

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
ANTÍGENOS DE “Neospora caninum” CON INTERÉS
INMUNODIAGNÓSTICO EN BOVINOS**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR**

Gema Álvarez García

Bajo la dirección del Doctor:

Luis Miguel Ortega Mora

Madrid, 2003

ISBN: 84-669-2160-5

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Dpto. Sanidad Animal



**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
DE ANTÍGENOS DE *Neospora caninum*
CON INTERÉS INMUNODIAGNÓSTICO EN BOVINOS**

TESIS DOCTORAL

Dña. Gema Álvarez García

Madrid, 2003

Memoria presentada por Dña. Gema Álvarez García para optar al grado de
Doctor en Veterinaria por la Universidad Complutense de Madrid

Luis Miguel Ortega Mora, Profesor Titular del Departamento de Sanidad Animal, de la Facultad de Veterinaria, de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada “Identificación y caracterización de antígenos de *Neospora caninum* con interés inmunodiagnóstico en bovinos” que presenta la Licenciada en Veterinaria Gema Álvarez García, para optar al grado de Doctora en Veterinaria ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y cumple los requisitos exigibles para la obtención de dicho grado y autoriza su presentación.

Y para que conste, a todos los efectos, firmo la presente en Madrid, a 8 de Abril de 2003,

Fdo. Prof. Dr. Luis Miguel Ortega Mora

A mi padre y a mi hermana Maribel,

Nunca me han parecido tan bellas las cosas de este mundo, tan dulces sus sabores, pero ya no lo sigo. Porque sé que hay algo más hermoso todavía. Me cuesta darle un nombre, porque lo empequeñece. Y aunque no es de este mundo, tampoco está en otro sitio sino en él..

Antonio Gala, "Las afueras de Dios"

A Oscar, A mi madre y a Hugo,

En la amplia puerta se detuvo a disfrutar de la vista de su jardín. Esto siempre le proporcionaba un íntimo goce. Conociendo todos sus detalles no cesaba de buscar las hojas caídas o el hormiguero que pudiese estropear su perfección; no deseaba así mismo, molestarle en buscar al jardinero y preguntarle por qué no había arreglado estos detalles. Cerró los ojos un minuto y cuando los abrió de nuevo vio su jardín resplandeciente a la luz del sol, exactamente como deseaba verle.

Pearl S. Buck, "La flor escondida"

Agradecimientos

La escritura de esta parte tan importante de la tesis doctoral constituye el momento más gratificante. Sin embargo, no está exento de una gran responsabilidad pues no me gustaría olvidar a ninguna de tantas personas que han hecho posible la realización de este trabajo. Es ahora cuando me doy cuenta de lo afortunada que soy por contar con todos vosotros, tanto dentro como fuera de la Universidad. A todos os quiero expresar mi más sincero y profundo agradecimiento.

En primer lugar, y sin que suene a un tópico, me gustaría agradecer a mi director de tesis doctoral, Luis Miguel Ortega Mora, la confianza que ha depositado en mí desde el primer día, sus críticas constructivas y su enorme capacidad de trabajo. Por demostrarme que un director no es solo un “jefe”. Su apoyo y su ánimo en los momentos más difíciles tanto en el ámbito profesional como personal han puesto de manifiesto su gran calidad humana.

A Mercedes Gómez, por introducirme en el mundo de la parasitología, por ser mi primera “jefa” y porque su respaldo y su ayuda han sido indispensables en muchos momentos.

A Esther, Vanesa y Fran, ellos han sido fieles testigos de todo el trabajo y el paño de lágrimas de mis “altibajos” en el laboratorio. Porque antes que compañeros son buenos amigos y sus risas y palabras de aliento me animan a continuar.

A todas las chicas y chicos del “labo”: Aurora, Verónica, Inma, Ana, Esther, Cristina, Andrea, Isabel, Javier, Ignacio, Adriana y Cinta, con su alegría, su amistad y su complicidad he logrado a afrontar los pequeños problemas del día a día.

A la Dra. Juana Pereira, Águeda y Gloria, que han hecho posible que guarde un maravilloso recuerdo de León, por ser encantadoras conmigo.

Al Dr. Bruno Gottstein, y a todo el personal de su laboratorio, que me hicieron sentirme como en casa y con los que aprendí a trabajar en equipo, en especial a Heinz y a Nagul, que me han regalado su amistad.

A los Dres. Ignacio Arnaiz, Sorka Ariz, Elizabeth Innes, Jens Mattsson y Gerson Schares por su inestimable colaboración en el envío de muestras.

A Ángel, por guiar mi trabajo, por su apoyo y sus acertados comentarios hasta el último momento.

A la Dra. Concha Gil por su colaboración y a Aida, por ser una compañera y una persona excepcional que me ha ayudado y enseñado en el último peldaño de la tesis.

A todos los profesores de Parasitología, por su apoyo y su compañerismo.

A las profesoras Mónica Luzón y Guadalupe Miró porque su cariño me ha llegado al corazón.

A Isabel y Chema, por compartir buenos momentos, por su colaboración.

A todo el departamento, en especial a Pascual y al personal del laboratorio de Parasitología.

A los demás compañeros, María, Ana A., Carol, Ana, Mariela, Enrique, Elena, Carlos, Raúl, Mar y Begoña, que facilitaron mis comienzos en el laboratorio.

A mis padres, mi hermana y Hugo, simplemente por ser maravillosos, por llenarme de alegría cada día, y al resto de mi familia por estar ahí.

A Ana, confidente y "hermana", que cada día me ilumina con su amistad ocupando un vacío importante de mi corazón, y al resto de mis amigos, Adela, Bea, Esther, Jorge, Jorge P., Asun, Manolo, Ángel, Rosa, Marisa y Olga que me han demostrado que los verdaderos amigos no se cuentan con los dedos de una mano y al resto de amigos que han seguido de alguna manera mi trabajo.

A la familia de Oscar porque es también mi familia, su enorme cariño me reconforta cada día.

A Oscar, por compartirlo todo, por ser mi apoyo y mi luz, por quererme tanto.

La realización de este trabajo ha sido posible gracias al disfrute de una beca de formación de personal investigador de la Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid y a la financiación a través del proyecto de investigación CICYT AGF98-0804-C02 y del proyecto europeo QRLT-2000-01050.

Listado de Figuras	x
Listado de Tablas	xii
Abreviaturas y siglas	xiii
1. ANTECEDENTES	1
1.1. CARACTERÍSTICAS DE <i>Neospora caninum</i>	3
1.1.1. Situación taxonómica.....	3
1.1.2. Morfología del parásito.....	4
1.1.3. Biología del parásito.....	6
1.1.3.1. Rango de hospedadores.....	6
1.1.3.2. Ciclo biológico.....	7
1.1.3.3. Resistencia a factores bióticos y abióticos.....	8
1.1.3.4. Aislados.....	9
1.1.3.5. Cultivo <i>in vitro</i>	11
1.1.3.6. Proteínas de <i>N. caninum</i>	12
1.1.3.6.1. Variaciones inter específicas e intra específicas.....	13
1.1.3.6.1.1. Variaciones inter específicas.....	13
1.1.3.6.2.1.a <i>Neospora</i> y <i>Toxoplasma</i>	13
1.1.3.6.2.1.b <i>N. caninum</i> y <i>Neospora hughesi</i>	14
1.1.3.6.1.2. Variaciones intra específicas.....	14
1.1.3.6.1.2.a Aislados de <i>N. caninum</i>	14
1.1.3.6.1.2.b Antígenos específicos de estadio.....	15
1.1.3.6.2. Localización y función de las proteínas de <i>N. caninum</i>	16
1.1.3.6.2.1. Superficie.....	19
1.1.3.6.2.2. Gránulos densos.....	20
1.1.3.6.2.3. Roptrias.....	21
1.1.3.6.2.4. Micronemas.....	21
1.1.3.6.3. Proteínas relevantes desde el punto de vista diagnóstico y vacunal.....	22
1.1.3.6.4. Perspectivas futuras.....	25
1.2. NEOSPOROSIS BOVINA	26
1.2.1. Epidemiología.....	26
1.2.1.1. Prevalencia.....	26
1.2.1.1.1. Fetos bovinos abortados.....	26
1.2.1.1.2. Bovinos adultos.....	29
1.2.1.2. Transmisión.....	32
1.2.1.3. Factores de riesgo.....	36
1.2.1.3.1. Dependientes del hospedador.....	37
1.2.1.3.1.1. Especie.....	37
1.2.1.3.1.2. Edad.....	37

1.2.1.3.1.3. Inmunidad.....	38
1.2.1.3.1.4. Sexo.....	38
1.2.1.3.1.5. Raza.....	38
1.2.1.3.1.6. Antecedentes de fallo reproductivo.....	39
1.2.1.3.2. Dependientes del parásito.....	39
1.2.1.3.2.1. Aislado.....	39
1.2.1.3.2.2. Dosis.....	40
1.2.1.3.2.3. Estadio parasitario.....	41
1.2.1.3.2.4. Infecciones concurrentes.....	42
1.2.1.3.3. Dependientes del manejo o del ambiente.....	42
1.2.1.3.3.1. Tamaño de la explotación.....	42
1.2.1.3.3.2. Estacionalidad.....	43
1.2.1.3.3.3. Reposición.....	44
1.2.1.3.3.4. Presencia de carnívoros en la explotación.....	44
1.2.1.4. Importancia económica.....	44
1.2.1.5. Importancia sanitaria.....	46
1.2.2. Patogenia de la infección por <i>N. caninum</i>	47
1.2.2.1. Adultos.....	47
1.2.2.1.1. Hembras.....	47
1.2.2.1.2. Machos.....	48
1.2.2.2. Fetos.....	48
1.2.2.3. Terneros.....	50
1.2.3. Sintomatología.....	50
1.2.3.1. Adultos.....	50
1.2.3.2. Fetos.....	51
1.2.3.3. Terneros.....	51
1.2.4. Lesiones.....	52
1.2.5. Respuesta inmune.....	54
1.2.5.1. Respuesta inmune humoral.....	55
1.2.5.1.1. Modelo bovino.....	55
1.2.5.1.2. Modelo murino.....	56
1.2.5.2. Respuesta inmune celular.....	56
1.2.5.2.1. <i>In vitro</i>	57
1.2.5.2.2. Modelo bovino.....	57
1.2.5.2.3. Modelo murino.....	58
1.2.6. Diagnóstico.....	59
1.2.6.1. Diagnóstico epidemiológico y clínico.....	59
1.2.6.2. Diagnóstico laboratorial.....	60
1.2.6.2.1. Técnicas histológicas.....	61
1.2.6.2.1.1. Histología convencional.....	61
1.2.6.2.1.2. Inmunohistoquímica.....	62

1.2.6.2.2. Detección de ácidos nucleicos.....	62
1.2.6.2.3. Aislamiento.....	64
1.2.6.2.3.1. En cultivo celular.....	64
1.2.6.2.3.2. Inoculación en ratón.....	64
1.2.6.2.4. Técnicas serológicas.....	64
1.2.6.2.4.1. Ventajas y limitaciones de la serología.....	65
1.2.6.2.4.2. Técnicas serológicas empleadas.....	66
1.2.6.2.4.2.a IFI.....	66
1.2.6.2.4.2.b ELISA.....	67
1.2.6.2.4.2.b.1. ELISA con antígeno soluble.....	67
1.2.6.2.4.2.b.2. ELISA con taquizoitos formalinizados.....	68
1.2.6.2.4.2.b.3. ELISA con partículas iscoms.....	69
1.2.6.2.4.2.b.4. ELISA con proteínas recombinantes.....	69
1.2.6.2.4.2.b.5. ELISA con proteínas purificadas por afinidad.....	70
1.2.6.2.4.2.b.5. ELISA de avidéz.....	71
1.2.6.2.4.2.c Western blot.....	73
1.2.6.2.4.2.d Aglutinación directa.....	73
1.2.6.2.4.3. Aplicaciones prácticas del diagnóstico serológico.....	74
1.2.6.2.4.3.a Estudio de la eficacia de la transmisión congénita.....	74
1.2.6.2.4.3.b Diagnóstico de la causa del aborto.....	74
1.2.6.2.4.3.b.1 Fetos.....	74
1.2.6.2.4.3.b.2 Reproductoras.....	75
1.2.6.2.4.3.c Estudios epidemiológicos.....	76
1.2.6.3. Diagnóstico diferencial.....	76
1.2.7. Control.....	78
1.2.7.1. Tratamiento terapéutico.....	78
1.2.7.2. Manejo del rebaño.....	80
1.2.7.2.1. Transmisión vertical.....	81
1.2.7.2.2. Transmisión horizontal.....	82
1.2.7.3. Inmunoprofilaxis.....	84
2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.....	86
3. MATERIAL Y METODOS.....	91
3.1. CULTIVOS CELULARES.....	92
3.1.1. Líneas celulares empleadas.....	92
3.1.2. Mantenimiento de las líneas celulares.....	92
3.1.3. Conservación de las líneas celulares.....	93
3.2. OBTENCIÓN <i>in vitro</i> DE TAQUIZOÍTOS DE <i>N. caninum</i>.....	93
3.2.1. Aislados de <i>N. caninum</i>	93

3.2.2. Obtención de taquizoítos de <i>N. caninum</i> en cultivo celular.....	94
3.2.3. Conservación de los aislados	94
3.3. PURIFICACIÓN DE TAQUIZOÍTOS DE <i>N. caninum</i> PARA LA OBTENCIÓN DE ANTÍGENO Y RNA TOTAL	95
3.3.1. Antígeno para la prueba de IFI.....	95
3.3.2. Antígeno para las pruebas de ELISA, electroforesis uni y bidimensional y Western blot.....	96
3.3.3. Determinación de la concentración de proteína.....	96
3.3.4. Purificación de taquizoítos para el aislamiento de RNA total.....	96
3.4. LÍQUIDOS FETALES Y SUEROS BOVINOS	97
3.4.1. Método de obtención de los líquidos fetales.....	97
3.4.2. Método de obtención de los sueros.....	97
3.4.3. Características de los diferentes grupos de líquidos fetales y sueros utilizados.....	98
3.4.3.1. Muestras de bovinos libres de la infección por <i>N. caninum</i>	98
3.4.3.2. Muestras de bovinos infectados naturalmente con <i>N. caninum</i>	98
3.4.3.2.1. Fetos.....	99
3.4.3.2.2. Terneros precalostrales.....	99
3.4.3.2.3. Novillas y vacas abortadas.....	99
3.4.3.2.4. Novillas y vacas infectadas.....	100
3.4.3.2.5. Muestras de rebaños con fallo reproductivo por <i>N. caninum</i>	100
3.4.3.2.6. Sementales.....	100
3.4.3.2.7. Muestras secuenciales de novillas y vacas durante la gestación.....	101
3.4.3.3. Muestras de bovinos infectados experimentalmente con <i>N. caninum</i>	101
3.5. OBTENCIÓN DE SUERO DE CONEJO ANTI - <i>N. caninum</i>	102
3.5.1. Preparación del antígeno.....	102
3.5.2. Inoculación de los animales y obtención de los sueros.....	102
3.6. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	103
3.6.1. Análisis unidimensional de proteínas.....	103
3.6.1.1. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes.....	103
3.6.1.2. Electrotransferencia.....	104
3.6.1.2.1. Transferencia a membrana de nitrocelulosa.....	104
3.6.1.2.2. Transferencia a membrana de PVDF.....	104
3.6.2. Análisis bidimensional de proteínas (2D-PAGE).....	105
3.6.2.1. Primera dimensión: separación de las proteínas mediante isoelectroenfoque.....	105
3.6.2.2. Segunda dimensión: electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes.....	105
3.6.2.3. Transferencia a membranas de nitrocelulosa.....	106
3.6.3. Purificación de proteínas por electroelución.....	106
3.6.3.1. Método de electroelución.....	106
3.6.3.2. Cuantificación de la proteína electroeluida.....	107
3.6.4. Estudio de la composición glicoproteica: deglicosilación química.....	108

3.7. TÉCNICAS SEROLÓGICAS	108
3.7.1. Inmunofluorescencia indirecta.....	108
3.7.1.1. Detección de IgG anti <i>N. caninum</i> en bovinos.....	109
3.7.1.2. Detección de IgG anti <i>N. caninum</i> en conejos.....	110
3.7.2. ELISA.....	110
3.7.2.1. Detección de IgG anti <i>N. caninum</i> en bovinos.....	110
3.7.3. Western blot.....	112
3.7.3.1. Detección de IgG anti <i>N. caninum</i> en bovinos.....	112
3.7.3.2. Detección de IgG anti <i>N. caninum</i> en conejos.....	113
3.8. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS PURIFICADOS POR AFINIDAD (APAs)	113
3.8.1. Purificación por afinidad de los anticuerpos monoespecíficos.....	114
3.8.2. Comprobación de la eficacia de la obtención de los APAs.....	114
3.9. TÉCNICAS GENÉTICAS	115
3.9.1. Bacterias y fagos utilizados.....	115
3.9.1.1. Cepas bacterianas.....	115
3.9.1.2. Vectores utilizados.....	115
3.9.2. Purificación de ácidos nucleicos.....	117
3.9.2.1. Extracción del RNA total: método de Promega.....	117
3.9.2.2. Extracción del RNA total: método de Tripure®.....	117
3.9.2.3. Cuantificación del RNA.....	118
3.9.2.4. Purificación del RNA mensajero.....	118
3.9.3. Construcción y análisis de una genoteca de cDNA.....	119
3.9.3.1. Síntesis del cDNA.....	119
3.9.3.2. Creación de extremos cohesivos en el cDNA: adaptación y digestión con enzimas de restricción.....	120
3.9.3.3. Fraccionamiento y cuantificación del cDNA.....	121
3.9.3.4. Ligación del cDNA en el vector de inserción Uni-Zap XR.....	122
3.9.3.5. Empaquetamiento de la genoteca de cDNA.....	122
3.9.3.6. Titulación y amplificación de la genoteca primaria.....	122
3.9.4. Cribado de la genoteca con anticuerpos.....	124
3.9.4.1. Identificación y purificación de los clones de interés.....	124
3.9.5. Amplificación del DNA por la técnica de PCR.....	125
3.9.6. Electroforesis del RNA y DNA.....	126
3.9.7. Secuenciación.....	127
3.9.8. Análisis bioinformático de las secuencias.....	128
3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	128
3.10.1. Índices que definen la distribución de los datos.....	129
3.10.2. Estudio de la homogeneidad.....	129
3.10.2.1. Homogeneidad de dos muestras: comparación de dos porcentajes.....	129
3.10.2.2. Homogeneidad de un conjunto de muestras.....	129
3.10.3. Concordancia entre dos pruebas diagnósticas.....	130

3.10.4. Estimación de los puntos de corte.....	131
3.10.5. Cálculo de las características diagnósticas de una prueba serológica.....	131
3.10.6. Regresión lineal.....	132
4. VALIDACIÓN DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS SEROLÓGICAS EN LA NEOSPOROSIS BOVINA: INFLUENCIA DE LA EDAD Y OBJETIVOS DE LA TÉCNICA EN LA ELECCIÓN DEL PUNTO DE CORTE.....	134
4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	136
4.1.1. Concordancia entre las diferentes técnicas serológicas.....	137
4.1.2. Precisión de la IFI y del ELISA (Civtest®).....	137
4.1.3. Poblaciones serológicas bovinas independientes.....	138
4.1.4. Determinación de los puntos de corte para cada una de las técnicas serológicas.....	138
4.1.5. Estudio comparativo de la IFI y el ELISA (Civtest®).....	139
4.2. RESULTADOS.....	140
4.2.1. Concordancia entre las diferentes técnicas serológicas.....	140
4.2.2. Precisión de la IFI y el ELISA (Civtest®).....	141
4.2.3. Poblaciones serológicas bovinas independientes.....	142
4.2.3.1. Poblaciones de referencia no infectadas.....	142
4.2.3.2. Poblaciones de referencia infectadas.....	143
4.2.4. Determinación de los puntos de corte para cada una de las técnicas serológicas.....	144
4.2.5. Estudio comparativo de la IFI y el ELISA.....	146
4.2.5.1. Comparación de las AUCs.....	146
4.2.5.2. Estudio de prevalencia en función de los puntos de corte.....	146
4.2.5.3. Correlación.....	147
4.3. DISCUSIÓN.....	148
5. ANTÍGENOS DEL TAQUIZOÍTO DE <i>N. caninum</i> CON IMPORTANCIA PARA EL INMUNODIAGNÓSTICO EN LA ESPECIE BOVINA.....	154
5.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	155
5.1.1. Influencia del aislado y del anticuerpo secundario en el patrón de reconocimiento de los antígenos del taquizoíto.....	155
5.1.2. Identificación de los antígenos del taquizoíto reconocidos por distintos grupos poblacionales de bovinos infectados por <i>N. caninum</i>	156
5.1.3. Variaciones en los antígenos del taquizoíto reconocidos a lo largo de la gestación por vacas abortadas y no abortadas con infección natural.....	157

5.2. RESULTADOS	158
5.2.1. Influencia del aislado y del anticuerpo secundario en el patrón de reconocimiento de los antígenos del taquizoíto.....	158
5.2.1.1. Aislado.....	158
5.2.1.2. Anticuerpo secundario.....	158
5.2.2. Identificación de los antígenos del taquizoíto reconocidos por distintos grupos poblacionales de bovinos infectados por <i>N. caninum</i>	160
5.2.2.1. Patrón de reconocimiento.....	160
5.2.2.2. Relación entre el título de anticuerpos específicos y los antígenos del taquizoíto identificados.....	162
5.2.2.2.1. Fetos.....	162
5.2.2.2.2. Reproductoras abortadas.....	162
5.2.2.2.3. Sementales.....	162
5.2.2.3. Estudio comparativo del reconocimiento de antígenos del taquizoíto por los diferentes grupos poblacionales de bovinos infectados por <i>N. caninum</i>	163
5.2.3. Variaciones en los antígenos del taquizoíto reconocidos a lo largo de la gestación por vacas abortadas y no abortadas con infección natural.....	165
5.3. DISCUSIÓN	169
6. UTILIDAD DE LA PROTEÍNA DE 17 kDa PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR <i>N. caninum</i> EN EL GANADO BOVINO	174
6.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	176
6.1.1. Reproductoras.....	177
6.1.2. Terneros.....	178
6.1.3. Fetos.....	179
6.1.4. Estudio comparativo de la IFI y el western blot p-17.....	179
6.2. RESULTADOS	180
6.2.1. Reproductoras.....	180
6.2.1.1. Con infección natural.....	180
6.2.1.2. Con infección experimental.....	181
6.2.2. Terneros.....	184
6.2.2.1. Con infección natural.....	184
6.2.2.2. Con infección experimental.....	185
6.2.3. Fetos.....	187
6.2.4. Estudio comparativo de la IFI y el western blot p-17.....	188
6.3. DISCUSIÓN	189

7. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS cDNAs DE <i>N. caninum</i> RECONOCIDOS POR ANTICUERPOS DESARROLLADOS FRENTE A LA p-17	198
7.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	200
7.1.1. Estudio de la composición glucídica de la p-17	200
7.1.2. Obtención y selección de los anticuerpos empleados en el cribado de la genoteca	200
7.1.3. Construcción de una genoteca de cDNA del taquizoíto de <i>N. caninum</i>	201
7.1.4. Aislamiento e identificación de los clones reconocidos por el suero policlonal (APA-17)	202
7.1.5. Caracterización de los cDNAs aislados	202
7.2. RESULTADOS	203
7.2.1. Estudio de la composición glucídica de p-17	203
7.2.2. Obtención y selección de los anticuerpos empleados en el cribado de la genoteca	204
7.2.3. Construcción de una genoteca de cDNA del taquizoíto de <i>N. caninum</i>	205
7.2.4. Aislamiento e identificación de los clones reconocidos por el suero policlonal (APA-17)	209
7.2.5. Caracterización de los cDNAs aislados	210
7.3. DISCUSIÓN	216
8. CARACTERIZACIÓN DE LA p-17 DE <i>N. caninum</i> MEDIANTE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL	223
8.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	225
8.1.1. Secuenciación aminoacídica N-terminal de la p-17	225
8.1.2. Mapa proteico bidimensional de los taquizoítos de <i>N. caninum</i>	225
8.1.3. Caracterización de la p-17 mediante 2D-PAGE	226
8.1.4. Identificación de otras proteínas inmunodominantes de <i>N. caninum</i> mediante 2D-PAGE	227
8.2. RESULTADOS	227
8.2.1. Secuenciación aminoacídica N-terminal de la p-17	227
8.2.2. Mapa proteico bidimensional de los taquizoítos de <i>N. caninum</i>	228
8.2.3. Caracterización de la p-17 mediante 2D-PAGE	229
8.2.4. Identificación de otras proteínas inmunodominantes de <i>N. caninum</i> mediante 2D-PAGE	231
8.3. DISCUSIÓN	232
9. CONCLUSIONES	238
10. RESUMEN	242
11. SUMMARY	246

12. BIBLIOGRAFÍA	249
13. APÉNDICES	276

LISTADO DE FIGURAS

- Figura 1 Cultivo celular de *N. caninum*.
- Figura 2 Ciclo biológico y vías de transmisión de *N. caninum*.
- Figura 3 Mapa físico del plásmido pBluescript®.
- Figura 4 Esquema general de la síntesis de cDNA para su clonaje en el vector λ -ZAP.
- Figura 5 Esquema del proceso de validación de las técnicas serológicas.
- Figura 6 Valores de sensibilidad y especificidad obtenidos en el análisis ROC para los diferentes puntos de corte.
- Figura 7 Comparación de dos curvas ROC a partir de muestras correlacionadas correspondientes a la IFI y el ELISA Civtest®.
- Figura 8 Correlación entre títulos de IFI y valores de D.O. del ELISA Civtest® mediante un análisis de regresión simple.
- Figura 9 Patrón de reconocimiento de los antígenos del taquizoíto de *N. caninum* reconocidos por bovinos infectados en función del aislado y del anticuerpo secundario.
- Figura 10 Patrón de reconocimiento de los antígenos del taquizoíto de *N. caninum* por fetos y reproductoras abortadas y por sementales con infección natural.
- Figura 11 Relación entre el título de anticuerpos específicos y los antígenos del taquizoíto de *N. caninum* identificados.
- Figura 12 Patrón de reconocimiento de los antígenos del taquizoíto de *N. caninum* a lo largo de la gestación por dos vacas abortadas.
- Figura 13 Patrón de reconocimiento de los antígenos del taquizoíto de *N. caninum* a lo largo de la gestación por una vaca infectada no abortada.
- Figura 14 Esquema del estudio del valor diagnóstico de p-17.
- Figura 15 Reconocimiento de la p-17 por IgG de reproductoras con infección natural.
- Figura 16 Anticuerpos específicos detectados en reproductoras con infección natural mediante IFI y wb-17.
- Figura 17 Anticuerpos específicos detectados en reproductoras infectadas experimentalmente mediante IFI.
- Figura 18 Reconocimiento de la p-17 por IgG de reproductoras infectadas experimentalmente.
- Figura 19 Anticuerpos específicos detectados en reproductoras infectadas experimentalmente mediante wb-17.
- Figura 20 Reconocimiento de la p-17 por IgG de muestras precalostrales de terneros.
- Figura 21 Anticuerpos específicos detectados en terneros con infección natural mediante IFI y wb-17.
- Figura 22 Reconocimiento de la p-17 por IgG de terneros con reproductoras infectadas experimentalmente.
- Figura 23 Anticuerpos específicos detectados en terneros con madres reproductoras infectadas experimentalmente mediante IFI y wb-17.

- Figura 24 Reconocimiento de la p-17 por IgG de fetos abortados.
- Figura 25 Anticuerpos específicos detectados en fetos abortados mediante IFI y wb-17.
- Figura 26 Correlación entre títulos de IFI y valores de D.O. del wb-p17.
- Figura 27 Deglicosilación química de las proteínas del taquizoíto de *N. caninum*
- Figura 28 Perfil del RNA total y mRNA extraídos.
- Figura 29 Análisis de la síntesis del cDNA.
- Figura 30 Análisis de la presencia del cDNA tras el fraccionamiento por columna.
- Figura 31 Análisis mediante PCR de los insertos contenidos en las distintas u.f.p. tomadas al azar de la genoteca.
- Figura 32 Reconocimiento de antígenos de *N. caninum* por anticuerpos específicos desarrollados frente a proteínas localizadas en la fracción de 17-18 kDa.
- Figura 33 Inmunodetección de u.f.p. reconocidas por el APA-17 sobre membranas de nitrocelulosa.
- Figura 34 Inmunodetección y aislamiento del clon 4.1.
- Figura 35 Secuencia de nucleótidos del clon 4.1.
- Figura 36 Inmunodetección y aislamiento del clon 5.9.
- Figura 37 Secuencia de nucleótidos del clon 5.9.
- Figura 38 Inmunodetección y aislamiento del clon 10.5.
- Figura 39 Patrón de proteínas del taquizoíto de *N. caninum* visualizado en un gel bidimensional teñido con nitrato de plata.
- Figura 40 Reconocimiento de la p-17 por dos anticuerpos específicos en western blot bidimensional.
- Figura 41 Reconocimiento de la p-17 y p-33 por el APA-17 y por sueros de dos reproductoras con infección natural por *N. caninum* en western blot bidimensional.
- Figura 42 Reconocimiento de los antígenos inmunodominantes del taquizoíto de *N. caninum* por una reproductora abortada en western blot bidimensional.

LISTADO DE TABLAS

Tabla I	Aislados de <i>N. caninum</i> .
Tabla II	Aislados de <i>N. bughesi</i> .
Tabla III	Antígenos específicos de taquizoítos de <i>N. caninum</i> reconocidos por anticuerpos monoclonales.
Tabla IV	Proteínas clonadas de <i>N. caninum</i> .
Tabla V	Patrón de reconocimiento de antígenos inmunodominantes de <i>N. caninum</i> .
Tabla VI	Prevalencia de la infección por <i>N. caninum</i> en fetos bovinos abortados.
Tabla VII	Seroprevalencia individual de la infección por <i>N. caninum</i> en el ganado bovino.
Tabla VIII	Principales técnicas de PCR empleadas en el diagnóstico e investigación de <i>N. caninum</i> .
Tabla IX	Pruebas ELISA desarrolladas para el diagnóstico de la infección por <i>N. caninum</i> .
Tabla X	Cebadores utilizados en la reacción de PCR
Tabla XI	Cálculo del valor κ .
Tabla XII	Cálculo de las características diagnósticas.
Tabla XIII	Concordancia (κ) entre las diferentes técnicas serológicas.
Tabla XIV	Precisión del ELISA Civtest® y de la IFI: repetibilidad y reproducibilidad.
Tabla XV	Comparación de los resultados del ELISA Civtest® obtenidos en las diferentes poblaciones de referencia negativas.
Tabla XVI	Valores de la IFI y el ELISA Civtest® obtenidos para las diferentes poblaciones de referencia positivas.
Tabla XVII	Puntos de corte propuestos para la IFI y el ELISA Civtest® en función de la edad y el propósito de la técnica.
Tabla XVIII	Características diagnósticas de la IFI y el ELISA Civtest® y valores de prevalencia obtenidos en una población diana en función de los diferentes puntos de corte considerados para el ganado reproductor infectado.
Tabla XIX	Frecuencia e intensidad de reconocimiento de los antígenos del taquizoíto de <i>Neospora</i> por fetos y reproductoras abortadas y sementales con infección natural.
Tabla XX	Reconocimiento de los antígenos del taquizoíto a lo largo de la gestación en las reproductoras bovinas abortadas.
Tabla XXI	Reconocimiento de los antígenos del taquizoíto a lo largo de la gestación en las reproductoras bovinas infectadas.
Tabla XXII	Animales con infección natural: grupos y muestras analizadas.
Tabla XXIII	Animales con infección experimental: grupos y muestras analizadas.
Tabla XXIV	Análisis estadístico de las variaciones inter-grupo en el título de anticuerpos por IFI y en el reconocimiento de la p-17 en las reproductoras infectadas experimentalmente.
Tabla XXV	Concordancia (κ) entre la IFI y el wb p-17.
Tabla XXVI	Extracción del RNA total mediante el empleo de diversas pruebas comerciales.

Abreviaturas y siglas

aa	Aminoácido
AUC	Área bajo la curva
DNA	Ácido desoxirribonucleico
BrEt	Bromuro de etidio
BSA	Seroalbúmina bovina
BVDV	Virus de la diarrea vírica bovina
°C	Grados centígrados
C.E.	Concordancia esperada
C.O.	Concordancia observada
CV	Coefficiente de variación
2D-PAGE	Electroforesis en geles en dos dimensiones
DEPC	Dietilpirocarbamato
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxinucleósido trifosfato
D.O.	Densidad óptica
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
Esp	Especificidad
EST	Secuencias expresadas de cDNA
FBS	Suero fetal bovino
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GD	Gránulo denso
HC	Histología convencional
H.E.	Hematoxilina-eosina
H₀	Hipótesis nula
IDA	Antígeno inmunodominante
IEF	Isoelectroenfoque
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IFN-γ	Interferón- γ
IHQ	Inmunohistoquímica
IL-12	Interleuquina 12
i.m.	Intramuscular
IPTG	Isopropil- β -D-thiogalactopiranosido
Iscom	Complejo inmunoestimulante
K	kappa
kDa	Kilodalton
kb	Kilobase
λ	Longitud de onda
mVp	Membrana de la vacuola parasitófora
μg	Microgramo
MEM	Medio mínimo esencial
Mic	Micronemas
ORF	Fase de lectura abierta
p-17	Fracción proteica de 17 kDa
p-33	Fracción proteica de 33 kDa
p-36	Fracción proteica de 36 kDa
p-66	Fracción proteica de 66 kDa
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
p.i.	Postinfección
PM	Peso molecular
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
p/v	Relación peso/volumen
RNA	Ácido ribonucleico
Rop	Roptrias
Se	Sensibilidad
SDS	Dodecil sulfato sódico
SHI	Suero equino inactivado
TBS	Tampón tris salino
TNF-α	Factor de necrosis tumoral- α
u.f.p.	Unidades formadoras de placa
u.v.	Ultravioleta
vp	Vacuola parasitófora
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo
v/v	relación volumen/volumen
wb	Western blot
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactósido

1. ANTECEDENTES

La neosporosis se diagnosticó por primera vez en 1984 en Noruega (Bjerkas *et al.*, 1984) como una encefalopatía mortal en perros, que parecía estar asociada a un parásito similar a *Toxoplasma gondii*. Sin embargo, el nuevo género *Neospora* no fue descrito hasta 1988 junto con su única especie representativa hasta ese momento, *Neospora caninum* (Dubey *et al.*, 1988a). Seguidamente, Dubey *et al.* (1988b) obtuvieron el primer aislado de *N. caninum* en cultivo celular y en el ratón a partir de muestras de cerebro y músculos de origen canino. La obtención *in vitro* del primer aislado de *N. caninum* permitió el desarrollo de una prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para el diagnóstico serológico de la neosporosis y, un año más tarde, Lindsay & Dubey (1989b) desarrollaron una prueba de inmunohistoquímica para la detección del parásito en tejidos de animales infectados. Simultáneamente, Speer & Dubey en 1989 realizaron estudios sobre la ultraestructura de los taquizoítos, bradizoítos y quistes tisulares y Thilsted & Dubey (1989) describieron, por primera vez, a *N. caninum* como agente etiológico de abortos en el ganado bovino.

A partir de ese momento, las diferentes líneas de investigación centraron sus esfuerzos en estudiar los mecanismos de patogenicidad del parásito en diferentes modelos animales naturales y experimentales, así como en determinar las repercusiones de esta parasitosis en el ganado bovino mediante la realización de numerosos estudios de prevalencia en diversos países de todo el mundo. Los primeros estudios sobre los mecanismos de transmisión de *N. caninum* realizados por Lindsay & Dubey (90a, 90b) pusieron de manifiesto la importancia de la transmisión vertical del parásito y establecieron un modelo experimental en el ratón para el estudio de la patogenia de la infección. A comienzos de la década de los 90, Anderson *et al.* (1991) y Barr *et al.* (1991a) reconocieron a la neosporosis como la principal causa de aborto en el ganado bovino lechero de California, hecho que fue apoyado por los resultados obtenidos por diferentes grupos investigadores de otros países. Desde entonces, se han multiplicado los estudios para la obtención y caracterización de diversos aislados de *N. caninum*, no solo de origen canino sino también bovino (Conrad *et al.*, 1993a y Barr *et al.*, 1994b). Así mismo, se han desarrollado nuevas pruebas diagnósticas indirectas, como el enzimoimmunoensayo (ELISA), la prueba de aglutinación directa y el western blot (Börkman & Uggla, 1999; Atkinson *et al.*, 2000b) y directas como la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Lally *et al.*, 1996a; Yamane *et al.*, 1996; Holmdahl & Mattsson, 1996), incluyendo la PCR cuantitativa (Collantes-Fernández *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2002).

En el año 1998, se pusieron en evidencia dos de los aspectos más desconocidos de la neosporosis. Por una parte, McAllister *et al.* (1998) describieron al perro como el hospedador definitivo de *N. caninum* cerrando, de este modo, el ciclo biológico de *N. caninum*. Por otra parte, Marsh *et al.* (1996, 1998) propusieron una nueva especie dentro del género *Neospora*, *Neospora hughesi*, la cual originaba trastornos neurológicos en los caballos.

N. hughesi fue aislada a partir de tejido nervioso de un caballo adulto que presentaba sintomatología nerviosa (Marsh *et al.*, 1996; Marsh *et al.*, 1998). Posteriormente, diversos autores pusieron en evidencia las diferencias ultra estructurales, antigénicas, genéticas y de patogenicidad existentes entre esta nueva especie y *N. caninum* (Marsh *et al.*, 1998; Walsh *et al.*, 2000). Sin embargo, la información disponible sobre la biología de *N. hughesi* es muy escasa. Tan solo se conocen las fases asexuales del parásito y, únicamente, se han identificado dos antígenos inmunodominantes del taquizoíta de *N. hughesi*, NhSAG1 y NhSRS2, homólogos a los descritos en el taquizoíta de *N. caninum*, NcSAG1 y NcSRS2 (Marsh *et al.*, 1999). Además, se han aislado *in vitro* y caracterizado dos aislados de *N. hughesi* (Marsh *et al.*, 1996; Marsh *et al.*, 1998; Dubey *et al.*, 2001). En relación al ciclo biológico, el caballo es, por el momento, el único hospedador natural, mientras que la infección experimental se ha logrado en el ratón, el gerbo y el perro (Walsh *et al.*, 2000). Hasta el momento, no se han identificado las fases sexuales del parásito y se desconoce el hospedador definitivo, la prevalencia y las repercusiones clínicas de la infección.

1.1. CARACTERÍSTICAS DE *Neospora caninum*

1.1.1. Situación taxonómica

N. caninum se incluye dentro del phylum Apicomplexa, clase Sporozoea, subclase Coccidia, orden Eucoccidia, suborden Eimeriina y familia Sarcocystidae, junto con los géneros *Toxoplasma*, *Sarcocystis*, *Hammondia* y *Besnoitia* (Dubey *et al.*, 1988a; Ellis *et al.*, 1994). Los integrantes de la familia Sarcocystidae se caracterizan por tener ciclos biológicos heteroxenos y formar quistes en el hospedador intermediario. Todos ellos tienen como hospedadores intermediarios a diferentes especies de herbívoros y como hospedadores definitivos a diferentes especies de carnívoros. Estos últimos eliminan ooquistes sin esporular en las heces, los cuales, tras esporular en el medio ambiente, presentan en su interior dos esporoquistes con cuatro esporozoítos cada uno. Cabe destacar cuatro especies estrechamente relacionadas: *N.*

caninum, *T. gondii*, *H. hammondi* y *H. heydorni*, cuyos ooquistes tienen un tamaño similar. Sin embargo, estas especies presentan importantes diferencias tanto biológicas como estructurales, que justifican la existencia del género *Neospora* (Dubey *et al.*, 2002a; Dubey *et al.*, 2002b), previamente cuestionado por Mehlhorn & Heydorn (2000) y Heydorn & Mehlhorn (2002a,b).

Desde el punto de vista biológico, son notables las diferencias en cuanto a la composición antigénica, el ciclo biológico y las manifestaciones clínicas de la infección. El empleo de pruebas diagnósticas serológicas específicas ha permitido diferenciar a *N. caninum* de otras especies gracias a su diferente composición antigénica. Por otra parte, el perro es el hospedador definitivo de *N. caninum* y *H. heydorni*, mientras que el gato es el hospedador definitivo de *T. gondii* y *H. hammondi*. En cuanto a las manifestaciones clínicas, la parálisis del tercio posterior, que presentan los animales congénitamente infectados por *N. caninum*, es un síntoma que no se ha observado en otras especies en las que se ha diagnosticado una infección por *T. gondii* y, hasta el momento, se desconoce la relevancia clínica de *H. hammondi* y *H. heydorni* (Dubey *et al.*, 2002b).

También destacan las diferencias ultra estructurales, existentes entre estas especies, de los quistes tisulares y los taquizoítos. Los quistes tisulares de *N. caninum* presentan una pared quística más gruesa que los de *T. gondii* y *H. heydorni* (Speer *et al.*, 1999). Así mismo, la presencia, localización y el número de determinadas organelas en el citoplasma de los taquizoítos difieren en los tres géneros mencionados (Speer & Dubey 1989; Dubey *et al.*, 2002b).

Finalmente, una gran variedad de estudios sobre las secuencia genéticas y las relaciones filogenéticas existentes entre estos tres géneros han corroborado el hecho de que *N. caninum*, *T. gondii* y *H. heydorni* son especies diferentes (Ellis *et al.*, 1999b, Mugridge *et al.*, 1999; Mugridge *et al.*, 2000).

1.1.2. Morfología del parásito

En el ciclo biológico de *N. caninum* se han identificado tres estadios diferentes: los taquizoítos, los quistes tisulares con bradizoítos en su interior y los ooquistes. Los dos primeros son muy similares en *N. caninum* y *T. gondii* cuando se observan mediante microscopía óptica, si bien existen notables diferencias ultraestructurales. Los presentan una

morfología y una estructura típicas de las fases infectantes de los Apicomplexa, habiéndose descrito las siguientes estructuras: dos anillos polares, un conoide, una película integrada por un plasmalema y una membrana interna, 22 microtúbulos subpeliculares, micronemas, roptrias, una mitocondria, un núcleo, el aparato de Golgi, ribosomas, polisomas, gránulos densos, gránulos de amilopectina, cuerpos lipídicos, vesículas, retículo endoplásmico liso y rugoso y un poro posterior (Speer & Dubey, 1989; Lindsay *et al.*, 1993; Speer *et al.*, 1999).

Los taquizoítos de *N. caninum* son de morfología ovoide y su tamaño oscila entre 3-7 μm de longitud y 1-5 μm de anchura, dependiendo de la etapa de división en la que se encuentren. En su citoplasma se encuentran hasta 150 micronemas y de 8 a 18 roptrias. El número de micronemas es muy variable y pueden encontrarse orientados de forma perpendicular a la membrana interna. Las roptrias contienen material muy electrodensos y son de 2 a 4 veces más gruesas que los micronemas (Speer & Dubey, 1989; Speer *et al.*, 1999). Por otra parte, Lindsay *et al.* (1993) demostraron que la ultra estructura de los taquizoítos de tres aislados de origen canino -NC-1, NC-2 y NC-3- era muy similar.

Los quistes tisulares tienen forma redondeada u oval y pueden medir hasta 107 μm de longitud (Bjerkas & Dubey, 1991). Su pared, que puede llegar a medir más de 4 μm de grosor, está compuesta por una pared quística primaria y una capa granular gruesa. La pared primaria consiste en una única membrana, la cual tiene su origen en la membrana de la vacuola parasitófora, mientras que la capa granular contiene vesículas electrodensas incluídas dentro de una matriz electrodensa. En las fases iniciales de la formación del quiste, éste presenta un tamaño de aproximadamente 17 μm y una pared delgada y regular, mientras que los quistes maduros son más grandes y su pared es más gruesa con un mayor número de invaginaciones de la pared primaria. En su interior se pueden encontrar hasta 200 bradizoítos, los cuales son delgados, miden 6-8 μm de longitud por 1-1,8 μm de anchura y contienen las mismas organelas que los taquizoítos, aunque en los bradizoítos el número de roptrias es menor. Por otro lado, cabe destacar la ausencia de características estructurales diferenciales entre los quistes tisulares y los bradizoítos de origen canino y bovino (Speer & Dubey, 1989; Speer *et al.*, 1999).

Recientemente, se han aislado ooquistes de *N. caninum* procedentes de infecciones experimentales en el perro. Morfológicamente, se han observado pocas diferencias respecto a los de *T. gondii* y *H. heydorni*; tienen forma esférica y su tamaño es de 11,7 μm de longitud y

11,3 μm de anchura. En su interior, no se aprecia el cuerpo residual ooquistico. La pared del ooquiste es lisa, presenta un grosor de 0,6-0,8 μm y no contiene el micropilo. En su interior se encuentran dos esporoquistes elipsoidales (8,4 μm de longitud por 6,1 μm de anchura), cuya pared de 0,6-0,8 μm de grosor no contiene el cuerpo de Stieda. A su vez, en el interior de cada esporoquiste se encuentran cuatro esporozoítos (6,5 μm de longitud por 2,0 μm de anchura) y el cuerpo residual esporoquistico (Lindsay *et al.*, 1999c). Las fases sexual y asexual del parásito pueden completarse en el perro, si bien las fases enteroepiteliales del parásito no se han identificado hasta el momento (Dubey *et al.*, 2002a).

1.1.3. Biología del parásito

1.1.3.1. Rango de hospedadores

La infección natural por *N. caninum* se ha descrito, además de en el perro y en el ganado bovino, en la cabra (Barr *et al.*, 1992; Dubey *et al.*, 1996a), la oveja (Dubey & Lindsay, 1990), el caballo (Lindsay *et al.*, 1996c) y, recientemente, en el búfalo de agua (Dubey *et al.*, 1998b; Huong *et al.*, 1998; Guarino *et al.*, 2000) y en el camello (Hilali *et al.*, 1998). En animales silvestres, la infección ha sido detectada en el ciervo (Woods *et al.*, 1994; Dubey *et al.*, 1996b), el antílope (Peters *et al.*, 2001b), el mapache (Lindsay *et al.*, 2001b), el coyote (Lindsay *et al.*, 1996b), el zorro (Jakubek *et al.*, 2001; Schares *et al.*, 2001; Almería *et al.*, 2002b), el dingo (Barber *et al.*, 1997), felinos salvajes (Cheadle *et al.*, 1999) y el rinoceronte (Williams *et al.*, 2002). La infección experimental ha sido establecida en el ratón (Lindsay & Dubey, 1989d), la rata (Lindsay & Dubey, 1989e), el gerbo (Dubey & Lindsay, 2000), el gato (Dubey & Lindsay, 1989a,b), el perro (Dubey & Lindsay, 1989c), el coyote (Lindsay *et al.*, 1996b), el zorro (Scharés *et al.*, 2002b), la vaca (Barr *et al.*, 1994b; Davison *et al.*, 2001), la oveja (McAllister *et al.*, 1996b; Buxton, 1998; Buxton *et al.*, 1998; Buxton *et al.*, 2001; O'Handley *et al.*, 2002), la cabra (Lindsay *et al.*, 1995b), el cerdo (Jensen *et al.*, 1998), el macaco (Barr *et al.*, 1994a) y en diversas especies de pájaros (Baker *et al.*, 1995). El papel de cada una de estas especies hospedadoras en el ciclo biológico del parásito y su importancia en relación con la transmisión de la infección no están totalmente aclarados.

1.1.3.2. Ciclo biológico

Hasta el año 1998 tan solo se conocían algunas especies hospedadoras implicadas en el ciclo biológico de *N. caninum* y la única vía de transmisión demostrada era la transplacentaria. Los estudios experimentales de McAllister *et al.* (1998), fueron definitivos en el conocimiento de la biología de este parásito, ya que demostraron el papel del perro como hospedador definitivo de *N. caninum*, y, por consiguiente, el modo de transmisión horizontal. Tal y como se ha mencionado anteriormente, se conocen tres estadios del ciclo biológico de *N. caninum*, el taquizoíto, el quiste tisular con bradizoítos en su interior y el ooquiste.

Los taquizoítos, responsables de la fase aguda de la infección, pueden invadir una gran variedad de tipos celulares en el hospedador parasitado incluyendo macrófagos, neutrófilos, células neuronales, hepatocitos, fibroblastos, miocitos y células endoteliales de los vasos sanguíneos y renales (Dubey *et al.*, 1988b; Bjerkas & Presthus, 1989; Speer & Dubey, 1989). En los perros infectados que presentan cuadros de parexia los taquizoítos se encuentran con frecuencia en la musculatura estriada, aislándose fácilmente del músculo cuádriceps.

N. caninum es un parásito intracelular obligado, por tanto el reconocimiento de la célula hospedadora es un requisito necesario para que tenga lugar la invasión y multiplicación. Los taquizoítos penetran en la célula hospedadora mediante invasión activa en menos de 5 minutos, localizándose en el interior de una vacuola parasitófora en el citoplasma. El fenómeno de invasión celular ha sido ampliamente estudiado en cultivos celulares y conlleva un previo reconocimiento y adhesión a la célula hospedadora. En el interior de la vacuola parasitófora los taquizoítos se multiplican mediante endodiogenia, pudiendo albergar una célula más de 100 taquizoítos. Tras la ruptura celular, los taquizoítos salen al medio extracelular y en pocas horas se iniciarán los mecanismos de adhesión e invasión de nuevas células diana (Hemphill *et al.*, 1996). La destrucción celular y, por consiguiente, la enfermedad depende de un equilibrio entre la habilidad de los taquizoítos para penetrar y multiplicarse en la célula hospedadora y la habilidad del hospedador para inhibir la multiplicación del parásito.

Los quistes tisulares con bradizoítos en su interior, responsables de la fase crónica de la infección, han sido observados tanto en el tejido nervioso (cerebro, médula espinal, nervios periféricos y retina) de diversas especies con infecciones naturales y experimentales (Dubey *et al.*, 1988b; Barr *et al.*, 1992; Kobayashi *et al.*, 2001) como en el tejido muscular esquelético del

perro y de la vaca con infecciones naturales (Peters *et al.*, 2001a). Los mecanismos implicados en la conversión del taquizoíto en bradizoíto, y por tanto en el paso de una fase de infección aguda a una crónica, no han sido esclarecidos si bien están siendo objeto de estudio en la actualidad.

La transmisión horizontal, sin demostrar durante más de una década, se confirmó con la eliminación fecal de ooquistes sin esporular en perros de 8 semanas de edad, tras la administración de tejidos infectados por *N. caninum* procedentes de ratones infectados experimentalmente. Posteriormente, Lindsay *et al.* (2001a) corroboraron este hecho al detectar eliminación de ooquistes en perros que habían sido alimentados con tejido que contenía quistes tisulares procedente de ratones infectados con taquizoítos. Así mismo, comprobaron que los ooquistes eliminados esporulaban en el medio ambiente transcurridas 48-72 horas. Sin embargo, se desconoce si los perros pueden eliminar ooquistes tras la ingestión de ooquistes esporulados y no se han evidenciado las fases enteroepiteliales del parásito. Por otra parte, el bajo número de ooquistes eliminados en las heces de los perros puede ser un indicio de que, posiblemente, el perro no sea el mejor hospedador definitivo en la naturaleza (Lindsay *et al.*, 2001a). Se especula con la hipótesis de que otras especies puedan actuar como hospedadores definitivos. Las investigaciones que se han llevado a cabo en diversas especies de mustélidos (McAllister *et al.*, 1999) no han aportado información concluyente al respecto. Por el contrario, los estudios realizados en el zorro rojo (*Vulpes vulpes*) han demostrado que interviene como hospedador intermediario en el ciclo biológico de *N. caninum* al haberse diagnosticado la infección mediante la técnica de PCR y pruebas serológicas y no haberse detectado la eliminación de ooquistes en zorros con infección natural (Almería *et al.*, 2002b) ni con infección experimental (Schaes *et al.*, 2002b).

1.1.3.3. Resistencia a factores bióticos y abióticos

Los taquizoítos dejan de ser infectivos a las pocas horas de haberlos inoculado en el cultivo celular, si para entonces no han penetrado en la célula hospedadora (Hemphill *et al.*, 1996). Además, la presencia de agentes como el interferón- γ (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) en el medio extracelular pueden afectar a la adhesión e invasión celular puesto que inhiben la multiplicación intracelular del parásito (Innes *et al.*, 1995; Yamane *et al.*, 2000).

En los quistes, los bradizoítos conservan su capacidad infectante durante períodos de tiempo prolongados (al menos 1 año en cerebro de ratones con infección experimental) y son resistentes a la acción del HCl y la pepsina (Lindsay & Dubey, 1990b), lo que corrobora la hipótesis demostrada de que el hospedador definitivo es un carnívoro (perro). Los quistes tisulares pueden sobrevivir hasta 14 días a 4°C. Sin embargo, los bradizoítos conservados en tejido nervioso a -20°C mueren transcurridas 24 horas (Lindsay *et al.*, 1992). Posteriormente, McGuire *et al.* (1997a) estudiaron la viabilidad de los quistes tisulares separados del tejido nervioso, comprobando que los quistes eran resistentes a una solución de HCl-pepsina y los bradizoítos mantenían su infectividad tras ser sometidos a un tratamiento de criopreservación en nitrógeno líquido durante 36 días.

1.1.3.4. Aislados

El primer aislado de *N. caninum* -NC-1- se consiguió en EE.UU. a partir de tejido nervioso de perros infectados (Dubey *et al.*, 1988b). Desde ese momento, otros aislados, tanto de *N. caninum* de origen canino y bovino como de *N. hughesi* de origen equino, se han obtenido en diferentes países (Tablas I y II, respectivamente). Los primeros aislados de *N. caninum* fueron obtenidos directamente en cultivo celular, y, posteriormente, se han incluido ligeras modificaciones en la técnica de aislamiento incluyendo el aislamiento previo en ratones atímicos (Yamane *et al.*, 1998; Sawada *et al.*, 2000) y en gerbos (Gondim *et al.*, 2001).

Tabla I: Aislados de *N. caninum*.

Denominación	País	Origen	Muestra	Aislamiento	Referencia
NC-1	EE.UU.	Canino	SNC	Cultivo celular	Dubey <i>et al.</i> , 1988a,b
NC-2	EE.UU.	Canino	SNC	Cultivo celular	Hay <i>et al.</i> , 1990
NC-3	EE.UU.	Canino	SNC	Cultivo celular	Cuddon <i>et al.</i> , 1992
BPA-3	EE.UU.	Bovino (ternero)	SNC	Cultivo celular	Barr, 1993
BPA-4	EE.UU.	Bovino (ternero)	SNC	Cultivo celular	Barr, 1993
NC-Liv	Reino Unido	Canino	Cerebro	Cultivo celular	Barber <i>et al.</i> , 1993
BPA-1	EE.UU.	Bovino (feto)	Cerebro	Cultivo celular	Conrad <i>et al.</i> , 1993a
BPA-2	EE.UU.	Bovino (feto)	Cerebro	Cultivo celular	Conrad <i>et al.</i> , 1993a
JPA-1	Japón	Bovino (ternero)	Cerebro	Cultivo celular	Yamane <i>et al.</i> , 1996
NC-SweB1	Suecia	Bovino (ternero)	Cerebro	Cultivo celular	Stenlund <i>et al.</i> , 1997
NC-4	EE.UU.	Canino	SNC	Cultivo celular	Dubey <i>et al.</i> , 1998a
NC-5	EE.UU.	Canino	SNC	Cultivo celular	Dubey <i>et al.</i> , 1998a
JPA-2	Japón	Bovino (ternero)	SNC	Ratón y cultivo celular	Yamane <i>et al.</i> , 1998
JPA-4	Japón	Bovino (ternero)	SNC	Ratón y cultivo celular	Yamane <i>et al.</i> , 1998
JPA-5	Japón	Bovino (ternero)	SNC	Ratón y cultivo celular	Yamane <i>et al.</i> , 1998
BT2	Japón	Bovino (ternero)	SNC	Ratón y cultivo celular	Yamane <i>et al.</i> , 1998
NC-LivB1	Reino Unido	Bovino (ternero)	Cerebro	Cultivo celular	Davison <i>et al.</i> , 1999b
NC-PV1	Italia	Bovino (ternero)	Cerebro	Cultivo celular	Magnino <i>et al.</i> , 1999
KBA-1	Corea	Bovino (ternero)	Cerebro	Cultivo celular	Kim <i>et al.</i> , 2000
KBA-2	Corea	Bovino (feto)	Cerebro	Cultivo celular	Kim <i>et al.</i> , 2000
NC-GER1	Alemania	Canino	SNC	Ratón y cultivo celular	Peters <i>et al.</i> , 2000
BT-3	Japón	Bovino (vaca)	Cerebro	Ratón y cultivo celular	Sawada <i>et al.</i> , 2000
NC-Bahia	Brasil	Canino	Cerebro	Gerbo y cultivo celular	Gondim <i>et al.</i> , 2001
NC-Porto1	Portugal	Bovino (feto)	Cerebro	Ratón	Canada <i>et al.</i> , 2002
NC-Nowra	Australia	Bovino (ternero)	Cerebro	Ratón y cultivo celular	Miller <i>et al.</i> , 2002

Tabla II: Aislados de *N. bughesi*.

