupos estimulados *in vitro* al día 34 del ensayo (previo al desafío) ($P= 0,0001$; ANOVA de una vía seguido por la prueba de comparación múltiple de Tukey). El grupo **VC** mostró los mayores valores de producción de IL-4 difiriendo significativamente del resto de los grupos, mientras que en los grupos **C** y **CA** no se detectó producción de IL- 4 (Fig. 8A).

Al medir la concentración de IL-4 en los sobrenadantes de los esplenocitos estimulados *in vitro* al día 65 del ensayo (posterior al desafío) no se hallaron diferencias significativas entre los 4 grupos ($P= 0,1132$; ANOVA de una vía seguido por la prueba de comparación múltiple de Tukey) (Fig. 8B).

Debido a que no ingresó al país el kit comercial para la medición del IFN γ , su cuantificación a partir de los sobrenadantes de los bazo de los ratones no se pudo realizar. Los sobrenadantes se conservaron a -20°C para estudios posteriores.

3.5. Análisis de la severidad de lesiones e inmunohistoquímica en los órganos de los ratones

No se observaron lesiones histopatológicas en cerebro, pulmón, corazón, hígado y riñón de los ratones de los 4 grupos sacrificados al día 34 (previo al desafío).

En los cerebros de los ratones sacrificados al día 65 (posterior al desafío), no se hallaron diferencias significativas en el grado de severidad de las lesiones entre los 4 grupos ($P= 0,07$; Kruskal Wallis, Tabla 1, Fig. 9). No obstante, los mayores promedios de lesiones se registraron en los grupos **C** y **VS/p38**, siendo 2 y 2,4 respectivamente, indicando encefalitis no supurativa, presencia de manguitos perivasculares y necrosis incipiente (Fig. 10).

Se hallaron marcaciones positivas por IHQ en 15/20 (75%) cerebros de ratones sacrificados al día 65 (Tabla 1, Fig. 11).

En pulmón, corazón, hígado y riñón de los ratones sacrificados al día 65 (posterior al desafío), no se hallaron diferencias significativas en el grado de severidad de las lesiones entre los 4 grupos ($P= 0,3$; $0,8$; $0,4$ y $0,7$; respectivamente; Kruskal Wallis, Tabla 2, Fig. 12). No obstante, en los 4 grupos se registraron lesiones en pulmón, corazón e hígado (Fig. 13- 15). En riñón para los grupos **C** y **VC** no se observaron lesiones histopatológicas.

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta se detectaron anticuerpos en los grupos inmunizados previo al desafío, mientras que con la prueba de ELISA-p38 se detectaron anticuerpos solo en el grupo inmunizado con el lisado completo de proteínas solubles. En la IFI están expuestos todos los antígenos de superficie (Dubey y Schares, 2006) del protozoo que fueron reconocidos por los

anticuerpos generados en los ratones, ya sea por el inmunógeno completo, como por el inmunógeno privado de la proteína de superficie p38, lo que permite afirmar que la ausencia de proteína p38 en la vacuna aplicada al grupo **VS/p38**, no afectó la producción de anticuerpos. Al cuantificar la respuesta humoral desarrollada por los ratones por la prueba de IFI previo al desafío, no se observaron diferencias significativas en el nivel de anticuerpos producidos en los grupos vacunados pero se determinó en ellos un incremento importante en la producción de anticuerpos en el segundo sangrado, lo que estaría relacionado con el *booster* recibido a los 14 días posteriores de la primera inmunización. Los grupos controles permanecieron seronegativos en todas las ocasiones de sangrado pre-desafío. Estos resultados no son comparables con los obtenidos en otros estudios dado que en la mayoría de los ensayos de vacunas en modelos murinos se ha determinado la producción de anticuerpos con una prueba de ELISA para diferenciar los subtipos de IgG (Baszler y col., 2000; Lundén y col., 2002; Halderson y col., 2005; Debache y col., 2009; Rojo-Montejo y col., 2011). En este trabajo, no se realizó dicha caracterización y se utilizó la prueba de IFI para detectar IgG en los ratones vacunados, mostrando ser eficiente para este propósito.

La prueba de ELISA-p38 evaluada en este ensayo permitió identificar y diferenciar a los ratones inmunizados con y sin la proteína p38 de *N. caninum*. En los sueros de los ratones inmunizados con proteínas solubles totales se detectaron anticuerpos, mientras que en el suero de los ratones inmunizados con proteínas solubles sin proteína p38, no se detectaron anticuerpos, resultando serológicamente negativos a la prueba. Los ratones de los grupos controles fueron serológicamente negativos previo al desafío. La purificación de la proteína nativa p38 hizo más

específica su detección en la prueba de ELISA. Su ausencia en el preparado permitió diferenciar a los dos grupos de animales inmunizados, sin embargo, este hecho, es decir, la ausencia de la proteína p38, no impidió el reconocimiento de los taquizoítos por los sueros de los ratones de ambos grupos por IFI. Si consideráramos los anticuerpos detectados en los sueros del grupo inmunizado con lisado completo de proteína solubles como equivalente a los sueros de animales infectados naturalmente, podríamos estipular que los animales podrían ser considerados positivos por ambas pruebas, pero podríamos diferenciarlos de los vacunados con el lisado de proteínas solubles sin p38, solo con el ELISA independientemente del momento de la infección.

El resultado obtenido en la evaluación del ELISA-p 38 fue el esperado desde el punto de vista inmunoserológico, de acuerdo a la hipótesis planteada, ya que en este experimento, una proteína, en este caso la p38, fue excluida de uno de las vacunas experimentales administradas, con el propósito de generar una respuesta inmune que permitiera identificar y diferenciar animales vacunados con fórmulas antigénicas distintas en alguno de sus componentes, a través de la prueba de ELISA-p38, que demostró ser exitosa con este propósito. Sin embargo, habría que considerar algunos aspectos en relación con protección conferida frente al desafío por la vacuna experimental sin p38, que se discuten más abajo y que hacen a la elección de la proteína a eliminar.

En el presente trabajo se caracterizó la respuesta inmune celular del perfil Th2 a través de la medición de la concentración de IL-4 en los sobrenadantes de esplenocitos estimulados *in vitro* de los ratones de los 4 grupos previo y posterior al desafío. Los sobrenadantes de los grupos controles no produjeron IL-4 previo al

desafío, coincidente con resultados obtenidos en otros trabajos (Baszler y col., 2000). En cambio, al comparar la concentración de IL-4 en los sobrenadantes de los grupos **VC** y **VS/p38** previo al desafío, se detectaron niveles superiores de IL-4 para el grupo **VC** respecto al grupo **VS/p38**. Se ha reportado que la inmunización con p38 en estado nativo induce un perfil Th2, caracterizado por una alta producción de IL-4 (Halderson y col., 2005). Por lo tanto, los menores niveles de IL-4 detectados en los sobrenadantes del grupo **VS/p38** podría guardar relación con la ausencia de la proteína p38. Cuando se midió la concentración de IL-4 en los sobrenadantes de los ratones sacrificados al final del ensayo, se hallaron niveles de IL-4 en los 4 grupos, sin detectarse diferencias significativas entre ellos.

La protección frente a la encefalitis causada por la neosporosis se relaciona principalmente con un predominio del perfil Th1 (IFN γ e IgG2a), mientras que el perfil Th2 induciría a potenciar la enfermedad (Pinitkiatisakul y col., 2005). No obstante, no es posible realizar conclusiones certeras respecto a la respuesta inmune celular desarrollada, debido a que solamente fue posible medir el perfil Th2.

Se hallaron lesiones histopatológicas compatibles con *N. caninum* en los cerebros de los ratones de los 4 grupos sacrificados al final del ensayo (día 65). No obstante, no se hallaron diferencias significativas en el grado de severidad de las lesiones entre los mismos. Sobre la base de los estudios histopatológicos, se observa una limitada protección conferida por las vacunas frente al desafío. Sin embargo, se detectó un mayor grado de severidad en las lesiones presentes en los cerebros de los ratones del grupo **VS/p38** (promedio de lesión: 2,4) respecto a las halladas en los cerebros de los ratones del grupo **VC** (promedio de lesión: 1,6) y en la distribución del grado de severidad de las lesiones en el pulmón de los ratones del

grupo **VS/p38** (promedio de lesión: 1,9). Estudios de cuantificación de ADN parasitario en los órganos de los ratones permitirían obtener resultados complementarios sobre la protección conferida por las vacunas. Ambas vacunas fueron formuladas con similar concentración de proteínas solubles de *N. caninum* (35 µg) y co-administradas con el mismo adyuvante preparadas de similar modo. La única diferencia entre las vacunas fue la exclusión de la proteína p38 de *N. caninum* en la vacuna utilizada para inmunizar los ratones del grupo **VS/p38**. Se ha demostrado que la proteína p38 de *N. caninum* interviene en los procesos de unión e invasión celular (Hemphill y col., 1999). Más aun, la aplicación de anticuerpos monoclonales anti-p38 *in vitro* resultó una inhibición de la invasión del parásito en las células hospedadoras (Nishikawa y col., 2000). El hecho de que ésta proteína no estuviera presente en la vacuna aplicada al grupo **VS/p38**, podría relacionarse con el mayor grado de severidad de lesiones halladas en los cerebros y pulmones de los ratones, que al carecer de anticuerpos anti-p38, serían más susceptibles a la invasión y diseminación del parásito en dichos órganos. De hecho, un estudio donde se administró una vacuna viva con el virus vaccinia recombinante con genes NcSRS2 en un modelo de ratona gestante fue capaz de proteger la transmisión vertical (Nishikawa y col., 2001). Si bien diferentes autores han comprobado la elevada virulencia del aislamiento NC Spain 7 en modelos murinos y bovinos (Caspe y col., 2012; Regidor-Cerrillo y col., 2012; Dellarupe y col., 2014a; Arranz-Solís y col., 2015b), la dosis de desafío utilizada en el presente trabajo coincide con la dosis estándar aplicada en infecciones experimentales en ratones (Lunden y col., 2002; Debache y col., 2009; Arranz-Solís y col., 2015b). Sin embargo, un trabajo reciente donde se analizó el efecto del suministro de distintas dosis del aislamiento NC-Spain

7 en un modelo de ratona gestante y de neosporosis cerebral (Arranz-Solís y col., 2015b) concluye que independientemente de la cepa utilizada, una dosis de 2×10^6 taquizoítos resulta excesivamente elevada para un ratón y que una dosis tan reducida como 100 taquizoítos de NC-Spain 7 provocó alta mortalidad en las crías y madres en un modelo de ratona gestante. Este hecho, cuya documentación fue reciente (Arranz-Solís y col., 2015b), puede haber influenciado y posiblemente sesgado el análisis del efecto protector de las vacunas evaluadas, generando una situación que desde el punto de vista inmunológico no podría controlar la infección en tales condiciones (Halderson y col., 2005; Arranz-Solís y col., 2015b).

Asimismo los elevados títulos de anticuerpos detectados por la prueba de IFI en todos los grupos al final del ensayo, podrían estar relacionados con la dosis de desafío empleada. Se ha reportado que al administrar una gran cantidad de parásitos, muchos permanecen en estado extracelular y por lo tanto inducen una respuesta humoral considerable (Rojo- Montejo y col., 2012). De lo contrario, dosis menores podrían implicar una mayor internalización de los parásitos por las células presentadoras de antígeno y de este modo inducir una mejor inmunidad celular (Rojo- Montejo y col., 2012).

Se considera que la herramienta diagnóstica y el modelo experimental desarrollado aportan información relevante para el diseño de vacunas. Actualmente, las vacunas vivas son consideradas potencialmente como candidatas para el control de la neosporosis bovina (Williams y col., 2007; Reichel y col., 2015). La metodologías utilizadas para la creación de vacunas de nueva generación sería muy útil para la elaboración de vacunas vivas con cepas atenuadas o transgénicas, en las que los genes codificadores de una determinada proteína sean eliminados

genéticamente (mutantes knock-out). En Estados Unidos y varios países europeos se usa una vacuna marcada en programas de control y erradicación de la enfermedad de Aujeszky en cerdos. La misma se realiza sobre la base de virus vivos modificados, carentes de una glucoproteína específica, la gE. Quint y col. (1987) eliminaron la secuencia que codifica la glucoproteína E de la cepa NIA3, resultando en una vacuna marcada eficiente, que permitió la diferenciación entre animales vacunados e infectados, pero al mismo tiempo protege contra los signos clínicos y reduce considerablemente el nivel de excreción vírica. Se han desarrollado pruebas comerciales basadas en la detección de anticuerpos dirigidos contra esta proteína (Pensaert y col., 2004; Meeusen y col., 2007; OIE, 2012). Por otro lado, en Estados Unidos, se utiliza la vacuna viva RB-51 de *Brucella abortus* para el control de la brucelosis bovina. La vacuna proviene de la cepa mutante rugosa de *B. abortus* que carece de lipopolisacáridos O en su membrana externa y por lo tanto no induce producción de anticuerpos hacia LPS O (Schuring y col., 2001; Meeusen y col., 2007). La aplicación de esta vacuna es práctica desde el punto de vista diagnóstico ya que no interfiere con la serología (Meeusen y col., 2007).

En este sentido y basado en los resultados de este ensayo, sería importante analizar qué proteína sería conveniente silenciar, caracterizando su rol, de manera que no resulte relevante en la inmunidad y que por lo tanto su eliminación genere una respuesta protectora adecuada en el hospedador.

TABLAS Y FIGURAS DEL CAPÍTULO III

Tablas

Tabla 1. Registro de la severidad de lesiones en los cerebros de los 4 grupos.

Grupo	HP ^a	Severidad de la lesión				Puntuación+/- DS	IHQ ^b
		Nula (n)	Leve (n)	Moderada (n)	Severa (n)		
VC	6/7	1	1	5	-	1,6±0,8	3/5
VS/p38	7/7	-	-	4	3	2,4±0,5	5/7
CA	6/6	-	3	3	-	1,5±0,5	2/3
C	5/6	1	-	3	2	2±1	5/5

^aNúmero de ratones con lesiones HP/ total de ratones analizados

^bNúmero de ratones positivos a IHQ/total de ratones analizados por IHQ

Tabla 2. Registro de la severidad de lesiones en diversos órganos de los 4 grupos.

