



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

Laboratorio de Inmunología y Parasitología Veterinaria,  
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria,  
Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Santa Fe, Argentina

Tesis presentada para optar por el grado académico de  
**DOCTORA EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**TEMA:** *“Diagnóstico y prevención de la neosporosis  
bovina. Desarrollo de técnicas serológicas y evaluación  
de inmunógenos basados en proteínas recombinantes”*

**AUTORA:** Médica Veterinaria María Belén NOVOA

**DIRECTORA:** Doctora María Evangelina PRIMO

**CO-DIRECTOR:** Doctor Marcelo Lisandro SIGNORINI

**AÑO 2019**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi directora de tesis María Evangelina Primo, a mi co-director de tesis Marcelo Signorini y a mi director de beca de CONICET Ignacio Echaide por permitirme participar de este trabajo, darme un lugar y ayudarme en el desarrollo y corrección del plan de trabajo y la tesis.

Agradezco a Macarena Sarli y Trichi Valentini, por su colaboración en el trabajo de laboratorio. A Ramón Mancilla y a Macarena, por ayudarme con el trabajo de campo.

A mis compañeras y compañeros del Laboratorio de Parasitología e Inmunología Veterinaria de INTA Rafaela, por hacerme más fácil el trabajo en el laboratorio con su ayuda, buena onda e hidratos de carbono. A Nerina Aguirre por tantos mates cebados durante la escritura de esta tesis.

A Susana Torioni y Victor Vanzini, por compartir conmigo sus conocimientos.

A Ivana Reidel y Carolina Veaute del Laboratorio de Inmunología Experimental de la Facultad de Ciencias Biológicas y Bioquímicas de la UNL por permitirme trabajar con el adyuvante que desarrollaron y por prestarme reactivos para poder realizar algunos de los experimentos. A Cecilia Camussone por ayudarme en las prácticas para la blastogénesis linfoproliferativa y por sus consejos sobre los experimentos.

A las investigadoras del Instituto de Virología de INTA Castelar, por permitirme realizar allí la blastogénesis linfoproliferativa, darme sugerencias y colaborar con mi trabajo.

Agradezco al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) el otorgamiento de una beca doctoral y a las autoridades de la Estación Experimental Agropecuaria INTA Rafaela por haberme permitido desarrollar el trabajo correspondiente a mi tesis doctoral en dicha institución.

La realización del trabajo de laboratorio y de campo fue posible gracias al apoyo económico de INTA, de la Asociación Cooperadora de INTA Rafaela, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y de CONICET.

Agradezco a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral por haberme permitido realizar mi tesis de doctorado. Al comité académico del doctorado de esta institución por sus aportes a lo largo de esta tesis doctoral. Al comité de avance

de tesis, Dr. Prando Moore, Dra. Silvina Wilkowsky y Dra. Belkis Marelli, por sus aportes y correcciones a lo largo de este trabajo de tesis.

Agradezco a mis padres, porque de ellos heredé la necesidad de seguir siempre aprendiendo. A mis hermanos y a mis viejos amigos por su apoyo y aguante, por estar presentes a pesar de la distancia.

Agradezco a los amigos que conocí en Rafaela, ellos fueron el sostén que me permitió perseverar y salir a flote en los malos momentos.

A Patrick, por su compañía, comprensión, sostén, estímulo y ayuda.

<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>I</b>
<b>ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS</b>	<b>VII</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XII</b>
<b>CAPÍTULO I: <i>Neospora caninum</i> Y NEOSPOROSIS</b>	<b>1</b>
1.1. Antecedentes	2
1.2. El agente etiológico	3
1.2.1. Taxonomía	3
1.2.2. Ciclo de vida	5
1.3. Patogenia de la neosporosis	7
1.4. Signos clínicos	9
1.5. Inmunidad frente a <i>N. caninum</i>	9
1.6. Epidemiología	11
1.7. Estrategias de control para la neosporosis bovina	16
<b>OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
<b>CAPÍTULO II: DIAGNÓSTICO DE LA NEOSPOROSIS BOVINA</b>	<b>20</b>
2.1. INTRODUCCIÓN	21
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	26
2.2.1. Parásitos	26
2.2.2. Muestras de suero	26
2.2.2.1. Sueros controles	26
2.2.2.2. Sueros de ensayo	26
2.2.2.2.1. Sueros de bovinos	26
2.2.2.2.2. Sueros de pequeños rumiantes	27
2.2.3. Proteína recombinante SAG1 truncada (SAG1t)	28
2.2.3.1. Análisis bioinformático de la secuencia de SAG1	28
2.2.3.2. Clonación del gen SAG1t	28
2.2.3.3. Expresión de la proteína recombinante SAG1t	29
2.2.3.3.1. Expresión en pequeña escala	29

2.2.3.3.2. Expresión en mediana escala	30
2.2.3.4. Purificación de la proteína recombinante SAG1t	30
2.2.4. Evaluación del anticuerpo monoclonal	30
2.2.5. Pruebas serológicas	31
2.2.5.1. Inmunofluorescencia indirecta	31
2.2.5.2. ELISAs de competición	32
2.2.5.2.1. ELISAc comercial, ELISAc <sub>VMRD</sub>	32
2.2.5.2.2. ELISAc con lisado de taquizoitos, ELISAc <sub>taq</sub>	32
2.2.5.2.3. ELISAc con SAG1t recombinante, ELISAc <sub>SAG1t</sub>	32
2.2.6. Estabilidad del antígeno SAG1t inmovilizado en placas de ELISA	33
2.2.7. Estándar relativo de comparación	33
2.2.8. Comparación entre pruebas serológicas	34
2.2.9. Análisis estadístico	34
2.3. RESULTADOS	35
2.3.1. Análisis bioinformático de SAG1 y construcción de la variante truncada SAG1t	35
2.3.2. Expresión y purificación de la proteína recombinante SAG1t	35
2.3.4. Evaluación del anticuerpo monoclonal	35
2.3.5. Categorización del estatus frente a neosporosis de los animales	37
2.3.5.1. Bovinos	37
2.3.5.2. Pequeños rumiantes	37
2.3.6. Desempeño del ELISAc <sub>SAG1t</sub>	38
2.3.6.1. Desempeño del ELISAc <sub>SAG1t</sub> con sueros de bovinos	38
2.3.6.2. Desempeño del ELISAc <sub>SAG1t</sub> con sueros de pequeños rumiantes	39
2.3.7. Concordancia entre pruebas	40
2.3.8. Estabilidad del antígeno SAG1t inmovilizado en placas de ELISA	41
2.4. DISCUSIÓN	42
CAPÍTULO III: PREVENCIÓN DE LA NEOSPOROSIS BOVINA	47
3.1. INTRODUCCIÓN	48
3.1.1. Vacunas formuladas con taquizoitos inactivados o extractos de taquizoitos	50
3.1.2. Vacunas formuladas con taquizoitos vivos atenuados	51
3.1.3. Vacunas formuladas con antígenos de <i>Neospora caninum</i>	53

3.1.4. Adyuvantes	54
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	57
3.2.1. Selección de los antígenos para evaluar como inmunógenos	57
3.2.2. Análisis bioinformático	57
3.2.3. Clonación de los genes	58
3.2.3.1. Diseño de <i>primers</i>	58
3.2.3.2. Obtención del ADNc	58
3.2.3.3. Clonación en el vector pGEM®-T Easy	59
3.2.3.4. Clonación en el vector de expresión pET-24a	59
3.2.3.5. Transformación de la cepa de expresión	60
3.2.4. Expresión de las proteínas recombinantes	60
3.2.4.1. Expresión de las proteínas recombinantes en pequeña escala	60
3.2.4.2. Expresión de las proteínas recombinantes en mediana escala	61
3.2.5. Purificación de las proteínas recombinantes	61
3.2.5.1. Purificación de las proteínas solubles: GRA7 y MIC3	61
3.2.5.2. Purificación de las proteínas insolubles: SRS2 y MIC1	61
3.2.6. Diseño Experimental	62
3.2.6.1. Formulación de la vacuna	62
3.2.6.2. Animales	63
3.2.6.3. Dosis y vía de inoculación	63
3.2.6.4. Desafío	64
3.2.7. Evaluación de la respuesta inmune	64
3.2.7.1. Evaluación de la respuesta inmune humoral	64
3.2.7.1.1. Determinación de IgG total específica contra cada proteína recombinante	66
3.2.7.1.2. Determinación de los isotipos IgG <sub>1</sub> e IgG <sub>2</sub> .	66
3.2.7.1.3. Determinación de anticuerpos anti- <i>N. caninum</i> mediante ELISAc	67
3.2.7.2. Evaluación de la respuesta inmune celular	67
3.2.7.2.1. Obtención de células mononucleares (CMN) bovinas de sangre periférica	67
3.2.7.2.2. Blastogénesis linfoproliferativa	68
3.2.7.2.3. Determinación de las citoquinas INF $\gamma$ e IL-4	70

<b>3.2.7.3. Evaluación de la protección de la vacuna frente a la infección persistente por <i>N. caninum</i></b>	<b>70</b>
<b>3.2.7.3.1. Estudio Molecular</b>	<b>70</b>
<b>3.2.7.4. Análisis estadístico</b>	<b>71</b>
<b>3.3. RESULTADOS</b>	<b>73</b>
<b>3.3.1. Análisis bioinformático y clonación</b>	<b>73</b>
<b>3.3.2. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes</b>	<b>73</b>
<b>3.3.3. Inmunización</b>	<b>75</b>
<b>3.3.4. Evaluación de la respuesta inmune humoral</b>	<b>75</b>
<b>3.3.4.1. IgG totales contra las proteínas recombinantes</b>	<b>75</b>
<b>3.3.4.2. Isotipos IgG1 e IgG2 inducidos</b>	<b>77</b>
<b>3.3.4.3. ELISAc para determinación de anticuerpos anti-<i>N. caninum</i></b>	<b>78</b>
<b>3.3.5. Evaluación de la respuesta inmune celular</b>	<b>80</b>
<b>3.3.5.1. Ensayo de blastogénesis linfoproliferativa</b>	<b>80</b>
<b>3.3.5.2. Citoquinas INF <math>\gamma</math> e IL-4</b>	<b>82</b>
<b>3.3.6. Evaluación de la protección de la vacuna frente a la infección persistente</b>	<b>83</b>
<b>3.3.6.1. Estudio Molecular</b>	<b>83</b>
<b>3.4. DISCUSIÓN</b>	<b>84</b>
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>91</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>93</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>94</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>IV</b>
<b>Tabla 1.1: Prevalencia de anticuerpos anti-<i>N. caninum</i> en bovinos en el mundo</b>	<b>12</b>
<b>Tabla 1.2: Prevalencia de anticuerpos anti-<i>N. caninum</i> en bovinos de Latinoamérica</b>	<b>13</b>
<b>Tabla 1.3: Prevalencia de anticuerpos anti-<i>N. caninum</i> en bovinos de Argentina</b>	<b>14</b>
<b>Tabla 1.4: Prevalencia de anticuerpos anti-<i>N. caninum</i> en pequeños rumiantes</b>	<b>15</b>

<b>Tabla 2.1: Número de animales y muestras tomadas por animal</b>	<b>27</b>
<b>Tabla 2.2: Número de majadas y animales analizados</b>	<b>27</b>
<b>Tabla 2.3: Concordancia e índice <math>\kappa</math> entre ELISAc<sub>SAG1t</sub> y ELISAc<sub>ctaq</sub>, ELISAc<sub>VMRD</sub> e IFI en sueros de bovinos</b>	<b>40</b>
<b>Tabla 2.4: Concordancia e índice <math>\kappa</math> entre ELISAc<sub>SAG1t</sub> y ELISAc<sub>ctaq</sub> e IFI en sueros de pequeños rumiantes</b>	<b>40</b>
<b>Tabla 3.1: Secuencias de los <i>primers</i> utilizados para el clonado de los genes</b>	<b>58</b>
<b>Tabla 3.2: Protocolos de los ELISAi utilizados para detectar IgG contra las proteínas recombinantes de <i>N. caninum</i> inoculadas en los bovinos</b>	<b>66</b>
<b>Tabla 3.3: <i>Primers</i> utilizados para la identificación específica de <i>N. caninum</i> mediante PCR anidada</b>	<b>71</b>
<b>Tabla 3.4: Nucleótidos, aminoácidos y pesos moleculares de los fragmentos clonados</b>	<b>73</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>V</b>
<b>Figura 1.1: Complejo apical de <i>Neospora caninum</i></b>	<b>3</b>
<b>Figura 1.2: Organelas de <i>Neospora caninum</i>.</b>	<b>4</b>
<b>Figura 1.3: Cultivo celular de células VERO infectadas con <i>Neospora caninum</i></b>	<b>5</b>
<b>Figura 1.4: Ciclo de vida de <i>Neospora caninum</i></b>	<b>6</b>
<b>Figura 1.5: Invasión de una célula por un taquizoito de <i>Neospora caninum</i></b>	<b>7</b>
<b>Figura 2.1: SDS-PAGE y WB de SAG1t</b>	<b>36</b>
<b>Figura 2.2: Distribución de los resultados de ELISAc<sub>SAG1t</sub> (%I) en 1123 muestras de suero de bovinos</b>	<b>38</b>
<b>Figura 2.3: Distribución de los resultados de ELISAc<sub>SAG1t</sub> (%I) en 1876 muestras de suero de ovinos y caprinos</b>	<b>39</b>
<b>Figura 2.4: Evaluación de la estabilidad del antígenoSAG1t inmovilizados en placas de ELISA</b>	<b>41</b>
<b>Figura 3.1: Línea de tiempo del diseño experimental para evaluar la vacuna recombinante en bovinos.</b>	<b>64</b>
<b>Figura 3.2: SDS-PAGE de las proteínas evaluadas como inmunógenos en bovinos luego de la purificación y diálisis</b>	<b>74</b>
<b>Figura 3.3: Respuesta de anticuerpos IgG luego de las inmunizaciones y el desafío experimental, medidos para cada proteína recombinante</b>	<b>76</b>

<b>Figura 3.4: Respuesta de anticuerpos del isotipo IgG1 luego de las inmunizaciones y el desafío experimental , medidos para cada proteína recombinante</b>	<b>77</b>
<b>Figura 3.5: Respuesta de anticuerpos del isotipo IgG2 luego de las inmunizaciones y el desafío experimental , medidos para cada proteína recombinante</b>	<b>78</b>
<b>Figura 3.6: Respuesta de anticuerpos anti-<i>N. caninum</i> luego de las inmunizaciones y el desafío experimental</b>	<b>79</b>
<b>Figura 3.7: Índices de proliferación de las células mononucleares en el ensayo de blastogénesis linfoproliferativa, luego de ser estimuladas</b>	<b>81</b>
<b>Figura 3.8: Concentración de citoquinas en los sobrenadantes celulares de los cultivos de blastogénesis linfoproliferativa</b>	<b>82</b>
<b>Figura 3.9: Gel de agarosa que muestra los resultados de la PCR anidada para detección de ADN de <i>N. caninum</i> en los cerebros de los novillos</b>	<b>83</b>

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

%: por ciento

%I: porcentaje de inhibición

<: menor

>: mayor

≤: menor o igual

≥: mayor o igual

®: marca registrada

ABTS: 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico

AcM: anticuerpo monoclonal

ADN: ácido desoxiribonucleico

AID: antígenos inmunodominantes

ANOVA: análisis de la varianza

APIA: del inglés applied printing immunoassay

ARN: ácido ribonucleico

C-: control negativo

C+: control positivo débil

C++: control positivo fuerte

Cc: control del conjugado

CFSE: éster de succinimidilo diacetato de carboxifluoresceína

Cl: cloranfenicol

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad

CMN: células mononucleares de sangre periférica

CO: concordancia observada

Con A: Conavalina A

CPA: células presentadoras de antígenos

CpG: del inglés cytosine-phosphate-guanine

DAB: diaminobencidina

DAT: del inglés direct antiglobulin test

DE: desvío estándar

DIVA: del inglés differentiate infected from vaccinated animals

DO: densidad óptica

dpi: días post-inoculación

DVB: diarrea viral bovina

EEA: estación experimental agropecuaria

ELISA: del inglés enzyme-linked immunoassay

ERC: estándar relativo de comparación

Es: especificidad

Es-D: especificidad diagnóstica

FNT: factor de necrosis tumoral

g: fuerza centrífuga relativa

g: gramos

GRA: proteínas de los gránulos densos

GST: glutatión-S-transferasa

HP: histopatología

IB: inmunoblott

IC: intervalo de confianza

ICT: inmunocromatografía

IFI: inmunofluorescencia indirecta

IFN: interferón

Ig: inmunoglobulina

IHQ: inmunohistoquímica

IL: interleuquina

INTA: instituto nacional de tecnología agropecuaria

IP: índice de proliferación

IPTG: isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido

ISCOM: del inglés immune stimulating complexes

ITS1: espaciador transcrito interno 1

IV: intravenosa

$\kappa$ : índice kappa

K: kanamicina

LB: medio Luria Bertani

LIPVet: laboratorio de inmunología y parasitología veterinaria

MBP: del inglés maltosa-binding-protein

MIC: proteínas de los micronemas

$n$ : tamaño de la muestra

ODN: oligodesoxinucleótidos

ON: óxido nítrico

OR: del inglés odds ratio

P: p valor

pb: pares de bases

PBS: del inglés phosphate buffered saline

PCR: del inglés polymerase chain reaction

PM: peso molecular

psi: del inglés pounds-force per square inch

ROP: proteínas de los rhoptries

rpm: revoluciones por minuto

RPMI: del inglés Roswell Park Memorial Institute medium.

SAG: del inglés major surface antigen

SC: subcutánea

SDS-PAGE: gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico

Se: sensibilidad

Se-D: sensibilidad diagnóstica

SFB: suero fetal bovino

SNC: sistema nervioso central

SRS: del inglés SAG1 related secuence

TBS: del inglés tris buffered saline

Th: T helper

TLR: del inglés toll like receptor

™: del inglés trade mark

TRX: tiorredoxina

VERO: células de riñón de mono verde africano

VFA: virus de la fiebre aftosa

VMRD: del inglés veterinary medical research and development

VP: vesícula parasitófora

## RESUMEN

La neosporosis es una enfermedad abortígena, causada por el parásito protozoario *Neospora caninum*. No hay tratamientos o vacunas disponibles, el control se basa en el diagnóstico y las estrategias de manejo. Se desarrollaron proteínas recombinantes de *N. caninum* para utilizarlas en una prueba diagnóstica y evaluarlas como inmunógenos en la elaboración de una vacuna. Se desarrolló un ELISA de competición (ELISAC<sub>SAG1t</sub>) basado en la proteína SAG1 truncada. La prueba se validó para sueros de bovinos y de pequeños rumiantes, utilizando 1123 muestras de bovinos y 1876 muestras de ovinos y caprinos. La vacuna se formuló con las proteínas MIC1, MIC3, SRS2 y GRA7, y como adyuvante liposomas suplementados con oligodeoxinucleótidos-CpG. Se realizaron dos inmunizaciones en novillos y un desafío con  $1.10^8$  taquizoitos de la cepa NC-1 (días 0, 21 y 56). El punto de corte del ELISAC<sub>SAG1t</sub> en bovinos fue  $\geq 28\%I$ , con una Se-D de 98,4% y una Es-D de 98,5% y en pequeños rumiantes  $\geq 34\%I$ , con una Se-D de 97,1% y una Es-D de 97,4%. Las proteínas MIC1, MIC3 y SRS2 estimularon un aumento de IgG total, IgG1 e IgG2. La proteína GRA7 no fue inmunogénica. Los experimentos de evaluación de la inmunidad celular y la protección frente al desafío no fueron concluyentes. El ELISAC<sub>SAG1t</sub> es útil para el diagnóstico de neosporosis en bovinos y pequeños rumiantes, dada su apropiada Se-D y Es-D. La capacidad de la vacuna de generar respuesta inmune celular y protección frente al desafío se deberá seguir evaluando a partir de los resultados obtenidos.

## ABSTRACT

Neosporosis is an abortigenic disease, caused by the protozoan parasite *Neospora caninum*. Disease control is based on diagnosis and management strategies, due to the lack of treatments and vaccines. Recombinant *N. caninum* proteins were developed to be used in a diagnostic test and to be evaluated as immunogens in the development of a vaccine. A competitive ELISA (cELISA<sub>tSAG1</sub>) based on the truncated SAG1 protein was developed. The test was validated with sera from cattle and small ruminants, using 1123 cattle samples and 1876 sheep and goat samples. The vaccine was formulated with MIC1, MIC3, SRS2 and GRA7 recombinant proteins, adjuvanted with liposomes and oligodeoxynucleotides-CpG. Two immunizations and a challenge with  $1.10^8$  tachyzoites of strain NC-1 were performed in steers (days 0, 21 and 56). The cut-off point of cELISA<sub>tSAG1</sub> was  $\geq 28\%I$ , with a D-Se of 98,4% and a D-Sp of 98,5% in cattle and  $\geq 34\%I$ , with a D-Se of 97.1% and an D-Sp of 97.4% in small ruminants. MIC1, MIC3 and SRS2 proteins stimulated IgG, IgG1 and IgG2 increase. GRA7 protein was not immunogenic. The evaluation of cellular immunity and protection against challenge experiments were inconclusive. cELISA<sub>tSAG1</sub> is useful for the diagnosis of neosporosis in bovines and small ruminants, given the appropriate D-Se and D-Sp values obtained. The ability of the vaccine to generate cellular immune response and protection against the challenge should continue under evaluation based on the obtained results.

# **CAPÍTULO I:**

## ***Neospora caninum* Y NEOSPOROSIS**

## **CAPÍTULO I: *Neospora caninum* Y NEOSPOROSIS**

### **1.1. ANTECEDENTES**

*Neospora caninum* es un parásito protozoario intracelular obligado, del Phylum Apicomplexa (Bjerkas y col., 1984; Dubey y col., 1988a), de la familia Sarcocystidae, estrechamente relacionado con otros parásitos que afectan a los bovinos como *Toxoplasma gondii*, *Hammondia heydorni*, *Besnoitia besnoiti* y *Sarcocystis* spp.

En 1984 en Noruega, un grupo de perros sufrió una enfermedad neuromuscular con parálisis y muerte de los cachorros. Ésta enfermedad fue asociada a un parásito similar a *T. gondii* (Bjerkas y col., 1984). Encontraron quistes en tejidos del sistema nervioso central y en los músculos de los perros, pero no detectaron anticuerpos anti-*T. gondii*. En 1988, un cuadro clínico similar, también en perros ocurrió en Estados Unidos. El parásito causante de estos episodios fue llamado *N. caninum* (Dubey y col., 1988a), y la enfermedad: Neosporosis. Más tarde se logró aislar y cultivar el parásito en una línea celular, y también reproducir la enfermedad de manera experimental en ratones y en perros (Dubey y col., 1988b). Gracias a la posibilidad de mantener el parásito en un cultivo celular, se desarrolló la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para detectar anticuerpos anti-*N. caninum* en el suero sanguíneo (Dubey y col., 1988b). El desarrollo de la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) permitió identificar los quistes formados por el parásito en los tejidos de distintos animales (Lindsay y Dubey, 1989). Así fue como se confirmó que los perros que presentaron enfermedad neurológica en Noruega y en EE.UU. estaban infectados con *N. caninum* (Bjerkas y Dubey, 1991).

Una vez descrito *N. caninum*, se descubrió que también era causante de abortos en vacas. El primer hallazgo en un rodeo bovino fue en Nuevo México, EE.UU., en un tambo de vacas Holstein (Thilsted y Dubey, 1989). Desde ese momento, *N. caninum* se ha encontrado en bovinos de todo el mundo (Dubey y Schares, 2011). También se detectó el parásito en cabras y ovejas. La enfermedad se reprodujo experimentalmente en bovinos, caprinos y ovinos, así como también se confirmó experimentalmente que *N. caninum* es causante de abortos en estas especies (Dubey y Lindsay, 1990; Barr y col., 1992; Bar y col., 1994; Buxton y col., 1997). En los equinos, se describió una segunda especie del género, *N. hughesi* (Marsh y col., 1998).

## 1.2. EL AGENTE ETIOLÓGICO

### 1.2.1. TAXONOMÍA

*N. caninum* es un parásito coccidio, protozooario, de vida intracelular obligada. Pertenece al phylum Apicomplexa. Como todos los parásitos de este phylum, posee una organela que los define: el complejo apical. Este complejo apical, situado en el extremo anterior del parásito, facilita su entrada a la célula. Está conformado por un conjunto de microtúbulos dispuestos en espiral denominados conoide, por los rhoptries, los micronemas y una o más bandas de microtúbulos que conforman el anillo polar (Figura 1.1).

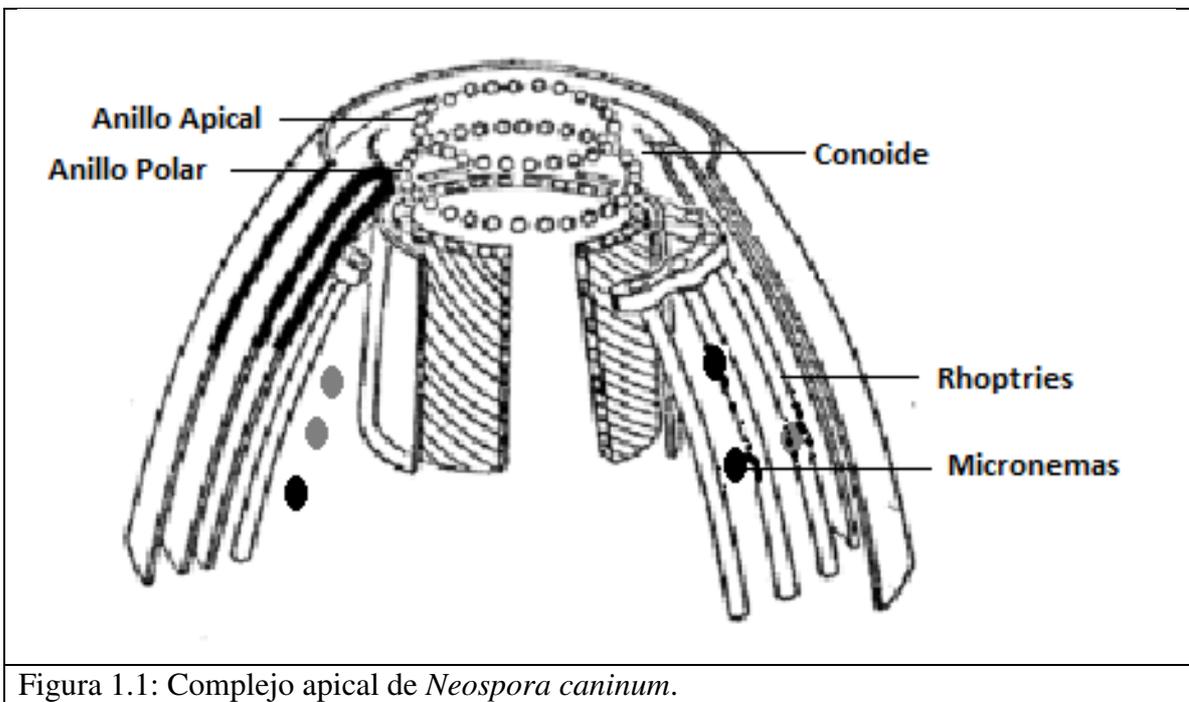


Figura 1.1: Complejo apical de *Neospora caninum*.

Los rhoptries y sus proteínas ROP colaboran en la penetración del parásito dentro de la célula hospedadora y la formación de la vacuola parasitófora (VP). La VP es un compartimiento formado dentro de la célula donde se aloja el parásito, con capacidad de modificar su medio ambiente y transportar sustancias desde y hacia el citoplasma celular. Los micronemas producen las proteínas MIC que participan en el reconocimiento y la adhesión a la célula hospedadora. Los gránulos densos producen proteínas GRA que se liberan dentro de la VP donde se multiplica el parásito para adecuar su medio ambiente.

Al igual que todas las células eucariotas, *N. caninum* también posee los compartimentos necesarios para la síntesis y el transporte de proteínas, incluido un núcleo, un retículo endoplasmático rugoso continuo a la envoltura nuclear, un aparato de Golgi y mitocondrias (Dubey y Lindsay, 1993) (Figura 1.2).

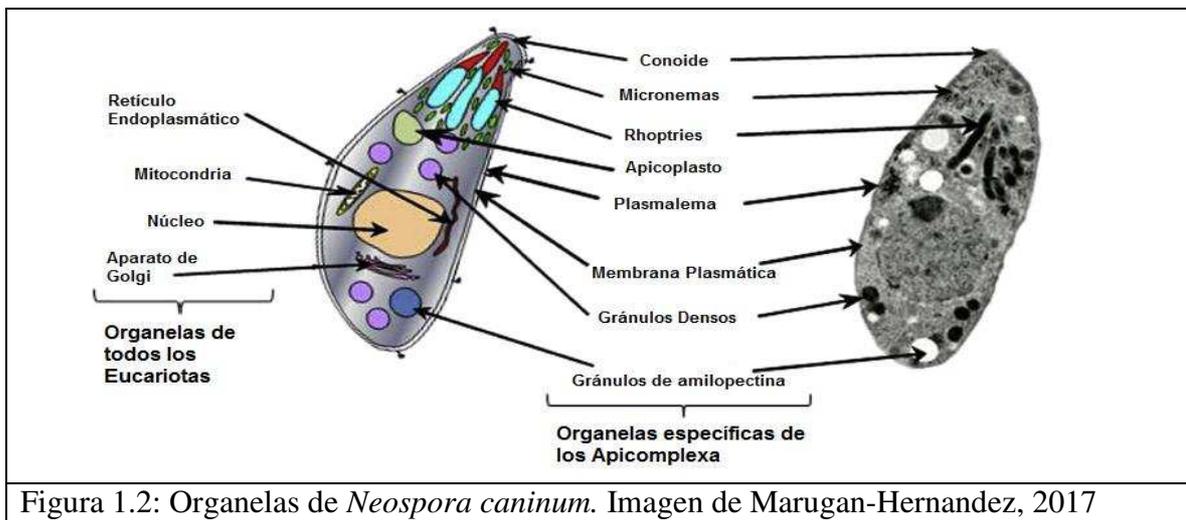


Figura 1.2: Organelas de *Neospora caninum*. Imagen de Marugan-Hernandez, 2017

*N. caninum* presenta tres estadios parasitarios: los taquizoitos, los bradizoitos y los esporozoitos. Los taquizoitos son estructuras de replicación rápida, ovoides o semilunares con una medida de 3-7 x 1-5  $\mu\text{m}$ , dependiendo del estado de la división. Se dividen por endodiogenia. En el animal parasitado, infectan una amplia variedad de células, entre ellas: macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, miocitos, células epiteliales de los túbulos renales, hepatocitos y células nerviosas (Dubey y Lindsay, 1993). Una célula parasitada puede contener hasta 100 taquizoitos en su interior (Figura 1.3). Los bradizoitos son las formas de reproducción lenta y forman los quistes tisulares. Estos tienen una forma redonda u oval, miden hasta 107  $\mu\text{m}$  y se encuentran en los tejidos del sistema nervioso central y músculos esqueléticos de los animales parasitados. Poseen una pared que los recubre, con un espesor de hasta 4  $\mu\text{m}$ . Los esporozoitos se encuentran en los ooquistes esporulados. Los ooquistes esporulan en el medio ambiente, y contienen dos esporocistos con cuatro esporozoitos cada uno. Miden aproximadamente 11  $\mu\text{m}$  y son resistentes al frío y a la desecación. Pueden permanecer infectivos en el ambiente durante meses (Uzeda y col., 2007) y son resistentes a tratamientos químicos como yodo, etanol, cloruro de amonio y formaldehído (Alves-Neto y col., 2011).

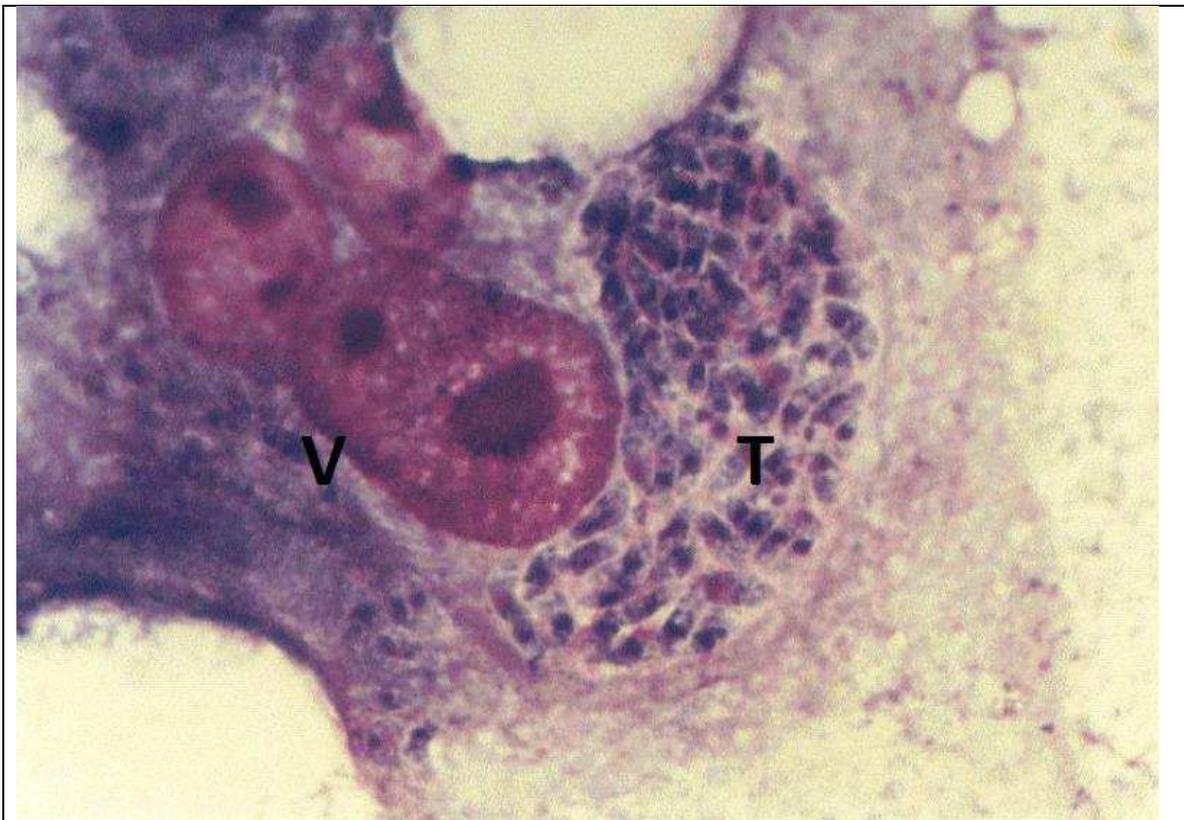


Figura 1.3: Cultivo celular de células VERO infectadas con *Neospora caninum*. V: célula VERO. T: taquizoitos. El cultivo se coloreó con Giemsa. Ampliación 1000x en microscopio óptico. Fotografía tomada por Ignacio Echaide.

### 1.2.2. CICLO DE VIDA

El ciclo de vida de *N. caninum* es heteroxeno, es decir que posee un hospedador definitivo y un hospedador intermediario (Figura 1.4). En el hospedador definitivo, *N. caninum* se reproduce sexualmente. Los hospedadores definitivos son el perro doméstico (McAllister y col., 1998), el coyote (Gondim y col., 2004), el lobo (Dubey y Schares, 2011) y el dingo (King y col., 2010). En el hospedador intermediario el parásito lleva a cabo la reproducción asexual, por endodigenia. *N. caninum* puede infectar potencialmente cualquier vertebrado de sangre caliente, entre ellos además de los ya nombrados bovinos, cabras y ovejas; se encuentran las gallinas (Costa y col., 2008), gorriones (Gondim y col., 2010), zorros colorados (Almeríay col., 2002) y ciervos de cola blanca (Vianna y col., 2005). Se han encontrado anticuerpos anti-*N. caninum* en una extensa variedad de animales (Dubey y Schares, 2011).