Denominación	País	Origen	Muestra	Aislamiento	Referencia
CN1	EE.UU.	Equino	SNC	Cultivo celular	Marsh <i>et al.</i> , 1996 Marsh <i>et al.</i> , 1998
Aislado Oregón	EE.UU.	Equino	Médula espinal	Cultivo celular	Dubey <i>et al.</i> , 2001

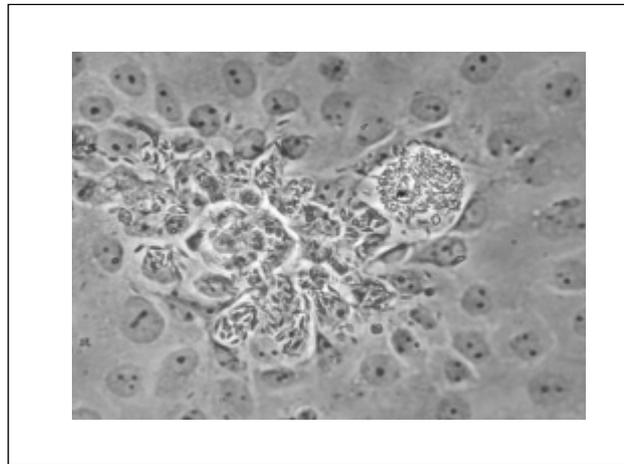
En la actualidad, la información disponible sobre la diversidad genética y biológica del parásito y sobre variaciones en la patogenicidad de los diferentes aislados es escasa. Tal diversidad podría estar relacionada con las diferentes manifestaciones clínicas que se han encontrado en el ganado bovino. En el estudio realizado por Barber *et al.* (1995) no se encontraron diferencias entre el aislado europeo (NC-Liv) y el americano (NC-1) en cuanto al crecimiento en cultivos celulares y a las características antigénicas y genéticas. Por el contrario, Lindsay *et al.* (1995a) sí detectaron diferencias en cuanto a la patogenicidad entre dos aislados de origen canino -NC-1 y NC-3-, al igual que Atkinson *et al.* (1999) entre el aislado NC-Liv y NC-SweB1. Además, el estudio realizado por Schock *et al.* (2001) puso de manifiesto las variaciones biológicas y genéticas existentes entre los aislados NC-1 y NC-Liv. En dicho estudio se compararon 6 aislados diferentes de *N. caninum* de origen canino y bovino -NC-1, NC-Liv, BPA1, NC-SweB1, JPA-2 y NC-LivB1- mediante un análisis de polimorfismo de amplificaciones aleatorias (RAPD), western blot y multiplicación en cultivo celular. Los resultados obtenidos destacan la mayor rapidez de crecimiento del aislado NC-Liv en comparación al resto de aislados, incluyendo el aislado NC-1, y el análisis RAPD reveló una variación genética significativa entre todos los aislados. Estos resultados *in vitro* reflejan los resultados obtenidos *in vivo* por Atkinson *et al.* (1999), donde también se encontraron diferencias biológicas y genéticas entre los aislados NC-SweB1 y NC-Liv, observándose una mayor patogenicidad del aislado NC-Liv en el modelo murino y diferencias genéticas mediante un análisis por la técnica de RAPD-PCR.

1.1.3.5. Cultivo *in vitro*

Inicialmente, los taquizoítos de *N. caninum* se cultivaron en monocitos bovinos y células endoteliales de arteria cardio-pulmonar bovina (Lindsay & Dubey, 1989c) y, posteriormente, se han cultivado en diferentes líneas celulares como las líneas Vero y Marc-145 (Fig. 1), células de riñón bovino y fibroblastos de piel humana. Los taquizoítos pueden mantenerse indefinidamente mediante su pase continuado en cultivo celular sin pérdida

aparente de su infectividad para el ratón, y mantienen su infectividad para los cultivos celulares tras su conservación en nitrógeno líquido (Dubey *et al.*, 2002a).

Figura 1: Cultivo celular de *N. caninum*.



En los cultivos celulares, transcurridos 45-60 minutos postinfección (p.i.), finaliza la invasión celular y comienza la endodiogenia apareciendo la primera generación de zoítos a las 8-10 horas p.i. (Hemphill *et al.*, 1996; Sundermann & Estridge, 1999). A las 36 horas p.i. se observan células infectadas con más de 10 taquizoítos incluidos en el interior de una vacuola parasitófora bien desarrollada. Seguidamente, el número de taquizoítos se multiplica exponencialmente pudiendo observarse más de 100 en una misma célula a los 4 días p.i. El efecto citopático en los cultivos celulares en monocapa se observa a los 3 días p.i., apreciándose la destrucción de las células infectadas y de la monocapa y quedando totalmente destruidos a los 4-6 días p.i.

El cultivo *in vitro* de los taquizoítos ha permitido, por una parte, estudiar las características ultraestructurales del parásito y los mecanismos de adhesión e invasión celular, y por otra, su utilización como antígeno en el desarrollo de pruebas diagnósticas.

1.1.3.6. Proteínas de *N. caninum*

El estudio de la composición antigénica de *N. caninum* es uno de los aspectos de este parásito que ha despertado mayor interés en la comunidad científica desde el primer aislamiento del parásito en cultivo celular. Además, su mantenimiento *in vitro* ha permitido purificar un elevado número de taquizoítos para la obtención y análisis de sus proteínas. En la

actualidad, numerosas investigaciones se están centrando en la identificación y caracterización de proteínas y glicoproteínas del parásito con interés inmunodiagnóstico e inmunoproláctico.

Howe *et al.* (1999) establecieron una nomenclatura común para denominar a las proteínas de *N. caninum*, lo cual facilita las comparaciones entre las diferentes especies de la subfamilia. De acuerdo con esta propuesta, las proteínas localizadas en micronemas se denominan con las siglas MIC o MAP (proteínas asociadas a micronemas); los gránulos densos contienen proteínas denominadas GRA; las proteínas de roptrias se denominan ROP y los antígenos de superficie se designan como SAG o SRS. Según se han ido descubriendo nuevas proteínas se han añadido números a las siglas, de tal modo que, por ejemplo, las proteínas de micronemas de *T. gondii* se denominan TgMIC1, TgMIC2 y, así, sucesivamente. En el caso de *N. caninum*, las proteínas homólogas que se han caracterizado se denominan de igual forma empleando el prefijo “Nc”.

1.1.3.6.1. Variaciones inter-específicas e intra-específicas

En el estudio de la composición proteica deben tomarse en consideración las posibles variaciones existentes entre las dos especies de *Neospora* descritas, hasta el momento, -*N. caninum* y *N. hughesi*- y entre el género *Neospora* y el género más cercano en la escala filogenética, *Toxoplasma* (variaciones inter-específicas). Así mismo, la composición antigénica de *N. caninum* podría variar en función del aislado, o de la fase del ciclo biológico del parásito objeto de estudio (variaciones intra-específicas).

1.1.3.6.1.1. Variaciones inter-específicas

1.1.3.6.1.1.a *Neospora* y *Toxoplasma*

El patrón antigénico de *Neospora* varía considerablemente con respecto al de *Toxoplasma* en western blot (Bjerkas *et al.*, 1994). Sin embargo, se han observado ligeras reacciones cruzadas entre los antígenos de 46, 88 y 97 kDa de *Neospora* con los antígenos de 45, 66 y 85 kDa de *Toxoplasma* bajo condiciones reductoras y no reductoras. Cole *et al.* (1994) también detectaron un antígeno del taquizoíto de 107 kDa de *T. gondii* con un anticuerpo monoclonal de ratón -6G7-, desarrollado frente a taquizoítos de *N. caninum* y, mediante microscopía electrónica, estas reacciones cruzadas fueron observadas con antígenos de los

miconemas y roptrias de *T. gondii*. Con posterioridad, Fuchs *et al.* (1998) describieron reacciones cruzadas con los antígenos de 40, 43 y 48 kDa de *T. gondii*, los cuales fueron detectados por un suero policlonal de conejo anti-*Neospora*. Todas estas evidencias sugieren la existencia de algunos epítomos comunes compartidos por ambas especies, si bien éstos no son frecuentes. En este sentido, en los estudios realizados con la proteína NcGRA7 por Hemphill *et al.* (1998), ni el anticuerpo policlonal anti-*N. caninum* ni el anticuerpo purificado por afinidad frente a dicho antígeno reconocieron por inmunofluorescencia o western blot proteínas del taquizoíto de *T. gondii*. Así mismo, dos de las proteínas de superficie de los taquizoítos de *N. caninum*, Nc-p43 (NcSRS2) y Nc-p36 (NcSAG1), tampoco presentaron reacciones cruzadas con un suero anti-*Toxoplasma* (Hemphill *et al.* 1997a; 1997b), confirmando la existencia de diferencias entre *N. caninum* y *T. gondii* con relación a la expresión de moléculas intracelulares y de superficie (Hemphill *et al.*, 1998; Howe *et al.*, 1999).

1.1.3.6.1.1.b *N. caninum* y *Neospora hughesi*

En lo que concierne a las dos especies del género *Neospora* -*N. caninum* y *N. hughesi*-, los escasos trabajos realizados hasta el momento han detectado diferencias ultraestructurales, antigénicas y en la secuencia genética, (Marsh *et al.*, 1998; Walsh *et al.*, 2001). En el estudio realizado por Walsh *et al.* (2001) se comparó la expresión de dos proteínas inmunodominantes del género *Neospora* -SAG1 y SRS2- en ambas especies, que presentaron 6 y 9% de diferencia en la identidad aminoacídica, respectivamente. Así mismo, se detectaron diferencias en los epítomos conformacionales de estas proteínas cuando se analizó el reconocimiento de los anticuerpos monoclonales desarrollados frente a dichas proteínas.

1.1.3.6.1.2. Variaciones intra-específicas

1.1.3.6.1.2.a Aislados de *N. caninum*

Aunque las diferencias genéticas y biológicas entre los diferentes aislados son evidentes, tal y como se ha mencionado previamente en el apartado 1.1.3.4., éstas no son tan claras cuando se analiza el perfil antigénico. En el estudio realizado por Atkinson *et al.* (1999) los sueros de ratones infectados experimentalmente con dos aislados, uno de origen canino -NC-Liv- y otro de origen bovino -NC-SweB1-, reconocieron los mismos antígenos del taquizoíto de *N. caninum* por western blot. La diferencia más destacada corresponde,

únicamente, a una mayor intensidad de reconocimiento de una banda de 50 kDa por parte de los sueros procedentes de los ratones infectados con el aislado NC-Liv. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Barber *et al.* (1995), Paré *et al.* (1995) y Schock *et al.* (2001), en los cuales se observó un perfil antigénico idéntico en todos los aislados analizados cuando se utilizaba tanto suero de ganado bovino infectado, como suero policlonal de conejo inmunizado.

1.1.3.6.1.2.b Antígenos específicos de estadio

En lo que se refiere a la comparación de la composición antigénica entre el taquizoíto -fase responsable de la infección aguda- y el bradizoíto -fase responsable de la infección crónica- la información disponible hasta el momento es escasa, ya que tan solo se ha realizado un estudio en el que se identificaron antígenos específicos del taquizoíto y/o bradizoíto (Fuchs *et al.*, 1998), hecho que contrasta con los estudios realizados en *Toxoplasma*, donde son varios los antígenos específicos de estadio identificados y caracterizados.

En cuanto a los antígenos específicos del taquizoíto de *Toxoplasma* destacan los antígenos de superficie p22 (SAG2A; Prince *et al.*, 1990), p23 (SAG2B; Lekutis *et al.*, 2000), p30 (SAG1; Burg *et al.*, 1988), y p60 (Reichmann *et al.*, 1997). Así mismo, se han descrito 12 antígenos específicos y exclusivos de bradizoíto: 7 de superficie -p18 (SAG4; Soète *et al.*, 1993), p21 (Soète *et al.*, 1993), p34 (Soète *et al.*, 1993), p36 (BSR4 Soète *et al.*, 1993; Ödberg-Ferragut *et al.*, 1996; Knoll & Boothroyd, 1998), p31,4 (LDH2; Soète *et al.*, 1993); p22 (SAG2C, SAG2D y SAG2E; Soète *et al.*, 1993; Lekutis *et al.*, 2000) y SAG5A (Soète *et al.*, 1993; Spano *et al.*, 2002), 3 de la matriz quística -p29, p30 (Zhang & Smith, 1995; Lane *et al.*, 1996) y p65 (MAG1; Parmley *et al.*, 1994)-, uno de la pared quística (p116; Zhang *et al.*, 2001) y dos proteínas citoplasmáticas de 20 kDa (High *et al.*, 1994) y 28 kDa (BAG1; Bohne *et al.*, 1995). Finalmente, se han identificado varias moléculas compartidas por el taquizoíto y el bradizoíto (Darcy *et al.*, 1989), entre las cuales destacan las proteínas p28,5 (GRA2; Mercier *et al.*, 1993), p29 (GRA7; Fischer *et al.*, 1998), p39, p43 (SAG3; Cesbron-Delauw *et al.*, 1994)-, p63 y SAG5B y C (Spano *et al.*, 2002).

En consonancia con lo anteriormente expuesto para *T. gondii*, en *N. caninum* también se han identificado antígenos específicos del taquizoíto y antígenos compartidos por el taquizoíto y el bradizoíto. En el estudio realizado por Fuchs *et al.* (1998) se analizaron tres antígenos

específicos de *N. caninum*, uno de gránulos densos -NcGRA7-, y dos se superficie -NcSAG1 y NcSRS2-. Los resultados obtenidos demuestran la existencia de antígenos compartidos entre los taquizoítos y los bradizoítos de *N. caninum*, si bien también se identificaron antígenos específicos de cada uno de los estadios. Mientras que el antígeno NcSAG1 se expresa exclusivamente en taquizoítos, el NcGRA7 y NcSRS2 se expresan de forma conjunta en los taquizoítos y en los bradizoítos. En otro estudio realizado por Schares *et al.* (1999b) se identificó una proteína de superficie exclusiva de taquizoítos -p38- mientras que otra proteína de 61 kDa fue detectada por un anticuerpo monoclonal tanto en los taquizoítos como en los bradizoítos. Recientemente, Sonda *et al.* (2000) y Keller *et al.* (2002) han identificado dos proteínas de micronemas (NcMIC3 y NcMIC1, respectivamente) que se expresan en ambos estadios del parásito.

En relación a los antígenos específicos del bradizoíto de *Neospora* no se ha identificado ninguno hasta el momento, debido a la dificultad de obtener quistes con bradizoítos tanto *in vitro* como *in vivo*.

1.1.3.6.2. Localización y función de las proteínas de *N. caninum*

La identificación, caracterización y localización de los antígenos del parásito pueden ayudar a determinar el posible papel de éstos en los mecanismos de adhesión, invasión y multiplicación de *N. caninum*.

Al contrario que otros patógenos intracelulares, los cuales penetran en la célula hospedadora mediante fenómenos de fagocitosis o endocitosis, los parásitos Apicomplexa realizan la invasión de la célula mediante un proceso activo en el cual intervienen procesos de motilidad, adhesión a moléculas de superficie y penetración en la célula hospedadora. Para llevar a cabo estos procesos complejos de adhesión e invasión celular, los Apicomplexa cuentan con un gran número de proteínas específicas. La característica más importante de los zoítos (fases invasivas) de este grupo es el denominado complejo apical localizado en el extremo anterior del parásito (Blackman & Bannister, 2001). En la mayoría de los parásitos del phylum Apicomplexa el complejo apical interviene en el reconocimiento y penetración de las células hospedadoras (Hemphill *et al.*, 1999). Antes, durante y después de la invasión celular, moléculas específicas son secretadas por organelas secretoras específicas -gránulos densos,

roptrias y micronemas-, la mayoría de las cuales se localizan en el extremo anterior del parásito formando parte del complejo apical.

Considerando que *N. caninum* y *T. gondii* son parásitos estrechamente relacionados, las moléculas de superficie y las asociadas a las organelas secretoras descritas, hasta el momento, han puesto de manifiesto un alto grado de homología entre ambos parásitos (Hemphill *et al.*, 1999; Howe & Sibley 1999).

Se ha realizado un esfuerzo considerable para identificar y caracterizar las proteínas del taquizoíto de *N. caninum*, mediante diferentes abordajes. Para ello, se han producido anticuerpos monoclonales y sueros policlonales, los cuales se han empleado en ensayos de inmunolocalización de proteínas específicas del taquizoíto, así como en la inmunodetección de clones que expresan proteínas recombinantes de *N. caninum* sobre genotecas de cDNA de taquizoítos (Hemphill *et al.* 1999). Mediante el empleo de anticuerpos monoclonales, se han identificado proteínas citoplasmáticas, y de membrana, algunas de las cuales han demostrado ser inmunodominantes (Björkman & Hemphill, 1998; Howe *et al.*, 1998; Schares *et al.*, 1999b; Nishikawa *et al.* (2000b) (Tabla III).

Por su parte, mediante el cribado de las genotecas de cDNA de *N. caninum*, con sueros policlonales de animales infectados y sueros policlonales monoespecíficos purificados por afinidad (APAs), se han aislado y caracterizado diversas proteínas recombinantes de *Neospora*, algunas de las cuales han sido utilizadas en pruebas de ELISA y en preparaciones vacunales. En la Tabla IV se recogen las proteínas de *N. caninum* que han sido clonadas.

Tabla III: Antígenos específicos de taquizoítos de *N. caninum* reconocidos por anticuerpos monoclonales.

Anticuerpo monoclonal	Peso molecular de los antígenos reconocidos (kDa)		Epítipo glicosilado	Localización celular del antígeno#		Referencia
	a	b		IFI	ME	
6G7	-	31, 34, 38,5 43, 70, 80, 90 y 97,4	-	Superf	Superf, VP, GD, Mic, Rop	Cole <i>et al.</i> , 1994
4A4-2	-	65	Sí	Superf	-	Baszler <i>et al.</i> , 1996
D9	-	42	-	Intracitopl	GD	Sundermann <i>et al.</i> , 1997
Ncmab-4	30/32	30/32	No	Superf Intracitopl	Superf GD	Björkman & Hemphill, 1998
Ncmab-7	18	18	Sí	Superf Intracitopl	Superf	Björkman & Hemphill, 1998
Ncmab-10 y 17	41	41	No	Intracitopl	Superf	Björkman & Hemphill, 1998
Ncmab-13 y 24	Ninguno	61	No	-	-	Björkman & Hemphill, 1998
5H5 y 4H7	35	-	-	-	Superf	Howe <i>et al.</i> , 1998
6C11	29	-	-	Superf	Superf	Howe <i>et al.</i> , 1998
6D12-G10						Sasai <i>et al.</i> , 1998
1.11.1.	40 (38, 36)	-	Sí	Superf	-	Schares <i>et al.</i> , 1999b
5.2.15	38 (36, 33)	-	No	-	Superf	Schares <i>et al.</i> , 1999b
4.11.5	33 (22, 28, 42)	33 (22, 24, 28)	No	Intracitopl	GD, VP	Schares <i>et al.</i> , 1999b
4.7.12	19	19	No	Superf	-	Schares <i>et al.</i> , 1999b
1E3	-	70	-	Superf	-	Nishikawa <i>et al.</i> , 2000b
1F3	-	70	-	Superf	-	Nishikawa <i>et al.</i> , 2000b
1B8	43	43	-	Superf	-	Nishikawa <i>et al.</i> , 2000b
2C8	43	43	-	Superf	-	Nishikawa <i>et al.</i> , 2000b
2G2	43	43	-	Superf	-	Nishikawa <i>et al.</i> , 2000b
1A5	42	42	-	Parte anterior	-	Nishikawa <i>et al.</i> , 2000b
1C7	36	-	-	Superf	-	Nishikawa <i>et al.</i> , 2000b
2C11	36	36	-	Superf	-	Nishikawa <i>et al.</i> , 2000b

a: Peso molecular estimado en condiciones no reductoras

b: Peso molecular estimado en condiciones reductoras

Superf: Superficie; Intracitopl: Intracitoplasmático; GD: Gránulos densos; VP: Vacuola parasitófora;

Mic: Micronemas; Rop: Roptrias

Tabla IV: Proteínas clonadas de *N. caninum*.

Nomenclatura	Aislado	Peso molecular (kDa)		Anticuerpo empleado*	Localización (estadio T/B)	Base de datos	Referencia
		Estimado	Aparente a b				
NcSAG1	NC-1	28,2	29 36	Mab 6C11 APA conejo	Superficie (T)	AF132217 AJ005664	Howe <i>et al.</i> , 1998 Hemphill & Gottstein 1996
NcSRS2	NC-1	34,1	35 43	Mab 5H5 APA conejo	Superficie (T y B)	AF061249 U93870	Howe <i>et al.</i> , 1998 Hemphill <i>et al.</i> , 1997a
N54	BPA1	-	29	vaca (N y E)	-	U76556	Louie <i>et al.</i> , 1997
N57	BPA1	-	20	vaca (N y E)	-	U36386	Louie <i>et al.</i> , 1997
NcGRA7	NC-1	20,3	33	vaca (E), feto bovino (N)	GD	U82229	Lally <i>et al.</i> , 1997
NcGRA6	NC-1	19/ 24	37	vaca (E), feto bovino (N)	GD	AF029350	Liddell <i>et al.</i> , 1998
Nc-NTPasa	NC-1	-	67	APA conejo	GD	AB010444	Asai <i>et al.</i> , 1998
NcGRA2	NC-Liv	26	29	vaca (N)	GD	AF061273	Ellis <i>et al.</i> , 2000b
NcSUB1	BPA-1	71	55 65	APA conejo	Micronemas (T)	AF139114	Louie & Conrad, 1999; Louie <i>et al.</i> , 2002
NcMIC2	NC-1	80	95 115	APA conejo	Micronemas	AF061273	Lovett <i>et al.</i> , 2000
Nc-MIC3	NC-1	38	40,2	APA conejo	Micronemas GD (T y B)	AF198615	Sonda <i>et al.</i> , 2000
NcGRA1	NC-Liv	15	20	APA ratón vaca (N)	-	AF199030	Atkinson <i>et al.</i> , 2001
P20	NC-Liv	12/ 17,8	20	APA ratón vaca (N)	-	AF200534	Atkinson <i>et al.</i> , 2001
NcMIC1	NC-1	-	50 60	APA conejo	Micronemas (T y B)	AF421187	Keller <i>et al.</i> , 2002

a: Condiciones no reductoras; b: Condiciones reductoras

* Anticuerpo empleado en el cribado de la genoteca y/o en la caracterización de las proteínas

GD: Gránulos densos

T: taquizoíto; B: bradizoíto

1.1.3.6.2.1. Superficie

Las proteínas que forman parte de la superficie celular son imprescindibles en la supervivencia del parásito, ya que están implicadas en los procesos previos de adhesión e invasión celular, siendo las responsables de iniciar las interacciones entre el patógeno y las moléculas de la superficie de la célula y de estimular la respuesta inmune desarrollada por el hospedador. (Hemphill *et al.*, 1996).

Björkman *et al.* (1994) identificaron las primeras proteínas de 17-18 y 30-45 kDa de la superficie de *N. caninum* por western blot. Posteriormente, estos antígenos fueron estudiados más específicamente con seis anticuerpos monoclonales (Björkman & Hemphill, 1998) (Tabla III), caracterizando, de este modo, los antígenos inmunodominantes de 18, 30, 32 y 41 kDa. Así mismo, Schares *et al.* (1999b) identificaron tres antígenos de superficie de 19, 28 y 40 kDa que parecían coincidir con los anteriormente descritos.

La primera proteína de superficie de *N. caninum* clonada fue la proteína NcSRS2 de 43 kDa (Hemphill *et al.*, 1996; Hemphill & Gottstein, 1996; Hemphill *et al.*, 1997a), cuyos epítomos son mayoritariamente de naturaleza proteica. Esta proteína está considerada como uno de los antígenos inmunodominantes de *Neospora*. y parece coincidir con la proteína p35 descrita por Howe *et al.* (1998). Esta proteína presenta homología con proteínas SRS de *T. gondii* y, debido a la ausencia de reacciones cruzadas con *T. gondii*, podría ser un candidato para el inmunodiagnóstico (Hemphill *et al.*, 1996).

Hemphill *et al.* (1997b) caracterizaron la glicoproteína SAG1 de 36 kDa localizada tanto en la superficie del parásito como en el interior de los gránulos densos, y Howe *et al.* (1998) clonaron una proteína idéntica a NcSAG1 de 29 kDa, cuyo homólogo en *T. gondii* es la proteína TgSAG1 de 30 kDa.

1.1.3.6.2.2. Gránulos densos

Los gránulos densos son organelas secretoras, que se localizan en el extremo anterior y posterior del parásito. Las moléculas que secretan los gránulos densos se dirigen bien hacia la superficie del parásito, facilitando la interacción del zoíto con la célula hospedadora y su posterior invasión, o son secretadas dentro de la vacuola parasitófora durante y después de la penetración en la célula hospedadora formando parte del entramado y de la membrana de la vacuola parasitófora. La secreción de estas proteínas tiene lugar durante el periodo de multiplicación intracelular del parásito. Hasta el momento, no se ha determinado el papel que juegan estas moléculas en el mantenimiento y multiplicación del parásito dentro de la célula hospedadora, pero sí que se han realizado diversos estudios sobre la función y la composición molecular de los gránulos densos en géneros como *Sarcocystis*, *Plasmodium*, *Babesia* y *Toxoplasma*.

En *N. caninum* poco se conoce sobre los componentes de las diferentes organelas secretoras. Las primeras proteínas de gránulos densos fueron identificadas mediante la técnica de western blot con sueros procedentes de diversas especies con infección natural y experimental (Bjerkas *et al.*, 1994). En dicho estudio, se identificaron dos proteínas inmunodominantes de 29 y 30 kDa reconocidas por sueros de diferentes especies asociadas a los gránulos densos y a la membrana de la vacuola parasitófora.

Lally *et al.* (1996b) clonaron dos proteínas de gránulos densos del taquizoíto de *Neospora* -NcGRA6 y NcGRA7 de 37 y 33 kDa, respectivamente- y demostraron su utilidad diagnóstica cuando se emplearon en una prueba de ELISA. Posteriormente, Hemphill *et al.* (1998) comprobaron que esta proteína es secretada a la membrana de la vacuola parasitófora, apareciendo más tarde asociada a la matriz de la vacuola parasitófora.

A parte de las proteínas NcGRA6 y NcGRA7, otras proteína de gránulos densos de 29 y 67 kDa, denominadas NcNTPasa-I (Asai *et al.*, 1998) y NcGRA2 (Ellis *et al.*, 2000b), respectivamente, han sido identificadas y caracterizadas. La proteína NcGRA2 presenta una identidad del 50% con su homóloga en *T. gondii* -TgGRA2-, mientras que la proteína NcNTPasa-I presentó reacciones cruzadas y una identidad del 69% con las proteínas de *T. gondii* NTPasa-I y NTPasa-II.

1.1.3.6.2.3. Roptrias

Las roptrias son organelas que están relacionadas con la invasión de la célula hospedadora y el establecimiento temprano de la infección (Bjerkas *et al.*, 1994; Dubremetz, 1998), y algunas de ellas forman parte de la vacuola parasitófora. Únicamente, se ha identificado una proteína de roptrias de 17 kDa de *Neospora*. Dicha proteína no ha sido clonada hasta el momento, pero sí está considerada como inmunodominante (Barta *et al.*, 1992). Estos resultados concuerdan con los hallazgos obtenidos en otros coccidios, donde los antígenos inmunodominantes están asociados a las roptrias y a los gránulos densos.

1.1.3.6.2.4. Micronemas

Los micronemas tienen funciones relacionadas con la invasión y adhesión celular. Para llevar a cabo estas funciones, el contenido de los micronemas es secretado por la zona apical

de los zoítos, posiblemente en el momento del contacto inicial con la célula hospedadora, distribuyéndose sobre la superficie del parásito. Una vez en la superficie del parásito, las proteínas de los micronemas intervienen en la interacción con las moléculas de la célula hospedadora estableciéndose una fuerte unión entre el parásito y la célula para, de esta forma, iniciar el proceso de invasión activa. Mientras que en *T. gondii* se han identificado 9 proteínas de micronemas (Rabenau *et al.*, 2001), en *N. caninum* tan solo se han caracterizado tres, NcMIC3, NcMIC2 y NcMIC1 de 38, 95 y 60 kDa, respectivamente (Sonda *et al.*, 2000; Lovett *et al.*, 2000; Keller *et al.*, 2002).

NcMIC3 ha sido identificada como uno de los antígenos inmunodominantes de *N. caninum* (Sonda *et al.*, 2000). De acuerdo con los resultados obtenidos por Naguleswaran *et al.* (2001), la proteína NcMIC3 se localiza exclusivamente en los micronemas de los taquizoítos intracelulares. Los estudios de inmunolocalización apuntan a una localización variable de esta proteína dentro del parásito y dependiente de la fase de invasión en la que se encuentre. Por su parte, a la proteína NcMIC2 también se le atribuye un papel en la adhesión e invasión celular. Recientemente, se han incluido en el banco de genes dos secuencias de *Neospora* denominadas NcMIC10 y NcMIC11, que podrían codificar dos proteínas de micronemas, ya que sus secuencias genómicas presentan una homología elevada con las secuencias que codifican las proteínas de *T. gondii* TgMIC10 y TgMIC11, respectivamente.

Finalmente, la única enzima clonada de *Neospora* es una serin-proteasa de 65 kDa (Louie & Conrad, 1997; Louie *et al.*, 2002) localizada en los micronemas del taquizoíto y denominada NcSUB1, la cual presenta una elevada identidad aminoacídica con la proteína de *T. gondii* denominada TgSUB1.

1.3.6.3. Proteínas relevantes desde el punto de vista diagnóstico y vacunal

Se han descrito una serie de antígenos inmunodominantes de *Neospora* cuyos pesos moleculares difieren entre los diferentes estudios realizados (Tabla V). Al menos 20 antígenos específicos de *N. caninum* fueron descritos por primera vez por Barta *et al.* (1992). Dichos antígenos, cuyos pesos moleculares oscilaban entre los 16 y 80 kDa se localizaron en su mayoría en las organelas del taquizoíto y fueron reconocidos por un suero policlonal de conejo. Por otro lado, sueros procedentes de diferentes especies de animales con infecciones

naturales y experimentales, incluyendo el ganado bovino y los perros, reconocieron 4 antígenos inmunodominantes -17, 29, 30 y 37 kDa- y varios antígenos menores de *N. caninum* (Bjerkas *et al.*, 1994). Otros autores, han obtenido resultados similares en cuanto al patrón de reconocimiento en western blot por sueros de vacas con infección natural (Paré *et al.*, 1995, Stenlund *et al.*, 1997; Schares *et al.*, 1999a; Atkinson *et al.*, 2000a), si bien no concuerdan con los obtenidos por Baszler *et al.* (1996) y Harkins *et al.*, (1998). En el estudio realizado por Baszler *et al.*, (1996) los sueros de vacas y los fluidos fetales detectaron mayoritariamente tres antígenos cuyos pesos moleculares fueron de 25, 65 y 116 kDa, mientras que en el estudio de Harkins *et al.*, (1998) los sueros de vacas con infección natural, y sueros procedentes de ovejas y cabras con infección experimental presentaron un patrón de reconocimiento antigénico diferente.

En cuanto al empleo de antígenos específicos de *N. caninum* en preparaciones vacunales destacan los estudios realizados por Nishikawa *et al.* en los que se valoró el empleo de vacunas de subunidades. En concreto, se evaluó la eficacia de la proteína NcSRS2 y SAG1 en ratones para prevenir tanto la infección (Nishikawa *et al.*, 2001a) como la transmisión vertical (Nishikawa *et al.*, 2001f). En ambos casos se empleó como vector de expresión el virus vaccinia obteniéndose resultados alentadores. Mientras que la proteína SRS2 confirió una protección eficaz frente a la infección y la transmisión vertical en ratonas gestantes al estimular una respuesta inmune de tipo Th1, la protección obtenida con la proteína SAG1 fue parcial detectándose una producción tardía de IgG. Además, cuando la proteína SRS2 se empleó para inmunizar perros, se consiguió estimular la producción de anticuerpos específicos (Nishikawa *et al.*, 2000a).

Tabla V: Patrón de reconocimiento de antígenos inmunodominantes de *N. caninum*.

Peso molecular (kDa)		Sueros (tipo de infección N/ E)*	Localización celular #	Referencia
a	b			
16	17	conejo (E)	organelas	
29	31	conejo (E)	organelas	
31	34	conejo (E)	organelas	
32	37	conejo (E)	organelas	
37	40,5	conejo (E)	organelas	Barta & Dubey, 1992
46	47	conejo (E)	organelas	
51	50	conejo (E)	organelas	
56	55	conejo (E)	organelas	
79	65	conejo (E)	organelas	
17		vaca, perro, oveja, cabra, cerdo (N y E)	Roptrias	
29		vaca, perro, oveja, cabra, cerdo (N y E)	GD mVP	Bjerkas <i>et al.</i> , 1994
30		vaca, perro, oveja, cabra, cerdo (N y E)	GD mVP	
37		vaca, perro, oveja, cabra, cerdo (N y E)	-	
25		vaca, fetos bovinos	-	
65		vaca, fetos bovinos	-	Baszler <i>et al.</i> , 1996
116		vaca, fetos bovinos	-	
17		vaca (N)	superficie	
29		vaca (N)	-	Schares <i>et al.</i> , 1999b
30		vaca (N)	-	
33		vaca (N)	GD	
37		vaca (N)	superficie	
	16/17	vaca, terneros (N)	-	
	29/39	vaca, terneros (N)	-	
	30-36	vaca, terneros (N)	-	Atkinson <i>et al.</i> , 2000a
	37	vaca, terneros (N)	-	
	45	vaca, terneros (N)	-	

a: Peso molecular estimado en condiciones no reductoras

b: Peso molecular estimado en condiciones reductoras

* N: Natural; E: Experimental

GD: Gránulos densos; mPV: Membrana de la vacuola parasitófora

1.3.6.4. Perspectivas futuras

En la actualidad están en marcha varios proyectos de secuenciación del genoma de diversos parásitos con perspectivas para el inmunodiagnóstico y la inmunoprofilaxis (Tarleton *et al.*, 2001).

Los genomas de los Apicomplexa más importantes son relativamente pequeños (10-270 Mb), la mayoría de los cuales contienen menos de 100 Mb, hecho que facilita la secuenciación e identificación de genes de interés. Dos de los proyectos que están en marcha en la actualidad corresponden a la secuenciación del genoma de *N. caninum* y *T. gondii*. Hasta el momento, la información disponible sobre *Neospora* en las diferentes bases de datos es muy limitada, habiéndose incluido hasta el momento tan solo 3366 secuencias expresadas (ESTs) en el banco de genes comparado con las más de 16000 ESTs descritas en *Toxoplasma*. Por otra parte, hay que destacar que mientras que en *Neospora* todas las ESTs corresponden al taquizoíto, en *Toxoplasma* 3000 ESTs corresponden al bradizoíto.

Los avances conseguidos en el campo de la genómica están íntimamente relacionados con la proteómica, ya que una vez identificada la secuencia de un gen el siguiente paso a seguir es la identificación de los genes relevantes desde el punto de vista biológico entre los miles de genes que se expresan en un organismo. En el campo de la proteómica destaca la electroforesis en dos dimensiones y la espectrometría de masas, que permiten identificar y caracterizar nuevas dianas terapéuticas (Page *et al.*, 1999). El empleo de la electroforesis y western blot en dos dimensiones ha conducido a la caracterización de diversas proteínas de *T. gondii*, entre las cuales cabe destacar una proteína de gránulos densos -TgGRA7 (Fischer *et al.*, 1998)-, una de micronemas -TgM2AP (Rabenau *et al.*, 2001)- y una glicoproteína de la pared quística -TgCST1 de 116 kDa (Zhan *et al.*, 2001). Recientemente, Cohen *et al.* (2002) han identificado otras proteínas de *T. gondii* como la TgGRA1, TgGRA2, TgGRA7 y TgROP1A mediante el empleo combinado de la electroforesis bidimensional con la espectrometría de masas.

En relación a *N. caninum*, únicamente se ha empleado la electroforesis bidimensional para identificar algunos antígenos responsables de las reacciones cruzadas observadas entre *N. caninum* y *T. gondii* (Heckerroth *et al.*, 2000).

1.2. NEOSPOROSIS BOVINA

Aunque, inicialmente, la neosporosis fue descrita en 1988 como una enfermedad neuromuscular grave en el perro, el descubrimiento de *N. caninum* como agente causal de aborto en ganado bovino de leche y carne impulsó el desarrollo de los primeros estudios sobre la enfermedad en esta especie. Desde entonces, la importancia de la neosporosis bovina se ha incrementado notablemente, habiéndose realizado numerosos trabajos para conocer la prevalencia real de la infección y la participación de *N. caninum* en el aborto y la mortalidad neonatal. La neosporosis es la principal causa de abortos en el ganado bovino en numerosos países originando unas pérdidas económicas cuantiosas que incluyen unos costes directos -alteración de los parámetros reproductivos- y unos costes indirectos (diagnóstico, reposición del ganado que aborta y alteración de los parámetros productivos). No obstante, en algunos países, la información es todavía escasa, los datos que se poseen se refieren únicamente a hallazgos esporádicos del agente etiológico o de las lesiones que origina en fetos bovinos abortados, y son necesarios más estudios epidemiológicos que permitan conocer la prevalencia, los factores de riesgo asociados y la importancia real, tanto económica como sanitaria, de la enfermedad (Dubey, 1999a,b; Jenkins *et al.*, 2002).

1.2.1. Epidemiología

1.2.1.1. Prevalencia

1.2.1.1.1. Fetos bovinos abortados

N. caninum ha sido identificada en fetos bovinos abortados, tanto en ganado lechero como de carne en países de los cinco continentes. Además, la infección se ha identificado en casos de aborto endémico, esporádico y en brotes de aborto epidémico en ganado bovino de leche y carne. La neosporosis está considerada como una de las causas principales de aborto y la tasa de prevalencia de la infección por *N. caninum* observada en fetos bovinos abortados enviados para diagnóstico del proceso abortivo y/o utilizados en estudios epidemiológicos en

distintos países es muy variable, tal y como se demuestra en la Tabla VI, si bien se ha observado de forma general una mayor prevalencia en aquellas granjas con problemas previos de aborto (Hentrich *et al.*, 1997). Por otra parte, existe una asociación entre el ganado lechero seropositivo y la presencia de abortos debidos a la infección por *N. caninum* (Paré *et al.*, 1997; Davison *et al.*, 1999d), hecho que ha sido confirmado con los resultados obtenidos por Sager *et al.* (2001), en cuyo estudio encontraron una elevada correlación entre la presencia de anticuerpos en la madre y la presencia del parásito en los fetos abortados.

La infección por *N. caninum* en el ganado bovino en España está ampliamente difundida y se ha demostrado una asociación significativa entre la presencia de la infección y el aborto. En España, la infección por *N. caninum* en el ganado bovino, se señaló por primera vez en 1996 en fetos abortados (González *et al.*, 1996) y en ganado lechero adulto (Quintanilla-Gozalo *et al.*, 1996) mediante la observación de lesiones específicas y la detección de anticuerpos específicos, respectivamente. En el País Vasco, en 5 de 10 fetos investigados se observaron lesiones histológicas compatibles con la infección por *N. caninum*. El examen inmunohistoquímico de secciones del sistema nervioso central de 2 de ellos permitió detectar la presencia de pequeñas cantidades de antígeno y establecer un diagnóstico de neosporosis como causa del aborto. En Aragón, la infección se identificó en 17 de entre 39 (44%) fetos remitidos para diagnóstico en los que ya se habían descartado otras enfermedades (Barberán *et al.*, 1998) y, en un estudio posterior realizado por González *et al.* (1999), se detectó la infección por diversas técnicas diagnósticas en el 58% de los fetos analizados. Recientemente, Pereira-Bueno *et al.* (2003) han detectado la infección en un 38,8% de los fetos bovinos remitidos para el diagnóstico por al menos una de las cinco técnicas diagnósticas empleadas (histología convencional, inmunohistoquímica, IFI, ELISA y PCR).

Tabla VI: Prevalencia de la infección por *N. caninum* en fetos bovinos abortados.

Continente	País	Prevalencia (%) Infectados/examinados	Técnica diagnóstica	Referencia	
Europa	Bélgica	7,6 (17/224)	HC	De Meerschman <i>et al.</i> , 2002	
	Dinamarca	10 (18/186)	IHQ	Agerholm <i>et al.</i> , 1997	
	España		(25/63)	IHQ	Pereira-Bueno <i>et al.</i> , 2003
			(36/63)	IFI	
			31,3 (25/80)	HC	
			53,8 (7/13)	IHQ	
			10,7 (6/56)	IFI/ELISA	
	Gran Bretaña		15,3 (9/59)	PCR	
			10,5 (20/190)	HC	Otter <i>et al.</i> , 1995
			4,2 (8/190)	IHQ	Shock <i>et al.</i> , 1998
			10,1 (47/464)	IFI	
		14 (12/86)	IHQ		
	Holanda	17 (350/2059)	HQ	Wouda <i>et al.</i> , 1994	
		13 (266/2059)	IHQ		
	Irlanda	3,9 (14/355)	IHQ	McNamee <i>et al.</i> , 1996	
Italia	24,8 (130/525)	IFI	Magnino <i>et al.</i> , 2000		
Portugal	13,3 (2/15)	IHQ	Thompson <i>et al.</i> , 2001		
Suiza		53 (10/19)	PCR	Hentrich <i>et al.</i> , 1997	
		29 (24/83)	PCR	Gottstein <i>et al.</i> , 1998	
		20,6 (50/242)	PCR	Sager <i>et al.</i> , (2001)	
		19,4 (47/242)	HC		
América	EE.UU.	16 (72/451)	IHQ	Barr <i>et al.</i> , 1991a	
		27,5 (38/138)	IFI	Barr <i>et al.</i> , 1995	
		42,5 (113/266)	IHQ	Anderson <i>et al.</i> , 1995	
		5 (34/688)	IHQ	Hattel <i>et al.</i> , 1998	
	Canada	11,4	IHQ	Paré <i>et al.</i> , 1998	
	Argentina	20 (21/104)	IFI	Venturini <i>et al.</i> , 1999	
		22,8 (43/188)	HC	Moore <i>et al.</i> , 2002	
	Méjico	49 (104/211)	HC	Morales <i>et al.</i> , 2001b	
Brasil	47,8 (22/46)	HC	Corbellini <i>et al.</i> , 2002		
Africa	Sudáfrica	1,9 (2/105)	IHQ	Jardine & Last, 1995	
Asia	Japón	2,5	IHQ	Ogino <i>et al.</i> , 1992	
	Israel	15 (3/20)	IHQ	Harmelin <i>et al.</i> , 1995	
	Corea	21,1 (38/180)	HC/PCR/IFI	Kim <i>et al.</i> , 2002b	
		3,9 (7/180)	HC		
Oceanía	Nueva Zelanda	27,5	HC	Thorton <i>et al.</i> , 1991	
	Australia	21 (152/729)	HC	Boulton <i>et al.</i> , 1995	

HC: Histología convencional; IHQ: Inmunohistoquímica; IFI: Inmunofluorescencia;
ELISA: enzimoimmunoensayo; PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

Como denominador común, en la mayor parte de los estudios, los fetos fueron enviados para diagnóstico y procedían de ganado bovino lechero. En Suecia, Dinamarca y Bélgica, los primeros diagnósticos de la infección en casos de aborto se realizaron entre 1994 y 1997. En todos los casos, los fetos enviados procedían de explotaciones lecheras con problemas de aborto. Así mismo, la infección por *N. caninum* es uno de los problemas más importantes en las grandes explotaciones de ganado lechero en la costa Oeste de los EE.UU. Desde la primera descripción de la presencia de *N. caninum* en fetos bovinos abortados en ganado lechero en Nuevo Méjico, la infección se ha asociado a la presentación de abortos esporádicos, endémicos o epidémicos en el ganado. En California, en base a los resultados del diagnóstico del aborto en fetos enviados a los laboratorios oficiales, se considera que la infección por *N. caninum* es la causa más importante de aborto en el ganado bovino lechero (Barr *et al.*, 1991a; Anderson *et al.*, 1995; Dubey, 1999b). Posteriormente, los estudios realizados en el ganado lechero de otros países de Europa, América, Oceanía y Asia han confirmado estos resultados. Sin embargo, también se ha identificado a la neosporosis como causa importante de fallo reproductor en el ganado de carne, si bien los estudios realizados hasta el momento son escasos. En Canadá, se han realizado diagnósticos de la infección por *N. caninum* en abortos tanto en ganado de leche (Ontario y Québec) como de carne (Columbia Británica y Alberta), al igual que en Argentina (Moore *et al.*, 2002). Así mismo, Rodríguez *et al.* (2002) señalaron la presencia de aborto asociado a la infección tanto en ganado bovino lechero como de carne de diversos rebaños de EE.UU. y Costa Rica.

1.2.1.1.2. Bovinos adultos

Son relativamente numerosos los estudios de prevalencia de la infección por *N. caninum* en el ganado adulto, en los cuales se han obtenido tasas de seroprevalencia muy variadas. Además de las diferencias inherentes al tipo de técnica diagnóstica utilizada (IFI, ELISA), en general, se observan diferencias importantes entre las tasas de seropositividad obtenidas en diversos países, en bovinos de leche y de carne y en animales con y sin antecedente de patología abortiva. En la tabla VII se recogen los estudios más recientes de seroprevalencia de la infección en el ganado bovino.

En Europa, las tasas de seroprevalencia individual observadas en el ganado lechero en diversos países oscilaron entre el 9,6% en Irlanda del Norte y el 11,5% en Suiza (Gottstein *et al.*, 1998). Las tasas de seropositividad en los animales con antecedente de aborto fueron más elevadas -entre el 9,2% en Escocia (Trees *et al.*, 1994) y el 26% en Francia (Klein *et al.*, 1997)- que las observadas en los animales sin problemas de este tipo -entre el 1% en Escocia (Trees *et al.*, 1994) y el 5,7% en Inglaterra y Gales (Davison *et al.*, 1999a). En animales de explotaciones con problemas reproductivos, la tasa de seroprevalencia fue del 4 y del 23% en Alemania (Conraths *et al.*, 1996) y Suiza (Hentrich *et al.*, 1997), respectivamente. En Argentina la tasa de seroprevalencia en animales con antecedente de aborto ascendió a un 57% (Campero *et al.*, 1998).

En los rebaños infectados, el porcentaje de animales seropositivos fue muy variable. La tasa de seroprevalencia intra-rebaño en explotaciones con problema de aborto osciló entre el 1% en Dinamarca y el 60% en Inglaterra (Dannat *et al.*, 1995); y entre el 6 y el 59% en explotaciones sin antecedente de fallo reproductivo en Dinamarca (Lind *et al.*, 1997).

En los bovinos de carne, los datos sobre la prevalencia de la neosporosis son muy escasos. Se han señalado tasas de seropositividad del 29,5% en vacas en Canadá (Waldner *et al.*, 1999) y, en animales abortados, del 14% en Francia (Klein *et al.*, 1997) y del 43 y el 67% en Canadá (Hoar *et al.*, 1996). Así mismo, destacan los estudios realizados en el ganado de carne en otros países como España, Corea y Paraguay (Tabla VII).

Tabla VII: Seroprevalencia individual de la infección por *N. caninum* en el ganado bovino.

Continente	País	Seroprevalencia (%) Infectados/analizados	Aptitud	Técnica diagnóstica	Referencia
Europa	Alemania	4,1 (16/388)	L	IFI	Conraths <i>et al.</i> , 1996
	España	33 (18/55)	L	IFI	González <i>et al.</i> , 1999
		83,2% (119/143)	L	IFI/ELISA	Quintanilla-Gozaló <i>et al.</i> , 1999
		55,1% (119/216)	C		
	Francia	26 (148/575)	L	ELISA	Klein <i>et al.</i> , 1997
		14 (30/219)	C		
	Gran Bretaña	5,6 (107/1924)	L	ELISA	Ould-Amrouche <i>et al.</i> , 1999
		17,4 (81/465)	L	IFI	Buxton <i>et al.</i> , 1997
	6 (24/418)	ELISA		Davison <i>et al.</i> , 1999a	
	Irlanda del norte	12,6 (41/324)	L	IFI	McNamee <i>et al.</i> , 1996
		3 (5/165)			
	Italia	24,3 (2596/10684)	L	IFI	Magnino <i>et al.</i> , 2000
	Polonia	15,6 (7/45)	L	ELISA	Cabaj <i>et al.</i> , 2000
	Portugal	49 (59/119)	L	ELISA	Thompson <i>et al.</i> , 2001
	República de Irlanda	5 (14/280)		ELISA	Meleady <i>et al.</i> , 2000
Rusia	9,9 (39/391)	-	ELISA	Conraths <i>et al.</i> , 2000	
Suecia	29 (17/58)	L	IFI/ELISA	Björkman <i>et al.</i> , 1996	
	76-78	C	ELISA	Björkman <i>et al.</i> , 2003	
Suíza	11,5 (194/1689)	L	ELISA	Gottstein <i>et al.</i> , 1998	
América	Argentina	56,9	L	IFI	Campero <i>et al.</i> , 1998
		18,9 (41/216)	L	IFI	Moore <i>et al.</i> , 2002
		43,1 (323/750)	C		
	Brasil	14 (63/447)	L	IFI	Gondim <i>et al.</i> , 1999
		11,2 (25/223)		IFI	Corbellini <i>et al.</i> , 2002
	Canadá	16,6 (507/3059)	L	ELISA	Paré <i>et al.</i> , 1998
		29,5 (124/419)	C	ELISA	Waldner <i>et al.</i> , 1999
		81,3 (282/347)	C	ELISA	Waldner <i>et al.</i> , 2001
	Costa Rica	39,7 (1191/3002)	L y C	ELISA	Romero <i>et al.</i> , 2002
	EE.UU.	36 (82/228)	L	ELISA	Paré <i>et al.</i> , 1996
24 (620/2585)		C	ELISA	Sanderson <i>et al.</i> , (2000)	
Méjico	56 (561/1003)	L	IFI	Morales <i>et al.</i> , 2001a	
	59 (110/187)	L	ELISA	García-Vázquez <i>et al.</i> , 2002	
Paraguay	29,8 (262/879)	L y C	ELISA	Osawa <i>et al.</i> , 2002	
Asia	Corea	4,1 (18/438)	C	IFI	Kim <i>et al.</i> , 2002a
	Malasia	9 (9/100)	L	IFI	Cheah <i>et al.</i> , 2001
	Tailandia	6 (54/904)	L	IFI	Suteeraparp <i>et al.</i> , 1999
	Taiwan	44,9 (275/613)	L	IFI	Ooi <i>et al.</i> , 2000

	Vietnam	5,5 (11/200)	L	IFI, ELISA	Huong <i>et al.</i> , 1998
Oceanía	Nueva Zelanda	2,8 (14/499)	C	ELISA	Tennent-Brown <i>et al.</i> , 2000

L: Lechera; C: Cárnica

En España, se detectaron por primera vez anticuerpos anti-*N. caninum* en el suero del 23,4% de las vacas y novillas de una explotación de ganado lechero, en la provincia de Lugo, en la que se habían producido abortos con fetos momificados durante los tres años anteriores (Quintanilla-Gozalo *et al.*, 1996). La seroprevalencia intra-rebaño osciló entre el 23,4 y el 56,3%. Posteriormente, se observaron tasas de seropositividad más bajas, entre el 14,6 y el 18,9%, en dos explotaciones lecheras en Aragón (Cebrián *et al.*, 1998). En ambos rebaños -con una tasa media anual de abortos del 12 y el 5%, respectivamente, durante los últimos cinco años- la infección se había demostrado en 4 fetos abortados (2 en cada rebaño) con anterioridad al estudio serológico. Recientemente, en 1998, se han realizado estudios más amplios sobre la prevalencia de la infección en abortos y en ganado adulto de leche y de carne en las Comunidades Autónomas de Aragón y Castilla y León, respectivamente. En un estudio epidemiológico, realizado en la provincia de León, se observó que el 55,1% (119/216) y el 83,2% (119/143) de los rebaños bovinos de carne y de leche, respectivamente, estaban infectados (Quintanilla-Gozalo *et al.*, 1999). La tasa de seroprevalencia individual obtenida en animales mayores de un año fue del 17,9% (306/1712) en el vacuno de carne y del 35,9% (402/1121) en los animales de aptitud lechera. Al igual que ocurre en otros países, también aquí la infección fue significativamente más frecuente en los animales lecheros -en régimen intensivo- que en los de carne -que se mantienen en extensivo. En ganado lechero, en Asturias, se han obtenido tasas de seroprevalencia de rebaño e individual similares, del 29,6% (263/889) y del 90,7% (39/43), respectivamente (Mainar-Jaime *et al.*, 1999).

1.2.1.2. Transmisión

Aunque el parásito se ha logrado transmitir de forma experimental por diferentes vías (intramuscular, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, calostrado y oral), todas las evidencias sugieren que la transmisión vertical, principalmente vía transplacentaria y posiblemente también vía calostro, es el principal modo de contagio de la enfermedad natural siendo la infección postnatal poco importante (Fig. 2).