Grupo	Órgano	HP ^a	Severidad de la lesión				Puntuación+/- DS
			Nula (n)	Leve (n)	Moderada (n)	Severa (n)	
Pulmón							
VC		4/7	3	3	-	1	0,9±1
VS/p38		6/7	1	1	3	2	1,9±1
CA		4/6	2	2	1	1	1,2±1,2
C		6/6	-	4	2	-	1,3±0,5
Corazón							
VC		2/7	5	2	-	-	0,3±0,5
VS/p38		1/7	6	-	-	1	0,4±1,1
CA		2/6	4	1	1	-	0,6±0,9
C		1/6	5	1	-	-	0,2±0,4
Hígado							
VC		6/7	1	3	3	-	1,3±0,8
VS/p38		5/7	2	4	1	-	0,9±0,7
CA		4/6	2	3	1	-	0,8±0,8
C		6/6	-	4	2	-	1,3±0,5
Riñón							
VC		0/7	7	-	-	-	0±0
VS/p38		1/7	6	1	-	-	0,14±0,4
CA		1/6	5	1	-	-	0,2±0,4
C		0/6	6	-	-	-	0±0

^aNúmero de ratones con lesiones HP/ total de ratones analizados

Figuras

Figura 1. Diseño experimental

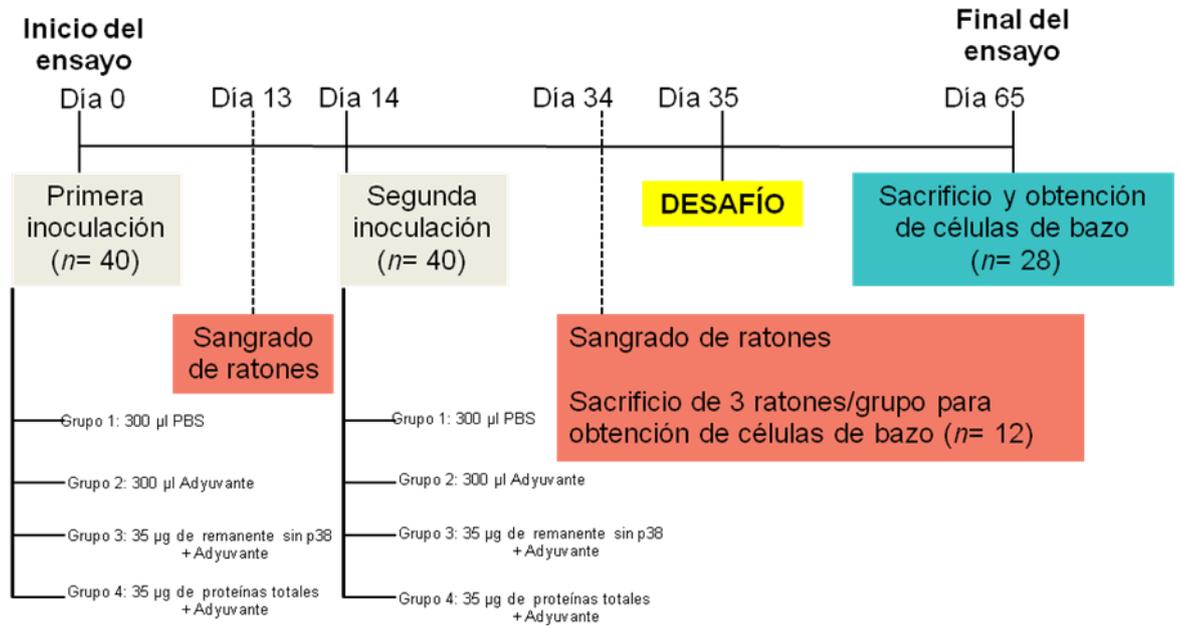
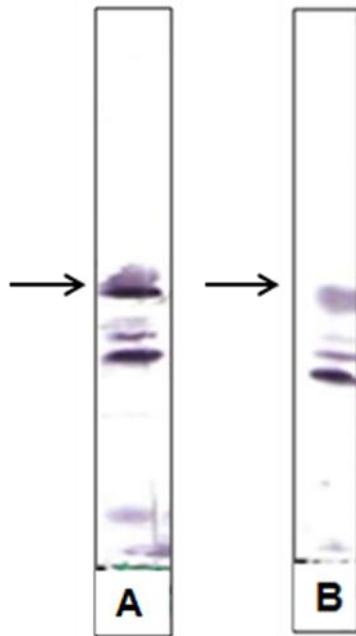
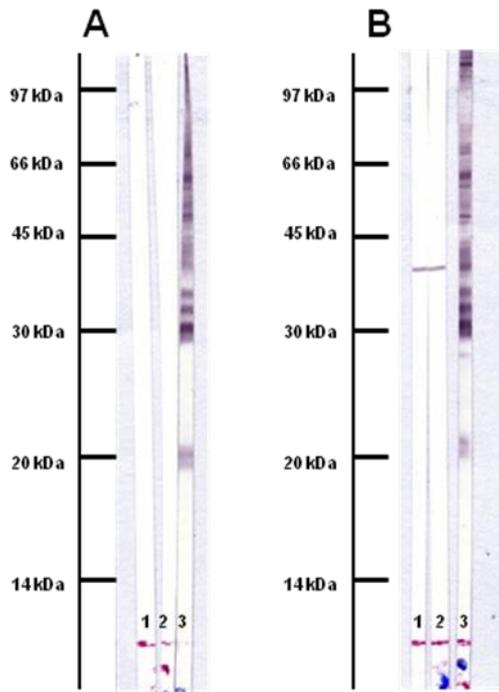


Figura 2. Detección de antígenos inmunodominantes (IDAs) de *N. caninum* en los inmunógenos administrados a los grupos **VC** y **VS/p38** analizados con un suero policlonal de una vaquillona infectada experimentalmente.



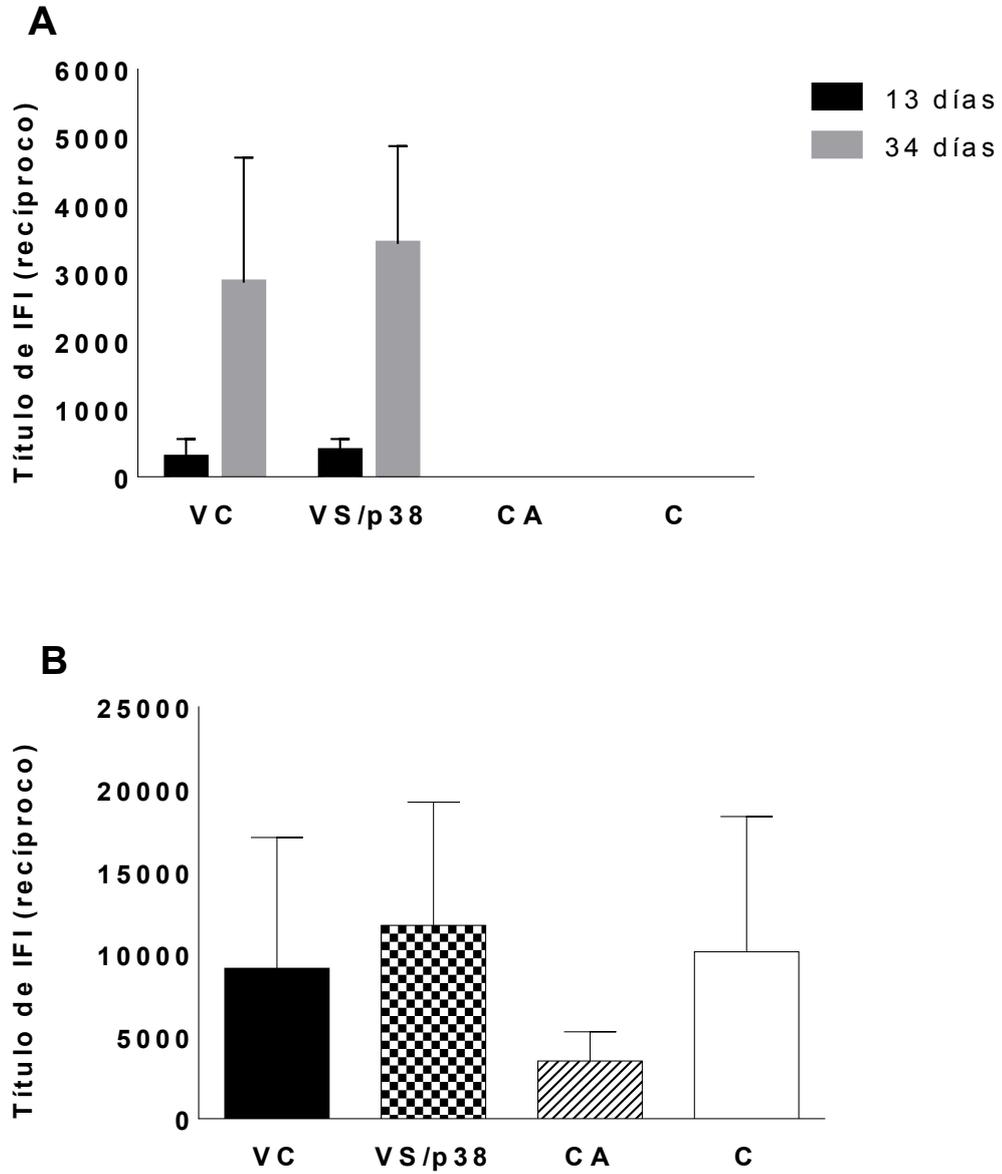
*(A) lisado completo de proteínas solubles de *N. caninum* del grupo **VC**; (B) lisado de proteínas solubles sin p38 de *N. caninum* del grupo **VS/p38**. La flecha indica la diferencia en la reacción hacia la proteína p38.

Figura 3. Detección de antígenos inmunodominantes (IDAs) de *N. caninum* en inmunógeno administrado al grupo **VS/p38** analizado con anticuerpos monoclonales anti-p38 4.12.12 (líneas 1), 5.2.15 (líneas 2) y suero policlonal de un bovino experimentalmente infectado (líneas 3).



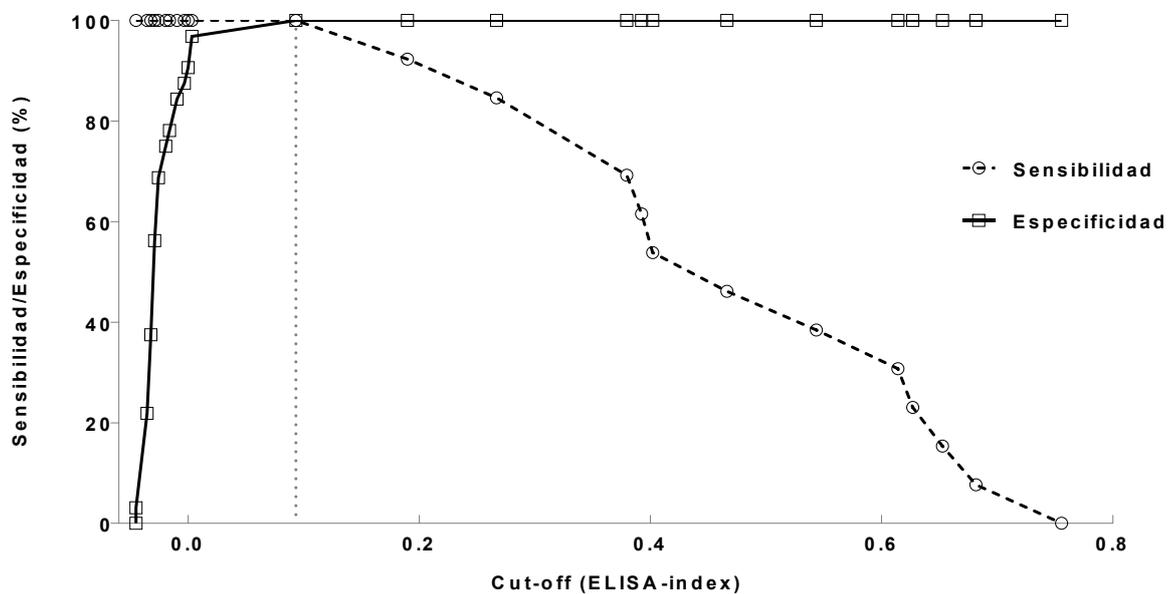
* (A) alícuota libre de p38; (B) alícuota con restos de proteína p38.

Figura 4. Respuesta humoral representada por la media de los títulos de IFI de los 4 grupos. Las barras de errores indican el desvío estándar.



* (A) días 13 y 34; (B) día 65.

Figura 5. Sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) relativa para la prueba de ELISA-p38 a distintos puntos de corte.



* la línea punteada vertical indica el punto de corte= 0,0932.

Figura 6. Curva ROC de la prueba de ELISA-p38 para suero de ratones pre-desafío.

Área bajo la curva = 1; 0,92 a 1,0 intervalo de confianza de un 95%.