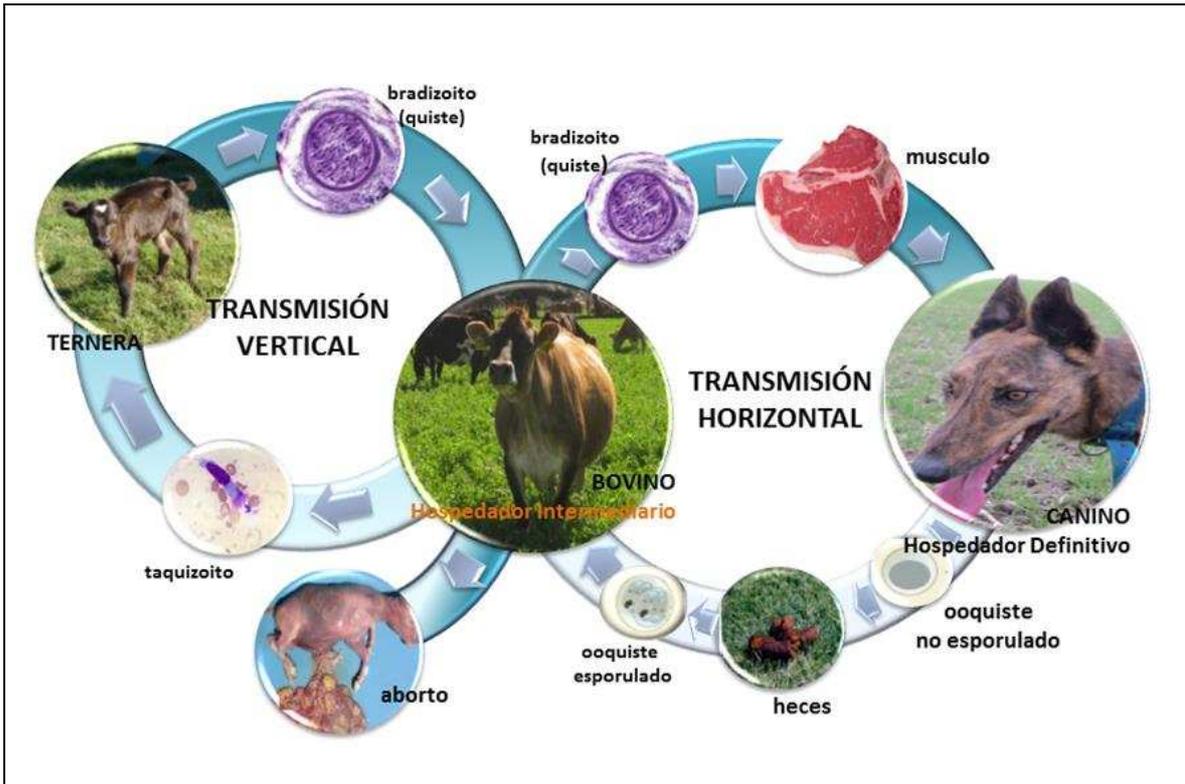


Figura 1.4: Ciclo de vida de *Neospora caninum*

Los ooquistes no esporulados son eliminados con las heces del hospedador definitivo al ambiente. En 24 horas esporulan, volviéndose infectivos (Lindsay y col., 1999) y aguardan por un hospedador intermediario que los ingiera. El hospedador intermediario ingiere los ooquistes esporulados con el agua o el alimento y los taquizoitos se liberan en su organismo. Esta forma de contagio se denomina transmisión horizontal. Los taquizoitos, luego de aproximadamente 20 divisiones comienzan su fase de multiplicación lenta, transformándose en bradizoitos. Así, tres semanas después de la infección podemos encontrar quistes tisulares en los tejidos de los hospedadores intermediarios (Goodswen y col., 2013). Los hospedadores definitivos se infectan ingiriendo los tejidos que contienen quistes tisulares. Otra forma de contagio es la transmisión vertical o transplacentaria, que tiene una eficiencia del 95 % (Davison y col., 1999). El feto se infecta cuando los taquizoitos atraviesan la placenta e invaden su organismo. Existen dos formas de transmisión vertical: 1) la forma exógena, en que una hembra preñada ingiere con la comida o bebida ooquistes esporulados de *N. caninum* y los taquizoitos atraviesan la placenta e infectan al feto; y 2) la forma endógena, que ocurre cuando la infección con *N. caninum* es previa a la concepción. Durante la preñez, como

consecuencia de la inmuno-depresión fisiológica, los bradizoitos enquistados en los tejidos se reactivan volviéndose taquizoitos y atraviesan la placenta infectando al feto (Innes y col., 2002). Esta reactivación de los bradizoitos contenidos en los quistes tisulares es un factor importante en la persistencia de la infección en los rodeos, ya que permite la transmisión eficiente del parásito de generación en generación.

### 1.3. PATOGENIA DE LA NEOSPOROSIS

En la patogenia de la neosporosis, la invasión celular es un elemento clave. Es un proceso complejo que incluye receptores de superficie y una serie de proteínas que se liberan desde los micronemas, rhoptries y gránulos densos (Figura 1.5).

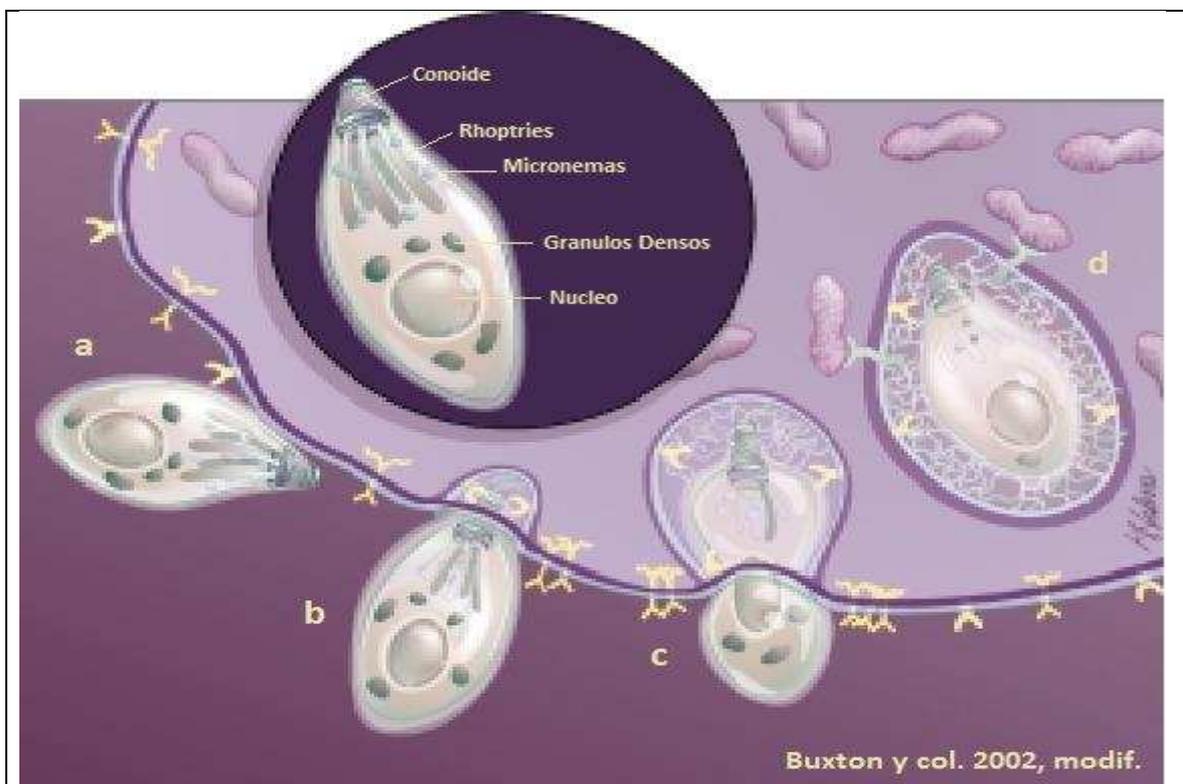


Figura 1.5: Invasión de una célula por un taquizoito de *Neospora caninum*. a) Unión inicial inespecífica. b) Comienzo de la invasión. El taquizoito se reorienta para que el complejo apical quede en contacto con la membrana citoplasmática de la célula hospedadora. Se externaliza el conoide, que penetra la membrana de la célula. c) Penetración del parásito impulsado por su citoesqueleto. La membrana citoplasmática de la célula hospedadora se invagina y forma la membrana de la vacuola parasitófora (VP). d) El parásito queda dentro de la célula. Las proteínas GRA de los gránulos densos se descargan en la VP para adecuar el medio a sus requerimientos. Imagen de Buxton y col., 2002.

La unión inicial del parásito a la célula hospedadora es inespecífica y ocurre sin una orientación determinada. Involucra antígenos de superficie inmunodominantes como el antígeno mayor de superficie SAG1 y la secuencia relacionada con SAG1, SRS2. Luego de la unión inicial, el parásito se reorienta para que su extremo anterior, donde se encuentra el complejo apical, quede en contacto con la membrana citoplasmática de la célula hospedadora. Se externaliza el conoide, que penetra la membrana de la célula y se secretan varias proteínas en la VP naciente. Los micronemas secretan las proteínas MIC, adhesinas que forman una unión estrecha entre las membranas del parásito y la membrana de la célula. Desde esta zona de unión, el parásito se internaliza impulsado por su citoesqueleto. Esta estructura capaz de introducir el parásito en la célula hospedadora se denomina “unión móvil” (del inglés *moving junction*). La membrana citoplasmática de la célula hospedadora se invagina y forma la membrana de la VP. El parásito queda entonces dentro de la célula, contenido en una VP. Las proteínas GRA de los gránulos densos se descargan en la VP para adecuar el medio a los requerimientos del parásito. La VP se coloca adyacente a las mitocondrias y el retículo endoplasmático de la célula hospedadora para utilizarlos en su beneficio (Buxton y col., 2002).

Al penetrar al organismo, los taquizoitos se diseminan a través de la sangre y linfa. Infechan las células del hospedador multiplicándose en su interior hasta hacerlas estallar debido a la gran cantidad de parásitos que alojan. Así, los taquizoitos liberados parasitan y se reproducen en nuevas células. A causa de esta agresión, se desencadena la respuesta inmune en el hospedador. Como mecanismo de evasión de la respuesta inmune, los taquizoitos comienzan una fase de división lenta y se convierten en bradizoitos, que se agrupan y forman quistes en los tejidos del hospedador (Innes y col., 2002). En el caso de que se genere una inmuno-depresión en el organismo hospedador (ya sea patológica o fisiológica), los bradizoitos pueden reactivarse, convertirse en taquizoitos y comenzar una fase de reproducción rápida. Un ejemplo de esto es la inmuno-depresión fisiológica que desencadena la gestación.

Las posibles consecuencias de la infección en un animal gestante son: 1) el aborto, 2) el nacimiento de un ternero enfermo y 3) el nacimiento de un ternero sano, pero persistentemente infectado. Cuál de los tres eventos ocurrirá, depende del sistema inmune de la madre, del momento de la gestación en que la madre se infecte y del grado de desarrollo del sistema inmune del feto. La mayoría de los abortos por *N. caninum* se producen entre el quinto y el sexto mes de gestación, ya que en este momento la vaca

gestante presenta una inmuno-depresión fisiológica causada por la progesterona y el feto aún no ha desarrollado su sistema inmune (Innes y col., 2002).

#### **1.4. SIGNOS CLÍNICOS**

El principal signo clínico que presentan los bovinos adultos es el aborto. Una vaca infectada con *N. caninum* tiene 2 veces más probabilidades de abortar que una vaca no infectada (Pare y col., 1997). Los abortos pueden ocurrir desde el tercer mes de gestación hasta el término, pero la mayoría de los abortos inducidos por *N. caninum* ocurren en el tercio medio de la gestación, entre los cinco y los seis meses (Buxton y col., 2002). También se reconoció a *N. caninum* como causante de abortos en majadas de ovinos (Gonzalez-Warleta y col., 2014; Hecker y col., 2019a) y caprinos (Moreno y col., 2012; Vereschin y col., 2012). Además, se han reportado pérdidas en la ganancia de peso en bovinos de carne (Barling y col., 2000) y pérdidas en la producción láctea (Hernandez y col., 2001).

Los terneros que nacen vivos pueden tener lesiones neurológicas, incapacidad para levantarse y bajo peso al nacer. Las extremidades posteriores y/o anteriores pueden estar flexionadas o hiperextendidas. En el examen neurológico se observa ataxia, disminución de los reflejos rotulianos y pérdida de la propiocepción consciente. Pueden presentar exoftalmia y ocasionalmente hidrocefalia (Dubey y Schares, 2011). Los terneros también pueden nacer sanos, pero persistentemente infectados, ya que los hijos de vacas infectadas tienen un 80-90 % de probabilidades de ser portadores congénitos de *N. caninum* (Paré y col., 1996).

#### **1.5. INMUNIDAD FRENTE A *N. caninum***

Tanto en animales infectados naturalmente como en aquellos infectados experimentalmente, hay producción de anticuerpos específicos y respuesta inmune mediada por células, con proliferación celular y producción de interferón gamma (INF  $\gamma$ ) (Andrianarivo y col., 2001). Los anticuerpos específicos en la respuesta inmune frente a *N. caninum* controlan la expansión inicial del parásito, en la fase de multiplicación rápida, facilitando la lisis de los parásitos extracelulares. Al ser un parásito intracelular obligado, la capacidad del organismo hospedador de hacer frente a la enfermedad depende de la inmunidad mediada por células (Innes y col., 2002).

Los parásitos intracelulares como *N. caninum*, desencadenan una respuesta inmune de tipo T helper 1 (Th1), mediada por linfocitos T citotóxicos, dominada por la producción de IL-12, INF  $\gamma$ , factor de necrosis tumoral alfa (FNT  $\alpha$ ) e inmunoglobulinas del isotipo IgG2. Dichas citoquinas activan las vías del óxido nítrico (ON) y radicales libres, que resultan letales para los parásitos (Tizard, 2009a). Esto quedó demostrado para *N. caninum* cuando Baszler y col. (1999) inocularon ratones incapaces de producir IL-12 e INF  $\gamma$  y observaron que no hubo supervivencia frente a la infección experimental.

Durante la gestación, la respuesta inmune Th1 es modulada para evitar dañar al feto, que es un elemento extraño en el organismo de la madre. Durante el primer tercio de la gestación, los niveles aún bajos de progesterona permiten a la madre desencadenar una respuesta Th1 frente a la infección. Probablemente, esta respuesta pro-inflamatoria, con proliferación celular y producción de INF  $\gamma$ , IL-2 e IL-12 sea la causa de los abortos en el primer tercio de la gestación (Raghupathy y col., 1997). A partir del segundo tercio de gestación, la progesterona y las células del trofoblasto efectúan una inmuno-modulación en el organismo materno, con un ambiente de citoquinas propio de un perfil Th2. Las concentraciones de IL-10, estimulante de un perfil T regulatorio, aumentan y las de INF  $\gamma$  disminuyen (Almería y col., 2015). Esto permite la reactivación del parásito y la invasión del feto. En este momento, la edad del feto y la madurez de su sistema inmunológico son cruciales en su supervivencia.

Los estudios del perfil de citoquinas e inmunoglobulinas, realizados en hembras infectadas naturalmente previo a la concepción, mostraron que el perfil Th1 protegió frente al aborto (Innes y col., 2002). La respuesta Th1 con predominio de IgG2 en plasma se demostró como protectora frente al aborto por *N. caninum* en presencia de INF  $\gamma$ . Los niveles elevados de anticuerpos IgG2, por si solos, parecen ser insuficientes para proteger a las madres infectadas crónicamente con *N. caninum* del aborto (Almería y col., 2009). Por otro lado, al comparar madres seropositivas que abortaron con las que no abortaron, se observó que aquellas que abortaron tuvieron títulos de INF  $\gamma$  mayores. Por lo tanto, está claro que es necesario un límite en el nivel de INF  $\gamma$  durante la gestación en vacas seropositivas a *N. caninum* para protegerlas del aborto. Además de INF  $\gamma$ , también existe una respuesta inmune protectora parcial contra el parásito en vacas preñadas infectadas, relacionada con la mayor expresión de FNT  $\alpha$  durante toda la gestación acompañado por una mayor expresión de IL-12 y de IL-10 reguladora, especialmente hacia el final de la gestación (Almería y col., 2012).

Recientemente, Pereyra y col. (2019) demostraron una diferencia en la transmisión vertical de la enfermedad en bovinos infectados crónicamente, según los isotipos de IgG presentes. Observaron que el 80 % de las madres que transmitió el parásito a los fetos, tuvo valores de la relación IgG1/IgG2 menores a 1 con bajos niveles de INF  $\gamma$  y, por el contrario, el 90 % de las madres que no transmitió la enfermedad, tuvo una relación de IgG1/IgG2 mayor a 1 con presencia de INF  $\gamma$ . Estos hallazgos indican que hay un delicado balance entre el perfil de respuesta Th y los indicadores serológicos medidos: IgG1, IgG2 e INF  $\gamma$ . Estas determinaciones podrían utilizarse como guías para estimar las probabilidades de abortar que tiene una vaca gestante (Almería y col., 2012).

## **1.6. EPIDEMIOLOGÍA**

La sero-prevalencia de *N. caninum* difiere considerablemente entre países, regiones y tipos de explotación ganadera. Las técnicas serológicas utilizadas, el diseño experimental y el tamaño de la muestra deben ser tenidos en cuenta al comparar distintos estudios sero-epidemiológicos. (Dubey y col., 2007).

En países de Europa, Asia, Oceanía y América del Norte, se llevaron a cabo estudios sero-epidemiológicos con un extenso número de muestras involucradas (Tabla 1.1). En algunos países y regiones, se desarrollaron planes de control de la enfermedad. Este es el caso de España donde varios gobiernos regionales incluyeron a la neosporosis en los programas de salud para bovinos. También en el Reino Unido se realizó un relevamiento de neosporosis incluyendo gran número de bovinos. En Alemania y Noruega se tomaron muestras de leche de tanque de 1900 y 1600 tambos, respectivamente, para conocer en cuantos tambos la prevalencia de la enfermedad superó el 15 %, mínimo valor detectable por la prueba de ELISA en leche.

Tabla 1.1: Prevalencia de anticuerpos anti-*N. caninum* en bovinos en el mundo (adaptado de Dubey y Schares, 2011)

País	Nro. de animales	Prevalencia (%)	Prueba	Referencia
Alemania	1950 (c)	1 (*)	ELISAi (1)	Schares y col., 2009
Grecia	1573	15	ELISAi (1)	Sotiraki y col., 2008
Irán	285	12,6	ELISAi SVANOVA®	Fard y col., 2008
	237	32	ELISAi IDEXX®	Youssefi y col., 2009
Noruega	1657 (c)	0,7 (*)	ELISAi SVANOVA®	Klevar y col., 2010
China	601	43	ELISAi (2)	Yao y col., 2009
	201	6	ELISAi (2)	Yao y col., 2009
	540	13	ELISAi IDEXX®	Xia y col., 2011
	370	19	ELISAi IDEXX®	Wang y col., 2010
España	37090 (a)	23	ELISAi IDEXX®	Eiras y col., 2011
	20206 (b)	26	ELISAi IDEXX®	Eiras y col., 2011
Suecia	2754	3	ELISAi (3)	Loobuyck y col., 2009
Reino Unido	15736	13	ELISAi IDEXX®	Woodbine y col., 2008
Canadá	1976 (b)	7	ELISAi IDEXX®	Waldner y col., 2004
	327	32	IB	Ortega y col., 2007
Estados Unidos	87	10	IB	Ortega y col., 2007
México	2585	24	ELISAc VMRD	Sanderson y col., 2000
	596	12	ELISAi IDEXX®	García-Vazquez y col., 2009
Australia	3298	6	ELISAi (3)	Moloney y col., 2017
Nueva Zelanda	499 (b)	3	ELISAi (2)	Tennent-Brown y col., 2014
	800 (b)	8	ELISAi (2)	Reichel y col., 1998

(a) bovinos de leche. (b) bovinos de carne. (c) pool de leche. (\*) % de tambos analizados que tuvo una prevalencia  $\geq 15$  %. (1) basado en la proteína recombinante SRS2. (2) basado en un lisado de taquizoitos. (3) basado en un lisado de taquizoitos capturados en ISCOM.

En varios países de Latinoamérica se realizaron estudios sero-epidemiológicos con resultados variables (Tabla 1.2). Las sero-prevalencias halladas estuvieron entre el 11 y el 36 %. La mayoría de los estudios fueron realizados en bovinos de leche. En Perú, la sero-prevalencia encontrada fue mayor que en los demás países analizados, pero el estudio fue realizado con sueros de 29 animales de 9 establecimientos de bovinos de leche con problemas reproductivos. Lo mismo sucedió en Uruguay, donde el estudio se realizó en un establecimiento de bovinos de leche con problemas de abortos.

Tabla 1.2: Prevalencia de anticuerpos anti-*N. caninum* en bovinos de Latinoamérica (adaptado de Moore, 2005)

País	Nro. de animales	Prevalencia (%)	Prueba	Referencia
	477 (a)	14	IFI	Gondim y col., 1999
	172 (a)	35	IFI y ELISAI IDEXX®	Locatelli-Dittrich y col., 2001
Brasil	623 (a)	14	IFI	Guimaraes y col., 2004
	223 (a)	11	IFI	Corbellini y col., 2002
	576 (a)	18	ELISAI (1)	Melo y col., 2004
Chile	55 (a)	36	IFI	Patitucci y col., 1999
	371 (a)	22	IFI	Patitucci y col., 2000
Paraguay	297 (a)	36	ELISAI (1)	Osawa y col., 2002
y	582 (b)	27	ELISAI (1)	Osawa y col., 2002
Perú	29 (a)	62	IFI	Rivera y col., 2000
Uruguay	217 (a)	57	IFI	Kashiwazaki y col., 2004

(a) bovinos de leche. (b) bovinos de carne. (1) basado en un lisado de taquizoitos.

En los últimos años se han realizado trabajos sero-epidemiológicos en diferentes regiones de Argentina para obtener información sobre la distribución y la prevalencia de la enfermedad (Tabla 1.3). La mayor cantidad de muestreos se realizó en el centro del país. Se detectaron diferencias en la prevalencia entre bovinos de leche y carne en la pampa húmeda (en su mayor parte muestras de la provincia de Buenos Aires) y en la provincia de La Pampa. En Santa Fe, la prevalencia de anticuerpos anti-*N. caninum* en bovinos de leche y carne fue similar.

Tabla 1.3: Prevalencia de anticuerpos anti-*N. caninum* en bovinos de Argentina

Región	Nro. de animales	Prevalencia (%)	Prueba	Referencia
Pampa húmeda	3043 (a)	40	IFI	Moore y col., 2009
	2551 (b)	17	IFI	
La pampa	864 (a)	20	IFI	Fort y col., 2015
	3492 (b)	7	IFI	
Salta	667 (a)	34	IFI	Neumann y col., 2011
Córdoba y Santa Fe	460 (a)	34	IFI y ELISAi (1)	Echaide y col., 1998
Santa Fe	352 (b)	30	IFI y 2 ELISAc (1)(2)	Novoa y col., 2019

(a) bovinos de leche. (b) bovinos de carne. (1) basado en un lisado de taquizoitos. (2) basado en la proteína recombinante SAG1t.

Hay poca información sobre la prevalencia de la enfermedad en pequeños rumiantes en el mundo y en el país (Tabla 1.4). Las sero-prevalencias reportadas para pequeños rumiantes son menores que a las encontradas en bovinos. Moore y col. (2007) evaluaron sueros de cabras ( $n = 1594$ ) de la provincia de La Rioja y Gos y col. (2017) de las provincias de Córdoba y Buenos Aires. Hecker y col. (2013) trabajaron con 6 majadas ovinas lecheras de la región pampeana. En las provincias de Entre Ríos y Santa Fe, se tomaron muestras de suero de cabras y ovejas, ya que la mayoría de las majadas en la zona están formadas por pequeños grupos de ambas especies juntas. Las prevalencias fueron similares en las dos especies. En un relevamiento sanitario en la provincia de Río Negro, Robles y col. (2016) analizaron sueros de 355 ovejas y 153 cabras.

Tabla 1.4: Prevalencia de anticuerpos anti-*N. caninum* en pequeños rumiantes

Región	Nro. de animales	Prevalencia (%)	Prueba	Referencia
La Rioja	1594 (a)	7	IFI	Moore y col., 2007
Córdoba	2187 (a)	4	IFI	Gos y col., 2017
Buenos Aires	735 (a)	10	IFI	
Pampa húmeda	704 (b)	3	IFI	Hecker y col., 2013
Entre Ríos	940 (a)(b)	14	IFI y 2 ELISAc (1) (2)	Novoa y col., 2018
Santa Fe	961 (a)(b)	12		
Río Negro	355 (b) 153 (a)	2 0	IFI	Robles y col., 2016
Brasil (San Pablo)	597 (b)	10	IFI	Figliuolo y col., 2004
Brasil (Río de Janeiro)	388 (b)	6	ELISAi IDEXX®	Cosendey y col., 2018

(a) cabras. (b) ovejas. (1) basado en un lisado de taquizoitos. (2) basado en la proteína recombinante SAG1t.

La enfermedad puede tener un patrón enzoótico, con presencia de abortos distribuidos en un porcentaje homogéneo a lo largo del tiempo; o epizoótico, con la ocurrencia de un brote de abortos. El patrón enzoótico se asocia a la vía de infección vertical, con la persistencia del parásito en los tejidos a través de distintas generaciones de bovinos. En el patrón epizoótico existen dos o más abortos en un periodo corto de tiempo, que pueden estar asociados a la presencia de ooquistes esporulados en el agua o el alimento (Thurmond y col., 1997). La causa de este episodio de abortos también puede ser la inmuno-depresión de un conjunto de animales por una enfermedad concomitante (micotoxinas, DVB, estrés calórico) que produzca la reactivación de los bradizoitos en quistes tisulares de animales que se infectaron previamente (Bartels y col., 1999).

### **1.7. ESTRATEGIAS DE CONTROL PARA LA NEOSPOROSIS BOVINA**

Actualmente no hay ningún quimioterápico seguro y eficaz para el tratamiento de la neosporosis o la prevención del aborto en animales infectados. Se probaron distintos quimioterápicos disponibles en el mercado, entre ellos la monensina, el toltrazuril, la sulfadiazina-trimethoprim y el decoquinato sin resultados concluyentes que confirmen su efectividad (Sánchez-Sánchez y col., 2018). El tratamiento preventivo a largo plazo resulta poco económico y en bovinos de cría extensiva resulta difícil su administración diaria. Además, no se puede descartar el efecto residual de dichos fármacos en la leche o carne de los animales tratados. Existen nuevos fármacos en desarrollo, con evaluaciones *in vitro* y algunos de ellos *in vivo* en animales de laboratorio. La mayoría mostró resultados prometedores en su efectividad frente a los taquizoitos, pero no hay información de su eficacia frente a los bradizoitos (Sánchez-Sánchez y col., 2018). A pesar de los esfuerzos realizados por muchos laboratorios para el desarrollo de una vacuna, en este momento no hay ninguna disponible. En Estados Unidos estuvo disponible hasta 2009 una vacuna basada en taquizoitos inactivados (C548 NeoGuard™, Intervet International B.V., Boxmeer, Países Bajos), que mostró baja eficacia contra la transmisión vertical, por lo que fue retirada del mercado (Weston y col., 2012). Por estas razones, actualmente las estrategias para el control de la infección por *N. caninum* y la reducción de los abortos que produce en los rodeos se basan en el conocimiento del ciclo de vida y la epidemiología del parásito (Reichel y col., 2014).

Para llegar a un diagnóstico sobre la responsabilidad de *N. caninum* en la disminución de la eficiencia reproductiva, en primera instancia se debe conocer la prevalencia de la

enfermedad y cuál es la forma de transmisión predominante en el rodeo. En el caso de que haya abortos confirmar si estos abortos son causados por *N. caninum* a través de histopatología. La detección de *N. caninum* a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el cerebro del feto o de anticuerpos por serología solo confirma la infección, pero no el aborto por *N. caninum*. Para conocer la prevalencia de anticuerpos anti-*N. caninum* en el rodeo, se deben tomar muestras de suero de al menos el 10 % de los animales o una muestra de leche de tanque. Los anticuerpos específicos se pueden detectar en un pool de leche cuando la sero-prevalencia en el rodeo es superior al 15 % (Bartels y col., 2005).

Ante la ocurrencia de abortos, se deben tomar muestras de suero de las vacas que abortaron e igual cantidad de sueros de vacas gestantes. Con estos datos se puede establecer si hay una asociación entre la ocurrencia de los abortos y la sero-positividad frente a *N. caninum* (Dubey y col., 2007). En el caso de que se confirme esta asociación, se debe evaluar la forma de transmisión predominante en el rodeo, para poder establecer las medidas de control adecuadas. Para conocer si hay asociación y cuál es el patrón de aborto producido por *N. caninum* en el rodeo, es necesario estimar la razón de probabilidades (OR, del inglés *odds ratio*), que es un parámetro indicativo del riesgo de aborto endémico o epidémico. Este parámetro se calcula según la siguiente fórmula:

$$OR = \frac{(a/c)}{(b/d)}$$

Donde *a* son los animales sero-positivos que abortaron, *b* los animales sero-negativos que abortaron, *c* los animales sero-positivos que no abortaron y *d* los animales sero-negativos que no abortaron.

El patrón endémico de abortos generalmente está relacionado con un OR menor a 10, mientras que un OR más alto podría ser indicativo de un patrón epidémico (Schaes y col., 2002). El patrón de abortos endémico está asociado a una vía de transmisión vertical, en que las vacas y sus crías son seropositivas, y ocurren abortos de manera homogénea en el tiempo. Para confirmarlo, se deben tomar muestras de suero de las madres y sus crías mayores a 6 meses, o de sus terneros pre-calostroado. En la transmisión horizontal de la enfermedad, los animales seropositivos están separados en grupos de edad (terneros, recría, vacas secas, vacas en ordeño, toros) y hay una falta de asociación entre el estatus serológico de las madres y sus crías. El análisis del historial de parcelas en que estuvo el

rodeo infectado y su suplementación con alimento balanceado o rollos puede ayudar a definir la fuente de infección (Dubey y col., 2007). La avidéz de los anticuerpos anti-*N. caninum* también puede ser útil para determinar si la enfermedad en el rodeo es crónica o de presentación reciente. Los anticuerpos en animales crónicos tendrán mayor avidéz que los recientemente infectados (Schaes y col., 2002).

En el caso de que la forma de transmisión predominante sea la vertical, la principal medida a tomar es la reducción de la cantidad de vacas infectadas. Estas medidas incluyen la eliminación de las vacas sero-positivas con historia de abortos, la inseminación de las vacas seropositivas con semen de razas de carne para posteriormente vender los terneros; la transferencia de los embriones de vacas de alto valor genético a vacas receptoras seronegativas, ya que la infección se produce de forma trans-placentaria. Ante el ingreso de nuevos animales, realizar un análisis serológico, y solo ingresar los animales seronegativos. En el caso de que la forma horizontal sea la de mayor ocurrencia, se deben enfocar los esfuerzos en evitar la contaminación de los alimentos y agua con ooquistes. Para esto, las medidas a tomar son evitar el ingreso de los perros a los lugares de almacenamiento de alimento para las vacas, restringir su acceso a los bebederos, y eliminar rápidamente las placentas, abortos y cadáveres para que los perros no puedan ingerirlos. Las medidas de bioseguridad deben aplicarse siempre en los establecimientos ganaderos. En el caso de tener que eliminar animales, debe tenerse en cuenta cual es el perjuicio económico de los abortos causados por *N. caninum* en la producción y si estos son mayores al costo de eliminación y reemplazo de animales. Algunos autores sugieren convivir con la enfermedad, es decir, no tomar medidas para disminuir la sero-prevalencia en el rodeo si ésta es menor al 20 % (Reichel y Ellis, 2006). Además, se debe tener en cuenta que siempre habrá algún riesgo de reintroducción de la infección a través de la ingestión de pasturas, alimentos o agua contaminados.

Por lo tanto, la eliminación completa del riesgo rara vez será factible. Las estrategias de control disponibles, previamente expuestas, se basan en la detección de individuos infectados y no infectados y su asociación con el aborto, para luego ahondar en las vías de transmisión. Para esto es necesario un método de diagnóstico eficaz, confiable, económico y transferible. La estrategia de prevención más apropiada es una vacuna capaz de prevenir la infección por *N. caninum*, que impida el enquistamiento del parásito en los tejidos del hospedador y que impida la ocurrencia de abortos.

Para contribuir al control de la neosporosis bovina, los objetivos del presente trabajo fueron:

## **OBJETIVOS**

### Objetivo general 1:

Desarrollar un método serológico de diagnóstico eficaz para la identificación de animales infectados con *N. caninum*.

### Objetivos específicos:

- 1a) Clonar, expresar y purificar la proteína recombinante SAG1 para utilizarla como antígeno.
- 1b) Evaluar la interacción entre el AcM P1C2D8F8 producido en el Laboratorio de Inmunología y Parasitología Veterinaria de la EEA de Rafaela del INTA y la proteína recombinante SAG1.
- 1c) Desarrollar un ELISA de competición basado en SAG1 y el AcM capaz de diferenciar animales infectados y no infectados.

### Objetivo general 2:

Evaluar el uso de antígenos recombinantes de *N. caninum* como inmunógenos en la elaboración de una vacuna.

### Objetivos Específicos:

- 2a) Seleccionar proteínas de *N. caninum* para su evaluación como inmunógenos.
- 2b) Clonar, expresar y purificar los antígenos recombinantes.
- 2c) Diseñar y ejecutar un experimento de vacunación y desafío para evaluar la respuesta inmune generada por la vacuna elaborada con los antígenos recombinantes.

## **CAPÍTULO II:**

# **DIAGNÓSTICO DE LA NEOSPOROSIS**

## **BOVINA**

## CAPÍTULO II: DIAGNÓSTICO DE LA NEOSPOROSIS BOVINA

### 2.1. INTRODUCCIÓN

El parásito *N. caninum* puede ser detectado de forma directa mediante histopatología (HP), IHQ (Lindsay y Dubey, 1989), PCR (Buxton y col., 1998) y aislamiento en cultivo celular (Davison y col., 1999a). Estas técnicas se realizan a partir de los tejidos de los animales infectados. El cerebro es el órgano de elección para realizarlas, pero otros tejidos como el hígado o el corazón de fetos abortados o animales *post mortem* también pueden ser útiles para la detección. El parásito tiene alta eficiencia en la transmisión vertical, lo que lleva al nacimiento de terneros portadores sanos (Davison y col., 1999b). Por esta razón, la detección por PCR de ADN del parásito en el cerebro o de quistes tisulares detectados histológicamente, sólo confirman la infección del feto, pero no el aborto. Por lo tanto, la única forma de confirmar que el aborto fue causado por *N. caninum* es observar lesiones histológicas en el feto, patognomónicas de la neosporosis, y que hayan llevado a su muerte. El cerebro es el órgano más afectado, y la lesión característica es la encefalitis focal, caracterizada por la observación de necrosis e inflamación no supurativa (Dubey, 1999).

Muchas veces, no es fácil obtener el feto abortado o sus tejidos en buen estado de conservación, o no podemos sacrificar animales para llegar a un diagnóstico certero. En animales vivos, se puede lograr un diagnóstico preciso cuando se utilizan técnicas serológicas para detectar anticuerpos anti-*N. caninum* en combinación con la observación clínica y la historia epidemiológica del rodeo (Wright y col., 1993). Una asociación entre las vacas seropositivas y las que abortaron puede darnos indicios de que la causa de los abortos es *N. caninum* (Dubey y col., 2007). Las técnicas serológicas incluyen la IFI, la aglutinación directa en placa (DAT), el inmunoblott (IB), la inmunocromatografía (ICT) y distintos enzimo-inmuno-ensayos (ELISA) indirectos (ELISAi) y de competición (ELISAc). Algunos ELISA también pueden ser utilizados para detección de anticuerpos en leche individual (Björkman y col., 1997; Schares y col., 2005) o de tanque cuando la prevalencia de anticuerpos anti-*N.caninum* en el rodeo es mayor al 15 % (Bartels y col., 2005). Otras técnicas de diagnóstico en animales vivos incluyen la detección de ADN del parásito en sangre o semen mediante PCR (Ferré y col., 2005).

La IFI fue la primera técnica utilizada para detectar anticuerpos anti-*N. caninum* en el suero. El resultado se considera positivo cuando hay fluorescencia alrededor de toda la

membrana externa del taquizoito, sin intermitencias (Dubey y col., 1988). Esta técnica requiere entrenamiento y experiencia por parte del operador, ya que se basa en la interpretación visual del resultado. Por esta razón, la IFI es una técnica subjetiva. La dilución recomendada para detectar anticuerpos en sueros de bovinos es de 1:200 (Baszler y col., 2001; Maley y col., 2001) y 1:50 para pequeños rumiantes (Jolley y col., 1999). Se puede utilizar la IFI para detectar anticuerpos en líquidos de las cavidades fetales, teniendo en cuenta que los anticuerpos no atraviesan la placenta y que el feto es inmunocompetente y capaz de producir anticuerpos a partir de los 5 meses de gestación (Tizard, 2009b). La dilución recomendada para la detección de anticuerpos en líquidos fetales es de 1:16 a 1:25 (Alvarez-García y col., 2003).