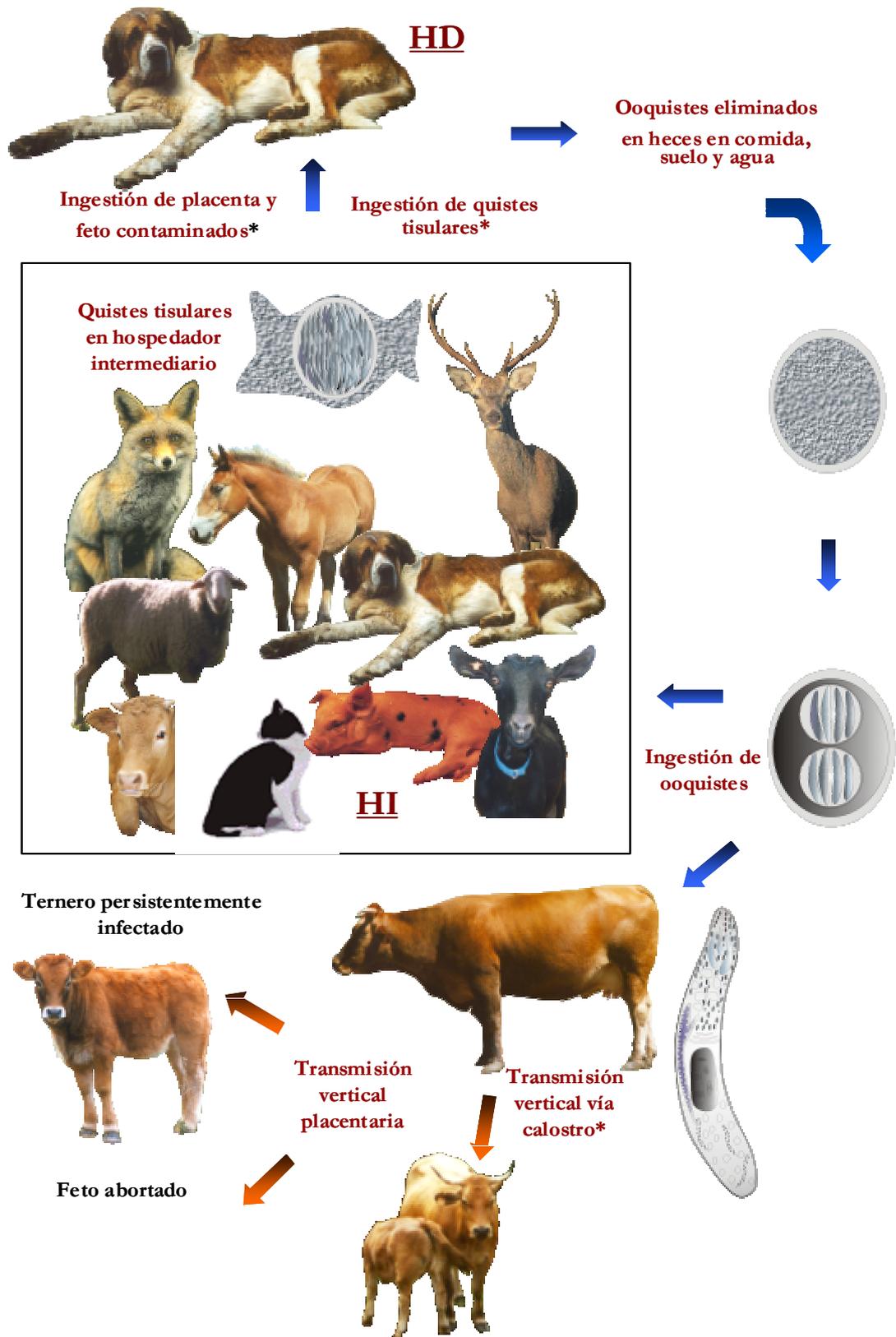
La detección de anticuerpos precalostrales frente a *N. caninum* en el suero de terneros nacidos de vacas seropositivas indica la existencia de infección intrauterina (Dijkstra *et al.*,

2002a). Se considera que la transmisión vertical es el modo más frecuente de transmisión de la infección en el ganado bovino y tiene, por ello, un papel muy importante en la epidemiología de la neosporosis en esta especie doméstica. Está demostrado que, una vez adquirida la infección *-in utero* o desde el medio- los animales permanecen infectados, probablemente de por vida, y pueden transmitir la infección a su descendencia en distintas gestaciones, consecutivas o no. En general, los animales infectados permanecen seropositivos aunque el nivel de anticuerpos fluctúa en relación con la presentación del aborto y durante la gestación. La existencia de la infección en determinadas líneas familiares y la ausencia aparente de transmisión horizontal observadas en la explotación, indican que el parásito puede transmitirse desde las madres infectadas a la descendencia durante varias generaciones y que la infección puede mantenerse en las explotaciones -donde la reposición con ganado propio es la norma- en ausencia de un hospedador definitivo.

La transmisión vertical vía transplacentaria (que con frecuencia ocurre repetidamente en el mismo animal) se produce tanto en animales en los que no se observa patología abortiva como en aquellos individuos que han abortado (Dubey & Lindsay, 1996), y en algunos rebaños se han señalado tasas de infección congénita que oscilan entre el 48% (Pereira-Bueno *et al.*, 2000) y el 90% (Davison *et al.*, 1999a). La transmisión transplacentaria se ha demostrado en infecciones experimentales no solo en el ganado bovino, sino también en la oveja (Dubey & Lindsay, 1990; McAllister *et al.*, 1996b, Buxton *et al.*, 1998), cabra (Lindsay *et al.*, 1995b), perro (Dubey & Lindsay, 1989c; Cole *et al.*, 1995), gato (Dubey & Lindsay, 1989a), mono (Barr *et al.*, 1994a), cerdo (Jensen *et al.*, 1998) y ratón (Cole *et al.*, 1995).

Experimentalmente, se ha demostrado que la transmisión vertical por vía calostrada de *N. caninum* en los bovinos es posible durante el período neonatal (Uggla *et al.*, 1998; Davison *et al.*, 2001) siendo una posible vía de transmisión vertical en animales recién nacidos, además de la vía transplacentaria. Las implicaciones de esta posible vía de transmisión en la epidemiología de la neosporosis bovina se desconocen por el momento.

Figura 2: Ciclo biológico y vías de transmisión de *N. caninum*.



- * Vía de transmisión no comprobada experimentalmente
- * Vía de transmisión comprobada experimentalmente

La infección postnatal en los bovinos puede tener lugar por ingestión de ooquistes eliminados en las heces del hospedador definitivo -el perro- que contaminarían el alimento (pastos, forrajes y piensos almacenados) y el agua de bebida. Existen evidencias seroepidemiológicas que apoyarían la teoría de la infección postnatal. La presencia de seroconversión en el rebaño, junto con la falta de asociación entre los resultados positivos de serología de la madre y de su descendencia sugieren la existencia de infección postnatal, en la cual podría estar implicado el perro (Paré *et al.*, 1997; Davison *et al.*, 1999c; Hietala & Thurmond, 1999; Dijkstra *et al.*, 2001a). Por otra parte, diversos estudios han sugerido la existencia de una relación entre la presentación de una curva epidémica de aborto por neosporosis en algunos rebaños y una exposición puntual a una fuente de infección externa, señalando la presencia del perro en el rebaño como un factor de riesgo implicado en la presentación de brotes de aborto asociados a la infección por *N. caninum* (Bartels *et al.*, 1999; Wouda *et al.*, 1999b; McAllister *et al.*, 2000). El descubrimiento del perro como un hospedador definitivo para *N. caninum* puso de manifiesto la posible transmisión horizontal de la infección, ya que se detectó la eliminación de ooquistes en las heces del perro (McAllister *et al.*, 1998; Lindsay *et al.*, 1999a). Posteriormente, De Marez *et al.* (1999) y, posteriormente, Trees *et al.* (2002) lograron detectar la infección en el ganado bovino al cual se le había administrado vía oral ooquistes de *N. caninum* eliminados por el perro. Otras posibles rutas de transmisión horizontal en el ganado bovino adulto, como la ingestión de calostro y placenta infectados por *N. caninum*, no han sido demostradas experimentalmente ya que Davison *et al.* (2001) no detectaron el parásito en los tejidos de los animales infectados por vía oral. Finalmente, se desconoce la posibilidad de que *N. caninum* pueda transmitirse vía venérea, ya que no se dispone de datos sobre la prevalencia de la infección en los sementales bovinos y no se han realizado estudios para determinar la eliminación del parásito en el semen ni en infecciones naturales ni experimentales.

La infección postnatal en el perro puede tener lugar por ingestión de tejidos de bovinos infectados -fetos abortados, placentas y restos de animales muertos- que probablemente tendría como consecuencia la eliminación de ooquistes en sus heces que contaminarían el medio ambiente y podrían infectar al ganado. En los animales infectados, los quistes con bradizoítos están presentes principalmente en el tejido nervioso (cerebro y

médula). En los quistes, los bradizoítos conservan su capacidad infectante durante períodos de tiempo prolongados (al menos 1 año en cerebro de ratones con infección experimental) y son resistentes a la acción del ácido clorhídrico y la pepsina lo que indica que el carnivorismo podría contribuir a la transmisión del parásito entre determinados hospedadores que participan en el ciclo biológico. Por otra parte, diversos autores han señalado la presencia de *N. caninum* en la placenta (Shivaprasad *et al.*, 1989; Barr *et al.*, 1994b; Schares *et al.*, 1997; Bergeron *et al.*, 2001b), pero, únicamente, Dijkstra *et al.* (2002c) han demostrado, recientemente, que la ingestión de placenta infectada naturalmente por *N. caninum* podría ser una posible ruta de transmisión entre el perro y la vaca. Sin embargo, la ingestión de fetos bovinos infectados por *N. caninum* no parece ser una importante vía de transmisión, de acuerdo con los resultados obtenidos por Bergeron *et al.* (2001a), en cuyo estudio los perros alimentados con fetos bovinos infectados no eliminaron ooquistes. Por otra parte, la ingestión de leche o calostro de origen bovino infectados con taquizoítos de *N. caninum* tampoco parece ser una posible vía de infección para el perro (Dijkstra *et al.*, 2001b).

Se desconoce si los ooquistes eliminados por el perro son infectantes para esta especie y/o para otras especies domésticas y silvestres en las que se ha demostrado la infección por *N. caninum*. Probablemente, dada la estrecha relación filogenética entre *N. caninum* y *T. gondii*, el perro desempeña en el ciclo biológico de *N. caninum* el mismo papel que el gato en el ciclo biológico de *T. gondii*. Siguiendo este modelo, los ooquistes eliminados en sus heces serían infectantes para él mismo y para los hospedadores intermediarios. Además de en el perro doméstico, se han detectado anticuerpos anti-*N. caninum* en otros carnívoros como el zorro (Scharés *et al.*, 2001; Almería *et al.*, 2002b), el coyote (Lindsay *et al.*, 1996b) y el dingo (Barber *et al.*, 1997), aunque son necesarios más estudios para determinar la importancia real de estos animales en la transmisión de la neosporosis puesto que no se han detectado ooquistes en sus heces. Por el momento, se desconoce la importancia relativa del pasto contaminado con ooquistes comparado con el forraje y los piensos almacenados, de los cánidos silvestres (zorros, coyotes y dingos) en relación con los perros domésticos, así como de las diferentes aptitudes (de compañía, de pastor, de caza) y razas de perros.

1.2.1.3. Factores de riesgo

Existe, por el momento, poca información acerca de los factores potenciales, de interés epidemiológico y/o clínico, que pueden estar asociados a la infección por *N. caninum*

en el ganado bovino. Entre los factores estudiados hay que señalar los dependientes del hospedador, del parásito y del manejo o del medio.

1.2.1.3.1. Dependientes del hospedador

1.2.1.3.1.1. Especie

Los diversos estudios de prevalencia realizados en los diferentes hospedadores naturales de la infección ponen de manifiesto una mayor repercusión de esta parasitosis, fundamentalmente, en la especie bovina. Por otra parte, las infecciones experimentales han demostrado que los ratones presentan una resistencia natural a la infección, lo que lleva a pensar que esta especie no es un hospedador de elección para *N. caninum* (Lindsay *et al.*, 1995a; Khan *et al.*, 1997; Long *et al.*, 1998; Lindsay *et al.*, 1999b).

1.2.1.3.1.2. Edad

En relación a la edad de los animales los datos que existen hasta el momento son controvertidos. En general, no se observan diferencias en la tasa de seroprevalencia de la infección por *N. caninum* en relación con la edad de los animales lo que indica que la infección en los rebaños se mantiene, principalmente, por transmisión vertical y que los brotes de aborto atribuibles a la infección son inducidos por factores que estimulan la reactivación de las infecciones crónicas más que debidos a reinfecciones (Paré *et al.*, 1996; Wouda *et al.*, 1998b). En brotes de aborto atribuibles a la infección por *N. caninum* en ganado lechero no se han observado diferencias significativas entre las tasas de aborto obtenidas en los diferentes grupos de edad de los animales abortados. Además, en relación con el aborto, cabe señalar que la infección se ha diagnosticado en fetos abortados por hembras de edad muy variable, identificándose el parásito en fetos abortados de novillas y en fetos abortados de vacas de hasta 11 años de edad. Sin embargo, en el estudio epidemiológico realizado por Davison *et al.* (1999a) se detectó una prevalencia más baja en los animales de entre 13 y 24 meses de edad, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Dyer *et al.* (2000), Pereira-Bueno *et al.* (2000) y Sanderson *et al.* (2000), apareciendo una mayor tasa de seroprevalencia en animales jóvenes, mientras que Jensen *et al.* (1999) describieron un incremento de la seroprevalencia con la edad.

1.2.1.3.1.3. Inmunidad

Después de una infección por *N. caninum* los animales desarrollan una respuesta inmune de base humoral y celular. Cualquier cambio en el equilibrio inmunológico puede influir de forma determinante en la relación parásito-hospedador originando enfermedad o muerte del feto. En el ganado bovino la eficacia de la respuesta inmune maternal, así como la capacidad del feto para desarrollar una respuesta inmune frente al parásito son factores determinantes en el progreso de la infección y, por consiguiente, en sus manifestaciones clínicas, tal y como se explica más detalladamente en los capítulos dedicados a la patogenia de la infección y a la respuesta inmune (apartados 1.2.2. y 1.2.5., respectivamente). En el caso de las infecciones experimentales en los ratones, el empleo de determinadas estirpes consanguíneas con fallos en el sistema inmune -ratones atímicos (Shibahara *et al.*, 1999), deficientes en linfocitos B (Eperon *et al.*, 1999), deficientes en linfocitos maduros B y T (Dreier *et al.*, 1999) y deficientes en IFN- γ (Dubey *et al.*, 1998a)- ha permitido reproducir la infección con mayor facilidad. Así mismo, en el caso de las estirpes no consanguíneas el tratamiento inmunosupresor con corticoides previo a la infección resultó ser un factor determinante en la inducción de la infección en el modelo murino (Lindsay & Dubey, 1989d; McGuire *et al.*, 1997b).

1.2.1.3.1.4. Sexo

En la actualidad, la información disponible sobre la influencia del sexo en la presentación de la enfermedad es escasa, ya que todos los estudios realizados en la especie bovina se han llevado a cabo en hembras reproductoras, y, aún, no se dispone de datos sobre la prevalencia de la infección en los machos, las manifestaciones clínicas y el papel que juegan éstos en el ciclo biológico de *N. caninum*.

1.2.1.3.1.5. Raza

La infección por *N. caninum* se ha diagnosticado con mayor frecuencia en los rebaños de razas de aptitud lechera que en los de razas de aptitud cárnica. Sin embargo, en los bovinos

no se ha demostrado la existencia de una mayor sensibilidad a la infección en las razas de aptitud lechera que en las de aptitud cárnica (Paré *et al.*, 1998).

Por otra parte, la mayor frecuencia de la neosporosis observada en los rebaños de leche podría estar relacionada con unas condiciones más adecuadas en estas explotaciones para la transmisión de la infección. En el ganado de leche -en el que, en muchos casos, la reposición se realiza con animales de la misma granja- la infección se transmite, principalmente, por vía transplacentaria -sin la participación de un hospedador definitivo que contamine el medio con ooquistes del parásito- existiendo una tasa de infección congénita elevada (Schaes *et al.*, 1998).

1.2.1.3.1.6. Antecedentes de fallo reproductivo

La infección por *N. caninum* es más frecuente en los rebaños con problemas de aborto y mortalidad neonatal que en las explotaciones sin antecedente de fallo reproductivo, observándose tasas de seroprevalencia intra-rebaño más elevadas en los rebaños con antecedente de aborto que en los rebaños sin este antecedente. Así mismo, la tasa de seroprevalencia individual es más elevada entre los animales con problema de aborto que entre los que no presentan esta manifestación clínica y, en el ganado lechero, se ha demostrado recientemente que la probabilidad de que los animales que abortan sean seropositivos es tres veces mayor a la probabilidad de que sean seronegativos (Paré *et al.*, 1996; Moen *et al.*, 1998).

1.2.1.3.2. Dependientes del parásito

Dentro de los factores dependientes del parásito que pueden influir en el desarrollo de la infección destacan el aislado de *N. caninum*, la dosis infectante, el estadio parasitario y la presencia de infecciones concurrentes (Innes *et al.*, 2000a,b).

1.2.1.3.2.1. Aislado

El aislado de *N. caninum* implicado en la infección ha demostrado ser un factor determinante en la presencia y la gravedad de la enfermedad. Los estudios en los que se ha comparado la patogenicidad de diversos aislados son escasos y se han realizado, únicamente, mediante infecciones experimentales en ratones, aunque todo parece indicar que, entre los

aislados empleados con mayor frecuencia en infecciones experimentales, el NC-Liv sería el más patógeno seguido del aislado NC-1 y NCSweB1. En los primeros estudios comparativos, el aislado NC-1 demostró ser más patógeno que los aislados NC-2 y NC-3 (Lindsay *et al.*, 1992; Lindsay *et al.*, 1995a). Posteriormente, cuando se estudió la virulencia de dos aislados en el modelo murino, uno de origen bovino -NC-Sweb1- y otro de origen canino -NC-Liv-, éste último demostró ser más patógeno. Resulta difícil establecer una correlación con los estudios experimentales realizados en el ganado bovino, debido a las diferentes dosis y vías de inoculación del parásito empleadas. Cuando se empleó el aislado NC-Liv se logró reproducir la infección con fallo reproductor en las hembras gestantes (Williams *et al.*, 2000), mientras que en el resto de los estudios en los que se ha empleado el aislado NC-1 y NC-SweB1 (Barr *et al.*, 1994b; Andriananarivo *et al.*, 2001) si bien se ha estudiado la respuesta inmune desarrollada como consecuencia de la infección y se ha detectado el parásito en los animales infectados no se ha detectado, sin embargo, sintomatología clínica asociada a la infección (Lunden *et al.*, 1998; Innes *et al.*, 2001a). Recientemente, Macaldowie *et al.* (2002) también han logrado reproducir la infección provocando mortalidad y reabsorción fetal cuando el ganado bovino fue reinfectado al comienzo de la gestación con taquizoítos del aislado NC-1.

1.2.1.3.2.2. Dosis

En las infecciones experimentales realizadas en el modelo murino, la dosis y la estirpe de ratón son factores que influyen de forma determinante en el desarrollo de la enfermedad, si bien los resultados obtenidos en los diferentes estudios son difícilmente comparables. En el estudio realizado por Lindsay *et al.* (1995a), cuando se emplearon dosis bajas se logró producir una enfermedad crónica asociada, en algunos casos, a sintomatología nerviosa como consecuencia de las lesiones presentes en el tejido nervioso, mientras que McGuire *et al.* (1997b) describieron tasas de mortalidad elevadas en las diferentes estirpes de ratón estudiadas. Por el contrario, Long *et al.* (1998) y, posteriormente, Gottstein *et al.* (2001) destacaron una asociación evidente entre dosis elevadas de taquizoítos empleadas en la infección y el incremento de la tasa de mortalidad y presencia de lesiones graves en los diferentes tejidos estudiados. Sin embargo, es complejo extrapolar estos resultados al modelo bovino. Por una parte, las vías de inoculación del parásito han sido muy diversas, incluyendo la vía oral, intramuscular, intravenosa o subcutánea, las cuales no parecen en principio las vías naturales de transmisión del parásito. Además, a pesar de que las dosis que se han empleado en los bovinos son variables oscilando entre 10^7 y 5×10^8 taquizoítos (Uggla *et al.*, 1998; Lunden

et al., 1998; Williams *et al.*, 2000; Andriananarivo *et al.*, 2001; Innes *et al.*, 2001a; Kritznner *et al.*, 2002; Macaldowie *et al.*, 2002; Almería *et al.*, 2002a), ninguna de ellas ha logrado reproducir la infección de forma semejante a como tiene lugar en las infecciones naturales, originando en la mayoría de los animales infecciones crónicas, las cuales solo en algunos casos estuvieron asociadas a la transmisión vertical del parásito a la descendencia.

1.2.1.3.2.3. Estadio parasitario

Hasta el momento, la mayoría de las infecciones experimentales llevadas a cabo en el modelo murino y bovino se han realizado mediante la inoculación de taquizoítos. En todos los casos se detectó la infección si bien todavía no se ha desarrollado un modelo adecuado experimental que logre reproducir la infección de forma semejante a como tiene lugar en la naturaleza, puesto que las presentaciones clínicas de la infección fueron muy diversas.

Otro estadio del parásito que se ha empleado en las infecciones experimentales son los quistes tisulares con bradizoítos administrados vía oral tanto al ganado bovino como a diversas especies de carnívoros (perros y zorros). Mientras que en el perro se logró demostrar la infección al detectar eliminación de ooquistes en las heces tras ser alimentados con tejido de ratón (McAllister *et al.*, 1998) o con placentas bovinas infectadas (Dijkstra *et al.*, 2001b), en los zorros no se detectó la eliminación de ooquistes (Schaes *et al.*, 2002b) y en el ganado bovino alimentado con placentas infectadas que probablemente contenían quistes tisulares la infección no fue detectada (Guy *et al.*, 2001). El origen de los quistes tisulares que ingieren los perros podría ser un factor determinante en el desarrollo de las fases enteroepiteliales del parásito. Parece ser que cuando los perros son infectados con tejido de origen murino eliminan un número considerablemente menor de ooquistes en las heces que cuando ingieren tejido bovino infectado (Gondim *et al.*, 2002).

Finalmente, también se han empleado ooquistes procedentes de las heces de perros infectados experimentalmente para reproducir la infección en el modelo bovino y ovino. Trees *et al.* (2002) inocularon vía oral 600 ooquistes esporulados a tres reproductoras gestantes logrando detectar la infección mediante pruebas serológicas y PCR en las reproductoras, sin embargo no se produjo aborto ni transmisión vertical asociada a la infección. Posteriormente, Gondim *et al.* (2002) lograron reproducir la infección con una dosis menor (300 ooquistes) en terneros y O'Handley *et al.* (2002) detectaron la infección por pruebas serológicas y PCR en

seis ovejas infectadas con 10.000 ooquistes, pero no detectaron ni lesiones ni el parásito mediante la técnica de inmunohistoquímica .

1.2.1.3.2.4. Infecciones concurrentes

Entre los factores de riesgo de aborto asociado a la infección por *N. caninum* hay que considerar la existencia de infecciones concurrentes por otros patógenos. Aunque experimentalmente se ha demostrado que la infección por *N. caninum* puede inducir el aborto en los bovinos (Barr *et al.*, 1994b) es posible que esta infección no sea la única causa de fallo reproductivo -aborto, nacimiento de animales muertos o enfermos- y no puede excluirse que factores diferentes de la infección *per se* -tales como infecciones por otros patógenos, agentes inmunosupresores o factores hereditarios- predispongan al aborto de fetos infectados por *N. caninum* (Paré *et al.*, 1997; Thurmond & Hietala, 1997a). En general, en los fetos bovinos abortados con infección por *N. caninum* se ha detectado con poca frecuencia la presencia de otros agentes que pueden ser también causa de aborto en el ganado bovino. Se han identificado simultáneamente infecciones por *N. caninum* y virus (BHV-1, BVD, BHV-4), salmonelas (*Salmonella dublin*), leptospiras (*Leptospira hardjo*), *Bacillus licheniformis* y *Actinomyces pyogenes*, entre otros (Caldow *et al.*, 1998), pero siempre en un porcentaje muy reducido de fetos abortados infectados por el parásito. Análogamente a estos resultados, Aduriz *et al.* (1999, 2001) detectaron infecciones mixtas por *N. caninum* y el virus BVD en el 7-9% de los fetos abortados. Pfeiffer *et al.* (2000) sugieren la infección por el virus BVD como posible factor asociado a los abortos por *N. caninum*, ya que el virus BVD origina una inmunodepresión que podría favorecer la acción de otros patógenos como *N. caninum*. Sin embargo, otros investigadores no encontraron una asociación clara entre ambas infecciones (Björkman *et al.*, 2000; Mainar *et al.*, 2001). Aunque en los bovinos la infección por *T. gondii* es poco frecuente y, además, este parásito no se considera una causa de aborto en esta especie, la detección de DNA de *T. gondii* y de *N. caninum* en el cerebro de un feto bovino abortado sugiere que el aborto bovino por neosporosis, aunque poco probable, podría ser un fenómeno multifactorial (Gottstein *et al.*, 1998).

1.2.1.3.3. Dependientes del manejo o del ambiente

1.2.1.3.3.1. Tamaño de la explotación

En cuanto al tamaño de la explotación, apenas existen datos que lo relacionen con la presencia de la infección por *N. caninum*. En EE.UU., la infección se ha diagnosticado tanto en explotaciones lecheras de gran tamaño como en rebaños de tamaño más reducido (Anderson *et al.*, 1991). En Francia, los resultados de un estudio seroepidemiológico en ganado normando y charolés indicaron que la infección fue más frecuente en los rebaños lecheros considerados de tamaño grande (media: 78 animales) (Klein *et al.*, 1997). En España, en un estudio realizado en la provincia de León no se encontraron diferencias significativas en la tasa de seroprevalencia (72-87%) en relación con el tamaño de las explotaciones lecheras. Por el contrario, en el ganado de aptitud cárnica, se observó una asociación altamente significativa entre el tamaño del rebaño y la presencia de la infección (Quintanilla-Gozalo *et al.*, 1999). En la zona de estudio, la infección por *N. caninum* fue significativamente más frecuente en los rebaños considerados de tamaño medio (11-49 animales) (64%) que en los pequeños (hasta 10 animales) (36%) y en los grandes (50 o más animales) (49%).

1.2.1.3.3.2. Estacionalidad

Existe muy poca información epidemiológica sobre el modelo estacional de presentación del aborto por neosporosis a pesar de que su estudio ayudaría a la identificación de los posibles factores predisponentes y condiciones que predominan durante las épocas de alto riesgo.

En general, los abortos de fetos infectados por el parásito se presentan en cualquier época del año aunque, en ocasiones, se ha observado una mayor frecuencia de presentación en los animales con infección crónica durante algunos meses -otoño e invierno, principalmente- debido, probablemente, a factores inmunodepresores que predominan durante este periodo relacionados con la alimentación y el estrés (Thurmond *et al.*, 1995). En el caso de posibles infecciones postnatales -vía ingestión de ooquistes- la infección de los animales en zonas templadas y los abortos por esta causa serían también más frecuentes durante los meses de otoño-invierno ya que, probablemente, la viabilidad de los ooquistes en el medio disminuiría notablemente durante la estación seca y cálida. En este sentido, Barling *et al.* (2000) y Sanderson *et al.* (2000) describieron una asociación entre el aumento de la prevalencia en el ganado bovino de carne y una mayor densidad de animales durante la estabulación invernal. Por el contrario, Wouda *et al.* (1999a) detectaron un mayor número de abortos en verano y principios de otoño. Así mismo, también se ha sugerido que la alimentación del ganado

durante el verano con ensilado de maíz mohoso podría inducir la reactivación de infecciones latentes por el parásito -debido a la inmunosupresión causada por las micotoxinas- y facilitado la infección fetal y, uno ó dos meses más tarde, el aborto (Thurmond *et al.*, 1995).

1.2.1.3.3.3. Reposición

La asociación entre la presencia de la infección y la entrada de animales en las explotaciones no ha sido estudiada en profundidad por el momento, sí se han señalado casos concretos de introducción de la infección en rebaños, tanto de leche como de carne, con animales adquiridos -sin diagnóstico previo- en explotaciones con antecedente de aborto. Aunque, probablemente, la infección es más frecuente en los rebaños considerados “abiertos” que en los “cerrados”, no se han encontrado diferencias significativas entre la frecuencia de la infección observada en el grupo de explotaciones donde la reposición se realiza con animales de la propia explotación (52%) y aquellas en las que se realiza con animales adquiridos en otras granjas más o menos próximas (58%). Tampoco se ha demostrado una asociación significativa entre la práctica de reposición con novillas procedentes de otras explotaciones y la tasa de aborto atribuible a la infección por *N. caninum*.

1.2.1.3.3.4. Presencia de carnívoros en la explotación

Finalmente, no se ha encontrado una asociación entre el manejo y los factores ambientales con el estatus serológico, pero sí se ha descrito una asociación entre la seroprevalencia y la abundancia de zorros y coyotes (Barling *et al.*, 2000), así como una asociación entre abortos epidémicos y una posible exposición previa a ooquistes de *N. caninum* que podrían haber sido eliminados por el perro y que contaminaban la comida (McAllister *et al.*, 2000; Dijkstra *et al.*, 2002c).

1.2.1.4. Importancia económica

En el momento presente, la neosporosis bovina está considerada como una de las causas principales de aborto en muchos países por lo que sus repercusiones en la economía de la industria ganadera está fuera de toda duda. Aunque no existen muchos estudios sobre las pérdidas reales en las explotaciones de bovino por neosporosis, cabe esperar que los avances producidos, recientemente, en el diagnóstico de la infección y la normalización de

procedimientos diagnósticos adecuados permitirán cuantificar en un futuro inmediato el impacto de esta enfermedad en la industria lechera y cárnica.

En California, con 1,2 millones de cabezas de ganado lechero y una tasa de aborto del 12%, considerando que la infección por *N. caninum* es responsable de aproximadamente el 43% del total de abortos y que cada aborto supone una pérdida de entre 550 y 600 dólares americanos para la explotación, el coste económico de la neosporosis en el sector lechero se ha estimado en unos 34-35 millones de dólares anuales (Dubey, 1999a). En Australia, aproximadamente el 25% de los abortos diagnosticados son atribuidos a la infección por *N. caninum* y, por ello, la neosporosis está considerada como una de las causas más importantes de pérdidas económicas, tanto en la industria lechera como en el sector cárnico. En las explotaciones lecheras infectadas las pérdidas anuales se estiman entre el 2 y el 5% y, en algunos casos, hasta el 20%. Se calcula que la neosporosis supone alrededor de 25 y 85 millones de dólares australianos -unos 15 y 51 millones de euros- de pérdida anual para los sectores lechero y de carne, respectivamente (Reichel & Ellis, 2002). Existen pocos datos sobre la repercusión de la neosporosis bovina en la economía de la industria ganadera en los países europeos. En Holanda, Moen *et al.* (1998) en un estudio sobre tres brotes de aborto por neosporosis diagnosticados en tres explotaciones lecheras entre 1992 y 1993 estimaron unas pérdidas económicas de aproximadamente 586 dólares por cada una de las vacas abortadas.

Las pérdidas económicas originadas por la neosporosis están asociadas al fallo reproductivo. Aunque el aborto se ha considerado como el efecto más adverso de la neosporosis también hay que tener en cuenta otros efectos negativos, tales como la disminución en la producción de leche en los animales seropositivos, el acortamiento de su vida productiva, la infertilidad asociada a mortalidad fetal y reabsorciones, la mortalidad neonatal y el nacimiento de terneros congénitamente infectados con o sin sintomatología clínica (Trees *et al.*, 1999). Por otra parte, en el análisis económico sobre los efectos de la infección por *Neospora* en una granja hay que añadir la disminución del valor de la reposición y el coste del sacrificio prematuro de los animales infectados. Se calcula que el riesgo de aborto en los animales seropositivos es de 2 a 3 veces mayor al riesgo de aborto en los animales seronegativos en las explotaciones con aborto endémico, pero puede ser mucho más alto en las explotaciones con brotes de aborto epidémico, siendo las hembras primíparas las que presentan una mayor probabilidad de abortar. Además, la mortalidad fetal y las reabsorciones pueden conducir a una infertilidad permanente. Por otra parte, el incremento del tiempo

parto-inseminación fértil supone un aumento del intervalo entre gestaciones con la consiguiente disminución en la producción lechera, debida en parte a la infección por *Neospora* y en parte a la disminución del número de lactaciones. En este sentido, Thurmond & Hietala (1997b) han descrito en hembras seropositivas una disminución en la producción lechera del 4% en la primera lactación comparado con las hembras seronegativas. En cuanto al sacrificio prematuro y selectivo de hembras seropositivas que presentan o no aborto, existen datos en la literatura sobre el posible coste económico derivado de su aplicación. La productividad lechera aumenta con la edad, por lo cual el sacrificio realizado antes de la cuarta lactación conlleva una notable pérdida económica. Además, en el estudio realizado por Thurmond & Hietala (1996) se describió una clara asociación entre la mayor probabilidad de sacrificio de las reproductoras seropositivas (1,6 veces) con respecto a las reproductoras seronegativas. Por otra parte, si bien el sacrificio del ganado de reposición es una buena alternativa en el control de la transmisión vertical, esta medida supone un coste añadido a tener en cuenta, ya que el valor de la reproductora de reposición al sacrificio disminuye 2,5 veces.

En conclusión, hacer una comparación objetiva del impacto económico de la enfermedad entre diferentes países y sistemas de explotación es difícil. Aunque la neosporosis afecta tanto al ganado de leche como al de carne, la mayoría de los datos disponibles se refieren al sector lechero, donde el nacimiento de un ternero y la producción de leche son los principales objetivos económicos.

1.2.1.5. Importancia sanitaria

Hasta el momento, no se ha detectado la presencia de *N. caninum* en el hombre, pero su estrecha relación con *T. gondii* -patógeno importante en mujeres gestantes y en individuos inmunodeprimidos- y el hecho de que la infección haya sido establecida experimentalmente en el macaco apuntan la posibilidad de la infección humana. Petersen *et al.* (1999) no detectaron anticuerpos frente a *N. caninum* en el suero de 76 mujeres con una historia de abortos repetidos. Por el contrario, Nam *et al.* (1998) detectaron -mediante ELISA, western-blotting e inmunofluorescencia- la presencia de anticuerpos anti-*N. caninum* en el suero de 12 de 172 (6,7%) individuos seropositivos a *T. gondii* y en 1 de entre 110 individuos seronegativos a este parásito. Posteriormente, Tranas *et al.* (1999) también detectaron anticuerpos anti-*N. caninum* en el suero de 69 de 1.029 (6,7%) mujeres con antecedentes de aborto mediante IFI y western blot. Aunque la tasa de seropositividad fue muy baja, estos resultados indican que anticuerpos

frente a *N. caninum* pueden estar presentes en el suero humano y no se debe descartar la posibilidad de la infección por este parásito afecte al hombre.

1.2.2. Patogenia de la infección por *N. caninum*

Una vez en el organismo, los taquizoítos pueden infectar las células de casi todos los tejidos del animal, pero muestran un mayor tropismo por las células del Sistema Nervioso Central (SNC), células musculares esqueléticas y cardíacas y células endoteliales, ocasionando la destrucción de las mismas con la consiguiente aparición de focos de necrosis, que constituyen la principal lesión de esta enfermedad (Barr *et al.*, 1991a; Anderson *et al.*, 1991; Wouda *et al.*, 1996).

1.2.2.1. Adultos

1.2.2.1.1. Hembras

Las consecuencias de la infección en una hembra gestante pueden ser: el aborto del embrión o del feto y el nacimiento de terneros congénitamente infectados con o sin sintomatología. La infección al comienzo de la gestación suele originar la muerte del feto, mientras que a mitad de la gestación puede provocar la muerte fetal o el nacimiento de terneros congénitamente infectados, los cuales pueden presentar sintomatología al nacimiento. Finalmente, si la infección se produce en la última fase de la gestación suelen nacer terneros congénitamente infectados sin sintomatología aparente, los cuales pueden transmitir la infección a la descendencia si son mantenidos en el rebaño como ganado de reposición (Buxton *et al.*, 2002).

La infección de las hembras gestantes, y por tanto del feto, se puede producir como consecuencia de una reactivación de una infección persistente o por la ingestión de ooquistes esporulados. Este último supuesto confiere una posible explicación para algunos brotes de abortos por *Neospora* descritos por diversos autores (McAllister *et al.*, 1996a). Además, es razonable asumir que la infección en el feto viene precedida por una parasitemia en la madre con una posterior invasión de las células en el útero grávido por parte del parásito y un posible daño a la placenta, si bien tan solo una minoría de los fetos infectados sucumbe a una infección letal. Los factores que pueden conducir al desarrollo de la enfermedad son diversos:

el momento de la gestación en el que se produce la parasitemia (González *et al.*, 1999) -en la mayoría de los casos directamente relacionado con el momento de la recrudescencia de una infección maternal persistente (Buxton *et al.*, 1998)-, la cantidad y duración de la parasitemia, la capacidad del feto para desarrollar una respuesta inmune, las características del aislado de *N. caninum* y la eficacia de la respuesta inmune maternal (Innes *et al.*, 2000b; Innes *et al.*, 2002).

Cuando *N. caninum* invade las células en el útero bovino se multiplica y causa la destrucción focal del tejido tanto materno como fetal de la placenta, desencadenando una respuesta inflamatoria y, a partir de esta zona, el daño se extiende a la membrana corioalantoidea entre los cotiledones (Barr *et al.*, 1994b; Otter *et al.*, 1995). La placenta juega un papel esencial en el equilibrio inmunológico. Durante la gestación se ponen en marcha una serie de mecanismos complejos que permiten que la madre gestante no rechace al feto, sin embargo este hecho puede favorecer la colonización de ciertos microorganismos como es el caso de *N. caninum*. En la placenta predomina la presencia de citoquinas “beneficiosas” como la interleuquina (IL) -10 y el factor de crecimiento tumoral (TGF) - β , mientras que las citoquinas con un efecto potencialmente perjudicial, como la IL-2, IL-12, el IFN- γ y el TNF- α , están restringidas (Entrican, 2002). Cualquier respuesta inflamatoria que se origina como consecuencia de la invasión y multiplicación de los taquizoítos en las células de la placenta del feto y de la madre podría estimular el desarrollo de una respuesta inmune inapropiada y por tanto favorecer que se produzca el consiguiente aborto. En este sentido, Buxton *et al.* (2002) también han sugerido que el TNF- α podría jugar un papel determinante en el fracaso de la gestación.

1.2.2.1.2. Machos

La patogenia de la infección en los machos es un aspecto importante y desconocido de la neosporosis que hasta el momento no ha sido abordado. Los estudios sobre la prevalencia de la infección en los machos, la posible eliminación del parásito vía semen y su presencia en el aparato reproductor masculino son necesarios ya que podrían aportar una valiosa información acerca de la importancia y las repercusiones clínicas de la infección en los machos y su posible participación en el ciclo biológico de *N. caninum*.

1.2.2.2. Fetos

La presencia de *N. caninum* parece ser necesaria para que se produzca el aborto, aunque la infección por sí misma no sería suficiente, en todos los casos, para producirlo. Otros factores como cambios de manejo, infecciones concomitantes, alteraciones en el estado inmunitario, etc. desempeñarían un importante papel.

Simultáneamente al daño y a la respuesta inflamatoria en la placenta materna y fetal, el parásito entra en la corriente sanguínea fetal e invade diversos tejidos como corazón, hígado, músculo esquelético y pulmón, mostrando una especial predilección por el SNC. En el SNC y alrededor de los capilares es donde el parásito se localiza en las fases iniciales (Buxton *et al.*, 1998b).

Los fetos abortados, frecuentemente autolíticos, no suelen presentar lesiones macroscópicas características y no hay retención de placenta. En determinadas circunstancias puede producirse la momificación del feto -hallazgo clínico característico en los brotes de aborto por neosporosis- que es abortado o bien retenido hasta el final de la gestación.

Los resultados obtenidos tanto en infecciones naturales (Barr *et al.*, 1991b) como en infecciones experimentales (Barr *et al.*, 1994b; Williams *et al.*, 2000) han demostrado que la transmisión del parásito al comienzo de la gestación es menos probable, pero si se produce conduce a la muerte fetal seguida de una posterior reabsorción. El feto es especialmente vulnerable durante el primer tercio de gestación debido a la inmadurez de su sistema inmune, cuando se está desarrollando el timo, el bazo y los nódulos linfáticos periféricos. Según avanza la gestación, la posibilidad de transmisión aumenta y, por tanto, el riesgo de aborto. Durante el tercio medio de gestación, estos tejidos empiezan a reconocer y a responder frente a los microorganismos, por consiguiente antes de los 100 días de gestación el feto es incapaz de reconocer ningún patógeno (Osburn, 1986). Entre los días 100 y 150 de gestación el feto comienza a desarrollar una respuesta inmune y después del día 150 el feto, progresivamente, es cada vez más inmunocompetente. Durante este segundo tercio de gestación ocurren la mayoría de los abortos ya que el feto desarrolla una respuesta inmune rudimentaria e insuficiente para superar la infección (González *et al.*, 1999). Finalmente, la infección al final de la gestación tiene como resultado el nacimiento de terneros congénitamente infectados pero clínicamente sanos, ya que el feto es capaz de desarrollar una defensa competente frente al patógeno. La patogenia del aborto por *N. caninum* también está estrechamente relacionada con la respuesta inmune celular desarrollada por las hembras gestantes, la cual es

notablemente más eficaz al comienzo de la gestación que en el segundo tercio de la gestación (Innes *et al.*, 2002). En definitiva, el éxito de la infección por el parásito también está en función de la adecuación de la respuesta inmune del hospedador.

1.2.2.3. Terneros

La infección congénita *in utero* tiene como resultado, en la mayoría de los casos, el nacimiento de terneros infectados clínicamente sanos. En estos animales asintomáticos, la infección intrauterina induce en fetos inmunocompetentes la producción de títulos elevados de anticuerpos específicos precalostrales, los cuales pueden llegar a ser superiores a los títulos de anticuerpos de las madres. Hasta un 95% de los terneros infectados congénitamente pueden nacer clínicamente normales (Davison *et al.*, 1999a), los cuales son seropositivos y proceden de madres también seropositivas, y que, a su vez, pueden transmitir la infección a su descendencia. A pesar de ser la infección subclínica la forma más frecuente de presentación de la neosporosis congénita, también se han descrito algunos casos de terneros infectados congénitamente que presentaron sintomatología nerviosa como consecuencia de la presencia de quistes tisulares en el SNC (Dubey & Lindsay, 1996).

1.2.3. Sintomatología

1.2.3.1. Adultos

En los bovinos adultos, el aborto es el único signo clínico observado en las hembras gestantes infectadas, aunque la mayor parte del ganado adulto es capaz de controlar la infección y permanecer clínicamente normal aunque persistentemente infectado.

El aborto puede producirse tanto en novillas como en vacas y, aunque no se ha diagnosticado en animales mayores de once años, se desconoce la existencia de relación entre la edad de los animales y su receptividad a la infección. La fertilidad después del aborto no está afectada y los animales salen en celo normalmente. Entre el 5 y el 6% de estos animales pueden abortar de nuevo, produciéndose la repetición del aborto durante la gestación siguiente o en otras posteriores (Anderson *et al.*, 1995; Wouda *et al.*, 1998b). Como se ha señalado previamente, el aborto repetido por neosporosis en el mismo animal se produce en

muy pocas ocasiones (menos del 5%), sin embargo, la transmisión repetida de la infección desde las madres infectadas a la descendencia es frecuente.

En los rebaños infectados por *N. caninum*, los abortos pueden producirse en cualquier época del año y presentarse de forma esporádica, endémica o en forma de brotes epidémicos, pero sin síntomas previos de enfermedad.

1.2.3.2. Feto

La infección fetal puede producirse en cualquier momento de la gestación, pero las consecuencias para el feto son más graves al comienzo de ésta. En los primeros momentos de la gestación, la neosporosis puede ocasionar la muerte del embrión o del feto en el útero y su reabsorción. Generalmente, el aborto tiene lugar entre el 3^{er} y el 9^o mes de la gestación, siendo más frecuente en torno a los 4-7 meses (Anderson *et al.*, 1995; Moen *et al.*, 1996; Campero *et al.*, 1998; Sager *et al.*, 2001).

1.2.3.3. Terneros

La infección del feto no siempre provoca la muerte del mismo y, en ocasiones, se produce el nacimiento de terneros infectados congénitamente y con sintomatología nerviosa, los cuales probablemente morirán a las cuatro semanas de vida (Dubey & Lindsay, 1996). En estos animales que nacen vivos, los primeros signos clínicos aparecen, frecuentemente, a los 4-5 días del parto o se retrasan hasta transcurridas 2 semanas. La casuística es reducida y estos animales suelen presentar problemas neuromusculares muy variables -desde incoordinación ligera hasta parálisis completa-, debilidad y dificultad para levantarse. Los miembros anteriores y/o posteriores están flexionados o hiperextendidos y el examen neurológico revela ataxia, disminución del reflejo patelar y pérdida de coordinación (Barr *et al.*, 1991b; Barr *et al.*, 1993). En ocasiones hay exoftalmia, posición asimétrica de los ojos y otras deformaciones asociadas con la lesión de las células nerviosas embrionarias (Bryan *et al.*, 1994).

La gran variabilidad del cuadro clínico observada en los animales con neosporosis congénita está relacionada, probablemente, con la edad y el desarrollo del sistema inmune del feto en el momento de la infección y con la distribución de las lesiones en el SNC.

1.2.4. Lesiones

Las lesiones van a localizarse principalmente en el feto abortado y en la placenta. Los animales adultos, aunque infectados, no manifiestan alteraciones lesionales evidentes. Los fetos pueden aparecer totalmente autolíticos o momificados, siendo esta última presentación relativamente común en los abortos causados por este parásito. En ocasiones, se observan, únicamente, restos del esqueleto óseo del feto ya que el resto de los tejidos pueden ser reabsorbidos en el útero. La placenta suele ser eliminada con el feto abortado, sin que exista retención.

Las alteraciones macroscópicas son raras y se suelen presentar en la musculatura, tanto esquelética como cardíaca, en forma de pequeñas áreas blanquecinas que profundizan a la sección. Microscópicamente, las alteraciones que aparecen en el feto son altamente específicas de esta infección, siendo el estudio histopatológico de los fetos abortados uno de los principales métodos de diagnóstico. Estas lesiones, como ya se ha señalado, van a tener una naturaleza inflamatoria y degenerativa (focos de necrosis) y, virtualmente, pueden aparecer en cualquier órgano o tejidos fetal, aunque por frecuencia de aparición destacan el SNC, el corazón, el músculo esquelético y el hígado. En otros órganos como el riñón, el pulmón, el páncreas o las glándulas adrenales también se han encontrado lesiones asociadas a esta parasitosis (Barr *et al.*, 1991b; Rogers *et al.*, 1993).

En el SNC, este parásito invade de forma activa neuronas y astrocitos, por lo que provoca trastornos neuromusculares graves por destrucción de las células nerviosas, incluyendo nervios craneales y espinales y afectando a la transmisión del impulso nervioso (Mayhew *et al.*, 1991; Dubey & de Lahunta, 1993). La lesión más característica es una encefalomiелitis no purulenta y de distribución multifocal. Esta lesión se caracteriza por la presencia de uno o varios focos de necrosis que, ocasionalmente, muestran hemorragias o áreas de mineralización (Boulton *et al.*, 1995). Rodeando a estos focos se localiza un infiltrado inflamatorio formado por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas y áreas de gliosis, con proliferación de la microglía y de los astrocitos. Ocasionalmente, se ha observado alrededor de los quistes tisulares la formación de granulomas y bradizoítos en degeneración lo que indica que algunos quistes tisulares se rompen y la reacción del hospedador produce focos de

inflamación (Dubey *et al.*, 1990; Mayhew *et al.*, 1991). Esporádicamente, pueden apreciarse manguitos perivasculares de células mononucleares alrededor de estas lesiones.

En el corazón, la alteración típica es una miocarditis que puede variar desde focal a difusa y está constituida por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas en menor número que se localizan entre las fibras musculares que pueden mostrar signos de degeneración e incluso necrosis con posterior calcificación (Wouda *et al.*, 1996).

En el resto de órganos, aunque todos serían susceptibles de presentar lesiones, éstas aparecen con menos frecuencia. El hígado presenta una hepatitis no purulenta caracterizada por una necrosis de los hepatocitos asociada a un infiltrado de macrófagos y linfocitos distribuidos de forma difusa, aunque más intensamente en los espacios porta (Barr *et al.*, 1990; Wouda *et al.*, 1996, 1997b). Con menor frecuencia, pueden detectarse infiltrados inflamatorios semejantes a los descritos en otros órganos como el pulmón -focales o difusos-, el riñón -localizados preferentemente en la cortical-, el páncreas o la glándula adrenal. En los ganglios linfáticos únicamente se observa una hiperplasia reactiva, con presencia de folículos linfoides prominentes.

N. caninum puede ser detectado casi exclusivamente en las lesiones del SNC y con menos frecuencia en el corazón. En el resto de los órganos afectados es más difícil encontrar al parásito. En muchas ocasiones, son necesarias secciones seriadas del tejido para poner de manifiesto al agente, aún en presencia de lesiones evidentes. Pueden aparecer taquizoítos asociados a las zonas de necrosis del SNC en número escaso y difícilmente identificables sin la ayuda de técnicas inmunohistoquímicas. El parásito puede localizarse tanto en el neuropilo como en el interior del citoplasma de las neuronas. Ocasionalmente, los taquizoítos se localizan asociados a los infiltrados inflamatorios y a las áreas de gliosis presentes en el encéfalo o formando grupos, sin pared que los delimite, en zonas donde no existe lesión. Los quistes tisulares de *N. caninum* son menos frecuentes y aparecen en el tejido nervioso sin asociarse con la presencia de lesiones, aunque, excepcionalmente, pueden observarse en zonas de infiltrado inflamatorio. Recientemente Peters *et al.* (2001a) han detectado quistes tisulares en tejido muscular de animales con infección natural. Las técnicas inmunohistoquímicas, utilizando anticuerpos específicos frente a *N. caninum* son también de gran ayuda en la identificación de los quistes.

Aunque la infección subclínica parece ser bastante común, hasta el momento son pocos los casos clínicos de neosporosis que se han diagnosticado en terneros nacidos vivos de madres infectadas. Las principales lesiones se van a localizar en el SNC. Macroscópicamente, pueden observarse áreas de malacia, con o sin hemorragia, semejantes a las descritas en los fetos abortados. Estas lesiones se localizan sobre todo en la médula espinal, que también puede presentar malformaciones (Barr *et al.*, 1991b; Bryan *et al.*, 1994). Microscópicamente, se aprecia una encefalomiелitis no purulenta, con necrosis moderada y presencia de macrófagos y células de Gitter, linfocitos, células plasmáticas y, ocasionalmente, eosinófilos. Así mismo, se observan, frecuentemente, manguitos perivasculares, focos de gliosis, vacuolización del neuropilo y la degeneración walleriana de los axones con presencia de esferoides. Estos fenómenos de tipo degenerativo e inflamatorio pueden localizarse también en las porciones extramedulares de los nervios espinales. Diferentes partes de la musculatura pueden presentar atrofia, que junto con algunas deformaciones de las extremidades, serían consecuencia de las alteraciones nerviosas. En estos terneros no es extraño observar taquizoítos y quistes parasitarios en los tejidos, tanto en el encéfalo como en la médula espinal, asociados a zonas lesionadas o no. La cantidad de parásitos o la presencia de una u otra forma varía de un animal a otro en los casos descritos.

1.2.5. Respuesta inmune

N. caninum es un parásito intracelular obligado, por lo cual tanto la respuesta de anticuerpos, cuya puesta en evidencia es de gran ayuda en el diagnóstico y en estudios epidemiológicos, como los mecanismos implicados en la respuesta celular son importantes elementos de la respuesta inmune frente a *N. caninum*. En este sentido, los diversos estudios de la respuesta inmune desarrollada por el hospedador frente al parásito, tanto en el modelo murino como en el modelo bovino han demostrado que tras la infección se induce una respuesta inmune humoral y celular.

Cabe señalar que, hasta el momento, la vacunación frente a *N. caninum* confiere una menor protección que frente a *T. gondii*. Con el objetivo de estudiar la viabilidad de la aplicación de la vacunación como estrategia de control de la neosporosis, es necesario determinar hasta qué punto los animales desarrollan una inmunidad protectora como consecuencia de una infección por el parásito. Los estudios epidemiológicos realizados por McAllister *et al.* (2000) en rebaños de ganado bovino han demostrado que las vacas

persistentemente infectadas tienen una menor probabilidad de abortar que las vacas no infectadas tras una exposición previa al parásito. Por otra parte, estudios adicionales han puesto de manifiesto que el riesgo de abortos asociados a la infección por *N. caninum* es más elevado en la primera gestación que en las posteriores (Thurmond *et al.*, 1997a). Estas observaciones sugieren que el ganado podría desarrollar una inmunidad protectora frente al aborto, sin embargo la eficacia de dicha inmunidad adquirida parece ser insuficiente para prevenir la transmisión vertical (Innes *et al.*, 2002).

1.2.5.1. Respuesta inmune humoral

1.2.5.1.1. Modelo bovino

Tanto en los animales adultos como en los fetos inmucocompetentes la infección provoca el desarrollo de una respuesta inmune humoral, mediada mayoritariamente por IgG2 (Andrianarivo *et al.*, 2001). Guy *et al.* (2001) detectaron un incremento de los anticuerpos maternos asociado a la recrudescencia de la parasitosis en reproductoras con infección natural y Andrianarivo *et al.* (2001) detectaron una marcada respuesta humoral en fetos abortados tras realizar infecciones experimentales en reproductoras. Sin embargo, se desconoce, si las fluctuaciones de anticuerpos son debidas a estímulos antigénicos por reactivación de infecciones latentes o por reinfecciones a partir de una fuente externa, así como el papel que juegan estos anticuerpos en el desarrollo de una inmunidad protectora, existiendo datos contradictorios al respecto. De acuerdo con las observaciones de Paré *et al.* (1996) la inmunidad que se desarrolla en respuesta a una exposición primaria a *N. caninum* es insuficiente para prevenir la transmisión vertical, debido a la tasa elevada de transmisión congénita del parásito de la madre al feto observada. Sin embargo, en las infecciones experimentales realizadas por Williams *et al.* (2000) e Innes *et al.* (2001a) se comprobó que los animales con infección crónica desarrollan una fuerte inmunidad celular y humoral que les protege frente a posteriores abortos y evita la transmisión congénita.

En los rebaños que presentan aborto endémico se han detectado fluctuaciones en los niveles de anticuerpos a lo largo de la gestación. Estos niveles de anticuerpos detectados durante la gestación pueden predecir la infección congénita o el aborto. De acuerdo con los resultados obtenidos por Paré *et al.* (1996) las reproductoras que presentan títulos elevados de anticuerpos alrededor del día 240 de gestación tendrán mayor probabilidad de parir terneros

seropositivos al nacimientos, mientras que las reproductoras con títulos de anticuerpos elevados entre los días 180 y 210 tendrán una mayor probabilidad de abortar. Posteriormente, resultados similares fueron obtenidos por Quintanilla-Gozalo *et al.* (2000), los cuales detectaron fluctuaciones de anticuerpos en reproductoras con infección natural a lo largo de la gestación, correspondiendo los mayores títulos de anticuerpos a las hembras que abortaban a mitad de la gestación y coincidiendo con el momento aborto. Por otra parte, también existe una asociación significativa entre las fluctuaciones de anticuerpos detectadas a lo largo de la gestación y la transmisión congénita, ya que un aumento del título de anticuerpos durante el sexto mes de gestación está relacionado con el nacimiento de terneros congénitamente infectados (Pereira-Bueno *et al.*, 2000).

Los estudios realizados en bovinos infectados experimentalmente también han destacado el desarrollo de una marcada respuesta inmune humoral en respuesta a la infección. En novillas infectadas experimentalmente mediante inoculación intravenosa del parásito, se detectaron IgM específicas a partir del día 12 p.i., mientras que la respuesta de IgG1 e IgG2 fue más tardía, detectándose a partir del día 29 p.i. y presentando un máximo el día 35 p.i. (Lunden *et al.*, 1998). Por su parte, cuando Williams *et al.* (2000) infectaron reproductoras gestantes en diferentes momentos de la gestación detectaron un aumento del nivel de anticuerpos a las 4-6 semanas p.i., alcanzando un pico alrededor de la séptima semana y disminuyendo a partir de la semana 10.

1.2.5.1.2. Modelo murino

Por el momento, debido a la descripción relativamente reciente de la enfermedad, no son muchos los datos de que se dispone. En el caso de las infecciones experimentales en ratones destaca la producción de IgG1 y IgG2a. Una respuesta de tipo Th2 asociada a la producción de altos niveles de IgG1, que a su vez está estimulada por la IL-4, se ha relacionado con una mayor susceptibilidad y agravamiento de la infección (Long *et al.*, 1998). Por el contrario, la producción de IgG2a, dirigida principalmente por el IFN- γ , es característica de una respuesta inmune de tipo Th1 y tiene un papel crucial en las fases iniciales de la infección interviniendo en la eliminación del parásito (Khan *et al.*, 1997; Baszler *et al.*, 1999b; Nishikawa *et al.*, 2001e).