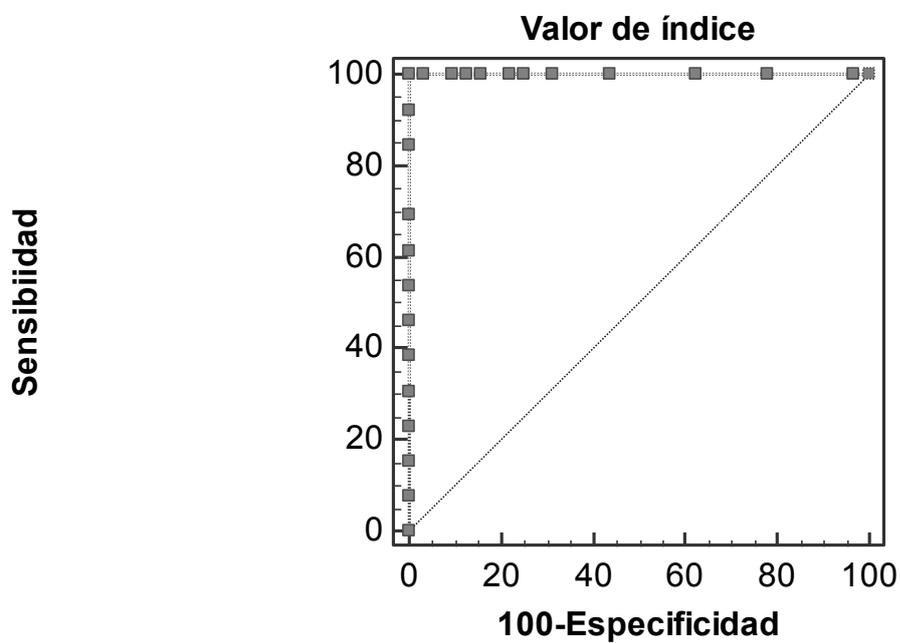
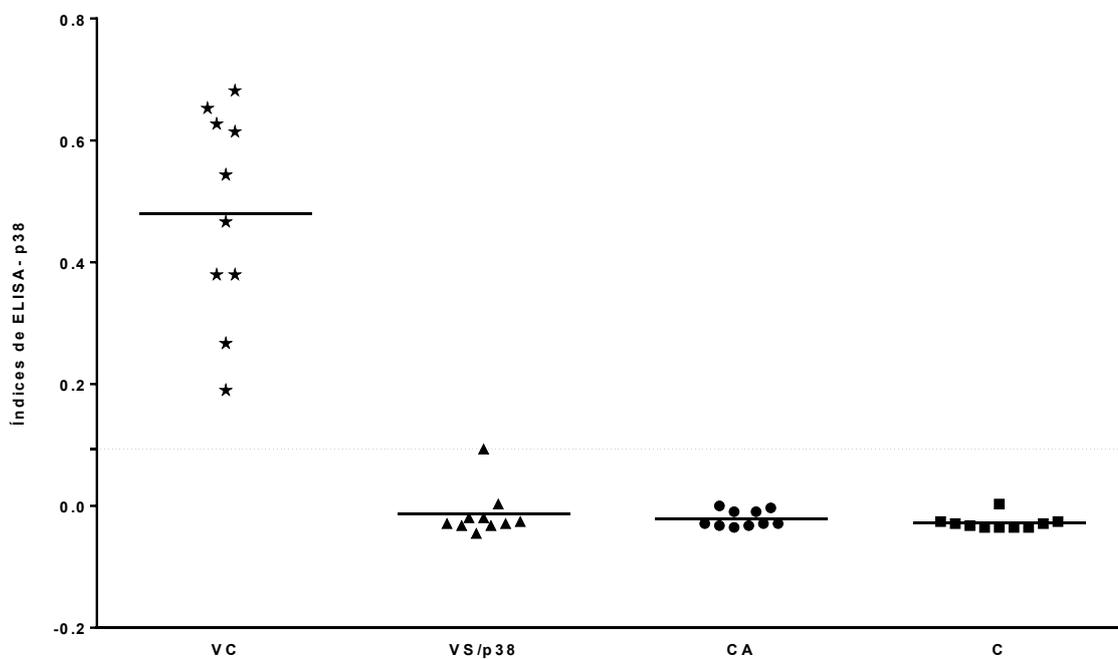
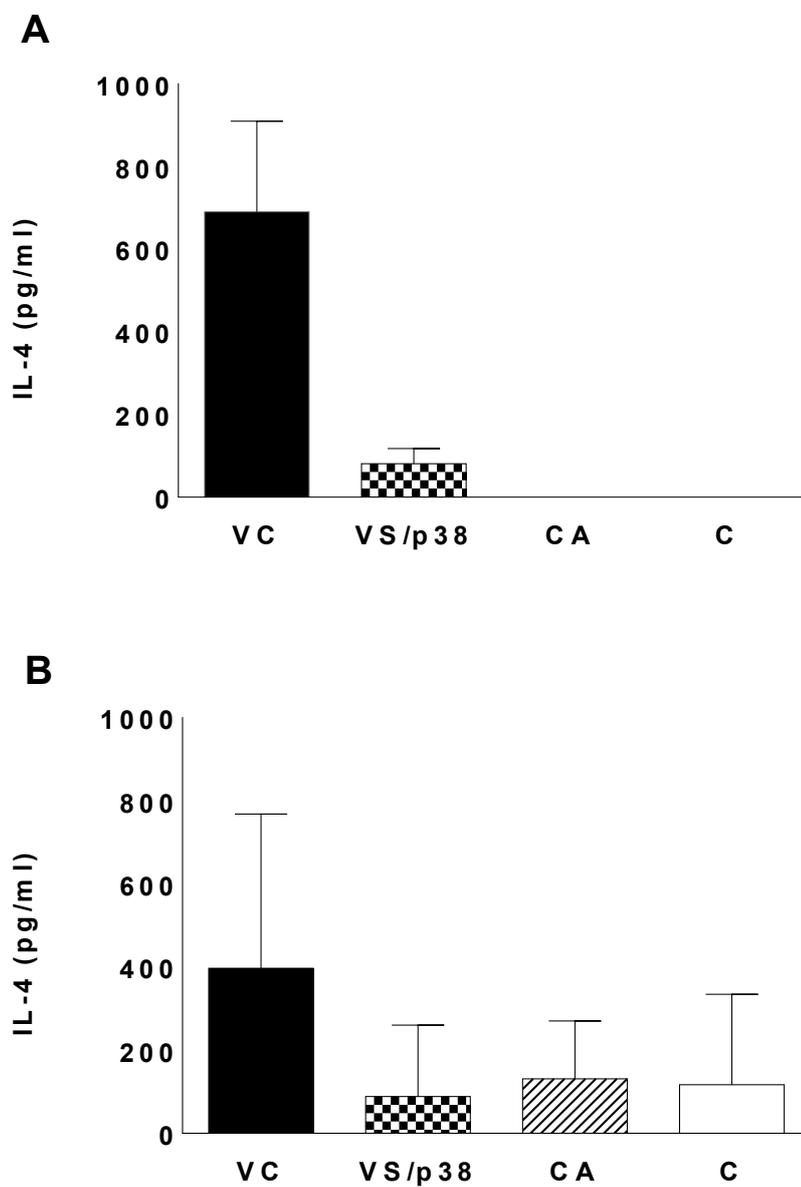


Figura 7. Evaluación de producción de anticuerpos anti-p38 desarrollados por los 4 grupos al día 34 del inicio del ensayo con la prueba de ELISA-p38. Se grafican los valores de los índices y las líneas horizontales representan los valores medios.



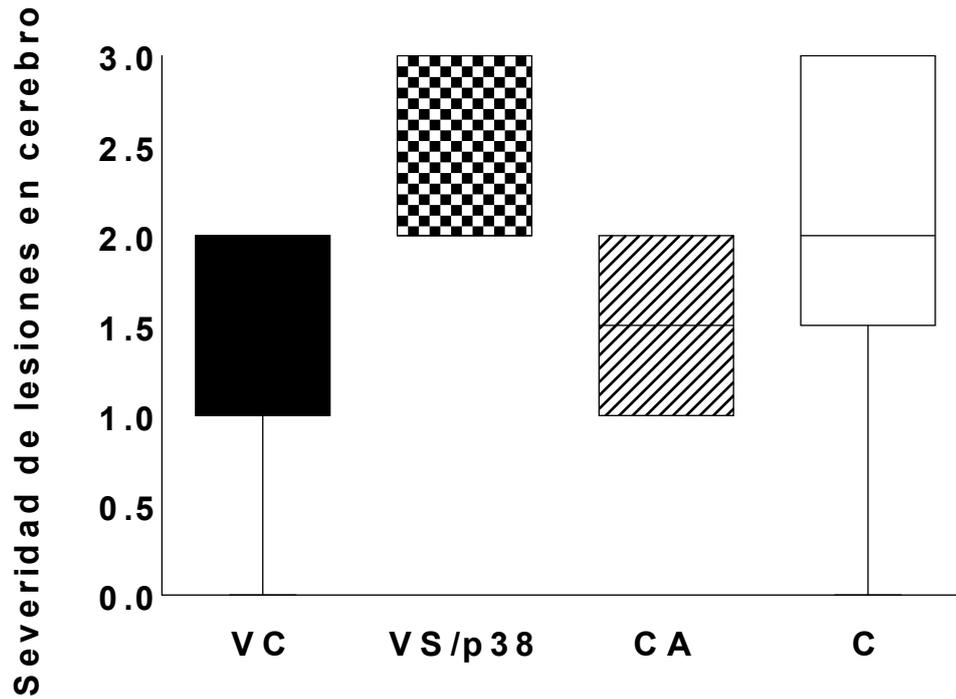
* la línea punteada horizontal indica el punto de corte= 0,0932.

Figura 8. Concentración de IL-4 de los sobrenadantes de los esplenocitos estimulados *in vitro*.



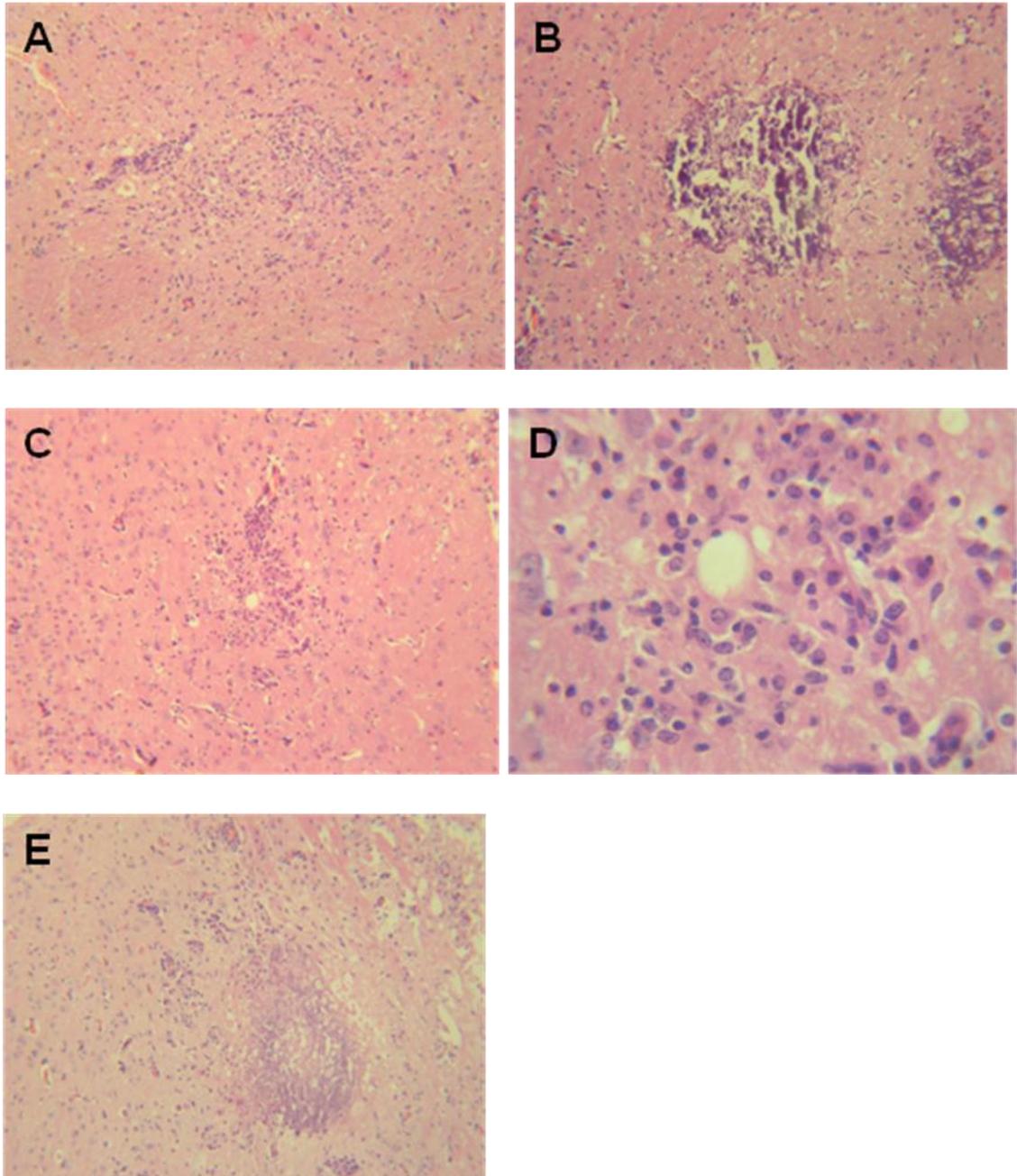
* (A) estimulación al día 34; (B) estimulación al día 65. Las barras indican la media y las barras de error el desvío estándar.

Figura 9. Severidad de las lesiones HP halladas en los cerebros de los ratones sacrificados al día 65 en los 4 grupos experimentales. La línea horizontal indica el valor de la mediana que para los grupos VC y VS/p38 coincide con el límite superior e inferior respectivamente.



* 0= sin lesiones, 1= encefalitis no supurativa leve y gliosis focal, 2= encefalitis no supurativa, manguitos perivasculares y necrosis incipiente, 3= encefalitis no supurativa severa, necrosis, infiltrado inflamatorio no supurativo con presencia de abundantes macrófagos.

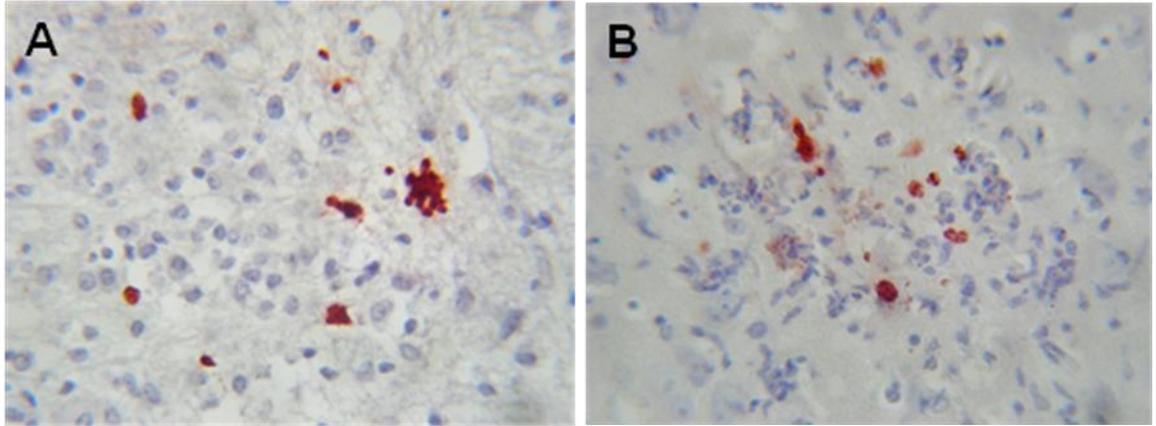
Figura 10. Microfotografías de lesiones en SNC de ratones experimentales.