El IB utiliza como antígenos taquizoitos purificados y lisados por sonicación. Los antígenos se separan en condiciones no reductoras por electroforesis en un gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). Luego se someten a electrotransferencia sobre una membrana adsorbente de nitrocelulosa. Las muestras de suero se enfrentan a la membrana y se evalúa la reacción frente a cinco antígenos inmunodominantes (AID) con masas moleculares relativas de 19, 29, 30, 33, 37 kDa. La muestra de suero se considera positiva cuando se reconocen dos o más AID (Bjerkas y col., 1994). Es una técnica muy laboriosa y que lleva mucho tiempo de realización. No se utiliza para el diagnóstico de rutina, sino como prueba confirmatoria, o para poner a punto otras pruebas.

La DAT se basa en la aglutinación de los taquizoitos purificados e intactos en presencia de anticuerpos específicos (Packham y col., 1998). También se desarrolló una aglutinación en placa basada en partículas de latex carboxilado tapizadas con el antígeno de superficie SAG1 (Moraveji y col., 2012). Esta técnica tiene a favor la condición de no necesitar herramientas de laboratorio complejas, pero consume mucho tiempo y mano de obra para su realización.

La ICT permite detectar anticuerpos de forma rápida en el suero. El antígeno se distribuye formando una línea en una tira de nitrocelulosa y al enfrentarse con los anticuerpos específicos en el suero se genera una reacción coloreada. Siguiendo estos principios, se utilizó SAG1 como antígeno para desarrollar un *test* rápido de flujo lateral (Liao y col., 2005) y un inmunoensayo de impresión aplicada (APIA, del inglés: antigen print immunoassay) (Wilkowsky y col., 2011).

Las técnicas de ELISA, son menos laboriosas, objetivas, con posibilidad de ser automatizadas y permiten procesar simultáneamente un gran número de muestras (Wright y col., 1993). Comercialmente hay disponibles ELISAI y ELISAc. La mayoría de los ELISA desarrollados son ELISAI, basados en taquizoitos de *N. caninum* purificados y lisados por sonicación (Paré y Hietala, 1995; Alvarez-García y col., 2003). El lisado de los parásitos permite que se expongan las proteínas internas, pudiendo generarse reacciones cruzadas con antígenos de otros protozoarios relacionados (Gondim y col., 2017). En la búsqueda para dar solución a este problema, se desarrolló un ELISAI basado en taquizoitos enteros fijados en las placas de ELISA, en el que solo se exponen las proteínas de la superficie del parásito (Williams y col., 1997). Otros ELISAI están basados en proteínas nativas de *N. caninum* incorporadas en complejos inmunoestimulantes (ISCOM) (Björkman y col., 1997). El ELISAI desarrollado por Schares y col. (2000) se basa en la proteína SRS2 del parásito purificada desde el lisado de taquizoitos mediante cromatografía de afinidad. Existen también ELISAI basados en proteínas recombinantes. Se desarrollaron ELISAI basados en las proteínas de los gránulos densos GRA7 y GRA6 (Lally y Jenkins, 1996) y las proteínas de la superficie del parásito SAG1 (Chahan y col., 2003) y SRS2 (Nishikawa y col., 2001). En Argentina, se desarrollaron ELISAI basados en lisados de taquizoitos en INTA de Castelar (no publicado, Revista Motivar, <http://www.motivar.com.ar/2015/12/el-kit-nacional-para-el-diagnostico-de-neosporosis-ya-es-una-realidad/>) y en INTA de Rafaela (Echaide y Valentini, 2001).

La detección de anticuerpos séricos por parte de los ELISAc se da tanto por la cantidad de anticuerpos presentes como por la afinidad de unión de los anticuerpos al antígeno, al competir eficazmente con el AcM. Por lo tanto, los anticuerpos séricos pueden estar presentes en cantidades bajas, no evidenciables por IFI o ELISAI, y sí ser detectados eficientemente por ELISAc (Baszler y col., 2001). Además, los ELISAc pueden ser utilizados para analizar sueros de diferentes especies sin necesitar un conjugado anti-especie para cada una. Existen pocos ELISAc desarrollados en la actualidad. El ELISAc desarrollado en Washington State University, Pullman, EE.UU. (Baszler y col., 1996) y comercializado por el laboratorio VMRD de Pullman, WA, EE.UU., está basado en un antígeno de la superficie de los taquizoitos de 65 kDa capturado con un anticuerpo monoclonal distinto al anticuerpo monoclonal de competición (ELISAc<sub>VMRD</sub>) (Baszler y col., 2001). Otro, desarrollado en la Universidad Federal de Pelotas, Brasil, está basado

en la proteína recombinante SRS2 (Sinnott y col., 2014). En el Laboratorio de Inmunología y Parasitología Veterinaria (LIPVet) de la EEA Rafaela, INTA, se desarrolló un ELISAc basado en un lisado de taquizoitos y el anticuerpo monoclonal (AcM) P1C2D8F8, que reconoce específicamente a SAG1 (Valentini y col., 2016).

El reemplazo de los antígenos nativos por antígenos recombinantes permite prescindir del mantenimiento de los parásitos en cultivo celular. Además, permitiría la producción masiva, facilitaría la estandarización de la prueba y reduciría las posibles reacciones cruzadas con antígenos de otros protozoarios relacionados.

Los *kits* comerciales utilizados en Argentina son importados, lo que implica altos costos y largos períodos de espera. Además, la implementación de técnicas validadas en otro lugar, requiere la revalidación del ensayo en las nuevas condiciones, ya que la sensibilidad y la especificidad pueden variar entre las poblaciones de animales. Las condiciones locales, la población objetivo, un aislamiento distinto de *N. caninum* y la situación epidemiológica pueden ser distintos a las condiciones de la validación original (Jacobson, 1998; Greiner y Gardner, 2000).

El antígeno mayor de la superficie de los taquizoitos de *N. caninum* SAG1 de 36 kDa, se considera una proteína de elección para el desarrollo de un ELISA por ser inmunodominante y conservado entre aislamientos (Hemphill y col., 1999). Varios investigadores intentaron producir la proteína recombinante SAG1 (rSAG1). Chahan y col. (2003) expresaron la proteína rSAG1, sin el péptido señal y la porción C-terminal hidrofóbicos, en *Escherichia coli* como proteína de fusión con la proteína glutatión-S-transferasa (GST) para mejorar su solubilidad. Wilkowsky y col. (2011) expresaron la proteína rSAG1 en forma insoluble en *E. coli* y la purificaron a partir de los cuerpos de inclusión.

El uso de GST para mejorar la solubilidad de la proteína recombinante puede llevar a una disminución de la sensibilidad de la prueba a causa del ocultamiento de epitopes por impedimento estérico. Otras proteínas de fusión utilizadas, procedentes de *E. coli*, como la maltosa-binding-protein (MBP) o la tiorredoxina (TRX) necesitan un paso de adsorción previo para evitar la ocurrencia de falsos positivos. La expresión de la proteína rSAG1 en *E.coli* de forma soluble permitiría realizar la purificación de manera simple y obtener la proteína recombinante con una conformación similar a la proteína nativa.

Por lo expuesto previamente, el desarrollo de una técnica serológica para la detección de anticuerpos anti-*N. caninum* en animales vivos, con un desempeño igual o mejor a los disponibles comercialmente, de industria nacional y de fácil producción y transferencia, permitiría colaborar al control de la neosporosis en los bovinos en el país.

El objetivo general de esta primera parte del trabajo fue desarrollar una prueba serológica para el diagnóstico de la neosporosis bovina.

Los objetivos específicos fueron a) clonar, expresar y purificar la proteína rSAG1 para ser utilizada como antígeno, b) evaluar la interacción entre el AcM P1C2D8F8 producido en el LIPVet y la proteína rSAG1 y c) desarrollar un ELISAc basado en rSAG1 y el AcM, capaz de diferenciar animales infectados y no infectados.

## **2.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.2.1. Parásitos**

Se utilizó la cepa NC-1 de *N. caninum* (Dubey y col., 1988a), que se multiplicó *in vitro* mediante sucesivos pasajes en células VERO según los procedimientos descritos por Dubey y col. (1988b). Los taquizoitos se cosecharon en forma mecánica cuando el 80 % de las células estuvieron parasitadas (Barta y Dubey, 1992) y se purificaron mediante un gradiente de Percoll (Rodríguez y col., 1986).

### **2.2.2. Muestras de Suero**

#### **2.2.2.1 Sueros controles**

Los sueros utilizados como controles negativos y positivos en las pruebas de ELISAc e IFI en bovinos se obtuvieron por inoculación de un novillo seronegativo con  $1.10^8$  taquizoitos por vía endovenosa. El novillo fue catalogado como negativo al analizar su suero mediante IFI y un ELISA de competición *in-house* basado en un lisado de taquizoitos (ELISAc<sub>taq</sub>) en tres sangrados separados por 30 días. El suero control negativo se obtuvo del mismo animal antes de la inoculación experimental. El suero control positivo débil (C+) se extrajo 21 días post inoculación (dpi) y el suero control positivo fuerte (C++) se extrajo 42 dpi. Los sueros se almacenaron en alícuotas a -20 °C.

Para obtener los sueros controles negativos y positivos para las pruebas de ELISAc e IFI en pequeños rumiantes se utilizó una oveja seronegativa, evaluada siguiendo la misma metodología descrita para el novillo. La oveja se inoculó con  $1.10^6$  taquizoitos de *N. caninum* por vía subcutánea (Arranz-solís y col., 2015). El suero control negativo se obtuvo del mismo animal antes de la inoculación experimental. El suero control positivo débil (C+) se extrajo 21 dpi y el suero control positivo fuerte (C++) se extrajo 42 dpi. Los sueros se almacenaron en alícuotas a -20 °C.

#### **2.2.2.2. Sueros de ensayo**

Las muestras de suero de bovinos, ovinos y caprinos pertenecen al banco de sueros del LIPVet de la EEA Rafaela, INTA.

##### **2.2.2.2.1. Sueros de bovinos**

Se utilizaron 847 muestras de suero que se obtuvieron periódicamente de 228 vacas que formaron parte de un estudio longitudinal realizado durante 3 años. Se tomaron más de

dos muestras de suero de cada animal (Tabla 2.1). Estas vacas pertenecían a un rodeo lechero de la provincia de Córdoba, con antecedentes de abortos por *N. caninum* (Echaide y col., 2002). Los sueros se analizaron mediante IFI y ELISAC<sub>taq</sub>.

Tabla 2.1: Número (*n*) de animales y muestras tomadas por animal

	Animales ( <i>n</i> )	Muestras/ Animal ( <i>n</i> )	Total de Muestras ( <i>n</i> )
	18	2	36
	85	3	252
	70	4	284
	55	5	275
Total	228		847

Además, se utilizaron 352 muestras de suero provenientes de 16 rodeos de vacas de cría de la región centro-litoral de la provincia de Santa Fe. Estas muestras de suero fueron incluidas en un estudio transversal (Echaide y col., 2016). Se analizaron mediante las pruebas de IFI, ELISAC<sub>taq</sub> y el ELISAC<sub>VMRD</sub>.

#### 2.2.2.2.2. Sueros de pequeños rumiantes

Se analizaron 1901 muestras de suero provenientes de 1483 cabras y 418 ovejas de 201 majadas de las provincias de Entre Ríos y Santa Fe (Tabla 2.2). Los sueros se analizaron mediante IFI y ELISAC<sub>taq</sub>.

Tabla 2.2: Número (*n*) de majadas y animales analizados

Especie	Majadas ( <i>n</i> )	Animales ( <i>n</i> )
Ovinos	48	418
Caprinos	153	1483
Total	201	1901

### 2.2.3. Proteína recombinante SAG1 truncada (SAG1t)

#### 2.2.3.1. Análisis bioinformático de la secuencia de SAG1

Para predecir la ubicación y aminoácidos que forman parte del péptido señal se utilizó el algoritmo de predicción SignalP 5.0 (Signal P, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Almagro-Armenteros y col., 2019). El algoritmo TMPred se utilizó para predecir los dominios transmembrana de la proteína (TM Pred, [http://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED\\_form.html](http://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html)) (Hofman y Stoffel, 1993). La solubilidad de la forma completa y truncada (sin dominios transmembrana) de la proteína se calculó utilizando un modelo de predicción basado en la sobreexpresión de proteínas heterólogas en *E. coli* (Recombinant protein solubility prediction, <http://www.biotech.ou.edu/>) (Díaz y col., 2010).

#### 2.2.3.2. Clonación del gen SAG1t

El ADN genómico de *N. caninum* se extrajo utilizando el método de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. Se clonó el fragmento de ADN que codifica los residuos 22-303 de la proteína SAG1, que excluye el péptido señal y la región hidrofóbica C-terminal. Este fragmento de 843 pares de bases (pb) fue amplificado mediante PCR, usando los *primers forward*: F SAG1t (5'-CATATGGCGTTCTTTGACTGTG-3') y *reverse*: R SAG1t (5'-GGATCCTCAGTGATGGTGATGATGCCGACCTTCAATCGCGACGCCAGC CGC -3') y la ADN polimerasa de alta fidelidad de copia Platinum Pfx (Invitrogen, CA, EE.UU.). En la secuencia del *primer reverse* se agregaron 6 histidinas, el codón de terminación y el sitio de corte para la enzima de restricción BamHI. En el *primer forward* se agregó el codón de iniciación y el sitio de corte para la enzima NdeI. El ADN del gen amplificado se clonó en el vector pGEM T Easy (Promega, WI, EE. UU.), para generar el plásmido recombinante pGEM-T Easy/SAG1t. El plásmido pGEM T Easy/SAG1t y el vector de expresión pET9b (Promega) fueron digeridos con las enzimas de restricción NdeI (Promega) y BamHI (Promega). Estas reacciones de restricción se corrieron en un gel de agarosa al 1 %. Las bandas de ADN correspondientes al vector pET9b lineal y al inserto SAG1t fueron purificados desde el gel con un *kit* de purificación de ADN (GeneClean, MP biomedical, CA, EE.UU.). Luego, el inserto y el vector de expresión pET9b se ligaron en una relación molecular inserto: vector = 3:1. Se utilizó la enzima T4 DNA Ligasa (Promega). Luego de una incubación de 16 h a 4 °C, con el producto de

ligación se transformaron por electroporación bacterias *E. coli* Top10F' competentes (Invitrogen). Las bacterias transformadas se sembraron en placas de Petri con medio Luria Bertani (LB) con agar y kanamicina (50 µg/ml) (LB/Agar/K). Las placas se incubaron a 37 °C durante 16 h. De las colonias crecidas en las placas, se seleccionó una colonia, se amplificó en caldo LB con kanamicina (LB/K), se extrajo el ADN plasmídico (pET9b/SAG1t) y la secuencia del inserto fue confirmada por secuenciación (Unidad de Genómica, EEA Castelar, INTA, Argentina).

El plásmido pET9b/SAG1t se utilizó para transformar bacterias *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (Novagen, Sigma-Aldrich) por shock térmico. Las bacterias transformadas se sembraron en placas de Petri con medio LB/Agar/K suplementado con cloranfenicol (34 µg/ml) (LB/Agar/K/Cl). Las placas se incubaron a 37 °C durante 16 h. Se tomó una colonia, se repicó en caldo LB y se guardaron alícuotas de las bacterias transformadas en nitrógeno líquido con un 10 % de glicerol como criopreservante.

### **2.2.3.3. Expresión de la proteína recombinante SAG1t**

#### **2.2.3.3.1. Expresión en pequeña escala**

El clon *E. coli* BL21-CodonPlus-(DE3)-RIL pET9b/SAG1t conservado en nitrógeno líquido, se sembró en placas de Petri con LB/Agar/K/Cl y se incubó a 37 °C 16 h. Se tomó una colonia aislada y se realizó un pre-cultivo de 2 ml en caldo LB/K/Cl que se incubó a 37 °C durante 16 h con agitación (250 rpm). Una alícuota de 0,5 ml de este pre-cultivo se utilizó para inocular 50 ml de caldo LB/K/Cl. Las bacterias se incubaron a 37 °C hasta llegar a una DO a 600 nm (DO<sub>600</sub>) de 0,8. La expresión de la proteína recombinante se indujo con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Sigma-Aldrich) 1 mM. El cultivo inducido se incubó a 37 °C con agitación durante 3 h. Se tomaron muestras del cultivo pre-inducción, 1, 2 y 3 horas post-inducción. Las muestras se centrifugaron a 5000 x g durante 15 minutos a 25 °C. Los *pellets* se re-suspendieron en *buffer* de lisis (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, β-mercaptoetanol 20 mM, pH = 8,0). Las suspensiones celulares se lisaron por congelado-descongelado mediante sucesivos pasajes por nitrógeno líquido y baño de agua a 37 °C. Luego, se centrifugaron a 35000 x g durante 20 min a 25 °C para separar las fracciones soluble e insoluble. Ambas fracciones se sembraron en un SDS-PAGE al 12 % para separar las proteínas por electroforesis.

#### 2.2.3.3.2. Expresión en mediana escala

Una vez confirmada la expresión de la proteína recombinante por el clon *E. coli* BL21-CodonPlus-(DE3)-RIL pET9b/SAG1t, la expresión se realizó en un volumen mayor. Se realizó un pre-cultivo de 5 ml en caldo LB/K/Cl y se incubó a 37 °C durante 16 h con agitación. Este pre-cultivo se utilizó para inocular 500 ml de caldo LB/K/Cl. Se incubaron las bacterias a 37 °C con agitación hasta llegar a una  $DO_{600} = 0,8$ . La expresión de la proteína se indujo con 1 % de lactosa a 37 °C durante 3 h en agitación. Se centrifugó el cultivo a 2000 x g durante 15 min a 25 °C. Luego, se re-suspendió el *pellet* en 10 ml de *buffer* de lisis con el agregado de 10 mM de imidazol y 20  $\mu$ l de un *cocktail* de inhibidores de proteasas set III (Calbiochem, Sigma-Aldrich). Para separar las fracciones soluble e insoluble del cultivo se realizó la lisis celular con un homogeneizador de alta presión (EmulsiFlex-B15, Avestin, Canadá) a 24000 *psi*.

#### 2.2.3.4. Purificación de la proteína recombinante SAG1t

Luego de la lisis, el cultivo se centrifugó a 35000 x g durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante soluble fue vertido en una columna plástica sobre 2 ml de una matriz de  $Ni^{2+}$ -NTA agarosa (Qiagen, Alemania), previamente equilibrada con el *buffer* de lisis con el agregado de 10 mM de imidazol. Después de 1 hora de incubación a 4 °C, se lavó la columna con 10 ml de *buffer* de lisis suplementado con concentraciones crecientes (10, 20, 30, 40 y 50 mM) de imidazol. Luego, la proteína fue eluída de la columna con 10 ml de *buffer* de lisis suplementado con 250 mM de imidazol. La proteína purificada se dializó en *buffer* A ( $Na_2HPO_4$  25 mM, NaCl 150 mM, pH = 8,0) a 4 °C durante 16 h. La pureza de la proteína se evaluó por SDS-PAGE y la concentración se determinó por medición de la absorbancia a 280 nm en un Nanodrop <sup>TM</sup> 2000 (ThermoFisher Scientific, MA, EE.UU.), utilizando el coeficiente de extinción molar teórico 27220  $M^{-1} cm^{-1}$  y la absorptividad de 0,1% (= 1 g/l) de 0,882 según la siguiente formula:

$$[SAG1t] = \frac{Abs\ 280\ nm}{0,882}$$

#### 2.2.4. Evaluación del anticuerpo monoclonal

El AcM P1C2D8F8, isotipo IgG1 kappa, fue producido y seleccionado previamente en el LIPVet para desarrollar el ELISAc<sub>taq</sub> (Valentini y col., 2016). La especificidad del AcM P1C2D8F8 frente a SAG1t fue evaluada en un inmunoblot (IB).

Las alícuotas pre y post-inducción con lactosa 1 % del cultivo de las células *E. coli* BL21-CodonPlus-(DE3)-RIL pET9b/SAG1t y la proteína SAG1t purificada se separaron por SDS-PAGE. Como controles, se sembraron taquizoitos de *N. caninum* y taquizoitos de *Toxoplasma gondii* sonicados. La electroforesis se realizó a 100 volts durante 3 h, y luego el gel se transfirió a una membrana adsorbente de nitrocelulosa (Trans-Blot® Transfer Medium, Bio-Rad Laboratories Inc., CA, EE.UU.). Luego de la transferencia, la membrana se bloqueó con TBS (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, pH = 7,6) con el agregado de 10 % de leche descremada (TBS-L) durante 16 h. Luego se realizaron tres lavados con TBS con 0,05 % de Tween-20 (TBS-T). Posteriormente, la membrana se incubó con el AcM P1C2D8F8 diluido 1:100 en TBS-L a 25 °C durante 1 h y luego de realizar tres lavados se agregó el anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Jackson Immuno Research Inc., PA, EE.UU.) diluido 1:1000 en TBS-L. Se repitieron la incubación y los lavados y la reacción se reveló con diaminobencidina (DAB) (ThermoFisher Scientific) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

## **2.2.5. Pruebas serológicas**

### **2.2.5.1. Inmunofluorescencia indirecta**

Para la IFI se utilizaron taquizoitos enteros purificados, según la técnica descrita por Paré y col. (1995a), modificada. Brevemente, taquizoitos purificados en un gradiente de Percoll se lavaron 3 veces con PBS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH = 7,4) y se fijaron con 0,025 % de formaldehído durante 16 h. Los taquizoitos fijados se sedimentaron por centrifugación (2000 x g, 20 min, 25 °C) y se re-suspendieron en PBS. Los parásitos homogeneizados se distribuyeron en sendos portaobjetos con cubierta de teflón de 12 celdas, se secaron a 37 °C, se envolvieron en papel absorbente y almacenaron a -20 °C hasta su utilización. Los sueros a analizar y los controles se diluyeron 1:200 en PBS. El anticuerpo anti-IgG bovina conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Sigma-Aldrich, MO, EE. UU.) se diluyó 1:800 en PBS. La observación se realizó con un microscopio de fluorescencia (Nikon, Eclipse I80), con un objetivo 1000x de aumento. Se consideraron positivos los sueros que generaron fluorescencia en toda la superficie de los taquizoitos (Baszler y col., 2001; Maley y col., 2001). Para realizar la IFI en sueros de pequeños rumiantes, las muestras de suero a analizar y los controles se diluyeron 1:50 en PBS y se utilizó el conjugado anti-IgG caprino/ovino conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Sigma-Aldrich) diluido 1:400 en PBS (Jolley y col., 1999).

### **2.2.5.2. ELISAs de competición**

Las muestras y controles se procesaron por duplicado. Salvo especificaciones, todas las incubaciones se realizaron a 25 °C. En cada placa se incluyeron sueros controles positivos fuerte (C++) y débil (C+), negativo (C-) y un control de conjugado sin suero, con PBS con el agregado de 10 % de leche descremada (PBS-L) en su lugar (Cc). El Cc mide la reacción entre el AcM y el antígeno en ausencia de suero, generando el 100 % de color. Los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición (%I), tomando como referencia la densidad óptica medida a 405 nanómetros (DO<sub>405nm</sub>) del Cc, según la siguiente fórmula:

$$\% I = 100 - [(DO_{\text{muestra}}/DO_{\text{Cc}}) \times 100]$$

#### **2.2.5.2.1. ELISAc comercial, ELISAc<sub>VMRD</sub>**

El ELISAc<sub>VMRD</sub>, desarrollado en Washington State University, Pullman, EE.UU. (Baszler y col., 1996). y comercializado por VMRD, Pullman, EE.UU., está basado en una proteína nativa de la superficie de los taquizoitos de *N. caninum* de 65 kDa, capturada con el AcM 5B6-2. La prueba utiliza como AcM competidor el AcM 4A4-2 conjugado con peroxidasa. El punto de corte que se utilizó fue el recomendado por el fabricante, %I ≥ 30 (Baszler y col., 2001).

#### **2.2.5.2.2. ELISAc con lisado de taquizoitos, ELISAc<sub>taq</sub>**

El ELISAc<sub>taq</sub> desarrollado en el LIPVet de la EEA Rafaela, INTA, está basado en la fracción soluble de un lisado de taquizoitos y el AcM P1C2D8F8. Se utilizó el punto de corte el %I ≥ 25 (Valentini y col., 2016).

#### **2.2.5.2.3. ELISAc con SAG1t recombinante, ELISAc<sub>SAG1t</sub>**

Se utilizaron placas de 96 pocillos (NUNC-Immuno™, Dinamarca) sensibilizadas con 1 µg de SAG1t por pocillo. Para ello, 50 µl/pocillo de una solución 0,02 µg/µl de SAG1t diluída en PBS se incubó a 4 °C durante 16 h. Las placas se lavaron 2 veces con PBS y se bloquearon con 200 µl de PBS-L. Luego se realizaron tres lavados con PBS con 0,05 % de Tween-20 (PBS-T) y se agregaron 100 µl de los sueros problema y controles diluidos 1:2 en PBS con 0,05 % de Tween-20 y 10 % de leche descremada (PBS-T-L) y se incubaron. Se repitieron los tres lavados, se agregaron 100 µl del AcM P1C2D8F8 diluido 1:2000 y se incubaron. Se repitieron los 3 lavados, se agregaron 100 µl del anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa diluido 1:4000 y se incubaron nuevamente. Luego de 3 lavados con PBS-T se agregaron 100 µl del sustrato cromógeno 2,2'-

Azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS) 1 mM (Sigma-Aldrich) en citrato de sodio 0,05 M, pH = 4,5 y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03 % v/v. Las placas se incubaron en oscuridad durante 10 minutos. El color de la reacción fue medido a 405 nm en un lector de placas de ELISA (Labsystems Multiskan FC, Microlat S.R.L., Argentina). Todas las incubaciones se realizaron durante 40 minutos y las diluciones de los reactivos y los sueros se realizaron con PBS-T-L.

#### **2.2.6. Estabilidad del antígeno SAG1t inmovilizado en placas de ELISA**

La estabilidad del antígeno SAG1t inmovilizado en placas de ELISA fue evaluada luego de 1 año de almacenamiento a 4 °C. Para ello, se sensibilizaron 26 placas de ELISA con 50 µl/pocillo de una solución de SAG1t 0,02 µg/µl en PBS. Las placas se incubaron a 4 °C durante 16 h. Luego de la incubación, se lavaron dos veces con PBS y se dividieron en 4 grupos (G): GA (*n* = 10), GB (*n* = 10), GC (*n* = 4) y GControl (*n* = 2). Las placas del GControl se procesaron inmediatamente. Las placas del GA, luego de los dos lavados con PBS, fueron envasadas al vacío. Las placas de los GB y GC se bloquearon con PBS-L, se incubaron durante 40 min a 25 °C y se lavaron con PBS-T. Las placas del GB se envasaron al vacío y a las placas del GC se les agregó 100 µl de un líquido sellador de placas de ELISA (Candor, Alemania). Se incubaron con el líquido sellador durante 40 min a 25 °C, se descartó el líquido, se secaron durante 60 min a 37 °C y luego se envasaron al vacío. Todas las placas envasadas al vacío se almacenaron a 4 °C durante un año.

Los sueros controles y las muestras de sueros positivos y negativos, diluidos 1:2 en PBS-L-T fueron sembrados por duplicado en todas las placas. En cada placa se analizaron por duplicado 3 sueros controles (C++, C+ y C-), el Cc y 44 sueros de bovinos (22 sueros negativos y 22 sueros positivos) analizados previamente por IFI y ELISAc<sub>taq</sub>. Se prosiguió con el protocolo detallado en el ítem 2.2.5.2.3. Los resultados se expresaron en %I, se utilizó el punto de corte establecido en el ítem 2.3.6.1.

#### **2.2.7. Estándar relativo de comparación**

Debido a la inexistencia de una prueba estándar de oro de comparación que se pueda realizar en animales vivos para la detección de neosporosis, se consideró un estándar relativo de comparación (ERC) (Jacobson, 1998). Del total de 228 vacas del rodeo lechero, se tomaron como vacas infectadas o no infectadas solo las que tuvieron igual resultado (positivo o negativo) en todas las muestras de suero sucesivas y para las dos pruebas (IFI y ELISAc<sub>taq</sub>). Se excluyeron en este caso los animales que sero-convirtieron

a lo largo del estudio. Los sueros de las 352 vacas de carne fueron analizados por IFI, ELISAC<sub>taq</sub> y ELISAC<sub>VMRD</sub> y solo se incluyeron en el ERC las muestras de suero con resultados concordantes entre las tres pruebas serológicas. En pequeños rumiantes el ERC se conformó por los sueros en los que hubo acuerdo de resultados positivos o negativos a las pruebas de IFI y ELISAC<sub>taq</sub>. En todos los casos, los sueros que resultaron positivos a una prueba y negativos a otra fueron descartados y no se incluyeron en el ERC.

### **2.2.8. Comparación entre pruebas serológicas**

La comparación de las pruebas serológicas a través de la concordancia observada (CO) y el índice *kappa* ( $\kappa$ ), se realizó con la totalidad de sueros de bovinos de leche ( $n = 847$ ) y de bovinos de cría ( $n = 352$ ). También se utilizó la totalidad de muestras de suero de pequeños rumiantes ( $n = 1901$ ).

### **2.2.9. Análisis estadístico**

Se determinó el punto de corte óptimo, la sensibilidad diagnóstica (Se-D) y la especificidad diagnóstica (Es-D) para la prueba ELISAC<sub>SAG1t</sub> comparada con el ERC en bovinos y en pequeños rumiantes. Para ello, se analizó la curva de la característica operativa del receptor (ROC) con el programa MedCalc para Windows, versión 14.12.0 (MedCalc Software, Ostend, Bélgica).

Se calculó la CO y el índice  $\kappa$  entre ELISAC<sub>SAG1t</sub> e IFI, ELISAC<sub>taq</sub>, y ELISAC<sub>VMRD</sub>, mediante el programa MedCalc. La concordancia se analizó como: pobre ( $\kappa \leq 0,2$ ), leve ( $\kappa = 0,21 - 0,40$ ), moderada ( $\kappa = 0,41 - 0,60$ ); buena ( $\kappa = 0,61 - 0,80$ ) y muy buena ( $\kappa > 0,81$ ) (Altman, 1990).

Para evaluar la estabilidad del antígeno SAG1t inmovilizado en las placas de ELISA se compararon los %I obtenidos en las placas de los grupos GA, GB y GC con los del GControl utilizando el test de Wilcoxon para datos pareados. Los resultados positivos o negativos al ELISAC<sub>SAG1t</sub> se compararon utilizando el test de McNemar. Se utilizó el programa estadístico InfoStat Software Estadístico versión 2011 (Di Rienzo y col., 2011).

## **2.3. RESULTADOS**

### **2.3.1. Análisis bioinformático de SAG1 y construcción de la variante truncada SAG1t**

El algoritmo SignalP 5.0 predijo la ubicación del péptido señal en los residuos 1 a 21 con una probabilidad del 50 % y del sitio de clivado en el aminoácido 30 con una probabilidad del 40 %. El algoritmo TMPred predijo dos dominios de transmembrana en la proteína SAG1, uno formado por los aminoácidos 9 a 27 y otro formado por los aminoácidos 301 a 319. Se utilizó el fragmento de ADN que codifica los aminoácidos 22-303 de la proteína SAG1 para generar la proteína recombinante truncada SAG1t. La predicción de la solubilidad, de la proteína completa y de la forma truncada cuando se expresan en *E. coli*, fue de 98,5 % y 100 %, respectivamente.

### **2.3.2. Expresión y purificación de la proteína recombinante SAG1t**

La expresión de la proteína recombinante SAG1t en *E. coli* fue elevada, y aproximadamente el 30 % se expresó en la fracción soluble. La proteína recombinante SAG1t expresada con una cola de 6 histidinas posee 293 residuos y el peso molecular (PM) es de 30,86 kDa. El rendimiento, luego de su purificación, fue de 5 mg/l de cultivo. La pureza de la proteína fue mayor al 90 % (Figura 2.1A).

### **2.3.4. Evaluación del anticuerpo monoclonal**

La inmunoreactividad del AcM P1C2D8F8 frente a SAG1t fue demostrada en el IB, en el que se detectó que el AcM reconoce específicamente a la proteína SAG1 presente en el lisado de taquizoitos y a la proteína SAG1t recombinante. No se observó reactividad cruzada con ninguna proteína de *T. gondii* (Figura 2.1B).

El patrón de bandas reveladas indica que el AcM se une a la proteína recombinante tSAG1 en sus formas monomérica y dimérica. El IB mostró que la banda gruesa observada en el SDS-PAGE, correspondiente al monómero de SAG1, está compuesta por dos bandas delgadas de la proteína. En el lisado de taquizoitos, también se observó que el AcM se une a las formas monomérica y dimérica de la proteína SAG1 nativa. En este caso, el monómero está compuesto por 3 bandas de proteínas de PM cercano.

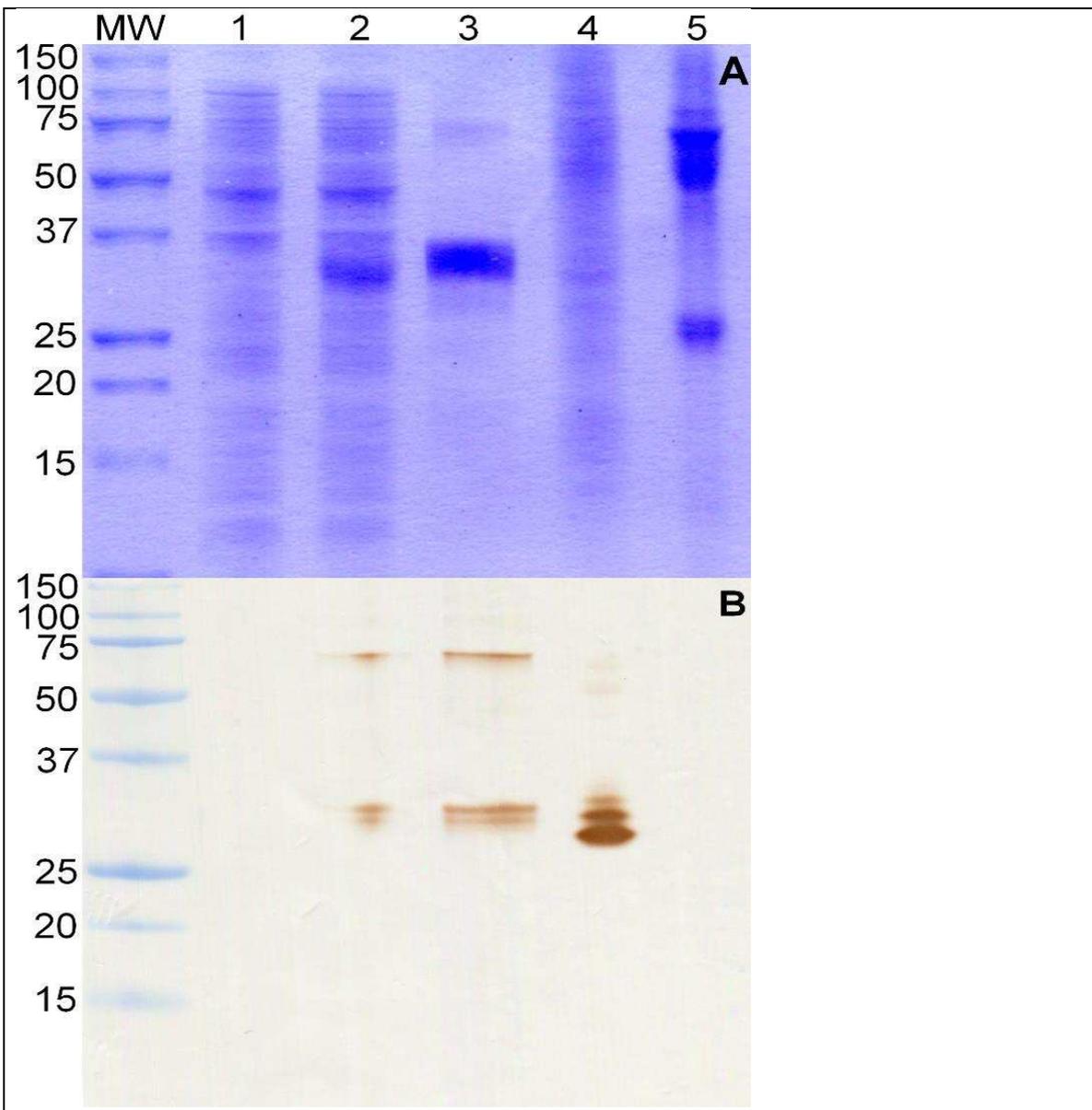


Figura 2.1: SDS-PAGE y WB de SAG1t Fig. 2.1A: SDS-PAGE: Las proteínas se tiñeron con *Coomassie Brilliant Blue R-250* (Bio-Rad Laboratories Inc.). Fig. 2.1B: WB revelado con el AcM P1C2D8F8. MW: Marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ All Blue (Bio-Rad Laboratories Inc.); línea 1 y 2: cultivo de *E. coli* BL21-CodonPlus-(DE3)-RIL pET9b/SAG1t pre-inducción y 3 horas post-inducción, respectivamente; línea 3: SAG1t luego de la purificación; línea 4: taquizoitos de *N. caninum* sonicados; línea 5: taquizoitos de *T. gondii* sonicados.