1.2.5.2. Respuesta inmune celular

Los diversos estudios realizados hasta el momento en diferentes especies animales sobre la respuesta inmune desarrollada frente a la infección por *Neospora* han señalado la participación de la respuesta inmune celular en los mecanismos de defensa del hospedador frente a la enfermedad interviniendo, fundamentalmente, macrófagos y linfoquinas.

1.2.5.2.1. *In vitro*

Los estudios preliminares demuestran que el IFN- γ puede jugar un papel importante, ya que el tratamiento de cultivos celulares de taquizoítos con IFN- γ reduce significativamente la multiplicación *in vitro* del parásito (Innes *et al.*, 1995; Nishikawa *et al.*, 2001b,d).

1.2.5.2.2. Modelo bovino

Hasta el momento, la información sobre el papel de las diferentes linfoquinas y poblaciones celulares en la respuesta inmune bovina es escasa. Los diversos estudios realizados tanto en infecciones naturales como experimentales sobre la respuesta inmune celular han puesto de manifiesto la participación de linfoquinas como el IFN- γ y la IL-4. Andrianarivo *et al.* (2001) destacaron la participación en la respuesta inmune del IFN- γ , la IL-4 y de las células T CD4+ y macrófagos. Así mismo, Guy *et al.* (2001) demostraron el efecto protector del IFN- γ al final de la gestación en hembras con infección natural, siendo sus valores especialmente elevados en aquellas reproductoras que no transmitieron la infección a la descendencia. Recientemente, Almería *et al.* (2002a) han estudiado la respuesta inmune que desarrollan las hembras y los fetos cuando éstas son infectadas en el segundo trimestre de gestación. En dicho estudio se detectaron mayores niveles de linfocitos CD3+, CD4+ y CD8+ en las reproductoras infectadas, en los fetos destacó la presencia de linfocitos CD3+, y la infección estimuló una respuesta tanto Th1 como Th2.

Por otra parte, las novillas infectadas experimentalmente desarrollan una respuesta inmune de base celular en la que destacan los elevados niveles de IFN- γ (Lunden *et al.*, 1998; Innes *et al.*, 2001). En el estudio realizado por Williams *et al.* (2000) la infección vino acompañada de una respuesta de tipo Th1 mediada por IgG2, linfoproliferación y elevados niveles de IFN- γ . Además, la estimulación *in vitro* de linfocitos de novillas infectadas

experimentalmente con antígenos de taquizoítos originó una respuesta proliferativa a partir del día 8 p.i. que se mantuvo al menos durante 77 días (Lunden *et al.*, 1998).

1.2.5.2.3. Modelo murino

En ratones, la infección provoca la estimulación de la respuesta celular con la producción de IFN- γ . Los macrófagos y las células dendríticas responden tras la infección por *N. caninum*, liberando linfoquinas como la IL-12, IL-10, IL-4, el IFN- γ y el TNF- α que, junto con los linfocitos CD4+ y CD8+, intervienen en la regulación del balance de la respuesta celular Th1/Th2, que es crucial en la respuesta protectora desarrollada frente al parásito (Kasper & Khan, 1998; Nishikawa *et al.*, 2001e). En la actualidad se dispone de escasa información sobre el papel que juegan las diferentes linfoquinas en la respuesta inmune desarrollada por los ratones infectados. El IFN- γ y la IL-12, responsables de una respuesta de tipo Th1, tienen un efecto sinérgico y están implicados en el control de la neosporosis aguda (Baszler *et al.*, 1999) y su depleción origina un aumento de la susceptibilidad de los ratones a la infección (Khan *et al.*, 1997). Sin embargo, la IL-4 está relacionada con una respuesta de tipo Th2 y con el progreso de la enfermedad, por ello una posible estrategia para disminuir la transmisión congénita es neutralizar la producción de IL-4 favoreciendo de esta forma la producción de IL-12 e IFN- γ (Long & Baszler 2000). Long *et al.* (1998) describieron los perfiles de linfoquinas asociados a la carga parasitaria y al desarrollo de sintomatología nerviosa cuando se realizaron infecciones experimentales en ratones. En los ratones resistentes a la infección se detectaron bajos niveles de IL-4 y altos niveles de IFN- γ , mientras que en los ratones sensibles a la infección se detectaron tanto IL-4 como IFN- γ . Por otro lado, en el estudio realizado por Khan *et al.* (1997) se detectó en ratones no gestantes una respuesta de citoquinas mixta durante las fases iniciales de la infección, detectándose altos niveles de IL-4, IL-10 e IFN- γ .

Ambas poblaciones de linfocitos T, CD4+ y CD8+, juegan un papel importante en la prevención de la infección por *Neospora* en las fases más avanzadas de la infección (Nishikawa *et al.*, 2001e). Las células T CD8+ son parcialmente responsables de la protección frente a *N. caninum*, al contrario que en *T. gondii* donde las CD8+ juegan un papel esencial en la protección (Tanaka *et al.*, 2000). Por consiguiente, en la respuesta inmune desarrollada frente a *Neospora* deben considerarse dos mecanismos en función de la fase de la infección. En una fase

temprana de la infección destaca la participación del IFN- γ producido por las células T activadas como primera línea de defensa destruyendo a los parásitos intracelulares y, de esta forma, aumentando la resistencia a la infección. En fases más avanzadas de la infección las células CD4+ jugarían un papel más importante que el IFN- γ . Al principio de la interacción, las células T CD4+ activadas por el IFN- γ originan una respuesta inmune de tipo Th1, a su vez activando las células CD4 citotóxicas que se encargan de destruir las células infectadas con el parásito. Finalmente, las células CD4+ también serían responsables de una disminución de la tasa de mortalidad, ya que intervienen en la producción de altos niveles de anticuerpos que inducen otros mecanismos protectores.

En la actualidad, son necesarios estudios más exhaustivos sobre el perfil de linfoquinas que se desarrollan, especialmente, en las infecciones naturales. Además, el diseño de vacunas debe ir encaminado a la identificación de antígenos específicos de *Neospora* que estimulen una respuesta inmune protectora humoral y celular, en la cual estén implicadas tanto las células T CD4+ como CD8+.

1.2.6. Diagnóstico

Aunque la infección por *N. caninum* en los fetos abortados solo puede diagnosticarse en cada caso individual -detección de anticuerpos específicos y/o identificación del parásito en los tejidos (inmunohistoquímica, PCR)-, los análisis serológicos en los animales adultos proporcionan una información inicial acerca de la magnitud del problema.

El diagnóstico etiológico del aborto en el ganado bovino es complejo y laborioso y, de hecho, solamente se consigue determinar su origen en menos del 50% de los casos remitidos a los laboratorios especializados. En aquellos casos en los que se llega a un diagnóstico etiológico, más del 90% corresponden a agentes infecciosos y parasitarios entre los que, actualmente, ocupa un lugar destacado *N. caninum*. La valoración adecuada de los datos de la anamnesis y la investigación epidemiológica, así como de los datos obtenidos en el examen clínico y lesional de los animales afectados (hembras abortadas y sus fetos) debe realizarse siempre, aunque es imprescindible la realización del diagnóstico laboratorial para confirmar la etiología del aborto teniendo en cuenta otras posibles causas infecciosas y no transmisibles.

1.2.6.1. Diagnóstico epidemiológico y clínico

Además de los datos relativos a la explotación y su entorno y al manejo del rebaño (sistema de explotación, dieta, historial reproductor, introducción de nuevos animales, tratamientos y vacunaciones, presencia de perros, etc.), la historia clínica de la enfermedad puede facilitar la emisión de un diagnóstico acertado. En los rebaños infectados por *N. caninum*, los abortos se producen tanto en novillas como en vacas y pueden presentarse de forma esporádica, endémica o epidémica en cualquier época del año. Puesto que se trata de una infección que, fundamentalmente, se transmite por vía transplacentaria, la existencia de antecedentes de aborto en alguno de los ascendientes o descendientes de los animales afectados es importante. Así mismo, la repetición del aborto en algunos animales, la edad del feto y la observación de fetos momificados puede ser orientativa.

Como ya hemos señalado anteriormente, si la infección intrauterina tiene lugar al inicio de la gestación, la muerte y reabsorción embrionaria o fetal suelen pasar desapercibidas pero, si la infección *in utero* tiene lugar más tardíamente, puede producirse el aborto -único signo clínico de la infección en los rebaños bovinos- con presencia o no de momificación fetal. También puede producirse el nacimiento de terneros clínicamente afectados o de animales aparentemente sanos pero con infección subclínica. En las hembras gestantes que han abortado no se observan signos clínicos posteriores y el celo reaparece normalmente. No obstante, el aborto o el nacimiento de animales infectados, con o sin síntomas, puede repetirse en futuras gestaciones (Dubey, 1999c; Jenkins *et al.*, 2002).

La ausencia de sintomatología en los animales adultos infectados impide el diagnóstico clínico, y cuando se produce el aborto el examen macroscópico del feto y de la placenta aporta información poco concluyente.

1.2.6.2. Diagnóstico laboratorial

En el feto, el diagnóstico laboratorial se realiza en los tejidos y en los líquidos fetales mediante técnicas que permiten la detección de lesiones, el aislamiento del parásito, su identificación, la detección de sus ácidos nucleicos en los tejidos infectados y la puesta en evidencia de anticuerpos anti-*Neospora* en los fluidos fetales. Por ello, siempre debe remitirse al laboratorio el feto completo con la placenta y una muestra de suero materno. Si ello no fuera posible, debe enviarse al menos la cabeza del feto, puesto que el parásito -taquizoítos y/o

quistes- y las lesiones más características producidas en los fetos abortados se localizan preferentemente en el cerebro, incluso en el caso de fetos momificados o con autólisis avanzada. En el feto, debe estimarse la edad aproximada mediante la medida de la longitud entre la región occipital y la base de la cola.

En adultos, el diagnóstico laboratorial se realiza mediante la detección de anticuerpos específicos en el suero. También es posible la detección de anticuerpos específicos en calostro y leche de vacas infectadas, así como en fluidos vaginales y saliva, siendo el orden de frecuencia de detección de anticuerpos: suero, leche, fluidos vaginales y saliva (Ooi *et al.*, 2000).

1.2.6.2.1. Técnicas histológicas

En muchos casos, el diagnóstico de la enfermedad se ha basado en la detección del parásito o las lesiones causadas por éste en los tejidos fetales mediante técnicas histológicas convencionales (tinción de cortes histológicos con hematoxilina y eosina) e inmunohistoquímicas utilizando anticuerpos específicos frente a *N. caninum*. Como hemos señalado anteriormente, *N. caninum* se localiza con mayor frecuencia en el cerebro y en el corazón de los fetos abortados que en otros órganos, incluida la placenta. También, es más frecuente la detección de taquizoítos del parásito en los tejidos de los fetos abortados al principio de la gestación, apareciendo los quistes tisulares en mayor número en los terneros mortinatos o en animales neonatos con sintomatología y sacrificados antes de los 7 días de vida (Dubey & Lindsay, 1996).

1.2.6.2.1.1. Histología convencional

La identificación del parásito en este tipo de estudios es muy difícil debido a su similitud morfológica con *T. gondii* y *Sarcocystis* spp. y a que, generalmente, el número de parásitos (taquizoítos y/o quistes) presentes en las muestras es escaso y son difíciles de encontrar en los cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina. La observación de lesiones histológicas degenerativas e inflamatorias ("lesiones compatibles"), típicas de las infecciones por protozoos, localizadas en cerebro y corazón permiten emitir un diagnóstico presuntivo de aborto por neosporosis.

1.2.6.2.1.2. Inmunohistoquímica

Las técnicas inmunohistoquímicas permiten localizar e identificar al parásito en los cortes de tejido utilizando un suero policlonal o un anticuerpo monoclonal anti-*Neospora* (Lindsay & Dubey, 1989b). En ocasiones, se han observado variaciones considerables en la reacción del antisuero en dependencia del tipo de antígeno, el estado del parásito usado para inmunizar al conejo y la fijación de los antígenos parasitarios por lo cual, en los últimos años, se han utilizado preferentemente anticuerpos monoclonales en las pruebas inmunohistoquímicas.

Actualmente, en la práctica diaria, se analizan por técnicas inmunohistoquímicas - basadas en el uso del complejo Avidina-Biotina Peroxidasa (ABC)- los tejidos fetales que presentan “lesiones compatibles” en el examen histológico convencional con el fin de confirmar la presencia de restos de antígeno, taquizoítos enteros o quistes con bradizoítos en los tejidos afectados. Hay que tener en cuenta que la sensibilidad de las técnicas histológicas utilizadas con fines diagnósticos puede variar en función del número de cortes histológicos analizados y del grado de autólisis de los tejidos.

1.2.6.2.2. Detección de ácidos nucleicos

Se han descrito varias técnicas de detección de ácidos nucleicos del parásito en los tejidos fetales basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las cuales presentan una elevada sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la infección en los fetos abortados (Gottstein *et al.*, 1998; Sager *et al.*, 2001). Entre las técnicas descritas hasta el momento, cabe comentar aquellas basadas en la amplificación de la región ITS1 del DNA ribosomal (Holmdahl & Mattsson, 1996), las que amplifican fragmentos de la región Nc5 del DNA genómico (Yamaga *et al.*, 1996) y las que utilizan el gen 14-3-3 de *N. caninum* (Lally *et al.*, 1996a) (Tabla VIII). Esta tecnología resulta de gran utilidad para el diagnóstico ya que permite amplificar cantidades tan pequeñas de DNA como las que, en la práctica, se encuentran en muestras clínicas autolíticas o sometidas a fijación química. Además la detección del DNA parasitario en los tejidos sospechosos mediante estas técnicas es rápida -menos de 24 horas- y la sensibilidad y especificidad de las mismas es muy elevada, detectándose contaminaciones

con un solo taquizoíto. Sin embargo, Pereira *et al.* (2003) han señalado la necesidad de utilizar más de una técnica diagnóstica para aumentar la probabilidad de detectar la infección en los fetos abortados.

En la actualidad, las técnicas de PCR que se han desarrollado han sido utilizadas no solo en el diagnóstico de la infección -sobre todo enfocado al aborto bovino-, sino también en el estudio de la patogenia de la enfermedad -en infecciones experimentales en distintas especies- y en estudios filogenéticos, en los cuales la técnica de PCR se ha combinado con otras técnicas como el RFLP y el RAPD. Recientemente, el desarrollo en paralelo de dos técnicas de PCR cuantitativa permite no solo la detección sino también la cuantificación del DNA del parásito en los tejidos de animales infectados (Collantes-Fernández *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2002).

Tabla VIII: Principales técnicas de PCR empleadas en el diagnóstico e investigación de *N. caninum*.

Método	Secuencia diana	Aplicación (especie)	Referencia
RAPD-PCR	-	Estudios de filogenia	Guo & Jonson, 1995
PCR anidada	ITS1	Diagnóstico de la infección (ovejas) Diagnóstico del aborto (vaca)	Buxton <i>et al.</i> , 1998
PCR	ITS1	Estudios de filogenia (ratón)	Holmdahl & Mattsson, 1996
PCR	p-Nc5		Kaufmann <i>et al.</i> , 1996
PCR	ITS1	Estudios de filogenia	Payne & Ellis, 1996
PCR	p-Nc5	(ratones)	Yamage <i>et al.</i> , 1996
PCR anidada	14-3-3	(ratones)	Lally <i>et al.</i> , 1996a
PCR + sonda captura	(nss-r)RNA	(vaca y mono)	Ho <i>et al.</i> , 1996; 1997a,b
PCR+UDG+DIA	p-Nc5	Diagnóstico del aborto (vaca)	Gottstein <i>et al.</i> , 1998
Semi PCR anidada	p-Nc5	Diagnóstico del aborto (vaca)	Baszler <i>et al.</i> , 1999a
PCR anidada+PCR MIMIC	ITS1	Diagnóstico del aborto (ratón)	Ellis <i>et al.</i> , 1999a
PCR y QC-PCR	p-Nc5	(ratones)	Lidell <i>et al.</i> , 1999a,b
PCR-RFLP	IGS+5S	Estudios de virulencia de <i>N. caninum</i>	Fazaeli <i>et al.</i> , 2000
PCR	p-Nc5	Detección de ooquistes	Hill <i>et al.</i> , 2001
RAPD-PCR	-	Estudios de diferenciación de especies de <i>N. caninum</i>	Spencer <i>et al.</i> , 2000
PCR cuantitativa	p-Nc5	(ratones y fetos bovinos)	Collantes-Fernández <i>et al.</i> , 2002
PCR cuantitativa	p-Nc5	(ratas)	Müller <i>et al.</i> , 2002

1.2.6.2.3. Aislamiento

La inoculación en cultivo celular y en ratón pueden utilizarse para recuperar el parásito de tejidos fetales sospechosos. El éxito del aislamiento dependerá del número de organismos presentes en la muestra y del grado de autólisis de la misma.

1.2.6.2.3.1. En cultivo celular

Teóricamente, puede utilizarse la inoculación de tejidos animales sospechosos en cultivo celular para el aislamiento del parásito. Sin embargo, aunque *N. caninum* crece en diversos tipos de células (Vero, monocitos bovinos, células endoteliales de arteria pulmonar bovina, etc.) y por lo tanto la elección de la línea celular, probablemente, no es crítica, el porcentaje de aislamientos a partir de fetos bovinos con neosporosis confirmada histológicamente no supera el 2%. Los resultados mejoran cuando el aislamiento se intenta a partir del tejido nervioso de terneros con infección congénita nacidos a término porque, en estos casos, el número de parásitos en el interior de los quistes es elevado y son más resistentes que los taquizoítos.

1.2.6.2.3.2. Inoculación en ratón

A diferencia de lo que ocurre con *T. gondii*, el aislamiento de *N. caninum* mediante la inoculación en ratón de tejidos fetales sospechosos no es fácil. El uso de determinadas estirpes de ratones puede facilitar el aislamiento de *N. caninum* de los fetos bovinos, especialmente cuando el material no es apto para el cultivo celular debido a la contaminación microbiana.

1.2.6.2.4. Técnicas serológicas

La creciente importancia de la infección por *N. caninum* en las diferentes especies domésticas y salvajes ha conducido al desarrollo de diversas pruebas serológicas que utilizan extractos antigénicos y antígenos de taquizoítos de *N. caninum* (Atkinson *et al.*, 2000b). La infección en adultos suele presentarse de forma crónica originando una respuesta inmune humoral que puede ser detectada mediante diversas pruebas serológicas. Por otra parte, las técnicas de diagnóstico serológicas son muy útiles para el diagnóstico en fetos autolíticos.

Desde la primera descripción del parásito (Dubey *et al.*, 1988a), se han empleado con éxito diferentes pruebas serológicas en la detección de anticuerpos específicos de *N. caninum*, lo que ha permitido mejorar el diagnóstico y el conocimiento de la biología y la epidemiología de la infección. La primera prueba que se utilizó en el diagnóstico de la infección fue la IFI y desde entonces, se han desarrollado numerosas pruebas de ELISA basadas en diferentes preparaciones antigénicas junto con una prueba de aglutinación directa y la técnica de western blot (Björkman & Uggla, 1999; Atkinson *et al.*, 2000b).

1.2.6.2.4.1. Ventajas y limitaciones de la serología

Las técnicas serológicas presentan una elevada sensibilidad y especificidad. Así mismo, hacen posible el examen *in vivo* de los animales, permiten el diagnóstico de la infección y el estudio del papel que puede jugar un animal en el ciclo biológico del parásito o en la epidemiología de la infección.

En lo que se refiere a las limitaciones de la serología de *Neospora*, éstas residen, fundamentalmente, en las discrepancias existentes entre los diferentes laboratorios, en las propiedades de la técnica empleada y en las oscilaciones de los niveles de anticuerpos específicos que se producen en los animales infectados.

Por el momento, no se dispone de una prueba serológica normalizada y aceptada por la mayor parte de los laboratorios. Se han desarrollado diferentes pruebas con sus propios puntos de corte y criterios para la interpretación de los resultados, por lo que los datos de sensibilidad y especificidad obtenidos pueden ser indicativos pero no definitivos (Atkinson *et al.*, 2000b). Por otra parte, debido a que las reacciones antígeno-anticuerpo son consecuencia de diversas interacciones moleculares, ligeros cambios en las condiciones de las técnicas - diferentes preparaciones antigénicas y anticuerpos secundarios- pueden alterar los resultados (Björkman & Uggla, 1999). Por todo ello, es difícil realizar estudios comparativos entre los diferentes laboratorios, incluso cuando se ha utilizado la misma técnica serológica.

Finalmente, las fluctuaciones de anticuerpos que se han descrito en el ganado bovino pueden influir considerablemente en la sensibilidad de la técnica empleada. Todas las técnicas serológicas resultan ser eficaces en la identificación de animales con títulos de anticuerpos anti-

Neospora moderados o altos, como consecuencia de una recrudescencia de la infección (Conrad *et al.*, 1993b; Paré *et al.*, 1997; Dubey, 1999c). Sin embargo, las discrepancias entre las diversas pruebas aparecen cuando se analizan sueros con bajos niveles de anticuerpos específicos típicos de animales que presentan una infección crónica (Schaes *et al.*, 1998; Dubey, 1999c). Estos bajos niveles de anticuerpos pueden detectarse en diversas circunstancias, tales como la seroconversión, el descenso de los anticuerpos maternos en terneros y el descenso de anticuerpos que se produce varios meses después del parto o del aborto en las reproductoras.

1.2.6.2.4.2. Técnicas serológicas empleadas

La IFI fue la primera prueba serológica empleada en la detección de anticuerpos específicos (IgG) frente a *N. caninum* en el suero de animales infectados (Dubey *et al.*, 1988b). Posteriormente, se ha empleado el enzimoimmunoensayo (ELISA) en el cribado de un número elevado de muestras. Así mismo, otras técnicas serológicas como el western blot y la prueba de aglutinación directa también han presentado buenos resultados de sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la neosporosis.

1.2.6.2.4.2.a IFI

La IFI detecta, fundamentalmente, anticuerpos que se unen a los antígenos localizados en la superficie celular de *N. caninum*. Se considera como resultado positivo cuando se observa la fluorescencia en toda la superficie del taquizoíto, que normalmente aparece cuando se analizan sueros con títulos moderados o altos. El patrón de IFI varía cuando se analizan sueros con títulos bajos, reduciéndose considerablemente la fluorescencia o quedando restringida a la parte apical del taquizoíto. Sin embargo, estos resultados deberían interpretarse con cautela, ya que la fluorescencia apical también puede aparecer como resultado de reacciones cruzadas con *T. gondii*, ya que *Eimeria* spp, *T. gondii* y *N. caninum* contienen epítomos comunes asociados al complejo apical (Sasai *et al.*, 1998). En la IFI se ha empleado como antígeno taquizoítos de *N. caninum* de aislados de origen bovino y canino, no existiendo evidencias de que las posibles diferencias antigénicas entre los diferentes aislados puedan afectar a la precisión de la prueba.

La IFI requiere para su realización de una experiencia previa y el tiempo necesario para la realización de la técnica en comparación con el ELISA y la subjetividad inherente a su sistema de interpretación, hacen que en la actualidad se utilice cuando se trabaja con un número reducido de muestras. Esta técnica serológica se ha empleado en el diagnóstico de la infección y en estudios epidemiológicos en un gran número de especies, incluyendo el perro, el zorro, el gato, el ganado bovino, la cabra, la oveja, diversas especies de roedores y primates. Así mismo, la IFI ha sido considerada como la técnica de referencia (“gold estandar”) en la neosporosis, con la cual han sido comparadas otras técnicas serológicas.

Los puntos de corte empleados en la IFI varían entre los diferentes laboratorios y al comparar los resultados de la IFI con los obtenidos en otras pruebas diagnósticas (ELISA e inmunohistoquímica, principalmente) se han propuesto diferentes títulos de seropositividad en función de la especie y de la edad. En relación a la serología bovina, se emplean puntos de corte distintos en función de la edad -fetos y vacas-. En la serología fetal los puntos de corte más aceptados varían desde 1:50 (Wouda *et al.*, 1998a) hasta 1:80 (Barr *et al.*, 1995), sin embargo González *et al.* (1999) han sugerido el empleo de diferentes puntos de corte en función de la edad gestacional del feto junto con conjugados anti-IgM para optimizar al máximo el rendimiento de la técnica. En el ganado bovino se han empleado puntos de corte que oscilan entre 1:200 (Schaes *et al.*, 1998) y 1:640 (Conrad *et al.*, 1993b). Sin embargo, la sensibilidad de la prueba aumentó cuando se empleó un título de IFI de 1:50 para identificar los animales persistentemente infectados (Schaes *et al.*, 1998).

1.2.6.2.4.2.b ELISA

Recientemente, se han desarrollado numerosas pruebas ELISA para la detección de anticuerpos específicos, cuya sensibilidad es adecuada y la especificidad elevada. La sencillez y rapidez de su realización y la fácil interpretación de los resultados, la capacidad de automatización y el bajo coste económico son ventajas a tener en cuenta cuando se analizan un número elevado de muestras. Estas pruebas utilizan distintos tipos de antígenos: taquizoítos sonicados, taquizoítos fijados con formalina, antígenos recombinantes o antígenos incluidos en partículas iscom (Tabla IX).

1.2.6.2.4.2.b.1. ELISA con antígeno soluble

En la práctica, el ELISA indirecto que emplea antígeno soluble -mezcla de antígenos intracelulares y de membrana- de los diferentes aislados de *N. caninum* -BPA1 y NC-1- es la técnica diagnóstica que se emplea con mayor frecuencia en la detección de anticuerpos específicos en suero y líquidos fetales (Börkman & Uggla, 1999).

No se han detectado reacciones cruzadas significativas con otros protozoos cercanos y estas pruebas se han utilizado en el ganado bovino, ovino y caprino, obteniéndose valores elevados de sensibilidad y especificidad (Osawa *et al.*, 1998).

En la actualidad, se han comercializado diferentes pruebas ELISA basadas en antígeno soluble, como los desarrollados por las casas comerciales IDDEX (Herdcheck®), Hipra (Civtest®) e Intervet (CHEKIT® Bommeli).

Una variante de los ELISAs convencionales que emplean antígeno soluble de taquizoítos es el ELISA de competición. El ELISA de competición es una prueba indirecta en la cual se incluye el empleo de un anticuerpo monoclonal que compite con los anticuerpos específicos del suero problema por los epítomos disponibles del antígeno fijado en la placa. Una ventaja de este tipo de ELISA es que analiza el nivel de anticuerpos que se unen a un único epítomo, lo cual le confiere una mayor especificidad con respecto al ELISA indirecto tradicional. Baszler *et al.* (1996) desarrollaron un ELISA de competición para detectar anticuerpos específicos frente al parásito en el ganado bovino, empleando un anticuerpo monoclonal -Mab 4A4-2- dirigido frente al antígeno de superficie de 65 kDa. Recientemente, este ELISA, ha sido validado mediante el análisis de diferentes grupos de sueros de referencia, sugiriendo el empleo de un único punto de corte sin que conlleve un descenso de la sensibilidad o de la especificidad (Baszler *et al.*, 2001). Por otra parte, Dubey *et al.* (1997) desarrollaron un ELISA de competición basado en el de Baszler *et al.* (1996), cuyos valores de sensibilidad y especificidad no pudieron ser calculados debido a la variabilidad existente entre los diferentes laboratorios incluidos en el estudio en relación a la lectura e interpretación de los resultados de la prueba de referencia empleada: la IFI.

1.2.6.2.4.2.b.2. ELISA con taquizoítos formalinizados

Williams *et al.* describieron en 1997 un ELISA que empleaba como antígeno taquizoítos enteros del aislado de origen canino NC-Liv, fijados con una solución salina

formolada. Mediante esta técnica, únicamente, los antígenos de la membrana celular externa son accesibles a los anticuerpos específicos presentes en el suero aumentando la especificidad. En la actualidad, la prueba se ha comercializado con el nombre Mastazyme-*Neospora* (MAST Diagnostics), normalizado únicamente para el análisis de sueros de origen bovino. La validación de este ELISA se realizó mediante el análisis de sueros procedentes de animales con infección aguda y crónica, obteniéndose diferentes valores de sensibilidad para cada punto de corte considerado (Williams *et al.*, 1999).

1.2.6.2.4.2.b.3. ELISA con partículas “iscoms”

Las partículas “iscoms” son estructuras de aproximadamente 40 nm compuestas por Quil A, colesterol, fosfolípidos y a las que se añade el antígeno, el cual incluye un número limitado de proteínas de membrana de origen citoplasmático de *N. caninum*. Las partículas iscoms permiten seleccionar antígenos anfipáticos, como las proteínas de membrana de los taquizoítos localizadas en los compartimentos intracelulares y de la superficie celular. En el desarrollo de este ELISA se han incluido antígenos del aislado NC-1 de 18, 30-45 y 61 kDa.

El ELISA basado en partículas “iscoms” se utilizó por primera vez para diagnosticar la infección en el perro (Björkman *et al.*, 1994). Posteriormente, se ha adaptado la técnica, mediante ligeras modificaciones, para detectar anticuerpos específicos en la leche y el suero del ganado bovino (Björkman *et al.*, 1997), empleándose la IFI como técnica de referencia para estimar su sensibilidad y especificidad.

1.2.6.2.4.2.b.4. ELISA con proteínas recombinantes

Se han desarrollado diversas proteínas recombinantes de *N. caninum* que podrían emplearse en nuevas pruebas inmunodiagnósticas. El ELISA basado en el empleo de antígenos recombinante presenta una serie de ventajas con respecto al ELISA clásico. El ELISA recombinante, al emplear uno o varios antígenos específicos de *Neospora* frente a una mezcla de antígenos que componen el extracto soluble, presenta una mayor especificidad detectándose un menor número de reacciones cruzadas con otros protozoos cercanos. Por otra parte, la facilidad para obtener grandes cantidades de antígeno recombinante sin necesidad de mantener el cultivo celular del parásito favorece la normalización del ELISA, mejorando su repetitibilidad y reproducibilidad.

Las diversas pruebas ELISAs recombinantes desarrollados para detectar anticuerpos específicos anti-*Neospora* han presentado una especificidad elevada, cuando se han evaluado sueros con anticuerpos específicos frente a otros coccidios como *T. gondii* y *Sarcocystis* spp. (Lally *et al.*, 1996b; Howe *et al.*, 2002), así como una sensibilidad elevada, comparable a la de la IFI (Lally *et al.*, 1996b; Jenkins *et al.*, 1997; Loui *et al.*, 1997; Howe *et al.*, 2002), excepto cuando se analizaron fluidos fetales donde la sensibilidad de la prueba disminuyó considerablemente (Wouda *et al.*, 1997a).

Las primeras proteínas recombinantes empleadas en el diagnóstico fueron las proteínas de gránulos densos NcGRA6 y NcGRA7 (Lally *et al.*, 1996b). Posteriormente, Jenkins *et al.* (1997) emplearon ambos antígenos conjuntamente en un ELISA para analizar la respuesta inmune desarrollada por los animales que habían presentado un aborto asociado a la infección por *Neospora*. Otros antígenos recombinantes utilizados en el diagnóstico de la neosporosis bovina son las proteínas de 20 y 29 kDa (N57 y N54, respectivamente) (Loui *et al.*, 1997) y la forma recombinante de los antígenos de superficie SAG1 (Howe *et al.*, 2002) y SRS2 (Nishikawa *et al.*, 2001c), respectivamente.

Las pruebas ELISAs recombinantes se han empleado en el diagnóstico de los abortos bovinos asociados a la infección por *N. caninum* (Lally *et al.*, 1996b; Jenkins *et al.*, 1997; Wouda *et al.*, 1997a) y en estudios epidemiológicos (Venturini *et al.*, 1999; Howe *et al.*, 2002).

1.2.6.2.4.2.b.5. ELISA con proteínas purificadas por afinidad

Hasta el momento, únicamente Schares *et al.* (2000) han desarrollado un ELISA basado en antígenos purificados por afinidad para utilizarlo en estudios epidemiológicos. En el desarrollo de este ELISA se empleó el antígeno inmunodominante p-38 (homólogo de la proteína SRS2 descrita por Hemphill & Gottstein en 1996) purificado por afinidad. Esta prueba se ha empleado en el diagnóstico de los abortos asociados a la infección por *N. caninum* detectándose diferencias entre los animales que presentaban o no aborto, así como entre los rebaños que presentaban aborto epidémico o endémico (Scharés *et al.*, 2000) y, recientemente, ha sido comercializada con el nombre P38-ELISA (VM-PRO GmbH).

1.2.6.2.4.2.b.6. ELISA de avidéz

Las pruebas ELISAs de avidéz se basan en la maduración del sistema inmune que se produce tras una exposición previa al parásito. Esta maduración conlleva un incremento del reconocimiento y la unión a determinados epítomos por parte de los anticuerpos específicos. De este modo, los primeros anticuerpos sintetizados tras una primera infección presentan una menor afinidad por el antígeno que los anticuerpos detectados durante una infección crónica (Lappalainen *et al.*, 1993; Jenun *et al.*, 1997). Por tanto, la estimación de la avidéz de los anticuerpos presentes en el suero puede ayudar a determinar el momento de exposición al parásito con el objetivo de diferenciar entre infección aguda y crónica.

Con anterioridad, el ELISA de avidéz resultó ser de enorme utilidad en el diagnóstico de la infección por *T. gondii* en humanos (Hedman *et al.*, 1989; Lappalainen *et al.*, 1993), mientras que en el caso de la neosporosis bovina esta técnica se ha empleado en diversos estudios epidemiológicos. En la neosporosis bovina, el primer ELISA de avidéz desarrollado se basó en el empleo de partículas iscom (Björkman *et al.*, 1999). Por otro lado, Jenkins *et al.* (2000) utilizaron el ELISA de avidéz junto con otras pruebas ELISA con el objetivo de estudiar la posible relación entre los abortos que presentaba el rebaño objeto del estudio y una infección reciente y McAllister *et al.* (2000) emplearon esta técnica para investigar si las vacas con antecedentes de infección por *Neospora* tenían una mayor probabilidad de presentar abortos o parir terneros congénitamente infectados. Posteriormente, Schares *et al.* (2002a) han desarrollado un ELISA de avidéz basado en el empleo de la proteína purificada por afinidad p-38, para diferenciar animales procedentes de rebaños que presentan abortos epidémicos - relacionado con el predominio de la transmisión horizontal, la infección aguda y baja avidéz de los anticuerpos- de animales que presentan abortos endémicos (relacionado con el predominio de la transmisión vertical, una infección crónica y elevada avidéz de los anticuerpos). Recientemente, Sager *et al.* (2003), han demostrado, mediante el empleo de un ELISA de avidéz utilizando antígeno soluble, que si bien los bajos niveles de avidéz pueden ayudar a predecir el aborto, estos no están necesariamente asociados a infecciones recientes.

Tabla IX: Pruebas ELISA desarrolladas para el diagnóstico de la infección por *N.caninum*.

* Se

Tipo de ELISA (Antígeno)	Punto de corte	Características diagnósticas		Aplicación diagnóstica	Técnica de referencia	Referencia
		Se*	Esp*			
Indirecto (antígeno crudo)	D.O. = 0,45	97,7	95,6	Infección en adultos	IFI	Björkman <i>et al.</i> , 1994
	S/P = 0,45	88,6	96,5	Infección en adultos	IFI	Paré <i>et al.</i> , 1995a
	D.O. = 0,17	89	100	Infección en fetos	IFI	Osawa <i>et al.</i> , 1998
	D.O. = 0,40	97	100	Infección en adultos		
	S/P = 0,7	88	97	Infección en adultos - que han abortado - rebaños endémicos - rebaños normales	IHQ	Wouda <i>et al.</i> , 1998a
		98	92			
98		92				
I.R.C.P. = 5			Infección en adultos	IFI	Rebordosa <i>et al.</i> , 2000	
Sandwich	D.O. = 0,034	94,2	94,2	Infección en adultos -aborto epidémico y endémico	IFI y WB	Schares <i>et al.</i> , 1999c
Competición (antígeno crudo)	P.I. = 58%	-	-	Infección en adultos	WB	Baszler <i>et al.</i> , 1996
	P.I. = 10%	98	89	Infección en adultos	Mastazyme	Williams <i>et al.</i> , 2000
	P.I. = 15%	98	96			
	P.I. = 20%	98	96	Infección en adultos	IFI e IHQ	Baszler <i>et al.</i> , 2001
	P.I. = 30%	97,6	98,6			
	96,4	96,8		IFI		
Indirecto (partículas Iscoms)	D.O. = 0,15-0,2	100	96	Infección en adultos	IFI	Björkman <i>et al.</i> , 1997
Indirecto (Taquizoítos)	D.O. = 0,77	95	96	Infección en adultos	IFI	Williams <i>et al.</i> , 1997
	P.P. = 20	97	95	Infección en adultos - que han abortado - rebaños endémicos - rebaños normales	IFI	Williams <i>et al.</i> , 1999
		85	90			
		83	75			
Indirecto (Antígeno recombinante) NcDG1y NcDG2	D.O. = 1,000	-	-	Infección en adultos	IFI	Lally <i>et al.</i> , 1996b Jenkins <i>et al.</i> , 1997
N54	D.O. = 0,04	95	96	Infección en adultos	IHQ	Louie <i>et al.</i> , 1997
N57	D.O. = 0,03	82	93			
SRS2	0,189	-	-	Infección en adultos	IFI y WB	Nishikakawa <i>et al.</i> , 2001c
SAG1 (Nc-p29)	(+) D.O. >1,2 (-) D.O. < 0,5	-	-	Infección en adultos	WB	Howe <i>et al.</i> , 2002
Indirecto (Antígeno purificado por afinidad) p38	D.O. = 0,153	83	83	Infección en adultos	IFI	Schares <i>et al.</i> , 2000
	D.O. = 0,149	78	78	Aborto epidémico		
	D.O. = 0,208	85	85	Aborto endémico		
p38 (avidez)	A.I. = 55%	92	92	Aborto epidémico - endémico	ELISA	Schares <i>et al.</i> , 2002a

* Se: Sensibilidad; Esp: Especificidad

1.2.6.2.4.2.c Western blot

La técnica de western blot se ha utilizado, fundamentalmente, para estudiar la composición antigénica de *N. caninum*, empleando sueros de diferentes especies infectadas. Entre los antígenos identificados destacan por su intensidad y frecuencia de reconocimiento varios antígenos inmunodominantes de 17, 29-30, 37 y 46 kDa (Bjerkas *et al.*, 1994). En cuanto a su utilidad diagnóstica, el western blot es una técnica que se ha empleado en escasos estudios de rebaño como apoyo a otras pruebas serológicas -IFI y ELISA-, más que como una técnica rutinaria, para establecer valores de concordancia y puntos de corte (Schaes *et al.*, 1998; Söndgen *et al.*, 2001). De acuerdo con los resultados obtenidos por Schaes *et al.* (1998), el western blot podría sustituir a la IFI como técnica de referencia en el diagnóstico serológico de la neosporosis, debido a que éste presentó una mayor sensibilidad en comparación a la IFI y el ELISA sin que por ello disminuyese la especificidad (Schaes *et al.*, 1998). Posteriormente, Söndgen *et al.* (2001) comprobaron que el diagnóstico serológico fetal mejoraba considerablemente cuando se empleaba el western blot.

1.2.6.2.4.2.d Aglutinación directa

La prueba de aglutinación directa ha sido una de las pruebas más empleadas en el diagnóstico de la infección por *T. gondii* tanto en humanos como en diferentes especies animales desde que fue desarrollada por Fulton & Turk (1959). La aglutinación directa se basa en la capacidad de aglutinación de los taquizoítos formalinizados en presencia de inmunoglobulinas específicas. La prueba, posteriormente, ha incluido una modificación en la cual únicamente se detectan IgG mientras que las IgM son destruidas mediante un tratamiento con mercaptoetanol. En esta técnica de aglutinación directa modificada se basan las pruebas diseñadas para el diagnóstico de la infección por *Neospora* (Romand *et al.*, 1998; Packham *et al.*, 1998). La prueba ha demostrado ser bastante específica y en su desarrollo se han empleado los aislados de *N. caninum* BPA-1 (Packham *et al.*, 1998) y Nc-1 (Romand *et al.*, 1998), obteniéndose en ambos casos una sensibilidad elevada cuando se analizaron sueros de 16 especies diferentes (Packham *et al.* 1998). Sin embargo, en la actualidad se debe evaluar su aplicación en las diferentes especies, razón por la cual no ha reemplazado a las técnicas serológicas -IFI y ELISA- que se emplean de forma habitual en los estudios epidemiológicos.

1.2.6.2.4.3. Aplicaciones prácticas del diagnóstico serológico

1.2.6.2.3.4.a Estudio de la eficacia de la transmisión congénita

Si *N. caninum* está presente en un rebaño, la infección podría mantenerse en el tiempo durante generaciones sucesivas, ya que la transmisión vertical es el principal modo de propagación del parásito, en cuyo caso será necesario controlar el rebaño mediante el empleo de una batería de pruebas serológicas. Por ello, es necesario destacar la utilidad de la serología precalostrar en la detección de transmisión vertical para, de esta forma, seleccionar ganado de reposición libre de la infección. En general, los terneros infectados *in utero* con *N. caninum* presentan anticuerpos específicos frente al parásito y la ausencia de anticuerpos específicos en terneros recién nacidos podría descartar la infección, a menos que el ternero se haya infectado al final de la gestación (Jenkins *et al.*, 2002). Un momento muy adecuado para analizar el estado serológico de un ternero es inmediatamente después del parto y antes de la primera toma de calostro para evitar interferencias con los anticuerpos calostrales de la madre, puesto que éstos no desaparecen antes de los 4-5 meses de vida (Thurmond & Hietala, 1999).

1.2.6.2.3.4.b Diagnóstico de la causa del aborto

La serología puede aplicarse en el diagnóstico de la causa del aborto, tanto en los fetos como en las vacas. La detección de anticuerpos específicos es el primer paso que se lleva a cabo durante el diagnóstico de la infección por ser la metodología más rápida y sencilla.

1.2.6.2.3.4.b.1. Fetos

Las técnicas para la detección de anticuerpos específicos en los líquidos fetales son muy útiles para el diagnóstico, especialmente en fetos autolíticos, que deben ser complementadas con otras técnicas que se basen en la detección del parásito (Pereira-Bueno *et al.*, 2003).

Las técnicas de IFI y ELISA, a pesar de ser métodos de diagnóstico rápidos y sencillos, han presentado una baja sensibilidad en estudios anteriores (Jenkins *et al.*, 2002). Por otra parte, el empleo de la técnica de western blot ha permitido aumentar considerablemente la

sensibilidad del diagnóstico de la neosporosis en fetos comparado con otras técnicas como la inmunohistoquímica, IFI y PCR (Söndgen *et al.*, 2001). Varios factores son los responsables de la baja sensibilidad de la serología fetal, entre ellos la falta de desarrollo del sistema inmune, ya que los fetos bovinos menores de 5 meses de edad no son inmunocompetentes (Osburn, 1988). Además, con frecuencia transcurre un corto intervalo de tiempo entre la infección y la muerte fetal, y la autólisis del feto puede degradar las inmunoglobulinas fetales, lo que puede conducir a un descenso de los niveles de anticuerpos. Por consiguiente, un resultado negativo no descarta la infección por *N. caninum* en el feto. Sin embargo, el hallazgo de anticuerpos específicos frente a *N. caninum* en los líquidos fetales es un resultado que confirma la infección del feto puesto que es muy improbable que la existencia de anticuerpos frente a *N. caninum* en los fetos abortados se deba al paso accidental de anticuerpos maternos desde la placenta dañada por otros microorganismos.

1.2.6.2.3.4.b.2. Reproductoras

La detección de anticuerpos en el suero materno -recogido inmediatamente después de la expulsión del feto- es una prueba adicional importante en el diagnóstico del aborto.

Un resultado negativo descarta con una elevada probabilidad al parásito como causa del aborto, ya que la mayor parte de las vacas que abortan fetos infectados por *N. caninum* presentan títulos de anticuerpos elevados (Paré *et al.*, 1995; Quintanilla-Gozalo *et al.*, 2000). Sin embargo, al igual que ocurre con la serología fetal, los resultados positivos y negativos en las reproductoras deben ser interpretados con precaución, especialmente si ha transcurrido un tiempo entre el aborto y la toma de muestras ya que, generalmente, los títulos de anticuerpos varían considerablemente después de 2 meses de producirse el aborto al disminuir los títulos -incluso hasta valores considerados negativos- y aumentar de nuevo si se produce otra gestación. Si la seroconversión es consecuencia de la parasitemia o de la carga antigénica en el hospedador, si las variaciones en el título de anticuerpos indican una reactivación del parásito o una reinfección y cual es el papel de los anticuerpos en la inmunidad protectora son cuestiones sin resolver.

La ausencia de anticuerpos específicos anti *N. caninum* en una vaca que ha abortado puede estar relacionado con las fluctuaciones de los títulos de anticuerpos que tienen lugar en las reproductoras a lo largo de la gestación (Conrad *et al.*, 1993b; Schares *et al.*, 1999a;

Quintanilla-Gozalo *et al.*, 2000). Por otra parte, la presencia de anticuerpos específicos, únicamente sugiere que *N. caninum* está implicado en el aborto pero no permite confirmar el diagnóstico definitivo de la causa del aborto ya que tan solo una pequeña proporción de las vacas infectadas abortan y la mayoría de sus terneros a pesar de nacer infectados permanecen clínicamente sanos (Paré *et al.*, 1997; Thurmond & Hietala, 1997a). A pesar de esto, la serología dispone en la actualidad de diversas herramientas que pueden ayudar a establecer una correlación entre un animal que ha abortado y la infección por *N. caninum*. Se puede conseguir un diagnóstico más certero si el problema del aborto se analiza teniendo en cuenta los resultados del rebaño y no se basa exclusivamente en un resultado individual. Para clarificar la causa del aborto, Thurmond & Hietala (1995) llevaron a cabo un estudio seroepidemiológico, en el cual la proporción más elevada de animales seropositivos correspondió a las reproductoras que habían abortado.

1.2.6.2.3.4.c Estudios epidemiológicos

En los estudios seroepidemiológicos, la detección de anticuerpos específicos en el suero de los animales adultos se realiza, generalmente, mediante la prueba de ELISA indirecto. Los resultados obtenidos en este tipo de estudios permiten determinar y cuantificar la presencia de la infección en las explotaciones de una determinada región o país (seroprevalencia de rebaño) y estimar la participación de *N. caninum* en los abortos de etiología infecciosa en los rebaños infectados (prevalencia intra-rebaño). Así mismo, los estudios seroepidemiológicos resultan de utilidad para la detección de animales infectados y así poder establecer adecuados programas de control de la neosporosis, los cuales pueden variar en función del tipo de abortos que presenta un rebaño. Schares *et al.* (1998, 2000, 2002a) detectaron diferencias en el nivel de anticuerpos específicos entre animales procedentes de rebaños que presentaban abortos epidémicos y endémicos, sugiriendo el empleo de diferentes puntos de corte de las pruebas serológicas en función del patrón de abortos que presente el rebaño sometido al análisis.

1.2.6.3. Diagnóstico diferencial

La ausencia de signos clínicos y lesiones macroscópicas evidentes que acompañan al aborto por *N. caninum* y la necesidad de recurrir al laboratorio para alcanzar un diagnóstico etiológico preciso son características compartidas por la mayoría de los procesos infecciosos y

parasitarios que cursan con infertilidad, entendiendo como tal el fallo reproductor transitorio (fallo en la concepción, muerte embrionaria o fetal y aborto). Por este motivo, el diagnóstico de la causa de aborto en un animal o en un grupo de animales en una explotación es siempre una tarea difícil debido a los múltiples agentes que pueden estar implicados, la ausencia de un cuadro clínico característico en la mayoría de los casos y la inespecificidad de las lesiones macroscópicas. La investigación de la infección fetal por *N. caninum* es sólo una más de las que deben realizarse en los abortos bovinos, empleando en todos los casos una aproximación sistemática y global, siempre teniendo en cuenta que incluso en los mejores laboratorios el porcentaje de éxito no superará el 40-50%.

Entre los agentes de etiología vírica que es necesario contemplar en el diagnóstico diferencial hay que incluir siempre dos enfermedades que son la rinotraqueitis bovina infecciosa (IBR) y la diarrea vírica bovina (BVD). En el IBR, el diagnóstico se confirma mediante la observación de lesiones necróticas en diversos órganos abdominales (especialmente el hígado) y el aislamiento o identificación (IFD, inmunohistoquímica) del agente etiológico. En el diagnóstico del aborto por BVD, la confirmación de la infección fetal (detección del virus en los tejidos fetales y anticuerpos en el suero) hay que completarla con la demostración de enfermedad fetal (lesiones macroscópicas y microscópicas).

Entre los de etiología bacteriana, a pesar de las campañas de saneamiento que vienen realizándose desde hace años, *Brucella abortus* debe seguir considerándose como causa potencial de aborto, especialmente en algunas zonas de la geografía española y en determinados tipos de manejo. En este caso, la presencia de aborto tardío y la retención de placenta son hechos habituales. En todos los casos debe realizarse serología en las madres, acompañada de tinción por métodos específicos de improntas de cotiledones placentarios y órganos fetales, así como cultivo específico a partir del contenido del abomaso del feto. En las zonas donde la brucelosis ha disminuido su incidencia, la leptospirosis es otra de las enfermedades bacterianas importantes. La serología materna y fetal son de interés, así como el aislamiento del agente etiológico a partir de la orina fetal y la IFI con anticuerpos policlonales del riñón fetal. La listeriosis, así como los procesos originados por otros agentes bacterianos causantes de aborto esporádico han de ser también considerados. También el aborto micótico supone un porcentaje importante de los abortos en algunas zonas.

En aquellas áreas donde se mantenga la monta natural (muchas de las zonas de cría extensiva de ganado vacuno en nuestro país) es necesario incluir en el diagnóstico dos agentes etiológicos de transmisión venérea que son: *Tritrichomonas foetus* y *Campylobacter foetus* var. *venerealis*. En ambos casos, el cuadro típico es la repetición de celos debida a la mortalidad embrionaria y fetal temprana. En aproximadamente el 10% de las vacas con tricomonosis se desarrolla además piómetra. En caso de que se produzca aborto, la investigación se realiza mediante el cultivo del agente etiológico a partir del abomaso fetal y de los fluidos placentarios.

Por último, en el diagnóstico diferencial del aborto no hay que excluir aquellas causas de naturaleza no transmisible de origen alimentario, yatrogénico, tóxico y genético que es necesario investigar siempre, aunque su demostración es más complicada.

1.2.7. Control

En general, la neosporosis se presenta como una causa más de aborto y el control debe ir encaminado, fundamentalmente, a reducir la prevalencia de la infección en las explotaciones con brotes declarados y a prevenir su propagación a otras evitando tanto la transmisión horizontal como la vertical. Las medidas de control de la infección, en un futuro, deberán incluir además el tratamiento químico y la inmunoprofilaxis.

1.2.7.1. Tratamiento terapéutico

En la actualidad, únicamente los perros con síntomas clínicos de neosporosis reciben tratamiento terapéutico. Los resultados con algunos de los fármacos ensayados en perros con problemas neurológicos compatibles con una neosporosis son controvertidos y no permiten establecer conclusiones.

La mayoría de los resultados sobre eficacia de fármacos han sido obtenidos en cultivos celulares, no disponiéndose de muchos datos en infecciones naturales en el ganado bovino u otras especies animales. En la actualidad, se han analizado más de 40 fármacos en este sistema. Pocos han sido probados *in vivo* y algunos con resultados satisfactorios sobre los taquizoítos en cultivo, no lo han sido sobre los bradizoítos en los ratones infectados experimentalmente. Entre los fármacos probados en cultivo celular destacan la mayoría de las sulfonamidas

(sulfadiazina, sulfadimetoxina, sulfameracina, sulfametacina, sulfaquinoxalina y el sulfatiazol), los inhibidores de la dihidrofolato reductasa/timidilato sintetasa -DHFR/TS- (diaveridina, metotrexato, ornitoprim, pirimetamina y trimetoprim), los antibióticos ionóforos (lasalocid, maduramicina, monensina, narasin y salinomicina), los macrólidos (azitromicina, claritromicina y eritromicina), las tetraciclinas (doxiciclina y minociclina) y las lincosamidas (clindamicina en sales cloruro y fosfato y la lincomicina hidrocloreuro) (Lindsay & Dubey, 1989a; Lindsay *et al.*, 1994). A diferencia de lo que sucede con parásitos estrechamente relacionados con *Neospora* como *Eimeria*, *Isoospora* o *Toxoplasma*, las sulfonamidas ensayadas en taquizoítos en cultivo celular no presentan una adecuada eficacia. Todos los demás grupos farmacológicos analizados, parecen tener mayor eficacia que las sulfonamidas, con mejores resultados frente a los taquizoítos en cultivos celulares y presentando sinergismo en combinación con los inhibidores de la DHFR/TS (Lindsay *et al.*, 1996a). Otros anticoccidiósicos como el arprinocid, la nitrofurazona, la robenidina, el decoquinato y el diclazuril también presentan actividad frente a los taquizoítos en cultivos celulares (Lindsay *et al.*, 1997). Sin embargo, algunos tan eficaces frente a la toxoplasmosis como el amprolio, el metronidazol y la paramomicina no lo son frente a los taquizoítos de *Neospora*. El decoquinato, anticoccidiósico con buenos resultados frente a la infección por *Eimeria* en vacuno, es eficaz frente a los taquizoítos de *Neospora* a las dosis coccidiocidas pero no tiene eficacia frente a las fases extracelulares.

Los escasos datos que se tienen procedentes de ensayos de fármacos frente a los bradizoítos se refieren a los anticoccidiósicos amprolio y sulfadiazina. El amprolio no protege de la infección experimental ni previene la muerte de ratones a dosis de 4 a 20 mg/día/3 días. La sulfadiazina a dosis de 4 mg administrada desde el día 3 postinoculación de los taquizoítos hasta el día 14 p.i. protegió al 90% de los ratones, pero no fue eficaz cuando se administró 7 días después de provocada la infección.

En el ganado bovino, apenas se tiene experiencia en el tratamiento farmacológico de la enfermedad y los ensayos sobre eficacia confirman la carencia de fármacos altamente eficaces frente a este parásito. Gottstein *et al.* (2001) sugirieron el empleo del toltrazuril y del ponazuril para atenuar la gravedad de la sintomatología clínica de la enfermedad, evitando la diseminación del parásito y la aparición de lesiones en el cerebro, de acuerdo con los resultados obtenidos en ratones infectados experimentalmente. Recientemente, Kritznner *et al.* (2002) han desarrollado un modelo experimental bovino para confirmar la eficacia del

ponazuril frente a la infección por *N. caninum*. En los terneros que recibieron el tratamiento no se detectó el parásito en el tejido nervioso y muscular, mientras que en el 50% de los animales infectados no tratados sí se detectó el parásito mediante PCR. Sin embargo, el efecto protector de este fármaco debería ser confirmado mediante estudios del control de la transmisión vertical en animales con infección natural. Reichel & Ellis (2002) han sugerido el tratamiento químico de reproductoras gestantes para prevenir la recrudescencia de la enfermedad durante la gestación y, por consiguiente, la infección congénita de los terneros descrita por Guy *et al.* (2001). El objetivo de esta estrategia sería ayudar al sistema inmune durante el periodo temporal de inmunosupresión observado a lo largo de la gestación. Sin embargo, el control farmacológico de la neosporosis en el ganado bovino es inviable en la actualidad, a lo que hay que añadir el problema de los residuos en leche y carne con los consiguientes periodos de espera.

Finalmente, hay que tener en cuenta el control de las infecciones concomitantes en reproductoras infectadas con *N. caninum*, ya que los pestivirus bovinos incrementan el riesgo de abortos por este parásito (Pfeiffer *et al.*, 2000). En el estudio realizado por Björkman *et al.* (2000) se describe una asociación significativa entre la infección por el virus de la diarrea vírica bovina (BVDV), la infección por *Neospora* y el riesgo de aborto. La infección con el BVDV u otros agentes inmunosupresores, como las micotoxinas, podrían facilitar la recrudescencia de una infección crónica por *N. caninum*, cuyo resultado sería la parasitemia con la consiguiente infección transplacentaria del feto y el aborto. Dependiendo de la fase de la gestación en la cual tenga lugar la parasitemia (Guy *et al.*, 2001) también podría conducir al nacimiento de terneros asintomáticos congénitamente infectados. En este sentido, existen vacunas eficaces para el control de los pestivirus bovinos, cuyo empleo podría reducir el riesgo de aborto por *Neospora*, si bien en el estudio realizado por Mainar-Jaime *et al.* (2001) no se encontró un efecto claro de dicha vacunación en el descenso de la incidencia de la infección y el aborto por *Neospora*.