*(A) presencia de un manguito perivascular y un foco de encefalitis no supurativa rodeada por gliosis y desorganización tisular y foco de necrosis, ratón del grupo C (H/E, X100); (B) severa área focal de mineralización del SNC como secuela de una necrosis localizada, ratón del grupo VC (H/E, X100); (C) foco de gliosis severa, ratón del grupo VS/p38 (H/E, X100); (D) severa vacuolización del estroma y

desorganización tisular acompañando a la gliosis focalizada, ratón del grupo VS/p38 (H/E, X400); (E) severa encefalitis necrotizante no supurativa y prominente vacuolización tisular (H/E, X100), ratón del grupo VS/p38.

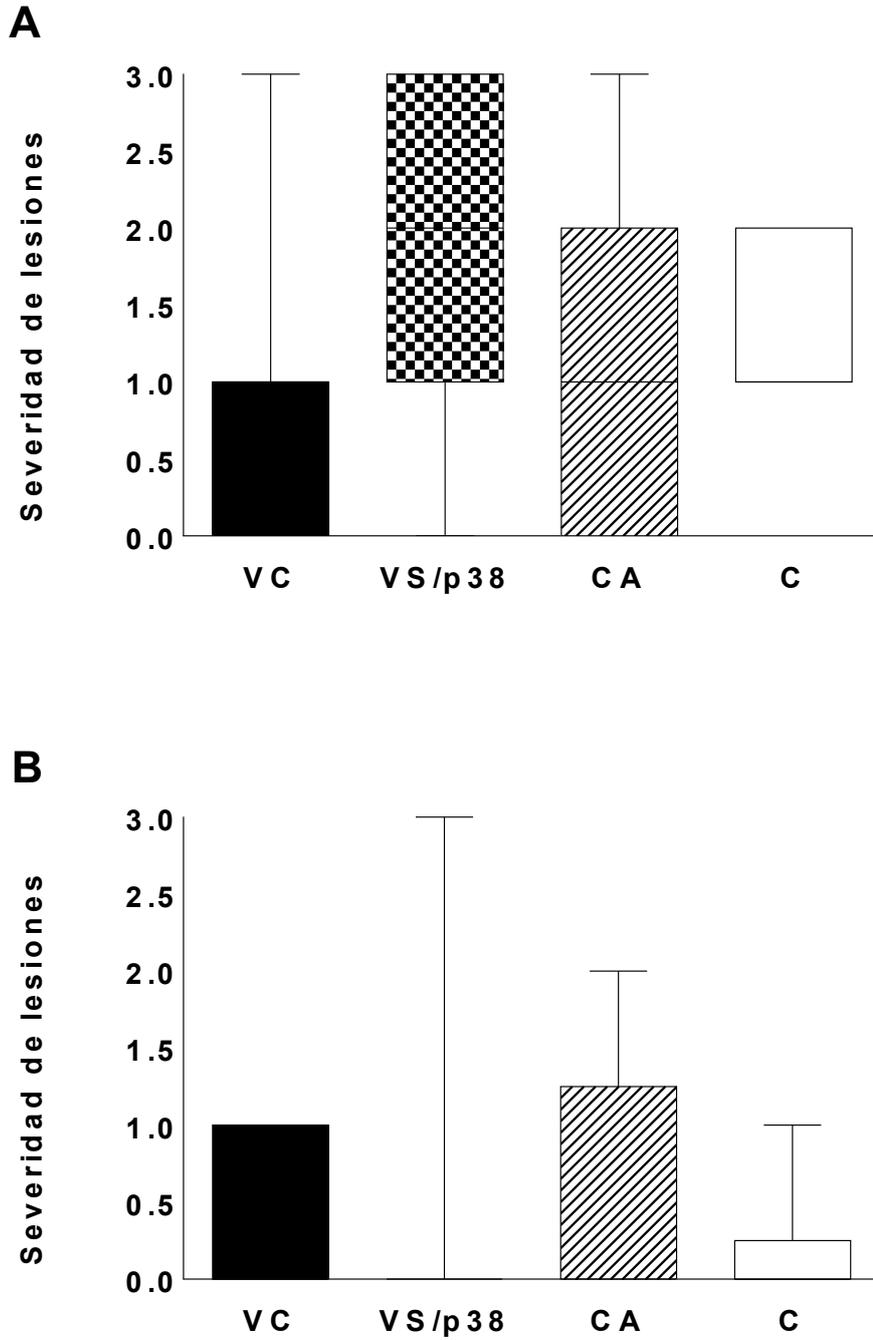
Figura 11. Microfotografías de secciones del SNC donde se observan grupos de taquizoítos de *N. caninum* inmumarcados mediante IHQ.

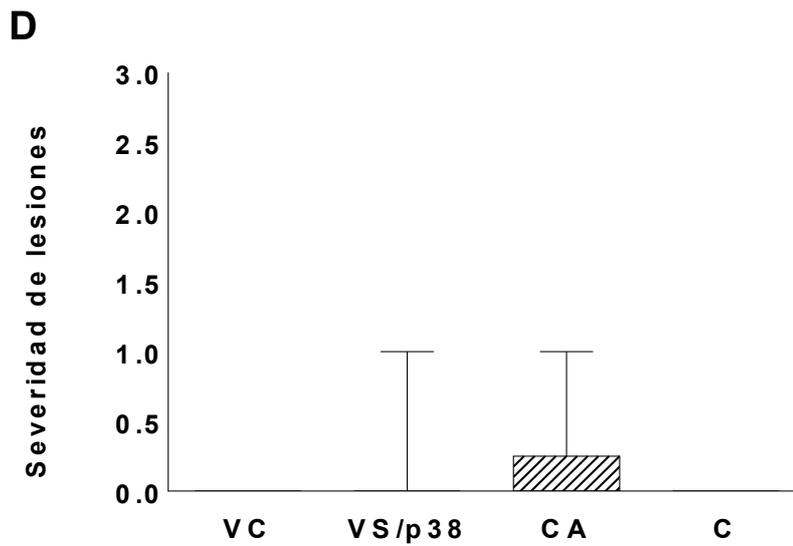
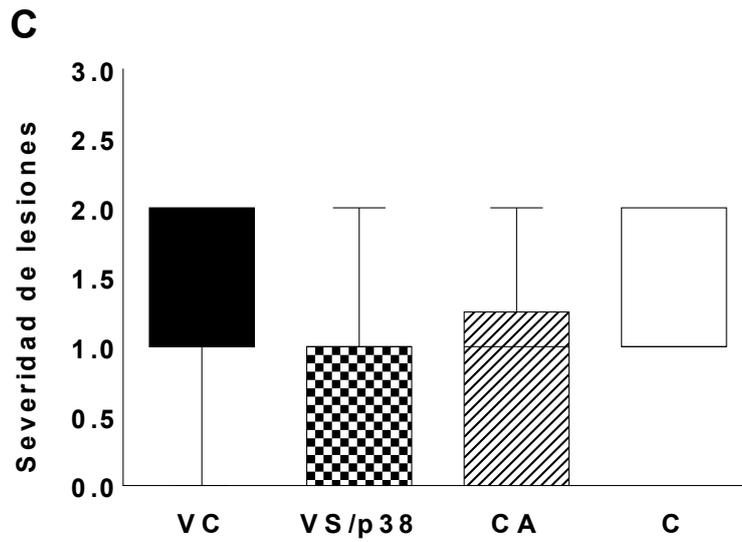


*(A) sección con área con escasa gliosis, ratón del grupo C; (B) sección con una severa encefalitis focal necrotizante, ratón del grupo VS/p38 (ABC, X400).

Figura 12. Severidad de lesiones HP halladas en pulmón (A), corazón (B), hígado (C) y riñón (D) de los ratones sacrificados al día 65 en los 4 grupos experimentales.

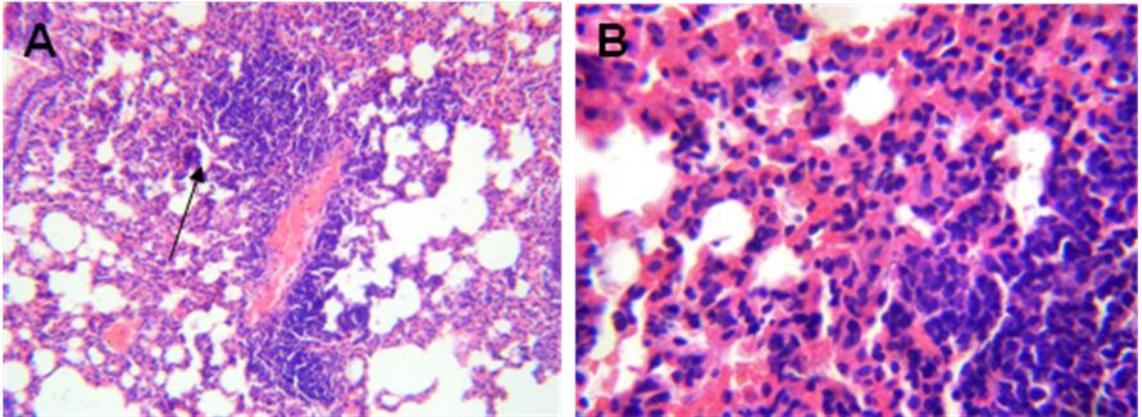
La línea horizontal indica el valor de la mediana.





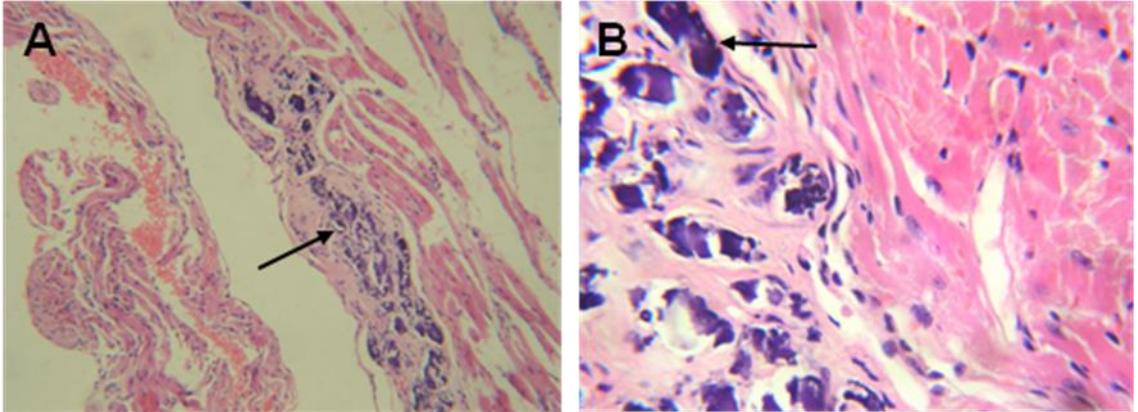
*0= sin lesiones, 1= infiltrado inflamatorio no supurativo leve, 2= infiltrado inflamatorio no supurativo moderado, 3= infiltrado inflamatorio no supurativo severo, necrosis y/o calcificación.

Figura 13. Microfotografías de lesiones en pulmón de un ratón del grupo VS/p38.



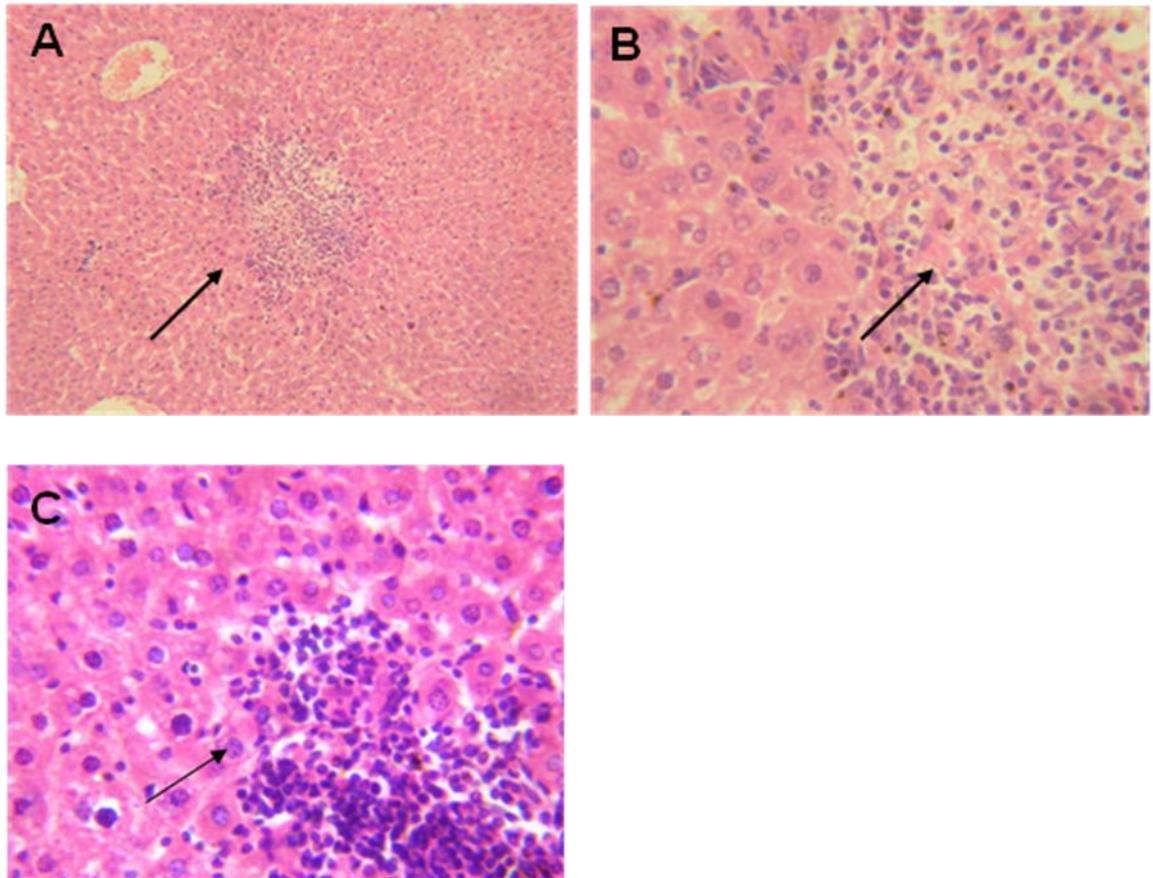
*(A) severa neumonía intersticial (flecha) con áreas de enfisema alveolar y congestión vascular (H/E, X10); (B) sección donde se observa células inflamatorias mononucleares en el intersticio con marcada congestión y enfisema alveolar (H/E, X40).