### **2.3.5. Categorización del estatus frente a neosporosis de los animales**

#### **2.3.5.1. Bovinos**

De las 228 vacas que formaron parte del rodeo lechero de la provincia de Córdoba analizado, 77 resultaron infectadas, 139 no infectadas y 12 sero-convirtieron a lo largo del ensayo. En total se obtuvieron 847 muestras de suero. Se incluyeron en el ERC 805 muestras de suero de 216 vacas de leche. Los 42 sueros de las 12 vacas que sero-convirtieron fueron excluidos del ERC.

En los rodeos de bovinos de cría, en los que se analizaron 352 animales, 98 resultaron infectados, 220 no infectados y en los sueros de 34 animales no hubo acuerdo entre las pruebas de diagnóstico. Por lo tanto, se incluyeron en el ERC 318 muestras de suero de bovinos de cría en los que hubo acuerdo en las pruebas de IFI, ELISAc<sub>taq</sub> y ELISAc<sub>VMRD</sub>.

En total se incluyeron en el ERC 1123 sueros bovinos, de los cuales 375 fueron clasificados como positivos y 748 como negativos.

#### **2.3.5.2. Pequeños rumiantes**

Se analizaron por IFI y ELISAc<sub>taq</sub> 1901 muestras de sueros de pequeños rumiantes. Según el acuerdo entre estos análisis, se clasificaron 242 animales como positivos, 1634 como negativos y 25 no pudieron ser clasificados ya que no hubo acuerdo entre los resultados de ambas pruebas. Se incluyeron en el ERC las 1876 muestras de suero en que hubo acuerdo entre ambas pruebas.

## 2.3.6. Desempeño del ELISAc<sub>SAG1t</sub>

### 2.3.6.1. Desempeño del ELISAc<sub>SAG1t</sub> con sueros de bovinos

El análisis ROC sobre las 1123 muestras de suero de bovinos de leche ( $n = 805$ ) y cría ( $n = 318$ ) estimó una Se-D del 98,4 % (IC 95 % = 96,6-99,4) y una Es-D del 98,5 % (IC 95 % = 97,4-99,3), con un punto de corte de %I  $\geq 28$ . La media para los sueros positivos fue de 83 %I (DE = 20) y para los sueros negativos de 10 %I (DE = 9) (Figura 2.2).

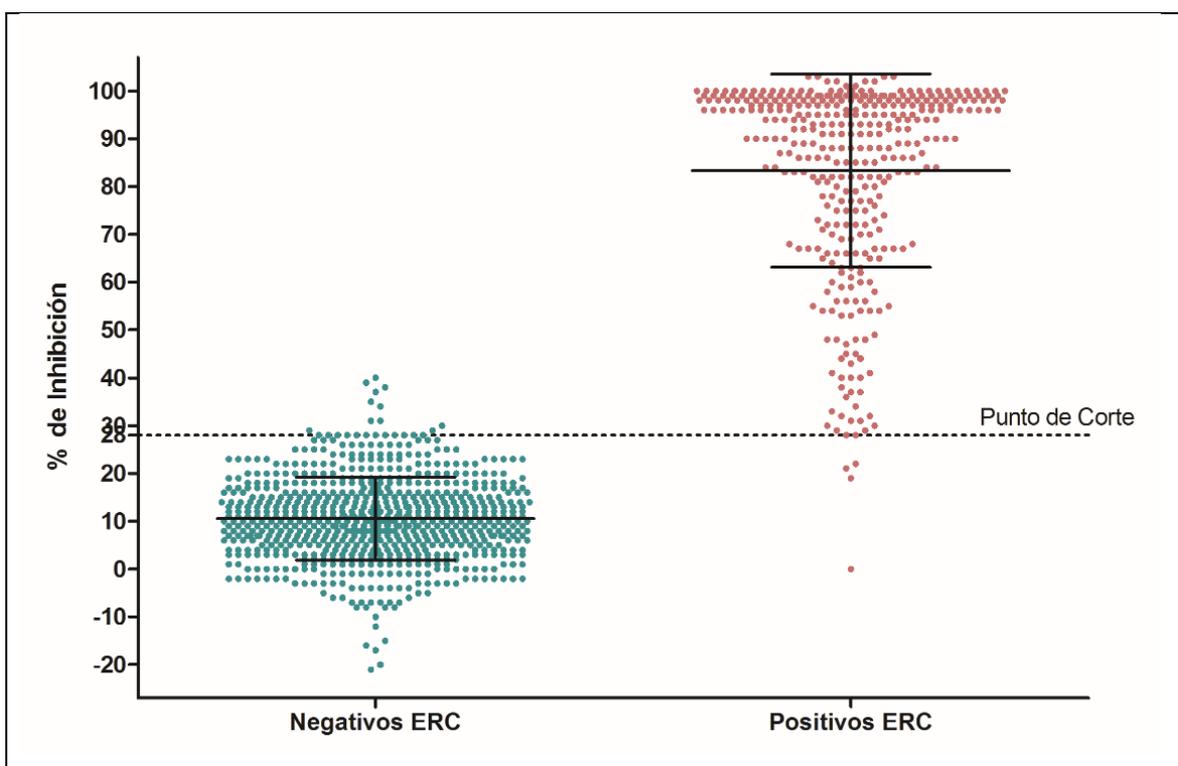


Figura 2.2: Distribución de los resultados de ELISAc<sub>SAG1t</sub> (%I) en 1123 muestras de suero de bovinos. El estatus de los animales fue obtenido a través de un estándar relativo de comparación (ERC) para Ac anti-*N. caninum* en bovinos. (Análisis ROC).

### 2.3.6.2. Desempeño del ELISAc<sub>SAG1t</sub> con sueros de pequeños rumiantes

En pequeños rumiantes el análisis ROC de los resultados del ELISAc<sub>SAG1t</sub> estimó una Se-D del 97,1 % (IC 95 % = 94,1–98,8) y una Es-D del 97,4 % (IC 95 % = 96,5–98,1) con un punto de corte de %I  $\geq$  34. La media para los sueros positivos fue de 86 %I (DE = 20) y para los sueros negativos 8 %I (DE = 14) (Figura 2.3).

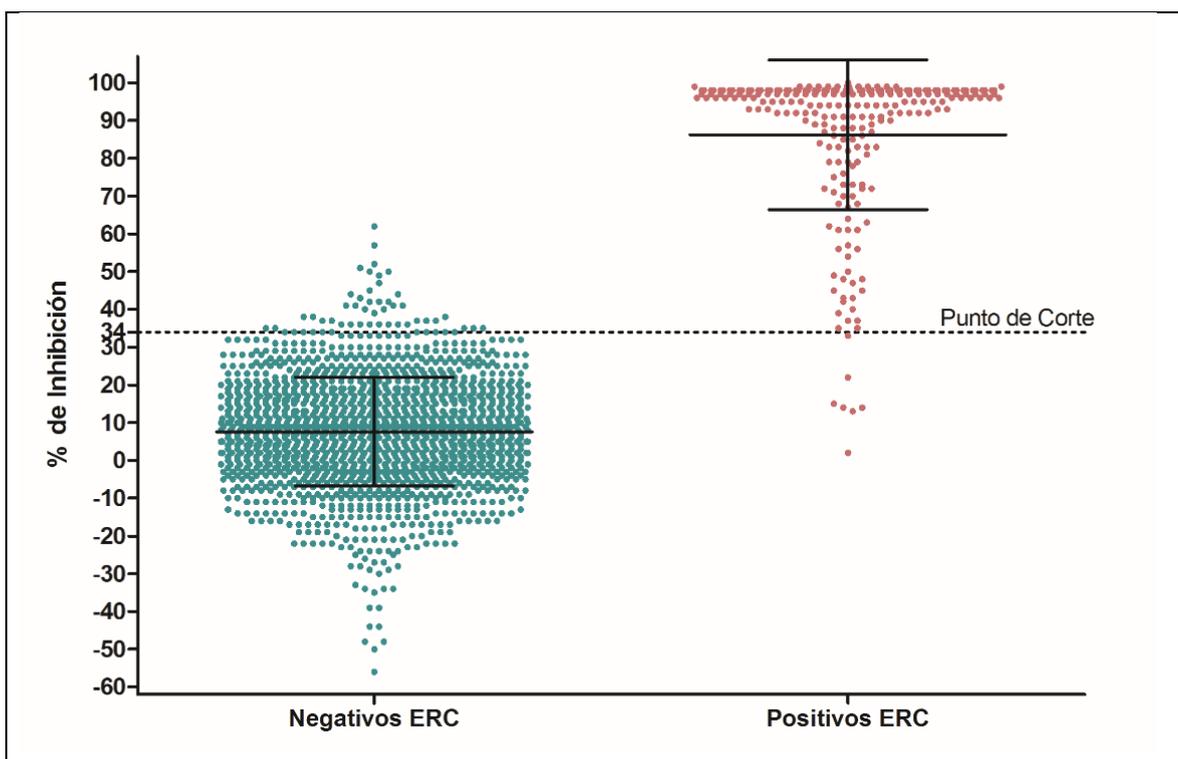


Figura 2.3: Distribución de los resultados de ELISAc<sub>SAG1t</sub> (%I) en 1876 muestras de suero de ovinos y caprinos. El estatus de los animales fue obtenido a través de un estándar relativo de comparación (ERC) para Ac anti-*N. caninum* en pequeños rumiantes. (Análisis ROC).

### 2.3.7. Concordancia entre pruebas

En el análisis de los resultados de las muestras de suero de bovinos, la CO y el índice  $\kappa$  obtenidos entre el ELISAc<sub>SAGIt</sub> y las pruebas IFI, ELISAc<sub>taq</sub> y ELISAc<sub>VMRD</sub> se muestran en la tabla 2.3.

Tabla 2.3. Concordancia observada e índice  $\kappa$  entre ELISAc<sub>SAGIt</sub> y ELISAc<sub>taq</sub>, ELISAc<sub>VMRD</sub> e IFI, para los resultados obtenidos en sueros de bovinos.

	Concordancia observada (%)	Índice $\kappa$	IC (95 %)
IFI/ ELISAc <sub>tSAGI</sub>	95,3	0,90	0,87-0,92
ELISAc <sub>taq</sub> /ELISAc <sub>tSAGI</sub>	94,6	0,89	0,86-0,91
ELISAc <sub>VMRD</sub> /ELISAc <sub>tSAGI</sub>	94,0	0,87	0,81-0,92

En el análisis de los resultados obtenidos para los sueros de pequeños rumiantes, la CO y el índice  $\kappa$  obtenidos entre el ELISAc<sub>SAGIt</sub> y las pruebas IFI y ELISAc<sub>taq</sub> se muestran en la tabla 2.4.

Tabla 2.4. Concordancia observada e índice  $\kappa$  entre ELISAc<sub>SAGIt</sub> y ELISAc<sub>taq</sub> e IFI, para los resultados obtenidos en sueros de pequeños rumiantes.

	Concordancia observada (%)	Índice $\kappa$	IC (95 %)
IFI/ ELISAc <sub>tSAGI</sub>	96,1	0,85	0,81-0,88
ELISAc <sub>taq</sub> /ELISAc <sub>tSAGI</sub>	96,6	0,87	0,83-0,90

En todos los casos, el índice  $\kappa$  entre el ELISAc<sub>SAGIt</sub> y otras pruebas fue muy bueno según la escala establecida por Altman (1990).

### 2.3.8. Estabilidad del antígeno SAG1t inmovilizado en placas de ELISA

Se observaron diferencias en los resultados obtenidos al evaluar los mismos sueros en las placas de ELISA sensibilizadas con el antígeno SAG1t y almacenadas luego de distintos tratamientos. En las placas almacenadas luego de la sensibilización (GA) y las que además se bloquearon (GB) los sueros tuvieron %I distintos que en las placas del grupo control (P = 0,006 y P < 0,001, respectivamente). Los resultados de las muestras de suero expresados como positivos o negativos al test también fueron significativamente diferentes (P < 0,001).

En cambio, el %I de los sueros en las placas que fueron almacenadas luego de la aplicación de un sellador para placas de ELISA (GC) no fue significativamente diferente al %I en las placas del grupo control (P = 0,673). Los resultados positivos o negativos al test de cada suero se mantuvieron iguales (P = 1) (Figura 2.4).

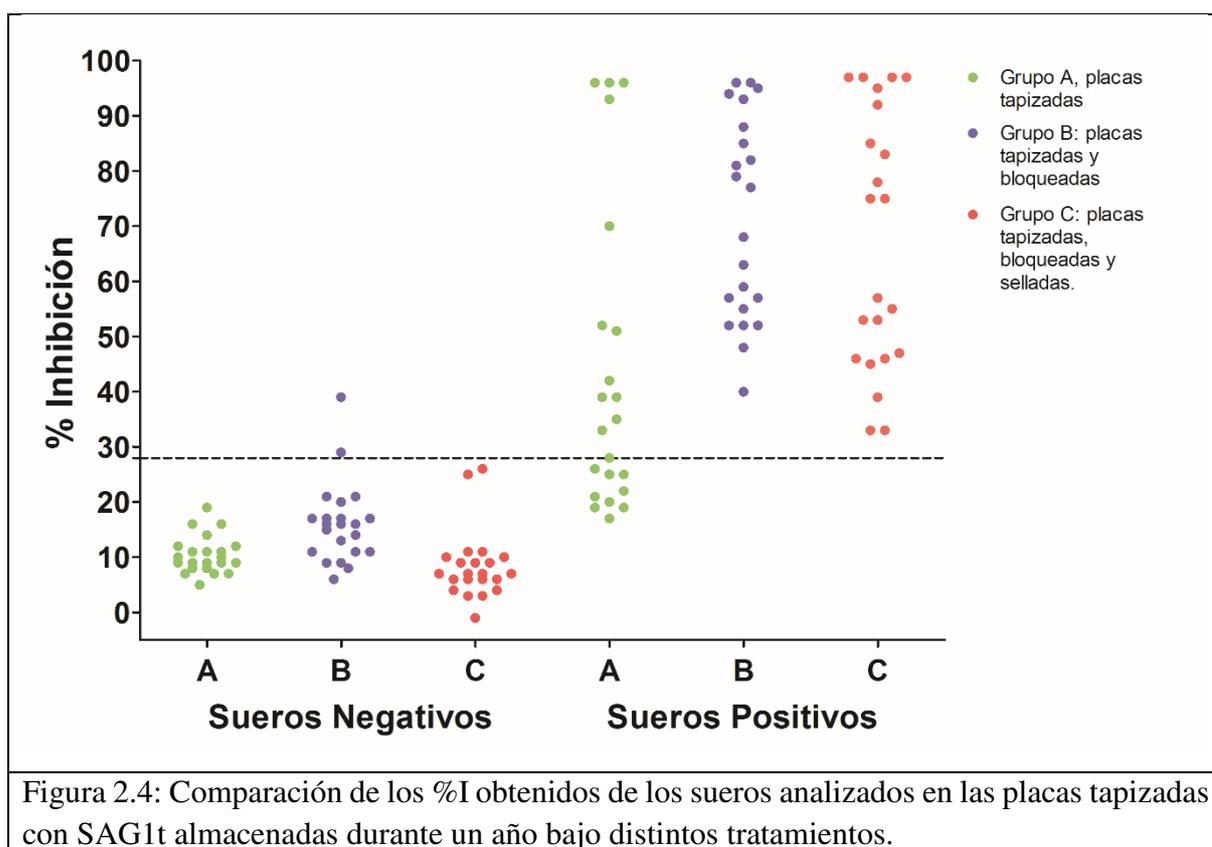


Figura 2.4: Comparación de los %I obtenidos de los sueros analizados en las placas tapizadas con SAG1t almacenadas durante un año bajo distintos tratamientos.

## 2.4. DISCUSIÓN

La sobreexpresión de proteínas en *E. coli* muchas veces lleva a la formación de cuerpos de inclusión compuestos por agregados de la proteína insoluble. En estos casos, las proteínas deben solubilizarse y replegarse, con el insumo de tiempo y trabajo, y esto no siempre arroja resultados satisfactorios. Además, luego del proceso de replegado, solo se recupera una pequeña fracción de la proteína inicial (Georgiou y Valax, 1996). El análisis bioinformático de las secuencias de las proteínas es ampliamente utilizado para la producción de proteínas recombinantes, ya sea para el desarrollo de técnicas de diagnóstico o de vacunas (Rappuoli, 2000; Fernández-Robledo y Vasta, 2010). En el presente trabajo, se identificaron las hélices de transmembrana en la proteína SAG1, y se desarrolló una versión truncada de la misma (SAG1t). De esta forma, la proteína se expresó parcialmente soluble en el citoplasma bacteriano, del cual se purificó, conservando su antigenicidad. Esto se demostró al enfrentar SAG1t con el AcM P1C2D8F8. El AcM reconoció específicamente a la proteína SAG1 expresada en la superficie de los taquizoitos de *N. caninum* y a su homóloga SAG1t recombinante. Por lo tanto, el epítopo de SAG1 nativa reconocido por el AcM está presente en la proteína recombinante SAG1t. La estrategia mejoró el desempeño de la prueba, comparada con la Se de 85 % y Es de 96 % que obtuvieron Wilkowsky y col. (2011) en el APIA basado en SAG1 replegada. Chahan y col. (2003) no reportaron los resultados del desempeño del ELISAI basado en rSAG truncada y fusionada a GST, pero describen una ocurrencia de 6 falsos positivos luego de analizar 60 sueros de bovinos positivos y 137 negativos, datos que demuestran una Es-D del 96 %.

La validación de las pruebas serológicas requiere de poblaciones bovinas con estatus de infección conocido. La identificación directa de los agentes etiológicos y/o las lesiones histológicas específicas que generan, constituyen criterios inequívocos para identificar a los animales infectados, necesarios para establecer una prueba de oro. Las pruebas directas como HP, IHQ, el aislamiento *in vitro* y la PCR, son pruebas que se realizan a partir de tejidos de animales *post mortem*, lo que dificulta la obtención de muestras en gran cantidad. La selección de una población de bovinos no infectados es aún más compleja. Las muestras negativas deben seleccionarse de zonas geográficas libres de la enfermedad en estudio, sin evidencia de signos clínicos y sin antecedentes de vacunación contra el patógeno en los últimos tres años, o en su defecto de rodeos sin indicios de anticuerpos después de la vacunación (Jacobson, 1998). La neosporosis bovina tiene una

distribución global y en Argentina no se han identificado áreas geográficas libres de la enfermedad. Por el contrario, ha sido detectada en más del 90 % de los rodeos evaluados con prevalencias de 40% para ganado lechero y 17 % para ganado de cría (Moore y col., 2009). Esto dificulta trabajar con sueros de bovinos no infectados. Por estas razones la mayoría de los autores recurren a diferentes estrategias para seleccionar las muestras positivas y negativas e inferir que corresponden a bovinos infectados y no infectados respectivamente. En un principio, la IFI fue usada como prueba de referencia para determinar la Se y la Es relativas de los ELISAI o ELISAc (Paré y Hietala, 1995b; Björkman y col., 1997; Williams y col., 1997; Baszler y col., 2001). Este criterio de comparación posee sus propios niveles de falsa positividad y falsa negatividad, lo cual constituye una fuente de error que se acumulará en el cálculo de la Se y la Es de la nueva prueba, llevando a la sub o sobrestimación de los resultados de la misma (Jacobson, 1998). Álvarez-García y col. (2003) evaluaron un ELISAI basado en un lisado de taquizoitos comparando sus resultados con las pruebas de IFI e IB. Schares y col. (2000) en Alemania, y luego Campero y col. (2015a) en Argentina evaluaron un ELISAI basado en una proteína nativa (p38) de *N. caninum* y establecieron un ERC según el resultado de las pruebas IFI e IB. En el presente trabajo para establecer el ERC se recurrió al acuerdo entre pruebas serológicas (IFI, ELISAc<sub>taq</sub> y ELISAc<sub>VMRD</sub>) en los sueros de bovinos procedentes de rodeos de carne y al análisis serológico secuencial de las vacas que formaban parte de un rodeo de bovinos de leche. El análisis secuencial otorga ventajas relevantes sobre los métodos comparativos. Dado que el parásito permanece en quistes tisulares, evadiendo la respuesta inmune del hospedador, los anticuerpos séricos pueden disminuir por debajo del punto de corte de las pruebas serológicas (Conrad y col., 1993a; Maley y col., 2001; Nogareda y col., 2007; Guido y col., 2016). Esto puede llevar a la ocurrencia de falsos negativos, por lo tanto, el seguimiento de los animales durante tres años confirma su estado de infección.

En pequeños rumiantes, el ERC se basó en el acuerdo entre las técnicas serológicas IFI y ELISAc<sub>taq</sub>. Para la IFI se utilizó según estudios previos, una dilución de 1:50 como punto de corte (Jolley y col., 1999). El ELISAc<sub>taq</sub> no fue validado para el uso en pequeños rumiantes, pero demostró una polarización de los resultados que permitió diferenciar claramente los sueros positivos y negativos, observándose una buena concordancia con los resultados obtenidos por la IFI (datos no mostrados). En la actualidad, para el diagnóstico de neosporosis en pequeños rumiantes se dispone de la técnica de IFI, y de

algunos ELISA comerciales como IDEXX Neospora ab (IDEXX) o SVANOVIR® (Svanova) diseñados para uso en bovinos. Recurriendo a conjugados anti-especie pueden ser utilizados en pequeños rumiantes (Álvarez-García y col., 2013). Estos *test* comerciales no reportan punto de corte ni datos de desempeño para estas especies. Por lo tanto, el ELISACSAGIT es una herramienta para sumar al diagnóstico en pequeños rumiantes, ya que no necesita de anticuerpos anti-especie y en el presente trabajo evidenció un buen desempeño. La prueba ELISACSAGIT, podría ser utilizada para el diagnóstico de neosporosis en otras especies requiriendo su validación para cada una de ellas.

La exactitud con la que luego podrá interpretarse el resultado de la prueba, depende de la selección de un panel de sueros representativos del hospedador y del entorno geográfico de la población. Los animales sanos deben ser representativos de la población sana donde se aplicará la prueba y en los animales enfermos debe estar presente todo el espectro clínico posible de la enfermedad (Jacobson, 1998). Los sueros utilizados en el presente trabajo, pertenecían a bovinos que formaban parte de rodeos de leche y de cría en Argentina. En el caso de pequeños rumiantes se incluyeron sueros de cabras y ovejas de distintos establecimientos de las provincias de Santa Fe y Entre Ríos. Esto hace que sean una muestra adecuada de la población diana en la cual se utilizará el *test* posteriormente. Los sueros positivos, al pertenecer a animales infectados naturalmente, cuentan con representantes de infecciones recientes como así también con enfermos crónicos. Esto se evidencia en las muestras de suero tomadas en el estudio longitudinal en vacas lecheras, en que 12 vacas sero-convirtieron durante el experimento. El número de muestras utilizado fue adecuado y supera el propuesto por Jacobson (1998).

Al no existir tratamiento ni vacunas para prevenir la enfermedad, los métodos disponibles para el control de la neosporosis bovina dependen de la correcta identificación de los bovinos infectados y de la consideración de las situaciones epidemiológicas de cada rodeo (Dubey y Schares, 2007). En la actualidad, las técnicas serológicas representan una herramienta útil para abordar el control de la infección por *N. caninum*. El ELISACSAGIT desarrollado en el presente trabajo fue eficiente para discriminar los bovinos infectados y no infectados por *N. caninum*, con una distribución polarizada de los resultados positivos y negativos evidenciada por el 83 % I (DE = 20) y 10 % I (DE = 9) promedio, respectivamente. Esta característica, deja en evidencia el punto de corte intrínseco virtual, lo que permite su modificación para diferentes situaciones epidemiológicas sin afectar significativamente la Se y Es de la prueba (Jacobson, 1998). Por el contrario, Álvarez-

García y col. (2003) establecieron dos puntos de corte posibles para su ELISAI basado en lisado de taquizoitos, uno para lograr una sensibilidad máxima y otro para una especificidad máxima. Entre estos dos puntos definieron un intervalo en el que los resultados son poco claros y se debe recurrir a una prueba confirmatoria. Schares y col. (2000) también establecieron distintos puntos de corte según el patrón de abortos presentes en los rodeos analizados: endémico o epidémico.

La baja especificidad que demuestran los ELISAI basados en lisados de taquizoitos, se debe en parte al gran número de antígenos citoplasmáticos del parásito expuestos. Esto puede llevar a reacciones cruzadas con otros parásitos relacionados. Para limitar la cantidad de antígenos expuestos sólo a los de la superficie de los taquizoitos, Williams y col. (1997) desarrollaron un ELISAI utilizando taquizoitos enteros fijados a la placa de ELISA. Obtuvieron una Se-D de 95 % y una Es-D de 96 % al comparar los resultados con los obtenidos por IFI. Otra estrategia utilizada para aumentar la especificidad fue incluir los antígenos en ISCOM. De esta forma quedan expuestos sólo los antígenos de la membrana del parásito. Con este diseño de ELISAI, Björkman y col. (1997) obtuvieron una Se del 100 % y un Es de 96 %. El uso de proteínas recombinantes mejora estas estrategias, ya que permite la elección de los antígenos que se usarán basándose en la inmunogenicidad y la especificidad de especie. Se desarrollaron ELISAI basados en las proteínas recombinantes GRA6 y GRA7 (Lally y Jenkins, 1996), SRS2 (Nishikawa y col., 2001) y SAG1 (Chahan y col., 2003). Estos trabajos no reportan datos de Se y Es, pero los ELISAs fueron capaces de distinguir bovinos infectados y no infectados sin obtener reacción cruzada en sueros de animales infectados con *Toxoplasma gondii*, *Hammondia heydorni* y *Sarcocystis* spp.

La dilución de los sueros requerida en los ELISAI (1:50-1:1000) para disminuir el ruido de fondo que presenta este diseño de ELISA, genera una disminución de la sensibilidad. En los ELISAc este ruido de fondo es menor, ya que es el anticuerpo monoclonal el que genera el color de la reacción, al reconocer un epítipo específico. Por esta razón, las muestras de suero se utilizan puras o con diluciones muy bajas (1:2), lo que permite aumentar la sensibilidad de la técnica.

En el ELISAc<sub>VMRD</sub>, Baszler y col. (2001) obtuvieron una Se de 96,4 % y una Es de 96,8% al comparar los resultados con los de IFI en 42 sueros positivos y 142 sueros negativos. El desempeño del ELISAc<sub>SAG1t</sub>, con una Se-D de 98,4 % y una Es-D de 98,5 %, utilizando un único punto de corte, fue igual o superior a otras pruebas serológicas disponibles. La

concordancia de la prueba con IFI, ELISAc<sub>taq</sub> y ELISAc<sub>VMRD</sub> fue muy buena ( $\kappa > 0,81$ ), tanto en sueros de bovinos como de pequeños rumiantes. Campero y col. (2018) realizaron una comparación de pruebas serológicas para diagnóstico de neosporosis en bovinos en la que incluyeron tres pruebas de ELISAi. Las pruebas mostraron un  $\kappa$  de 0,79, 0,80 y 0,89 relativas al resultado de la mayoría de los test comparados. Álvarez-García y col. (2013) compararon diez pruebas comerciales de ELISA (nueve ELISAi y un ELISAc) y evaluaron la concordancia relativa al resultado de la mayoría de los test. Obtuvieron concordancias muy buenas con  $\kappa > 0,9$  en cuatro de los test y  $\kappa > 0,8$  en cinco de los test. El cELISAc<sub>VMRD</sub> no tuvo buena concordancia, con un  $\kappa = 0,67$  en dicho trabajo. Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente trabajo cuando se compararon los resultados del ELISAc<sub>SAG1t</sub> con el ELISAc<sub>VMRD</sub>.

El período de tiempo durante el cual el antígeno SAG1t se conservó estable adsorbido en las placas de ELISA (1 año) fue similar al periodo de utilidad de los test comerciales disponibles. Estos test comerciales tienen el mismo tiempo de utilidad (12-15 meses) desde su elaboración hasta el vencimiento.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo indican que ELISAc<sub>SAG1t</sub> sería útil para realizar el diagnóstico de neosporosis y estudios epidemiológicos en rodeos de bovinos y majadas de pequeños rumiantes. El ELISAc<sub>SAG1t</sub> podría ser una alternativa superadora para la producción en gran escala con respecto al ELISAc<sub>taq</sub> basado en el uso de un lisado de taquizoitos como antígeno. La proteína SAG1t es producida en un sistema de expresión rápido y económico que prescinde del mantenimiento de un cultivo de parásitos. El antígeno tSAG1 mantuvo la estabilidad durante 1 año inmovilizado en placas para ELISA, lo que permitiría su transferencia a otros laboratorios. La utilización del ELISAc<sub>SAG1t</sub> en conjunto con otras técnicas de diagnóstico directo y la evaluación epidemiológica del rodeo provee un sólido soporte para los planes de control de los rodeos con neosporosis.

## **CAPÍTULO III:**

# **PREVENCIÓN DE LA NEOSPOROSIS BOVINA**

## CAPÍTULO III: PREVENCIÓN DE LA NEOSPOROSIS BOVINA

### 3.1. INTRODUCCIÓN

Dado que los tratamientos quimioterápicos y las vacunas preventivas para la neosporosis se encuentran aún en etapa experimental, las medidas de prevención de la neosporosis están basadas en el análisis epidemiológico de los rodeos afectados. La forma de evitar la infección horizontal de los animales del rodeo, es evitar la infección oral con ooquistes. Esto se logra realizando un control de los hospedadores definitivos, principalmente de los perros en el establecimiento, ya que la presencia y el número de perros es un factor de riesgo asociado a la infección de los bovinos y a la ocurrencia de abortos por neospora (Dubey y col., 2007). Se puede controlar el ingreso de los perros a las áreas donde se encuentran las vacas, sus alimentos y agua por medio de vallados. Para impedir que los perros se contagien, se deben eliminar inmediatamente fetos, placentas y cadáveres del campo. Es importante realizar el control de roedores en el establecimiento. No se aisló aún *N. caninum* de roedores, pero si se han encontrado roedores positivos por PCR (Almería, 2013). Por lo tanto, controlarlos es una medida de higiene a tomar. Para reducir la persistencia de la enfermedad en el rodeo a través de la transmisión vertical, las medidas son seleccionar para la reposición animales negativos por serología, ya sea de producción propia o adquirida. Inseminar a las vacas de tambo seropositivas con semen de toros de carne, ya que el vigor híbrido disminuye la probabilidad de aborto (López-Gatius y col., 2005) y las terneras seropositivas con fenotipo de carne, no quedarán en el rodeo. Realizar transferencia de los embriones de vacas de alto valor genético a receptoras sero-negativas, para que no se infecten sus crías. Eliminar a las vacas seropositivas con historia de abortos. Controlar la contaminación de los rollos, fardos y silos con micotoxinas, ya que la inmunosupresión que estas generan puede desencadenar la recrudescencia de la enfermedad y llevar a la ocurrencia de abortos en animales infectados crónicamente (Bartels y col., 1999). A pesar de que se tomen todas las medidas preventivas y de control, nunca se descarta la posibilidad de contagio a través de la entrada de hospedadores definitivos, de alimento o agua contaminados.

Por esta razón, la existencia de una vacuna es la vía más eficaz, económica y práctica para prevenir la enfermedad. Una vacuna efectiva frente a la neosporosis debería poder cubrir tres aspectos: evitar la infección horizontal, evitar la transmisión vertical en animales crónicamente infectados y evitar el aborto.

Existen actualmente vacunas contra parásitos intracelulares del phylum apicomplexa estrechamente relacionados con *N. caninum* y esto hace pensar que el desarrollo de una vacuna efectiva frente a la neosporosis es posible. La vacuna contra *T. gondii* está elaborada con taquizoitos vivos atenuados de la cepa S48, que no pueden progresar a la fase de bradizoitos y por lo tanto no pueden enquistarse en los tejidos. Esta cepa fue aislada mediante la inoculación de ratones con los tejidos de un feto ovino abortado. Después de 3000 pasajes en ratones, el parásito perdió la habilidad de formar quistes tisulares y producir infección persistente. Tampoco puede estimular la producción de ooquistes en los gatos, sus hospedadores definitivos (Buxton, 1993). Las vacunas actuales contra la babesiosis bovina, también están basadas en babesias atenuadas. En el caso de *Babesia bovis*, se logró la atenuación a través de rápidos y sucesivos pasajes en terneros esplenectomizados (Callow y Mellors, 1966; Callow y col., 1979). Más tarde, también se logró la atenuación de *B. bigemina*, pero en este caso el procedimiento involucró pasajes sucesivos lentos en terneros íntegros, sin esplenectomizar (Dalgliesh y col., 1981). Otras vacunas en uso, elaboradas con parásitos vivos atenuados son las que previenen la coccidiosis en aves y la theileriosis en bovinos (McAllister, 2017).

Actualmente, existen en el mercado vacunas elaboradas con parásitos enteros muertos, como las vacunas contra *Trichomonas foetus* para bovinos y *Giardia lamblia* para caninos. En el ensayo experimental, la vacuna contra la trichomoniasis en bovinos tuvo una protección moderada en hembras con una inmunidad de corta duración, que sería efectiva durante el período reproductivo estacional. La vacuna contra la giardiasis en caninos protegió significativamente frente a la infección y redujo el signo clínico de diarrea en los perros vacunados (McAllister, 2017). Algunas vacunas elaboradas con antígenos de los parásitos, ya sean extractivos o recombinantes, se encuentran en el mercado actualmente. Existen vacunas contra la leishmaniasis visceral en caninos elaboradas con extractos proteicos o con proteínas recombinantes de *Leishmania infantum* y también una vacuna contra la coccidiosis en aves, elaborada a partir de extractos proteicos de *Eimeria spp.* que otorga protección interespecífica (McAllister, 2017).

Contra la neosporosis en bovinos, en Estados Unidos se comercializó hasta el 2009 una vacuna basada en taquizoitos inactivados (Bovilis NeoGuard™), que mostró solo baja eficacia contra la transmisión vertical y por esa razón fue retirada del mercado (Weston y col., 2012).

Desde que se conocen los signos clínicos provocados por *N. caninum* y las pérdidas económicas que la neosporosis causa en la producción de bovinos, se han enfocado los esfuerzos en el desarrollo de una vacuna preventiva. Se han desarrollado y evaluado distintas formulaciones que comprenden vacunas elaboradas con taquizoitos inactivados, con taquizoitos vivos atenuados, con extractos proteicos de los taquizoitos y con proteínas recombinantes. También se han desarrollado y evaluado vacunas que utilizan virus y bacterias como vectores de genes de *N. caninum*.

### **3.1.1. Vacunas formuladas con taquizoitos inactivados o extractos de taquizoitos**

Andrianarivo y col. (1999) fueron los primeros en evaluar la inmunogenicidad de los taquizoitos inactivados formulados con distintos adyuvantes al ser administrados en bovinos. Evaluaron los adyuvantes poliméricos Polygen™ y Havlogen® y la emulsión oleosa Montanide™ ISA 773. De estos adyuvantes, el Polygen™ fue el único que produjo niveles de INF  $\gamma$  similares a los encontrados en la infección natural. Por este motivo, luego evaluaron en vacas gestantes una vacuna formulada con taquizoitos inactivados y el adyuvante Polygen™ (Andrianarivo y col., 2000). Esta vacuna no evitó el aborto en las vacas desafiadas con taquizoitos vivos de la cepa BPA1 de *N. caninum* aislada por Conrad y col. (1993b).