1.2.7.2. Manejo del rebaño

A la hora de establecer las medidas de control adecuadas encaminadas a evitar la propagación de la infección en el rebaño se deben tener en cuenta algunos aspectos epidemiológicos de la enfermedad:

- La seroprevalencia de la infección por *N. caninum* es elevada.

- La infección se mantiene probablemente de por vida, con fluctuaciones en los niveles séricos de anticuerpos que pueden llevar a periodos de aparente seronegatividad alternando con periodos de seropositividad.

- El riesgo de aborto, la única manifestación clínica de la neosporosis en reproductoras gestantes, de las hembras infectadas es 2-3 veces superior al de las hembras no infectadas.

- La infección puede ser transmitida por la novilla o la vaca infectada a la descendencia en gestaciones sucesivas.

- La ternera con infección congénita subclínica que nace viva y supera la enfermedad es una posible transmisora, por lo que no es apta para la reposición.

1.2.7.2.1. Transmisión vertical

Hasta donde se conoce, la infección congénita es el principal modo de transmisión y las medidas encaminadas a evitarla deben constituir la base del control de esta enfermedad.

La infección congénita puede manifestarse con aborto, el nacimiento de terneros débiles con signos neurológicos graves que fallecerán a los pocos días y, por último, el nacimiento de terneros aparentemente sanos pero infectados, que si son hembras tendrán a su vez la posibilidad de transmitir la infección a la prole. Estas hembras no deberán ser utilizadas para la reposición de la granja ni vendidas para tal fin, premisa importante si se quiere frenar la propagación de esta enfermedad.

Por tanto, en la actualidad el seguimiento del estado inmunoserológico de las reproductoras, evitando la presencia de hembras seropositivas en la granja es la medida más eficaz de prevención de la neosporosis (Thurmond & Hietala, 1995; French *et al.*, 1999; Jensen *et al.*, 1999). Las medidas encaminadas a reducir en la explotación el número de hembras seropositivas pueden instaurarse de dos formas: drásticamente, eliminando todas las vacas seropositivas, o gradualmente de la forma que se indica a continuación. Tomar unas u otras medidas dependerá de la tasa de abortos que se presenten en la explotación, entre otros factores. Si existen problemas reproductivos importantes y está comprobada la participación de este parásito eliminar las vacas seropositivas puede ser la medida más adecuada. Si la seroprevalencia es baja puede ser factible el sacrificio de las vacas positivas pero si ésta es elevada es muy probable que las medidas a considerar no puedan ser tan drásticas y debemos actuar siguiendo pautas más conservadoras. Entre ellas cabe destacar la eliminación de vacas

seropositivas con antecedentes de aborto o que tienen crías también seropositivas, evitando además la reposición con terneras seropositivas. Para llevar a cabo estas medidas de control es necesario el empleo de técnicas serológicas validadas y optimizadas adecuadamente para el diagnóstico del aborto por *Neospora*, cuyas características diagnósticas incluyan una máxima sensibilidad (Reichel & Pfeiffer, 2002). Sin embargo, la adopción de estas medidas de control implica el sacrificio de reproductoras valiosas con infección crónica, cuya probabilidad de presentar abortos repetidos es muy baja (menos del 5% según Innes *et al.*, 2000b) y que han desarrollado una fuerte respuesta inmune protectora (Williams *et al.*, 2000; Innes *et al.*, 2001b). En estos casos, una medida especialmente interesante únicamente en reproductoras seropositivas muy valiosas, debido a su elevado coste económico, es la transferencia de embriones evitando receptoras seropositivas (Reichel & Ellis, 2002). Los terneros infectados congénitamente suelen adquirir la infección al final de la gestación, por lo que se puede proteger a los terneros de una infección congénita mediante la transferencia de embriones a receptoras seronegativas, obteniéndose de esta forma una descendencia seronegativa procedente de madres seropositivas (Baillargeon *et al.*, 2001; Landmann *et al.*, 2002). También se ha señalado la importancia de la serología precalostrar en el control de la transmisión vertical (Thurmond & Hietala, 1995), puesto que todos los terneros de vacas infectadas no presentan una serología precalostrar positiva. De este modo, el análisis de la serología precalostrar puede resultar de utilidad para diferenciar anticuerpos precalostrares de los anticuerpos recibidos con el calostro procedentes de la madre y así eliminar solamente la descendencia seropositiva congénitamente infectada.

1.2.7.2.2. Transmisión horizontal

No obstante, no se pueden excluir las medidas encaminadas a evitar la infección postnatal en los bovinos ya que las medidas sugeridas en el apartado anterior para controlar la transmisión vertical resultarían ser ineficaces en el caso de que existiera transmisión horizontal en el rebaño. Aunque se ignora la importancia de la transmisión horizontal, se tienen evidencias de que a la prevalencia debida a la infección congénita se produce una adición constante atribuible a la infección postnatal. Recientemente, se ha demostrado que los perros infectados eliminan ooquistes (hospedador definitivo) (McAllister *et al.*, 1998) y que los taquizoítos administrados oralmente con el calostro causan infección en el ganado bovino. Estos datos sugieren que la infección postnatal puede tener su origen en la ingestión de ooquistes eliminados por el perro y/o de taquizoítos eliminados por la madre vía calostro

(Uggla *et al.*, 1998; Dijkstra *et al.*, 2002b). El papel que pueden tener cada una de estas dos formas de infección postnatal se desconoce en la actualidad, pero existen datos que relacionan la presencia de perros en las granjas con la prevalencia de la enfermedad (Paré *et al.*, 1998; Wouda *et al.*, 1998b; Barling *et al.*, 2000). En el estudio realizado por Dijkstra *et al.* (2001b) se demostró que los perros eliminaban ooquistes tras ingerir placenta procedente de vacas con infección natural y, con posterioridad, Dijkstra *et al.* (2002a,c) han encontrado asociaciones epidemiológicas entre los abortos, la infección postnatal y la presencia de perros en las granjas.

El riesgo de transmisión horizontal en el ganado bovino es poco conocido y presumiblemente muy escaso, razones por las que se conoce poco sobre las posibles medidas a tomar y la eficacia de las mismas. Todavía hoy no se tienen datos sobre la circulación del parásito en la naturaleza y no se puede sino especular sobre la contaminación del medio ambiente por ooquistes y sobre otros posibles mecanismos de transmisión horizontal de esta parasitosis. Por esta causa, se puede tomar como modelo para el control de la transmisión horizontal el de otro parásito muy similar, *T. gondii*, considerando un ciclo biológico en el que el perro (y posiblemente otros cánidos silvestres) es el hospedador definitivo y que éste podría infectarse por la ingestión de taquizoítos que contaminan placentas, fetos y fluidos residuales del aborto bovino y por bradizoítos enquistados en otras especies animales. Teniendo ésto en cuenta se tomarían sobre todo medidas higiénicas encaminadas a reducir la posible contaminación ambiental con diferentes fases del parásito, evitando las posibilidades de contacto del efectivo de la granja con los ooquistes del parásito y con los taquizoítos y bradizoítos que pueden encontrarse en el concepto abortado y ser la causa de la infección oral de la vaca, del perro y de otros reservorios. A su vez, los bradizoítos en tejidos animales muertos podrían ser otra importante fuente de infección para el perro. Entre las medidas específicas que podrían contemplarse para el control de la transmisión horizontal se encontrarían las siguientes:

- Eliminar los fetos, fluidos y placentas, también vacas y terneros muertos, evitando que puedan ser ingeridos por los perros, lamidos por la hembra abortada o entrar en contacto con otras vacas.

- Evitar la exposición del efectivo y del alimento (pienso, agua) a las heces de perros. Eliminar contaminación por heces de perro de la paja que constituirá la cama, del grano almacenado, del forraje y del pienso. Son prácticas muy adecuadas evitar que los perros entren en las áreas de alojamiento de los animales.

- Controlar la población de perros.

1.2.7.3. Inmunoprofilaxis

A las medidas de manejo del rebaño indicadas, consistentes como hemos visto en el desecho y reposición selectivas, habría que añadir otra medida eficaz de la prevención de la transmisión vertical como podría ser la inmunoprofilaxis. En este sentido, recientemente se ha descrito una vacuna frente a *N. caninum* que ha tenido escaso éxito (Andrianarivo *et al.*, 2000).

En la vacunación frente a infecciones por protozoos es importante inducir una respuesta inmune eficaz de tipo Th1, la cual se ha detectado en infecciones experimentales en bovinos (Williams *et al.*, 2000). Sin embargo, una fuerte respuesta de tipo Th1 originada como consecuencia de una vacunación podría ser incompatible con el desarrollo de una gestación normal. En este sentido se han realizado pruebas con la vacuna comercial que existe frente a la toxoplasmosis en ovino (Toxovax®) en ovejas gestantes infectadas experimentalmente con *N. caninum* sin obtener resultados prometedores (Innes *et al.*, 2001a).

Otros inconvenientes de la vacunación frente a la infección por *Neospora* son los modelos animales y las preparaciones vacunales empleadas en los ensayos. Por lo que se refiere a las especies animales empleadas en los estudios de vacunación, la mayor parte de los experimentos realizados hasta el momento han utilizado especies animales, como ratones y ovejas, que no reflejarían la situación natural. En este sentido, Liddell *et al.* (1999b) vacunaron ratonas BALB/c con extracto crudo de taquizoítos antes de la cubrición e infectaron con taquizoítos a los 10-12 días de la gestación, obteniéndose una eficaz protección frente a la transmisión vertical. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Baszler *et al.* (2000) donde la vacunación exacerbó la sintomatología nerviosa y originó una inadecuada respuesta inmune. Andrianarivo *et al.* (1999) vacunaron el ganado bovino con taquizoítos muertos detectando una ligera respuesta inmune de base celular y cuando se inoculó en reproductoras gestantes no se evitó la infección fetal (Andrianarivo *et al.*, 2000). En lo que respecta al empleo de taquizoítos vivos, aislados menos virulentos (Atkinson *et al.*, 1999) o mutantes sensibles a la temperatura (Lindsay *et al.*, 1999b) se han empleado en ensayos de vacunación en ratones con el objetivo de estimular una respuesta inmune protectora frente a una infección letal por *N. caninum*, obteniendo resultados prometedores, pero no definitivos. Estos resultados señalaron la posibilidad de emplear vacunas atenuadas vivas para prevenir el aborto, si bien, tal y como se ha mencionado anteriormente, la vacuna viva desarrollada para la toxoplasmosis, Toxovax®,

resultó ser ineficaz cuando se empleó en ovejas gestantes infectadas con una dosis letal de taquizoítos de *N. caninum*.

Por otra parte, las preparaciones vacunales más empleadas han incluido tanto extracto crudo de taquizoítos como taquizoítos enteros. Sin embargo, su empleo resulta cuestionable debido al elevado coste económico ya que para su producción es necesario el mantenimiento de los taquizoítos en cultivo celular. Las vacunas que se basan en el empleo de parásitos atenuados aunque inducen una respuesta protectora adecuada presentan el problema de originar animales persistentemente infectados. En cuanto a las vacunas que utilizan antígeno crudo o taquizoítos muertos, los resultados son controvertidos tal y como se ha detallado previamente. Con el objetivo de solventar estos problemas y disminuir el coste de producción, se ha propuesto el empleo de vacunas de subunidades (Jenkins, 2001). Con anterioridad se han empleado diversos antígenos recombinantes exclusivamente en el diagnóstico serológico (Lally *et al.*, 1996b; Dubey *et al.*, 1997; Jenkins *et al.*, 1997), si bien en la actualidad estas investigaciones se están dirigiendo también hacia el diseño de vacunas. En este sentido, en el estudio realizado por Nishikawa *et al.* (2001a) se empleó un vector, el virus vaccinia, para clonar los antígenos NcSRS2 y NcSAG1 e inmunizar ratonas gestantes protegiendo con éxito frente a la transmisión vertical.

2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

El diagnóstico serológico en el ganado bovino se viene realizando con éxito de forma rutinaria para diagnosticar la infección por *N. caninum* en los animales adultos y se utiliza como técnica complementaria en el diagnóstico de la neosporosis en fetos abortados (Björkman & Uggla, 1999; Trees & Williams, 2000). Sin embargo, en el diagnóstico serológico pueden influir factores como la edad del animal o el objetivo de la técnica y, por ello, no se ha establecido un punto de corte común para las diferentes técnicas serológicas. En la serología fetal, la edad del feto y el tiempo transcurrido entre la infección y el aborto son factores determinantes, mientras que en el ganado adulto se han descrito fluctuaciones de los niveles de anticuerpos relacionados con la edad del animal y la fase de gestación. Por otra parte, las diferentes pruebas inmunodiagnósticas se han empleado con diversos fines, tales como el diagnóstico del aborto en los fetos y en el ganado reproductor, el diagnóstico de la infección en un animal previo a su entrada en un rebaño de reproductoras y la estimación de las tasas de prevalencia en estudios epidemiológicos (Jenkins *et al.*, 2002).

Entre las técnicas serológicas más utilizadas se encuentran la IFI, el ELISA, y, recientemente, el western blot, que se ha utilizado, preferentemente, como una técnica complementaria a otras técnicas serológicas y no como una técnica de rutina para el diagnóstico de la infección en el ganado bovino (Björkman & Uggla, 1999; Atkinson *et al.*, 2000b).

El estudio de los antígenos de *N. caninum*, especialmente, los inmunodominantes, constituye un campo de enorme interés, ya que las complejas interacciones parásito-hospedador dependen, básicamente, de la respuesta inmune desarrollada por el hospedador frente a estas proteínas y/o glicoproteínas del parásito accesibles a la acción del sistema inmune (Hemphill *et al.*, 1999b). De este modo, la identificación y caracterización de los antígenos inmunodominantes de *N. caninum* implicados en la respuesta inmune humoral desarrollada por diversas especies animales infectadas con *Neospora* spp., y la obtención de proteínas recombinantes de *N. caninum* abre las puertas al desarrollo de nuevas pruebas inmunodiagnósticas más sensibles y específicas.

Hasta el momento, se han descrito varios antígenos inmunodominantes del taquizoíto reconocidos por sueros procedentes de diversas especies con infecciones naturales y experimentales (Barta *et al.*, 1992; Bjerkas *et al.*, 1994; Baszler *et al.*, 1996). Sin embargo, no se ha establecido un patrón de reconocimiento antigénico común para las tres poblaciones

bovinas de riesgo -fetos, reproductoras y sementales- importantes desde el punto de vista de la patogenia y el control de la infección. Por otra parte, las diferencias de reconocimiento antigénico existentes en función de la población objeto de estudio y de la fase de la infección son aspectos fundamentales, que no han sido estudiados y que deberían tenerse en cuenta a la hora de abordar el desarrollo de nuevas pruebas inmunodiagnósticas. Así mismo, en lo referente a la fase de la infección permanece sin ser aclarado la posible relación existente entre las variaciones de anticuerpos que ocurren en el ganado infectado a lo largo de la gestación, descritas por diversos autores (Stenlud *et al.*, 1999; Quintanilla-Gozalo *et al.*, 2000), y los antígenos de *N. caninum* implicados en dicho proceso.

Por otra parte, el empleo de antígenos inmunodominantes en el desarrollo de nuevas pruebas diagnósticas serológicas podría aportar una mayor sensibilidad, especificidad, repetibilidad y reproducibilidad a la técnica. El empleo de la proteína nativa en lugar de la proteína recombinante en un prueba diagnóstica es un paso previo que debe realizarse a la hora evaluar el potencial diagnóstico de un antígeno, puesto que las modificaciones postraslacionales y conformacionales en las proteínas recombinantes pueden ser diferentes comparadas con la proteína nativa, lo cual podría influir notablemente en la inmunogenicidad de dicha proteína.

Durante esta última década, se ha invertido un enorme esfuerzo, por parte de los diferentes grupos investigadores, en identificar y caracterizar proteínas del taquizoíta de *N. caninum* mediante el desarrollo de anticuerpos monoclonales y anticuerpos purificados por afinidad frente a determinados antígenos del parásito, la obtención de sueros policlonales dirigidos frente a parásitos completos y la inmunodetección de clones de interés sobre genotecas de cDNA del taquizoíta de *N. caninum* con suero de animales infectados. De este modo, se han caracterizado diversas proteínas de secreción y de la superficie del parásito.

Otro abordaje que se puede seguir a la hora de caracterizar proteínas con interés diagnóstico y vacunal es el empleo de la electroforesis bidimensional complementada con el western blot. Esta tecnología relativamente novedosa ha permitido identificar y caracterizar un gran número de proteínas de *T. gondii*, pero hasta el momento no se ha empleado con esta finalidad en *N. caninum*.

Con todos estos antecedentes, el presente estudio se ha centrado, por una parte, en la mejora de las técnicas inmunodiagnósticas existentes y, por otra, en la identificación, caracterización y estudio del valor inmunodiagnóstico de los antígenos inmunodominantes de *Neospora*.

El **primer objetivo** de este trabajo comprendió la validación de dos de las técnicas inmunodiagnósticas más utilizadas en el diagnóstico serológico de la neosporosis bovina, la IFI y el ELISA, con el objetivo de esclarecer algunos aspectos controvertidos del diagnóstico serológico y, así, poder establecer una serie de pautas desde el punto de vista práctico a la hora de afrontar el control de la infección. Para ello, se utilizó un panel de sueros de referencia bien caracterizado y se estudió la existencia de poblaciones serológicas independientes en el ganado bovino infectado naturalmente. Una vez definidas las posibles poblaciones serológicas independientes, se establecieron diferentes puntos de corte para cada técnica serológica en función de la edad del animal y del propósito de la técnica y, finalmente, las características diagnósticas junto con las tasas de prevalencia, en función de los distintos puntos de corte para cada técnica, fueron determinadas utilizando una población diana.

El **segundo objetivo** que se planteó fue el estudio del patrón de reconocimiento de los antígenos de *N. caninum* en tres poblaciones bovinas con infecciones naturales importantes desde el punto de vista clínico y del diagnóstico de la neosporosis bovina (fetos, reproductoras y sementales). Así mismo, se investigó la posible relación entre los resultados de IFI y el reconocimiento de los antígenos de *N. caninum*. Por otra parte, se investigaron aquellos antígenos cuyo reconocimiento está implicado en las fluctuaciones de anticuerpos que tienen lugar a lo largo de la gestación, estudiando el reconocimiento de antígenos por dos poblaciones de reproductoras infectadas naturalmente -abortadas y no abortadas- a lo largo de su gestación.

El **tercer objetivo** fue estudiar la utilidad diagnóstica de alguno de los antígenos inmunodominantes definidos en el apartado anterior. Para ello, se purificó la fracción de 17 kDa, el antígeno inmunodominante que fue reconocido con mayor frecuencia e intensidad por las diferentes poblaciones bovinas infectadas. A continuación, el antígeno purificado fue empleado en la prueba de western blot para analizar su reconocimiento por parte de sueros procedentes de animales de diferentes grupos de edad con infección natural y experimental.

Finalmente, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las tres primeras partes de este estudio, nos planteamos la realización del cuarto y quinto objetivos para caracterizar los antígenos inmunodominantes de *N. caninum* con interés en el inmunodiagnóstico siguiendo dos aproximaciones diferentes y complementarias.

El **cuarto objetivo** propuesto comprendió la identificación de las secuencias de cDNAs correspondientes a la fracción de 17 kDa. Para ello, en primer lugar, se obtuvieron anticuerpos policlonales dirigidos frente a la fracción antigénica de interés y, seguidamente, se construyó una genoteca de cDNA de taquizoítos de *N. caninum* y se realizó su cribado con los anticuerpos específicos con el objetivo de identificar clones que expresaran proteínas de esta fracción.

Finalmente, el **quinto objetivo** incluyó la caracterización de las proteínas inmunodominantes del taquizoíto mediante electroforesis en geles bidimensionales y western blot. Como paso previo se obtuvo el mapa bidimensional de las proteínas del taquizoíto de *N. caninum* y, posteriormente, se estudió la composición polipeptídica - determinándose, tanto el peso molecular como el punto isoeléctrico- y el reconocimiento de los componentes polipeptídicos de la fracción antigénica de 17 kDa.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. CULTIVOS CELULARES

3.1.1. Líneas celulares empleadas

En el trabajo de tesis doctoral se utilizaron dos líneas celulares establecidas: la línea Vero, procedente de fibroblastos de riñón de mono (Higashi *et al.*, 1967) y la línea Marc-145, procedente de un clon de la línea celular MA-104 originada a partir de células epiteliales de riñón de mono (Kim *et al.*, 1993). Ambas líneas celulares se emplearon para el mantenimiento y producción de taquizoítos de los distintos aislados de *N. caninum* utilizados.

3.1.2. Mantenimiento de las líneas celulares

Para el crecimiento tanto de la línea Vero como de la Marc-145, se utilizaron diferentes medios en función de su posterior utilización. Para el mantenimiento se utilizó el medio HAM-F10 (Gibco-BRL), un medio líquido al que se le añadieron enriquecedores -Ultrosereg al 2% (Gibco-BRL) y suero fetal bovino (FBS) al 20% (Gibco-BRL)-, una solución tampón -HEPES (Gibco-BRL)- y antibióticos -penicilina/estreptomicina (Gibco-BRL) (100 U.I./ μ l, 100 μ g/ml)- para prevenir posibles contaminaciones de origen bacteriano. El medio, preparado previamente en cabina de flujo laminar y con todos sus componentes estériles, se guardó en alícuotas a -20°C hasta su uso posterior. Cuando las células se emplearon para el mantenimiento y multiplicación de taquizoítos de *N. caninum*, se utilizó el medio mínimo esencial (MEM) deshidratado (Sigma), suplementado con sales de Earle, L-glutamina y tampón HEPES. Este medio fue reconstituido con agua desmineralizada y desionizada (sistema Milli Q de Millipore) y posteriormente se añadió penicilina/estreptomicina (100 U.I./ μ l, 100 μ g/ml) y bicarbonato sódico (2,2 g/L) (Sigma) con el objetivo de mantener el pH del medio neutro. Una vez preparado el medio, éste se esterilizó mediante un sistema de filtración (filtros Steritop GP de 0,22 μ m, Millipore). En este caso, el FBS fue sustituido por suero equino inactivado (SHI) (2-5%) (Sigma).

Las líneas celulares se mantuvieron en un incubador (Forma Scientific) a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂. Tanto para el mantenimiento de las líneas celulares como para la obtención *in vitro* de taquizoítos de *N. caninum* se realizaron pases seriados de las células en una cabina de flujo laminar vertical (Telstar, mod. AV-100), dos veces por semana, utilizando frascos de cultivo de 25, 75 y 150 cm² (TPP), en los que se sembraron 7x10⁵ células, 2x10⁶ y

4×10^6 , respectivamente. Para ello, la monocapa de células confluentes se lavó con tampón fosfato salino (PBS) y se separó del soporte mediante tratamiento con una solución de tripsina (500mg/L)-EDTA (200mg/L) (Sigma) y posterior resuspensión en el medio de cultivo adecuado. El número y la viabilidad de las células se determinó realizando una dilución 1:2 en tripán azul (Merck) al 0,05%. Para su recuento, se utilizó un hemocitómetro (Neubauer mejorado, Brand) y la viabilidad fue evaluada basándonos en la captación selectiva de este colorante por parte de las células con la membrana celular alterada.

3.1.3. Conservación de las líneas celulares

La conservación de las líneas celulares se realizó mediante criopreservación en N_2 líquido ($-196^\circ C$). Para ello, una vez que las células eran separadas y resuspendidas en medio de cultivo, se centrifugaron ($600 \times g$, 5 minutos) evaluando previamente su viabilidad con el colorante tripán azul. El sedimento obtenido fue resuspendido en el medio de mantenimiento de las células y se distribuyó en viales de congelación de 1,8 ml a los que se añadió dimetil sulfóxido (DMSO) (10%) (Sigma). La concentración final fue de 10^7 células/vial y los viales fueron guardados a $-80^\circ C$ durante 24 horas y posteriormente a $-196^\circ C$ en tanques de N_2 líquido (Air Liquide, mod. Arpege 40).

Cuando se necesitó descongelar las células, el contenido del vial se atemperó unos segundos a $37^\circ C$, posteriormente se mezcló lentamente con 20 ml de medio HAM-F10 y se centrifugó ($600 \times g$, 5 minutos) para eliminar el DMSO. El sedimento se añadió al frasco de cultivo junto con medio HAM-F10.

3.2. OBTENCIÓN *IN VITRO* DE TAQUIZOÍTOS DE *N. caninum*

3.2.1. Aislados de *N. caninum*

En este estudio se utilizaron tres aislados diferentes de *N. caninum*: NC-1 (Dubey *et al.*, 1988b) y NC-Liv (Barber *et al.*, 1993) de origen canino y NC-SweB1 (Stendlund *et al.*, 1997) de origen bovino. Los aislados NC-1 y NC-Liv fueron obtenidos en 1988 y 1993, respectivamente, a partir del cerebro de perros con manifestaciones nerviosas, mientras que el aislado NC-SweB1 fue obtenido en el año 1995 a partir del cerebro de un ternero recién

nacido, infectado congénitamente, y que presentaba sintomatología nerviosa. El aislado NC-1 fue cedido por la Dra. Innes (Moredun Research Institute; Edimburgo, Reino Unido), el aislado NC-Liv por la Dra. Diana Williams (Liverpool School of Tropical Medicine; Liverpool, Inglaterra) y el aislado NC-SweB1 por el Dr. Arvid Uggla (Swedish University of Agricultural Sciences; Uppsala, Suecia).

3.2.2. Obtención de taquizoítos de *N. caninum* en cultivo celular

Los tres aislados señalados en el apartado anterior fueron mantenidos en el laboratorio mediante pases seriados en las líneas celulares Vero y Marc-145 a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂. El día anterior a la infección del cultivo celular con taquizoítos de *N. caninum* se sembraron las células (2x10⁶ células/frasco de 75 cm²) utilizando medio de cultivo MEM con 2% de SHI. A las 24 horas, se añadieron 4x10⁶ taquizoítos de *N. caninum* a cada frasco de 75 cm². Los taquizoítos fueron recogidos cuando al menos el 80% del tapiz celular estaba destruido (3-4 días después de la infección). El pase de células así como la recogida del parásito se realizó dos veces a la semana. El sobrenadante de los frascos de cultivo fue recogido con pipetas estériles (Biotech), y, en algunos casos, previamente se utilizaron rascadores de plástico (Nunc) para despegar los restos de tapiz celular con taquizoítos en su interior. La viabilidad de los taquizoítos se evaluó por la captación selectiva del colorante tripán azul y para su recuento se empleó un hemocitómetro. Los taquizoítos obtenidos fueron utilizados para la obtención de proteínas para las pruebas serológicas y de análisis de proteínas y para el aislamiento del RNA total utilizado en las pruebas genómicas.

3.2.3. Conservación de los aislados

Los pases más bajos de cada uno de los aislados se conservaron criopreservados en N₂ líquido hasta su utilización (NC-1 pase 39; NC-Liv pase 15 y NC-SweB1 pase 15). Para ello, el sobrenadante del cultivo celular se centrifugó a 600 x g durante 15 minutos, evaluando después el número y la viabilidad de los taquizoítos. El sedimento fue resuspendido en una mezcla de medio MEM (50%) y SHI (40%) y la suspensión se distribuyó en viales de congelación de 1,8 ml alcanzando una concentración final de 10⁷ taquizoítos/ml. Finalmente, se añadió DMSO (10%) y se guardó a -80°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo los viales se almacenaron a -196°C en N₂ líquido.

Cuando se precisó descongelar alguno de los aislados, el contenido del vial de congelación se mezcló lentamente con 20 ml de medio MEM y se centrifugó (600 x g, 5 minutos) para eliminar el DMSO. El sedimento se añadió al cultivo celular junto con medio MEM y SHI al 2% y, aproximadamente, transcurridos 8-10 días, comenzaron a visualizarse los primeros taquizoítos en el interior de las células.

3.3. PURIFICACIÓN DE TAQUIZOÍTOS DE *N. caninum* PARA LA OBTENCIÓN DE ANTÍGENO Y RNA TOTAL

Los taquizoítos de *N. caninum* obtenidos en cultivo celular fueron purificados para su utilización en la prueba de inmunofluorescencia (IFI) y para la obtención del antígeno soluble utilizado en las técnicas de ELISA, electroforesis uni y bidimensional y western blot. También se utilizaron estos taquizoítos purificados para la obtención del RNA total que se empleó en la construcción de la genoteca.

3.3.1. Antígeno para la prueba de IFI

Como antígeno para las pruebas de inmunofluorescencia se emplearon taquizoítos enteros del aislado NC-1 de *N. caninum*, siguiendo el protocolo descrito por Trees *et al.* (1993).

En resumen, el sobrenadante del cultivo celular que contenía los taquizoítos se pasó por una aguja de 0,8 x 40 mm y posteriormente a través de una aguja de 0,5 x 16 mm para romper las células y así poder liberar los taquizoítos que hubiese en su interior. A continuación, los taquizoítos fueron lavados dos veces mediante centrifugación en PBS (600 x g, 15 minutos) y antes del último lavado la suspensión de taquizoítos se pasó por un filtro de 5 µm (Biotech) para eliminar células y restos celulares, realizándose posteriormente el recuento, no solo de los taquizoítos sino también de las células, comprobándose la ausencia de contaminación celular. Tras un último lavado con PBS, el sedimento fue resuspendido en esta solución tampón hasta conseguir una concentración final de 10^7 taquizoítos/ml a la que se añadió formaldehído al 0,2%. Los taquizoítos formalinizados fueron distribuidos en alícuotas y almacenados a 4°C o a -20°C hasta su utilización.

3.3.2. Antígeno para las pruebas de ELISA, electroforesis uni y bidimensional y Western blot

Como antígeno para estas pruebas se utilizaron, principalmente, proteínas solubles del taquizoíto de *N. caninum*. Las proteínas solubles se obtuvieron siguiendo un protocolo similar al descrito por Voller *et al.* (1976) adaptado para nuestros propósitos. En resumen, los taquizoítos se purificaron de la misma forma que en el apartado 3.3.1. Tras comprobar la ausencia de células, el sedimento se guardó a -80°C hasta su uso.

Se preparó antígeno de los aislados NC-1, NC-Liv y NC-SweB1. Los taquizoítos de los diferentes aislados se sometieron a dos ciclos de congelación-descongelación y posteriormente se resuspendieron en 4 ml de una solución 10mM de tris-HCl (pH 7,0) que contenía 2 mM de PMSF (Sigma) como inhibidor de proteasas. Posteriormente, los taquizoítos se sonicaron (sonicador Branson mod. Sonifier 450) utilizando 5-6 ciclos de 20 segundos a una amplitud de 3 micrones. Durante todo el proceso la muestra se mantuvo en un baño con hielo picado para evitar su calentamiento con la consiguiente desnaturalización de las proteínas. La suspensión resultante fue centrifugada (12000 x g, 30 minutos a 4°C) y el sobrenadante obtenido se dividió en alícuotas previa determinación de la concentración de proteína y se almacenó a -80°C.

3.3.3. Determinación de la concentración de proteína

La determinación de la cantidad de proteína soluble obtenida se realizó siguiendo el protocolo propuesto por Smith *et al.* (1985), empleando la prueba comercial MICRO BCA (Pierce). Como proteína patrón se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) (Roche Molecular, Biochemical, Mannheim) realizándose concentraciones conocidas y decrecientes para elaborar la curva patrón.

3.3.4. Purificación de taquizoítos para el aislamiento de RNA total

Los taquizoítos empleados en la obtención del RNA de *N. caninum* correspondieron al aislado NC-1 y fueron purificados siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.3.1. en las máximas condiciones de esterilidad. Durante todo el proceso, se utilizó material estéril libre de RNAsas y PBS tratado con dietilpírocarbonato (DEPC) al 0,1%. Se evaluó la viabilidad y el

número de los taquizoítos mediante recuento, en una solución con 0,05% de colorante tripán azul, comprobándose la ausencia de células del cultivo, y tras el último lavado con PBS el sedimento que contenía los taquizoítos se guardó en tubos estériles libres de RNAsas de 1,5 ml a -80°C hasta su utilización.

3.4. LÍQUIDOS FETALES Y SUEROS BOVINOS

3.4.1. Método de obtención de los líquidos fetales

Los líquidos fetales se recogieron de la cavidad torácica y/o cavidad abdominal en el curso de la necropsia. Estas muestras fueron recogidas y remitidas a nuestra institución por los Dres. Ignacio Arnaiz y Gorka Aduriz del Laboratorio de Sanidad y Producción Animal de Galicia (Lugo) y del Instituto de Investigación y Desarrollo Agrario (Neiker, Derio, País Vasco), respectivamente. En todos los casos, las muestras fueron recogidas en condiciones asépticas, valorándose previamente el estado general de cada feto -fresco, momificado o autolítico-, y determinándose la edad gestacional mediante la medida de la distancia entre la región occipital y la base de la cola (Gjesdal, 1969).

Los líquidos fetales se centrifugaron (500 x g, 10 minutos) para eliminar posibles restos celulares, y el sobrenadante se dividió en alícuotas y se almacenó en tubos de 1,5 ml a -80°C hasta su posterior utilización.

3.4.2. Método de obtención de los sueros

Los sueros procedían de grupos de bovinos de distintas edades. La sangre se obtuvo por punción aséptica de la vena coccígea y se recogió en tubos de vacío de 10 ml (Venoyect®). Para la obtención del suero, los tubos con la sangre permanecieron a temperatura ambiente durante 1-2 horas, y posteriormente a 4°C durante 12-24 horas para facilitar la retracción del coágulo. Finalmente, los tubos se centrifugaron a 500 x g durante 10 minutos y el suero fue dividido en varias alícuotas y almacenado en tubos de 1,5 ml a -80°C hasta su posterior estudio.

3.4.3. Características de los diferentes grupos de líquidos fetales y sueros utilizados

3.4.3.1. Muestras de bovinos libres de la infección por *N. caninum*

Las muestras de bovinos libres de la infección por *N. caninum* constituyeron la población de referencia negativa utilizada en los apartados 4, 5 y 6. Así mismo, estas muestras se emplearon como testigos negativos en las diferentes técnicas serológicas (IFI, ELISA y western blot). Los criterios de selección incluyeron la procedencia de rebaños sin una historia previa de fallo reproductivo originado por *N. caninum* durante los últimos tres años, así como una ausencia de reconocimiento de antígenos específicos de *N. caninum* en la técnica de western blot por parte de los sueros individuales. En el caso de los fetos, además se comprobó que la infección por *Neospora* no había sido la causa del aborto al no detectarse lesiones compatibles con la infección mediante técnicas histológicas.

Las poblaciones de referencia negativas estuvieron constituidas por seis grupos diferentes de edad: fetos abortados, terneros precalostrales, terneros calostrales menores de 6 meses, terneros de entre 7 y 12 meses de edad, novillas de entre 1 y 2 años y vacas mayores de 2 años. De cada una de estas categorías se recogieron 21 muestras, las cuales fueron analizadas por la técnica de western blot para corroborar el estatus serológico, considerándose la ausencia de reconocimiento de cualquier antígeno inmunodominante del taquizoíto de *N. caninum* como un resultado negativo.

Como testigo negativo de las diferentes técnicas serológicas (IFI, ELISA y western blot) se utilizó una mezcla de 10 sueros procedentes de las reproductoras empleadas como población de referencia negativa.

3.4.3.2. Muestras de bovinos infectados naturalmente con *N. caninum*

Las muestras de bovinos infectados naturalmente con *N. caninum* constituyeron las poblaciones de referencia positivas analizadas en los apartados 4 y 5 y se emplearon como testigos positivos en las diferentes técnicas serológicas (IFI, ELISA y western blot). Las

muestras se recogieron de animales infectados que presentaron aborto (fetos y reproductoras) y de animales infectados que no presentaron sintomatología (reproductoras y sementales).

3.4.3.2.1. Fetos

Los fluidos torácicos o abdominales utilizados como muestras fetales de referencia positivas (n=13) analizadas en los apartados 4 y 5 y las muestras empleadas en el apartado 6 (n=4) procedían de rebaños con una historia previa de fallo reproductivo originado por *N. caninum* durante los últimos tres años. Así mismo, la infección por *Neospora* se confirmó mediante la presencia de lesiones compatibles o específicas de *Neospora* en cerebro (González *et al.*, 1999) y el reconocimiento de al menos un antígeno inmunodominante del taquizoíto mediante la técnica de western blot.

3.4.3.2.2. Terneros precalostrales

Las muestras de suero de terneros precalostrales empleados en el apartado 6 procedían de rebaños con una historia previa de fallo reproductivo originado por *N. caninum* durante los últimos tres años. Las muestras fueron recogidas tras el nacimiento inmediatamente antes de la primera toma de calostro, y la infección se confirmó mediante la detección de anticuerpos específicos anti-*Neospora* por la técnica de IFI.

3.4.3.2.3. Novillas y vacas abortadas

La población de referencia positiva de reproductoras abortadas, que se empleó en los apartados 4 y 5, estaba constituida por hembras en edad reproductora (novillas y vacas) (n=33). Los requisitos que se tuvieron en cuenta en la selección de las muestras fue la procedencia de rebaños con una historia previa de fallo reproductivo por *N. caninum* durante los últimos tres años y la presencia de aborto. La infección por *Neospora* se confirmó mediante el reconocimiento de al menos un antígeno inmunodominante de *Neospora* por la técnica de western blot. Las muestras fueron recogidas inmediatamente después del aborto.

El grupo de reproductoras abortadas, que se analizó en el apartado 6, estaba constituida por 6 hembras en edad reproductora (novillas y vacas) que habían abortado (n=6). El criterio seguido en la selección de las muestras incluyó la procedencia de rebaños con una historia previa de fallo reproductivo por *N. caninum* durante los últimos tres años, la presencia

de aborto y la detección de anticuerpos específicos anti-*Neospora* por la técnica de IFI (títulos iguales o superiores a 1:250).

Por otra parte, se realizó una mezcla con 10 de los sueros procedentes de vacas infectadas con aborto, la cual presentó un título de IFI de 1:1000. Esta mezcla se utilizó como testigo positivo en las diferentes técnicas serológicas.

3.4.3.2.4. Novillas y vacas infectadas

En el apartado 4 se analizaron un total de 59 sueros (positivos n=22; negativos n=27) de novillas y vacas que no habían presentado aborto procedentes de diferentes rebaños sin problemas reproductivos recientes, en los cuales se había diagnosticado la infección por *N. caninum* mediante la técnica de western blot.

En el apartado 6 se analizaron sueros de reproductoras que no habían presentado aborto y procedentes de rebaños con antecedentes de fallo reproductor debido a la infección por *Neospora*, en los cuales se diagnosticó la infección por *N. caninum* mediante la técnica de IFI (títulos iguales o superiores a 1:250).

3.4.3.2.5. Muestras de rebaños con fallo reproductivo por *N. caninum*

Las muestras procedentes de 11 rebaños con antecedentes de fallo reproductivo debido a la infección por *N. caninum* constituyeron la población diana objeto del estudio de prevalencia, la cual estaba compuesta por 372 sueros positivos y negativos de novillas y vacas adultas, algunas de las cuales habían presentado aborto. La infección por *Neospora* se diagnosticó mediante la técnica de western blot.

3.4.3.2.6. Sementales

Se recogieron muestras de sementales de diversas procedencias de las cuales únicamente se seleccionaron las muestras de animales infectados (n=31). En los animales seleccionados se habían detectado previamente anticuerpos específicos frente a *N. caninum* mediante dos pruebas ELISA comerciales (Civtest® -Laboratorios Hipra S.A., Gerona, España- y Herdcheck® -IDEXX S.A., EE.UU.-), cuyos resultados fueron confirmados en

nuestro laboratorio empleando la técnica de IFI (títulos de anticuerpos iguales o superiores a 1:250).

3.4.3.2.7. Muestras secuenciales de novillas y vacas durante la gestación

La cinética de anticuerpos a lo largo de la gestación fue estudiada en novillas y vacas infectadas, 7 que habían abortado y 14 no abortadas procedentes de rebaños con una historia previa de fallo reproductivo por *N. caninum* durante los últimos tres años. El criterio de selección de las muestras fue la detección de títulos de anticuerpos por IFI iguales o superiores a 1:250, y en el caso de las hembras que habían abortado, el aborto por *N. caninum* fue confirmado tal y como se ha descrito anteriormente en el apartado 3.4.3.2.2.

Como testigos negativos, se recogieron muestras de 10 reproductoras procedentes de un rebaño serologicamente negativo y sin una historia previa de fallo reproductivo durante los últimos tres años. En este caso, las muestras fueron recogidas cuatrimestralmente a lo largo de la gestación.

3.4.3.3. Muestras de bovinos infectados experimentalmente con *N. caninum*

Las vacas infectadas experimentalmente fueron inoculadas y mantenidas en las instalaciones del Moredun Research Institute; Edimburgo, Reino Unido y sus correspondientes sueros junto con los procedentes de sus terneros fueron cedidos amablemente por la Dra. Innes (Moredun Research Institute; Edimburgo, Escocia).

Las muestras procedentes de animales infectados experimentalmente empleados en el apartado 6.2.1. pertenecen al estudio realizado por Innes *et al.* (2001b). Se analizaron cuatro grupos de reproductoras gestantes infectadas en momentos diferentes y los terneros procedentes de dichas reproductoras. Las muestras de las reproductoras analizadas en nuestro estudio fueron recogidas a partir del día 140 de gestación, mientras que las muestras correspondientes a los terneros incluyeron tanto sueros precalostrales como poscalostrales recogidos 5 días después del nacimiento.

Se seleccionaron 20 vacas de la raza Frisona con edades comprendidas entre los 16 y 24 meses, las cuales eran seronegativas frente a *T. gondii*, el virus de la diarrea vírica bovina (BVDV), la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) y *Leptospira* sp. Los animales pertenecientes a los grupos 1 (n=5) y 2 (n=6) tampoco presentaron anticuerpos específicos frente a *N. caninum*. Todos los animales fueron vacunados frente a BVDV (Bovidec®, Vericore) y leptospirosis (Leptavoid H®, Schering –Plough Animal Health), y fueron tratados con Streptogen® (Schering –Plough Animal Health) antes de la cubrición para eliminar cualquier posible infección residual. Los animales pertenecientes a los grupos 3 (n =6) y 4 (n=3) habían sido inoculados en una gestación anterior con 10^7 taquizoítos vivos de *N. caninum* (aislado NC-1) y fueron de nuevo inoculados con 10^8 taquizoítos vivos por vía subcutánea sobre el linfonódulo prefemoral izquierdo 6 semanas antes de la cubrición. Así mismo, los animales incluidos en los grupos 2 y 3 fueron inoculados el día 140 de gestación con 5×10^8 taquizoítos vivos por vía subcutánea sobre el linfonódulo prefemoral derecho. En el grupo testigo se empleó un inóculo de 5×10^6 células Vero.

3.5. OBTENCIÓN DE SUERO DE CONEJO ANTI - *N. caninum*

Durante el trabajo experimental se utilizaron 2 conejos hembra de tres meses de edad, raza Neozelandesa y con un peso de aproximadamente 2,5 kg para la obtención de suero frente a los taquizoítos de *N. caninum*. Los conejos se mantuvieron en jaulas metálicas a una temperatura ambiente constante de 20°C, sometidos a un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y alimentados con dietas comerciales y agua *ad libitum*.

3.5.1. Preparación del antígeno

Para la inmunización de los conejos, los taquizoítos fueron purificados siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.3.1. Tras un último lavado con PBS, se realizó su recuento y se evaluó su viabilidad tal y como se ha descrito previamente en el apartado 3.2.2. Para la inmunización se utilizaron 10^8 taquizoítos de *N. caninum* diluidos en PBS y adyuvante completo de Freund (Sigma). Para preparar la emulsión, los taquizoítos fueron sometidos a varios ciclos de congelación y descongelación, y posteriormente fueron resuspendidos en 2 ml de PBS a los que se añadió un volumen equivalente de adyuvante completo de Freund. Finalmente, la mezcla fue sonicada utilizando 5-6 ciclos de 20 segundos.

3.5.2. Inoculación de los animales y obtención de los sueros

La emulsión se inyectó intradérmicamente en distintos lugares del dorso del animal (100 µl/inoculación) siguiendo el método propuesto por Vaitukaitis (1981). Previamente, se tomó una muestra de sangre de cada conejo para determinar el título de IgG específico pre-inoculación. A las nueve semanas post-inoculación, se realizó la primera recogida de sangre, y tres semanas más tarde (semana 12 post-inoculación), se procedió a la exanguinación total y sacrificio humanitario del animal.

Para la obtención de los sueros, los conejos fueron anestesiados previamente con 0,2 ml de Tiletamina (50 mg/ml) y Zolazepan (50 mg/ml) (Zoletil, Laboratorios Virvac) vía i.m. y sacrificados con 7 ml del fármaco T-61 (Laboratorios Intervet) vía intrapulmonar. La recogida del suero se realizó mediante punción intracardiaca. El suero de conejo se tituló mediante la técnica de IFI, tal y como se describe en el apartado 3.7.1.2., presentando un título de 1:8000. Finalmente, el suero fue distribuido en alícuotas de 500 µl y almacenado a -80°C.

3.6. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

3.6.1. Análisis unidimensional de proteínas

3.6.1.1. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes

Las proteínas de la fracción soluble de los taquizoítos de *N. caninum* fueron analizadas en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida siguiendo básicamente el método descrito por Laemmli, (1970). Para ello, se utilizó el gel de empaquetamiento a una concentración del 3,75% de una mezcla de acrilamida-bisacrilamida (Bio-Rad) en una proporción 30:0,8, mientras que el gel separador se realizó a una concentración del 15% de una mezcla de acrilamida-DATD (Bio-Rad) en una proporción 28:0,7 (Bio-Rad). Las muestras junto con el marcador de bajo peso molecular (Bio-Rad) se cargaron en el gel diluidos (1:2 y 1:20, respectivamente) en un tampón de carga 1x, que en condiciones reductoras incluyó 2β mercaptoetanol (2β -ME) al 5%, tras ser desnaturalizados a 95°C durante 5 minutos. En cada gel de 5 ml se utilizó 100 µg de extracto soluble de taquizoíto y 2,7 µg de proteína electroeluída. Para llevar a cabo la electroforesis se empleó el tampón de electroforesis (véase Apéndice C).

La electroforesis en minigeles, de 5 ml y 0,75 mm de espesor, se realizó utilizando el sistema denominado “Mini-Protean® II Electrophoresis Cell” (Bio-Rad) a 200 V durante 1h. En otras ocasiones se utilizaron geles grandes (Protean® II xi Cell), de 30 ml y 1 mm de espesor, realizando la electroforesis a un amperaje constante de 10 mA/ gel durante toda la noche.

Las proteínas se visualizaron mediante tinción de los geles con una solución de azul de Coomassie (azul de Coomassie 0,25% en metanol - ácido acético - agua destilada en proporción 4:1:5). Finalmente, los geles se secaron en un papel de filtro 3 MM (Whatman) durante 1-2 horas a 80°C en un secador de geles (DrygelSr., Model SE 1160, Hoefer Scientific Instruments; San Francisco; USA) conectado a una bomba de vacío (Aspirator A-3S; EYELA Tokio Rikakikai CO., LTD; Japón).

3.6.1.2. Electrotransferencia

3.6.1.2.1. Transferencia a membrana de nitrocelulosa

Las proteínas separadas mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) en una cubeta “Mini Trans-blot® Electrophoretic Cell” (Bio-Rad), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial, en un tampón de electrotransferencia frío en agitación. Para comprobar la transferencia de las proteínas, éstas fueron visualizadas mediante tinción de las membranas con el colorante Rojo Ponceau (Apéndice C), el cual fue posteriormente eliminado mediante varios lavados de la membrana con agua destilada.

3.6.1.2.2. Transferencia a membrana de PVDF

En este caso, las proteínas separadas mediante electroforesis se transfirieron a membranas de PVDF (Bio-Rad) para llevar a cabo en ella la secuenciación N-terminal de la proteína problema. La transferencia se realizó en una cubeta “Mini Trans-blot® Electrophoretic Cell” (Bio-Rad), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial y en

agitación, utilizando un tampón de electrotransferencia sin azúcares, ya que estos pueden interferir en la posterior secuenciación.

3.6.2. Análisis bidimensional de proteínas (2D-PAGE)

3.6.2.1. Primera dimensión: separación de las proteínas mediante isoelectroenfoque

Las proteínas de la fracción soluble de los taquizoítos de *N. caninum* (350 µg/tira de pH) fueron solubilizadas en un tampón de rehidratación (véase Apéndice C) con ditioeritriol 2% durante 12 minutos y con iodoacetamida al 2,5% durante 5 minutos y, posteriormente, fueron separadas mediante isoelectroenfoque (IEF) de acuerdo con sus puntos isoeléctricos (pI) en un gradiente de pH inmovilizado (IPG). El gradiente empleado fue de pH 3-10 no lineal (Immobiline pH 3-10 non-linear DryStrips, 18 cm; Amersham Biosciences). A continuación, las proteínas se cargaron para la primera dimensión siguiendo las recomendaciones del fabricante y el IEF se realizó en una cubeta IPGphor (Amersham Biosciences) a una temperatura constante de 15°C utilizando las siguientes condiciones: 16 horas de rehidratación pasiva, 500 V durante 1 hora, de 500 a 2000 V en 1 hora y 8000 V durante 5,5 h. A continuación las tiras fueron reducidas en un tampón de equilibrado durante 5 minutos.

3.6.2.2. Segunda dimensión: electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes

Cada una de las electroforesis se realizó en dos geles grandes de poliacrilamida (piperacina diacrilamida) al 10% en paralelo. Las tiras IPG se cargaron en la parte superior de los geles y se cubrieron con una solución de agarosa al 0,5%. Para ello, se emplearon las condiciones y el sistema citado en el apartado 3.6.1.1. Los pesos moleculares y los pI fueron estimados mediante el empleo de marcadores internos 2DE-PAGE y de marcadores externos de geles en una dimensión (Bio-Rad). Finalmente, uno de los geles se transfirió a membranas de nitrocelulosa y el otro se mantuvo como gel de referencia y se tiñó con nitrato de plata. En este último caso, los geles se fijaron con metanol al 40% y ácido acético al 10% durante 1 hora y, posteriormente, en etanol al 5% y ácido acético al 5% toda la noche. A continuación, los

geles fueron lavados con ácido acético al 7,5% e incubados en glutaraldehído al 10% durante 30 minutos, tras lo cual los geles fueron lavados con abundante agua y teñidos con nitrato de plata amoniacal durante 30 minutos. Finalmente, los geles se lavaron con ácido cítrico al 0,01% y formaldehído al 0,1%.

Las imágenes de los geles bidimensionales teñidos con nitrato de plata fueron capturadas con un densitómetro (GS-690 imaging densitometer, Bio-Rad) y digitalizadas empleando el software Multi-Analysis. Finalmente, los pesos moleculares y pI fueron determinados con el software Melanie 3.0 (Bio-Rad).

3.6.2.3. Transferencia a membrana de nitrocelulosa

La transferencia a membranas de nitrocelulosa se realizó a 50 mA durante 14 horas con tampón de transferencia (Apéndice C).

3.6.3. Purificación de proteínas por electroelución

3.6.3.1. Método de electroelución

La electroelución de la proteína de interés se realizó a partir del extracto crudo soluble de taquizoítos del aislado NC-1. Para ello, se separaron las proteínas mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes utilizando geles de 30 ml y 1 mm de espesor a un voltaje constante de 15 V durante toda la noche y posteriormente se congelaron a -20°C . En el momento de su utilización, se tiñeron dos tiras laterales de cada gel con Azul de Coomassie, para determinar la localización de la proteína de interés. Para lograr una localización más exacta de la proteína, además de teñir el gel, se cortaron otras dos tiras laterales y sobre ellas se realizó la electrotransferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa a un amperaje constante de 0,1 A toda la noche utilizando un sistema de refrigeración. Una vez realizada la transferencia, la membrana fue incubada a temperatura ambiente durante 1 hora con solución de bloqueo, y tras los lavados con PBS-Tween al 0,05% se procedió a la realización de la inmunodetección de la banda de interés tal y como se detalla en el apartado 3.7.3.1.

Una vez teñidas las tiras y detectada la banda por western blot, se determinó cual era la banda que interesaba electroeluir en el gel congelado. Para ello se utilizó la fórmula siguiente:

$$X_{\text{cm}} = \text{cm}_1 \times \text{cm}_2 / \text{cm}_3$$

X cm = distancia en cm desde el origen del gel al centro de la banda a cortar

cm₁= movilidad en cm de la proteína de interés en la tira lateral de poliacrilamida teñida o bien distancia en cm que hay en la membrana hasta la banda de interés detectada por el suero positivo

cm₂= longitud en cm del gel congelado

cm₃= longitud de la tira lateral de poliacrilamida o longitud de la tira lateral de la membrana electrotransferida y enfrentada al suero positivo.

Tras la localización de la proteína en el gel se cortó 1 cm de la banda de acrilamida correspondiente. Para su electroelución se siguió básicamente el método recomendado por la casa comercial del Electro-Eluter (Mod.: 422, Bio-Rad), en tampón de electroelución durante 6-7 horas a 10 mA/tubo. Una vez electroeluída la proteína fue sometida nuevamente a electroforesis en condiciones desnaturalizantes y western blot para comprobar la correcta electroelución de la proteína de interés.

3.6.3.2. Cuantificación de la proteína electroeluída

Para la visualización y cuantificación de la proteína electroeluída se utilizó una tinción con nitrato de plata previa electroforesis en geles de acrilamida. Esta metodología se empleó al ser entre 100-1000 veces más sensible que la tinción con azul de Coomassie y detectarse entre 0,1-1,0 ng de polipéptido en una sola banda (Schoenle *et al.*, 1984).

Para la realización de la tinción de plata se siguió el protocolo descrito por Schoenle *et al.* (1984). Una vez realizada la electroforesis, el gel fue incubado de 4-12 horas a temperatura ambiente con una solución para fijar las proteínas. Transcurrido este tiempo, se eliminó la solución de fijado y se incubó de nuevo el gel durante 1 hora con etanol al 30%. Posteriormente, se realizaron 4 lavados de 10 minutos cada uno con agua destilada y se incubó de nuevo el gel con una solución al 0,1% de nitrato de plata durante 30 minutos. Tras un nuevo lavado el gel se reveló con una solución recién preparada de bicarbonato sódico al 2,5% y formaldehído al 0,02%. Una vez visualizadas las bandas de proteínas y alcanzado el contraste deseado la reacción se paró con ácido acético al 1% y posteriormente se lavó el gel con agua destilada. Finalmente se secó el gel, tal y como se ha descrito previamente en el apartado 3.6.1.1.

3.6.4. Estudio de la composición glicoprotéica: deglicosilación química

La metodología empleada para realizar la deglicosilación química se basó en el protocolo descrito por Woodward (1985), en el cual se realiza una oxidación con periodato a pH ácido de los epítomos glucídicos asociados a las glicoproteínas unidas a membranas de nitrocelulosa sin alterar la estructura de las cadenas polipeptídicas. Una vez separadas las proteínas que componen el extracto crudo de los taquizoítos mediante una electroforesis en geles de acrilamida y su posterior electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa, tal y como se describe en el apartado 3.6.1., la membrana fue incubada toda la noche a 4°C con solución de bloqueo. Tras realizar tres lavados con TBS-Tween 20 al 0,05%, la membrana fue cortada en cuatro tiras, dos de las cuales fueron sometidas al proceso de deglicosilación (tiras problema) dejando las dos restantes como tiras control. El proceso de deglicosilación comenzó sumergiendo las dos tiras problema en una solución tampón de acetato sódico 50 mM (pH 4,5), seguido de una incubación con una solución de periodato sódico 10 mM y 20 mM, para cada tira respectivamente, durante 1 hora en oscuridad a 23°C. Transcurrido este tiempo, las tiras se sumergieron de nuevo en el tampón de acetato sódico y a continuación se incubaron en una solución de borohidro de sodio 50 mM durante 30 minutos a 23° C. Finalmente, las tiras fueron lavadas con TBS-Tween 20 al 0,05%. Respecto a las tiras testigo, una de ellas fue incubada en el tampón de acetato sódico 50 mM (pH 4,5) con el objetivo de comprobar que éste no interfería en la reacción, mientras que la segunda tira testigo no se incubó con ninguna de las soluciones tampón empleadas en el proceso de deglicosilación. Una vez realizada la deglicosilación, se inició el western blot tanto en las tiras problema como en las dos tiras testigo siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.7.3.1.