Figura 14. Microfotografías de lesiones de corazón de un ratón del grupo CA.



* marcada mineralización de miofibrillas en (A) (H/E, 10X) y (B) (H/E, X40).

Figura 15. Microfotografías de lesiones en hígado de ratones experimentales.



* (A) hepatitis focal mixta (flecha), ratón del grupo C (H/E, X10); (B) idem sección anterior (H/E, X40) (B) (H/E, X100); (C) notar la vacuolización de hepatocitos con marginación de la cromatina nuclear, otros hepatocitos con condensación de la cromatina, adyacentes al foco inflamatorio. Se evidencia la presencia de células inflamatorias mononucleares y polimorfos nucleares, con retención de pigmento biliar (flechas) en dicha área inflamatoria, ratón del grupo VC.

CONCLUSIONES FINALES

- La prueba de ELISA-p38 ha demostrado un buen desempeño y una adecuada *performance* para el diagnóstico de la neosporosis bovina en Argentina.
- Mediante la prueba de IFI se detectaron anticuerpos en los grupos de ratones inmunizados previo al desafío, mientras que con la prueba de ELISA-p38, se detectaron anticuerpos solo en el grupo inmunizado con el lisado completo de proteínas solubles.
- En los sueros de los ratones inmunizados con lisado completo de proteínas solubles se detectaron anticuerpos, mientras que en el suero de los ratones inmunizados con lisado de proteínas solubles sin p38, no se detectaron anticuerpos, resultando serológicamente negativos a la prueba de ELISA-p38.
- La prueba de ELISA-p38 en el modelo murino permitió identificar y diferenciar a los ratones inmunizados con y sin la proteína p38 de *N. caninum*.
- Al comparar la concentración de IL-4 en los sobrenadantes de los grupos inmunizados con lisado completo de proteínas solubles y sin p38 previo al desafío, se detectaron niveles superiores de IL-4 para el primer grupo con respecto al segundo.
- Los ratones inmunizados con la vacuna oleosa de *N. caninum* sin p38 tuvieron mayor severidad de lesiones en cerebro y pulmón, por lo que se considera que el

preparado vacunal sin p38 no otorgó suficiente protección frente al desafío con una cepa de alta virulencia. Por lo tanto, la presencia de esta proteína sería necesaria para generar una respuesta inmune protectora.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aucouturier J, Dupuis L, Ganne V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine*. 2001; 19: 2666-2672.

Almería S, De Marez T, Dawson H, Araujo R, Dubey JP, Gasbarre LC. Cytokine gene expression in dams and fetuses after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. *Parasite Immunol*. 2003; 25: 383-392.

Almería S, López-Gatius F. Bovine neosporosis: Clinical and practical aspects. *Res Vet Science*. 2013; 95: 303-309.

Álvarez-García G, Collantes-Fernández E, Costas E, Rebordosa X, Ortega-Mora LM. Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods in bovine neosporosis. *Vet Res*. 2003; 34: 341-352.

Álvarez-García G, García-Culebras A, Gutiérrez-Expósito D, Navarro-Lozano V, Pastor-Fernández I, Ortega-Mora LM. Serological diagnosis of bovine neosporosis: A comparative study of commercially available ELISA tests. *Vet Parasitol*. 2013; 198: 85-95.

Alves Neto AF, Bandini LA, Nishi SM, Soares RM, Driemeier D, Antoniassi NA, Schares G, Gennari SM. Viability of sporulated oocysts of *Neospora caninum* after

exposure to different physical and chemical treatments. J Parasitol. 2011; 97: 135-139.

Andreotti R, Matos Mde F, Gonçalves KN, Oshiro LM, Lima-Junior MS, Paiva F, Leite FL. Comparison of indirect ELISA based on recombinant protein NcSRS2 and IFAT for detection of *Neospora caninum* antibodies in sheep. Rev Bras Parasitol Vet. 2009; 18: 19-22.

Andrianarivo AG, Barr BC, Anderson ML, Rowe JD, Packham AE, Sverlow KW, Conrad PA. Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum*. Parasitol Res. 2001; 87: 817-825.

Andrianarivo AG, Choromanski L, McDonough SP, Packham AE, Conrad PA. Immunogenicity of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite preparation formulated with different adjuvants. Int J Parasitol. 1999; 29: 1613-1625.

Anon. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. En: OIE Terrestrial Manual. 2008, capítulo 1.1.4, p. 12.

Arranz-Solís D, Benavides J, Regidor-Cerrillo J, Fuertes M, Ferre I, Ferreras Mdel C, Collantes-Fernández E, Hemphill A, Pérez V, Ortega-Mora LM. Influence of the gestational stage on the clinical course, lesional development and parasite distribution in experimental ovine neosporosis. Vet Res. 2015a; 46: 19.

Arranz-Solís D, Aguado-Martínez A, Müller J, Regidor-Cerrillo J, Ortega-Mora LM, Hemphill A. Dose-dependent effects of experimental infection with the virulent *Neospora caninum* Nc-Spain7 isolate in a pregnant mouse model. *Vet Parasitol.* 2015b; 211: 133-140.

Bacigalupe D, Basso W, Caspe SG, Moré G, Lischinsky L, Gos ML, Leunda M, Campero L, Moore DP, Schares G, Campero CM, Venturini MC. *Neospora caninum* NC-6 Argentina induces fetopathy in both serologically positive and negative experimentally inoculated pregnant dams. *Parasitol Res.* 2013; 112: 2585-2592.

Bandini LA, Neto AF, Pena HF, Cavalcante GT, Schares G, Nishi SM, Gennari SM. Experimental infection of dogs (*Canis familiaris*) with sporulated oocysts of *Neospora caninum*. *Vet Parasitol.* 2011; 176: 151-156.

Bartley PM, Kirvar E, Wright S, Swales C, Esteban-Redondo I, Buxton D, Maley SW, Schock A, Rae AG, Hamilton C, Innes EA. Maternal and fetal immune responses of cattle inoculated with *Neospora caninum* at mid-gestation. *J Comp Pathol.* 2004; 130: 81-91.

Basso W, Moré G, Quiroga MA, Balducchi D, Schares G, Venturini MC. *Neospora caninum* is a cause of perinatal mortality in axis deer (*Axis axis*). *Vet Parasitol.* 2014; 199: 255-258.

Basso W, Schares S, Minke L, Bärwald A, Maksimov A, Peters M, Schulze C, Müller M, Conraths FJ, Schares G. Microsatellite typing and avidity analysis suggest a common source of infection in herds with epidemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Vet Parasitol.* 2010; 173: 24-31.

Basso W, Venturini L, Venturini MC, Hill DE, Kwok OC, Shen SK, Dubey JP. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *J Parasitol.* 2001; 87: 612-618.

Baszler TV, McElwain TF, Mathison BA. Immunization of BALB/c mice with killed *Neospora caninum* tachyzoite antigen induces a type 2 immune response and exacerbates encephalitis and neurological disease. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000; 7: 893-898.

Bernagozzi J, Barragan J, Anselmino F. En: *Vacunas en veterinaria: aspectos generales.* Edición del Autor. La Plata, Argentina. 2014, p.18-48.

Bjerkas I, Mohn SF, Presthus J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z Parasitenkd.* 1984; 70: 271-274.

Björkman C, McAllister MM, Frossling J, Naslund K, Leung F, Uggla A. Application of the *Neospora caninum* IgG avidity ELISA in assessment of chronic reproductive losses after an outbreak of neosporosis in a herd of beef cattle. *J Vet Diagn Invest.* 2003; 15: 3-7.

Björkman C, Uggla A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. Int J Parasitol. 1999; 29: 1497-1507.

Buxton D, Maley SW, Wright S, Thomson KM, Rae AG, Innes EA. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. J Comp Pathol. 1998; 118: 267-279.

Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. Stat Methods Med Res. 1999; 8: 135-160.

Caetano-da-Silva A, Ferre I, Collantes-Fernández E, Navarro V, Aduriz G, Ugarte-Garagalza C, Ortega-Mora LM. Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. Theriogenology. 2004; 62: 1329-1336.

Calandra PM, Di Matía JM, Cano DB, Odriozola ER, García JA, Späth EJ, Odeón AC, Paolicchi FA, Morrell EL, Campero CM, Moore DP. Endemic and epidemic bovine neosporosis: description of two events in beef cattle. Rev Argent Microbiol. 2014; 46: 315-319.

Campero CM. Opciones para el control de la neosporosis bovina. Rev Taurus. 2014; 16: 4-15.

Campero CM, Anderson ML, Conosciuto G, Odriozola H, Bretschneider G, Poso MA. *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in Argentina. *Vet Rec.* 1998; 143: 228-229.

Campero CM, Moore DP, Lagomarsino H, Odeón AC, Castro M, Visca H. Serological Status and Abortion Rate in Progeny Obtained by Natural Service or Embryo Transfer from *Neospora caninum*-Seropositive Cows. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2003; 50: 458-460.

Campero CM, Moore DP, Odeón AC, Cipolla AL, Odriozola E. Aetiology of bovine abortion in Argentina. *Vet Res Commun.* 2003; 27: 359-369.

Campero LM, Venturini MC, Moore DP, Massola L, Lagomarsino H, García B, Bacigalupe D, Rambeaud M, Pardini L, Leunda MR, Schares G, Campero CM. Isolation and molecular characterization of a new *Neospora caninum* isolate from cattle in Argentina. *Exp Parasitol.* 2015; 155: 8-12.

Canada N, Meireles CS, Ferreira P, Correia da Costa JM, Rocha A. Artificial insemination of cows with semen in vitro contaminated with *Neospora caninum* tachyzoites failed to induce neosporosis. *Vet Parasitol.* 2006; 139: 109-114.

Caspe SG, Moore DP, Leunda MR, Cano DB, Lischinsky L, Regidor-Cerrillo J, Álvarez-García G, Echaide IE, Bacigalupe D, Ortega Mora LM, Odeón AC, Campero CM. The *Neospora caninum*-Spain 7 isolate induces placental damage, fetal death

and abortion in cattle when inoculated in early gestation. *Vet Parasitol.* 2012; 189: 171-181.

Collantes-Fernández E, Álvarez-García G, Pérez-Pérez V, Pereira-Bueno J, Ortega-Mora LM. Characterization of pathology and parasite load in outbred and inbred mouse models of chronic *Neospora caninum* infection. *J Parasitol.* 2004; 90: 579-583.

Conraths F, Schares G. Validation of molecular diagnostic techniques in the parasitological laboratory. *Vet Parasitol.* 2006; 136: 91-98.

Davison HC, Otter A, Trees AJ. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *Int J Parasitol.* 1999; 29: 1683-1689.

Debache K, Alaeddine F, Guionaud C, Monney T, Müller J, Strohbusch M, Leib SL, Grandgirard D, Hemphill A. Vaccination with recombinant NcROP2 combined with recombinant NcMIC1 and NcMIC3 reduces cerebral infection and vertical transmission in mice experimentally infected with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int J Parasitol.* 2009; 39: 1373-1384.

Dellarupe A, Regidor-Cerrillo J, Jiménez-Ruiz E, Schares G, Unzaga JM, Venturini MC, Ortega-Mora LM. Clinical outcome and vertical transmission variability among

canine *Neospora caninum* isolates in a pregnant mouse model of infection. *Parasitology*. 2014a; 141: 356-366.

Dellarupe A, Regidor-Cerrillo J, Jiménez-Ruiz E, Schares G, Unzaga JM, Venturini MC, Ortega-Mora LM. Comparison of host cell invasion and proliferation among *Neospora caninum* isolates obtained from oocysts and from clinical cases of naturally infected dogs. *Exp Parasitol*. 2014b; 145: 22-28.

Dubey JP, Barr BC, Barta JR, Bjerkås I, Björkman C, Blagburn BL, Bowman DD, Buxton D, Ellis JT, Gottstein B, Hemphill A, Hill DE, Howe DK, Jenkins MC, Kobayashi Y, Koudela B, Marsh AE, Mattsson JG, McAllister MM, Modrý D, Omata Y, Sibley LD, Speer CA, Trees AJ, Uggla A, Upton SJ, Williams DJ, Lindsay DS. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *Int J Parasitol*. 2002; 32: 929-946.

Dubey JP, Buxton D, Wouda W. Pathogenesis of bovine neosporosis. *J Comp Pathol*. 2006; 134: 267-289.

Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Uggla A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 1988a; 192: 1269-1285.

Dubey JP, Hattel AL, Lindsay DS, Topper MJ. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J Am Vet Med Assoc*. 1988b; 193: 1259-1263.

Dubey JP, Jenkins MC, Ferreira LR, Choudhary S, Verma SK, Kwok OC, Fetterer R, Butler E, Carstensen M. Isolation of viable *Neospora caninum* from brains of wild gray wolves (*Canis lupus*). *Vet Parasitol.* 2014; 201: 150-153.

Dubey JP, Jenkins MC, Rajendran C, Miska K, Ferreira LR, Martins J, Kwok OC, Choudhary S. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. *Vet Parasitol.* 2011; 181: 382-387.

Dubey JP, Leathers CW, Lindsay DS. *Neospora caninum*-like protozoon associated with fatal myelitis in newborn calves. *J Parasitol.* 1989; 75: 146-148.

Dubey JP, Lindsay DS. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol.* 1996; 67: 1-59.

Dubey JP, Lindsay DS. Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocysts. *Parasitol Res.* 2000; 86: 165-168.

Dubey JP, Schares G. Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet Parasitol.* 2006; 140: 1-34.

Dubey JP, Schares G. Neosporosis in animals-The last five years. *Vet Parasitol.* 2011; 180: 90-108.

Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. Clin Microbiol Rev. 2007; 20: 323-367.