En Argentina se realizaron experimentos para establecer la inmunogenicidad de vacunas formuladas con extractos de taquizoitos inactivados y su protección frente a un desafío con *N. caninum*. La inoculación de terneros con la fracción soluble de un lisado de taquizoitos con complejos inmunoestimulantes (ISCOM) como adyuvante generó un aumento de la IgG total en el grupo de animales vacunados dos semanas post inoculación, que se mantuvo luego del desafío. La respuesta obtenida fue del tipo Th2, con producción de IgG1. Los niveles de INF  $\gamma$  aumentaron sólo luego del desafío con  $1.10^8$  taquizoitos de la cepa NC-1. No se evaluó la protección frente al aborto o transmisión vertical (Moore y col., 2011). Por otra parte, se evaluó en vaquillonas gestantes la fracción soluble de un lisado de taquizoitos con lecitina de soja como adyuvante. Las vaquillonas preñadas se desafiaron con  $1.10^8$  taquizoitos de la cepa NC-1 a los 78 o 225 días de gestación. Se observaron mayores títulos de IgG e INF  $\gamma$  luego del desafío en el grupo vacunado, al compararlo con el grupo control. No se registraron abortos en el grupo vacunado ni en el grupo control; pero se hallaron lesiones macroscópicas, como edema o autólisis, sólo en las placentas de las vaquillonas del grupo control (Mansilla y col., 2015).

### 3.1.2. Vacunas formuladas con taquizoitos vivos atenuados

La primera cepa de *N. caninum* probada como vacuna viva en bovinos fue NC-Nowra. Esta cepa, atenuada naturalmente, fue aislada de un ternero infectado congénitamente (Miller y col., 2002). Williams y col. (2007) evaluaron la protección conferida por la cepa atenuada frente al desafío con la cepa NC-Liv (Barber y col., 1995) en el día 70 de gestación. Para esto, inocularon vaquillonas por vía intravenosa (IV) con  $1.10^7$  taquizoitos NC-Nowra nueve semanas antes de la inseminación artificial. Luego de la administración de la vacuna, se observó producción de anticuerpos e IFN  $\gamma$ . Luego del desafío, se obtuvo una protección total frente al aborto y la transmisión vertical del parásito. En un estudio posterior, se realizó la vacunación de vaquillonas con la cepa NC-Nowra para comparar las vías de administración IV y subcutánea (SC), y para investigar los efectos de la vacunación sobre el aborto utilizando taquizoitos de NC-Nowra en cultivo y criopreservados. La eficacia protectora de los taquizoitos en cultivo administrados por vía IV fue del 55 % y por vía SC del 85 %. Los taquizoitos criopreservados de NC-Nowra indujeron protección en el 30% de los animales. Este estudio proporcionó información sobre la producción y conservación de la vacuna, para su eventual transferencia y aplicación en condiciones de campo (Williams y col., 2007).

Rojo-Montejo y col. (2013) evaluaron la protección de la cepa NC-Spain1H de *N. caninum* naturalmente atenuada, aislada también de un ternero congénitamente infectado. Inmunizaron vaquillonas por vía SC dos veces con  $1.10^7$  taquizoitos vivos de NC-Spain1H antes de la inseminación artificial. El desafío se realizó con la cepa patógena NC-1 en los días 70 o 135 de gestación. Las vaquillonas desafiadas en el día 70 tuvieron protección parcial frente al aborto y la transmisión vertical, con 2 de 5 fetos afectados. Las desafiadas en el día 135, tuvieron mayor protección frente al aborto y un 100 % de protección frente a la transmisión vertical. Los terneros de las vaquillonas inmunizadas mostraron títulos de anticuerpos específicos anti-*N. caninum* cepa NC-1 pre-calostales significativamente más bajos en comparación con los terneros del grupo no inmunizado y desafiado (Rojo-Montejo y col., 2013).

La cepa aislada en Argentina NC-6, obtenida de la materia fecal de un perro infectado (Basso y col., 2001) fue utilizada por Hecker y col. (2013) para evaluar su inmunogenicidad y protección frente al desafío con la cepa NC-1 en vaquillonas. Se comparó la protección conferida por los taquizoitos vivos atenuados y un extracto soluble

de taquizoitos de la misma cepa con ISCOM como adyuvante. Se inocularon las vaquillonas previamente a la inseminación artificial, y el desafío se realizó a los 70 días de gestación. Se detectó un aumento significativo en las respuestas de anticuerpos contra *N. caninum* en las vaquillonas de ambos grupos antes del desafío, y las respuestas de IFN  $\gamma$  también fueron similares. Se detectó la transmisión transplacentaria en uno de los cuatro fetos del grupo vacunado con los taquizoitos vivos y en tres de los cuatro fetos del grupo vacunado con el extracto de taquizoitos inactivados e ISCOM. Los resultados sugieren que la vacunación con taquizoitos vivos de la cepa NC-6 antes de la concepción disminuyó la transmisión vertical de *N. caninum*. Recientemente se evaluó la inmunogenicidad de la cepa NC-LP1, aislada también en Argentina a partir de un ternero infectado congénitamente (Campero y col., 2015b). Hecker y col. (2019b) inocularon terneras de 5-7 meses con  $1.10^6$  taquizoitos de la cepa NC-LP1 por vía SC, y se evaluó la respuesta inmune humoral y celular. La inoculación experimental indujo una respuesta inmune específica caracterizada por la producción de anticuerpos IgG y la expresión de las citoquinas IFN  $\gamma$  y FNT  $\alpha$ . Los animales no presentaron reacción febril luego de la inoculación. Los anticuerpos IgG disminuyeron por debajo del punto de corte después de los 120 días post inoculación y se detectó la presencia de anticuerpos anti-SAG4, antígeno específico de los bradizoitos, en el 50 % de las terneras. Esto permitió inferir que se produjo la infección crónica en los animales inoculados con formación de quistes tisulares, que podría ser protectora frente a la infección con una cepa virulenta. Al llegar a la pubertad las terneras vacunadas se inseminaron y desafiaron a los 210 días de gestación. Los resultados obtenidos de este experimento hasta el momento permiten concluir que no hubo protección frente a la transmisión vertical de la cepa de desafío y que la cepa utilizada como vacuna también se habría transmitido congénitamente. (Hecker, 2019. Comunicación en conferencia: Control of *Neospora caninum* on cattle farms, EEA Balcarce, INTA. 4 de junio de 2019). Los experimentos con taquizoitos vivos demuestran que algunas cepas atenuadas serían capaces de conferir protección frente a la infección horizontal, vertical y el aborto causado por *N. caninum*. Sin embargo, hasta el momento no se han podido comercializar estas vacunas. En este contexto, las vacunas de nueva generación (proteínas recombinantes, subunidades, ADN del parásito incluido en vectores) resultan más seguras, fáciles de fabricar y transferir, ya que no dependen de un cultivo celular infectado y por lo tanto son la principal línea de investigación en el desarrollo de vacunas preventivas de la neosporosis.

### 3.1.3. Vacunas utilizando antígenos de *Neospora caninum*

En los últimos años se han realizado avances en el desarrollo de vacunas basadas en antígenos recombinantes. Se realizaron pruebas en ratones, meriones (*Meriones unguiculatus*) y bovinos. Las proteínas de superficie de *N. caninum* SRS2 y SAG1 se evaluaron como inmunógenos en ratones, obteniendo una protección parcial frente a la enfermedad aguda (Pinitkiatisakul y col., 2007) y protección parcial en la transmisión vertical en ratones gestantes (Haldorson y col., 2005). Además, se combinaron SAG1 y SRS2 con las proteínas NcDG1 (GRA7) y NcDG2 (GRA6) de los gránulos densos para vacunar meriones. Con la combinación SRS2 y GRA7 se obtuvo una protección parcial a la enfermedad aguda, con una sobrevivencia del 67,5 % de los meriones en el grupo vacunado (Cho y col., 2005). Posteriormente se evaluaron en ratones gestantes las proteínas MIC1, MIC3 y ROP2, proteínas de los micronemas y de los rhoptries de *N. caninum*, respectivamente. Se obtuvo protección total frente a la infección aguda y parcial frente a la transmisión vertical, sobreviviendo el 35 % de las crías (Debache y col., 2009). Recientemente se evaluó una vacuna compuesta por el antígeno recombinante SAG1 y el adyuvante *heat shock protein* 81.2 de *Arabidopsis thaliana* (AtHsp81.2) en un modelo murino de neosporosis congénita. Este adyuvante permite, a través de la medición de anticuerpos contra AtHsp81.2, diferenciar animales infectados de vacunados (adyuvante DIVA). Esta vacuna estimuló la producción de anticuerpos IgG, IgG1 e IgG2 específicos en los ratones inmunizados, con diferencias significativas, al compararlos con los ratones de los grupos control. Además, se observó protección parcial contra la transmisión vertical y un aumento en el tiempo de supervivencia de las crías (Bengoa-Luoni y col., 2019).

Las diferencias fisiológicas e inmunológicas entre especies, especialmente la respuesta del sistema inmune a la infección durante la gestación, hacen necesaria la evaluación de los inmunógenos en modelos experimentales bovinos. Nishimura y col. (2013) inmunizaron bovinos no gestantes con el antígeno recombinante GRA7 encapsulado en liposomas. Realizaron el desafío con  $1.10^7$  taquizoitos de la cepa NC-1. Antes del desafío, en los animales inmunizados hubo producción de anticuerpos específicos contra GRA7 y de IFN  $\gamma$  y luego del desafío la carga de parásitos en el cerebro fue significativamente menor en los animales inmunizados que en los animales del grupo control. En otro experimento realizado en vacas gestantes, se evaluó una vacuna basada en múltiples antígenos recombinantes: SAG1, *heat shock protein* 20 (HSP20) y GRA7. Se utilizó

ISCOM como adyuvante. La vacuna generó IgG específicas, sin que se detectara diferencia en la producción de INF  $\gamma$  entre los grupos vacunado y control. No se logró protección frente a la transmisión vertical, ya que el 100 % de las placentas evidenció lesiones y todos los fetos fueron infectados (Hecker y col., 2014).

#### **3.1.4. Adyuvantes**

El adyuvante utilizado en la formulación de una vacuna, es un factor clave para el direccionamiento de la respuesta inmune hacia el perfil necesario y por consiguiente, el incremento de su eficacia. Esto adquiere especial relevancia al tratarse de inmunógenos formados por proteínas o péptidos. Para un efectivo control de la infección por *N. caninum* se requiere de una respuesta inmune de tipo Th1 activa, con producción de inmunoglobulinas de isotipo IgG2. Los anticuerpos específicos controlan la expansión inicial de *N. caninum* en la fase de multiplicación rápida, facilitando la lisis de los parásitos extracelulares (Innes y col, 2002). La respuesta Th1 con predominio de IgG2 se asocia a la protección contra el aborto por *N. caninum* (Almería y col, 2009).

Los adyuvantes más utilizados en medicina veterinaria son las sales de aluminio (hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio), los oleosos (Montanide™) y las saponinas como Quil A®. En la actualidad, son cada vez más usados los sistemas de transporte de antígenos como los ISCOM y los liposomas. Las sales de aluminio son adyuvantes que retrasan la eliminación de los antígenos, permitiendo que la estimulación del sistema inmune dure más tiempo, a través de la formación de un granuloma rico en macrófagos en los tejidos. Estos adyuvantes promueven las respuestas de anticuerpos, teniendo poco efecto estimulante sobre las respuestas mediadas por células. Este tipo de respuesta los hace inadecuados para conferir inmunidad protectora frente a protozoos intracelulares como *N. caninum*. El Montanide™ ISA también produce una reacción granulomatosa o absceso alrededor del sitio de inoculación. Estos adyuvantes de liberación prolongada pueden causar irritación tisular significativa, con la destrucción del tejido. Las saponinas son una mezcla de glicósidos triterpenoides derivados del extracto crudo de la corteza de un árbol llamado *Quillaja saponaria*, que tienen efectos adyuvantes, pero son de elevada toxicidad. El Quil A® es una mezcla parcialmente purificada de este extracto crudo, de menor toxicidad, que es ampliamente usada en medicina veterinaria (Hecker y col, 2012). Las saponinas pueden estimular selectivamente la actividad Th1, ya que dirigen los antígenos hacia las rutas endógenas de procesamiento e incrementan la actividad

coestimuladora (Tizard, 2009c). El polímero sintético Polygen™ se utilizó en la formulación de una vacuna con taquizoitos inactivados de *N. caninum* estimulando una respuesta de tipo Th1, que no logró proteger frente al desafío con la cepa BPA1 (Andrianarivo y col., 2000).

Los ISCOM son nanopartículas de 40 nm utilizadas como sistema de administración de antígenos. Están compuestos de saponinas, lípidos y el o los antígenos generalmente unidos por interacciones hidrofóbicas. En general, la saponina es el Quil A® y los lípidos pueden ser una mezcla de colesterol y fosfatidilcolina o bien fosfatidiletanolamina. Muchas partículas pueden ser utilizadas como antígenos, con la condición de que sean hidrofóbicas. A través de los ISCOMs, los antígenos son capturados por las células presentadoras de antígenos (CPA) en vesículas endosomales y también en el citosol de estas células. Por este motivo, se inducen ambas respuestas Th1 y Th2, pero con predominio de la respuesta Th1 debido a la producción de IL-12 (Morein y col., 2004).

Los liposomas son estructuras formadas por bicapas de fosfolípidos biocompatibles. Los liposomas pueden imitar a los microorganismos patógenos, transportando grandes cantidades de antígenos, que son captados por las CPA. De este modo, pueden inducir respuestas inmunes tanto humorales como celulares frente a proteínas y polisacáridos (Gregoriadis y col., 1990; Sivakumar y col., 2011). Otra ventaja de los liposomas es que son capaces de cargar moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas, lo que hace posible la entrega conjunta de antígenos y agentes inmunoestimulantes, con la consiguiente mejora de las respuestas inmunes específicas (Frézard, 1999). Los oligodesoxinucleótidos con secuencias CpG no metiladas (ODN-CpG) se encuentran actualmente en estudio como inmunoestimulantes. Las secuencias de nucleótidos CpG se hallan presentes en el ADN bacteriano y en el eucariota, pero en el ADN eucariota son de baja expresión y están metiladas. Debido a esto, cuando las secuencias CpG no metiladas ingresan al organismo de un animal, son reconocidas como un agente extraño por el sistema inmune. Son útiles como potenciadores de adyuvantes, especialmente cuando los antígenos son poco inmunógenos, como sucede con las proteínas recombinantes (Klinman, 2004). Los liposomas unidos a ODN-CpG despiertan específicamente una respuesta Th1 con producción de IFN- $\gamma$ , el cual estimula la producción de IgG2 y el desarrollo de una respuesta de linfocitos T citotóxicos (Klinman, 2004), que serían útiles para la protección frente a una infección con *N. caninum*.

Los trabajos previos de evaluación de inmunógenos, adyuvantes y diferentes vacunas experimentales sugieren que una vacuna basada en parásitos vivos atenuados sería la mejor opción para proteger frente a la infección, transmisión vertical y el aborto por *N. caninum*. De todos modos, entre las dificultades que se reconocen en las vacunas formuladas con parásitos vivos, se destacan la posibilidad de la reversión de la atenuación, la dificultad para la producción a nivel industrial, con un mayor costo y una distribución dependiente de la cadena de frío y del tiempo posible de almacenamiento. Una vacuna formulada con antígenos de *N. caninum* y un adyuvante que estimule una respuesta inmune de tipo Th1, sería una herramienta inocua, estable, económica y transferible de gran valor para el control de la neosporosis bovina.

El objetivo general de esta segunda parte del trabajo fue evaluar antígenos de *N. caninum* como inmunógenos en bovinos.

Los objetivos específicos fueron

- a) Seleccionar proteínas de *N. caninum* para su evaluación como inmunógenos.
- b) Clonar, expresar y purificar los antígenos recombinantes.
- c) Diseñar y ejecutar un experimento de vacunación y desafío para evaluar la respuesta inmune generada por la vacuna elaborada con los antígenos recombinantes.

## **3.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.2.1. Selección de los antígenos para evaluar como inmunógenos**

La elección de los antígenos se basó en experimentos realizados previamente por otros grupos de investigación, que evaluaron antígenos de *N. caninum* en ratones, meriones y bovinos. Las proteínas SRS2, GRA7, MIC1 Y MIC3 de *N. caninum* se seleccionaron para su evaluación como inmunógenos en bovinos ya que demostraron protección frente a la infección aguda y a la transmisión vertical en los animales de experimentación evaluados (Cho y col., 2005; Debache y col., 2009; Nishimura y col., 2013).

### **3.2.2. Análisis bioinformático**

Para predecir la ubicación y los aminoácidos que forman parte del péptido señal de cada proteína se utilizó el algoritmo de predicción SignalP 5.0 (Signal P, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Almagro-Armenteros y col., 2019). El algoritmo TMpred se utilizó para predecir los dominios transmembrana de cada proteína (TM Pred, [https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED\\_form.html](https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html)) (Hofman y Stoffel, 1993). La solubilidad de las formas completa y trunca (sin dominios transmembrana) de cada proteína se calculó utilizando un modelo de predicción basado en la sobreexpresión de proteínas heterólogas en *E. coli* (Recombinant protein solubility prediction, <http://www.biotech.ou.edu/>) (Díaz y col., 2010).

### 3.2.3. Clonación de los genes

Tabla 3.1: Secuencias de los *primers* utilizados para el clonado de los genes.

Gen	Acceso GenBank Nro.	Primer	Secuencia (5' - 3')
NcSRS2	JQ410454.1	<i>forward</i>	<u>ggatccccattcaagtcggaaaatg</u>
		<i>reverse</i>	<u>gaattctcagtggtggtgatggtgatggcgttcttacattcgtc</u>
NcGRA7	JQ410455.1	<i>forward</i>	<u>ggatccatggacttagcaaccgaa</u>
		<i>reverse</i>	<u>gaattctcagtggtggtgatggtgatgagtcttgacacgttt</u>
NcMIC1	AF421187.1	<i>forward</i>	<u>ggatccatgaaaacatacggagaagcgtcg</u>
		<i>reverse</i>	<u>gaattcttagtggtggtggtggtggtgcttgaacatctccattt</u>
NcMIC3	XM_003880575.1	<i>forward</i>	<u>ggatccatggataaaagctacggtggtgactgc</u>
		<i>reverse</i>	<u>gaattctcagtggtgatgatggtgatgactcgcggacaaaactg</u>

Las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción están subrayadas. La secuencia codificante para la cola de 6 histidinas se encuentra en itálica.

#### 3.2.3.1. Diseño de *primers*

Los *primers* específicos (*forward* y *reverse*) para cada proteína se diseñaron de forma de agregar en los extremos de los ADN codificantes (ADNc) los sitios de corte para las enzimas de restricción BamHI y EcoRI que permitieron orientar el clonado de los ADNc en el vector de expresión. Además, se agregó en el *primer forward* el codón de iniciación y en *primer reverse* una secuencia de ADN que codifica para una cola de 6 histidinas, que se expresa en el extremo carboxilo-terminal de las proteínas recombinantes, para facilitar su purificación y el codón de terminación (Tabla 3.1).

#### 3.2.3.2. Obtención del ADNc

Se extrajo el ADN genómico (ADNg) o el ARN total (ARNt) de los parásitos, según la ausencia o presencia de intrones en las secuencias de ADN, respectivamente. Para amplificar las secuencias de ADNc que no poseían intrones (SRS2 y GRA7) se extrajo el

ADNg por el método de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. El ADNg se utilizó como templado para la amplificación de los ADNc para las proteínas seleccionadas a través de la PCR. Se utilizó la ADN polimerasa de alta fidelidad de copia Platinum Pfx (Invitrogen). Luego de la amplificación se agregaron adeninas a los extremos 3' para su clonación en el pGEM®-T Easy.

Para amplificar las secuencias de ADNc que poseían intrones (MIC1 y MIC3) se extrajo el ARN total (ARNt) por el método de tiocianato de guanidinio/fenol/cloroformo utilizando TRIzol Reagent (Invitrogen) a partir de los parásitos purificados. El ARN mensajero (ARNm) se utilizó como templado para una retro-transcripción con los *primers* específicos para los ADNc. Se obtuvo el ADNc de cadena simple y luego se procedió con una PCR al igual que con las secuencias sin intrones.

El tamaño de los productos de PCR fue observado por electroforesis en geles de agarosa 1 % teñidos con bromuro de etidio. Los amplicones se purificaron desde el gel de agarosa con un el *kit* de purificación de ADN GeneClean (MP Biomedicals).

### **3.2.3.3. Clonación en el vector pGEM®-T Easy**

Los productos de la amplificación se clonaron en el vector pGEM®-T Easy a través de una ligación con la enzima T4 ADN Ligasa (Promega). Se transformaron por electroporación bacterias *E. coli* Top10F' competentes (Invitrogen) con los productos de las ligaciones. Las bacterias transformadas se sembraron en placas de Petri con medio LB/Agar suplementado con carbenicilina 50 µg/ml, IPTG 0.5 mM y X-Gal 80 µg/ml. Las placas se incubaron a 37 °C durante 16 h. Se extrajo el ADN plasmídico (ADNp) de las colonias blancas, que contenían el inserto, crecidas en las placas. A través de cortes con enzimas de restricción se seleccionaron las colonias que tuvieran el número de pares de bases esperado. La secuencia del ADNp de estas colonias se confirmó por secuenciación (Unidad de Genómica, EEA Castelar, INTA).

### **3.2.3.4. Clonación en el vector de expresión pET-24a**

El ADNp con la secuencia correcta para cada proteína se digirió con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI. El vector de expresión pET-24a (Novagen) fue digerido con las mismas enzimas de restricción. Las reacciones de restricción fueron corridas en geles de agarosa al 1 % y las bandas correspondientes al vector pET-24a lineal y a los insertos

fueron cortadas del gel de agarosa y purificadas con el *kit* de purificación de ADN GeneClean (MP Biomedicals). Se ligaron los insertos en el vector pET-24a en una relación molecular 3:1 inserto:vector utilizando la enzima T4 DNA Ligasa (Promega). Con los productos de ligación se transformaron por electroporación bacterias *E. coli* Top10F<sup>'</sup> competentes (Invitrogen). Se seleccionó para cada proteína un clon, cuya secuencia fue confirmada por secuenciación, para amplificar y obtener el ADNp para transformar la cepa bacteriana de expresión.

### **3.2.3.5. Transformación de la cepa de expresión**

Se transformaron células *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (Invitrogen) por el método de shock térmico con los ADNp seleccionados. Se sembraron en placas de Petri con medio LB/agar/K/Cl. Se tomó una colonia, se repicó en caldo LB/K/Cl y se guardaron alícuotas de las bacterias con 10 % de glicerol en nitrógeno líquido.

### **3.2.4. Expresión de las proteínas recombinantes**

#### **3.2.4.1. Expresión de las proteínas recombinantes en pequeña escala**

Los clones conservados en nitrógeno líquido se sembraron en placas de Petri con medio LB/agar/K/Cl y se incubaron a 37 °C durante 16 h. Se tomó una colonia aislada de cada placa para realizar pre-cultivos en 2 ml de caldo LB/K/Cl que se incubaron a 37 °C durante 16 h con agitación. Una alícuota de 0,5 ml de cada pre-cultivo se utilizó para inocular 50 ml de caldo LB/K/Cl. Los cultivos se incubaron a 37 °C hasta llegar a una DO<sub>600</sub> = 0,8. Al llegar a este punto, se indujo la expresión proteica con IPTG 1 mM. Se continuó la incubación a 37 °C con agitación durante 3 h. Se tomaron muestras de los cultivos pre-inducción, 1, 2 y 3 horas post-inducción. Las muestras fueron centrifugadas a 5000 x g durante 15 min. Los *pellets* se re-suspendieron en *buffer* de lisis (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50mM, NaCl 300mM, β-mercaptoetanol 20mM, pH = 8,0). Las suspensiones celulares se lisaron por ciclos de congelado-descongelado, realizados mediante sucesivos pasajes por nitrógeno líquido y baño de agua a 37 °C. Luego de la lisis, se centrifugaron a 35000 x g durante 20 min, se separaron las fracciones soluble e insoluble y se sembraron geles de SDS-PAGE al 12 % para evaluar la expresión de las proteínas en las fracciones soluble e insoluble de los cultivos de *E. coli*.

### 3.2.4.2. Expresión de las proteínas recombinantes en mediana escala

Una vez confirmada la expresión de las proteínas en pequeña escala, la inducción se realizó en un volumen mayor. Se tomó una alícuota de cada clon conservado en nitrógeno líquido y se repicó en un pre-cultivo de 5 ml en caldo LB/K/Cl. Se incubó a 37 °C durante 16 h con agitación a 250 rpm. Este pre-cultivo se utilizó para inocular 500 ml de caldo LB/K/Cl. Las bacterias se incubaron a 37 °C hasta una  $DO_{600} = 0,8$ . Al alcanzar esta  $DO$ , se indujo la expresión con 1 % de lactosa a 37 °C durante 3 h en agitación. Las bacterias se colectaron por centrifugación (6000 x g, 15 min, 4 °C), se re-suspendieron en 10 ml de *buffer* de lisis con el agregado de 10 mM de imidazol y 20  $\mu$ l de un *cocktail* de inhibidores de proteasas set III (Calbiochem), y se lisaron a 24000 *psi* con un homogeneizador de alta presión (EmulsiFlex-B15, Avestin, Canadá).

### 3.2.5. Purificación de las proteínas recombinantes

#### 3.2.5.1. Purificación de las proteínas solubles: GRA7 y MIC3

Se separaron las fracciones soluble e insoluble de los cultivos por centrifugación (35000 x g, 30 min, 4 °C). El sobrenadante se pasó a través de un filtro de 0,45  $\mu$ m y fue vertido en una columna plástica sobre 2 ml de una matriz de  $Ni^{2+}$ -NTA agarosa (Qiagen), previamente equilibrada con el *buffer* de lisis con el agregado de 10 mM de imidazol. Después de 1 h de incubación a 4 °C con agitación, se lavó la columna con 10 ml de *buffer* de lisis agregando concentraciones crecientes (10, 20, 30, 40 y 50 mM) de imidazol. Luego, la proteína fue eluída de la columna con 10 ml de *buffer* lisis con el agregado de 200 mM de imidazol. Las proteínas purificadas se dializaron en *buffer* A ( $Na_2HPO_4$  25 mM, NaCl 150 mM, pH = 8) a 4 °C. La pureza de las proteínas se evaluó por electroforesis en un SDS-PAGE al 16 % y la concentración se determinó por medición de la absorbancia a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar teórico de cada proteína: para GRA7 = 11460  $M^{-1} cm^{-1}$  y para MIC3 = 20535  $M^{-1} cm^{-1}$ .

#### 3.2.5.2. Purificación de las proteínas insolubles: SRS2 y MIC1

Se separaron las fracciones soluble e insoluble del cultivo de cada proteína por centrifugación (35000 x g, 30 min, 4 °C). Los cuerpos de inclusión, formados por las proteínas insolubles, quedaron retenidos en los *pellet*. Para separar los cuerpos de inclusión de los detritos celulares y sustancias insolubles del medio de cultivo, se

realizaron sucesivos lavados. El *pellet* de cada cultivo se re-suspendió en *buffer* lisis con el agregado de 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 1 mM de CaCl<sub>2</sub>. Se agregaron 10 U de ADNasa y se incubó durante 10 min a 25 °C. Se centrifugó (35000 x g, 10 min, 25 °C) y el *pellet* se re-suspendió en *buffer* lisis con 0,1 mg/ml de lisozima. Se repitió la incubación y centrifugación. Se descartó el sobrenadante y se re-suspendió el *pellet* en *buffer* lisis con 10 mg/ml de ácido deoxicólico, luego se centrifugo nuevamente. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se re-suspendió en *buffer* lisis con el agregado de 0,5 % de tritón X-100. Por último, se realizaron dos lavados con agua bidestilada y el *pellet* se re-suspendió en *buffer* de lisis desnaturizante (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, β-mercaptoetanol 20 mM, Urea 6M, pH = 8). Se centrifugó a 35000 x g 30 min a 25 °C y el sobrenadante se pasó a través de un filtro de 0,45 μm. Luego, se vertió en columnas plásticas sobre 2 ml de la matriz de Ni<sup>2+</sup>-NTA agarosa. La matriz previamente fue equilibrada con el *buffer* de lisis desnaturizante con el agregado de 10 mM de imidazol. Después de 1 h de incubación a 25 °C, las proteínas fueron eluidas de las columnas con 10 ml de *buffer* de lisis desnaturizante con el agregado de 200 mM de imidazol.

Se determinó la concentración de las proteínas purificadas por medición de la absorbancia a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar teórico 19075 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> para SRS2 y 27680 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> para MIC1. Las proteínas se llevaron a la concentración de 1 mg/ml por dilución con *buffer* A y luego se dializaron en *buffer* A a 4 °C. La pureza de las proteínas se evaluó por electroforesis en un SDS-PAGE al 16 % y la concentración final se determinó por medición de la absorbancia a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar teórico para cada proteína.

### **3.2.6. Diseño Experimental**

#### **3.2.6.1. Formulación de la vacuna**

Se utilizaron las proteínas recombinantes purificadas y solubilizadas en *buffer* A. Las proteínas se llevaron a una concentración de 1 mg/ml y se almacenaron con 10 % de glicerol a -20 °C hasta su uso.

Para la formulación de la vacuna se utilizaron liposomas catiónicos. Estos se suplementaron con oligodesoxinucleótidos CpG no metilados (ODN-CpG), con una secuencia descrita para bovinos y enlaces fosfodiéster biocompatibles, como inmunoestimulantes. El adyuvante fue desarrollado en el Laboratorio de Inmunología

Experimental de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL (Reidel y col., 2019). Los liposomas se obtuvieron a partir de la mezcla de dipalmitoilfosfatidilcolina, colesterol y estearilamina en una relación molar 7:2:2 por el método de inyección etanólica. El agregado de las proteínas recombinantes a los liposomas se realizó adicionando gota a gota 100 µg de cada proteína por dosis. El agregado de ODN-CpG 15 µM diluido en *buffer* acetato 50 mM se realizó sobre las formulaciones pre-armadas previo a la inoculación de los animales.

### **3.2.6.2. Animales**

Se tomaron tres muestras de sangre separadas por 30 días de un grupo de 35 novillos de aproximadamente 3 años de edad para establecer la presencia o ausencia de anticuerpos anti-*N. caninum*. Los sueros se analizaron mediante IFI, ELISAC<sub>taq</sub> y ELISAC<sub>SAGIt</sub>. De estos, 20 animales resultaron seronegativos, 13 animales fueron seropositivos y 2 seroconvirtieron durante el monitoreo. Se seleccionaron 18 novillos seronegativos para formar parte del experimento, que fueron separados al azar en tres grupos de 6 novillos cada uno:

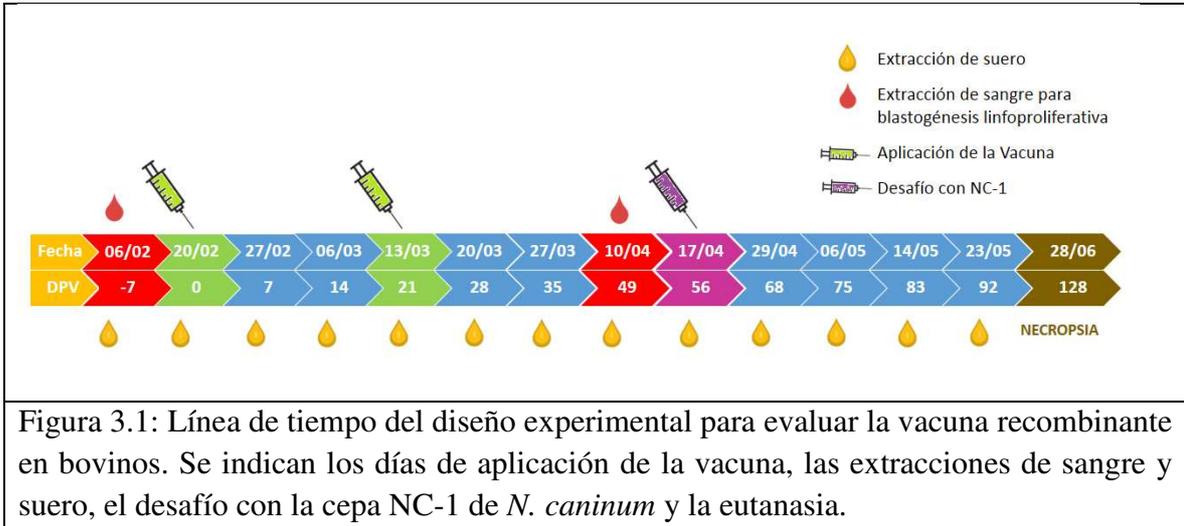
GRUPO A: fue inmunizado con la vacuna recombinante formulada con el adyuvante liposomal suplementado con ODN-CpG y las proteínas recombinantes.

GRUPO B: recibió el adyuvante liposomal suplementado con ODN-CpG.

GRUPO C: recibió PBS estéril.

### 3.2.6.3. Dosis y vía de inoculación

Los grupos experimentales se inocularon por la vía subcutánea en la zona subescapular con dos dosis de 2 ml de la solución indicada separadas por 21 días (Figura 3.1).



Se evaluó la respuesta granulomatosa local post-vacunal en el sitio de inyección mediante palpación 48 h después de la inmunización.

### 3.2.6.4. Desafío

Los animales de los tres grupos fueron desafiados por vía subcutánea con  $1.10^8$  taquizoitos 56 días después de primera inmunización (dpi). Se utilizaron taquizoitos de *N. caninum* cepa NC-1 mantenida *in vitro* en cultivo de células VERO. Los taquizoitos se cosecharon en forma mecánica cuando  $\geq 80$  % de las células estuvieron parasitadas, se contaron en una cámara de Neubauer y se diluyeron en PBS, para conformar 18 dosis de 2 ml cada una. Los animales fueron inoculados inmediatamente luego de la formulación del inóculo.

### **3.2.7. Evaluación de la respuesta inmune**

#### **3.2.7.1. Evaluación de la respuesta inmune humoral**

Para la evaluación de la respuesta inmune humoral, se extrajeron 15 ml de sangre sin anticoagulante para obtención de suero. Las extracciones se realizaron semanalmente mediante punción de la vena yugular en jeringas estériles de 20 ml. Luego se trasvasó la sangre a tubos de vidrio para la separación del suero. El suero se almacenó en alícuotas de 2 ml en tubos plásticos a -20 °C hasta su utilización.

La respuesta inmune humoral fue evaluada por ELISAI. Se estandarizó un ELISAI para cada proteína para la medición de IgG total y los isotipos IgG1 e IgG2.

Las concentraciones de antígeno, sueros y anticuerpo anti-IgG bovina conjugado con peroxidasa se estandarizaron para cada proteína individualmente. Para la estandarización del protocolo de ELISA se evaluaron distintos reactivos y condiciones de análisis. Así, las placas de ELISA Nunc (Nunc, Dinamarca), Costar (Corning, EE.UU.) y Polisorp (Nunc, Dinamarca) se tapizaron con 100 µl de una solución con el antígeno en concentraciones de 0,01, 0,03 y 0,05 µg/µl. Los antígenos se diluyeron en PBS y en *buffer coating* (NaHCO<sub>3</sub> 50 mM, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20 mM, pH= 9,6). Se utilizaron los sueros en diluciones de 1:2, 1:4 y 1:10. También se evaluaron distintas diluciones (1:1000, 1:2000 y 1:4000) del anticuerpo anti-IgG bovina conjugado con peroxidasa (Sigma-Aldrich). Todas las incubaciones se realizaron durante 60 minutos a 25 °C. Los lavados entre incubaciones se realizaron tres veces con PBS con 0,05 % y 0,1 % de tween 20 (PBS-T y PBS-0,1T). Los sueros y reactivos se diluyeron en PBS con 0,05 % y 0,1 % de tween 20 y 10 % de leche descremada (PBS-T-L y PBS-0,1T-L). Se utilizó como control positivo de las placas un pool formado por los sueros de los animales inoculados con la vacuna experimental en el día 28 dpv. El punto de corte se determinó como el promedio de la DO de los sueros en los días -7 y 0, más dos desvíos estándar. La reacción se reveló con ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la DO<sub>405nm</sub> se midió al llegar el control positivo a una DO = 1.

##### **3.2.7.1.1. Determinación de IgG total específica contra cada proteína recombinante**

Luego de la evaluación de las diferentes condiciones, se estableció el protocolo para la determinación de IgG total frente a cada proteína, detallado en la tabla 3.2.