En todos los pocillos se utilizó el mismo testigo positivo, procedente de una mezcla de sueros con anticuerpos específicos tal y como se describe en el apartado 3.4.3.2.2.

3.7. TÉCNICAS SEROLÓGICAS

3.7.1. Inmunofluorescencia indirecta

En nuestro caso, 8 μ l de una suspensión de 10^7 taquizoítos formalinizados/ml, fueron depositados en cada pocillo de un portaobjetos de inmunofluorescencia (Cultek) de 18 pocillos de 4 mm de diámetro. Posteriormente, la preparación se dejó secar al aire, fijándose a continuación con acetona durante 10 minutos a -20°C .

Tras la fijación, se añadió el suero problema, diluido en PBS (10 μ l/pocillo), siendo los portaobjetos incubados 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda. Posteriormente, los pocillos se lavaron dos veces con PBS (10 minutos cada vez) y se añadió la inmunoglobulina antiespecie unida al fluorocromo (isotiocianato de fluoresceína) diluida en PBS-azul de Evans (1:10000), incubándose a 37°C durante media hora en una cámara húmeda. A continuación, los pocillos se lavaron de nuevo con PBS (3 veces durante 10 minutos cada vez) realizándose un último lavado de 10 minutos con agua destilada, tras el cual se secaron al aire los pocillos y se procedió al montaje del portaobjetos con Fluoprep (Biomerieux) y un cubreobjetos de 24 x 60 mm. Los pocillos fueron examinados con un microscopio de fluorescencia a 40x (Nikon, Lámpara de mercurio modelo HB-10101AF).

En todos los portaobjetos se destinó un pocillo al testigo positivo, uno al testigo negativo y otro al PBS.

3.7.1.1. Detección de IgG anti *N. caninum* en bovinos

Los sueros problema se diluyeron en PBS comenzando por una dilución 1:25 en el caso de animales reproductores y 1:8 en el caso de fluidos corporales fetales, realizándose diluciones seriadas hasta conseguir la última dilución en la cual las muestras dejaron de ser positivas.

El conjugado anti IgG de bovino unido a fluoresceína (Sigma, purificado por afinidad ref. F7887) fue utilizado a una dilución 1:150 en una solución PBS-azul de Evans (1:10000).

Como testigos negativo y positivo se emplearon los descritos en el apartado 3.4.3.1. y 3.4.3.2.2. También se utilizó PBS como testigo de la reacción.

3.7.1.2. Detección de IgG anti *N. caninum* en conejos

Las diluciones de los sueros de los conejos se realizaron en PBS comenzando por una dilución 1:25 y realizándose diluciones seriadas hasta conseguir la última dilución en la cual los sueros dejaron de ser positivos.

El conjugado anti IgG de conejo unido a fluoresceína (Sigma, purificado por afinidad ref. F0382) fue utilizado a una dilución 1:40 en una solución PBS-azul de Evans (1:10000).

Como testigo de la reacción se utilizó PBS.

3.7.2. ELISA

En nuestro estudio se emplearon tres métodos ELISA que utilizan como antígeno extracto soluble de taquizoítos de *N. caninum*. El primero estaba basado en el descrito por Osawa *et al.* (1998) y desarrollado en nuestro laboratorio, y los dos últimos eran pruebas comerciales: Civtest® -desarrollado por la casa comercial Hipra S.A. (Gerona, España) en colaboración con nuestro laboratorio (Rebordosa *et al.*, 2001)- y Herdcheck® [desarrollado por la casa comercial IDEXX S.A. (EE.UU.) (Paré *et al.*, 1995)].

En el desarrollo del primer ELISA se siguió la metodología descrita por Osawa *et al.* (1998) incluyendo ligeras modificaciones. Una vez tapizados los pocillos con el antígeno soluble diluido en tampón carbonato-bicarbonato (pH 9,6) y bloqueados con una solución de PBS-Tween al 0,05% y BSA al 3% se inició la detección de IgGs anti-*N. caninum*.

3.7.2.1. Detección de IgG anti *N. caninum* en bovinos

En el primer ELISA se siguieron las recomendaciones sugeridas en la descripción original (Osawa *et al.*, 1998). En este caso como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo policlonal anti IgG de bovino (Sigma, purificado por afinidad ref. A5295) a una dilución

1:10.000, y como testigos positivo y negativo de la reacción se utilizaron los descritos anteriormente en los apartados 3.4.3.1. y 3.4.3.2.2. En el caso de los dos ELISAs comerciales se siguieron las recomendaciones del fabricante empleándose los reactivos y sueros testigo suministrados en la prueba comercial.

La reacción colorimétrica en cada pocillo se midió utilizando un lector de ELISA (Multiskan RC 6.0, Labsystems) a una longitud de onda de 450 nm en el caso del ELISA de Osawa *et al.* (1998), y de 405 nm y 650 nm en el caso del Civtest® y Herdcheck®, respectivamente. La interpretación de los resultados varió en función del ELISA empleado.

ELISA basado en Osawa *et al.* (1998)

Para la interpretación de los resultados se calculó el porcentaje de positividad (PP).

$$PP = \frac{D.O._{450} \text{ Muestra}}{D.O._{450} \text{ Testigo Positivo}} \times 100$$

Las muestras de suero y líquidos fetales con PP mayores del 30% y del 15%, respectivamente, fueron consideradas positivas.

Herdcheck®

Para la interpretación de los resultados se calculó el índice relativo (cociente S/P)

$$S/P = \frac{D.O._{650} \text{ Muestra} - D.O._{650} \text{ Testigo Negativo}}{D.O._{650} \text{ Testigo Positivo} - D.O._{650} \text{ Testigo Negativo}}$$

Las muestras de suero con cocientes S/P mayores de 0,5 fueron consideradas positivas

Civtest®

Para la interpretación de los resultados se calculó el índice relativo x 100 (IRPC)

$$IRPC = \frac{D.O._{650} \text{ Muestra} - D.O._{650} \text{ Testigo Negativo}}{D.O._{650} \text{ Testigo Positivo} - D.O._{650} \text{ Testigo Negativo}} \times 100$$

Las muestras de suero con valores de IRPC superiores a 5 fueron consideradas positivas

3.7.3. Western blot

Tras la transferencia de las proteínas de *N. caninum* a las membranas de nitrocelulosa, éstas fueron lavadas con TBS-Tween 20 al 0,05% (2 lavados de 5 minutos cada uno) y se bloquearon con una solución TBS-Tween 20 al 0,05%-BSA 3% a 4°C toda la noche. Tras dos lavados de 10 minutos cada uno en TBS-Tween 20 al 0,05%, las membranas fueron incubadas con los sueros problema, diluidos en la solución de bloqueo, a 37°C durante 1 hora. Transcurrida esta primera incubación, se realizaron nuevamente tres lavados con TBS-Tween 20 al 0,05% de 10 minutos cada uno, tras lo cual las membranas fueron nuevamente incubadas a 37°C durante 1 hora con el anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa y diluido en TBS-Tween 20 al 0,05%. Finalmente, las membranas se lavaron dos veces con TBS-Tween 20 al 0,05% y una última vez con TBS, e inmediatamente se incubaron con el sustrato, 4 cloro-1naftol (Bio-Rad), en oscuridad a temperatura ambiente durante unos minutos hasta que se empezaron a visualizar las bandas inmunoreactivas. La reacción fue parada mediante la adición de agua destilada.

En el caso del western blot bidimensional, las incubaciones con los sueros problema y con el anticuerpo secundario se realizaron a temperatura ambiente durante 2 horas y los lavados durante 1,5 horas. Para visualizar las manchas proteicas inmunoreactivas se empleó el sistema de detección por quimioluminiscencia ECL (Amersham Biosciences).

3.7.3.1. Detección de IgG anti *N. caninum* en bovinos

Las condiciones de la técnica fueron las mismas para las membranas en las que se había transferido proteínas solubles de taquizoítos como para las membranas con proteína electroeluída. Los fluidos fetales y el resto de los sueros bovinos fueron utilizados a una dilución 1:10 y 1:25, respectivamente, mientras que en el caso del western blot realizado a partir de geles bidimensionales, los sueros bovinos se emplaron a una dilución 1:500. Se utilizaron dos anticuerpos secundarios anti IgG de bovino conjugados con la enzima

peroxidasa, un anticuerpo policlonal anti IgG de bovino (Sigma, purificado por afinidad ref. A5295) empleado a una dilución 1:10.000 y un anticuerpo monoclonal anti IgG₁ e IgG₂ (clon 9D8-P, Laboratorios L.S.I., Francia) a una dilución 1:200.

Los testigos negativo y positivo correspondieron a los descritos en los apartados 3.4.3.1. y 3.4.3.2.2.

Las imágenes de las bandas detectadas por western blot fueron captadas mediante el empleo de un escáner (*hp* ScanJet 5100C). Para determinar el peso molecular de las proteínas de taquizoítos de *N. caninum* detectadas por los sueros y fluidos fetales positivos se utilizó el software ID Manager 2.0 (TDI)

En el análisis cuantitativo del reconocimiento de la proteína electroeluida se empleó un sistema de análisis de imágenes, el cual incluía un sistema de captación de imágenes (Fluor-STM Multimager, Bio-Rad) y un “software” para el análisis cuantitativo de las imágenes (Quantity One[®] quantitation software, Versión 4 para Windows, Bio-Rad). Mediante un análisis por densitometría se obtenían valores de D.O. que permitían cuantificar la intensidad de reconocimiento de la proteína.

3.7.3.2. Detección de IgG anti *N. caninum* en conejos

Los sueros policlonales de conejo fueron utilizados a una dilución 1:100, y el conjugado anti IgG de conejo (Sigma, ref. A9169) se utilizó a una dilución 1:1000.

3.8. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS PURIFICADOS POR AFINIDAD (APAs)

La obtención de anticuerpos monovalentes purificados por afinidad a partir de un anti suero policlonal bovino o de conejo se llevó a cabo básicamente siguiendo el protocolo descrito por Müller & Felleisen (1995). El objetivo fue la obtención de anticuerpos únicamente dirigidos contra la proteína de 17-18 kDa, los cuales posteriormente fueron utilizados en el cribado de la genoteca de cDNA de *N. caninum* y en la caracterización de la fracción proteica de 17-18 kDa en western blot bidimensionales.

Las proteínas del extracto crudo de taquizoítos de *N. caninum* fueron separadas mediante geles de acrilamida y posteriormente transferidas a membranas de nitrocelulosa siguiendo la metodología previamente descrita en los apartados 3.6.1.1. y 3.6.1.2. de material y métodos, respectivamente. La localización de los antígenos inmunodominantes de interés, debido a su posible aplicación práctica en el desarrollo de pruebas serológicas, fue determinada mediante la realización de un western blot con un suero policlonal de conejo y un suero procedente de una vaca abortada sobre dos tiras de la membrana de nitrocelulosa, las cuales previamente fueron cortadas de los extremos. Estos sueros policlonales contienen anticuerpos frente a los antígenos que constituyen el extracto crudo de taquizoítos. A continuación, se cortó la tira de interés de la membrana de nitrocelulosa que contenía el antígeno de interés y fue enfrentada al suero policlonal. Los anticuerpos monoespecíficos fueron separados de la tira de nitrocelulosa mediante una incubación con un tampón de pH ácido.

3.8.1. Purificación por afinidad de los anticuerpos monoespecíficos

Durante la realización del western blot de las tiras que flanqueaban la membrana de nitrocelulosa con un suero positivo a *N. caninum*, la parte de membrana de nitrocelulosa restante fue conservada a 4°C con TBS-Tween. Una vez reveladas las tiras, estas se colocaron junto a la membrana para localizar y cortar la banda de 17-18 kDa. Esta banda fue bloqueada a temperatura ambiente durante 2 horas con solución de bloqueo TBS-Tween 20 al 0,05%-3% BSA y a continuación se incubó en una solución de TBS-Tween 0,05%-0,3% BSA que contenía en una dilución 1:5 el suero policlonal anti-*N. caninum* durante toda la noche a 4°C en agitación.

Al día siguiente, la tira se lavó 3 veces durante 15 minutos con TBS-Tween 20 al 0,05% y a continuación se colocó en un tubo de 1,5 ml al que se añadió 800 µl de tampón de elución. La tira se incubó durante 5 minutos y mientras tanto cada 20 segundos era agitado y colocado en hielo. Transcurrida la incubación, la tira fue retirada y se añadió inmediatamente 80 µl de Tris 1 M y 90 µl de solución de bloqueo. Finalmente, el tubo fue centrifugado a máxima velocidad durante 20 minutos a 4°C y el sobrenadante que contenía los APAs fue conservado a -20°C hasta su posterior uso.

3.8.2. Comprobación de la eficacia de la obtención de los APAs

Con el objetivo de comprobar la eficacia de la purificación de los APAs, estos fueron utilizados en un inmunoblot en diluciones 1:5, 1:10, 1:20 y 1:40 para determinar la dilución óptima de uso, resultando la dilución 1:10 la de elección tanto para los APAs de origen bovino como para los procedentes del suero policlonal de conejo. El western blot fue realizado siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.7.3.2.

3.9. TÉCNICAS GENÉTICAS

3.9.1. Bacterias y fagos utilizados

3.9.1.1. Cepas bacterianas

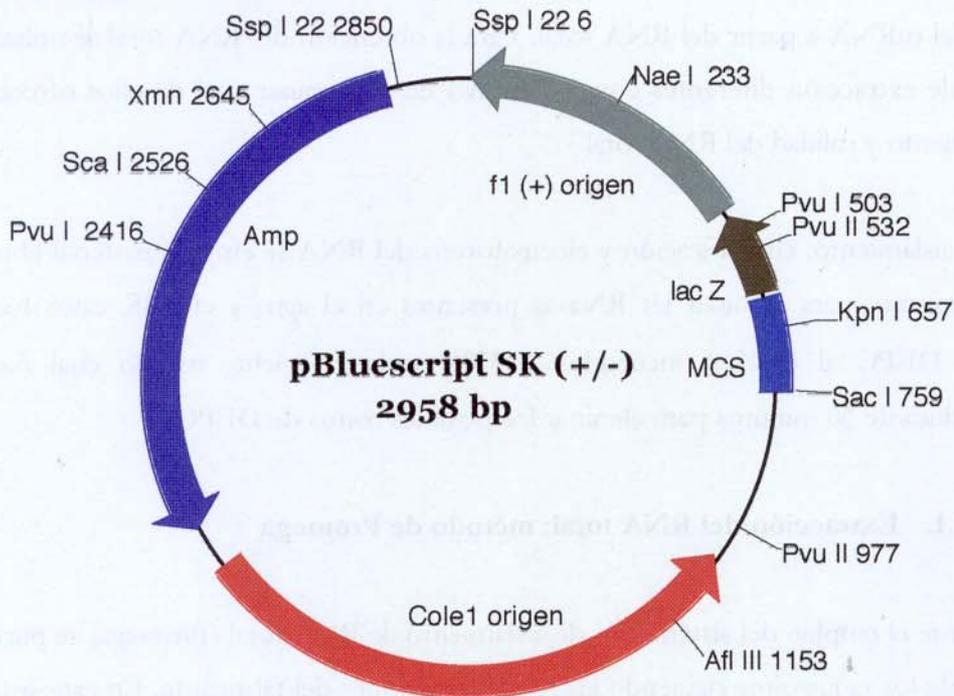
Se utilizó la cepa de *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' (Stratagene; (*mcrA*) 183 Δ (*mcrCB-bsd*SMR-*mrr*) 173*endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* [F' *proAB lacI^l Z Δ M15 Tn10* (Tet^r)] para propagar la genoteca del fago λ . Para su posterior conservación, las células se almacenaron en glicerol al 50% a -80°C.

3.9.1.2. Vectores utilizados

Se empleó el vector de clonación UNI-ZAP XR (λ -ZAP II digerido con las enzimas de restricción EcoRI y Xho) para la construcción de la genoteca. El fago λ -ZAP es capaz de insertar fragmentos de hasta 10 kb y contiene la secuencia del plásmido pBluescript SK® (Fig. 3).

El plásmido pBluescript SK® (-) (Stratagene) contiene el gen *lacZ*, el cual permite la selección de los clones recombinantes. Además, contiene los promotores de transcripción T3 y T7, flanqueando los sitios de inserción.

Figura 3: Mapa físico del plásmido pBluescript®.



Cebador T3
5' AATTAACCCTAACTAAAGGG 3'

Promotor T3 +1 →

5' TTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAAC
3' AATTGGGAGTGATTTCCTTTGTTTTTCGACCTCGAGGTGGCGCCACCGCCGCGGAGATCTTG

|
759

BamHI Pst I EcoRI EcoR Hind III Sal I Xho I

5' TAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGG
3' ATCACCTAGGGGCCCCGACGTCCTAAGCTATAGTTCGAATAGCTATGGCAGCTGGAGCTCC

← **+1 Promotor T3**

5' GGGGGCCCGGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTAC
3' CCCCCGGGCCATGGGTTAAGCGGGATATCACTCAGCATAATG

|
657

Cebador T7
5' CGGGATATCACTCAGCATAATG 3'

3.9.2. Purificación de ácidos nucleicos

Como paso previo a la construcción de la genoteca de cDNA se procedió a la purificación del mRNA a partir del RNA total. Para la obtención del RNA total se utilizaron dos sistemas de extracción diferentes con el objetivo de determinar cual de ellos ofrecía un mayor rendimiento y calidad del RNA total.

En el aislamiento, cuantificación y electroforesis del RNA se empleó material libre de RNasas. Así mismo, para eliminar las RNasas presentes en el agua y el PBS, estos fueron tratados con DEPC al 0,1% e incubados a 37°C toda la noche, tras lo cual fueron autoclavados durante 30 minutos para eliminar los posibles restos de DEPC.

3.9.2.1. Extracción del RNA total: método de Promega

Mediante el empleo del sistema SV de aislamiento de RNA total (Promega) se purificó el RNA total de los taquizoítos siguiendo las recomendaciones del fabricante. En este sistema la inactivación de RNasas endógenas, que se liberan tras la ruptura celular, y la desnaturalización de las proteínas celulares se consigue gracias al empleo de tiocianato de guanidina y β -mercaptoetanol. El RNA total entonces se une selectivamente a la superficie de la resina incluida en una columna de purificación. El posible DNA contaminante es eliminado por incubación con DNasa y, posteriormente, el RNA total se eluye mediante lavados con agua.

3.9.2.2. Extracción del RNA total: método de Tripure®

El reactivo Tripure® (Boehringer Mannheim), el cual contiene fenol y tiocianato de guanidina, permite el aislamiento de RNA total, DNA y proteína a partir de la misma muestra en un único paso mediante la separación de las distintas fases. De este modo, tras incubar la muestra con el reactivo Tripure® y añadir cloroformo se obtienen tres fases bien diferenciadas, una superior que contiene el RNA soluble y una interfase y un sedimento donde

se encuentran el DNA y las proteínas, respectivamente. Una vez que se aísla el RNA soluble, éste se precipita con isopropanol y se lava con etanol 75%.

El aislamiento de RNA total se realizó a partir de taquizoítos conservados a -80°C tras su obtención en cultivo celular y posterior purificación.

3.9.2.3. Cuantificación del RNA

La cuantificación del RNA total extraído se realizó mediante la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm en un espectrofotómetro (Pharmacia-Biotech Mod.Ultrospec 3000 uv/visible spectrofotometer) utilizando una cubeta de cuarzo de 1 ml. Las diluciones del RNA se realizaron siempre en agua DEPC y para calcular la cantidad final de RNA obtenido se aplicó la siguiente fórmula:

$$[\text{RNA}] = (A_{260}) \times (0,04 \mu\text{g}/\mu\text{l}) \times \text{Factor de dilución}$$

Para obtener una medida precisa de la concentración de RNA, el valor de la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm debe ser mayor de 0,05.

3.9.2.4. Purificación del RNA mensajero

El mRNA, que representa entre el 0,5 y 2% del RNA total, fue aislado mediante purificación por afinidad en matrices de oligo dT celulosa utilizando el sistema comercial FastTrack™ 2.0 (Invitrogen). Dicho sistema se basa en la unión de las colas poli (A) presentes en el mRNA a oligo (dT) presente en una matriz de celulosa.

El material de partida fue el RNA total purificado según la metodología anteriormente descrita en los apartados 3.9.2.1. y 3.9.2.2. El RNA total (1 mg) fue resuspendido en 15 ml de solución de lisis. Esta solución se incubó con la matriz de celulosa oligo(dT) durante una hora a temperatura ambiente con movimiento oscilante. Posteriormente, se realizaron varios lavados con una solución de unión hasta la completa desaparición del SDS presente en el medio. Tras un último lavado, el sedimento fue resuspendido en una solución de lavado transfiriéndose la suspensión a la columna de purificación. A continuación, se centrifugó la columna, quedando la celulosa, junto al mRNA, retenida en la columna. Finalmente, el mRNA

fue eluído con agua DEPC, precipitado en presencia de AcNa 0,3M; pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol durante toda la noche a -20°C y conservado a -80°C hasta su utilización para la síntesis del cDNA.

La cuantificación, así como el análisis de la calidad del mRNA se realizó siguiendo la misma metodología descrita en el apartados 3.8.2.3.

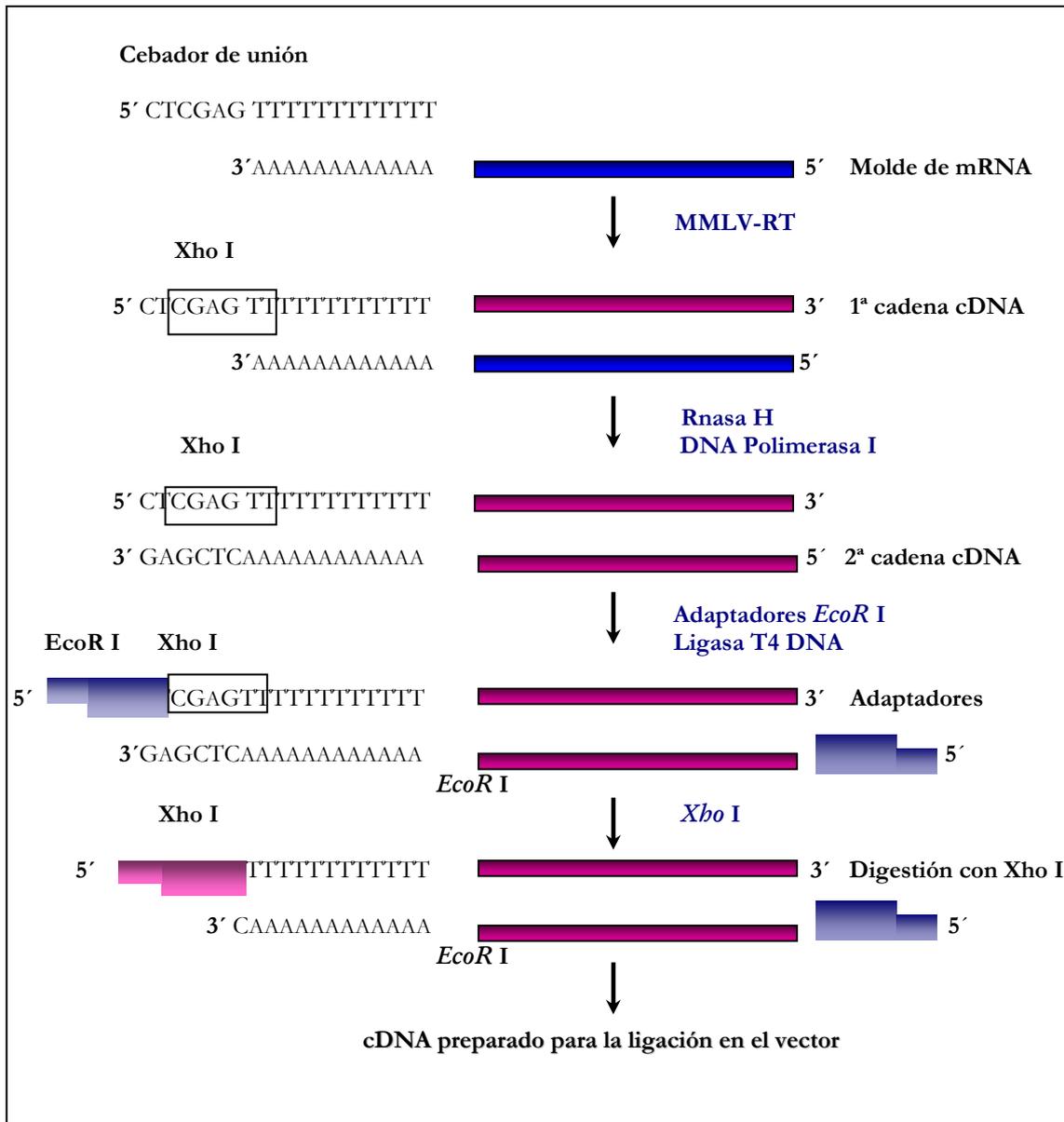
3.9.3. Construcción y análisis de una genoteca de cDNA

Se utilizó el sistema de síntesis del cDNA, ZAP-cDNA® y clonaje Gigapack® III Gold ZAP-cDNA® (Stratagene) para la construcción de una genoteca direccional de cDNA a partir de mRNA de taquizoítos del aislado NC-1 de *N. caninum*.

3.9.3.1. Síntesis del cDNA

La síntesis de DNA complementario (Fig. 4) a partir del mRNA obtenido en el apartado 3.9.2.5. comenzó con la adición de la enzima transcriptasa inversa (MMLV-RT) (Stratagene) de manera que utilizó el mRNA como molde para la síntesis de la primera cadena de DNA, y ésta a su vez sirvió como molde para la síntesis de la segunda cadena de DNA (Fig. 4).

Figura 4: Esquema general de la síntesis de cDNA para su clonaje en el vector λ -ZAP.



3.9.3.2. Creación de extremos cohesivos en el cDNA: adaptación y digestión con enzimas de restricción.

El último paso en la síntesis del cDNA consiste en añadir a los extremos del cDNA, mediante un cebador en la síntesis de la primera cadena, un adaptador *EcoR I* que está

fosforilado en su extremo 5'. De esta forma, los sitios de restricción Xho I y EcoR I permiten el clonaje direccional de los fragmentos de cDNA en el vector.

Una vez obtenido el cDNA de doble cadena, se usó la DNA polimerasa *Pfu* para asegurar la presencia de los extremos romos. Tras este paso, se precipitó el cDNA y se ligaron los adaptadores EcoR I a los extremos del cDNA gracias a la enzima DNA ligasa T4. Tras inactivar la ligasa, los extremos 5' que contenían el sitio de restricción EcoR I se fosforilaron con la enzima polinucleótido kinasa T4 para permitir la posterior ligación del cDNA al vector de clonación. Para finalizar, el cDNA fue digerido con la enzima de restricción Xho I, que actuó en el lugar de restricción presente en el cebador de unión del extremo 5' de la primera cadena del cDNA, con la finalidad de eliminar el adaptador EcoR I junto con el cebador de unión del extremo 3' del cDNA. Finalmente, el cDNA se precipitó y fue resuspendido en tampón STE 1x..

3.9.3.3. Fraccionamiento y cuantificación del cDNA

La presencia de una elevada concentración de los adaptadores en el cDNA puede ser un impedimento para la ligación del cDNA con el vector y, adicionalmente, puede ocasionar una contaminación de la genoteca con clones aparentemente vacíos. El fraccionamiento del cDNA por su tamaño molecular también reduce la presencia de insertos del cDNA con tamaño inferior a 400 pb que podrían predominar en la genoteca.

Para eliminar fragmentos de cDNA de bajo peso molecular junto con el adaptador EcoR I y el cebador de unión, eliminados tras la digestión con la enzima de restricción Xho I, se utilizó una columna de fraccionamiento (SizeSep™ 400 Spum Columns; Amersham Pharmacia Biotech con Sepharosa™ CL-4B), paso previo al clonaje del cDNA en el vector.

El protocolo comenzó con el equilibrado de la columna con 8 ml de tampón STE suplementado por el “kit” de síntesis del cDNA. La columna equilibrada fue colocada en el interior de un tubo de centrifuga de 30 ml y fue centrifugada a 400 x *g* durante 2 minutos para conseguir la compactación de la Sepharosa™ CL-4B. La muestra de cDNA fue colocada en el centro de la superficie lisa de la columna y se colocó un tubo de 1,5 ml en el fondo del tubo de 30 ml orientando el extremo inferior de la columna en el interior del tubo de 1,5 ml. La columna fue de nuevo centrifugada en las mismas condiciones y el cDNA eluído fue

precipitado con etanol al 100%. Finalmente, el sedimento resultante fue lavado con 200 μ l de etanol al 80%. Antes de ligar el cDNA al vector, fue necesario realizar una cuantificación previa del cDNA, ya que los mejores resultados se obtienen ligando 100 ng de cDNA por cada 1 μ g de vector.

La cuantificación del cDNA se llevó a cabo en una placa de agarosa que contenía bromuro de etidio, sobre la cual se depositó tanto la muestra problema de cDNA como concentraciones conocidas de DNA. Se preparó un gel de agarosa al 0,8% en tampón TAE y se añadió bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 ng/ml. Una vez mezclada la solución, ésta fue depositada en una placa petri de plástico de 90 mm. Una vez que solidificó la agarosa se depositó en su superficie 0,5 μ l de la muestra problema y el mismo volumen de una serie de diluciones dobles decrecientes del control de DNA (desde 500 ng hasta 0,0075 ng). Como control de DNA se utilizó un marcador de peso molecular de DNA (1 Kb, Invitrogen), cuya concentración inicial de DNA era de 1 μ g/ μ l. Finalmente, se comparó la intensidad de señal de nuestra muestra problema de cDNA con respecto a las diferentes diluciones del DNA control mediante el sistema de captación de imágenes Gel Printer (TDI) con luz ultravioleta.

3.9.3.4. Ligación del cDNA en el vector de inserción Uni-Zap XR

Siguiendo las indicaciones del fabricante, se añadió a la reacción de ligación 100 ng del cDNA resuspendido, y la reacción se mantuvo dos días a 4°C.

3.9.3.5. Empaquetamiento de la genoteca de cDNA

Se añadió 1-4 μ l del DNA (0,1-1,0 ng de DNA ligado) al extracto de empaquetamiento, y una vez mezclado el contenido se incubó la muestra durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió a cada tubo 500 μ l de tampón SM y 20 μ l de cloroformo, se eliminaron los restos celulares mediante una breve centrifugación y se almacenó el sobrenadante que contenía el fago a 4°C hasta su posterior titulación.

3.9.3.6. Titulación y amplificación de la genoteca primaria

Una vez preparadas las correspondientes bacterias, se añadió 1 µl del fago λ a 200 µl de las bacterias diluidas en MgSO₄ 10mM y 1 µl de una dilución 1:10 del fago en tampón SM a 200 µl de las bacterias. El fago con las bacterias fue incubado a 37°C durante 15 minutos. A continuación se añadieron 2-3 ml de agar NZY top (licuado y enfriado a 48 °C), 15 µl de IPTG 0,5 M y 50 µl de X-gal (250 mg/ml DMF) y se depositó en placas de agar NZY de 90 mm. A continuación las placas fueron incubadas a 37°C toda la noche, tras lo cual se realizó el recuento de las placas de lisis recombinantes y no recombinantes en función del color.

La amplificación de la genoteca primaria se realizó inmediatamente para conseguir una genoteca estable con un título elevado, ya que las genotecas primarias pueden ser inestables.

Se prepararon las bacterias, de tal forma que una colonia fue inoculada en 10 ml del medio líquido LB (Apéndice F) con tetraciclina, maltosa al 0,2% y MgSO₄ 10 mM y se dejó crecer a 37°C en agitación durante 4-6 horas hasta que se alcanzó una D.O.₆₀₀ de 1,0. Finalmente, las células fueron centrifugadas a 500 x g durante 10 minutos y el sedimento celular fue resuspendido en MgSO₄ 10 mM hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0,5. A continuación se añadió a cada tubo 5x10⁴ ufp de bacteriófago y 600 µl de bacterias con una D.O.₆₀₀ de 0,5, y los tubos fueron incubados a 37°C durante 15 minutos. En este caso se utilizaron placas petri de 150 mm, por lo que se añadió 6,5 ml de agar NZY top a cada tubo y el contenido total se vertió en placas de agar NZY de 150 mm. Tras 6-8 horas de incubación de las placas a 37°C se empezaron a visualizar las placas de lisis y cada placa se cubrió con 8-10 ml de tampón SM y fue guardada a 4°C toda la noche en agitación lenta.

Al día siguiente, el fago en suspensión de cada placa fue recogido en tubos estériles y las placas se lavaron con un volumen adicional de 2 ml de tampón SM. Se añadió cloroformo a una concentración final del 5% y se incubaron los tubos a temperatura ambiente. Finalmente los restos celulares fueron eliminados tras una centrifugación a 500 x g durante 10 minutos, y al sobrenadante que contenía el fago se añadió cloroformo a una concentración final del 0,3%. La genoteca fue guardada en alícuotas, una parte fue conservada a 4°C mientras que el resto de la genoteca se conservó en DMSO al 7% a -80°C.

La genoteca amplificada fue titulada de nuevo tal y como se ha descrito anteriormente, realizando diluciones decimales del fago desde 1:10.000 hasta 1:1.000.000.

3.9.4. Cribado de la genoteca con anticuerpos

El cribado de la genoteca se realizó con los APAs frente a la fracción de 17-18 kDa, cuya obtención se ha descrito previamente en el apartado 3.8.

3.9.4.1. Identificación y purificación de los clones de interés

La identificación de los clones que inducen la expresión de las proteínas de interés, fue realizada en varias etapas. Normalmente, un único cribado de la genoteca no es suficiente para aislar y purificar clones recombinantes de fagos individuales y, por consiguiente, son necesarios cribados posteriores.

El protocolo comienza con la preparación de las bacterias de la cepa XL1 Blue MRF⁺ tal y como se ha descrito en el apartado 3.8.1.1.2. y, a continuación, se realizó un procedimiento similar al descrito en el apartado 3.8.3.6. Se emplearon 20 placas de NZY agar, y para cada una se incubaron 600 μ l de bacterias con 300 u.f.p. del fago. Finalmente, las placas fueron incubadas a 42°C durante 4 horas con el objetivo de obtener las placas de lisis sobre las cuales realizar el cribado. A continuación, se realizó la transferencia de los clones a las membranas de nitrocelulosa de 0,45 μ m de poro y 132 mm de diámetro (Millipore) preincubadas en IPTG 10 mM a 37°C durante 3,5 horas. Las membranas fueron marcadas con una aguja para poder orientarlas correctamente. Transcurrida la incubación las placas fueron guardadas a 4°C y las membranas fueron lavadas con TBS-Tween 20 al 0,05% y bloqueadas con TBS-Tween 20 (0,05%) BSA 3% toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizó la inmunodetección de los clones sobre las membranas siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.7.3.2.

Una vez reveladas las membranas las colonias positivas fueron localizadas en las placas mediante las marcas de las membranas y colocando estas en el reverso de las placas. Las colonias positivas fueron aisladas recogiendo la placa de lisis con una punta de micropipeta de 200 μ l y fueron conservadas en 500 μ l de tampón SM a 4°C al que se añadió dos gotas de cloroformo.

Fue necesario la realización de un segundo cribado de la genoteca para aislar un clon puro con mayor facilidad, siguiendo la metodología descrita en el apartado anterior. En esta ocasión las placas utilizadas fueron de 90 mm y las membranas de nitrocelulosa de 82 mm de diámetro (Millipore) y antes del cribado fue necesario realizar una titulación del fago con diluciones 1:10, tal y como se ha descrito en el apartado 3.8.3.6. En este segundo cribado se colocaron de 100-200 u.f.p. por placa.

3.9.5. Amplificación del DNA por la técnica de PCR

Para amplificar el cDNA se utilizaron dos parejas de cebadores diferentes -NcSUL1-NcSUL2 y NcSUL3-NcSUL4 (Pharmacia, Biotech)-(Tabla X). En este caso el cDNA (5 µl) fue precipitado con 1 ml de etanol al 75% a una velocidad de 13000 x g durante 10 minutos. A continuación el sobrenadante fue eliminado y el cDNA fue resuspendido en 10 µl de agua milliQ estéril. Una vez preparada la muestra de cDNA, se realizaron diferentes diluciones del cDNA (desde 1:10 hasta 1:1.000.000) y el cDNA fue amplificado con las dos parejas de cebadores. Para la reacción de amplificación se partió de una mezcla compuesta por dNTPs 0,2 mM (Sigma), tampón de PCR 10x (Applied Biosystems), MgCl₂ 2mM (Applied Biosystems), 0,4 µM de cada cebador, una unidad de Taq Gold DNA polimerasa (Applied Biosystems) y 5 µl de cada dilución de cDNA o de DNA de taquizoítos -para comprobar que los cebadores no amplificaban DNA genómico- y el volumen final de la reacción se completó con agua milli Q estéril hasta 25 µl finales. Las condiciones de la PCR para ambas parejas de cebadores fueron las siguientes:

Activación de la enzima Taq Gold DNA Polimerasa: 95°C, 10 minutos

Desnaturalización :94°C, 30 segundos

Hibridación de los cebadores: 56°C 30 segundos

Elongación: 72°C, 1 minuto y 30 segundos

Elongación final: 72°C, 5 minutos

} 40 ciclos

El tamaño del fragmento amplificado por la primera pareja de cebadores fue de 209 pb, mientras que el tamaño del fragmento amplificado por la segunda pareja fue de 268 pb.

Como testigo positivo de la PCR se utilizó DNA genómico extraído de 10^5 taquizoítos del aislado NC-1, y como testigo negativo agua milli Q estéril.

Tabla X: Cebadores utilizados en la reacción de PCR.

Amplificación de cDNA	1ª pareja de cebadores	Nc SUL1	5' AACAACTCGGAGAATTCCACC 3'
		Nc SUL2	5' GATCGAGTGCCTTATCCAGG 3'
	2ª pareja de cebadores	Nc SUL3	5' CGTGTTCGTGTTACAGTCTGCTG 3'
		Nc SUL4	5' TAAGTGTGTAGTGGAGCCGC 3'
Amplificación de cDNA del fago	Cebadores universales	T3	5' AATTAACCCTCACTAAAGGG 3'
		T7	5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3'

Para determinar la calidad de la genoteca y amplificar el cDNA de los clones recombinantes positivos tras el cribado de la genoteca con anticuerpos específicos se emplearon dos cebadores universales, T3 y T7 (Tabla X), que amplificaban a partir de la región promotora T3 y de la región promotora T7 del bacteriófago el inserto de cDNA incluido entre estas dos regiones del fago. Previamente se prepararon los clones recombinantes, tal y como se describe en el apartado 3.8.3.6., para poder diferenciar los clones recombinantes y, de esta manera, evitar amplificar clones no recombinantes. Tanto las condiciones de la amplificación como la composición de la mezcla de PCR coincidió con lo anteriormente expuesto para los cebadores NcSUL1-NcSUL2 y NcSUL3-NcSUL4. Cada uno de los clones positivos se añadieron al volumen final de cada reacción. Estos fueron aislados al picar con una punta de micropipeta estéril la placa de lisis positiva del fago directamente en la placa de agar. Como testigo negativo se utilizó agua milli Q estéril.

3.9.6. Electroforesis del RNA y el DNA

Con el objetivo de comprobar la calidad del RNA total, éste fue visualizado en un gel de agarosa al 1%, el cual se preparó en el tampón de electroforesis TBE (Apéndice D) y al que se añadió bromuro de etidio (Sigma) a una concentración de 0,2 µg/ml. En un pocillo se

cargó 8 μ l de RNA total diluido en agua milli Q estéril con 2 μ l de un tampón de carga de DNA 5x, y en el pocillo adyacente se cargó el mismo volumen (10 μ l) de un marcador de peso molecular de DNA (1Kb) (Invitrogen).

La electroforesis se realizó a 6-7 V/cm durante 30-40 minutos y el RNA fue visualizado con luz ultravioleta utilizando el sistema de captación de imágenes Gel Printer (TDI).

Para comprobar la presencia de cDNA, los distintos fragmentos de cDNA y los fragmentos correspondientes a los fagos recombinantes fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% y al 1,5%, respectivamente, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.8.6. El gel se preparó a partir del tampón de electroforesis TBE al que se añadió la agarosa y el bromuro de etidio.

A continuación, se cargaron los pocillos con una mezcla del producto de la amplificación (4:1) y el tampón de carga. Para comprobar el tamaño de los fragmentos amplificados, se utilizó un marcador de peso molecular de DNA (1Kb, Invitrogen). La electroforesis se realizó a 6-7 V/cm hasta que se separaron todas las bandas de DNA, que fueron visualizadas utilizando el sistema de captación de imágenes Gel Printer (TDI).

3.9.7. Secuenciación

Las muestras de DNA que se enviaron a secuenciar fueron productos de amplificación de la PCR obtenidos tras amplificar el cDNA de los clones positivos aislados. Con el objetivo de eliminar los restos de cebadores y de nucleótidos de la reacción de PCR, los cuales podrían interferir en la reacción de secuenciación, se empleó la “prueba” comercial ExoSAP-IT® (USB). Dicha prueba contiene una mezcla de dos enzimas hidrolíticas, la Exonucleasa I y la Shrimp Fosfatasa alcalina, que van a degradar los cebadores y nucleótidos, respectivamente. Como las enzimas son activas en el tampón de la reacción de PCR, se añadió por cada 5 μ l del producto de PCR 2 μ l de la mezcla ExoSAP-IT, y todo ello se incubó a 37°C durante 15 minutos, tras lo cual las enzimas fueron inactivadas mediante una incubación a 80°C durante 15 minutos.

La secuenciación automatizada de las muestras fue realizada por el servicio de secuenciación de la empresa Sistemas Genómicos S.L. de Valencia. La cantidad de DNA necesario para realizar la secuenciación fue de 100 ng, y el aparato empleado para el análisis de la secuencia de ácidos nucleicos fue el ABI Prism 377 (Perkin Elmer), siendo el sistema utilizado para la secuenciación el “ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit v2.0.”.

La secuenciación *N*-terminal de la fracción proteica de 17-18 kDA fue realizada por el servicio de secuenciación del departamento de proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) de Madrid.

3.9.8. Análisis bioinformático de las secuencias

La búsqueda de secuencias homólogas se realizó en las diferentes bases de datos del Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) y de diferentes proyectos de secuenciación de EST, fundamentalmente, de los diferentes parásitos Apicomplexa (<http://www.tigr.org>). También se utilizó el programa de biología molecular DNA Strider v1.0, para comparar secuencias genéticas y aminoacídicas y el programa SignalP v2.0 para predecir la presencia de un péptido señal y de posibles sitios de glicosilación en las proteínas codificadas por las fases de lectura presentes en los cDNAs aislados en la genoteca.

3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para realizar el análisis estadístico de los datos se emplearon los programas informáticos STAT-VIEW v.4.0. (Abacus Concepts, Inc. Berkeley, Ca. USA), STATISTICA v.5.0 (StatSoft Inc.) y SAS v.8.2. En el análisis estadístico descriptivo se establecieron los índices que definen una distribución de datos, mientras que el análisis estadístico analítico incluyó un estudio de homogeneidad de diferentes grupos de valores, así como la determinación de los coeficientes de correlación.

Para establecer los puntos de corte de las diversas técnicas serológicas se utilizaron dos aproximaciones diferentes -la estimación de parámetros y el análisis de las curvas ROC-. En este caso, se emplearon dos programas informáticos, STAT-VIEW v.4.0. Para la estimación de parámetros, y AccuROC para Windows 95/98/NT 2.0. y TG-ROC CMDT para el análisis de

las curvas ROC y la determinación de los puntos de corte. Así mismo, se realizó un estudio del grado de concordancia existente entre las diferentes pruebas serológicas mediante el cálculo del estadístico *kappa* (κ).

3.10.1. Índices que definen la distribución de los datos

En este apartado se determinó el tamaño mínimo estimado para la muestra y se calculó el valor de la mediana, los percentiles y el coeficiente de variación.

El número de muestras necesarias para calcular los puntos de corte en el apartado 4.2.4. fue establecido siguiendo las recomendaciones de Jacobson (1998), para un margen de confianza del 95%, un error del 0,05, y un valor de sensibilidad o especificidad diagnósticas estimadas del 98%, basándonos en el estudio de Osawa *et al.* (1998) donde se obtenía una sensibilidad del 97% y una especificidad del 100%.

En la representación de los datos se consideraron los valores más adecuados cuando se trabaja con pruebas estadísticas no paramétricas, la mediana -como medida de centralización- y los percentiles -como medida de dispersión.

Finalmente, en el apartado 4.2.2. se estimaron los coeficientes de variación, necesarios para evaluar la precisión de las pruebas serológicas empleadas. En el cálculo del coeficiente de variación se considera la media y la desviación típica de la muestra.

$$CV = \frac{\alpha}{M} \times 100 \quad \begin{array}{l} \alpha = \text{desviación típica} \\ M = \text{media} \end{array}$$

3.10.2. Estudio de la homogeneidad

3.10.2.1. Homogeneidad de dos muestras: comparación de dos porcentajes

Para valorar si las diferencias entre dos porcentajes eran significativas se utilizó un análisis de tablas de contingencia. Este estudio se empleó en el apartado 4.2.5.2.

3.10.2.2. Homogeneidad de un conjunto de muestras

En el estudio de la homogeneidad de varias poblaciones en el que se analizaron medidas independientes se aplicaron pruebas no paramétricas, al ser el tamaño de muestra inferior a 30 y no cumplir una distribución normal.

Para comprobar la homogeneidad entre dos grupos de valores se utilizó la prueba no paramétrica *U* de Mann Whitney, que compara la homogeneidad de dos medias. La prueba no paramétrica *H* de Kruskal-Wallis, que es una generalización de la prueba *U* de Mann Whitney se utilizó para comparar, en bloque, la homogeneidad de un conjunto de muestras.

Cuando en el estudio se incluyeron medidas de una variable repetidas en el tiempo correspondientes a un mismo animal, en estos casos se empleó una prueba paramétrica denominada Anova bifactorial de muestras repetidas.

3.10.3. Concordancia entre dos pruebas diagnósticas

El grado de concordancia entre dos pruebas diagnósticas se evaluó mediante el valor κ , un estadístico que nos indica la proporción de concordancia potencial no debida al azar que se produce entre dos pruebas. Para el cálculo de κ es necesario utilizar una tabla de contingencia 2 x 2, en la que se presentan los resultados positivos y negativos de las pruebas diagnósticas. Inicialmente, se calculó la concordancia observada (C.O.) y la concordancia esperada (C.E.) y, a partir de ella, el estadístico κ (Tabla XI).

El estadístico κ puede tomar distintos valores entre -1 (discordancia absoluta) y +1 (concordancia absoluta), pasando por el 0 (concordancia debida exclusivamente al azar). Los valores comprendidos entre 0 y 0,20 se interpretan como concordancia débil; entre 0,20 y 0,40 concordancia escasa; entre 0,40 y 0,60 concordancia moderada y entre 0,80 y 1 concordancia casi perfecta (Thrusfield, 1995).

Tabla XI: Cálculo del valor κ

		PRUEBA 1			
		Positiva	Negativa	Total	
PRUEBA 2	Positiva	a	b	a+b	C.O. = $a + d / n$ C.E. = $[(a + b) / n \times (a + c) / n]$ + $[(c + d) / n \times (b + d) / n]$
	Negativa	c	d	c+d	
	Total	a+c	b+d	a+b+c+d = n	Valor κ = $(CO - CE) / (1 - CE)$

3.10.3. Estimación de los puntos de corte

Los puntos de corte obtenidos en el apartado 4.2.4. fueron estimados mediante dos aproximaciones diferentes: análisis estadístico clásico de estimación de parámetros estableciendo intervalos con un nivel de confianza del 95% y el análisis de las curvas ROC.

El punto de corte expresado en forma de intervalo de confianza se establece mediante la metodología de la estimación de parámetros, de tal forma que el intervalo de confianza queda delimitado por un valor superior (establecido con la población de referencia positiva) y otro inferior (establecido con la población de referencia negativa). Matemáticamente, los sueros de cada grupo con valores de IFI o de ELISA que no estén dentro del intervalo se consideran verdaderos negativos (menores al valor inferior del intervalo) o verdaderos positivos (mayores que el valor superior del intervalo).

El análisis de las curvas ROC mediante el programa AccuROC para Windows 95/98/NT 2.0. ofrece valores de sensibilidad y especificidad diagnósticas para cada uno de los puntos de corte calculados. Por otra parte también permite calcular el área bajo cada curva (AUC) junto el error estandar (SE) y comparar los valores de AUC obtenidos para pruebas diferentes cuando se analizan muestras correlacionas (TG-ROC). De esta manera, se pueden establecer comparaciones respecto a la eficacia de varias pruebas diagnósticas siguiendo una metodología no paramétrica para muestras correlacionadas (DeLong *et al.*, 1988). Por otra parte, el programa TG-ROC CMDT, calcula un único punto de corte (d_0) para el mismo valor de sensibilidad y especificidad diagnósticas (θ_0).

3.10.5. Cálculo de las características diagnósticas de una prueba serológica

Este apartado incluye el cálculo de la sensibilidad y especificidad diagnósticas, junto con el valor predictivo positivo y negativo. También se determinó el valor de prevalencia aparente y verdadera.

Una primera estimación de la sensibilidad y especificidad diagnósticas se realizó de forma simultánea cuando se calcularon los puntos de corte mediante el análisis de las curvas ROC para las distintas poblaciones de referencia. Para el cálculo de la sensibilidad (SnD) y especificidad diagnósticas (EspD) de una prueba en una población diana, realizado en el apartado 4.2.5.2., fue necesario utilizar una tabla de contingencia 2x2. En dicha tabla se presentaron los resultados positivos y negativos de cada prueba diagnóstica y para cada punto de corte, al disponer de una prueba de referencia (Tabla XII).

Tabla XII: Cálculo de las características diagnósticas.

RESULTADOS DE LA PRUEBA A VALIDAR	RESULTADOS DE LA PRUEBA DE REFERENCIA			Total	VP + = $\frac{a}{a+b}$
	Infectada	No infectada			
Positivos	a	b	a+b		
Negativos	c	d	c+d		VP - = $\frac{d}{c+d}$
Total	a+c	b+d	a+b+c+d = n		

$$\text{SnD} = \frac{a}{a+c}$$

$$\text{EspD} = \frac{d}{b+d}$$

Los valores predictivos (PV) fueron calculados teniendo en cuenta el valor de prevalencia estimada en la población diana (prevalencia verdadera) (Jacobson, 1998), la sensibilidad y especificidad diagnósticas, y el tamaño de muestra. En primer lugar se calculó la prevalencia aparente, y la prevalencia verdadera fue calculada recurriendo a la siguiente fórmula:

$$\text{PrVd} = \frac{\text{PrAp} + \text{EspD} - 1}{\text{SnD} + \text{EspD} - 1}$$

PrVd = Prevalencia verdadera estimada
PrAp = Prevalencia aparente

A continuación, se empleó una tabla de contingencia similar a la realizada para el cálculo de sensibilidad y especificidad diagnósticas, determinándose de nuevo los valores de verdaderos positivos (a) y negativos (d), y falsos positivos (b) y negativos (c).

3.10.6. Regresión lineal

Con el objetivo de establecer una correlación entre variables cuantitativas (apartado 4.2.5.3.) se determinó el coeficiente de correlación de Pearson (r), cuyos valores pueden variar entre -1 y +1, y para determinar el grado de asociación se calculó el valor de r^2 . El cálculo del coeficiente de correlación está incluido dentro de un análisis de regresión lineal simple, que nos permite obtener una ecuación de regresión. Para poder obtener la ecuación de regresión, que relaciona las dos variables cuantitativas, es necesario que el coeficiente de correlación además de ser significativo sea alto; y tanto mejor cuanto más próximo sea a +1 ó -1.

**4. VALIDACIÓN DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS
SEROLÓGICAS EN LA NEOSPOROSIS BOVINA:
INFLUENCIA DE LA EDAD Y OBJETIVOS DE LA
TÉCNICA EN LA ELECCIÓN DEL PUNTO DE CORTE**

En la actualidad, el diagnóstico serológico de la neosporosis bovina se realiza, fundamentalmente, mediante las técnicas de IFI y ELISA. A pesar de que estas técnicas presentan una elevada sensibilidad y especificidad, la serología de *Neospora* tiene una serie de limitaciones relacionadas con la falta de normalización de las técnicas entre los diferentes laboratorios y las fluctuaciones de los niveles de anticuerpos que tienen lugar en los animales en función de la edad y de la fase de gestación. La edad fetal y el tiempo transcurrido entre la infección y el aborto son factores determinantes en la serología fetal (Wouda *et al.*, 1997a). En lo que respecta al ganado adulto, se han detectado fluctuaciones de los niveles de anticuerpos específicos relacionadas con la edad del animal y la fase de gestación (Davison *et al.*, 1999a, Pereira-Bueno *et al.*, 2000; Quintanilla-Gozalo *et al.*, 2000). También hay que tener en cuenta que los objetivos de las técnicas serológicas pueden ser diversos, tales como el diagnóstico de la infección en fetos y en el ganado reproductor que recientemente ha abortado, el diagnóstico de la infección en el ganado de reposición previamente a su entrada en el rebaño y la estimación de la prevalencia en estudios epidemiológicos. Puesto que en la actualidad no existe un punto de corte comúnmente aceptado por los diferentes laboratorios para las distintas técnicas serológicas y debido a sus diversas aplicaciones parece necesaria la estimación de diferentes puntos de corte en función del objetivo que se plantee y de la edad del animal.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, esta primera parte del estudio abordó la validación de las dos técnicas serológicas más empleadas, la IFI y el ELISA, investigando la necesidad de utilizar puntos de corte independientes en función de la edad del animal y del propósito de la técnica (aborto o infección). Los sueros de referencia utilizados procedieron de poblaciones definidas mediante una combinación de parámetros epidemiológicos/clínicos (historia de fallo reproductivo debido a la infección por *Neospora* en el rebaño/presencia de aborto), histopatológicos (lesiones compatibles y/o específicas en tejido nervioso de fetos abortados) y serológicos (detección de al menos un antígeno inmunodominante por la técnica de western blot).