Dubey JP, Sreekumar C, Knickman E, Miska KB, Vianna MC, Kwok OC, Hill DE, Jenkins MC, Lindsay DS, Greene CE. Biologic, morphologic, and molecular characterisation of *Neospora caninum* isolates from littermate dogs. Int J Parasitol. 2004; 34: 1157-1167.

Echaide IE, Valentini B, Baszler TV. Detección de anticuerpos contra *Neospora caninum* en bovinos de la cuenca lechera de Santa Fe y Córdoba. Resultados preliminares. XII Reunión Científico Técnica, Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico, Mar del Plata. 1998; p. 71.

Echaide IE, Valentini B, Mondino D, Torioni S. Neosporosis bovina: análisis seropediemiológico de un hato lechero mediante IFA y ELISA. XIV Reunión Científico Técnica, Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico, Villa General Belgrano, Córdoba. PAR-01.

Entrican G. Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. J Comp Pathol. 2002; 126: 79-94.

French NP, Clancy D, Davison HC, Trees AJ. Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control. Int J Parasitol. 1999; 29: 1691-1704.

Ferre I, Aduriz G, Del-Pozo I, Regidor-Cerrillo J, Atxaerandio R, Collantes-Fernández E, Hurtado A, Ugarte-Garagalza C, Ortega-Mora LM. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. *Theriogenology*. 2005; 63: 1504-1518.

Fleis JL. The design and analysis of clinical experiments. New York: John Wiley and Sons. 1986.

Fort M, Edelsten M, Maley S, Innes E. Seroepidemiological study of *Neospora caninum* in beef and dairy cattle in La Pampa, Argentina. *Acta Parasitol*. 2015; 60: 275-282.

Gondim LF, McAllister MM, Pitt WC, Zemlicka DE. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol*. 2004; 34: 159-161.

Greiner M, Gardner IA. Application of diagnostic tests in veterinary epidemiologic studies. *Prev Vet Med*. 2000; 45: 43-59.

Haldorson GJ, Mathison BA, Wenberg K, Conrad PA, Dubey JP, Trees AJ, Yamane I, Baszler TV. Immunization with native surface protein NcSRS2 induces a Th2 immune response and reduces congenital *Neospora caninum* transmission in mice. *Int J Parasitol*. 2005; 35: 1407-1415.

Hecker YP, Cóceres V, Wilkowsky SE, Jaramillo Ortiz JM, Morrell EL, Verna AE, Ganuza A, Cano DB, Lischinsky L, Angel SO, Zamorano P, Odeón AC, Leunda MR, Campero CM, Morein B, Moore DP. A *Neospora caninum* vaccine using recombinant proteins fails to prevent foetal infection in pregnant cattle after experimental intravenous challenge. *Vet Immunol Immunopathol.* 2014; 162: 142-153.

Hecker YP, Moore DP, Quattrocchi V, Regidor-Cerrillo J, Verna A, Leunda MR, Morrell E, Ortega-Mora LM, Zamorano P, Venturini MC, Campero CM. Immune response and protection provided by live tachyzoites and native antigens from the NC-6 Argentina strain of *Neospora caninum* in pregnant heifers. *Vet Parasitol.* 2013; 197: 436-446.

Hecker YP, Venturini MC, Campero CM, Odeón AC, Moore DP. Avances en el desarrollo de vacunas contra la neosporosis bovina. *Rev Argent Microbiol.* 2012; 44: 216-230.

Hemphill A, Fuchs N, Sonda S, Hehl A. The antigenic composition of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol.* 1999; 29: 1175-1188.

Hemphill A, Gajendran N, Sonda S, Fuchs N, Gottstein B, Hentrich B, Jenkins M.. Identification and characterisation of a dense granule associated protein in *Neospora caninum* tachyzoites. *Int J Parasitol.* 1998; 28: 429-438.

Hosseininejad M, Hosseini F, Mosharraf M, Shahbaz S, Mahzounieh M, Schares G. Development of an indirect ELISA test using an affinity purified surface antigen (P38) for sero-diagnosis of canine *Neospora caninum* infection. *Vet Parasitol.* 2010; 171: 337-342.

Innes EA. The host-parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora caninum*. *Parasitol.* 2007; 134: 1903-1910.

Innes EA, Andrianarivo AG, Björkman C, Williams DJL, Conrad PA. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends Parasitol.* 2002; 18: 497-504.

Innes EA, Wright S, Bartley P, Maley S, Macaldowie C, Esteban-Redondo I, Buxton D. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005; 108: 29-36.

Innes EA, Wright SE, Maley S, Rae A, Schock A, Kirvar E, Bartley P, Hamilton C, Carey IM, Buxton D. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int J Parasitol.* 2001; 31: 1523-1534.

King JS, Slapeta J, Jenkins DJ, Al-Qassab SE, Ellis JT, Windsor PA. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol.* 2010; 40: 945-950.

Langellotti CA, Pappalardo JS, Quattrocchi V, Mongini C, Zamorano P. Induction of specific cytotoxic activity for bovine herpesvirus-1 by DNA immunization with different adjuvants. *Antiviral Res.* 2011; 90: 134-142.

Lindsay DS, Dubey JP. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *Am J Vet Res.* 1989; 50: 1981-1983.

Lindsay DS, Lenz SD, Cole RA, Dubey JP, Blagburn BL. Mouse model for central nervous system *Neospora caninum* infections. *J Parasitol.* 1995; 81: 313-315.

Lindsay DS, Upton SJ, Dubey JP. A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. *Int J Parasitol.* 1999; 29: 1521-1523.

López-Gatius F, Santolaria P, Almería S. *Neospora caninum* infection does not affect the fertility of dairy cows in herds with high incidence of *Neospora*-associated abortions. *Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2005; 52: 51-53.

Lundén A, Wright S, Allen JE, Buxton D. Immunisation of mice against neosporosis. *Int J Parasitol.* 2002; 32: 867-876.

Macaldowie C, Maley SW, Wright S, Bartley P, Esteban-Redondo I, Buxton D, Innes EA. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. *J Comp Pathol.* 2004; 131: 142-156.

Maley SW, Buxton D, Rae AG, Wright SE, Schock A, Bartley PM, Esteban-Redondo I, Swales C, Hamilton CM, Sales J, Innes EA. The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at mid-gestation. *J Comp Pathol.* 2003; 129: 186-195.

Mansilla FC, Czepluch W, Malacari DA, Hecker YP, Bucafusco D, Franco-Mahecha OL, Moore DP, Capozzo AV. Dose-dependent immunogenicity of a soluble *Neospora caninum* tachyzoite-extract vaccine formulated with a soy lecithin/ β -glucan adjuvant in cattle. *Vet Parasitol.* 2013; 197: 13-21.

Mansilla FC, Franco-Mahecha OL, Lavoria MÁ, Moore DP, Giraldez AN, Iglesias ME, Wilda M, Capozzo AV. The immune enhancement of a novel soy lecithin/ β -glucans based adjuvant on native *Neospora caninum* tachyzoite extract vaccine in mice. *Vaccine.* 2012; 30: 1124-1131.

Mansilla FC, Moore DP, Quintana ME, Cardoso N, Hecker YP, Gual I, Czepluch W, Odeón AC, Capozzo AV. Safety and immunogenicity of a soluble native *Neospora caninum* tachyzoite-extract vaccine formulated with a soy lecithin/ β -glucan adjuvant in pregnant cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 2015; 165: 75-80.

Marugán-Hernández V, Ortega-Mora LM, Aguado-Martinez A, Álvarez-García G. Genetic manipulation of *Neospora caninum* to express the bradyzoites specific protein NcSAG4 in tachyzoites. *Parasitol.* 2011a; 138: 472-480.

Marugán-Hernández V, Ortega-Mora LM, Aguado-Martinez A, Jimenez-Ruiz E, Álvarez-García G. Transgenic *Neospora caninum* strains constitutively expressing the bradyzoite NcSAG4 protein proved to be safe and conferred significant levels of protection against vertical transmission when used as live vaccines in mice. *Vaccine*. 2011b; 29: 7867-7874.

McAllister MM, Björkman C, Anderson-Sprecher R, Rogers DG. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. *J Am Vet Med Assoc*. 2000; 217: 881-887.

McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire AM. Dogs are definitive host of *Neospora caninum*. *Inter J Parasitol*. 1998; 28: 1473-1478.

Meeusen EN, Walker J, Peters A, Pastoret PP, Jungersen G. Current status of veterinary vaccines. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20: 489-510.

Moen AR, Wouda W, Mul MF, Graat EA, van Werven T. Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks: a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. *Theriogenology*. 1998; 49: 1301-1309.

Monney T, Debache K, Grandgirard D, Leib SL, Hemphill A. Vaccination with the recombinant chimeric antigen recNcMIC3-1-R induces a nonprotective Th2-type immune response in the pregnant mouse model for *N. caninum* infection. *Vaccine*. 2012; 30: 6588-6594.

Monney T, Grandgirard D, Leib SL, Hemphill A. Use of a Th1 stimulator adjuvant for vaccination against *Neospora caninum* infection in the pregnant mouse model. *Pathogens*. 2013; 2: 193-208.

Monney T, Hemphill A. Vaccines against neosporosis: what can we learn from the past studies? *Exp Parasitol*. 2014; 140: 52-70.

Monney T, Rutti D, Schorer M, Debache K, Grandgirard D, Leib SL, Hemphill A. RecNcMIC3-1-R is a microneme- and rhoptry-based chimeric antigen that protects against acute neosporosis and limits cerebral parasite load in the mouse model for *Neospora caninum* infection. *Vaccine*. 2011; 29: 6967-6975.

Moore DP, Campero CM, Odeón AC, Posso MA, Cano D, Leunda MR, Basso W, Venturini MC, Späth E. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. *Vet Parasitol*. 2002; 107: 303-316.

Moore DP, Echaide I, Verna AE, Leunda MR, Cano A, Pereyra S, Zamorano PI, Odeón AC, Campero CM. Immune response to *Neospora caninum* native antigens formulated with immune stimulating complexes in calves. *Vet Parasitol*. 2011; 175: 245-251.

Moore DP, Leunda MR, Zamorano PI, Odeón AC, Romera SA, Cano A, de Yaniz G, Venturini MC, Campero CM. Immune response to *Neospora caninum* in naturally

infected heifers and heifers vaccinated with inactivated antigen during the second trimester of gestation. *Vet Parasitol.* 2005; 130: 29-39.

Moore D, Reichel M, Spath E, Campero C. *Neospora caninum* causes severe economic losses in cattle in the humid pampa region of Argentina. *Trop Anim Health Prod.* 2013; 45: 1237-1241.

Moré G, Bacigalupe D, Basso W, Rambeaud M, Beltrame F, Ramirez B, Ventruini MC, Venturini L. Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* in dairy cattle. *Vet Parasitol.* 2009; 160: 51-54.

Moré G, Basso W, Bacigalupe D, Venturini MC, Venturini L. Diagnosis of *Sarcocystis cruzi*, *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in cattle. *Parasitol Res.* 2008; 102: 671-675.

Müller J, Aguado-Martínez A, Manser V, Wong HN, Haynes RK, Hemphill A. Repurposing of antiparasitic drugs: the hydroxy-naphthoquinone buparvaquone inhibits vertical transmission in the pregnant neosporosis mouse model. *Vet Res.* 2016; 47: 32.

Nishikawa Y, Xuan X, Nagasawa H, Igarashi I, Fujisaki K, Otsuka H, Mikami T. Monoclonal antibody inhibition of *Neospora caninum* tachyzoite invasion into host cells. *Int J Parasitol.* 2000; 30: 51-58.

Nishikawa Y, Xuan X, Nagasawa H, Igarashi I, Fujisaki K, Otsuka H, Mikami T. Prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice by recombinant vaccinia virus carrying NcSRS2 gene. *Vaccine*. 2001; 19: 1710-1716.

OIE. World Organisation for Animal Health. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. En: *Terrestrial Manual*. 2014, capítulo 1.1.5, p. 15-16.

Ortega-Mora LM, Gottstein B, Conraths FJ, Buxton D. En: *Protozoal abortion in farm ruminants: guidelines for diagnosis and control*. 2007.

Ortega-Mora LM, Fernández-García A, Gómez-Bautista M. Diagnosis of bovine neosporosis: Recent advances and perspectives. *Acta Parasitol*. 2006; 51: 1-14.

Ortega-Mora LM, Ferre I, del-Pozo I, Caetano-da-Silva A, Collantes-Fernández E, Regidor-Cerrillo J, Ugarte-Garagalza C, Aduriz G. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. *Vet Parasitol*. 2003; 117: 301-308.

O'Toole D, Jeffrey M. Congenital sporozoan encephalomyelitis in a calf. *Vet Rec*. 1987; 121: 563-566.

Paré J, Hietala SK, Thurmond MC. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *J Vet Diagn Invest*. 1995; 7: 273-275.

Paré J, Thurmond MC, Hietala SK. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. *Can J Vet Res.* 1996; 60: 133-139.

Parish SM, Maag-Miller L, Besser TE, Weidner JP, McElwain T, Knowles DP, Leathers CW. Myelitis associated with protozoal infection in newborn calves. *J Am Vet Med Assoc.* 1987; 191: 1599-1600.

Pereira García-Melo D, Regidor-Cerrillo J, Collantes-Fernández E, Aguado-Martínez A, Del Pozo I, Minguijón E, Gómez-Bautista M, Aduriz G, Ortega-Mora LM. Pathogenic characterization in mice of *Neospora caninum* isolates obtained from asymptomatic calves. *Parasitology.* 2010; 137: 1057-1068.

Pensaert M, Labarque G, Favoreel H, Nauwynck H. Aujeszky's disease vaccination and differentiation of vaccinated from infected pigs. *Dev Biol (Basel).* 2004; 119: 243-254.

Peters M, Lutkefels E, Heckerroth AR, Schares G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. *Int J Parasitol.* 2001; 31: 1144-1148.

Pinitkiatisakul S, Mattsson JG, Wikman M, Friedman M, Bengtsson KL, Ståhl S, Lundén A. Immunisation of mice against neosporosis with recombinant NcSRS2 iscoms. *Vet Parasitol.* 2005; 129: 25-34.

Quinn HE, Ellis JT, Smith NC. *Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy? Trends Parasitol. 2002; 18: 391-394.