Tabla 3.2. Protocolos de los ELISAI utilizados para detectar IgG contra las proteínas recombinantes de *N. caninum* inoculadas en los bovinos.

<b>Procedimiento</b>	<b>ELISAI SRS2</b>	<b>ELISAI MIC1</b>	<b>ELISAI MIC3</b>	<b>ELISAI GRA7</b>
<b>Placas</b>	NUNC	NUNC	NUNC	COSTAR
<b>Tapizado</b>	0,03 µg/µl en 100 µl de <i>buffer coating</i>			
<b>Incubación</b>	16 h a 4 °C			
<b>Lavado</b>	2 veces con PBS			
<b>Sueros</b>	diluidos 1:10 en PBS-T0,1-L	diluidos 1:4 en PBS-T0,1-L	diluidos 1:10 en PBS-T0,1-L	diluidos 1:4 en PBS-T0,1-L
<b>Incubación</b>	1 h a 25 °C			
<b>Lavado</b>	4 veces con PBS-T0,1			
<b>Ac anti-IgG bov conjugado con Px</b>	diluido 1:1000 en PBS-T0,1-L			
<b>Incubación</b>	1 h a 25 °C			
<b>Lavado</b>	4 veces con PBS-T0,1			
<b>Revelado</b>	ABTS/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a los 10 min.			

### 3.2.7.1.2. Determinación de los isotipos IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub>.

Se determinó la DO generada por las IgG de los isotipos IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub> en los días 28 dpv y 75 dpv. Los tiempos de análisis fueron seleccionados en base a los niveles de IgG total. La primera determinación fue 7 días después de la segunda dosis de la vacuna y la segunda 19 días luego del desafío.

Para cada proteína, se tapizó una placa COSTAR con 0,03 µg/µl del antígeno en 100 µl de *buffer coating*. Se incubaron durante 16 h a 4 °C. Cada placa se lavó dos veces con PBS, se bloqueó con PBS-L y luego de 1 h de incubación y tres lavados con PBS-0,1T se sembraron los sueros diluidos en PBS-0,1T-L, utilizando las diluciones detalladas en la tabla 3.2. Se incubó durante una hora y se lavó 4 veces con PBS-0,1T. Se agregó el

anticuerpo anti-IgG1 conjugado con peroxidasa o el anticuerpo anti-IgG2 no conjugado, seguido de una incubación con anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa en el caso del anticuerpo anti-IgG2. Se utilizó una dilución 1:1000 en PBS-0,1T-L para todos los anticuerpos secundarios y conjugados. Se incubó durante 1 h. Al cabo de este tiempo se lavaron las placas 4 veces con PBS-0,1T y se reveló la reacción con ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La DO<sub>405nm</sub> se midió cuando el control positivo para cada placa llegó a una DO = 1. Los resultados se expresaron en valores de DO.

### **3.2.7.1.3. Determinación de anticuerpos anti-*N.caninum* mediante ELISAc**

Para detectar IgG específicas contra diferentes proteínas de *N. caninum* se utilizó el ELISAc<sub>taq</sub> (ver 2.2.5.2.2.) y para detectar IgG originadas específicamente por el desafío se utilizó el ELISASAGIt (ver 2.2.5.2.3.)

### **3.2.7.2. Evaluación de la respuesta inmune celular**

Para la evaluación de la respuesta inmune celular se tomaron muestras de sangre con anticoagulante 15 días antes de la primera inmunización y 30 días después de la segunda inmunización. Se extrajeron 50 ml de sangre utilizando citrato como anticoagulante mediante punción de la vena yugular con jeringas estériles de 60 ml y la sangre luego se trasvasó en flujo laminar a tubos cónicos estériles de 50 ml.

La evaluación de la respuesta inmune celular se realizó a través de la prueba de blastogénesis linfoproliferativa con éster de succinimidilo diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) y de la medición de la producción de las citoquinas INF  $\gamma$  e IL-4 a través de un ELISA comercial específico para cada una.

#### **3.2.7.2.1. Obtención de células mononucleares (CMN) bovinas de sangre periférica**

Los tubos cónicos con 50 ml de sangre con 5 % de citrato se centrifugaron a 700 x g durante 20 min a 25 °C. Se colectó la capa de leucocitos y se vertió sobre 5 ml de PBS homogeneizando lentamente. Esta suspensión se colocó sobre 3 ml de Ficoll® Paque Plus (GE Healthcare, Sigma-Aldrich) y se centrifugó a 700 x g durante 30 min a 25 °C. El Ficoll® permitió la sedimentación de las células de mayor densidad, eritrocitos y células polimorfonucleares, en el fondo del tubo y la separación de las CMN que permanecieron en la interface con el plasma. Las CMN se absorbieron con pipeta Pasteur estéril y se incorporaron a 25 ml de PBS. Se homogeneizaron y se centrifugaron a 500 x g durante

15 min a 25 °C. Se eliminó el sobrenadante por volcado y se repitió el lavado con 25 ml de PBS y la centrifugación. El *pellet* formado por las células se re-suspendió en 1 ml de PBS y se mantuvo a 25 °C hasta su utilización. Se tomaron 20 µl de la suspensión de células y se mezclaron con 980 µl de PBS. Se tomaron 20 µl de la mezcla, se agregaron 20 µl de azul de tripán y las células se contaron en una cámara de Neubauer.

### **3.2.7.2.2. Blastogénesis linfoproliferativa**

Para los experimentos de blastogénesis linfoproliferativa las células CMN de cada animal fueron divididas en 9 grupos y sometidas a diferentes estímulos:

GRUPO 1: células no estimuladas.

GRUPO 2: células estimuladas con la proteína recombinante MSP5 de *Anaplasma marginale* (proteína recombinante no relacionada, expresada con una cola de histidinas) en concentración de 2 µg/ml.

GRUPO 3: células estimuladas con una mezcla de las 4 proteínas recombinantes de *N. caninum*, en concentración de 2 µg/ml de cada una.

GRUPO 4: células estimuladas con la proteína MIC1 en concentración de 2 µg/ml.

GRUPO 5: células estimuladas con la proteína MIC3 en concentración de 2 µg/ml.

GRUPO 6: células estimuladas con la proteína GRA7 en concentración de 2 µg/ml.

GRUPO 7: células estimuladas con la proteína SRS2 en concentración de 2 µg/ml.

GRUPO 8: células estimuladas con el mitógeno inespecífico concavalina A (Con A) 5 µg/ml (Sigma-Aldrich).

GRUPO 9: células estimuladas con un lisado proteico del virus de fiebre aftosa (VFA) en una concentración de 5 µg/ml.

Para la evaluación de la linfoproliferación se utilizó el marcador intracelular fluorescente CFSE, que etiqueta a las células proliferantes. El CFSE se une covalentemente a componentes citoplasmáticos, lo que resulta en la fluorescencia brillante y uniforme de las células. Tras la división celular, el colorante es distribuido en partes iguales entre las células hijas, lo que permite una resolución de hasta ocho ciclos de la división celular

mediante citometría de flujo, permitiendo la discriminación de las sucesivas rondas de división celular.

Para proceder a la marcación con CFSE, se ajustó la concentración de las células a  $2 \cdot 10^7$  cél/ml. Las células se diluyeron en PBS, se mezclaron con una solución de CFSE  $6 \mu\text{M}$  en partes iguales y se incubaron durante 30 min a  $37^\circ\text{C}$ . Luego de este tiempo, las células marcadas se lavaron 3 veces con PBS y se re-suspendieron en medio RPMI incompleto (medio RPMI-1640 de Sigma-Aldrich, gentamicina  $10 \mu\text{g/ml}$ , ampicilina  $200 \text{ UI/ml}$ , estreptomicina  $200 \mu\text{g/ml}$ ,  $\beta$  mercaptoetanol  $0,1 \text{ mM}$ , L-glutamina  $4 \text{ mM}$ ) ajustando la concentración a  $5 \cdot 10^6$  cél/ml. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos con fondo en U, colocando  $100 \mu\text{l}$  de la suspensión celular y  $100 \mu\text{l}$  del antígeno a evaluar diluido en medio RPMI completo 2X (medio RPMI incompleto con el agregado de  $20\%$  de suero fetal bovino) por pocillo. Las placas se incubaron durante 5 días en estufa a  $37^\circ\text{C}$  con  $5\%$  de  $\text{CO}_2$ . Al cabo de este tiempo se recolectó el sobrenadante de cada pocillo, se almacenó a  $-80^\circ\text{C}$  para realizar la medición de citoquinas, y las células se centrifugaron a  $1000 \times g$   $5 \text{ min}$  a  $4^\circ\text{C}$ . Se descartó el sobrenadante por volcado y se re-suspendieron las células en paraformaldehído  $0,2\%$ .

Las células se pasaron por un citómetro de flujo (FACScan, Becton Dickinson, NJ, EE.UU.) La longitud de onda de excitación del CFSE fue de  $488 \text{ nm}$  y la fluorescencia verde emitida se midió con un filtro de paso de banda de  $525 \text{ nm}$ . Los datos se analizaron con el *software* Flowing 2.5.1. Los resultados se expresaron como el porcentaje de células proliferantes con CFSE (% proliferación CFSE positiva) por pérdida de marca. Para comparar la proliferación celular entre los grupos, se utilizó el Índice de Proliferación (IP), teniendo en cuenta la proliferación basal determinada por las células cultivadas sin estímulo, con medio RPMI (grupo 1). Los valores de  $\text{IP} \geq 2,5$  se consideraron positivos.

$$IP = \frac{(\% \text{Prolif. Cél. Estimulada})}{(\% \text{Prolif. Cél. RPMI})}$$

### 3.2.7.2.3. Determinación de las citoquinas INF $\gamma$ e IL-4

Se determinó la concentración de las citoquinas INF  $\gamma$  e IL-4 en los sobrenadantes de los cultivos celulares de la prueba de blastogénesis linfoproliferativa con CFSE. Se evaluaron

los sobrenadantes de los cultivos de las células no estimuladas (Grupo 1), de las células estimuladas con Con A (Grupo 8) y de las estimuladas con cada una de las proteínas recombinantes de *N. caninum* (Grupos 4, 5, 6 y 7).

Se utilizaron los *kits* comerciales de ELISA Bovine IL-4 ELISA Reagent Kit (ThermoFisher Scientific) y Bovine Interferon- $\gamma$  Specific ELISA Assay Kit (Bio-Rad, CA, EE.UU.) siguiendo las indicaciones de los fabricantes.

La DO a 450 nm se midió a los 20 minutos de agregado el sustrato cromógeno. La concentración de citoquinas se midió por interpolación de los resultados de las muestras ( $DO_{450nmM}$ ) en una curva estándar, realizada en paralelo, con un control de la citoquina provisto por el proveedor. Para cada animal, la  $DO_{450nmM}$  se calculó como la  $DO_{450nm}$  del sobrenadante de cultivo de las células estimuladas menos la  $DO_{450nm}$  del sobrenadante de cultivo de las células no estimuladas

### **3.2.7.3. Evaluación de la protección de la vacuna frente a la infección persistente por *N. caninum***

La protección de la vacuna frente a la infección persistente por *N. caninum* se evaluó teniendo en cuenta la capacidad del parásito de enquistarse y permanecer latente en el tejido del sistema nervioso central (SNC).

Los animales se sacrificaron 128 dpv en el frigorífico Friar de Nelson, Santa Fe, según las prácticas regulatorias del establecimiento. Luego del sacrificio, los encéfalos se extrajeron y examinaron inmediatamente en busca de lesiones macroscópicas. Se refrigeraron hasta la toma de muestras para el estudio molecular.

#### **3.2.7.3.1. Estudio Molecular**

Para la extracción de ADN, se tomaron muestras de la corteza de los lóbulos frontal, parietal y occipital del encéfalo en un flujo laminar con material estéril. La extracción de ADN de las muestras de encéfalo se realizó por el método de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. Se midió la concentración de ADN luego de la extracción por espectrofotometría a 260 nm con un Nanodrop™ 2000 (ThermoFisher Scientific). Las muestras fueron diluidas a una concentración final de 60 ng/ $\mu$ l.

El ADN del parásito se detectó con una PCR semi-anidada que amplifica la región del espaciador transcrito interno (ITS1). Se utilizaron los *primers* y el protocolo descrito por Yamage y col. (1996) detallados en la tabla 3.3. En la primera amplificación se utilizaron los *primers* NP6-R y NP21-F y en la segunda amplificación los *primers* NP6-R y NP7-F. Como controles positivos se utilizó ADN extraído de un feto abortado por *N. caninum* y ADN extraído de un cultivo de células VERO infectadas con la cepa NC-1. Como controles negativos se utilizó ADN de *Babesia bovis* y agua. Las muestras se consideraron positivas cuando mostraron en la primera vuelta una banda de amplificación de 328 pb o en la segunda vuelta una banda de amplificación de 227 pb. Los productos de la amplificación fueron visualizados por electroforesis en un gel de agarosa 1 % teñido con bromuro de etidio.

Tabla 3.3. *Primers* utilizados para la identificación específica de *N. caninum* mediante PCR anidada (Yamage y col., 1996).

<i>Primer</i>	Ubicación en el ITS1	Secuencia 5'-3'
NP21-F	449-467	GTGCGTCCAATCCTGTAAC
NP6-R	758-776	CAGTCAACCTACGTCTTCT
NP7-F	550-568	GGGTGAACCGAGGGAGTTC

#### 3.2.7.4. Análisis estadístico

Los niveles de IgG totales frente a los cuatro antígenos recombinantes en los animales vacunados (Grupo A) se compararon con los de los animales inoculados con el adyuvante (Grupo B) y los animales inoculados con PBS (Grupo C). Se utilizó un **modelo lineal generalizado de mediciones repetidas con distribución gamma, considerando la distribución de la variable de respuesta (DO)**. Los niveles de **IgG1 e IgG2** se compararon entre los grupos con un **modelo lineal generalizado con distribución gamma**. El índice de proliferación de las células en la prueba de blastogénesis linfoproliferativa para cada antígeno evaluado se comparó **entre los grupos con un ANOVA para un factor**. Los niveles de INF  $\gamma$  e IL-4 se compararon para cada antígeno evaluado entre los grupos con

un **modelo lineal generalizado con distribución gamma**. Se utilizó el programa estadístico InfoStat Software Estadístico versión 2011 (Di Rienzo y col., 2011).

### 3.3. RESULTADOS

#### 3.3.1. Análisis bioinformático y clonación

Los aminoácidos que formaban parte del péptido señal y de los dominios transmembrana hidrofóbicos, predichos por los programas bioinformáticos consultados, se eliminaron de la secuencia de cada proteína. Los fragmentos clonados de cada gen se detallan en la tabla 3.4.

Tabla 3.4. Nucleótidos, aminoácidos y pesos moleculares de los fragmentos clonados.

Gen	Acceso GenBank Nro.	Nucleótidos	Aminoácidos	Peso Molecular (kDa)
NcSRS2	JQ410454.1	172 a 735	54 a 242	21,5
NcGRA7	JQ410455.1	201 a 635	29 a 138	13,9
NcMIC1	AF421187.1	58 a 537	20 a 179	23,9
NcMIC3	XM_003880575.1	417 a 1086	140 a 350	24,8

#### 3.3.2. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes

Las proteínas GRA7 y MIC3 se purificaron a partir de las fracciones solubles de los cultivos de *E. coli* con un rendimiento luego de la purificación de 20 mg/l y 5 mg/l de cultivo respectivamente. Las proteínas SRS2 y MIC1 se purificaron en condiciones desnaturalizantes a partir de los cuerpos de inclusión formados por las proteínas insolubles en los cultivos de *E. coli*. El rendimiento luego de la purificación y plegado de las proteínas fue de 10 mg/l y 7 mg/l de cultivo respectivamente.

La pureza observada en el gel de SDS-PAGE fue mayor al 90 % (Figura 3.2). Las bandas principales observadas en el gel corresponden al PM de las proteínas en su estado monomérico, considerando que el error del SDS-PAGE para la determinación del PM de las proteínas varía entre el 5-20 % y el mayor error se produce en proteínas de bajo PM. Además, en las proteínas MIC1, MIC3 Y SRS2 se observan bandas ubicadas a la altura del PM correspondiente a sus dímeros y trímeros.

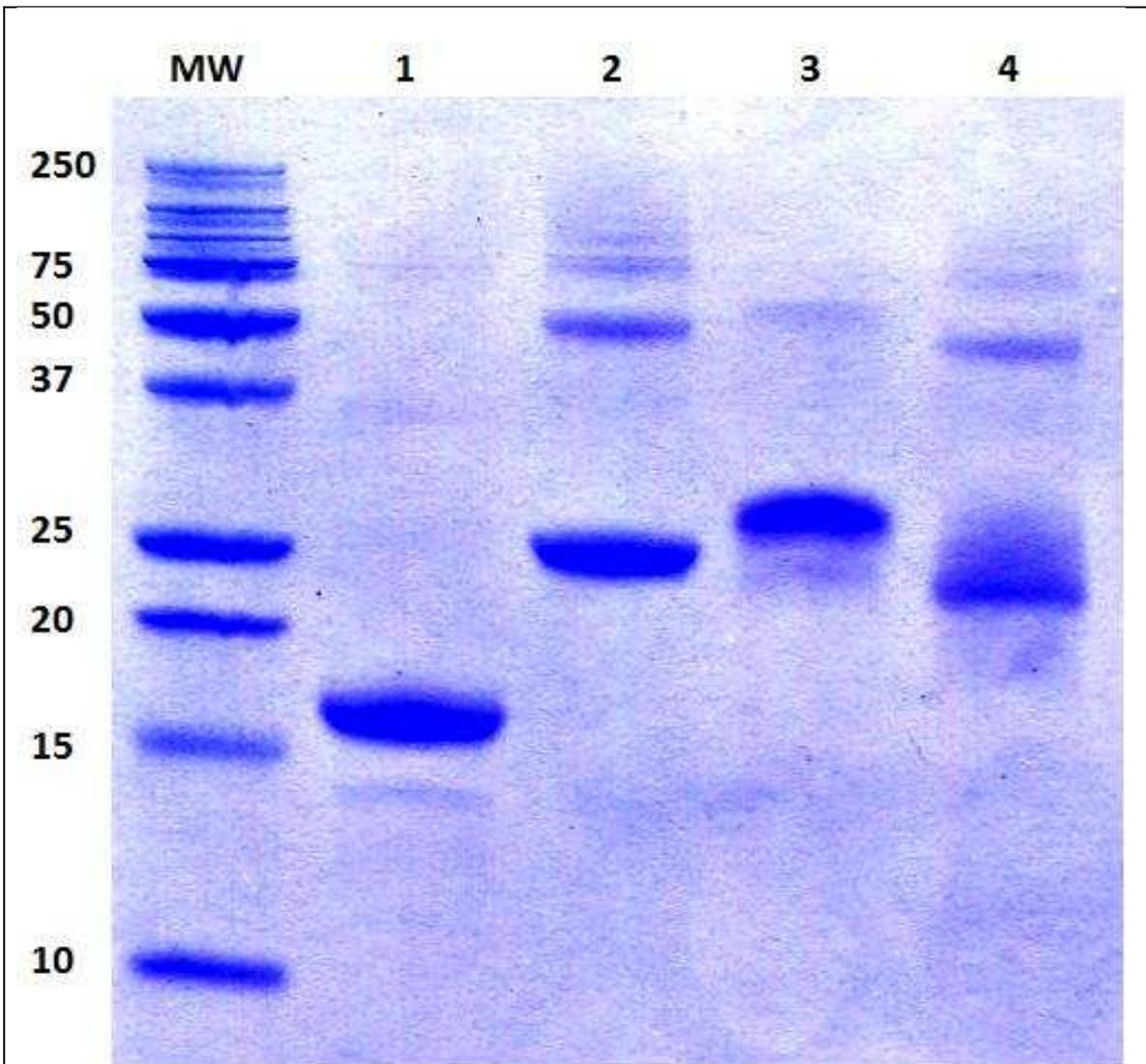


Figura 3.2: SDS-PAGE de las proteínas evaluadas como inmunógenos en bovinos luego de la purificación y diálisis. Las proteínas se tiñeron con *Coomassie Brilliant Blue R-250* (Bio-Rad Laboratories Inc.). MW: Marcador de peso molecular *Precision Plus Protein™ All Blue* (Bio-Rad Laboratories Inc.); línea 1: proteína GRA7; línea 2: proteína MIC1; línea 3: proteína MIC3; línea 4: proteína SRS2. Las bandas gruesas corresponden a los monómeros de las proteínas y bandas finas a los dímeros y trímeros de MIC1, MIC3 y SRS2.

### 3.3.3. Inmunización

La formulación compuesta por el adyuvante, las proteínas y los ODN-CpG permaneció homogénea desde su elaboración hasta la inoculación en los animales. Luego de la inmunización, ningún animal presentó reacción granulomatosa local.

### 3.3.4. Evaluación de la respuesta inmune humoral

#### 3.3.4.1. IgG total contra las proteínas recombinantes

La  $DO_{405nm}$  a la cual se estableció el punto de corte en el ELISAi de cada proteína fue: para MIC1 = 0,265, para MIC3 = 0,492, para SRS2 = 0,185 y para GRA7 = 0,728. La respuesta inmune humoral de anticuerpos IgG contra las cuatro proteínas recombinantes en los novillos incluidos en el experimento se muestra en la figura 3.3. **Luego de la primera y segunda inmunización, hubo un aumento significativo en los niveles de IgG de los animales del grupo A frente a las proteínas MIC1, MIC3 y SRS2 en comparación con los animales de los grupos B y C ( $P < 0,001$ ) (Figura 3.3A, B y D). No se observó un aumento de los niveles de IgG frente a la proteína GRA7 sobre el punto de corte en los animales vacunados (Figura 3.3C). De todos modos, la diferencia de los niveles de IgG con los grupos B y C fue significativa ( $P = 0,005$ ). Luego del desafío, se observó un incremento en los niveles de IgG contra las proteínas MIC1 y MIC3 sólo en los animales vacunados.** En los animales de los grupos B y C no se observó modificación de los niveles de IgG frente a estas dos proteínas (Figura 3.3A y B). La diferencia en los niveles de IgG entre los animales vacunados y los grupos control fue significativa ( $P < 0,001$ ). En cambio, frente a la proteína SRS2, después del desafío se observó un aumento en los niveles de IgG de los animales de los tres grupos (Figura 3.3D). Igualmente, hubo diferencias significativas entre los grupos, con un aumento mayor de los niveles de IgG frente a SRS2 en los animales vacunados ( $P < 0,001$ ). Frente a la proteína GRA7 se observó un leve aumento de los niveles de IgG en los animales vacunados sobre el punto de corte, dos semanas luego del desafío (Figura 3.3C). La diferencia en los niveles de IgG contra GRA7 entre el grupo A y los grupos B y C fueron significativas ( $P < 0,001$ ).

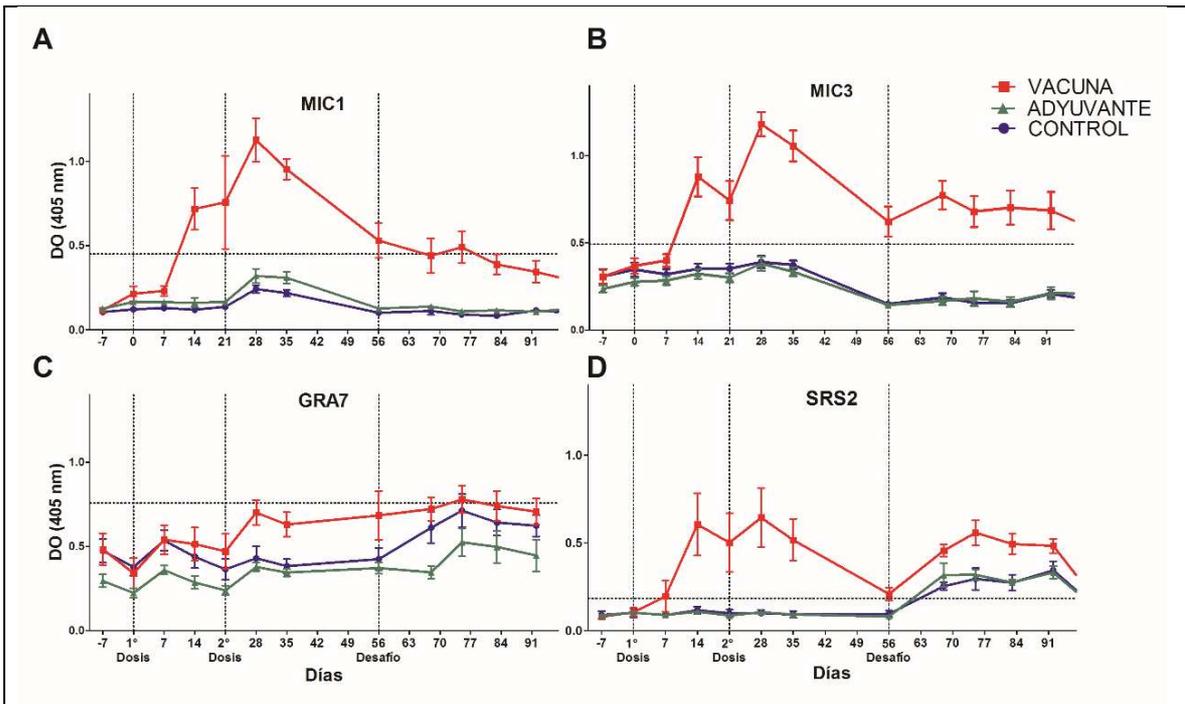


Figura 3.3: Respuesta de anticuerpos IgG de los tres grupos de animales luego de las inmunizaciones y el desafío experimental, medidos para cada proteína recombinante. A: niveles de IgG frente a MIC1. B: niveles de IgG frente a MIC3. C: niveles de IgG frente a GRA7. D: niveles de IgG frente a SRS2.

### 3.3.4.2. Isotipos IgG1 e IgG2 inducidos

Luego de la segunda inmunización y luego del desafío, los niveles de IgG1 contra las 4 proteínas recombinantes fueron significativamente mayores en los animales del grupo A que en los animales de los grupos B y C ( $P < 0,05$ ) (Figura 3.4). Los niveles de IgG2 contra las proteínas MIC1, MIC3 y SRS2 en los animales del grupo A luego de la segunda inmunización fueron significativamente mayores que en los animales de los grupos B y C ( $P < 0,05$ ). Esta diferencia fue observable luego del desafío frente a las proteínas MIC1 y SRS2 (Figura 3.5A y D). Frente a la proteína MIC3, luego del desafío hubo un aumento de los niveles de IgG2 en los animales vacunados y en los inoculados con el adyuvante (Figura 3.5B). No se observaron diferencias entre los grupos en los niveles de IgG2 contra la proteína GRA7 luego de la segunda inmunización ni luego del desafío (Figura 3.5C).

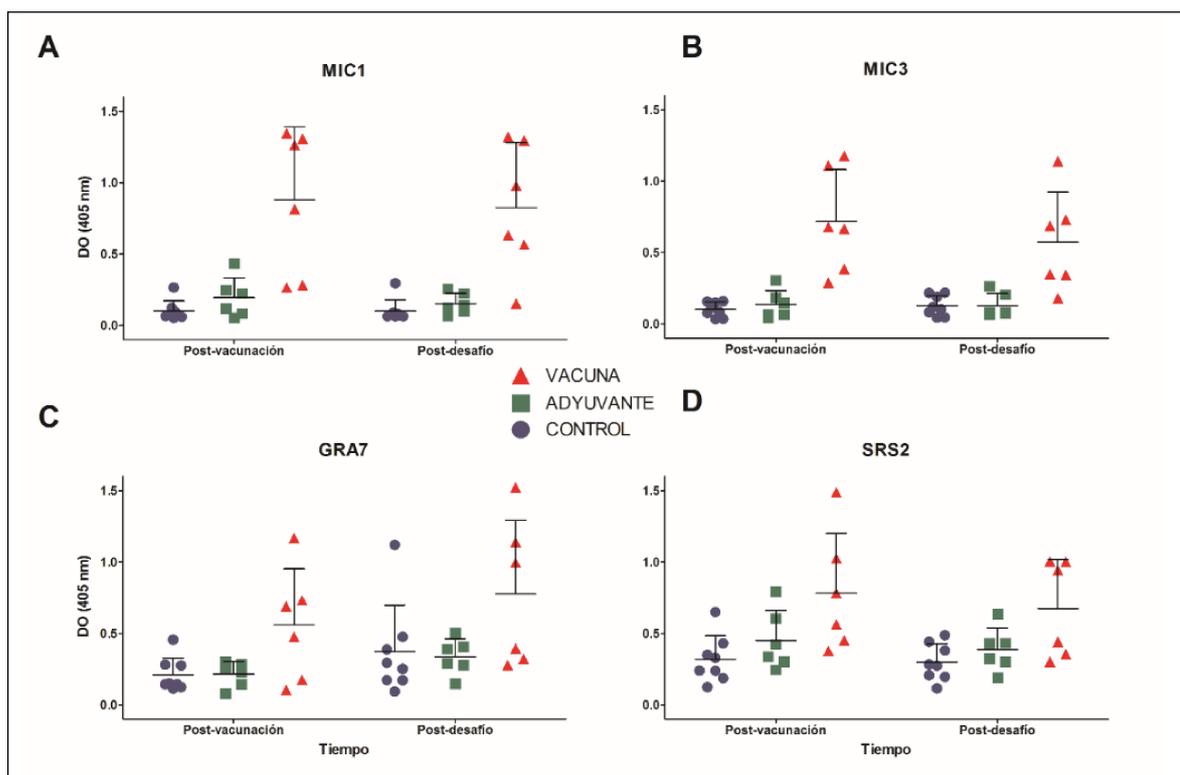


Figura 3.4: Respuesta de anticuerpos del isotipo IgG1 en los tres grupos experimentales luego de las inmunizaciones (28 dpv) y luego de la inoculación experimental (75 dpv), frente a cada proteína recombinante. A: niveles de IgG1 frente a MIC1. B: niveles de IgG1 frente a MIC3. C: niveles de IgG1 frente a GRA7. D: niveles de IgG1 frente a SRS2.

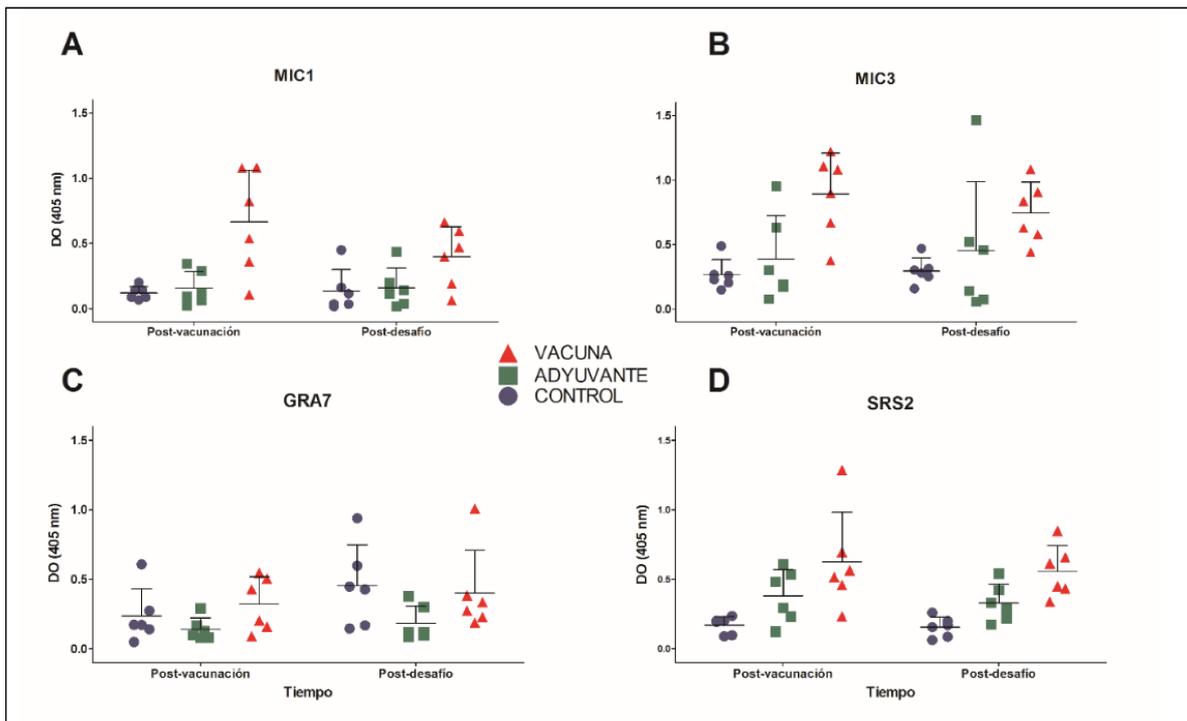
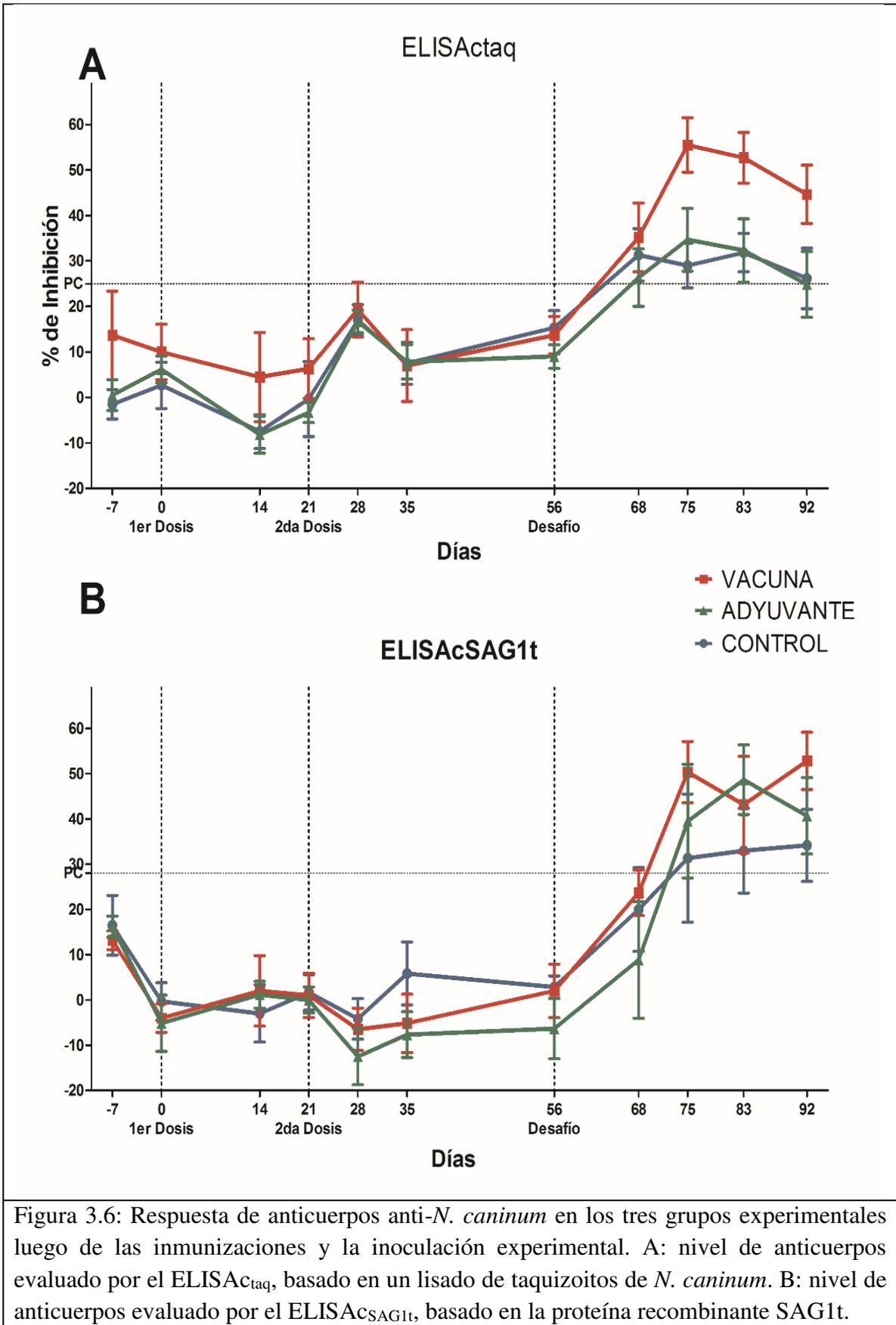


Figura 3.5: Respuesta de anticuerpos del isotipo IgG2 en los tres grupos experimentales luego de las inmunizaciones (28 dpv) y luego de la inoculación experimental (75 dpv), frente a cada proteína recombinante. A: niveles de IgG2 frente a MIC1. B: niveles de IgG2 frente a MIC3. C: niveles de IgG2 frente a GRA7. D: niveles de IgG2 frente a SRS2.