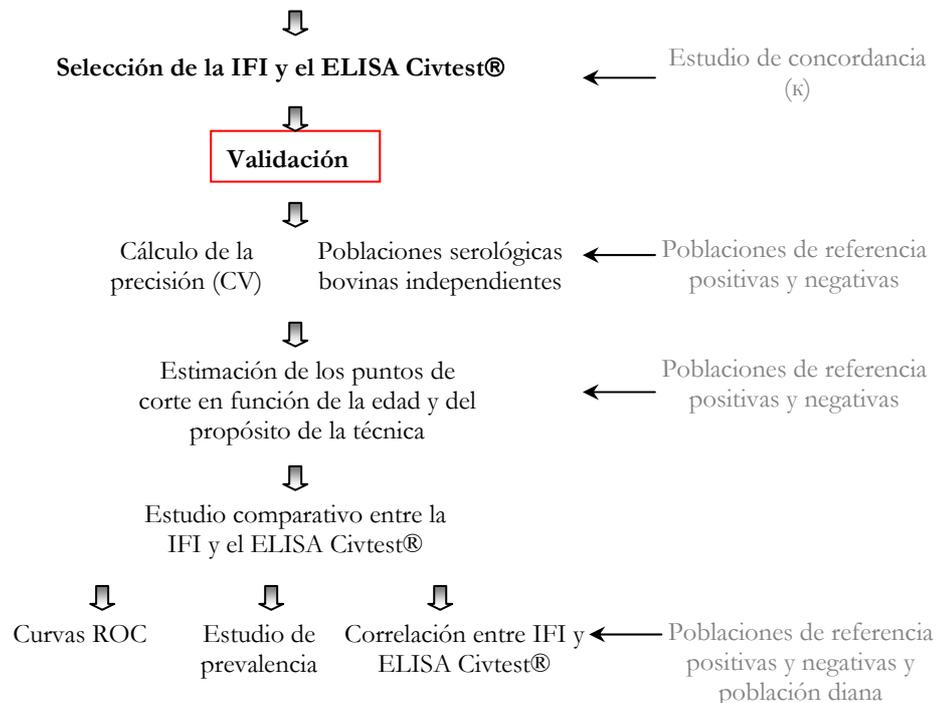
4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

En la estimación de los puntos de corte en función de las diferentes aplicaciones prácticas (Fig. 5) se siguieron siempre las indicaciones de Jacobson (1998) y Greiner & Gardner (2000):

- Desarrollo de una prueba serológica y de una prueba de referencia: descripción del protocolo y del propósito de la técnica.
- Selección de las poblaciones de referencia, incluyendo un número apropiado de animales enfermos.
- Muestreo de la población de referencia: tamaño de la muestra.
- Determinación del punto de corte.
- Presentación de los resultados: análisis ROC, sensibilidad y especificidad diagnósticas y resultados intermedios.
- Estimación de la prevalencia de acuerdo con el valor del punto de corte.

Fig. 5: Esquema del proceso de validación de las técnicas serológicas.

IFI, ELISA Herdcheck®, ELISA Civtest® y ELISA Osawa *et al.* (1998)



4.1.1. Concordancia entre las diferentes técnicas serológicas

La primera parte del estudio comprendió la estimación de la concordancia existente entre la IFI y diversos ELISAs, cuya metodología se detalla en los apartados 3.7.1. y 3.7.2., respectivamente, con el objetivo de seleccionar las dos técnicas que presentaron el valor de κ más elevado para continuar con el proceso de validación.

En esta parte del estudio se incluyó la IFI junto con tres pruebas ELISA comúnmente empleadas en el diagnóstico de la neosporosis: dos pruebas comerciales (Herdcheck® de laboratorios IDEXX y Civtest® de Laboratorios Hipra) y una prueba laboratorial basada en la descrita por Osawa *et al.* (1998).

Se analizaron un total de 53 sueros (positivos $n=22$; negativos $n=27$) de reproductoras (novillas y vacas). El criterio de selección de las muestras, que se explica detalladamente en el apartado 3.4.3.2.4., incluyó una historia de ausencia de fallo reproductivo por *N. caninum* en los rebaños de procedencia en los últimos tres años y una prueba serológica, el western blot. El reconocimiento de al menos una banda inmunodominante del taquizoíto de *N. caninum* fue considerado como resultado positivo.

El grado de concordancia entre dos pruebas diagnósticas se evaluó mediante el cálculo del valor de κ , previamente explicado en el apartado 3.10.3.

4.1.2. Precisión de la IFI y del ELISA (Civtest®)

Se estimó la precisión para ambas pruebas serológicas, que incluyó una medida de repetibilidad y una de reproducibilidad, siguiendo las recomendaciones de Jacobson (1998), tal y como se describe en el apartado 3.10.1.

La precisión de ambas técnicas serológicas fue estudiada mediante el cálculo, siempre por triplicado, de sus respectivos coeficientes de variación para 7 muestras positivas y 7 muestras negativas.

4.1.3. Poblaciones serológicas bovinas independientes

Se investigó la posible independencia, desde el punto de vista serológico, de diferentes grupos de edad. Para ello, se analizaron una población de referencia negativa y otra positiva empleando las técnicas de IFI y ELISA (Civtest®).

La población de referencia negativa estuvo constituida por seis grupos de edad diferentes: fetos abortados, terneros precalostrales, terneros calostrales menores de 6 meses, terneros de entre 7 y 12 meses de edad, novillas de entre 1 y 2 años y vacas mayores de 2 años. De cada una de estas categorías se recogieron 21 muestras procedentes de animales seronegativos.

Las muestras de referencia positivas incluyeron líquidos torácicos o abdominales y sueros de las dos poblaciones bovinas de mayor interés desde el punto de vista clínico y diagnóstico: fetos abortados (n=13) y hembras en edad reproductora (novillas y vacas) que presentaron aborto, confirmado por *Neospora* (n=33).

Para definir las poblaciones de referencia negativa y positiva se consideró como “prueba oro” de referencia un conjunto de criterios para cada una de ellas, anteriormente explicados en los apartados 3.4.3.2.1. y 3.4.3.2.3., respectivamente.

4.1.4. Determinación de los puntos de corte para cada una de las técnicas serológicas

Se procedió a calcular los puntos de corte para cada técnica -IFI y ELISA (Civtest®)- en función del grupo de edad -fetos y hembras reproductoras abortadas- y de la finalidad de la técnica -diagnóstico de la infección en animales recién abortados o en animales asintomáticos- en el caso de hembras reproductoras (novillas y vacas).

Para calcular el punto de corte en el caso de los fetos abortados y de las hembras que presentaron aborto se utilizó como población de referencia positiva (fetos=13; reproductoras n=33) y negativa (fetos n=21; reproductoras n=42) las muestras de ambos grupos de edad descritas en el apartado 4.1.3. Así mismo, en el cálculo del punto de corte para detectar infección en animales que no han abortado se empleó la población de referencia descrita en el

apartado 3.4.3.2.4. y compuesta por 59 sueros (positivos n=22; negativos n=27) de novillas y vacas procedentes de diferentes rebaños sin problemas reproductivos recientes.

Para el cálculo de los puntos de corte se realizaron dos aproximaciones diferentes: la determinación de intervalos con un nivel de confianza del 95%, basados en la teoría clásica de estimación de parámetros y el análisis de las curvas ROC. Ambos abordajes se explican detalladamente en el apartado 3.10.4. En el caso del análisis de las curvas ROC, en un primer paso, los puntos de corte obtenidos fueron seleccionados para una máxima sensibilidad y especificidad diagnósticas. En ausencia de un punto de corte perfecto se estableció un intervalo de resultados dudosos delimitado por los dos posibles puntos de corte (máxima sensibilidad o especificidad). Así mismo, con el objetivo de confirmar el empleo de diferentes puntos de corte en el caso del ELISA Civtest® se estimaron los puntos de corte (d_c) para igual valor de sensibilidad y especificidad diagnósticas (θ_c). Finalmente, se calculó el valor del AUC para cada técnica en función de la edad y del propósito de la técnica junto con el error estándar del AUC (SE_{AUC}), siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.10.4.

4.1.5. Estudio comparativo de la IFI y el ELISA (Civtest®)

En esta parte del estudio se comparó la eficacia diagnóstica de la IFI y el ELISA mediante tres aproximaciones diferentes; la comparación de dos curvas ROC (TG-ROC), el cálculo y comparación de la prevalencia verdadera para cada uno de los puntos de corte obtenidos para la detección de animales infectados y la estimación del coeficiente de correlación entre ambas técnicas serológicas.

El análisis de las curvas ROC se utilizó tanto para determinar los puntos de corte como para calcular y comparar el valor de AUC de ambas técnicas con el objetivo de definir la prueba serológica que presentó una mayor eficacia diagnóstica. Para ello, se compararon las dos curvas ROC obtenidas para la IFI y el ELISA en función de la edad y el propósito de la técnica a partir de las poblaciones de referencia.

El segundo objetivo consistió en estudiar la influencia del punto de corte en los estudios de prevalencia en una población diana (n=372), previamente descrita en el apartado 3.4.3.2.5., evaluando las variaciones que origina el empleo de diferentes puntos de corte en las características diagnósticas de ambas pruebas. En esta parte del estudio se incluyeron los

puntos de corte obtenidos a partir de la población de referencia de animales infectados (n=59) tanto para la IFI como para el ELISA, así como un punto de corte sugerido por Conrad *et al.* (1993b) para la IFI (1:640) y el punto de corte recomendado por el fabricante (Rebordosa *et al.*, 2000) en el caso del ELISA (IRCP>5). Para cada uno de los puntos de corte se volvió a calcular la sensibilidad y especificidad diagnóstica mediante el análisis ROC, así como los valores de prevalencia aparente. Así mismo, se determinaron tanto el valor predictivo positivo (VPP) como el valor predictivo negativo (VPN), a partir de los nuevos valores de sensibilidad y especificidad diagnósticas, como los valores de prevalencia real para cada uno de los puntos de corte. La metodología empleada para el cálculo de las características diagnósticas y la estimación de las tasas de prevalencia se ha explicado previamente en el apartado 3.10.5.

Finalmente, se comparó mediante un análisis estadístico los diferentes valores de prevalencia aparente y real obtenidos. En primer lugar, se compararon los valores de prevalencia real y aparente obtenidos con los diferentes puntos de corte considerados para cada técnica serológica. A continuación, se comparó del mismo modo las tasas de prevalencia correspondientes a la IFI y el ELISA obtenidas tanto para el punto de corte estimado para máxima especificidad como para el calculado para máxima sensibilidad, de acuerdo con la metodología descrita en el apartado 3.10.5.

Finalmente, se realizó un estudio de regresión simple, tal y como se ha descrito en el apartado 3.10.6., con el objetivo de intentar establecer una correlación cuantitativa entre títulos de anticuerpos específicos de IFI y valores de D.O. obtenidos en el ELISA. Dicho estudio se realizó de forma independiente para las muestras de referencia procedentes de los fetos y vacas abortadas, así como para la población diana empleada en el estudio de prevalencia.

4.2. RESULTADOS

4.2.1. Concordancia entre las diferentes técnicas serológicas

Tal y como demuestran los valores de κ recogidos en la Tabla XIII, las dos técnicas que presentaron una mayor concordancia fueron la IFI y el ELISA Civtest® ($\kappa=0,90$). Estas técnicas fueron las seleccionadas para continuar con las restantes partes del estudio. Cuando se comparó el ELISA Herdcheck® con la IFI y el ELISA Civtest® también se obtuvieron valores de κ elevados (0,88 y 0,79, respectivamente). Sin embargo, se obtuvo una concordancia

débil cuando se comparó el ELISA descrito por Osawa *et al.* (1998) con las restantes técnicas serológicas.

Tabla XIII: Concordancia (κ) entre las diferentes técnicas serológicas.

Técnicas serológicas	IFI	Civtest®	Herdcheck®	ELISA Osawa <i>et al.</i> (1998)
IFI		$\kappa=0,90$ C.O.=0,96 C.E.=0,63	$\kappa=0,88$ C.O.=0,96 C.E.=0,67	$\kappa=0,45$ C.O.=0,75 C.E.=0,56
Civtest®	$\kappa=0,90$ C.O.=0,96 C.E.=0,63		$\kappa=0,79$ C.O.=0,92 C.E.=0,55	$\kappa=0,37$ C.O.=0,72 C.E.=0,56
Herdcheck®	$\kappa=0,88$ C.O.=0,96 C.E.=0,67	$\kappa=0,79$ C.O.=0,92 C.E.=0,55		$\kappa=0,35$ C.O.=0,72 C.E.=0,56
ELISA Osawa <i>et al.</i> , 1998	$\kappa=0,45$ C.O.=0,75 C.E.=0,56	$\kappa=0,37$ C.O.=0,72 C.E.=0,56	$\kappa=0,35$ C.O.=0,72 C.E.=0,56	

C.O.: Concordancia observada.

C.E.: Concordancia esperada.

4.2.2. Precisión de la IFI y el ELISA (Civtest®)

Como demuestran los datos de la Tabla XIV, la mayoría de los coeficientes de variación (CV) obtenidos tanto para el ELISA como para la IFI -como medida de la repetibilidad y reproducibilidad de los ensayos- fueron menores del 10%.

Tabla XIV: Precisión del ELISA Civtest® y de la IFI: repetibilidad y reproducibilidad.

n° de muestras	Civtest® (D.O.) #				Título de IFI (log ₂) #			
	Media		% CV*		Media		% CV*	
	a	b	a	b	a	b	a	b
Muestras positivas								
1	1,729	1,618	4,0	6,3	10,23	10,23	5,6	5,6
2	1,741	1,756	1,3	6,6	10,63	10,63	5,4	5,4
3	1,612	1,651	3,3	5,3	9,97	9,30	0,0	6,2
4	0,909	0,898	12,3	2,5	9,30	9,97	6,2	0,0
5	1,718	1,719	3,4	5,7	10,30	9,30	5,6	6,2
6	1,061	1,039	9,4	13,9	10,63	10,63	5,4	5,4
7	2,004	1,907	9,0	5,8	11,97	10,97	0,0	9,1
Muestras negativas								
1	0,115	0,119	1,0	8,6	6,64	6,31	0,0	9,1
2	0,100	0,097	10,2	14,9	6,31	5,98	9,1	9,7
3	0,123	0,125	3,7	5,6	6,64	5,31	0,0	10,9
4	0,129	0,130	5,1	8,0	5,64	4,98	0,0	11,6
5	0,104	0,117	11,5	9,0	5,98	4,98	9,7	11,6
6	0,122	0,130	4,2	8,7	5,98	4,98	9,7	11,6
7	0,134	0,125	6,0	2,0	5,64	4,98	17,7	11,6

Los valores corresponden a la media de tres medidas independientes.

* CV, coeficiente de variación.

^a Valores de la repetibilidad del ensayo.

^b Valores de la reproducibilidad del ensayo.

4.2.3. Poblaciones serológicas bovinas independientes

4.2.3.1. Poblaciones de referencia no infectadas

En una primera aproximación, las seis categorías de edad (fetos abortados, terneros precalostrales, terneros calostrales menores de 6 meses, terneros de entre 7 y 12 meses de edad, novillas de entre 1 y 2 años y vacas mayores de 2 años) fueron comparadas para cada una de las técnicas utilizadas, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas en el caso del ELISA ($H=54,7$; $P=0,0001$). Sin embargo, cuando los títulos de IFI de cada categoría fueron comparados estas diferencias no fueron significativas ($H=6,6$; $P=0,2493$) debido a que en su mayoría no presentaron ningún título de anticuerpos específicos en la IFI empleando como dilución de partida 1:25.

Con el objetivo de definir con exactitud las poblaciones independientes, las diferentes categorías de edad de animales seronegativos fueron comparadas dos a dos (Tabla XV). Los resultados obtenidos en ambas pruebas pusieron de manifiesto la existencia de tres poblaciones serológicas estadísticamente independientes: fetos, terneros precalostrales y una tercera población compuesta por terneros calostrales, terneros mayores de 6 meses, novillas y vacas.

Tabla XV: Comparación de los resultados del ELISA Civtest® obtenidos en las diferentes poblaciones de referencia negativas.

Grupos de edad	Significación estadística * (valor de U de Mann-Whitney)					
	Fetos	Precalostrales	Calostrales	Terneros	Novillas	Vacas
Fetos		0,0041 (126)	0,0001 (27,5)	0,0001 (27,5)	0,0001 (28,5)	0,0001 (24,5)
Precalostrales	0,0041 (126)		0,0095 (117,5)	0,0057 (91)	0,0009 (88,5)	0,007 (80,5)
Calostrales	0,0001 (27,5)	0,0095 (117,5)		0,4217 (160,5)	0,1444 (162,5)	0,0658 (139,5)
Terneros	0,0001 (27,5)	0,0057 (91)	0,4217 (160,5)		0,8879 (194)	0,5292 (201,5)
Novillas	0,0001 (28,5)	0,0009 (88,5)	0,1444 (162,5)	0,8879 (194)		0,6763 (194)
Vacas	0,0001 (24,5)	0,007 (80,5)	0,0658 (139,5)	0,5292 (201,5)	0,6763 (194)	

* Valores de P ; en negrita aparecen señaladas las diferencias significativas

4.2.3.2. Poblaciones de referencia infectadas

Una vez establecidas las diferentes poblaciones bovinas seronegativas estadísticamente independientes y con el objetivo de corroborar su independencia se utilizaron sueros de referencia positivos correspondientes a las dos poblaciones bovinas de mayor interés en la neosporosis bovina: fetos abortados y hembras reproductoras abortadas (novillas y vacas). Una vez analizados los resultados obtenidos en las dos poblaciones de referencia seropositivas, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre ambas poblaciones tanto en la IFI ($P < 0,01$) como en el ELISA ($P < 0,001$) (Tabla XVI).

Tabla XVI: Valores de la IFI y el ELISA Civtest® obtenidos para las diferentes poblaciones de referencia positivas.

		Fetos			Novillas-vacas			P	U
		Mediana	Percentiles		Mediana	Percentiles			
			25%	75%		25%	75%		
IFI *	Negativo	0	0	0	0	0	0	468	0,2755
	Positivo	1:128	1:32	1:500	1:500	1:250	1:1000	114	0,0012
Civtest® **	Negativo	0,077	0,072	0,082	0,111	0,095	0,137	53	0,0001
	Positivo	0,728	0,102	0,907	1,060	0,805	1,642	106,5	0,0008

* Títulos de IFI

** Valores de D.O.

4.2.4. Determinación de los puntos de corte para cada una de las técnicas serológicas

Los puntos de corte calculados mediante la estimación de parámetros y las técnicas ROC para cada técnica, grupo de edad y propósito de la técnica quedan recogidos en la Tabla XVII. Para la IFI y el ELISA se obtuvo un 100% de sensibilidad y especificidad diagnósticas en el caso de las hembras reproductoras abortadas, al igual que para la IFI en el caso de los fetos abortados. Sin embargo, cuando no fue posible obtener un punto de corte perfecto con un 100% de sensibilidad y especificidad, se establecieron dos posibles puntos de corte -uno para máxima sensibilidad y otro para máxima especificidad- de tal forma que el rango de los valores de IFI y ELISA situados entre ambos puntos de corte se consideraron valores dudosos (Fig. 6).

Cuando se estimaron los puntos de corte considerando igual valor de sensibilidad y especificidad, también se obtuvieron diferentes puntos de corte del ELISA Civtest® (d_0) para los diferentes grupos considerados, obteniendo en todos los casos valores de sensibilidad y especificidad (θ) iguales o superiores a 0,9.

Figura 6: Valores de sensibilidad y especificidad obtenidos en el análisis ROC para los diferentes puntos de corte: 1: IFI; 2: Civtest®.

A: Fetos abortados; B: Hembras reproductoras abortadas; C: Hembras reproductoras infectadas.

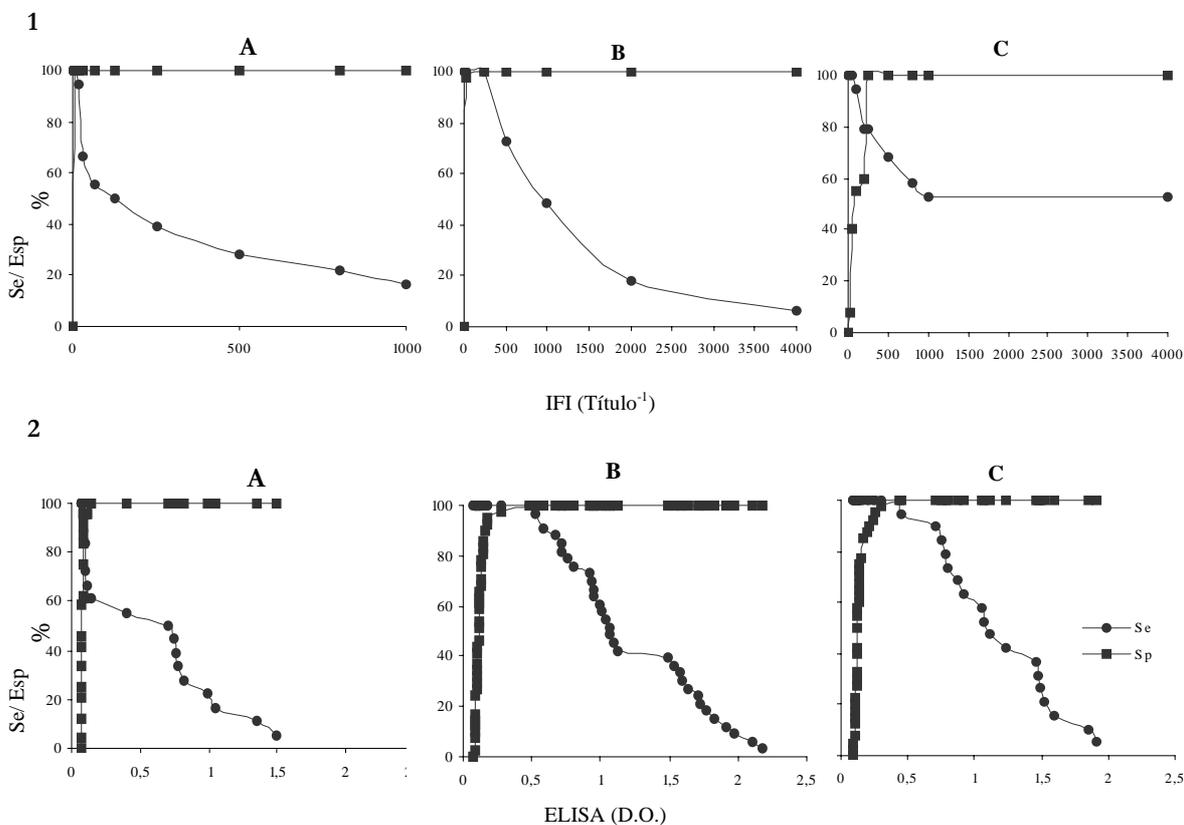


Tabla XVII: Puntos de corte propuestos para la IFI y el ELISA Civtest® en función de la edad y el propósito de la técnica.

		Fetos Abortados	Hembras reproductoras	
			Hembras abortadas	Hembras infectadas
Análisis ROC	IFI *	1:16 ^{a,b}	1:250 ^{a,b}	1:100 ^a 1:250 ^b
	ELISA **	0,098 ^a	0,484 ^{a,b}	0,306 ^a
		0,401 ^b	0,381 ^c	0,451 ^b
0,093 ^c			0,373 ^c	
Estimación de Parámetros ^d	IFI *	0 - 1:64	0 - 1:500	1:64 - 1:400
	ELISA **	0,083 - 0,519	0,131 - 1,033	0,141 - 0,77

^a Puntos de corte obtenidos para 100% de Sensibilidad

^b Puntos de corte obtenidos para 100% de Especificidad

^c Puntos de corte obtenidos para valores de Sensibilidad y Especificidad iguales ($\theta > 0.90$)

^d Intervalos de los puntos de corte definidos por el valor superior de las muestras negativas y por el valor inferior de las muestras positivas calculados para un nivel de confianza del 95%

* Títulos de IFI; ** Valores de D.O.

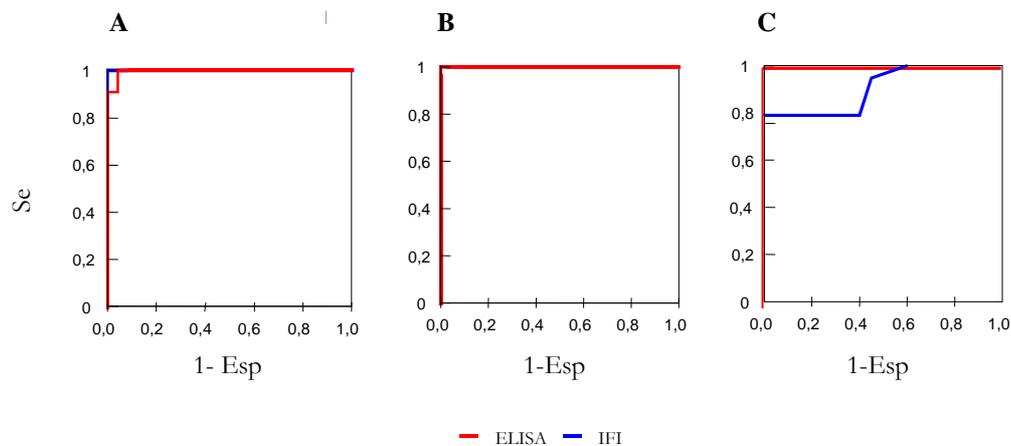
4.2.5. Estudio comparativo de la IFI y el ELISA

4.2.5.1. Comparación de las AUCs

Se obtuvo una eficacia prácticamente similar en el caso de las hembras reproductoras infectadas no abortadas con un AUC de 0,9 y 1 para la IFI y el ELISA, respectivamente. Resultados similares fueron obtenidos para las hembras reproductoras abortadas - $AUC_{IFI}=1$; $AUC_{ELISA}=1$ - y para los fetos abortados ($AUC_{IFI}=1$; $AUC_{ELISA}=0,99$) (Fig. 7). Por otra parte, los correspondientes valores de error estándar fueron siempre inferiores a 0,05. Las diferencias encontradas entre los valores de AUC para cada uno de los casos únicamente fueron estadísticamente significativas en el caso de las hembras reproductoras infectadas ($P<0,05$).

Figura 7: Comparación de dos curvas ROC a partir de muestras correlacionadas correspondientes a la IFI y el ELISA Civtest®.

A: Fetos abortados; B: Hembras reproductoras abortadas; C: Hembras reproductoras infectadas.



4.2.5.2. Estudio de prevalencia en función de los puntos de corte

Los datos correspondientes a las características diagnósticas obtenidas para cada uno de los puntos de corte aparecen recogidos en la Tabla XVIII. Los puntos de corte que presentaron mejores valores diagnósticos de Se, Esp, VPP y VPN correspondieron a los puntos de corte obtenidos en el presente estudio (1:250 para IFI, 0,306 y 0,451 para el ELISA).

Por otra parte, cuando se compararon los valores de prevalencia real correspondientes a los puntos de corte 1:100 y 1:250; y 1:250 y 1:640 de la IFI, se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0,05$). Sin embargo, las diferencias observadas en los valores de prevalencia real obtenidas para los puntos de corte del ELISA no fueron significativas. Se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0,01$) cuando las tasas de prevalencia real correspondientes a los puntos de corte de la IFI y del ELISA calculados para máxima sensibilidad, mientras que para una máxima especificidad las diferencias observadas no fueron significativas ($P > 0,05$).

Tabla XVIII: Características diagnósticas de la IFI y el ELISA Civtest® y valores de prevalencia obtenidos en una población diana en función de los diferentes puntos de corte considerados para el ganado reproductor infectado.

	Puntos de corte	Se	Esp	VPP	VPN	Prevalencia Aparente	Prevalencia Real
IFI (Título)	1:100 ¹	95	55	15,1	99,4	48,9	7,8
	1:250 ²	78,9	100	100	92	23,1	29,2
	1:640 ³	57,8	100	100	92	8,8	16,4
Civtest® (D.O.)	0,306 ¹ (D.O.)	100	97,5	91,3	100	24,7	22,7
	0,451 ² (D.O.)	94,7	100	100	98	23,9	25,2
	5 ³ (IRCP)*	100	85	53	100	27,6	14,8

¹ Punto de corte seleccionado para máxima Sensibilidad

² Punto de corte seleccionado para máxima Especificidad

³ Puntos de corte sugeridos en la bibliografía para la IFI (Conrad *et al.*, 1993) y el ELISA (Rebordosa *et al.*, 2000)

IRCP: Índice relativo x 100

$$* \text{IRCP} = \frac{(\text{D.O.}_{405\text{M}} - \text{D.O.}_{405\text{CN}})}{(\text{D.O.}_{405\text{CP}} - \text{D.O.}_{405\text{CP}})} \times 100$$

M = Muestra
CN = Media del Testigo Negativo
CP = Media del Testigo Positivo

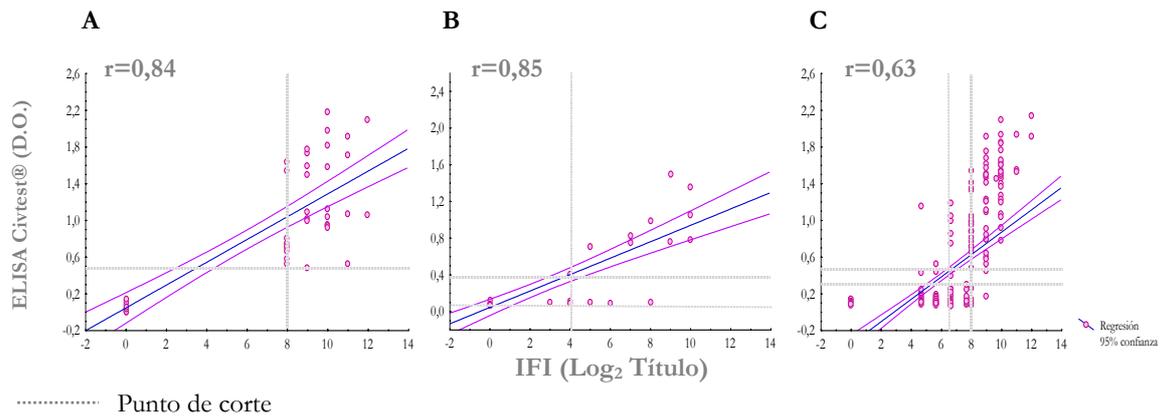
4.2.5.3. Correlación

Se intentó establecer una correlación entre los títulos de IFI y los valores de D.O. del ELISA, ya que presentaron una eficacia diagnóstica similar (valor de concordancia casi perfecto y unos valores de sensibilidad y especificidad diagnósticas elevados). Tal y como demuestran los resultados presentados en la Figura 8 el peor dato de correlación se obtuvo en el caso de las vacas infectadas con un valor de r^2 de 0,40. Sin embargo, en el caso de fetos y reproductoras abortadas los resultados fueron mejores, si bien en ambos casos los valores de

r^2 (0,70 y 0,71, respectivamente) están todavía alejados del valor máximo de correlación (1). En los tres casos el análisis de regresión simple fue estadísticamente significativo ($P < 0,05$).

Figura 8: Correlación entre títulos de IFI y valores de D.O. del ELISA Civtest® mediante un análisis de regresión simple.

A: Fetos abortados; B: Reproductoras abortadas; C: Reproductoras infectadas



4.3. DISCUSIÓN

Hasta el momento, son escasos los trabajos realizados sobre la comparación y evaluación de las diferentes técnicas serológicas utilizadas habitualmente en el diagnóstico de la neosporosis bovina. De acuerdo con las recomendaciones de Jacobson (1998) y Greiner & Gardner (2000) una adecuada selección de la población de referencia y la estrategia de muestreo son variables que deberían tenerse en cuenta a la hora de realizar la validación de una prueba diagnóstica veterinaria. La sensibilidad y especificidad diagnósticas son parámetros que definen la eficacia de una prueba y podrían estar influenciadas por factores como la fase de la enfermedad y la edad del animal. Hasta el momento, no se ha realizado ningún trabajo que aborde en conjunto las principales limitaciones de la serología en el diagnóstico de la neosporosis bovina.

En el presente estudio, se han validado la IFI y un ELISA indirecto, dos de las técnicas más empleadas para el diagnóstico de la neosporosis bovina, de acuerdo con la propuesta de Jacobson (1998), Greiner & Gardner (2000) y Jenkins *et al.*, (2002). Por consiguiente, el empleo de criterios restrictivos para seleccionar las poblaciones de referencia y la selección de los puntos de corte en función de la edad del animal y de la fase de la enfermedad fueron considerados dos pasos cruciales en el proceso de validación. Para ello, el criterio empleado en

nuestro estudio para definir las poblaciones de referencia incluyó una combinación de parámetros epidemiológicos, clínicos, histopatológicos y medidas serológicas. En este sentido, en anteriores trabajos las poblaciones de referencia fueron establecidas siguiendo, fundamentalmente, tres aproximaciones diferentes: el estado serológico del ternero recién nacido como indicador del estado de la madre al asumir una elevada eficacia de la transmisión vertical (Davison *et al.*, 1999d), la utilización simultánea de dos técnicas serológicas para confirmar el estado del animal (Schaes *et al.*, 1999a) y el empleo de la IFI como “prueba oro” (Björkman & Uggla, 1999; Reichel & Pfeiffer, 2002). En nuestra opinión, la primera aproximación partiría de un supuesto erróneo, basándonos en los datos obtenidos tanto en infecciones naturales como experimentales. En condiciones naturales en algunos rebaños congénitamente infectados no se ha observado una eficiencia de transmisión vertical tan elevada -desde el 48% (Pereira-Bueno *et al.*, 2000) al 95% (Davison *et al.*, 1999c)-, habiéndose observado también que en los animales infectados experimentalmente antes de la gestación y que presentan títulos de anticuerpos específicos elevados durante la gestación, no se transmite la infección a sus descendientes (Innes *et al.*, 2001b). Por otra parte, el uso exclusivo de la IFI como técnica de referencia no aporta la precisión necesaria en un estudio de validación, ya que no existe un consenso entre los diferentes laboratorios acerca del punto de corte que debe aplicarse tanto en fetos como en adultos. En los bovinos adultos, normalmente los títulos de IFI más empleados han correspondido a 1:25 (Conrad *et al.*, 1993b) y entre 1:160 y 1:640 (Björkman & Uggla, 1999; Schaes *et al.*, 1998), mientras que en la serología fetal se han utilizado títulos entre 1:25 y 1:80 (Barr *et al.*, 1995; Buxton *et al.*, 1997; Wouda *et al.*, 1997a). Además, la prueba de IFI a veces da lugar a reacciones inespecíficas o reacciones positivas dudosas, al contrario que el western blot, prueba más específica que permite un diagnóstico serológico inequívoco incluso en aquellos casos problemáticos por la técnica de IFI. Además, en el caso de la serología fetal, la técnica de western blot demostró ser mas sensible y específica que la IFI en comparación con otras técnicas comúnmente empleadas en el diagnóstico de la neosporosis bovina en fetos, como la histología, inmunohistoquímica, serología maternal y la PCR (Söndgen *et al.*, 2001).

Uno de los factores biológicos más importantes que podrían afectar la distribución de los valores de la prueba, así como la sensibilidad y especificidad diagnósticas, es la edad del animal (Greiner & Gardner, 2000). Los fetos bovinos son capaces de desarrollar una respuesta inmune de base humoral a partir de los 4-5 meses de gestación (Osburn, 1988). Por otra parte, los títulos de anticuerpos específicos que se han detectado en terneros de 7 a 12 meses de edad

y en novillas (Pereira-Bueno *et al.*, 2000) o la seroprevalencia observada en novillas de 13 a 24 meses (Davison *et al.*, 1999a) es inferior que en otros grupos de edad, hecho probablemente relacionado con el descenso de los anticuerpos en el ganado congénitamente infectado que no presenta recrudescencia de la infección (Williams *et al.*, 2000).

Nuestros resultados justifican el estudio de diferentes grupos de edad y confirman, por una parte, la homogeneidad de la población de ganado reproductor compuesta por novillas y vacas y, por otra, la utilización de diferentes puntos de corte en función del grupo de edad analizado (fetos y el ganado reproductor). Los resultados obtenidos en el análisis de la población de referencia negativa también sugieren la existencia de un tercer grupo de edad independiente, los terneros precalostrales. Se ha sugerido el análisis serológico de muestras de sangre precalostrales para evaluar la presencia de terneros congénitamente infectados (Thurmond & Hietala, 1995) por lo que sería interesante la confirmación de estos resultados mediante el análisis de un número significativo de muestras positivas dentro de este apartado.

En relación al empleo de las técnicas serológicas, mientras que la mayoría de los autores han realizado una estimación de los puntos de corte, Thurmond *et al.* (2002) han propuesto, recientemente, un método para determinar la probabilidad de que un animal esté o no infectado basándose en el teorema de Bayes y considerando la prevalencia de la infección en el rebaño. A pesar de la indudable validez de este modelo teórico, la determinación de los puntos de corte en la serología de cualquier enfermedad presenta una mayor utilidad práctica a la hora de realizar el diagnóstico serológico. Por ello, en el presente estudio se presenta un abordaje más práctico empleando una metodología novedosa y de actualidad en el diagnóstico serológico de la neosporosis bovina. De este modo se siguieron dos posibles aproximaciones en el cálculo de los puntos de corte para clasificar a los animales en positivos o negativos: una metodología estadística clásica -la estimación de los intervalos de confianza- y un análisis más novedoso y que ofrece valores diagnósticos de gran utilidad (el análisis de las curvas ROC). Ambos abordajes fueron empleados para las dos principales poblaciones bovinas independientes definidas en este estudio: fetos y reproductoras, y para los diferentes propósitos de la técnica. Los amplios intervalos de confianza obtenidos para ambas pusieron de manifiesto las dificultades que existen para establecer el punto de corte en la infección por *Neospora* empleando la metodología estadística clásica. Por consiguiente, en un segundo paso se empleó el análisis de las curvas ROC combinado con la teoría de decisiones basada en la utilidad de la técnica. Esta aproximación permite obtener puntos de corte más precisos para

los valores deseados de sensibilidad y especificidad de acuerdo con las diferentes aplicaciones prácticas de la técnica. En el caso concreto de la neosporosis bovina, Reichel & Pfeiffer (2002) han sugerido el empleo del análisis ROC para calcular los puntos de corte del Herdcheck®, los cuales se podrían ajustar dependiendo del propósito de la investigación. Los puntos de corte obtenidos para los fetos y el ganado reproductor que ha abortado debido a la infección por *Neospora* aportan una mayor precisión a las técnicas serológicas utilizadas en el diagnóstico del agente etiológico del aborto, ya que los puntos de corte para ambas técnicas estudiadas fueron obtenidos siguiendo el mismo criterio y utilizando un panel de sueros de referencia bien caracterizados. En este sentido, mientras que los puntos de corte obtenidos para las hembras reproductoras con infección que han abortado o no, se encuentran dentro del rango de puntos de corte empleados por otros autores, en el caso de los puntos de corte de la IFI obtenidos para los fetos discrepan con algunos resultados obtenidos por otros autores. La mayoría de los autores sugieren puntos de corte superiores a 1:25. En concreto, los resultados obtenidos por Atkinson *et al.* (2000a), donde se compara la IFI y el western blot se considera la IFI como la técnica de referencia y sugieren como punto de corte más razonable en fetos un título de IFI de 1:60. Sin embargo, nuestros resultados de serología fetal coinciden en gran medida con los obtenidos en el trabajo realizado por Slotvet *et al.* (1999). En dicho trabajo se sugiere el empleo de un punto de corte de IFI de 1:20 para el diagnóstico de la infección por *N. caninum* en fetos mayores de 4,5 meses.

En ambos casos, los puntos de corte de IFI obtenidos tanto para una máxima sensibilidad como para una máxima especificidad fueron inferiores a los descritos por los diversos autores, lo cual no supuso un aumento del número de falsos positivos. Por otra parte, los valores de los puntos de corte fueron mayores en el caso de las hembras que han abortado debido a la infección por *Neospora* que en el grupo de reproductoras infectadas, datos que coinciden con los mayores títulos de anticuerpos obtenidos en el ganado abortado por *Neospora* en comparación con el ganado seropositivo no abortado descrito por Schares *et al.* (1998), en cuyo estudio se sugirió el punto de corte de IFI de 1:200 para vacas que habían abortado debido a una infección por *Neospora* y de 1:50 para diferenciar vacas seronegativas de vacas persistentemente infectadas. Sin embargo, el punto de corte de IFI de 1:50, en nuestro caso, sería demasiado bajo y su empleo no aportaría un aumento de la sensibilidad y supondría una notable disminución de la especificidad y por tanto de la concordancia con el western blot, que es la técnica de referencia empleada por su mayor sensibilidad y especificidad. Por otra parte, los puntos de corte estimados para valores de sensibilidad y especificidad iguales

fueron muy similares a los obtenidos para máxima sensibilidad o máxima especificidad, confirmando la necesidad de emplear diferentes puntos de corte en función de la edad y objetivos de la técnica. Sin embargo, mientras que el punto de corte que establece el programa TG-ROC CMDT para igual valor de sensibilidad y especificidad podría no corresponderse con ninguno de los valores obtenidos en la práctica, el programa AccuROC ofrece valores de sensibilidad y especificidad para cada uno de los puntos de corte obtenidos en el experimento.

Desde un punto de vista práctico y en ausencia de un punto de corte perfecto (máxima sensibilidad y especificidad) la posibilidad de disponer de dos puntos de corte distintos -uno para máxima sensibilidad y otro para máxima especificidad- ofrece diversas opciones de uso de las técnicas serológicas. En el ganado reproductor infectado, el empleo del punto de corte obtenido para máxima sensibilidad es interesante cuando la finalidad de la técnica es investigar el estado serológico de un animal antes de su compra o de su entrada en un rebaño libre de la infección por *Neospora*. Por el contrario, el punto de corte para máxima especificidad puede ser de utilidad cuando la finalidad de la técnica es evaluar la presencia de la infección en una región. Una última posibilidad es asumir un coste equivalente de los falsos positivos y negativos, empleando los dos puntos de corte obtenidos para máxima sensibilidad y especificidad o el punto de corte obtenido para igual sensibilidad y especificidad. Esta decisión implica el uso de una prueba *a posteriori* que confirme los resultados dudosos, la cual podría ser la técnica de western blot basada en el reconocimiento de uno o varios antígenos inmunodominantes por el suero problemático.

La concordancia entre la IFI y el ELISA se ha estudiado previamente mediante el cálculo del valor κ , obteniéndose resultados moderados y buenos en los diferentes estudios. Esta misma metodología junto con el análisis de correlación han sido empleadas para comparar diferentes ELISAs (Dubey *et al.* 1997; Schares *et al.* 1999a), obteniéndose una buena concordancia y unos coeficientes elevados de correlación, respectivamente. En nuestro caso, la eficacia diagnóstica de ambas pruebas serológicas se comparó siguiendo estas dos aproximaciones junto con la comparación de dos curvas ROC y el estudio de prevalencia en una población diana. Si bien los resultados de correlación son aceptables cuando se analizan muestras procedentes de poblaciones de referencia definidas siguiendo múltiples criterios, cuando se analiza una población diana, donde únicamente se conoce el estado serológico de cada animal, el valor de correlación desciende notablemente. El elevado valor de correlación obtenido en el caso de la población de referencia compuesta por fetos abortados coincide con

los resultados obtenidos por Slotvet *et al.* (1999), en cuyo trabajo al aplicarse un punto de corte de IFI similar se obtuvo un valor de correlación elevado entre la IFI y el ELISA. Sin embargo, en el estudio realizado por Dubey *et al.* (1997) se obtuvieron resultados muy similares a los obtenidos en el presente estudio para la población diana, donde al comparar la IFI y cinco ELISAs diferentes hubo un buen grado de concordancia entre las diferentes pruebas, pero una baja correlación entre los títulos de anticuerpos y los valores de D.O. Estos datos reflejan la dificultad que existe para establecer una correcta correlación entre valores de D.O. obtenidos en el ELISA y títulos de anticuerpos detectados por IFI, a pesar de los similares valores de prevalencia y características diagnósticas obtenidos por ambas técnicas.

En nuestro estudio, los resultados obtenidos en la comparación de las curvas ROC sugieren la posibilidad de utilizar la IFI o el ELISA indistintamente. Se ha sugerido la idoneidad del empleo del área bajo la curva ROC para el estudio de la eficacia en conjunto de una prueba. Los elevados valores del AUC obtenidos son un indicador de la buena clasificación de positivos y negativos, hecho confirmado por los resultados obtenidos en el estudio realizado en una población diana con valores predictivos positivo y negativo y valores de prevalencia real similares para los puntos de corte 1:250 en el caso de la IFI y 0,306 o 0,451 en el caso del ELISA. Sin embargo, cuando se necesita un incremento de la sensibilidad diagnóstica con la técnica de ELISA se obtienen valores de las características diagnósticas más precisos.

**5. ANTÍGENOS DEL TAQUIZOÍTO DE *N. caninum* CON
IMPORTANCIA PARA EL INMUNODIAGNÓSTICO EN
LA ESPECIE BOVINA**

En esta parte del estudio se realizó un análisis de los antígenos del taquizoíta de *N. caninum* reconocidos por diferentes grupos poblacionales infectados: fetos abortados, reproductoras infectadas abortadas y no abortadas y sementales mediante la técnica de western blot con el objetivo de identificar los antígenos específicos del taquizoíta de *N. caninum* importantes en el inmunodiagnóstico.

En primer lugar, se estudiaron las variaciones en la detección de los antígenos específicos en función de factores dependientes del parásito (aislado de *N. caninum*) y de las condiciones de la técnica de western blot (anticuerpo secundario). En el análisis se incluyó el estudio de tres aislados diferentes de *N. caninum* (NC-1, NC-Liv y NC-SweB1) junto con dos anticuerpos secundarios diferentes, uno monoclonal (anti-IgG₁ e IgG₂ bovino) y otro policlonal (anti-IgG bovino).

Una vez optimizados estos parámetros, se compararon los patrones de reconocimiento obtenidos en los tres grupos de animales analizados. Para ello, se determinaron los antígenos inmunodominantes (IDAs) de *N. caninum* y se estudió la relación existente entre los títulos de anticuerpos específicos y el número e intensidad de los antígenos de *Neospora* identificados por western blot. El estudio se completó con el análisis de las diferencias del reconocimiento de antígenos existentes entre las diferentes poblaciones bovinas consideradas.

Finalmente, se caracterizaron los antígenos reconocidos a lo largo de la gestación por dos grupos de reproductoras infectadas: vacas abortadas y no abortadas, analizándose las variaciones intragrupo e intergrupo.

5.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1.1. Influencia del aislado y del anticuerpo secundario en el patrón de reconocimiento de los antígenos del taquizoíta

Se comparó el patrón de reconocimiento de los antígenos de tres aislados diferentes de *N. caninum*: NC-1, NC-Liv y NC-SweB1. Para ello se enfrentó un suero procedente de una vaca seropositiva con infección natural (con un título de anticuerpos específicos por IFI > 1:500) a la misma cantidad de antígeno soluble de cada uno de los tres aislados, separado mediante electroforesis en condiciones reductoras y no reductoras.

Para estudiar la variabilidad del reconocimiento antigénico en función del anticuerpo secundario, se probaron dos diferentes conjugados con la enzima peroxidasa: un monoclonal anti-IgG₁ e IgG₂ bovino (anti-IgG₁ e IgG₂; clon 9D8-P, Laboratorios L.S.I., Francia) y un policlonal anti-IgG bovino (Sigma). En ambos casos, se utilizó un suero procedente de una vaca seropositiva con infección natural y con un título de IFI > 1:500.

En ambos casos, se analizó tanto el número de bandas específicas detectadas como los IDAs.

5.1.2. Identificación de los antígenos del taquizoíta reconocidos por distintos grupos poblacionales de bovinos infectados por *N. caninum*

Con el objetivo de identificar los antígenos reconocidos por animales con infección natural por *N. caninum* se analizaron muestras procedentes de tres grupos poblacionales, que incluyeron fluidos torácicos o abdominales de fetos abortados (n=13), sueros de reproductoras abortadas (n=33) y sueros de sementales (n=31). Como testigos negativos, se utilizaron 8 fluidos fetales recogidos de fetos abortados por otras causas diferentes a la infección por *Neospora* y 16 sueros de vacas procedentes de rebaños seronegativos a la infección por *Neospora* y sin una historia previa de fallo reproductivo durante los últimos tres años, los cuales no reconocieron ningún antígeno específico de *N. caninum*. Los criterios que se tuvieron en cuenta para la selección de las muestras correspondientes a las diferentes poblaciones se han mencionado previamente en los apartados 3.4.3.2.1, 3.4.3.2.3. y 3.4.3.2.6., respectivamente y todas las muestras se analizaron por las técnicas de IFI y western blot. Previo al análisis por western blot, se comprobó la presencia de títulos de anticuerpos iguales o superiores a 1:16, en el caso de los fetos, e iguales o superiores a 1:250, en el caso de las reproductoras y sementales.

En primer lugar, se analizó el número total de antígenos de *Neospora*, así como sus IDAs. A continuación, se buscaron posibles diferencias en cuanto al número total de antígenos reconocidos, número de IDAs y frecuencia e intensidad de reconocimiento entre fetos, vacas abortadas y sementales. En el análisis correspondiente a las muestras fetales se tuvo en cuenta la edad fetal. Para el procesamiento estadístico de los datos, las proteínas analizadas fueron clasificadas según su intensidad y frecuencia de reconocimiento estableciéndose tres categorías de intensidad de reconocimiento

-baja, moderada y alta- y a cada una de estas categorías se le dio un valor numérico (1, 2 o 3, respectivamente).

Para completar esta parte del estudio se comparó el título de anticuerpos con el número de bandas identificadas y se consideraron las tres poblaciones bovinas: fetos, reproductoras abortadas y sementales. En el caso de los fetos se consideró la edad fetal. Para llevar a cabo dicha comparación, los títulos de IFI se dividieron en dos categorías, que en el caso de los fetos abortados correspondieron a títulos de IFI iguales o superiores a 1:128 (n=6) y títulos menores a 1:128 (n=7), mientras que en el caso de las reproductoras y los sementales correspondieron a títulos menores de 1:500 (n=9 y n=24, respectivamente) y mayores o iguales a 1:500 (n=24 y n=7, respectivamente). Una vez establecidas dichas categorías, cada una de ellas fue comparada con el número de IDAs, la intensidad de reconocimiento de cada uno de ellos y el número de antígenos totales reconocidos.

5.1.3. Variaciones en los antígenos del taquizoíta reconocidos a lo largo de la gestación por vacas abortadas y no abortadas con infección natural

La cinética de reconocimiento antigénico a lo largo de la gestación fue estudiada en novillas y vacas infectadas (7 que habían abortado y 14 no abortadas), las cuales fueron seleccionadas siguiendo los criterios descritos en el apartado 3.4.3.2.7. Las muestras de suero fueron recogidas mensualmente de cada animal a partir de los tres meses anteriores a la cubrición hasta el tercer mes posterior al parto. Como testigos negativos, se recogieron muestras de 10 reproductoras procedentes de un rebaño seronegativo y sin una historia previa de fallo reproductivo durante los últimos tres años. En este caso, las muestras fueron recogidas cuatrimestralmente a lo largo de la gestación.

Las variaciones dentro de cada grupo y las existentes entre ambos grupos en relación a los antígenos de *Neospora* reconocidos a lo largo de la gestación fueron analizadas comparando los resultados correspondientes a cada trimestre de la gestación. Así, en las reproductoras abortadas se compararon los dos primeros trimestres de la gestación y el trimestre posterior al aborto ya que todas ellas habían abortado entre el quinto y el octavo mes de gestación, mientras que en las infectadas no abortadas se compararon los tres trimestres de la gestación y el trimestre posterior al parto. Finalmente, para comparar las vacas abortadas y no abortadas, únicamente se tuvieron en cuenta los dos primeros trimestres de gestación.

Para realizar el análisis estadístico, la frecuencia e intensidad de reconocimiento de los diferentes antígenos fueron clasificadas en tres categorías -baja, moderada y alta- y a cada categoría se le dio un valor numérico (1, 2 y 3, respectivamente). La media de los tres valores de frecuencia e intensidad para cada trimestre y para cada animal fue el valor utilizado en el análisis estadístico.

5.2. RESULTADOS

5.2.1. Influencia del aislado y del anticuerpo secundario en el patrón de reconocimiento de los antígenos del taquizoíta

5.2.1.1. Aislado

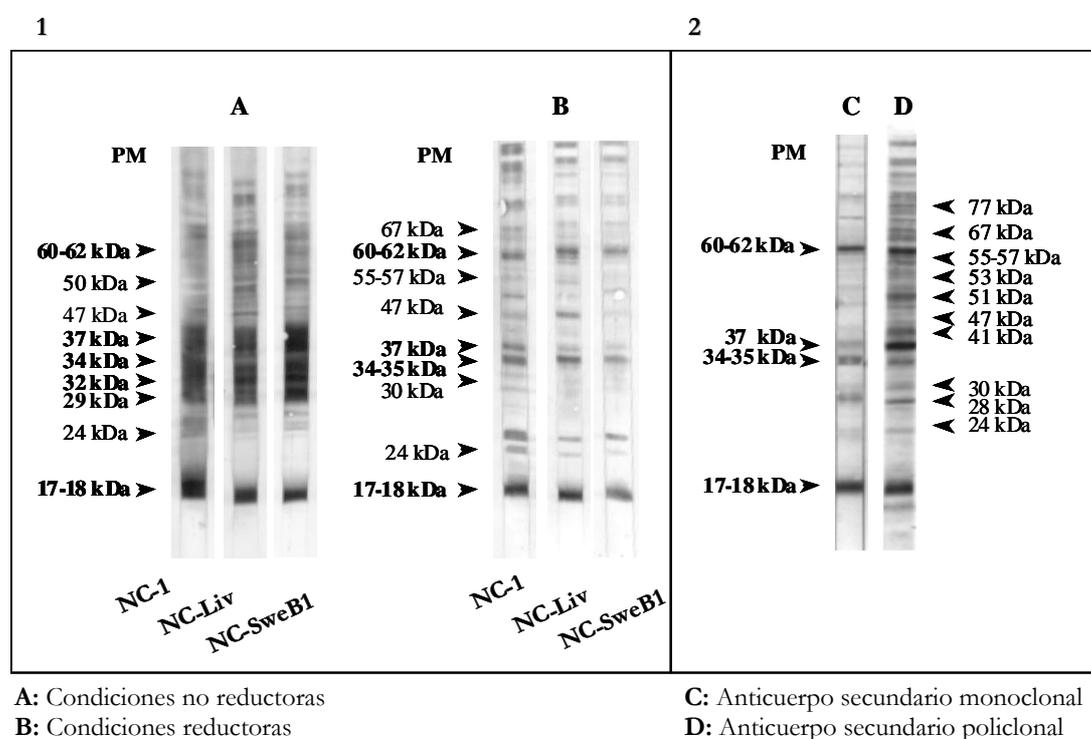
Tal y como refleja la Figura 9, no se detectaron diferencias apreciables en el patrón de reconocimiento de los tres aislados de *N. caninum* tanto en condiciones reductoras como no reductoras, apreciándose además la misma intensidad de reconocimiento de los diferentes antígenos de *Neospora* en los tres casos. En condiciones no reductoras destaca un reconocimiento más intenso de las bandas de 17-18, 29, 32, 34 y 37 kDa, mientras que en condiciones reductoras se reconocen con mayor intensidad las bandas de 17-18, 34-35, 37 y 60-62 kDa. De acuerdo con estos resultados, la variable “aislado” no fue considerada un factor determinante en las posibles variaciones de los resultados obtenidos mediante la técnica de western blot, y en los experimentos posteriores se empleó, únicamente, antígeno soluble obtenido a partir del aislado NC-1.

5.2.1.2. Anticuerpo secundario

Cuando se analizaron los resultados obtenidos con los dos anticuerpos secundarios se observó un idéntico patrón de reconocimiento (Fig. 9). En ambos casos, los antígenos de 17-18, 34-35, 37 y 60-62 kDa fueron detectados con una intensidad alta, mientras que el resto de antígenos específicos fueron detectados con una intensidad moderada o débil. Sin embargo, mientras que el anticuerpo secundario monoclonal detectó con mayor intensidad los antígenos de 17-18, 34-35, 37 y 60-62 kDa, el anticuerpo secundario policlonal fue capaz de detectar con mayor intensidad algunos antígenos menores de *N. caninum* que apenas eran visibles cuando se empleó el anticuerpo secundario monoclonal (30, 51, 53, 67 y 77 kDa). De esta forma, el

anticuerpo secundario monoclonal fue utilizado en el estudio del patrón de reconocimiento de los antígenos de *N. caninum* y la caracterización de sus IDAs reconocidos por las diferentes poblaciones estudiadas, mientras que se consideró más apropiado la utilización del anticuerpo secundario policlonal en el estudio de la cinética de reconocimiento de todos los antígenos específicos en vacas infectadas, abortadas y no abortadas, a lo largo de la gestación.

Figura 9: Patrón de reconocimiento de los antígenos del taquizoíta de *N. caninum* reconocidos por bovinos infectados en función del aislado (1) y del anticuerpo secundario (2).