Quint W, Gielkens A, Van Oirschot J, Berns A, Cuypers HT. Construction and characterization of deletion mutants of pseudorabies virus: a new generation of 'live' vaccines. J Gen Virol. 1987;68:523-534.

Ramamoorthy S, Duncan R, Lindsay DS, Sriranganathan N. Optimization of the use of C57BL/6 mice as a laboratory animal model for *Neospora caninum* vaccine studies. Vet Parasitol. 2007; 145: 253-259.

Regidor-Cerrillo J, Gómez-Bautista M, Del Pozo I, Jiménez-Ruiz E, Aduriz G, Ortega-Mora LM. Influence of *Neospora caninum* intra-specific variability in the outcome of infection in a pregnant BALB/c mouse model. Vet Res. 2010; 41: 52.

Regidor-Cerrillo J, Gómez-Bautista M, Pereira-Bueno J, Aduriz G, Navarro-Lozano V, Risco-Castillo V, Fernández-García A, Pedraza-Díaz S, Ortega-Mora LM. Isolation and genetic characterization of *Neospora caninum* from asymptomatic calves in Spain. Parasitology. 2008; 135: 1651-1659.

Reichel MP, Ayanegui-Alcérreca M, Gondim LF, Ellis JT. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle- the billion dollar question. Int J Parasitol. 2013; 43: 133-142.

Reichel MP, Ellis JT. If control of *Neospora caninum* infection is technically feasible does it make economic sense? *Vet Parasitol.* 2006; 142: 23-34.

Reichel MP, Moore DP, Hemphill A, Ortega-Mora LM, Dubey JP, Ellis JT. A live vaccine against *Neospora caninum* abortions in cattle. *Vaccine.* 2015; 33: 1299-1301.

Ribeiro DP, Freitas MM, Cardoso MR, Pajuaba AC, Silva NM, Mineo TW, Silva JS, Mineo JR, Silva DA. CpG-ODN combined with *Neospora caninum* lysate, but not with excreted-secreted antigen, enhances protection against infection in mice. *Vaccine.* 2009; 27: 2570-2579.

Rojo-Montejo S, Collantes-Fernández E, López-Pérez I, Risco-Castillo V, Prenafeta A, Ortega-Mora LM. Evaluation of the protection conferred by a naturally attenuated *Neospora caninum* isolate against congenital and cerebral neosporosis in mice. *Vet Res.* 2012; 43: 62.

Rojo-Montejo S, Collantes-Fernández E, Pérez-Zaballos F, Rodríguez-Marcos S, Blanco-Murcia J, Rodríguez-Bertos A, Prenafeta A, Ortega-Mora LM. Effect of vaccination of cattle with the low virulence Nc-Spain 1H isolate of *Neospora caninum* against a heterologous challenge in early and mid-gestation. *Vet Res.* 2013; 44: 106.

Schares G, Bärwald A, Conraths FJ. Adaptation of a surface antigen-based ELISA for the detection of antibodies against *Neospora caninum* in bovine milk. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 2005; 52: 45-48.

Schares G, Bärwald A, Staubach C, Söndgen P, Rauser M, Schröder R, Peters M, Wurm R, Selhorst T, Conraths FJ. p38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. Vet Parasitol. 2002; 106: 293-305.

Schares G, Rauser M, Söndgen P, Rehberg P, Bärwald A, Dubey JP, Edelhofer R, Conraths FJ. Use of purified tachyzoite surface antigen p38 in an ELISA to diagnose bovine neosporosis. Int J Parasitol. 2000; 30: 1123-1130.

Schares G, Rauser M, Zimmer K, Peters M, Wurm R, Dubey JP, de Graaf DC, Edelhofer R, Mertens C, Hess G, Conraths FJ. Serological differences in *Neospora caninum* associated epidemic and endemic abortions. J Parasitol. 1999; 85: 688-694.

Schurig GG, Roop RM II, Bagchi T, Boyle S, Buhrman D, Sriranganathan N. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. Vet Microbiol. 1991; 28: 171-188.

Serrano-Martínez E, Ferre I, Osoro K, Aduriz G, Mota RA, Martínez A, Del-Pozo I, Hidalgo CO, Ortega-Mora LM. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers

and cows using contaminated semen with different numbers of tachyzoites. *Theriogenology*. 2007; 67: 729-737.

Spickler AR, Roth JA. Adjuvants in veterinary vaccines: modes of action and adverse effects. *J Vet Intern Med*. 2003 ; 17: 273-281.

Staubli D, Nunez S, Sager H, Schares G, Gottstein B. *Neospora caninum* immunoblotting improves serodiagnosis of bovine neosporosis. *Parasitol Res*. 2006; 99: 648-658.

Swets JA. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science*. 1988; 240: 1285-1293.

Syed-Hussain SS, Howe L, Pomroy WE, West DM, Hardcastle M, Williamson NB. Vertical transmission in experimentally infected sheep despite previous inoculation with *Neospora caninum* NcNZ1 isolate. *Vet Parasitol*. 2015; 208: 150-158.

Thilsted JP, Dubey JP. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *J Vet Diagn Invest*. 1989; 1: 205-209.

Trees AJ, Williams DJ. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends Parasitol*. 2005; 21: 558-561.

Uzeda RS, Costa KS, Santos SL, Pinheiro AM, De Almeida MA, McAllister MM, Gondim LF. Loss of infectivity of *Neospora caninum* oocysts maintained for a prolonged time. Korean J Parasitol. 2007; 45: 295-299.

Venturini L, Di Lorenzo C., Venturini M.C., Romero J. Anticuerpos anti *Neospora* sp., en vacas que abortaron. Vet Arg. 1995; 12: 167-170.

Venturini MC, Venturini L, Bacigalupe D, Machuca M, Echaide I, Basso W, et al. *Neospora caninum* infections in bovine foetuses and dairy cows with abortions in Argentina. Int J Parasitol. 1999; 29: 1705-1708.

Von Blumröder D, Schares G, Norton R, Williams DJ, Esteban-Redondo I, Wright S, Björkman C, Frössling J, Risco-Castillo V, Fernández-García A, Ortega-Mora LM, Sager H, Hemphill A, van Maanen C, Wouda W, Conraths FJ. Comparison and standardisation of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in bovines. Vet Parasitol. 2004; 120: 11-22.

Wapenaar W, Barkema HW, Vanleeuwen JA, McClure JT, O'Handley RM, Kwok OC, Thulliez P, Dubey JP, Jenkins MC. Comparison of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle. Vet Parasitol. 2007; 143: 166-173.

Weber FH, Jackson JA, Sobecki B, Choromanski L, Olsen M, Meinert T, Frank R, Reichel MP, Ellis JT. On the efficacy and safety of vaccination with live tachyzoites of

Neospora caninum for prevention of *Neospora*-associated fetal loss in cattle. Clin Vaccine Immunol. 2013; 20: 99-105.

Weston JF, Heuer C, Williamson NB. Efficacy of a *Neospora caninum* killed tachyzoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle. Prev Vet Med. 2012; 103: 136-144.

Wilkowsky SE, Bareiro GG, Mon ML, Moore DP, Caspe G, Campero C, Fort M, Romano MI. An applied printing immunoassay with recombinant Nc-SAG1 for detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle. J Vet Diagn Invest. 2011; 23: 971-976.

Williams DJ, Guy CS, Smith RF, Ellis J, Björkman C, Reichel MP, Trees AJ. Immunization of cattle with live tachyzoites of *Neospora caninum* confers protection against fetal death. Infect Immun. 2007; 75: 1343- 1348.

Williams DJ, Hartley CS, Björkman C, Trees AJ. Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum*- how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. Parasitol. 2009; 136: 1895-1900.

Wolf D, Schares G, Cardenas O, Huanca W, Cordero A, Bärwald A, Conraths FJ, Gauly M, Zahner H, Bauer C. Detection of specific antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in naturally infected alpacas (*Lama pacos*), llamas (*Lama*

glama) and vicunas (*Lama vicugna*) from Peru and Germany. *Vet Parasitol.* 2005; 130: 81-87.

Wouda W, Bartels CJM, Moen AR. Characteristics of *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology.* 1999; 52: 233-245.

Anexos de técnicas y soluciones

Anexo 1: Soluciones buffers de uso frecuente

- **Solución buffer de fosfatos (PBS)**

Solución madre:

Cloruro de sodio (NaCl)= 40 g

Cloruro de potasio (KCl)= 1 g

Fosfato disódico (Na_2HPO_4)= 5,75 g

Fosfato de potasio (KH_2PO_4)= 1 g

Agua destilada= c.s.p.500 ml

Solución de trabajo: utilizar la solución madre diluida 1:10 en agua destilada. El pH final será de 7,2.

- **Solución buffer de carbonatos**

Solución madre:

Carbonato de sodio (Na_2CO_3)= 11,4 g

Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)= 33,6 g

Cloruro de sodio (NaCl)= 8,5 g

Agua destilada= c.s.p 1 l

Solución de trabajo: diluir la solución madre en agua destilada en proporción de 1: 4.
El pH final será de 9.

Anexo 2: Cultivo de células Vero

2.1. Reactivos y materiales utilizados

Medio RPMI 1640 con glutamina, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) para crecimiento o 3% SFB para mantenimiento y con 1% de antibiótico (penicilina- estreptomina) y antimicótico (anfotericina B).

- RPMI 1640: N° catálogo: E15-840 (PAA Laboratories, Austria).
- Suero equino (SE): N° catálogo: B15-023 (PAA Laboratories, Austria).
- Suero fetal bovino (SFB): N° catálogo: A15-042 (PAA Laboratories, Austria)
- Tripsina-EDTA (10x): N° catálogo: L11-003 (PAA Laboratories, Austria)
- Solución antibiótico-antimicótico (100x): N° catálogo P11-(PAA Laboratories, Austria).
- Botellas de cultivo de 25 cm² y 50 ml: N° catálogo: 690 170 (CELLSTAR®, Greiner Bio One International GmbH).

2.2. Procedimiento

Eliminar el medio de la botella de 25 cm² a tripsinar, cuando la monocapa está completamente formada. Agregar PBS estéril y enjuagar; eliminar el PBS. Agregar 2,7 ml de PBS y 0,3 ml de Tripsina- EDTA sol. 10 x (5 g de tripsina/l 1:250, 2 g EDTA/l) e incubar a 37°C por 30 min. Una vez desprendidas las células completar hasta 5 ml con RPMI. Colocar 1 ml de esa suspensión en cada nueva botella de cultivo con 5 ml de medio con 10% de SFB colocado previamente. Incubar a 37°C bajo una atmósfera con 5% de CO₂. Las células deben multiplicarse una vez por semana. En dos a cinco días puede estar formada la monocapa.

Anexo 3: Cultivo y obtención de taquizoítos de *N. caninum*

Se utilizaron cultivos de células Vero de tres días para infectar con taquizoítos de *N. caninum* de la cepa NC-1, cedida por el Dr. Dubey y mantenida en el Laboratorio de Inmunoparasitología, FCV, UNLP. Para la infección se utilizaron taquizoítos provenientes de cultivos de células Vero infectados siete días antes. Los cultivos se mantuvieron como se indica en el Anexo 2. Se realizaron pasajes semanales de taquizoítos durante el desarrollo del plan de trabajo. Cuando aproximadamente el 50% de la monocapa había sido lisada por los parásitos, se descartó el medio de cultivo y se agregó PBS. La monocapa se levantó con un raspador estéril (Greiner Bio One International GmbH) y la suspensión fue recogida en un tubo de 50 ml. Para causar la lisis de las células que hubieren quedado, la suspensión se pasó repetidas veces por agujas de diferente tamaño, en el siguiente orden: 18 G, 21 G, 22 G, 25 G y 27 G. Se comprobó la ruptura total de las células por observación directa en microscopio óptico a 400 x. Luego se realizaron dos lavados con medio de cultivo y los taquizoítos obtenidos se contaron en una cámara de Neubauer.

Anexo 4: Elaboración de antígeno para la prueba de IFI

4.1. Reactivos y materiales utilizados

- Solución buffer de fosfatos (PBS) (ver Anexo 1).
- Portaobjetos de 15 áreas (MP Biomedicals, Santa Ana, EE.UU).
- Taquizoítos de cepa NC-1 obtenidos de cultivo celular (ver Anexo 3).

4.2. Procedimiento

Para elaborar el antígeno se debe coleccionar los parásitos de la cepa NC-1, lavarlos en PBS y llevarlos a una concentración de 1×10^7 taquizoítos/ml. Colocarlos en los portaobjetos y fijarlos con metanol. Conservar a -20° C.

Anexo 5: Prueba de IFI

5.1. Reactivos y materiales utilizados

- Portaobjetos con taquizoítos fijados de cepa NC-1 (ver Anexo 4).
- Solución buffer de fosfatos (PBS) (ver Anexo 1).
- Solución buffer de carbonatos (ver Anexo 1).
- Conjugado:
 - bovinos: conjugado anti-IgG de bovino. N° código: F7887 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU).
 - ratones: conjugado anti-IgG de ratón. N° código: F0257 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU).
- Microscopio de fluorescencia (Leica, Wetzlar, Alemania).

5.2. Procedimiento

Diluir el suero problema y los sueros controles positivos y negativos con PBS. Incubar el antígeno con el suero problema y los controles a 37°C durante 30 min en cámara húmeda. Realizar 3 lavados de 10, 5 y 3 min, con solución buffer de carbonatos, en agitador. Incubar con el conjugado correspondiente marcado con fluoresceína, 30 min a 37°C, en cámara húmeda. Repetir los lavados como se mencionó previamente. Montar con glicerina al 50% en buffer de carbonatos. Observar con microscopio de fluorescencia (Leica, Wetzlar, Alemania).