### 3.3.4.3. ELISAc para la determinación de anticuerpos anti-*N.caninum*

En todos los animales de los tres grupos, luego del plan de inmunización, no se detectaron anticuerpos anti-proteínas presentes en el lisado de taquizoitos ni anti-SAG1, medidos por ELISAc<sub>taq</sub> y ELISAc<sub>SAG1t</sub>, respectivamente. Los %I para todos los animales se mantuvieron debajo del punto de corte en ambas pruebas. **Luego del desafío con taquizoitos de *N. caninum*, se detectó un incremento de los anticuerpos con ambas pruebas (Figura 3.6).** Los %I aumentaron sobre el punto de corte en la primera semana post-desafío al evaluar los sueros con el ELISAc<sub>taq</sub>. **Los %I fueron mayores en los animales vacunados que los animales de los grupos controles** (Figura 3.6A). Este aumento se observó en la segunda semana post-desafío al evaluar los sueros con el ELISAc<sub>SAG1t</sub>. En esta prueba, **el grupo de animales vacunados y el grupo de animales inoculados con el adyuvante demostró %I similares, y superiores a los de los animales del grupo inoculado con PBS** (Figura 3.6B).



### 3.3.5. Evaluación de la respuesta inmune celular

#### 3.3.5.1. Ensayo de blastogénesis linfoproliferativa

El mitógeno inespecífico Con A estimuló las CMN en el cultivo. Como resultado de esta estimulación se observaron  $IP > 2,5$  en los pocillos de células estimuladas con el mitógeno (Figura 3.7H). Las células estimuladas con el lisado proteico del virus de fiebre aftosa (VFA) también mostraron  $IP > 2,5$  (Figura 3.7G). No hubo respuesta al estímulo con las diferentes proteínas recombinantes de *N. caninum*, con  $IP < 2,5$  en todos los grupos (Figura 3.7A, B, C y D), ni con una mezcla de las cuatro proteínas recombinantes juntas, con  $IP < 2,5$  (Figura 3.7E). Las células estimuladas con la proteína de *A. marginale* MSP5 tampoco respondieron al estímulo (Figura 3.7F), el IP fue  $< 2,5$  (Figura 3.7). Frente a los distintos estímulos, en ningún caso se observaron diferencias significativas entre los grupos de animales vacunados y controles ( $P > 0,05$ ).

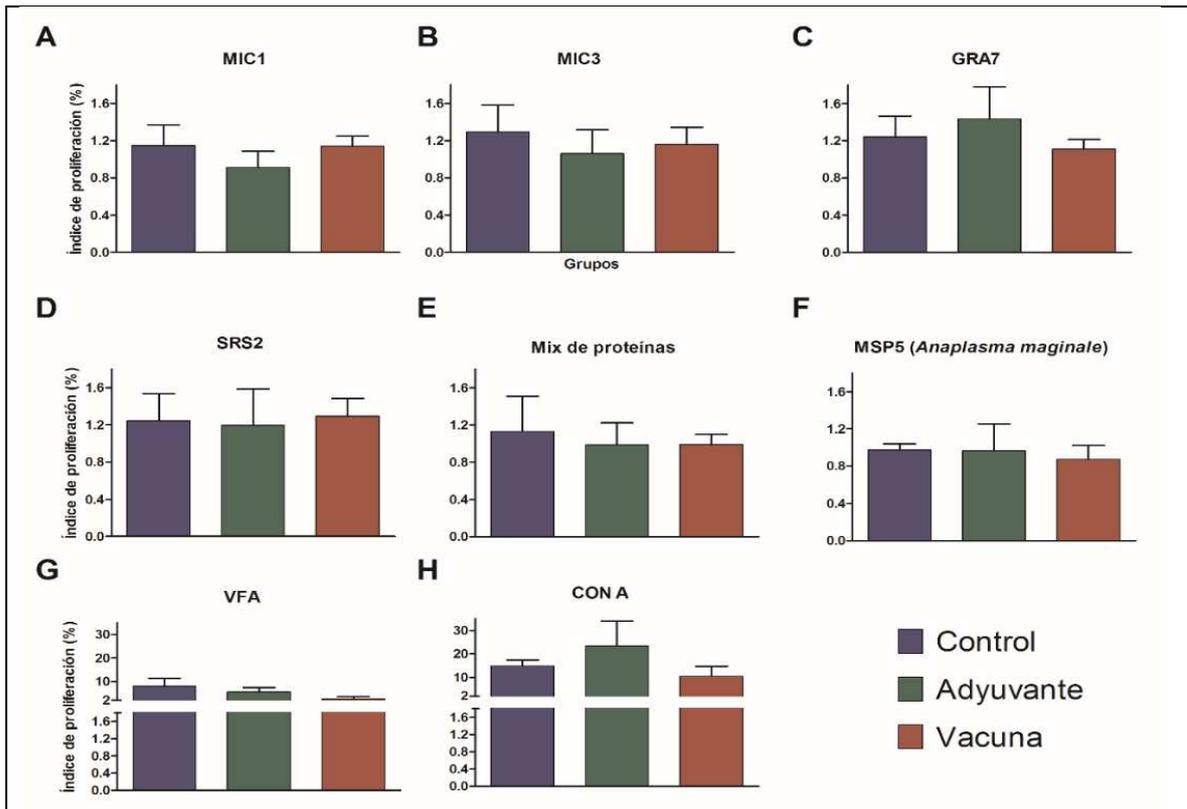
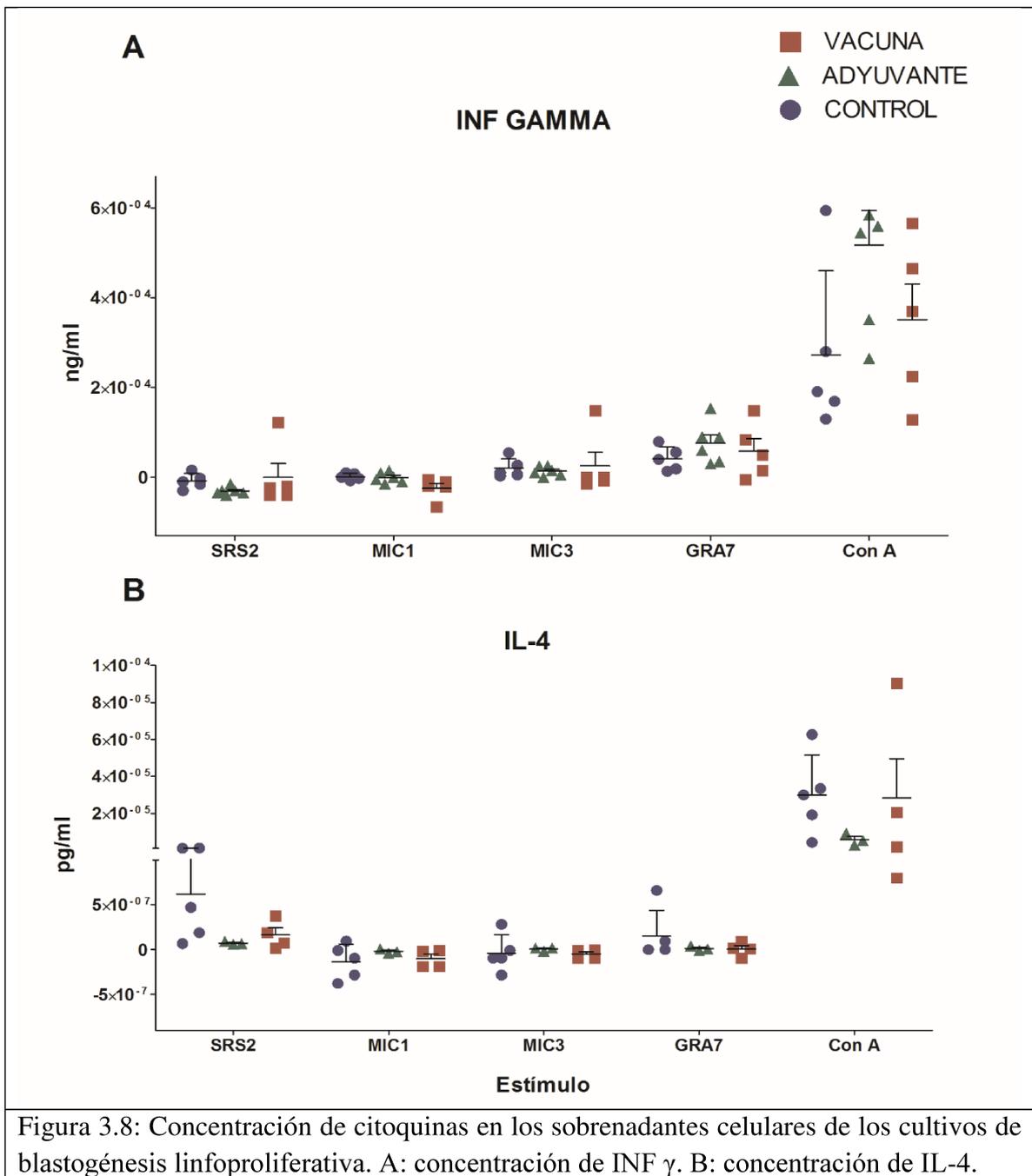


Figura 3.7: Índices de proliferación (IP) de las células mononucleares (CMN) en el ensayo de blastogénesis linfoproliferativa, luego de ser estimuladas. A: CMN estimuladas con MIC1. B: CMN estimuladas con MIC3. C: CMN estimuladas con GRA7. D: CMN estimuladas con SRS2. E: CMN estimuladas con una mezcla de las 4 proteínas recombinantes de *N. caninum*. F: CMN estimuladas con la proteína MSP5 de *Anaplasma marginale* (no relacionada). G: CMN estimuladas con partículas del virus de la fiebre aftosa. H: CMN estimuladas con el mitógeno inespecífico Con A. Un  $IP \geq 2,5$  se considera como proliferación positiva frente al estímulo.

### 3.3.5.2. Citoquinas INF $\gamma$ e IL-4

No se detectaron niveles de citoquinas INF  $\gamma$  ni IL-4 en los sobrenadantes de las células estimuladas con las proteínas recombinantes de *N. caninum*. Las células estimuladas con Con A mostraron niveles de citoquinas mayores que las células estimuladas con las proteínas recombinantes, pero aun así se mantuvieron por debajo de los  $4 \cdot 10^{-4}$  ng/ $\mu$ l para INF  $\gamma$  (Figura 3.8A) y por debajo de  $1 \cdot 10^{-5}$  pg/ $\mu$ l para IL-4 (Figura 3.8B).



### 3.3.6. Evaluación de la protección de la vacuna frente a la infección persistente

#### 3.3.6.1. Estudio Molecular

Las muestras de encéfalo de todos los novillos resultaron negativas en la PCR semi-anidada (Figura 3.9). No se observaron bandas de amplificación en los controles negativos. En la primera vuelta de amplificación se detectó una banda de 328 pb en el control positivo de la muestra de ADN extraído de taquizoitos en cultivo (Figura 3.9A). En la segunda vuelta de amplificación, se detectó una banda de 227 pb en ambos controles positivos (Figura 3.9B).

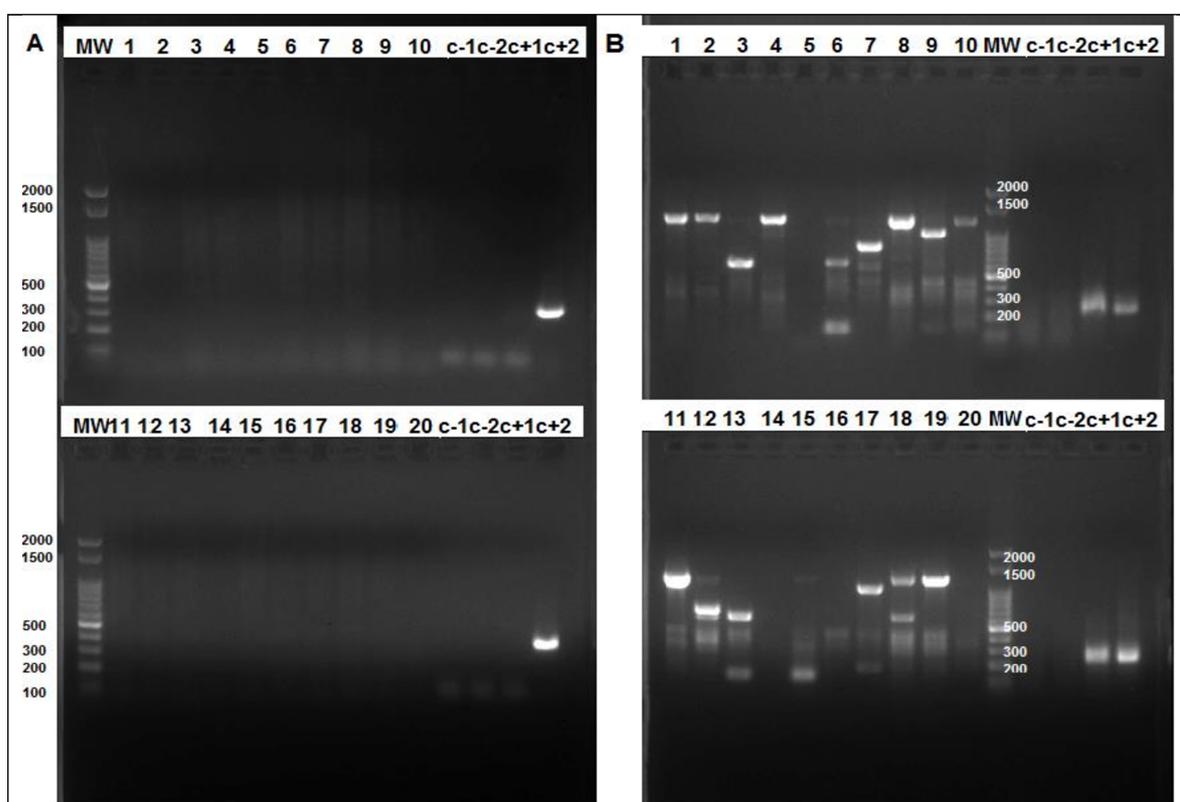


Figura 3.9: Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio 1 %, que muestra los resultados de la PCR anidada para detección de ADN de *N. caninum* en los cerebros de los novillos. A: primera vuelta de PCR. El resultado positivo presenta una banda de 328 pb. B: segunda vuelta de PCR. Los resultados positivos presentan una banda de 227 pb. MW: Marcador de peso molecular qLadder 100 pb de precisión (PB-L productos Bio-Lógicos®); líneas 1 a 6: muestras de cerebros de los novillos inoculados con la vacuna; líneas 7 a 12: muestras de cerebros de los novillos inoculados con el adyuvante; líneas 13 a 20: muestras de cerebros de los novillos inoculados con PBS. C-1: muestra de agua bidestilada. C-2: muestra de ADN de *B. bovis* en cultivo. C+1: muestra de cerebro de feto abortado por *N. caninum*. C+2: muestra de ADN de *N. caninum* en cultivo.

### 3.4. DISCUSIÓN

El presente trabajo se diseñó para evaluar la respuesta inmune y el grado de protección generado por la inmunización de bovinos con una vacuna formulada con 4 proteínas recombinantes, MIC1, MIC3, GRA7 y SRS2, y liposomas suplementados con ODN-CpG como adyuvante. Los resultados obtenidos solo fueron concluyentes para la respuesta inmune humoral, que fue detectable frente a las proteínas MIC1, MIC3 y SRS2, pero no frente a la proteína GRA7. Los resultados de los estudios realizados para medir la respuesta inmune celular y la protección frente al desafío no fueron satisfactorios, pero sientan las bases para el diseño de futuros experimentos.

MIC1 y MIC3 no son proteínas inmunodominantes de *N. caninum* (Hemphill y col., 1999), y no se detectan anticuerpos circulantes frente a estas proteínas en animales infectados naturalmente. Las proteínas recombinantes desarrolladas, encapsuladas en los liposomas, generaron una respuesta inmune humoral detectable. Luego del desafío con taquizoitos vivos se observó, sólo en los animales vacunados, un leve incremento en los niveles de IgG total medidos. Esto indica que los linfocitos de memoria generados luego del plan de inmunización por MIC1 y MIC3 recombinantes son activados frente al estímulo con los taquizoitos vivos y que las proteínas recombinantes son inmunológicamente similares a las presentes naturalmente en los taquizoitos. La proteína recombinante MIC1 fue evaluada previamente por Alaeddine y col. (2005), que obtuvieron un aumento en el nivel de IgG y protección frente a la infección aguda. Cannas y col. (2003) utilizaron la proteína recombinante MIC3 en su largo total para inocular ratones, que luego fueron desafiados. Obtuvieron protección frente a la enfermedad aguda en el 75 % de los animales vacunados. En dos experimentos, los antígenos MIC1, MIC3 y ROP2 fueron combinados para elaborar una vacuna. Debache y col. (2009) formularon una vacuna con los tres antígenos expresados como proteínas recombinantes y evaluaron su capacidad protectora frente a la enfermedad aguda y la transmisión vertical en ratones. La vacuna protegió al 100 % de los ratones frente a la enfermedad aguda y obtuvieron una sobrevivencia del 35 % de las crías, que tuvieron una menor carga parasitaria en los tejidos del SNC que las crías de los controles. Monney y col. (2011) desarrollaron un antígeno quimérico con los dominios inmunogénicos de los tres antígenos. Evaluaron su capacidad de proteger a los ratones vacunados frente a un desafío y obtuvieron protección frente a la enfermedad aguda en el 100 % de los animales. A diferencia de lo observado en ratones, en el presente trabajo, realizado en bovinos, la protección frente a la infección

no pudo ser evaluada ya que ninguno de los animales resultó positivo al análisis molecular.

La proteína recombinante SRS2 estimuló la respuesta inmune humoral luego de las dos inmunizaciones en los animales del grupo que recibió la vacuna. Luego del desafío, los niveles de IgG total aumentaron en los animales de todos los grupos, esto se debe a que SRS2 es una proteína inmunodominante de la superficie del parásito (Hemphill y col., 1999). En los animales naturalmente infectados con *N. caninum* se detectan anticuerpos contra SRS2 (Schaes y col., 2000; Borsuk y col., 2011).

El fragmento de la proteína GRA7 inoculado en este trabajo no generó respuesta inmune humoral en los bovinos. Luego del desafío, tampoco hubo respuesta inmune detectable con el ELISAI basado en la proteína recombinante. Hecker y col. (2014), luego de inmunizar vaquillonas gestantes con un inmunógeno formado por SAG1, HSP20 y GRA7 detectaron IgG total anti-GRA7. En su trabajo la proteína recombinante GRA7 de longitud completa fue expresada en la fracción soluble. La diferencia en la inmunogenicidad con la proteína generada en el presente trabajo, podría ser el fragmento de la proteína GRA7 seleccionado para su expresión. Abdelbaky y col. (2018) evaluaron 5 fragmentos de GRA7 a través de ELISAI con sueros de ratones, perros y bovinos infectados. Utilizaron los fragmentos GRA7m (27–217), GRA7m3 (27–160), GRA7m4 (27–135), GRA7m5 (161–190) y GRA7m6 (188–217). El fragmento GRA7m4 es similar al que se utilizó en el presente trabajo (residuos 29-138). Los fragmentos, GRA7m, GRA7m3 y GRA7m4, fueron reconocidos por los sueros de perros y ratones infectados. Los sueros de bovinos infectados sólo reconocieron el fragmento GRA7m. Si bien estos datos indican que la fracción inmunogénica de GRA7 para los bovinos involucra aminoácidos ubicados entre los residuos 138 y 217, estudios previos realizados por Álvarez-García y col. (2007) demostraron que el antígeno inmunodominante p17 corresponde a el fragmento de GRA7 ubicado inmediatamente después del péptido señal (residuos 28-44). El antígeno p17, purificado a partir de un extracto soluble de taquizoítos de *N. caninum*, se utilizó en un IB. Se analizaron 131 sueros de bovinos, incluidas muestras secuenciales de terneros infectados de forma natural y experimental y animales infectados naturalmente. Los sueros positivos reaccionaron específicamente en el IB con p17. Nishimura y col. (2013), cuando inmunizaron bovinos con la proteína recombinante GRA7, sin el péptido señal, fusionada a GST y encapsulada en liposomas, observaron producción de respuesta inmune humoral y celular con perfil Th1. Si bien la proteína

truncada GRA7 expresada en el presente trabajo tiene el epítoto inmunodominante p17, carece del extremo C-terminal y esto podría ser la causa de la falta de inmunogenicidad observada.

La sobreexpresión de proteínas recombinantes en *E. coli* conduce a la formación de agregados, llamados cuerpos de inclusión. La solubilidad de los antígenos recombinantes y el repliegado según su conformación nativa es un requisito para desarrollar una vacuna que reproduzca la infección natural. Para este propósito, los agregados de proteínas deben solubilizarse y replegarse, con el inconveniente adicional de que solo se recupera una pequeña fracción de la proteína inicial (Sing y Panda, 2005). Las proteínas recombinantes de longitud completa MIC1 y MIC3 fueron purificadas previamente por Debache y col. (2009) a partir de la fracción insoluble. La proteína completa GRA7 fue purificada en forma soluble por Hecker y col. (2014), y también se expresó y purificó fusionada a GST (Kefayat y col., 2014; Abdelbaky y col., 2018). El antígeno de superficie SRS2 en una versión truncada fue purificado previamente de forma insoluble por Borsuk y col. (2011). En el presente trabajo, las proteínas GRA7 y MIC3 truncadas se expresaron y purificaron de forma soluble y las proteínas MIC1 y SRS2 en forma insoluble, obteniendo cantidades moderadas (5-20 mg/l de cultivo) de las cuatro proteínas en forma pura. La migración electroforética de las proteínas en un SDS-PAGE permitió identificar en las proteínas MIC1, MIC3 y SRS2 bandas que concordaron con las estructuras de monómeros, dímeros y trímeros. Esta observación puede ser explicada por la formación de puentes disulfuro intermoleculares que no han sido totalmente reducidos por el reductor utilizado ( $\beta$ -mercaptoetanol) previo a la corrida electroforética. La proteína GRA7 no posee cisteínas y solo se observa la banda correspondiente a la forma monomérica de la proteína.

Los niveles de inmunoglobulinas de los isotipos IgG1 e IgG2 fueron mayores en los animales vacunados que en los animales de los grupos control luego de las inmunizaciones y luego del desafío, a excepción de GRA7 que no estimuló la producción de IgG2. La IgG1 representa el 50 % de las IgG del suero en los bovinos, y es la inmunoglobulina predominante en la leche de las vacas. La expresión de IgG2 es hereditaria, por lo que su concentración varía mucho entre animales (Tizard, 2009d). La dispersión observada en los niveles de IgG2 entre los animales del grupo vacunado podría explicarse por la variabilidad en la respuesta a CpG-ODN que existe entre individuos en poblaciones exogámicas, lo que sugiere que la sensibilidad a CpG está controlada genéticamente (Kamstrup y col., 2001; Mena y col., 2003). La presencia de mayores

niveles de IgG2 en los animales vacunados, podría significar que hubo activación de una respuesta del tipo Th1 (Tizard, 2009e). Esta teoría se fortalecería con el resultado de la producción de INF  $\gamma$  en las CMN de los animales vacunados.

El ELISA basado en un lisado de taquizoitos, ELISAc<sub>taq</sub>, dio resultados negativos en las muestras de todos los animales de los 3 grupos que fueron tomadas antes del desafío. Luego del desafío, todos los animales se hicieron positivos. La ausencia de sueros positivos detectables por ELISAc<sub>taq</sub>, previo al desafío, podría significar que las proteínas recombinantes no son idénticas estructuralmente a las proteínas del taquizoito y por lo tanto, que los anticuerpos estimulados por la inmunización no reconocerían a las proteínas del lisado de *N. caninum*. Otra posibilidad es que la expresión de las proteínas MIC1, MIC3, GRA7 y SRS2 en los taquizoitos es baja y por lo tanto la cantidad de estas proteínas inmovilizadas en la placa de ELISA es insuficiente para detectar los anticuerpos circulantes. Sin embargo, cuando se comparan los niveles de anticuerpos (%I) se observa que luego del desafío, los animales vacunados tienen niveles significativamente más altos de anticuerpos que los animales de los grupos control. Esto evidencia una amplificación de la respuesta inmune humoral luego del desafío en los animales que estuvieron en contacto con los antígenos recombinantes. De la misma manera, el ELISA basado en SAG1t solo detectó un aumento en el nivel de anticuerpos luego del desafío. Esto es lo esperado, dado que la proteína SAG1 no formó parte del inmunógeno inoculado. Los animales inoculados con la vacuna y con el adyuvante demostraron un mayor %I que los animales inoculados con PBS, posiblemente por la acción inmunoestimulante de los ODN-CpG (Klinman, 2004).

La respuesta inmune celular, evaluada a través de la blastogénesis linfoproliferativa y la medición de las citoquinas en los sobrenadantes celulares, demostró que no hubo respuesta proliferativa ni producción de citoquinas por parte de las células en cultivo enfrentadas con los antígenos recombinantes. Una causa de la falta de respuesta al estímulo podría ser la muerte de las células en el cultivo. La blastogénesis linfoproliferativa es una técnica muy laboriosa, que debe ser realizada en el menor tiempo posible luego de la extracción de sangre con citrato. Las condiciones en que se realizó el ensayo, en las que la sangre se comenzó a procesar 12 h luego de la extracción, y las células estuvieron dispuestas en las placas de cultivo 24 h después de la extracción, pueden llevar a la muerte de las CMN. Por otro lado, la marcación con CFSE es tóxica y podría ser otra causa de muerte celular. Estas teorías se descartan al observar que hubo

proliferación frente al estímulo con Con A y frente al VFA. Otra causa de la falta de proliferación estaría en un error en la cantidad de proteína utilizada como estímulo por pocillo. Las células se estimularon con 2 µg/ml de cada proteína recombinante por pocillo. Esta cantidad podría ser demasiado baja y no llegar a estimular a las CMN en el cultivo o demasiado alta y resultar citotóxica. La falta de estímulo de las células del sistema inmune por falta de inmunogenicidad de la vacuna también puede llevar a no obtener respuesta celular al estímulo en el cultivo. Para que se desencadene una respuesta inmune celular efectiva, los liposomas cargando los antígenos y los ODN-CpG deben ser captados por las células dendríticas. Estas células cumplen un rol importante en la respuesta inmune innata e inducen una señal que activará otras CPA y estimulará la producción de IL-12 que activará a los LTh1 (Tizard, 2009f). En el caso de que estas células no hayan sido estimuladas luego de la aplicación de la vacuna, no habrá proliferación celular frente al estímulo en el ensayo de blastogénesis linfoproliferativa.

En el presente trabajo, se utilizó en la formulación un adyuvante basado en liposomas catiónicos en combinados con ODN-CpG como inmunoestimulante. La secuencia ODN utilizada es específica para los receptores tipo Toll 9 (TLR9) de las CPA de los bovinos y porcinos. Al estar encapsulados en los liposomas, los ODN-CpG están protegidos de la degradación por parte de las nucleasas, prolongando su vida media (Reidel y col., 2019). El uso de liposomas permite que todas las moléculas incluidas en la formulación sean capturadas por la misma CPA, con el consiguiente aumento de la respuesta inmune específica (Krishnamachari y Salem, 2009). Previamente, Reidel y col. (2019), utilizando este adyuvante, obtuvieron respuesta inmune humoral específica en terneras, frente a dos proteínas recombinantes de *Staphylococcus aureus*. En dicho ensayo, los niveles de IgG específicos aumentaron después de la segunda dosis de vacuna, sin un nuevo aumento después de la tercera dosis. Además, se evidenció respuesta inmune de memoria con una elevación en los niveles de IgG frente a las dos proteínas luego de un refuerzo a los 425 días de la primera dosis (Reidel y col., 2019). En el presente trabajo no se evaluó la respuesta inmune humoral de memoria, pero se obtuvo una respuesta humoral específica frente a tres de las cuatro proteínas incluidas en los liposomas luego de dos dosis de vacuna.

El desafío, realizado por la vía SC con  $1.10^8$  taquizoitos de la cepa NC-1 de *N. caninum* no logró la formación de quistes en los cerebros de los animales inoculados de los grupos control, por lo que ninguna conclusión puede sacarse con respecto al grupo vacunado, en

el que tampoco se observó la formación de quistes. Las PCR de las muestras de ADN extraídas de cerebro fueron negativas para todos los animales. En un trabajo previo, Mansilla y col. (2015) desafiaron por la vía IV con  $1.10^8$  taquizoitos de la cepa NC-1 a vaquillonas preñadas previamente vacunadas con la fracción soluble de un lisado de taquizoitos con lecitina de soja como adyuvante, y también a un grupo no vacunado como control. Luego del desafío no registraron abortos ninguno de los dos grupos experimentales. Hecker y col. (2014) también desafiaron por la vía IV con  $4,7.10^7$  taquizoitos de la cepa NC-1 a vaquillonas preñadas vacunadas con una vacuna formulada con las proteínas recombinantes SAG1, HSP20 y GRA7 y a un grupo control sin vacunar. Los animales fueron eutanasiados en el día 104 de gestación, y se observó que los fetos de ambos grupos experimentales permanecían viables. Por lo tanto, la falta de detección de parásitos en los cerebros de los novillos de este estudio, podría explicarse por la moderada virulencia de la cepa NC-1 (Dubey y col., 1988). Nishimura y col. (2013) desafiaron novillos por la vía IV con  $1.10^7$  taquizoitos de la cepa NC-1, previamente vacunados con el antígeno recombinante GRA7 encapsulado en liposomas. Encontraron quistes en los cerebros 85 días después del desafío. En el presente trabajo, los animales fueron inoculados por la vía SC y sacrificados 72 días después del desafío, por lo que tal vez el tiempo desde la inoculación experimental hasta la necropsia no fue suficiente para permitir la formación de quistes tisulares en los cerebros. De todos modos, la replicación rápida de los taquizoitos se limita *in vivo* a aproximadamente 20 divisiones (aproximadamente un período de 21 días) antes de que se diferencien en bradizoitos y formen quistes en los tejidos (Goodswen y col., 2013). La distinta vía de inoculación experimental también pudo haber modificado el tiempo hasta la formación de los quistes. Hecker y col. (2014) y Mansilla y col. (2015) realizaron el desafío por vía IV y no observaron abortos en los animales vacunados ni en los controles.

En conclusión, las proteínas MIC1, MIC3 y SRS2 de *N. caninum*, expresadas como proteínas recombinantes truncadas en *E. coli*, fueron capaces de estimular una respuesta inmune humoral detectable, con aumento de IgG total, IgG1 e IgG2. La proteína GRA7 truncada no fue inmunogénica. Los experimentos de evaluación de la inmunidad celular y la protección frente al desafío no fueron concluyentes por lo que deberán realizarse nuevamente, utilizando como punto de partida lo aprendido en el presente trabajo. La proteína GRA7 deberá expresarse en su versión completa y evaluar nuevamente su inmunogenicidad. En un próximo ensayo se deberán evaluar distintas concentraciones de

proteínas recombinantes como estímulo de las CMN en la blastogénesis linfoproliferativa y utilizar una cepa de *N. caninum* con mayor virulencia, como la cepa NC-Spain7 o NC-Liv para el desafío (Regidor-Cerrillo y col., 2010).

## DISCUSIÓN GENERAL

La contribución del presente trabajo a la disminución de las pérdidas económicas y los perjuicios reproductivos en los rodeos que causa *N. caninum* fue el desarrollo de un método de diagnóstico y la evaluación de inmunógenos que podrían ser útiles para desarrollar una vacuna preventiva. Ante la ausencia de vacunas y tratamientos, el diagnóstico serológico de la neosporosis en el rodeo, junto a técnicas de detección directa del parásito y las lesiones que provoca en los fetos abortados, es la única herramienta para conocer el estatus de infección y controlar la enfermedad.

EL ELISA<sub>CSAG1t</sub> desarrollado tuvo Se-D y Es-D adecuadas en sueros de bovinos y de pequeños rumiantes, similares a las obtenidas en los ELISA comerciales disponibles (Álvarez-García y col., 2013; Campero y col., 2018). En el ELISA<sub>CSAG1t</sub> el ruido de fondo es menor que en los ELISA<sub>i</sub>, ya que es el anticuerpo monoclonal el que genera el color de la reacción, al reconocer un epítopo específico. Esto permite utilizar los sueros en una dilución de 1:2, que lo hace más sensible que los ELISA<sub>i</sub>. Además, es más versátil ya que puede ser utilizado en distintas especies sin la necesidad de un anticuerpo anti-especie. La expresión del antígeno SAG1t en un cultivo de *E. coli* hace que su producción sea rápida, fácil y económica, prescindiendo del mantenimiento de un cultivo celular infectado con *N. caninum*. La posibilidad de conservar las placas de ELISA durante 12 meses sin modificaciones en la reactividad de SAG1t inmovilizada en ellas, permite que la técnica sea transferible en formato de *kits* a laboratorios de diagnóstico.

Las proteínas MIC1, MIC3 y SRS2 de *N. caninum*, expresadas como proteínas recombinantes truncadas en *E. coli*, fueron capaces de estimular una respuesta inmune humoral detectable, con aumento de IgG total, IgG1 e IgG2. La proteína GRA7 truncada no fue inmunogénica. Estos antígenos se evaluaron previamente en ratones, meriones y bovinos, obteniendo protección parcial frente a la infección aguda y la transmisión vertical del parásito (Cho y col., 2005; Debache y col., 2009; Nishikawa y col., 2013). En el presente trabajo los experimentos de evaluación de la inmunidad celular y la protección frente al desafío no fueron concluyentes por lo que deberán realizarse nuevamente, utilizando como punto de partida los resultados obtenidos. El adyuvante, compuesto por liposomas suplementados con ODN-CpG como inmunoestimulantes, fue capaz de estimular un perfil Th1 en trabajos previos (Klinman, 2004; Reidel y col., 2019). Este perfil de respuesta inmune celular es el necesario para la protección en la infección con

*N. caninum* (Innes y col., 2002). En el presente trabajo, la presencia de mayores niveles de IgG2 en los animales vacunados, sugiere que se estimuló dicho perfil (Tizard, 2009e), pero esta teoría debe ser reforzada por una nueva evaluación de la respuesta inmune celular y del desafío. En un próximo ensayo se deberán evaluar distintas concentraciones de proteínas recombinantes como estímulo de las CMN en la blastogénesis linfoproliferativa y utilizar una cepa de *N. caninum* con mayor virulencia, como la cepa NC-Spain7 o NC-Liv para el desafío (Regidor-Cerrillo y col., 2010).

## CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo indican que:

La Se-D y la Es-D obtenidas al evaluar el ELISAc<sub>SAGIt</sub> con sueros de bovinos y de pequeños rumiantes fue adecuada, similares a las obtenidas en los ELISA comerciales disponibles.

La concordancia del ELISAc<sub>SAGIt</sub> con IFI, ELISAc<sub>taq</sub> y ELISAc<sub>VMRD</sub> fue muy buena ( $\kappa > 0,81$ ) tanto en sueros de bovinos como de pequeños rumiantes.

El ELISAc<sub>SAGIt</sub> es útil para realizar el diagnóstico de neosporosis en bovinos y pequeños rumiantes, en conjunto con el conocimiento de la situación epidemiológica del rodeo o majada.

Las proteínas MIC1, MIC3 y SRS2 de *N. caninum*, expresadas como proteínas recombinantes truncadas en *E. coli* fueron capaces de estimular una respuesta inmune humoral detectable, con aumento de IgG total, IgG1 e IgG2.

La proteína GRA7 truncada no fue inmunogénica, por lo que deberá expresarse en su versión completa y evaluar nuevamente su inmunogenicidad.

Los experimentos de evaluación de la inmunidad celular no fueron concluyentes por lo que deberán realizarse nuevamente, utilizando como punto de partida lo aprendido en el presente trabajo. En un próximo ensayo se deberán evaluar distintas concentraciones de proteínas recombinantes como estímulo de las CMN en la blastogénesis linfoproliferativa.

El desafío, realizado con  $1.10^8$  taquizoitos de la cepa NC-1 de *N. caninum* no logró la formación de quistes en los cerebros de los animales inoculados de los grupos control, por lo que ninguna conclusión puede sacarse con respecto al grupo vacunado, en el que tampoco se observó la formación de quistes. En un próximo ensayo se deberá utilizar una cepa de *N. caninum* con mayor virulencia, como la cepa NC-Spain7 o NC-Liv para el desafío.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdelbaky HH, Fereig RM, Nishikawa Y. 2018. Identification of the antigenic region of *Neospora caninum* dense granule protein 7 using ELISA. *Parasitol Int.* 67(6): 675-678.
- Alaeddine F, Keller N, Leepin A, Hemphill A. 2005. Reduced infection and protection from clinical signs of cerebral neosporosis in c57bl/6 mice vaccinated with recombinant microneme antigen NcMIC1. *J Parasitol.* 91(3): 657-665. *J Parasitol.* 91(3): 657-665.
- Almagro-Armenteros JJ, Tsirigos KD, Sønderby CK, Petersen TN, Winther O, Brunak S, von-Heijne G, Nielsen H. *Nat Biotechnol.* 2019. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat Biotechnol.* 37(4):420-423.
- Almería S. 2013. *Neospora caninum* and Wildlife. *ISRN Parasitol.* Article ID 947347: 23 pp.
- Almería S y López Gatius F. 2015. Markers related to the diagnosis and to the risk of abortion in bovine neosporosis. *Res Vet Sci.* 100: 169-175.
- Almería S, Ferrer D, Pabón M, Castellá J, Mañas S. 2002. Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* 107(4): 287-294.
- Almería S, Nogareda C, Santolaria P, Garcia-Ispuerto I, Yániz JL, López-Gatius F. 2009. Specific anti-*Neospora caninum* IgG1 and IgG2 antibody responses during gestation in naturally infected cattle and their relationship with gamma interferon production. *Vet Immunol Immunopathol.* 130(1-2): 35-42.
- Almería S, Serrano B, Yániz JL, Darwich L, López-Gatius F. 2012. Cytokine gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from *Neospora caninum* naturally infected dams throughout gestation. *Vet Parasitol.* 183(3-4): 237-243.
- Altman DG. 1990. *Practical statistics for medical research.* Ed. Chapman and Hall/CRC. Londres. p. 367.
- Álvarez-García G, Collantes-Fernández E, Ortega-Mora LM. 2003. Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods in bovine

neosporosis. Vet Res. 34: 341-352.

Álvarez-García G, Pitarch A, Zaballos A, Fernández-García A, Gil C, Gómez-Bautista M, Aguado-Martínez A, Ortega-Mora LM. 2007. The NcGRA7 gene encodes the immunodominant 17 kDa antigen of *Neospora caninum*. Parasitology 134(1): 41-50.

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

Alves-Neto AF, Bandini LA, Nishi SM, Soares RM, Driemeier D, Antoniassi NAB, Schares G, Gennari SM. 2011. Viability of Sporulated Oocysts of *Neospora caninum* After Exposure to Different Physical and Chemical Treatments. J Parasitol. 97(1): 135-139.

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

Andrianarivo AG, Rowe JD, Barr BC, Anderson ML, Packham AE, Sverlow KW, Choromanski L, Loui C, Grace A, Conrad PA. 2000. A Polygen™-adjuvanted killed *Neospora caninum* tachyzoite preparation failed to prevent foetal infection in pregnant cattle following I.V./I.M. experimental tachyzoite challenge. Int J Parasitol. 30: 985-990.

Andrianarivo AG, Barr B, Anderson M, Rowe J, Packham A, Sverlow K, Conrad P. 2001. Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum*. Parasitol Res. 87(10): 817-825.

Arranz-Solís D, Benavides J, Regidor-Cerrillo J, Fuertes M, Ferré I, Ferreras C, Collantes-Fernández E, Hemphill A, Pérez V, Ortega-Mora LM. 2015. Influence of the gestational stage on the clinical course, lesional development and parasite distribution in experimental ovine neosporosis. Vet Res. 19: 1-13.

Barber JS, Holmdahl OJM, Owen MR, Guy F, Uggla A, Trees AJ. 1995. Characterisation

- of the first European isolate of *Neospora caninum* (Dubey, Carpenter, Speer, Topper and Uggla). *Parasitology* 111, 563–568.
- Barling KS, McNeill JW, Thompson JA, Paschal JC, McCollum FT, Craig TM, Adams LG. 2000. Association of serologic status for *Neospora caninum* with postweaning weight gain and carcass measurements in beef calves. *J Am Vet Med Assoc.* 217(9): 1356-1360.
- Barta JR y Dubey JP. 1992. Characterization of anti-*Neospora caninum* hyperimmune rabbit serum by Western blot analysis and immunoelectron microscopy. *Parasitol Res.* 78: 689-694.
- Barr BC, Anderson ML, Woods LW, Dubey JP, Conrad PA. 1992. *Neospora*-like protozoal infections associated with abortion in goats. *J Vet Diagn Invest.* 4(3): 365-367.
- Barr BC, Rowe JD, Sverlow KW, BonDurant RH, Ardans AA, Oliver MN, Conrad PA. 1994. Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. *J Vet Diagn Invest.* 6(2): 207-215.
- Bartels C, Wouda JW, Schukken YH. 1999. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology.* 52(2): 247-257.
- Bartels CJM, Van-Maanen C, Van-Der-Meulen AM, Dijkstra T, Wouda W. 2005. Evaluation of three enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Neospora caninum* in bulk milk. *Vet Parasitol.* 131(3-4): 235-246.
- Basso W, Venturini L, Venturini MC, Hill DE, Kwok OCH, Shen SK, Dubey JP. 2001. “First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog.” *J Parasitol.* 87(3): 612-618.
- Baszler TV, Long MT, McElwain TF, Mathison BA. 1999. Interferon-gamma and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. *Int J Parasitol.* 29(10): 1635-1646.
- Baszler TV, Adams S, Vander-Schalie J, Mathison BA, Kostovic M. 2001. Validation of

- a commercially available monoclonal antibody-based competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to *Neospora caninum* in cattle. J Clin Microbiol. 39: 3851-3857.
- Bengoia-Luoni A, Corigliano MG, Sánchez-López E, Albarracín RM, Legarralde A, Ganuza A, Clemente M, Sander VA. 2019. The potential of a DIVA-like recombinant vaccine composed by rNcSAG1 and rAtHsp81.2 against vertical transmission in a mouse model of congenital neosporosis. Acta Trop. 198: 105094.
- Bjerkas I y Dubey JP. 1991. Evidence that *Neospora caninum* is identical to the *Toxoplasma*-like parasite of Norwegian dogs. Acta Vet Scand, 32(3): 407-410.
- Bjerkas I, Mohn F, Presthus J. 1984. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. Z Parasitenkd. 70: 271-274.
- Bjerkas I, Jenkins MC, Dubey JP. 1994. Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis. Clin Diagn Lab Immunol. 1: 214-221.
- Björkman C, Holmdahl OJM, Uggla A. 1997. An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. Vet Parasitol. 68: 251-260.
- Borsuk S, Andreotti R, Pereira-Leivas-Leite F, da-Silva-Pinto L, Simionatto S, Pinho-Hartleben C, Goetze M, Oshiro LM, Cepa-Matos MF, Aires-Berne ME. 2011. Development of an indirect ELISA-NcSRS2 for detection of *Neospora caninum* antibodies in cattle. Vet Parasitol. 177(1-2): 33-38.
- Buxton D. 1993. Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. Parasitol Today. 9(9): 335-337.
- Buxton D, Maley SW, Thomson KM, Trees AJ, Innes EA. 1997. Experimental infection of non-pregnant and pregnant sheep with *Neospora caninum*. J Comp Pathol. 117(1): 1-16.
- Buxton D, Maley SW, Wright S, Thomson KM, Rae AG, Innes EA. 1998. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. J Comp Pathol. 118:

267-279.

Buxton D, McAllister MM, Dubey JP. 2002. The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends Parasitol.* 18(12): 546-552.

Callow LL, Mellors LT. 1966. A new vaccine for *Babesia argentina* infection prepared in splenectomised calves. *Aust Vet J.* 42: 464-465.

Callow LL, Mellors LT, McGregor W. 1979. Reduction in virulence of *Babesia bovis* due to rapid passage in splenectomized cattle. *Int. J. Parasitol.* 9: 333-338.

Campero LM, Minke L, Moré G, Rambeaud M, Bacigalupe D, Moore DP, Hecker Y, Campero CM, Schares G, Venturini MC. 2015a. Evaluation and comparison of serological methods for the detection of bovine neosporosis in Argentina. *Rev argent microbiol.* 47(4): 295-301.

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

Campero LM, Moreno-Gonzalo J, Venturini MC, Moré G, Dellarupe A, Rambeaud M, Echaide IE, Valentini BS, Campero CM, Moore DP, Cano DB, Fort M, Mota RA, Serrano-Martínez ME, Cruz-Vázquez C, Ortega-Mora LM, Álvarez-García G. 2018. An Ibero-American inter-laboratory trial to evaluate serological tests for the detection of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle. *Trop Anim Health Prod.* 50: 75-84.

Cannas A, Naguleswaran A, Müller N, Gottstein B, Hemphill A. 2003. Reduced cerebral infection of *Neospora caninum*-infected mice after vaccination with recombinant microneme protein NcMIC3 and ribi adjuvant. *J Parasitol.* 89(1): 44-50.

Chahan B, Gaturaga I, Huang X, Liao M, Fukumoto S, Hirata H, Nishikawa Y, Suzuki H, Sugimoto C, Nagasawa H, Fujisaki K, Igarashi I, Mikami T, Xuan X. 2003. Serodiagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle by enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant truncated NcSAG1. *Vet Parasitol.* 118: 117-185.

- Cho JH, Chung WS, Song KJ, Na BK, Kang SW, Song CY, Kim TS. 2005. "Protective efficacy of vaccination with *Neospora caninum* multiple recombinant antigens against experimental *Neospora caninum* Infection." *Kor J Parasitol.* 43(1): 19-25.
- Conrad PA, Sverlow K, Anderson M, Rowe J, Bondurant R, Tuter G, Breitmeyer R, Palmer C, Thurmond M, Ardans A, Dubey JP, Duhamel G, Barr B. 1993a. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *J Vet Diagn Invest.* 5: 572-578.
- Conrad PA, Barr BC, Sverlow KW, Anderson M, Daft B, Kinde H, Dubey JP, Munson, L, Ardans A. 1993b. In vitro isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine foetuses. *Parasitology.* 106, 239–249.
- Cosendey RII, de Oliveira FCR, Frazão-Teixeira E, de Souza GN, Brandão FZ, Ferreira AMR, Lilenbaum W. 2018. Seroprevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in sheep from the rapidly expanding flock of Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Parasitol Reg Stud Reports.* 14: 59-62.
- Costa KS, Santos SL, Uzêda RS, Pinheiro AM, Almeida MAO, Araújo FR, McAllister MM, Gondim LFP. 2008. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol.* 38(2): 157-159.
- Dalgliesh RJ, Callow LL, Mellors LT, McGregor W. 1981. Development of a highly infective *Babesia bigemina* vaccine of reduced virulence. *Aust. Vet. J.* 57: 8-11.
- Davison HC, Guy F, Trees AJ, Ryce C, Ellis JT, Otter A, Jeffrey M, Simpson VR, Holt JJ. 1999a. In vitro isolation of *Neospora caninum* from a stillborn calf in the UK. *Res Vet Sci.* 67(1): 103-105.
- Davison H, Otter A, Trees A. 1999b. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *Int J Parasitol.* 29(10): 1683-1689.
- Debache K, Alaeddine F, Guionaud C, Monney T, Müller J, Strohbusch M, Leib SL, Grandgirard D, Hemphill A. 2009. 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.* 39(12): 1373-1384.
- Díaz AA, Tomba E, Lennarson R, Richard R, Bagajewicz MJ, Harrison RG. 2010. Prediction of protein solubility in *Escherichia coli* using logistic regression. *Biotechnol Bioeng.* 105(2):374-83.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. 2011. InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL: <http://www.infostat.com.ar>. Último acceso 01-10-2019.
- Dubey JP. 1999. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Vet Parasitol.* 84(3-4): 349-367.
- Dubey JP y Lindsay DS. 1990. *Neospora caninum* induced abortion in sheep. *J Vet Diagn Invest.* 2: 230-233.
- Dubey JP y Lindsay DS. 1993. Neosporosis. *Parasitol Today.* 9(12), 452-458.
- Dubey JP y Schares G. 2011. Neosporosis in animals-The last five years. *Vet Parasitol.* 180(1-2): 90-108.
- Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Uggla A. 1988a. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 192(9): 1269-1285.
- Dubey JP, Hattel AL, Lindsay DS, Topper MJ. 1988b. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J Am Vet Med Assoc.* 193(10): 1259-1263.
- Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. 2007. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Rev.* 20(2): 323-367
- Echaide IE y Valentini BS. Comparación entre dos pruebas serológicas para la detección de anticuerpos contra *Neospora caninum*. XXI Reunión científico-técnica de la AAVLD. Villa General Belgrano, Córdoba, Argentina. 2002. p. I5
- Echaide IE, Valentini BS, Bazler TV. Detección de anticuerpos contra *Neospora caninum* en bovinos de la cuenca lechera de Santa Fe y Córdoba. Resultados preliminares. Memorias de XII Reunión Científico Técnica, Asociación Argentina de Veterinarios

- de Laboratorios de Diagnóstico, Mar del Plata, Argentina. 1998. p. 71.
- Echaide IE, Valentini BS, Mondino D, Torioni de Echaide SM. Neosporosis bovina: Análisis seroepidemiológico de un hato lechero mediante IFI y ELISA. XXI Reunión científico-técnica de la AAVLD. Villa General Belgrano, Córdoba, Argentina. 2002. p. PAR8
- Echaide IE, Aguirre NP, Thompson CS, Ferreira M, Pane J, Bugnon A, Signorini M, Valentini BS, Primo ME, Torioni de Echaide SM. Relevamiento sanitario en bovinos para carne de islas y costa de tres departamentos de la zona centro-litoral de Santa Fe. Primera etapa. XXI Reunión científico-técnica de la AAVLD. San Salvador de Jujuy, Argentina. 2016. p. E5.
- Fernandez-Robledo JA y Vasta G. 2010. Production of recombinant proteins from protozoan parasites. *Trends Parasitol.* 26(5): 244-254.
- Ferre I, Aduriz G, Del-Pozo I, Regidor-Cerrillo J, Atxaerandio R, Collantes-Fernández E, Hurtado A, Ugarte-Garagalza C, Ortega-Mora LM. 2005. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. *Theriogenology.* 63(5): 1504-1518.
- Figliuolo LPC, Kasai N, Ragozo AMA, De-Paula VSO, Dias RA, Souza SLP, Gennari SM. 2004. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol.* 123: 161-166.
- Fort M, Edelsten M, Maley S, Innes E. 2015. Seroepidemiological study of *Neospora caninum* in beef and dairy cattle in La Pampa, Argentina. *Acta Parasitol.* 60(2): 275-282.
- Frézard F. 1999. Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines. *Braz J Med Biol Res.* 32(2): 181-189.
- Georgiou G y Valax P. 1996. Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol.* 7(2): 190-197.
- Gondim LFP, McAllister MM, Pitt WC, Zemlicka DE. 2004. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol.* 34(2): 159-161.

- Gondim LFP, Mineo JR, Schares G. 2017. Importance of serological cross-reactivity among *Toxoplasma gondii*, *Hammondia* spp., *Neospora* spp., *Sarcocystis* spp. and *Besnoitia besnoiti*. *Parasitology*. 144(7): 851-868.
- Gondim LSQ, Abe-Sandes K, Uzêda RS, Silva MSA, Santos SL, Mota RA, Vilela SMO, Gondim LFP. 2010. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. *Vet Parasitol*. 168(1-2): 121-124.
- González-Warleta M, Castro-Hermida JA, Regidor-Cerrillo J, Benavides J, Álvarez-García G, Fuertes M, Ortega-Mora LM, Mezo M. 2014. *Neospora caninum* infection as a cause of reproductive failure in a sheep flock. *Vet Res*. 45: 88.
- Goodswen SJ, Kennedy PJ, Ellis JT. 2013. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present. *Infect Genet Evol*. 13(1): 133-150.
- Gos ML, Manazza JA, Späth EJA, Pardini L, Fiorentino MA, Unzaga JM, Moré G, Venturini MC. 2017. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in goats from two Argentinean provinces. *Open Vet J*. 7(4): 319-322.
- Gregoriadis G. 1990. Immunological adjuvants : a role for liposomes. *Immunol Today*. 11(3): 89-97.
- Greiner M y Gardner IA. 2000. Application of diagnostic tests in veterinary epidemiologic studies. *Prev Vet Med*. 45(1-2): 43-59.
- Guido S, Katzer F, Nanjiani I, Milne E, Innes EA. 2016. Serology-based diagnostics for the control of bovine neosporosis. *Trends Parasitol*. 32(2): 131-143.
- Haldorson GJ, Mathison BA, Wenberg K, Conrad PA, Dubey JP, Trees AJ, Yamane I, Baszler TV. 2005. Immunization with native surface protein NcSRS2 induces a Th2 immune response and reduces congenital *Neospora caninum* transmission in mice. *Int J Parasitol*. 35: 1407-1415.
- Hamidinejat H, Seifi-Abad-Shapouri MR, Namavari MM, Shayan P, Kefayat M. 2015. Development of an indirect ELISA using different fragments of recombinant NcGRA7 for detection of *Neospora caninum* infection in cattle and water buffalo.

Iran J Parasitol. 10(1): 69-77.

Hecker YP, Venturini MC, Campero CM, Odeón AC. 2012. Avances en el desarrollo de vacunas contra la neosporosis bovina. Rev argent microbiol. 44: 216-230.

Hecker YP, Moore DP, Manazza JA, Unzaga JM, Späth EJA, Pardini LL, Venturini MC, Roberi JM, Campero CM. 2013a. First report of seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dairy sheep from Humid Pampa, Argentina. Trop Anim Health Prod. 45(7): 1645-1647

Hecker YP, Moore DP, Quattrocchi V, Regidor-Cerrillo J, Verna A, Leunda MR, Morrell E, Ortega-Mora LM, Zamorano P, Venturini MC, Campero CM. 2013b. 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. 197(3-4): 436-446.

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

Hecker YP, Morrell EL, Fiorentino MA, Gual I, Rivera E, Fiorani F, Dorsch MA, Gos ML, Pardini LL, Scioli MV, Magariños S, Paolicchi FA, Cantón GJ, Moore DP. 2019a. Ovine Abortion by *Neospora caninum*: First Case Reported in Argentina. Acta Parasitol. 1-6.

Hecker YP, Regidor-Cerrillo J, Fiorani F, Horcajo P, Soria I, Gual I, Torioni S, Campero LM, Echaide IE, Álvarez-García G, Ortega-Mora LM, Zamorano PI, Venturini MC, Odeón AC, Cantón GJ, Moore DP. 2019b. Immune response to *Neospora caninum* live tachyzoites in prepubertal female calves. Parasitol Res. 118(10): 2945-2955.

Hemphill A, Fuchs N, Sonda S, Hehl A. 1999. The antigenic composition of *Neospora caninum*. Int J Parasitol. 29(8): 1175-1188.

Hernandez J, Risco C, Donovan A. 2001. Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. J Am Vet Med Assoc. 219(5): 632-635.

- Hofmann K, Stoffel W. 1993. A database of membrane spanning protein segments. *Biol Chem.* 374:166.
- Innes EA, Andrianarivo AG, Björkman C, Williams DJL, Conrad PA. 2002. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends Parasitol.* 18(11): 497-504.
- Jacobson RH. 1998. Validación de pruebas serológicas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 17(2): 507-526.
- Jolley WR, McAllister MM, McGuire AM, Wills RA. 1999. Repetitive abortion in *Neospora*-infected ewes. *Vet Parasitol.* 82(3): 251-257.
- Kamstrup S, Verthelyi D, Klinman DM. 2001. Response of porcine peripheral blood mononuclear cells to CpG-containing oligodeoxynucleotides. *Vet Microbiol.* 78(4): 353-362.
- Kefayat M, Hamidinejat H, Seifiabadshapoori MR, Namavari MM, Shayan P, Gooraninejad S. 2014. Cloning and expression of *Neospora caninum* dense-granule 7 in *E. Coli*. *J Parasit Dis.* 38(2):196-200.
- King JS, Šlapeta J, Jenkins DJ, Al-Qassab SE, Ellis JT, Windsor PA. 2010. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol.* 40(8): 945-950.
- Klinman DM. 2004. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol.* 4(4): 249-259.
- Krishnamachari Y y Aliasger KS. 2009. Innovative strategies for co-delivering antigens and CpG oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev.* 61(3): 205-217.
- Lally NC y Jenkins MC. 1996. Evaluation of two *Neospora caninum* recombinant antigens for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine neosporosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 3(3): 275-279.
- Liao M, Zhang S, Xuan X, Zhang G, Huang X, Igarashi I, Fujisaki K. 2005. Development of rapid immunochromatographic test with recombinant NcSAG1 for detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *Clin Vaccine Immunol.* 12(7): 885-887.

- Lindsay DS y Dubey JP. 1989. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *Am J Vet Res.* 50: 1981-1983.
- Lindsay DS, Dubey JP, Duncan RB. 1999. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Vet Parasitol.* 82(4): 327-333.
- López-Gatius F, Santolaria P, YÁniz JL, Garbayo JM, Almería S. 2005. The use of beef bull semen reduced the risk of abortion in *Neospora*- seropositive dairy cows. *J. Vet. Med. B* 52:88–92
- Maley SW, Buxton D, Thomson KM, Schriefer CES, Innes EA. 2001. Serological analysis of calves experimentally infected with *Neospora caninum*: A 1-year study. *Vet Parasitol.* 96(1): 1-9.
- Mansilla FC, Moore DP, Quintana ME, Cardoso N, Hecker YP, Gual I, Czepluch W, Odeón AC, Capozzo AV. 2015. Safety and immunogenicity of a soluble native *Neospora caninum* tachyzoite-extract vaccine formulated with a soy lecithin/ $\beta$ -glucan adjuvant in pregnant cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 165: 75-80.
- Marsh AE, Barr BC, Packham AE, Conrad PA. 1998. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). *J Parasitol.* 84(5): 983-991.
- McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire AM. 1998. Rapid communication: Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol.* 28: 1473-1479.
- Mcallister MM. 2014. Successful vaccines for naturally occurring protozoal diseases of animals should guide human vaccine research . A review of protozoal vaccines and their designs. *Parasitology.* 141(5): 624-640.
- MedCalc for Windows, version 14.12.0. MedCalc Software, Ostend, Belgium.
- Mena A, Nichani AK, Popowych Y, Ioannou XP, Godson DL, Mutwiri GK, Hecker R, Babiuk LA, Griebel P. 2003. Bovine and ovine blood mononuclear leukocytes differ markedly in innate immune responses induced by Class A and Class B CpG-oligodeoxynucleotide. *Oligonucleotides.* 13: 245-259.
- Miller C, Quinn H, Windsor PA, Ellis JT. 2002. Characterisation of the first Australian

- isolate of *Neospora caninum* from cattle. Aust Vet J. 80(10): 620-625.
- Monney T, Rutti D, Schorer M, Debache K, Grandgirard D, Leib SL, Hemphill A. 2011. 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 29: 6967-6975.
- Moore DP. 2005. Neosporosis in South America. Vet Parasitol. 127(2): 87-97.
- Moore DP, de Yaniz MG, Odeón AC, Cano D, Leunda MR, Späth EAJ, Campero CM. 2007. Serological evidence of *Neospora caninum* infections in goats from La Rioja Province, Argentina. Small Ruminant Res. 73(1-3): 256-258.
- Moore DP, Pérez A, Agliano S, Brace M, Cantón G, Cano D, Leunda MR, Odeón AC, Odriozola E, Campero CM. 2009. Risk factors associated with *Neospora caninum* infections in cattle in Argentina. Vet Parasitol. 161(1-2): 122-125.
- Moore DP, Echaide IE, Verna AE, Leunda MR, Cano A, Pereyra S, Zamorano PI, Odeón AC, Campero CM. 2011. Immune response to *Neospora caninum* native antigens formulated with immune stimulating complexes in calves. Vet Parasitol. 175(34): 245-251.
- Moraveji M, Hosseini A, Moghaddar N, Namavari MM, Eskandari MH. 2012. Development of latex agglutination test with recombinant NcSAG1 for the rapid detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle. Vet Parasitol. 189(2-4): 211-217.
- Morein B, Hu KF, Abusugra I. 2004. Current status and potential application of ISCOMs in veterinary medicine. Adv Drug Deliv Rev. 56(10): 1367-1382.
- Moreno B, Collantes-Fernández E, Villa A, Navarro A, Regidor-Cerrillo J, Ortega-Mora LM. 2012. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. Vet Parasitol. 187(1-2): 312-318.
- Neumann R, Aguirre D, Salatín A, Cano D, Moore DP, Campero CM. *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle from Valle de Lerma, Salta. 23rd International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary

- Parasitology. Buenos Aires, Argentina. 2011. p. 67.
- Nishikawa Y, Kousaka Y, Tragoolpua K, Xuan X, Makala L, Fujisaki K, Mikami T, Nagasawa H. 2001. Characterization of *Neospora caninum* surface protein NcSRS2 based on baculovirus expression system and its application for serodiagnosis of *Neospora* infection. *J Clin Microbiol.* 39(11): 3987-3991.
- Nishimura M, Kohara J, Kuroda Y, Hiasa J, Tanaka S, Muroi Y, Kojima N, Furuoka H, Nishikawa Y. 2013. Oligomannose-coated liposome- entrapped dense granule protein 7 induces protective immune response to *Neospora caninum* in cattle. *Vaccine* 31: 3528-3535.
- Nogareda C, López-Gatius F, Santolaria P, García-Ispuerto I, Bech-Sàbat G, Pabón M, Mezod M, Gonzalez-Warleta M, Castro-Hermida JA, Yániz J, Almeria S. 2007. Dynamics of anti-*Neospora caninum* antibodies during gestation in chronically infected dairy cows. *Vet Parasitol.* 148(3-4): 193-199.
- Novoa MB, Aguirre NP, Ormaechea N, Palmero S, Rouzic L, Orcellet V, Valentini BS, Sarli M, Primo ME, Vanzini VR, Echaide IE. Seroprevalencia de neosporosis en pequeños rumiantes mediante IFI y ELISA de competición basado en la proteína recombinante SAG1. XXII Reunión científico-técnica de la AAVLD. Río Cuarto, Córdoba, Argentina. 2018. p. 102.
- Novoa MB, Valentini BS, Sarli M, Torioni de Echaide SM, Primo ME, Echaide IE. 2019. Evaluation of a competitive-inhibition ELISA based on the recombinant protein tSAG1 to detect anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle. *J Vet Diagn Invest.* En prensa.
- OIE Terrestrial Manual. First adopted in 1996 as principles of validation of diagnostic assays for infectious diseases. Most recent updates adopted in 2013. Chapter 1.1.6. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. p. 72-87.
- Packham AE, Sverlow KW, Conrad PA, Loomis EF, Rowe JD, Anderson ML, Marsh AE, Cray C, Barr BC. 1998. A modified agglutination test for *Neospora caninum*: Development, optimization, and comparison to the indirect fluorescent-antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol.* 5(4): 467-473.

- Paré J y Hietala SK. 1995. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* spp. infection in cattle. *J Vet Diagn Invest.* 7(3): 352-359.
- Paré J, Hietala SK, Thurmond MC. 1995. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* spp. infection in cattle. *J Vet Diagn Invest.* 7(2): 273-275.
- Paré J, Thurmond MC, Hietala SK. 1996. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhoo mortality. *Can J Vet Res.* 60(2): 133-139.
- Paré J, Thurmond MC, Hietala SK. 1997. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J Parasitol.* 83(1): 82-87.
- Pereyra R, Mansilla FC, Petersen MI, Suarez V, Capozzo AV. 2019. Evidence of reduced vertical transmission of *Neospora caninum* associated with higher IgG1 than IgG2 serum levels and presence of IFN- $\gamma$  in non-aborting chronically infected cattle under natural condition. *Vet Immunol Immunopathol.* 208: 53-57.
- Pinitkiatisakul S, Friedman M, Wikman M, Mattsson JG, Lovgren-Bengtsson K, Stahl S, Lunden A. 2007. Immunogenicity and protective effect against murine cerebral neosporosis of recombinant NcSRS2 in different ISCOM formulations. *Vaccine.* 25: 3658-3668.
- Raghupathy R. 1997. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today.* 18(10): 478-482.
- Rappuoli R. 2000. Reverse vaccinology. *Curr Opin Microbiol.* 3: 445-450.
- Recombinant protein solubility prediction. URL: <http://www.biotech.ou.edu/>. Último acceso: 01-10-2019.
- Regidor-Cerrillo J, Arranz-Solís D, Benavides J, Gómez-Bautista M, Castro-Hermida JA, Mezo M, Pérez V, Ortega-Mora LM, González-Warleta M. 2014. *Neospora caninum* infection during early pregnancy in cattle: how the isolate influences infection dynamics, clinical outcome and peripheral and local immune responses.

Vet Res. 45:10.

Reichel MP y Ellis JT. 2006. If control of *Neospora caninum* infection is technically feasible does it make economic sense? *Vet Parasitol.* 142(1-2): 23-34.

Reichel MP, McAllister MM, Pomroy WE, Campero CM, Ortega-Mora LM, Ellis JT. 2014. Control options for *Neospora caninum* - is there anything new or are we going backwards? *Parasitology.* 141(11): 1455-1470.

Reidel IG, Camussone C, Suarez-Archilla GA, Calvinho LF, Veaute C. 2019. Liposomal and CpG-ODN formulation elicits strong humoral immune responses to recombinant *Staphylococcus aureus* antigens in heifer calves. *Vet Immunol Immunopathol.* 212: 1-8.

Revista Motivar. URL: <http://www.motivar.com.ar/2015/12/el-kit-nacional-para-el-diagnostico-de-neosporosis-ya-es-una-realidad/>. Último acceso: 01-10-2019.

Robles C, Martínez A, Romera A, Brihuega B, Chodilef M, Vega C, Gos ML. 2018. Capítulo: Relevamiento sanitario en rebaños ovinos y caprinos de la región sur de la provincia de Río Negro. En: *Enfermedades de los ovinos, caprinos y camélidos sudamericanos*. Editor: Carlos Robles. Primera Edición. Editorial: INTA 2018. San Carlos de Bariloche, Río Negro, Argentina. p. 95-96.

Rodriguez SD, Bueninc GM, Vega CA, Carson CA. 1986. *Babesia bovis*: purification and concentration of merozoites and infected bovine erythrocytes. *Exp Parasitol.* 61: 236-243.

Rojo-Montejo S, Collantes-Fernández E, Perez-Zaballos F, Rodríguez-Marcos S, Blanco-Murcia J, Rodríguez-Bertos A, Prenafeta A, Ortega-Mora LM. 2013. Effect of vaccination of cattle with the low virulence Nc-Spain1H isolate of *Neospora caninum* against a heterologous challenge in early and mid-gestation. *Vet Res.* 44: 106.

Rosano GL y Ceccarelli EA. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol.* 5: 1-17.

Sánchez-Sánchez R, Vázquez P, Ferre I, Ortega-Mora LM. 2018. Treatment of

- toxoplasmosis and neosporosis in farm ruminants: state of knowledge and future trends. *Curr Top Med Chem.* 18(15): 1304-1323.
- Schares G, Rauser M, Söndgen P, Rehberg P, Bärwald A, Dubey JP, Edelhofer R, Conraths FJ. 2000. Use of purified tachyzoite surface antigen p38 in an ELISA to diagnose bovine neosporosis. *Int J Parasitol.* 30(10): 1123-1130.
- Schares G, Bärwald A, Staubach C, Söndgen P, Rauser M, Schröder R, Peters M, Wurmb DR, Selhorst T, Conraths FJ. 2002. p38-avidity-ELISA: Examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Vet Parasitol.* 106(4): 293-305.
- Schares G, Bärwald A, Conraths FJ. 2005. Adaptation of a surface antigen-based ELISA for the detection of antibodies against *Neospora caninum* in bovine milk. *J Vet Med B.* 52(1): 45-48.
- Signal P. URL: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>. Último acceso: 01-10-2019.
- Singh SM y Panda AK. 2005. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng.* 99(4): 303-310.
- Sinnott FA, Monte LG, Collares TF, De Matos BM, Pacheco DB, Borsuk S, Andreotti R, Hartleben CP. 2014. Blocking elisa using recombinant NcSRS2 protein for diagnosing bovine neosporosis. *Curr Microbiol.* 70(3): 429-432.
- Sivakumar SM, Safhi MM, Kannadasan M, Sukumaran N. 2011. Vaccine adjuvants – current status and prospects on controlled release adjuvancity. *Saudi Pharm J.* 19(4): 197-206.
- Thilsted JP y Dubey JP. 1989. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *J Vet Diagn Invest.* 1(3): 205-209.
- Thurmond MC, Hietala SK, Blanchard PC. 1997. Herd-based diagnosis of *Neospora caninum*-induced endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and postnatal transmission. *J Vet Diagn Invest.* 9(1): 44-49.
- Tizard IR. 2009a. Capítulo 24: Inmunidad adquirida frente a parásitos. En: *Inmunología Veterinaria. Octava Edición.* Elsevier. España. p. 312-328.

- Tizard IR. 2009b. Capítulo 18: Inmunidad en el feto y el recién nacido. En: Inmunología Veterinaria. Octava Edición. Elsevier. España. p. 223-238.
- Tizard IR. 2009c. Capítulo 20: Vacunas y su producción. En: Inmunología Veterinaria. Octava Edición. Elsevier. España. p. 255-285.
- Tizard IR. 2009d. Capítulo 14: Los anticuerpos: Receptores solubles de antígeno. En: Inmunología Veterinaria. Octava Edición. Elsevier. España. p. 170-180.
- Tizard IR. 2009e. Capítulo 12: Linfocitos T colaboradores y su respuesta al antígeno. En: Inmunología Veterinaria. Octava Edición. Elsevier. España. p. 139-150.
- Tizard IR. 2009f. Capítulo 8: Las células dendríticas y el procesamiento de antígenos. En: Inmunología Veterinaria. Octava Edición. Elsevier. España. p. 89-100.
- TM Pred. URL: [http://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED\\_form.html](http://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html). Último acceso: 01-10-2019
- Uzeda RS, Costa KDS, Santos SL, Pinheiro AM, De Almeida MAO, McAllister MM, Gondim LFP. 2007. Loss of infectivity of *Neospora caninum* oocysts maintained for a prolonged time. Korean J Parasitol. 45(4): 295-299.
- Valentini BS, Primo ME, Torioni de Echaide SM, Echaide IE. 2016. Neosporosis bovina: estatus de infección definido por IFI y cELISA en muestras de suero obtenidas periódicamente de vacas lecheras. XXI Reunión científico-técnica de la AAVLD. San Salvador de Jujuy, Argentina. 2016. p. E4.
- Varaschin MS, Hirsch C, Wouters F, Nakagaki KI, Guimarães AM, Santos DS, Bezerra Jr. PS, Costa RC, Peconick AP, Langohr IM. 2012. Congenital Neosporosis in Goats from the State of Minas Gerais, Brazil. Korean J Parasitol. 50(1): 63-67.
- Vianna MCB, Sreekumar C, Miska KB, Hill DE, Dubey JP. 2005. Isolation of *Neospora caninum* from naturally infected white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). Vet Parasitol. 129(3-4): 253-257.
- Weston JF, Heuer C, Williamson NB. 2012. Efficacy of a *Neospora caninum* killed tachyzoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle. Prev Vet Med. 103(2): 136-144.

- Wilkowsky SE, Bareiro GG, Mon ML, Moore DP, Caspe G, Campero CM, Fort M, Romano MI. 2011. An applied printing immunoassay with recombinant Nc-SAG1 for detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *J Vet Diagn Invest.* 23(5): 971-976.
- Williams DJ, McGarry J, Guy F, Barber J, Trees AJ. 1997. Novel ELISA for detection of *Neospora*-specific antibodies in cattle. *Vet Rec.* 140(13): 328-331.
- Williams DJ, Guy CS, Smith RF, Ellis J, Björkman C, Reichel MP, Trees AJ. 2007. Immunization of cattle with live tachyzoites of *Neospora caninum* confers protection against fetal death. *Infect Immun.* 75: 1343-1348.
- Wright PF, Nilsson E, Van Rooij EM, Lelenta M, Jeggo MH. 1993. Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev Sci Tech.* 12(2): 435-450.
- Yamage M, Flechtner O, Gottstein B. 1996. *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain 'cyst' DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). *J Parasitol.* 82(2): 272-279.