Anexo 6: Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en condiciones no reducidas e Inmunotransferencia

6.1. Reactivos y materiales utilizados

- Cuba electroforética vertical (ENDURO™ Vertical PAGE System, Labnet International, Inc., Nueva York, EE.UU).
- Transbloteador semiseco.
- Sonicador: N° código: OR250-220 (Omni International, Kennesaw, EE.UU).
- Filtros de PVDF de 5 µ (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania).
- Buffer de muestra no reducido (5x): 3,75 g Tris (hydroxymethyl) aminoethanol/10 g SDS/ 35 ml glicerina/ 25 mg azul bromofenol/(pH 6,8 ajustarlo con HCl)/completar con agua destilada hasta 100 ml.
- Buffer Tris-HCl 0,5M pH 6,8 (Solución A): 6,06 g tris(hydroxymethyl)-aminometanol/4 ml 10% (w/v) SDS /completar con agua destilada hasta 100 ml
- Buffer Tris-HCl 1,5M pH 8,8 (Solución B): 18,17 g tris(hydroxymethyl)-aminometanol/4 ml 10% (w/v) SDS/completar con agua destilada hasta 100 ml.
- Acrilamida (Solución C): 30 g acrilamida/0,8 g N,N'-methylen-bis(acrilamida)/completar con agua destilada hasta 100 ml.
- Buffer de electroforesis (5x): 15,2 g tris(hydroxymethyl)-aminometanol/72,1 g glicina/5 g SDS/completar con agua destilada hasta 1000 ml.
- Amonio persulfato (APS) 30% (w/v): N° Catálogo: 161-0754 (Biorad, California, EE.UU) preparado en agua destilada.

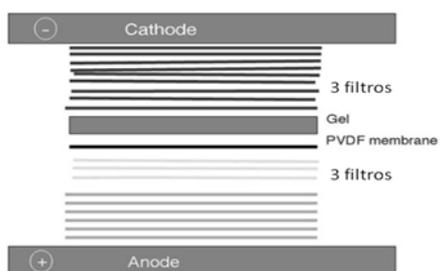
- N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED): N° catálogo: 161-0800 (Biorad, California, EE.UU).
- Prestained SDS-PAGE Standard, low range: N° catálogo: 161-0305 (Biorad, California, EE.UU).
- Membrana PVDF: N° catálogo: IPVH00010 (Millipore Immobilon-P Membrane, Billerica, EE.UU).
- Filtros Gel Blot Paper N° catálogo: GB003 (15 cm x 20 cm).
- Buffer Aniónico: 3,03 g tris(hydroxyl-methyl)aminomethanol/ 200 ml 20% metanol (V/V)/ completar con agua destilada hasta 1000 ml.
- Gel de concentración: Gel de corrida (al 12,5%):

Solución B: 2,5 ml	Solución A: 1,5 ml
Solución C: 4,2 ml	Solución C: 0,7 ml
Agua destilada: 3, 3 ml	Agua destilada: 3,6 ml
TEMED: 10 µl	TEMED: 5 µl
APS al 30%: 50 µl	APS al 30%: 20 µl

6.2. Procedimiento

Preparar el gel de corrida y volcarlo entre vidrios de cuba electroforética. Agregar agua destilada hasta el borde de los vidrios y dejarlo a temperatura ambiente aproximadamente 30 min. Preparar el gel de concentración y descartar el agua que estaba cubriendo el gel de corrida y agregar el gel concentrador hacia el tope de la cuba, y finalmente agregar el peine deseado según el objetivo. Esperar al menos 30 min hasta que polimerice el gel concentrador y luego retirar el peine. Sumergir el gel en buffer de electroforesis 1X y cargar la muestra en la calle correspondiente con su buffer de muestra y cargar 10 µl del

marcador de peso molecular en una calle. Correr el gel a 150 voltios y una potencia de 75 mA durante 90 min. Sumergir 6 filtros (para 1 membrana) en buffer aniónico. La membrana PVDF debe primero ser activada sumergiéndola unos segundos en metanol puro, acto seguido de lavado con agua destilada. Luego sumergir la membrana en buffer aniónico al igual que el gel recién corrido. Finalmente, seguir el siguiente esquema:



Correr a una potencia de 100 mA y 120 voltios durante 90 min. Luego de la corrida, cortar el extremo de la membrana donde se ubica el marcador de peso molecular y guardarlo a -20°C .

Anexo 7: Elaboración de membranas con antígeno de NC-1 para IB

7.1. Reactivos y materiales utilizados

Los materiales necesarios son los indicados en Anexo 6 (6.1.) y se adicionan los siguientes:

- Tinción Tinta China: 5 ml de ácido acético ($\text{CH}_3\text{-COOH}$) ($M= 60.05 \text{ g/ mol}$)/ 0,5 ml de tinta marca PELIKAN FOUNT INDIA, Alemania, nº 17, frasco de 30 ml/500 ml de PBS (1X)- 0,05% Tween20.
- Solución de bloqueo: PBS (1X)- 0,05 % Tween20- 2% de gelatina de pescado: Nº Catálogo G7765 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU).

7.2. Procedimiento

Obtener pellets de 4×10^7 taquizoítos totales (cantidad para 1 membrana) de la cepa NC-1 de *N. caninum* (ver Anexo 3) y purificar mediante filtros de policarbonato de 3-5 μ . Centrifugar a 1000 g por 10 minutos. Descartar sobrenadante y resuspender el pellet en 1 ml de PBS 1X (estéril) y centrifugar a 1000 g por 5 min. Descartar el sobrenadante y dejar secar al aire el pellet bajo el flujo laminar. Se puede conservar el pellet a -20°C hasta su uso.

Al momento de realizar la electroforesis, resuspender el pellet en 150 μl de agua destilada y sonicar a 50 ciclos, 30 seg, 3 veces. Agregar 50 μl de buffer de muestra y calentar en baño seco a 94°C por 5 min previo a ser sembrado en el pocillo del gel. Proceder de similar modo para la elaboración de los geles como se indica en el Anexo 3 (3.2.). Luego de la inmunotransferencia se pueden cortar ambos extremos de la membrana para ser teñidas mediante la Tinción Tinta China para asegurarse la correcta corrida del antígeno y que se comenzará a

cortar la membrana en donde haya antígeno efectivamente. Poner a bloquear la membrana con solución de bloqueo por 30 min. Se deja secar la membrana bajo flujo laminar y con papel secante y luego se guarda a -20°C hasta su posterior uso.

Anexo 8: Prueba de IB

8.1. Reactivos y materiales utilizados

- Membranas PVDF con antígeno de cepa NC-1 (ver Anexo 3).
- Solución de bloqueo: PBS (1X)- 0,05 % Tween20- 2% de gelatina de pescado: N° catálogo G7765 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU).
- Solución de lavado: PBS (1X)- 0,05% Tween20.
- Conjugado:
 - bovinos: anti-IgG bovina-peroxidasa: N° catálogo: 101-035-003 (Jackson ImmunoResearch Lab. Inc., PA, EE.UU).
- Sustrato: 30 mg 4-chloro-1-naphthol: N° catálogo: 6788 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU)/10 ml metanol/ 30 ml PBS1x y 40 µl 30% H₂O₂.

8.2. Procedimiento

Cortar la membrana del antígeno en tiras de 3 a 4 mm de ancho y rotular cada tira en el borde inferior. Cortar tantas tiras como muestras a probar e incluir una tira para el control positivo y una tira para el control negativo. Incubar las tiras 30 min con solución de bloqueo en agitación a temperatura ambiente. Eliminar la solución de bloqueo e incubar cada tira con el suero problema respectivo diluido 1:100 en solución de bloqueo y los controles positivos y negativos por 60 min. Lavar las tiras 5 veces con solución de lavado, 2 min cada lavado. Incubar 60 min las tiras con el conjugado (diluido 1:1000). Realizar 3 lavados de 2 min con solución de lavado y 2 lavados de 2 min con PBS 1X. Incubar las tiras con el sustrato por 20 min. Detener la reacción con agua destilada y dejar las tiras secar en papel de secar. Cuando se prueban sueros bovinos para la detección de anticuerpos anti- *N. caninum*, se

registran las reacciones hacia 5 antígenos IDAs con pesos relativos moleculares de 17–19, 29, 30, 33 and 37 kDa. La interpretación de estos resultados es:

- reconocimiento de 2 o más IDAs= positivo
- 1 IDA= inconcluso
- sin reconocimiento de IDA= negativo

Anexo 9: Prueba de ELISA-p38

9.1. Reactivos y materiales utilizados

- Placas de 96 pocillos (Nunc-Immuno-Polysorb, Thermo Scientific, Waltham, EE.UU).
- Coating buffer: 0,1 M bicarbonato de sodio (pH 8,3).
- 1,5 ng de proteína p38/pocillo.
- Solución de bloqueo: PBS (1X)- 0,05 % Tween20- 20% de suero equino
- Solución de lavado: PBS (1X)- 0,05% Tween20 (pH 7,2).
- Conjugados: los conjugados se diluyeron en una solución de: PBS (1X)- 0,05 % Tween20- 1% de suero equino
 - bovinos: anticuerpo monoclonal biotinilado anti-IgG bovina, N° catálogo: B9780 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU) y extravidin-peroxidasa: N° catálogo: E2886 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU).
 - ratones: anti-IgG ratón unido a peroxidasa, N° catálogo: 315-035-044 (Jackson ImmunoResearch Lab. Inc., PA, EE.UU).
- Sustrato: 100 µg/ml 3,3',5,5'-tetrametilbencidina- 0,004% de peróxido de hidrógeno en una solución de 0,2 M de acetato de sodio y 0,2 M de ácido cítrico.
- Solución de detención: ácido sulfúrico a una concentración final de 2N.

9.2. Procedimiento

El procedimiento se detalla en la sección 2.5 del Capítulo II para bovinos y en la sección 2.7 del Capítulo III para ratones.

Anexo 10: Obtención de células esplénicas de ratones

10.1. Reactivos y materiales utilizados

- RPMI con 10% de SFB.
- Placas de Petri.
- Portaobjetos esmerilados.

Solución buffer de lisis de glóbulos rojos (mantener a 37°C al momento de su uso)

- Cloruro de amonio al 0,83 % (pH 7,2)

Tetracloruro de Amonio:

Cloruro de amonio.....0,83 g

Tris clorhídrico (0,01 M).....100 ml

10.2. Procedimiento

El procedimiento se detalla en la sección 2.8.1 del Capítulo III.

Anexo 11: Cuantificación de la concentración de proteínas (Bicinchoninic acid assay, BCA; Pierce, Rockford, EE.UU).

11.1. Reactivos y materiales utilizados

Para la determinación de la concentración de proteínas se siguieron las instrucciones recomendadas por la empresa elaboradora.

11.2. Procedimiento

1. Se prepararon las diluciones seriadas del estándar de albumina sérica bovina (0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 y 2000 µg/ml)

2. Se preparó la solución reactiva de trabajo (ST) mezclando 50 partes de reactivo A con 1 parte del reactivo B.

3. Se procedió a realizar el protocolo para trabajar con microplacas:

3.1. Se agregó 25 µl de cada estándar de albúmina sérica bovina y de cada muestra por duplicado en una microplaca.

3.2. Se adicionó 200 µl de la ST a cada pocillo y se mezcló la microplaca por 30 seg en agitador.

3.3. Se cubrió la microplaca y se incubó a 37°C por 30 min.

3.4. Se dejó enfriar la microplaca a temperatura ambiente.

3.5. Se midió la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro.

3.6. Se sustrajo el promedio de la DO del blanco del estándar de albúmina sérica bovina a cada muestra.

3.7. Se estimó la concentración proteica de las muestras mediante una curva obtenida a partir de las DO de las diluciones seriadas de los estándares de albúmina sérica bovina.

Anexo 12: Prueba de ELISA para medición de IL-4 de ratones (EMIL4, Thermo Scientific, Rockford, IL, EE.UU)

12.1. Reactivos y materiales utilizados

Para la cuantificación de IL-4 a partir de un pool de los triplicados de cada tratamiento de los sobrenadantes de los esplenocitos estimulados con proteínas solubles se siguieron las instrucciones recomendadas por la empresa elaboradora.

12.2. Procedimiento

1. Se prepararon las diluciones seriadas del estándar de IL-4 (0, 15, 75, 375pg/ml) reconstituido en medio RPMI con 10% de SFB.
2. Se adicionó 50 μ l del reactivo de placa a todos los pocillos a utilizar.
3. Se adicionó 50 μ l de los estándares de IL-4 y de las muestras por duplicado a cada pocillo.
4. Se cubrió la microplaca y se incubó a 37°C por 120 min.
5. Se realizó 5 lavados de los pocillos con el buffer de lavado.
6. Se adicionó 100 μ l del reactivo conjugado a cada pocillo.
7. Se cubrió la microplaca y se incubó a 37°C por 60 min.
8. Se realizó 5 lavados de los pocillos con el buffer de lavado.
9. Se adicionó 100 μ l de la solución sustrato TMB.
10. Se dejó que la microplaca en la oscuridad a temperatura ambiente por 30 min.
11. Se detuvo la reacción con 100 μ l de solución de detención por pocillo.
12. Se midió la absorbancia dual sustrayendo los valores obtenidos a 550 nm a los obtenidos a 450 nm para corregir las imperfecciones ópticas de la microplaca.

13. Se estimó la concentración de IL-4 de las muestras mediante una curva obtenida a partir de las DO de las diluciones seriadas de los estándares de IL-4.

Anexo 13: Inmunohistoquímica

13.1. Reactivos y materiales utilizados

- **Solución salina tampón estéril**

Cloruro de sodio (NaCl)= 8 g

Cloruro de potasio (KCl)= 0,2 g

Fosfato disódico (Na_2HPO_4)= 11,2 g

Fosfato de potasio (KH_2PO_4)= 33,6 g

Agua destilada= c.s.p. 1 l

Ajustar el pH final a 7,4.

- **Bloqueo de la peroxidasa endógena**

Metanol= 180 ml

H_2O_2 (30%)= 20 ml

- **Solución de pepsina**

Pepsina N° catálogo P7000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU)= 0,6 g

Agua destilada= 150 ml

ClH (1N)= 1,5 ml

- **Solución de caseína bloqueante**

Caseína N° catálogo C5890 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU)= 10 g

Timerosal= 0,5 g

Tween20= 1ml

PBS= c.s.p. 1 l

Ajustar el pH final a 7,4.

- **Solución de agua de Scott**

Solución madre:

SO_4Mg = 200 g

NaHCO_3 = 20 g

Agua destilada= c.s.p. 1 l

Solución de trabajo: utilizar la solución madre diluida 1:10 en agua bidestilada.

- **Hematoxilina de Mayer**

Hematoxilina= 1g

Iodato de Na= 0,2 g

Alumbre de K= 50 g

Ácido cítrico= 1 g

Hidrato de cloral= 50 g

Agua destilada= c.s.p. 1 l

13.2. Procedimiento

El procedimiento se detalla en la sección 2.9 del Capítulo III.