5.2.2. Identificación de los antígenos del taquizoíta reconocidos por distintos grupos poblacionales de bovinos infectados por *N. caninum*

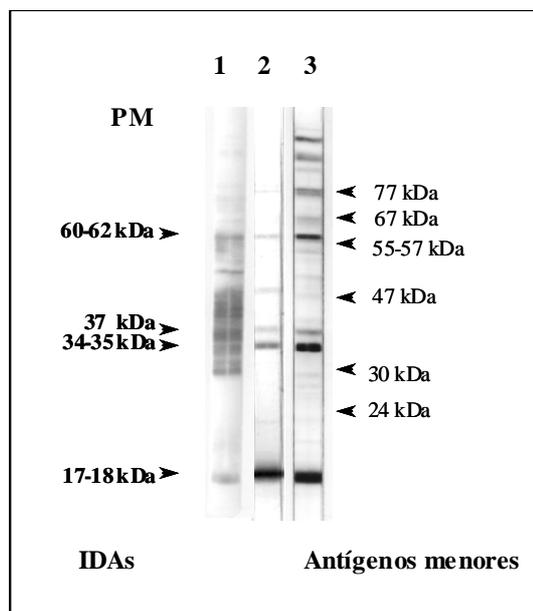
5.2.2.1. Patrón de reconocimiento

Hasta un total de 18 antígenos del taquizoíta de *Neospora*, cuyos pesos moleculares oscilaron entre los 14 y los 94 kDa, fueron reconocidos por las IgG específicas de las distintas poblaciones estudiadas. Además, también fueron detectados varios antígenos de alto peso molecular (>94 kDa) (Fig. 9). La frecuencia e intensidad de reconocimiento de los diferentes antígenos están recogidas en la tabla XIX. Aunque, en la mayoría de los casos se observó un patrón de reconocimiento similar por parte de las tres poblaciones (Fig. 10), se detectaron diferencias en la frecuencia e intensidad de reconocimiento de los antígenos inmunodominantes y en la frecuencia de reconocimiento de algunos antígenos menores.

En las tres poblaciones bovinas, cuatro IDAs comunes fueron seleccionados teniendo en cuenta la frecuencia de aparición y la intensidad de reconocimiento: 17-18, 34-35, 37 y 60-62 kDa (Fig. 10). Los fetos y vacas abortadas presentaron como característica común una elevada intensidad de reconocimiento de la banda de 17-18 kDa mostrada por el 100% de los animales. Sin embargo, en el caso de los sementales no se detectó un intenso reconocimiento de los antígenos inmunodominantes, y únicamente la banda de 17-18 kDa fue reconocida con una intensidad de leve a moderada por parte del 78% de los animales.

En cuanto a los diferentes patrones de reconocimiento de los antígenos inmunodominantes también se observaron notables diferencias entre las tres poblaciones. La proteína de 17-18 kDa junto con las proteínas de 34-35 y 37 kDa fueron reconocidas por el 78% de los fetos, mientras que el 94% de las vacas abortadas siempre detectaron las bandas de 17 y 60-62 kDa simultáneamente y el 76% de las vacas abortadas reconocieron las bandas de 17-18, 34-35 y 60-62 kDa. En el caso de los sementales infectados por *Neospora* estas frecuencias de reconocimiento disminuyeron notablemente. El 39% de los sementales reconocieron las bandas de 17 y 60-62 kDa simultáneamente, mientras que el 19% de los animales reconocieron las bandas de 17-18, 34-35 y 60-62 kDa.

Figura 10: Patrón de reconocimiento de los antígenos del taquizoíta de *N. caninum* por fetos y reproductoras abortadas y por sementales con infección natural.



1 = Semental infectado
 2 = Feto abortado
 3 = Vaca abortada

Tabla XIX: Frecuencia e intensidad de reconocimiento de los antígenos del taquizoíta de *Neospora* por fetos y reproductoras abortadas y sementales con infección natural.

PM (kDa)	IDAs (Frecuencia*/Intensidad**)			Antígenos menores (Frecuencia*)		
	Fetos	Vacas	Sementales	Fetos	Vacas	Sementales
77				9	21	0
67				18	51	0
60-62	45/ +	94/ ++	37/ +			
55-57				27	33	6
53				45	24	6
51				0	15	0
47				27	36	15
41				0	9	0
37	73/ ++	70/ ++	25/ +			
35-34	73/ ++	82/ ++	25/ +			
30				0	21	0
28				27	42	3
24				0	21	3
17-18	100/ +++	100/ +++	78/ ++			

* Frecuencia de reconocimiento: porcentaje de animales que reconocen los diferentes antígenos de *Neospora*.

** Intensidad de reconocimiento expresadas como: + Intensidad de reconocimiento baja (1); ++ Intensidad de reconocimiento moderada (2); +++ Intensidad de reconocimiento alta (3)

Los testigos negativos, tanto fluidos fetales como sueros de animales adultos, no reconocieron ninguna proteína de *Neospora*.

5.2.2.2. Relación entre el título de anticuerpos específicos y los antígenos del taquizoíta identificados

5.2.2.2.1. Fetos

Cuando las dos categorías de títulos de IFI fueron relacionadas tanto con el número de IDAs y antígenos totales como con la intensidad de reconocimiento de cada uno de ellos, se encontró una asociación entre los títulos elevados de anticuerpos y el número de IDAs ($U=6,5; P<0,05$) y de antígenos totales reconocidos ($U=6,5; P<0,05$), así como con una mayor intensidad de reconocimiento de las bandas de 17-18 ($U=5,5; P<0,05$), 34-35 ($U=8,5; P<0,05$) y 37 kDa ($U=7,5; P<0,05$) (Fig.11).

5.2.2.2.2. Reproductoras abortadas

Se observó una tendencia a reconocer un mayor número de IDAs por parte de los sueros con mayor título de anticuerpos, aunque la asociación no fue estadísticamente significativa ($U=118; P>0,05$). Cuando los títulos de anticuerpos fueron comparados con el número total de antígenos reconocidos, se encontró una asociación entre los títulos elevados de IFI ($>1:500$) y un mayor número de bandas específicas detectadas ($U=72; P<0,05$) (Fig.11). Con respecto a la posible asociación entre títulos elevados de anticuerpos y la intensidad de reconocimiento, se observó una tendencia a reconocer con mayor intensidad todos los IDAs, si bien únicamente se encontró una asociación significativa con el reconocimiento de la banda de 34-35 kDa ($U=58; P<0,05$).

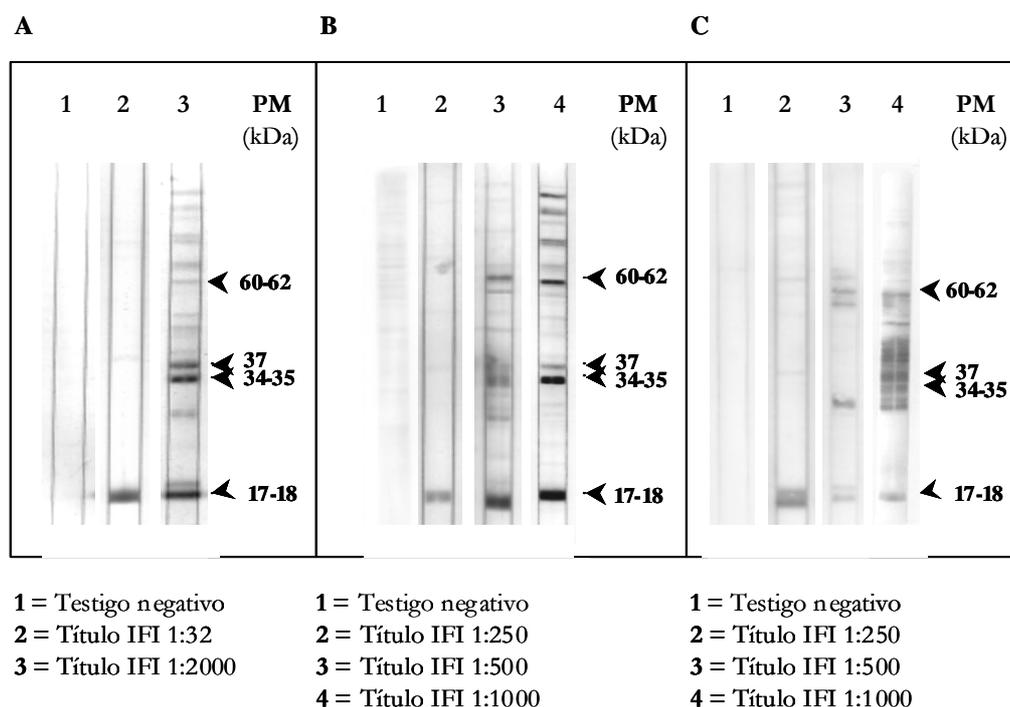
5.2.2.2.3. Sementales

No se encontraron diferencias significativas cuando se estudió la asociación entre los títulos de anticuerpos con el número de IDAs y el número total de antígenos ($U=76,5; P>0,05$ y $U=78; P>0,05$, respectivamente), pero sí se observó una tendencia a reconocer un mayor número de IDAs y un mayor número de antígenos cuando los títulos de IFI fueron elevados ($>1:500$). Del mismo modo, cuando se compararon las dos categorías de títulos de IFI con los

valores de intensidad de reconocimiento de los cuatro IDAs no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P>0,05$), aunque sí se observó una tendencia a detectar con mayor intensidad dichos IDAs.

Figura 11: Relación entre el título de anticuerpos específicos y los antígenos del taquizoíta de *N. caninum* identificados.

A: Fetos abortados; B: Reproductoras abortadas; C: Sementales infectados



5.2.2.3. Estudio comparativo del reconocimiento de antígenos del taquizoíta por los diferentes grupos poblacionales de bovinos infectados por *N. caninum*

Las diferencias encontradas entre los tres grupos poblacionales cuando se comparó la intensidad y frecuencia de reconocimiento de los antígenos han quedado anteriormente reflejadas en la Tabla XIX. Cuando estos datos se compararon mediante pruebas estadísticas, en algunos casos las diferencias observadas fueron significativas.

En primer lugar, se comparó el número total de IDAs, así como el número total de los antígenos de *Neospora* reconocidos por los diferentes grupos. Las vacas abortadas detectaron un mayor número de IDAs ($U=139$; $P<0,05$) y de antígenos totales ($U=54$; $P<0,001$) en comparación a los fetos abortados. Sin embargo, cuando en dicha comparación solo se incluyeron los fetos abortados durante el tercer trimestre de gestación las diferencias observadas en el número total de IDAs y en el número total de antígenos no fueron significativas ($U=90,5$; $P>0,05$ y $U=129,5$; $P>0,05$, respectivamente). Respecto a la comparación entre fetos abortados y sementales, los fetos reconocieron un número mayor de IDAs que los sementales ($U=115$; $P<0,05$), pero en cuanto al número total de antígenos detectados las diferencias no fueron significativas. Por otra parte, las reproductoras abortadas también reconocieron un número mayor de IDAs y de antígenos totales que los sementales, siendo en ambos casos las diferencias significativas ($U=134$ y $U=72,5$, respectivamente; $P<0,001$).

En segundo lugar, se comparó la frecuencia e intensidad de reconocimiento de cada IDA por parte de los tres grupos poblacionales. Las diferencias observadas entre los fetos y las reproductoras abortadas únicamente resultaron ser significativas para la frecuencia e intensidad de reconocimiento de la banda de 60-62 kDa, la cual fue detectada con una mayor frecuencia ($\chi^2=1,01$; $P<0,05$) e intensidad ($U=72,5$; $P<0,05$) por parte de las vacas abortadas. En relación a los fetos y los sementales, los fetos detectaron con mayor frecuencia de forma significativa los IDAs de 17-18 ($\chi^2=22,5$; $P<0,0001$), 34-35 ($\chi^2=44,2$; $P<0,0001$) y 37 kDa ($\chi^2=44,2$; $P<0,0001$) y con mayor intensidad los IDAs de 34 ($U=107$; $P<0,05$) y 37 kDa ($U=126$; $P<0,05$). Así mismo, las vacas reconocieron todos los IDAs con mayor frecuencia e intensidad que los sementales (17 kDa: $\chi^2=22,5$, $U=30$, $P<0,0001$; 34-35 kDa: $\chi^2=63,0$, $U=146$, $P<0,0001$; 37 kDa: $\chi^2=38,8$, $U=221$, $P<0,0001$; 60-62 kDa: $\chi^2=69,4$, $U=142,5$, $P<0,0001$).

Finalmente, se compararon los títulos de anticuerpos de las tres poblaciones bovinas. Las vacas abortadas presentaron mayores títulos de anticuerpos que los sementales ($U=208$; $P<0,0001$) y que los fetos abortados ($U=97$; $P<0,05$), si bien los fetos abortados durante el tercer trimestre de gestación no presentaron títulos de anticuerpos diferentes a los de las vacas abortadas ($U=88$; $P>0,05$). Por otra parte, cuando se compararon los sementales con los fetos tampoco se encontraron diferencias significativas ($U=171$; $P>0,05$), si bien los fetos abortados

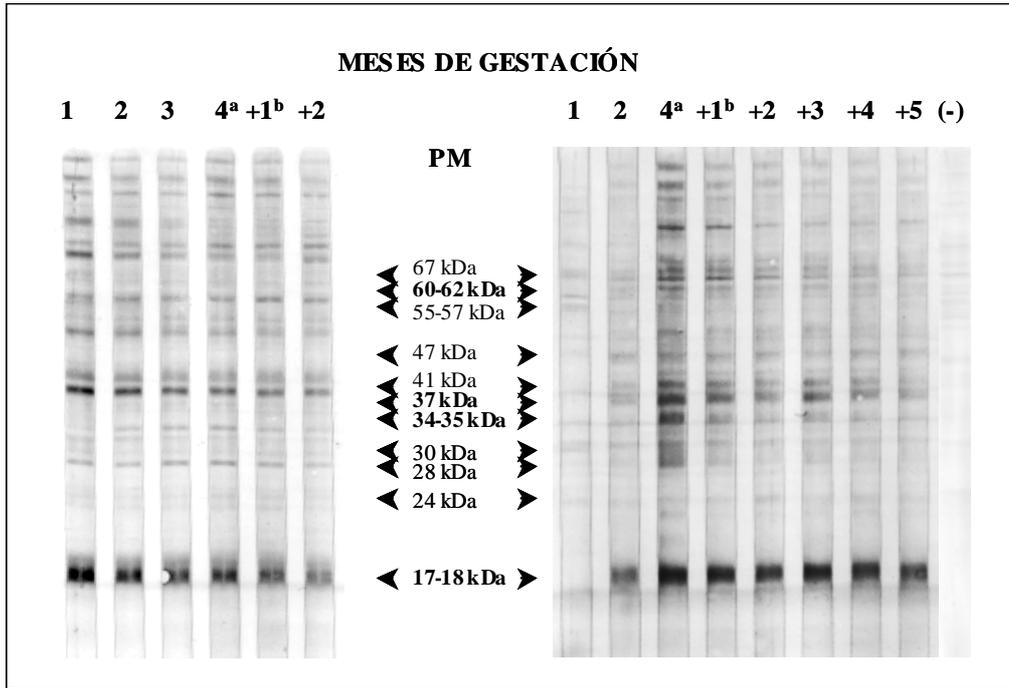
durante el tercer trimestre presentaron títulos de anticuerpos superiores a los de los sementales ($U=39$; $P<0,05$).

5.2.3. Variaciones en los antígenos del taquizoíta reconocidos a lo largo de la gestación por vacas abortadas y no abortadas con infección natural

El patrón general de reconocimiento de antígenos específicos fue similar en vacas infectadas abortadas y no abortadas (Tablas XX y XXI y Figuras 12 y 13, respectivamente), excepto en lo referente a la intensidad de reconocimiento de varias bandas proteicas.

Cuando se analizaron las variaciones intra-grupo en las vacas abortadas, únicamente, se detectaron diferencias significativas a lo largo de la gestación en el reconocimiento del antígeno de 17-18 kDa, el cual fue reconocido con una mayor intensidad a lo largo del segundo trimestre de la gestación ($U=6$; $P<0,05$) y durante el trimestre después del aborto ($U=8$; $P<0,05$), comparado con el primer trimestre de la gestación. En algunos casos, se pudo observar un incremento de la intensidad de reconocimiento de varias proteínas de bajo peso molecular (17-18, 28, 34-35, 41 55-57, 60-62 y 67 kDa) y de tres proteínas de alto peso molecular (> 94 kDa) en las calles correspondientes al mes del aborto (Fig. 12). En cuanto a la frecuencia de reconocimiento de la banda de 17-18 kDa, como a la frecuencia e intensidad de reconocimiento de las restantes bandas de bajo peso molecular no se encontraron diferencias significativas.

Figura 12: Patrón de reconocimiento de los antígenos del taquizoíto de *N. caninum* a lo largo de la gestación por dos vacas abortadas.



- ^a Mes del aborto
- ^b “+” Mes siguiente al aborto
- (-) Testigo negativo

Tabla XX: Reconocimiento de los antígenos del taquizoíto a lo largo de la gestación en las reproductoras bovinas abortadas.

PM (kDa)	Trimestre de gestación				Trimestre después del aborto	
	1 ^{er}		2 ^o		1 ^{er}	
	Frecuencia*	Intensidad*	Frecuencia	Intensidad	Frecuencia	Intensidad
77 kDa	++	+	++	+	++	+
67 kDa	++	+	+++	+	++	+
60-62 kDa	+	+	++	+	+	+
55-57 kDa	++	++	+++	++	+++	+
53 kDa	-	-	-	-	-	-
51 kDa	+	+	+	+	+	+
47 kDa	++	+	++	+	+++	++
41 kDa	+++	++	+++	++	++	++
37 kDa	+++	+	+++	++	+++	++
34-35 kDa	+++	+	+++	+	+++	+
30 kDa	+	+	+	+	+	+
28 kDa	++	+	++	+	++	+
24 kDa	+	+	+	+	++	+
17-18 kDa	++	+++	+++	+++	+++	+++

- * + Frecuencia baja (0-33%) / Intensidad (1)
- ++ Frecuencia moderada (33-66%) / Intensidad (2)
- +++ Frecuencia alta (66-100%) / Intensidad (3)

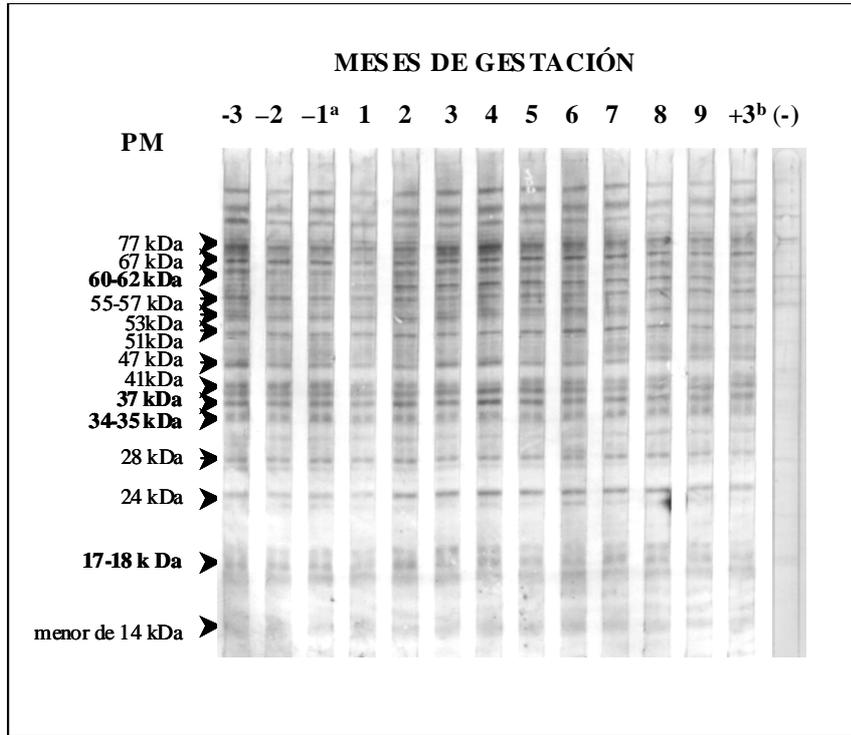
En lo que se refiere a las vacas infectadas no abortadas, no se encontraron diferencias significativas a lo largo de la gestación en ninguna de las bandas estudiadas, destacando un débil reconocimiento de una banda cuyo peso molecular era inferior a 14 kDa por la mayor parte de las vacas no abortadas (Fig. 13).

A continuación, se analizaron las diferencias inter-grupo existentes entre las vacas abortadas y no abortadas durante el primer y segundo trimestre de la gestación. En relación al primer trimestre de gestación, se detectó una mayor intensidad de reconocimiento de las bandas de 17-18 y 41 kDa en las vacas abortadas comparado con las vacas no abortadas ($U=7$ and $U=19,5$, respectivamente; $P<0,05$), mientras que durante el segundo trimestre el antígeno detectado con una mayor frecuencia por parte de las vacas abortadas fue la banda de 34-35 kDa ($U=19,5$; $P<0,05$). Por otra parte, las vacas abortadas presentaron un intenso reconocimiento de las bandas de alto peso molecular, mientras que estas apenas fueron visibles o no aparecieron en los western blot de las vacas no abortadas.

En las vacas no abortadas, solamente la frecuencia de reconocimiento de la banda de 60-62 kDa se incrementó significativamente durante el primer trimestre de la gestación, comparada con el primer trimestre de gestación de las vacas abortadas ($U=12,5$; $P<0,05$).

Finalmente, se analizaron los testigos negativos correspondientes a cada uno de los trimestres de gestación de reproductoras gestantes. En ningún caso se detectaron los IDAs de *N. caninum* y, aunque algunos animales detectaron varias bandas inespecíficas con una intensidad débil, no se detectó un patrón característico y repetitivo.

Figura 13: Patrón de reconocimiento de los antígenos del taquizoítos de *N. caninum* a lo largo de la gestación por una vaca infectada no abortada.



a “-” Mes anterior a la cubrición

b “+” Mes siguiente al parto

(-) Testigo negativo

Tabla XXI: Reconocimiento de los antígenos del taquizoítos a lo largo de la gestación en las reproductoras bovinas infectadas.

PM (kDa)	Trimestre de gestación					
	1 ^{er}		2 ^o		3 ^{er}	
	Frecuencia*	Intensidad*	Frecuencia	Intensidad	Frecuencia	Intensidad
77 kDa	+	+	+	+	+	+
67 kDa	++	+	+++	+	+++	++
60-62 kDa	++	+	+++	+	+++	++
55-57 kDa	+++	+	+++	+	+++	+
53 kDa	+	+	+	+	+	+
51 kDa	+	+	+	+	+	+
47 kDa	++	+	++	+	++	+
41 kDa	+	+	+	+	+	+
37 kDa	+++	++	+++	++	++	++
34-35 kDa	+	+	+	+	++	+
30 kDa	++	+	++	+	++	+
28 kDa	+	+	+	+	++	+
24 kDa	+++	++	+++	++	+++	++
17-18 kDa	+++	++	+++	++	+++	++

* + Frecuencia baja (0-33%) / Intensidad (1)

++ Frecuencia moderada (33-66%) / Intensidad (2)

+++ Frecuencia alta (66-100%) / Intensidad (3)

5.3. DISCUSIÓN

Las IgG presentes en los fluidos fetales, en los sueros de las vacas, que habían abortado debido a la infección por *Neospora* y en los sueros de los sementales infectados reconocieron hasta un total de 18 antígenos específicos del taquizoíto de *Neospora*. Además, los sueros procedentes de los tres grupos también identificaron varios antígenos de alto peso molecular (>94 kDa).

En la mayoría de los casos, en las tres poblaciones bovinas se observó un patrón similar de reconocimiento antigénico, aunque las vacas abortadas reconocieron los antígenos específicos con una mayor frecuencia e intensidad, seguidas de los fetos abortados y de los sementales infectados. Las diferencias observadas entre las vacas y los fetos se deben, probablemente, al completo desarrollo del sistema inmune y a la exposición previa a diferentes antígenos, incluyendo aquellos de otras especies de coccidios cercanas a *Neospora* en la escala filogenética, en las vacas abortadas. La menor frecuencia e intensidad de reconocimiento de los diferentes antígenos por parte de los sueros procedentes de sementales infectados en comparación con las dos poblaciones abortadas podría estar estrechamente relacionado con la fase de la infección. El aborto es el principal síntoma de la neosporosis aguda, que se produciría como consecuencia de una infección reciente o una recrudescencia y suele estar relacionado con un aumento de los títulos de anticuerpos específicos en el momento del aborto. Sin embargo, en los sementales infectados, en la mayoría de los casos podría tratarse de animales persistentemente infectados con títulos bajos de anticuerpos específicos, puesto que éstos presentarían una menor predisposición a la recrudescencia de la infección. La explicación a este hecho parece clara, ya que la gestación junto con los mecanismos inmunológicos asociados es uno de los principales factores que influyen en la reactivación de la infección (Innes *et al.*, 2002). Por otra parte, no hay que olvidar que las diferencias observadas entre los tres grupos bovinos estudiados también podrían deberse a inespecificidades en el reconocimiento de antígenos. En este sentido, Bjerkas *et al.* (1994) describieron ciertas inespecificidades en el reconocimiento antigénico, ya que el suero preinmune de un conejo infectado experimentalmente y sueros con anticuerpos específicos frente a *T. gondii* detectaron varios antígenos de *N. caninum*. Así mismo, las pequeñas diferencias observadas en el reconocimiento de diversos antígenos no inmunodominantes podrían deberse tanto a variaciones individuales del hospedador como a variaciones del parásito, ya que diversos autores han observado diferencias relacionadas con infecciones por

diversas cepas del parásito en ratones infectados con *T. gondii* (Hassl & Aspöck, 1990; Appleford & Smith, 2000).

En relación a la composición antigénica de los diferentes aislados de *N. caninum*, los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con los presentados, con anterioridad, en trabajos similares. En el trabajo realizado por Atkinson *et al.* (1999) se empleó en el western blot antígeno procedente del aislado NC-Liv para comparar el reconocimiento antigénico en condiciones no reductoras por parte de sueros de ratones infectados por dos aislados diferentes -NC-Liv y NC-SweB1-, observándose un idéntico reconocimiento de los IDAs de 17, 29/30, 30-36 y 37 kDa. Por otra parte, Schock *et al.* (2001) no detectaron diferencias en la composición antigénica cuando se empleó en el western blot proteína soluble de 6 aislados diferentes de *N. caninum* e idénticos sueros de bovinos con infección natural y experimental. En el presente trabajo, se analizó tanto la composición antigénica como el reconocimiento de los IDAs en condiciones reductoras y no reductoras cuando se empleó antígeno procedente de tres aislados diferentes, dos de origen canino -NC-1 y NC-Liv- y uno de origen bovino -NC-SweB1-, obteniéndose un patrón idéntico de antígenos totales reconocidos por vacas con una infección natural. Así mismo, en los tres casos, se identificaron los mismos IDAs tanto en condiciones reductoras -17-18, 34-35, 37 y 60-62 kDa- como en condiciones no reductoras (17, 29, 32, 34 y 37 kDa). Estos resultados confirman la especificidad de la técnica de western blot en el diagnóstico de la neosporosis bovina y la validez del empleo de proteína obtenida a partir de cualquiera de los tres aislados -NC-1, NC-Liv y NC-SweB1- como antígeno en esta prueba diagnóstica.

Por lo que se refiere a la relación existente entre los títulos de IFI y el número de antígenos reconocidos, se encontró una correspondencia no solo en las vacas que habían abortado (Atkinson *et al.*, 2000a), sino también en los fetos abortados y en los sementales infectados, si bien en este último grupo de animales esta relación no fue estadísticamente significativa. Por otra parte, los hallazgos encontrados en *T. gondii* apoyan nuestros resultados. De acuerdo con Ashburn *et al.* (1998) los cambios en el reconocimiento de antígenos específicos de *T. gondii* dependen de las diferencias en los títulos de anticuerpos, mientras que según Baszler *et al.* (1996) el patrón de reconocimiento de antígenos de *Neospora* en western blot era variable y no guardaba relación con el título de IFI. Por otra parte, los fetos abortados en el tercer trimestre de la gestación presentaron títulos de anticuerpos más elevados y reconocieron un número mayor de antígenos de *Neospora* comparado con los fetos abortados

en el segundo trimestre de gestación. El desarrollo del sistema inmune del feto podría ser la explicación a este resultado, ya que los fetos no comienzan a desarrollar una respuesta inmune hasta los cinco meses de edad (Osburn, 1988). Si los fetos son capaces de controlar la infección en el segundo mes de gestación, se produce un incremento del título de anticuerpos específicos. Además, los primeros antígenos en ser detectados son los IDAs y cuando los títulos de anticuerpos comienzan a aumentar estos IDAs son reconocidos junto a otros antígenos menores. Cazzabone *et al.* (1994) obtuvieron similares resultados con *T. gondii*, donde las primeras inmunoglobulinas se unieron a los IDAs y los anticuerpos sintetizados con posterioridad detectaron otros antígenos menores con una intensidad más débil.

En nuestro trabajo, los tres grupos de animales infectados -fetos, vacas abortadas y sementales infectados- identificaron cuatro IDAs de taquizoítos basándonos en su frecuencia e intensidad de reconocimiento y cuyos pesos moleculares son: 17-18, 34-35, 37 y 60-62 kDa. Previamente, Bjerkas *et al.* (1994) describieron la identificación de cuatro IDAs de 17, 29, 30 y 37 kDa por sueros procedentes de diferentes especies animales incluyendo el ganado bovino. Recientemente, otros grupos han considerado como IDAs de *N. caninum* los antígenos reconocidos por el ganado bovino cuyos pesos moleculares son de 16/17, 29/30, 37 y 46 kDa (Schaes *et al.*, 1998; Atkinson *et al.*, 2000a). Sin embargo, en el trabajo publicado por Baszler *et al.* las muestras de suero procedentes de vacas infectadas con *Neospora* reconocieron de manera consistente únicamente los antígenos de 25, 65 y 116 kDa. En el presente trabajo, se analizó un amplio panel de muestras procedentes de fetos y vacas con aborto debidos a la infección por *Neospora*, lo cual permitió realizar una precisa caracterización de los antígenos reconocidos y una comparación entre ambos grupos. Nuestros resultados confirman la importancia de las proteínas de 17-18 y 37 kDa para el inmunodiagnóstico y apuntan la relevancia de otros dos IDAs específicos de *N. caninum*, las proteínas de 34-35 y 60-62 kDa.

El antígeno de 17-18 kDa parece ser el IDA más importante reconocido por los fetos, y vacas abortadas y por los sementales infectados por *Neospora*, ya que los anticuerpos de todas las muestras positivas examinadas se unieron al antígeno con una intensidad elevada, incluso cuando ningún otro antígeno fue detectado. Este fue el caso de tres fetos, una vaca y varios sementales infectados por *Neospora*, los cuales presentaban títulos bajos de anticuerpos (1:32 y 1:250, respectivamente) y tan solo reconocieron el antígeno de 17-18 kDa. Estos resultados coinciden en parte con los obtenidos por Bjerkas *et al.* (1994), en cuyo estudio algunas muestras con títulos bajos de anticuerpos detectaban un antígeno de 17 kDa. Por el contrario,

Schares *et al.* (1998) y Atkinson *et al.* (2000a) consideraron a las proteínas de 29/30 y 37 kDa como los antígenos detectados con mayor frecuencia por vacas con infección natural, mientras que Söndgen *et al.* (2001) comprobó que el antígeno de 37 kDa era detectado con mayor frecuencia por los anticuerpos específicos presentes en los fluidos fetales. Las discrepancias observadas entre los diversos autores en cuanto al reconocimiento antigénico y, especialmente, en el patrón de IDAs reconocidos por sueros de animales infectados, se deben fundamentalmente a las diferentes condiciones de la técnica de western blot, puesto que la mayoría de los trabajos que coinciden en el patrón de IDAs se han realizado bajo condiciones no reductoras. El origen de la muestra también parece ser un factor determinante especialmente en el caso de la serología fetal, ya que Söndgen *et al.* (2001) obtuvieron valores óptimos de concordancia y sensibilidad cuando analizó fluido peritoneal en comparación con el contenido abomasal y el fluido pleural.

Diversos autores han descrito una proteína en el rango de 17-18 kDa (Barta *et al.*, 1992; Bjerkas *et al.*, 1994; Björkman *et al.*, 1994; Schares *et al.*, 1998; Atkinson *et al.*, 2000) y la mayoría de ellos coinciden en considerarla como uno de los IDAs de *Neospora* bajo condiciones no reductoras (Bjerkas *et al.*, 1994; Björkman *et al.*, 1994; Schares *et al.*, 1998). De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo y las condiciones de la técnica de western blot empleadas, la proteína en el rango de 17-18 kDa debe considerarse como uno de los IDAs más importantes de *Neospora*, independientemente de las condiciones de las técnicas. Así mismo, describimos la existencia de un nuevo IDA de 60-62 kDa, el cual fue reconocido por los fetos con una intensidad considerablemente menor que por el ganado adulto, lo cual podría estar relacionado con los mayores títulos de anticuerpos presentes en las vacas.

También se estudió la relación existente entre las fluctuaciones cuantitativas de los anticuerpos detectadas a lo largo de la gestación y los cambios cualitativos en el reconocimiento de antígenos en un grupo de vacas infectadas que habían o no presentado aborto por *Neospora*. Quintanilla-Gozalo *et al.* (2000) detectó un incremento en el título de anticuerpos alrededor del momento del parto, que en nuestro estudio estaba relacionado con una mayor intensidad de reconocimiento de varios antígenos de bajo peso molecular, principalmente la proteína de 17-18 kDa, la cual fue reconocida antes y durante el momento del aborto. Por el contrario, el patrón de reconocimiento de esta proteína permaneció constante en las vacas con infección crónica que no habían abortado. Se han encontrado resultados similares en la infección por *T. gondii*, donde un antígeno de secreción con un peso

molecular de 18 kDa, TgMIC10, presentó un mayor nivel de expresión en taquizoítos -fase responsable de la infección aguda- que en bradizoítos -fase responsable de la infección crónica- (Hoff *et al.*, 2001). En nuestro caso, la proteína de 17-18 kDa se expresa durante la fase aguda de la infección y los animales con infección aguda, como los fetos y vacas abortados, la reconocen con una intensidad elevada. Sin embargo, Atkinson *et al.* (2001) han sugerido recientemente un antígeno de 17,8 kDa como posible diana de la respuesta inmune del hospedador durante las infecciones crónicas de *N. caninum*. Los cambios en la intensidad de reconocimiento de esta proteína podrían estar relacionados con una infección aguda o con la reactivación de una infección crónica, por lo que esta proteína podría ser un buen marcador diagnóstico de una neosporosis activa en los animales infectados *a priori* de forma crónica.

**6. UTILIDAD DE LA FRACCIÓN PROTEICA DE 17 kDa
PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *N.*
caninum EN EL GANADO BOVINO**

Los resultados obtenidos en el capítulo 5 nos indujeron a pensar que la fracción inmunodominante de 17 kDa (p-17) podría ser un candidato ideal para el desarrollo de nuevas pruebas diagnósticas serológicas más sensibles y específicas, puesto que dicha fracción fue reconocida mayoritariamente y con una mayor intensidad por las tres poblaciones bovinas de interés desde el punto de vista del diagnóstico -fetos, reproductoras y sementales- en comparación con el resto de los IDAs.

Hasta el momento, no se ha empleado ningún antígeno con un peso molecular similar al de la p-17 en el diagnóstico de la neosporosis bovina. Se han desarrollado, eso sí, varias pruebas de ELISA que utilizan uno o varios antígenos del taquizoíta de *N. caninum*, cuyos pesos moleculares son superiores a 17 kDa: antígenos iscoms, recombinantes y purificados por afinidad, tal y como se ha descrito previamente en el apartado 1.2.6.2.3.3.b. Todas estas pruebas presentaron una sensibilidad y especificidad elevadas cuando se analizaron sueros procedentes de animales adultos. Sin embargo, su sensibilidad disminuyó cuando se analizaron muestras de origen fetal (Wouda *et al.*, 1997a). Por ello, el empleo de estas pruebas diagnósticas en la actualidad es limitado.

Con todos estos antecedentes, se planteó estudiar la utilidad diagnóstica de la p-17 en una prueba serológica con el objetivo de detectar los animales infectados por *N. caninum*. Para ello, la p-17 purificada mediante electroelución se empleó como antígeno en la prueba de western blot, en cuya validación se incluyeron sueros procedentes de diferentes poblaciones bovinas -reproductoras, terneros y fetos- con infección natural y experimental. Recientemente, se han realizado aproximaciones similares para identificar antígenos candidatos para el inmunodiagnóstico de otras parasitosis, como la fasciolosis (Attallah *et al.*, 2002) y la triquinelosis (Srimanote *et al.*, 2000). En estos estudios se purificaron los antígenos de interés mediante electroelución o por afinidad, respectivamente, evaluándose su utilidad diagnóstica en una prueba diagnóstica serológica cuantitativa, el dot blot ELISA. Del mismo modo, en el presente estudio el reconocimiento de la p-17 fue estimado de forma cuantitativa mediante el empleo de un densitómetro y expresado como valor de D.O.

6.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se evaluó la utilidad diagnóstica de p-17. Para ello, la fracción proteica fue purificada mediante electroelución a partir del extracto soluble de taquizoítos de *N. caninum* y se empleó en la prueba serológica de western blot, siguiendo la aproximación que se detalla en la Figura 14.

Las muestras de suero incluidas en esta parte del estudio procedían de grupos de animales de edad diferente (fetos, terneros precalostrales y calostrales y reproductoras con y sin antecedentes de aborto) tanto con infección natural como experimental (Tablas XXII y XXIII, respectivamente), así como de animales libres de la infección.

Se empleó la misma cantidad de proteína para cada una de las muestras y la intensidad de reconocimiento de la proteína electroeluida se midió mediante densitometría, tal y como se ha descrito en el apartado 3.7.3.1. Los valores finales se expresaron como D.O.

Figura 14: Esquema del estudio del valor diagnóstico de p-17.

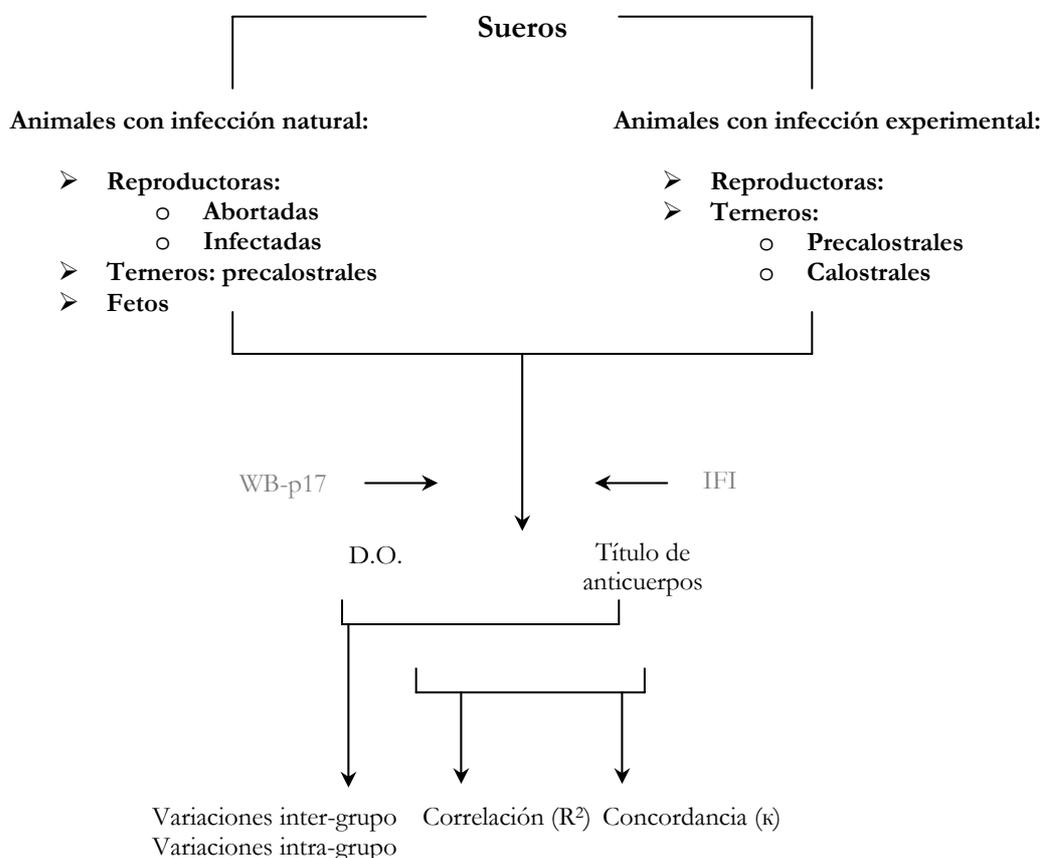


Tabla XXII: Animales con infección natural: grupos y muestras analizadas.

Reproductoras infectadas		Terneros precalostrales		Fetos	
Abortadas	No Abortadas	Infectados	No infectados	Infectados	No infectados
6	6	4	4	5	4

Tabla XXIII: Animales infectados experimentalmente: grupos y muestras analizadas.

*Grupo	Reproductoras					Terneros		
	# Semana 0	Semana 1	Semana 4	Semana 20	Total	Precalostral	Calostral	Total
1	5	5	5	5	20	4	4	8
2	6	5	6	6	23	6	6	12
3	6	6	6	6	24	6	6	12
4	3	3	3	3	12	NR	NR	NR
Total	20	19	20	20	79	16	16	32

* Grupo 1: Grupo testigo

Grupo 2: Infectado en el día 140 de la gestación

Grupo 3: Infectado antes de la cubrición y en el día 140 de la gestación

Grupo 4: Infectado antes de la cubrición

Semanas transcurridas tras el día 140 de gestación

NR: No realizado

6.1.1. Reproductoras

El grupo de animales con infección natural estuvo compuesto por reproductoras (novillas y vacas) infectadas por *N. caninum* que habían presentado aborto y reproductoras (novillas de primer parto) infectadas que no habían abortado. De cada una de las reproductoras se recogieron dos muestras. De las hembras que presentaron aborto una primera muestra se recogió en el momento del aborto y una segunda 6 meses antes o después del aborto. En cuanto a las reproductoras infectadas que no habían abortado las dos muestras se recogieron con un intervalo de tiempo entre cada toma de muestra de al menos 3 meses.

El panel de sueros procedentes de reproductoras con infección experimental procedía de tres grupos de reproductoras infectadas en momentos diferentes -antes y/o durante la gestación- y un cuarto grupo que no fue infectado por *N. caninum*, el cual se mantuvo como testigo. El mantenimiento de los animales, así como las pautas de inoculación de los diferentes grupos se ha descrito previamente en el apartado 3.4.3.3.

Todas las muestras fueron analizadas por la técnica de IFI (apartado 3.7.1.) y, posteriormente, se estudió el reconocimiento de la p-17 por western blot (wb p-17) (apartado 3.7.3.1). En primer lugar, se estudiaron las variaciones de los títulos de anticuerpos y del reconocimiento de la p-17 existentes entre los diferentes grupos de reproductoras con infección natural o experimental (variaciones inter-grupo) mediante el empleo de pruebas estadísticas no paramétricas (U de Mann-Whitney y H de Kruskal Wallis). En segundo lugar, se realizó un análisis estadístico de las variaciones correspondientes a la intensidad de reconocimiento de la p-17 existentes en función del grupo de animales y del momento del muestreo. Para ello se aplicó la prueba paramétrica Anova bifactorial de medidas repetidas en el tiempo analizándose de manera conjunta la variable grupo y tiempo (vease apartado 3.10.8.2.). De este modo se plantearon las siguientes hipótesis nulas (H_0):

- H_0^1 : El grupo no tiene efecto en los niveles de anticuerpos
- H_0^2 : No hay variaciones de anticuerpos a lo largo del tiempo
- H_0^3 : Todos los grupos presentan la misma tendencia en las variaciones de los niveles de anticuerpos a lo largo del tiempo

6.1.2. Terneros

El grupo de terneros con infección natural estuvo compuesto por muestras de sueros precalostrales procedentes de terneros infectados congénitamente y no infectados (Tabla XXII). Los terneros infectados procedían de madres que, a su vez, presentaron anticuerpos específicos anti-*N. caninum*. Los criterios de selección de las muestras se han explicado previamente en los apartados 3.4.3.1. y 3.4.3.2.2.

Los sueros procedentes de terneros con madres infectadas experimentalmente fueron obtenidos de los grupos detallados en la Tabla XXIII. Las muestras incluyeron tanto sueros precalostrales como recogidos 5 días después del nacimiento.

De acuerdo con los resultados presentados por Innes *et al.* (2001b), correspondientes al análisis del suero de las madres y de los terneros y del cerebro de los terneros mediante las técnicas de ELISA y PCR, respectivamente, tan solo un grupo de reproductoras infectadas experimentalmente transmitió la infección a la descendencia. Las reproductoras pertenecientes al grupo infectado antes de la cubrición (grupo 4), así como las reproductoras infectadas antes de la cubrición y en el día 140 de gestación (grupo 3), no tuvieron terneros congénitamente

infectados, mientras que el grupo infectado únicamente en el día 140 de gestación (grupo 2) sí que dió lugar al nacimiento de terneros infectados congénitamente, que presentaron anticuerpos específicos precalostrales.

Al igual que en el caso de las reproductoras, todas las muestras fueron analizadas por la técnica de IFI y western blot. El análisis estadístico de los resultados obtenidos en ambas pruebas serológicas siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior.

6.1.3. Fetos

Los fluidos fetales analizados en esta parte del estudio procedían de fetos abortados debido a la infección por *Neospora* (n=5) y de fetos abortados por otras causas (n=4). Todas las muestras fueron analizadas mediante las pruebas de western blot e IFI. Los criterios de selección de las muestras fetales negativas y positivas se han descrito previamente en los apartados 3.4.3.1. y 3.4.3.2.1., respectivamente.

Finalmente, se estudiaron las posibles diferencias existentes entre los tres grupos bovinos infectados naturalmente -reproductoras, terneros y fetos- en función de los niveles de anticuerpos determinados por ambas pruebas serológicas (IFI y wb p-17).

6.1.4. Estudio comparativo de la IFI y el western blot p-17

Se estableció el grado de concordancia (κ) entre ambas pruebas serológicas y la correlación entre los títulos de anticuerpos y los valores de D.O. obtenidos en el western blot p-17, tal y como se describe en los apartados 3.10.3. y 3.10.6., respectivamente. Para ello, se calculó el valor κ para el conjunto de muestras empleadas. Por otra parte, se estimó el coeficiente de correlación para las poblaciones de reproductoras y terneros de manera independiente, así como para el conjunto de muestras empleadas en esta parte del estudio (reproductoras, terneros y fetos).

6.2. RESULTADOS

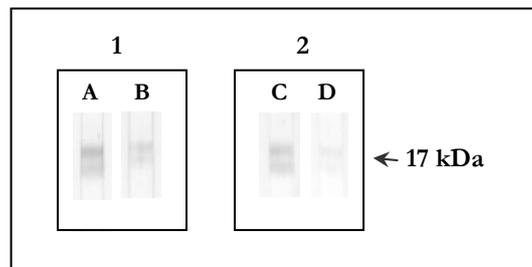
6.2.1. Reproductoras

6.2.1.1. Con infección natural

Tanto en el grupo de reproductoras infectadas que habían abortado como en el grupo de reproductoras infectadas que no abortaron se detectaron títulos de anticuerpos específicos por IFI, así como reconocimiento de la p-17 kDa por western blot (Fig. 15).

Figura 15: Reconocimiento de la p-17 por IgG de reproductoras con infección natural:

1: Reproductoras abortadas; 2: Reproductoras infectadas sin aborto



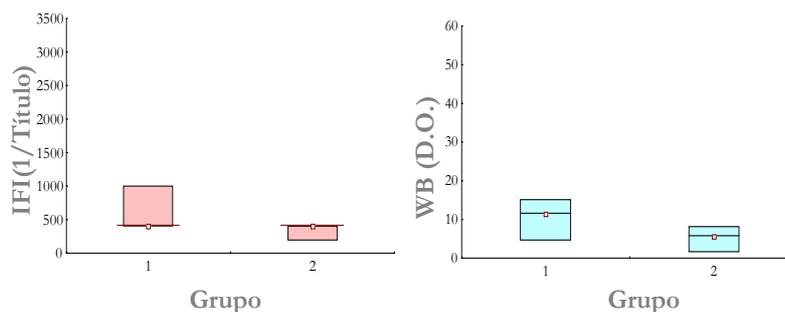
A: Momento del aborto

B: 6 meses anteriores al aborto

C y D: Muestras recogidas con un espacio de tres meses

Tal y como se refleja en las Figuras 15 y 16, en el grupo de las reproductoras abortadas los mayores títulos de anticuerpos y la mayor intensidad de reconocimiento de la p-17 coincidió con en el momento del aborto, comparado con el reconocimiento 6 meses antes o después del aborto, mientras que en el grupo de reproductoras no abortadas apenas se detectaron diferencias en el reconocimiento de la p-17 entre ambos muestreos.

Figura 16: Anticuerpos específicos detectados en reproductoras con infección natural mediante IFI y wb-17. (Representación de medianas \pm cuartiles)



1: Reproductoras infectadas con aborto; 2: Reproductoras infectadas sin aborto

Cuando se analizaron estadísticamente las variaciones inter-grupo, en un primer paso, se incluyeron en el análisis estadístico todas las muestras correspondientes a las reproductoras que presentaban aborto (n=12) y a las reproductoras con infección crónica (n=12), correspondiendo los mayores títulos de anticuerpos y la mayor intensidad de reconocimiento de la p-17 a las reproductoras que abortaron, si bien estas diferencias, únicamente, fueron significativas cuando se compararon los títulos de anticuerpos específicos por IFI ($U=44$, $P<0,05$).

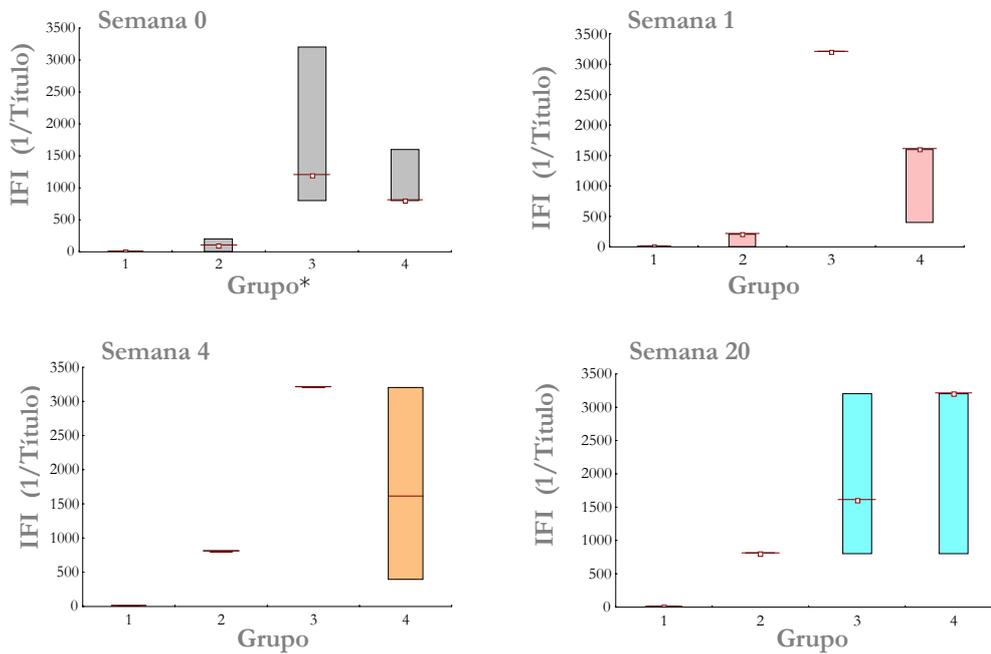
Cuando se compararon los resultados de las reproductoras abortadas obtenidos únicamente en el momento del aborto (n=6), con los resultados correspondientes a las reproductoras infectadas sin aborto en los dos momentos del muestreo (n=12), en ambos casos los mayores valores obtenidos por IFI y wb p-17 correspondieron de nuevo al grupo de reproductoras que abortaban. Estas diferencias fueron significativas cuando se compararon los títulos de anticuerpos obtenidos por IFI ($U=34$; $P<0,05$).

6.2.1.2. Con infección experimental

A excepción del grupo testigo, los tres grupos restantes de reproductoras presentaron títulos de anticuerpos específicos moderados o altos a partir de la semana 4 posterior a la infección en el día 140 de gestación. Los grupos que presentaron títulos de anticuerpos por IFI fueron el grupo 3 y 4, seguidos del grupo 2.

El grupo 3 presentó títulos de anticuerpos por IFI más elevados en las semanas 0, 1 y 4 posteriores a la infección en el día 140 de gestación, mientras que en el momento cercano al parto (semana 20), el grupo 4 presentó los títulos más elevados. El grupo 2 presentó títulos de anticuerpos por IFI negativos o muy bajos en las semanas 0 y 1 tras la infección, aumentando de forma moderada y manteniéndose estables desde la semana 4 hasta el final de la gestación (semana 20) (Fig. 17).

Figura 17: Anticuerpos específicos detectados en reproductoras infectadas experimentalmente mediante IFI. (Representación de medianas \pm cuartiles)



* Grupo 1: Grupo testigo
 Grupo 2: Infectado en el día 140 de la gestación
 Grupo 3: Infectado antes de la cubrición y en el día 140 de la gestación
 Grupo 4: Infectado antes de la cubrición

En cuanto a los resultados obtenidos por wb p-17, del mismo modo que para el caso de la IFI, los grupos 3 y 4 reconocieron la fracción proteica con una intensidad moderada-alta, seguidos del grupo 2 (Fig. 18 y 19).

El grupo 4 presentó un reconocimiento muy intenso en los cuatro momentos del muestreo, mientras que en los grupos 2 y 3 sí se observaron diferencias a partir del día 140 de gestación. El grupo 2 no detectó la fracción inmunodominante en las semanas 0 y 1 posteriores a la infección (día 140 de gestación), apareciendo un leve reconocimiento en la semana 4 y manteniéndose hasta el final de la gestación (semana 20). Por lo que se refiere al grupo 3, aunque todos los animales detectaron de forma muy intensa el antígeno a lo largo del periodo de muestreo, sí se observó un incremento notable en la intensidad de reconocimiento en las semanas 1 y 4 en comparación a las semanas 0 y 20 (Fig. 18 y 19).

Figura 18: Reconocimiento de la p-17 por IgG de reproductoras infectadas experimentalmente.

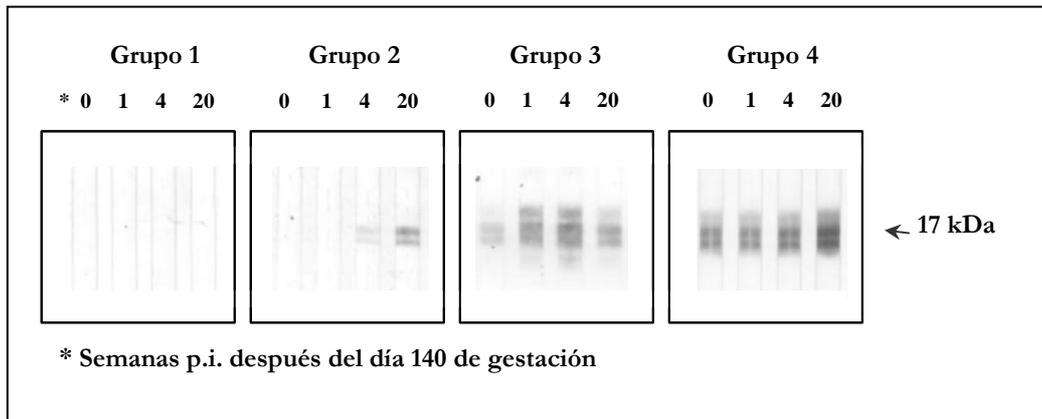
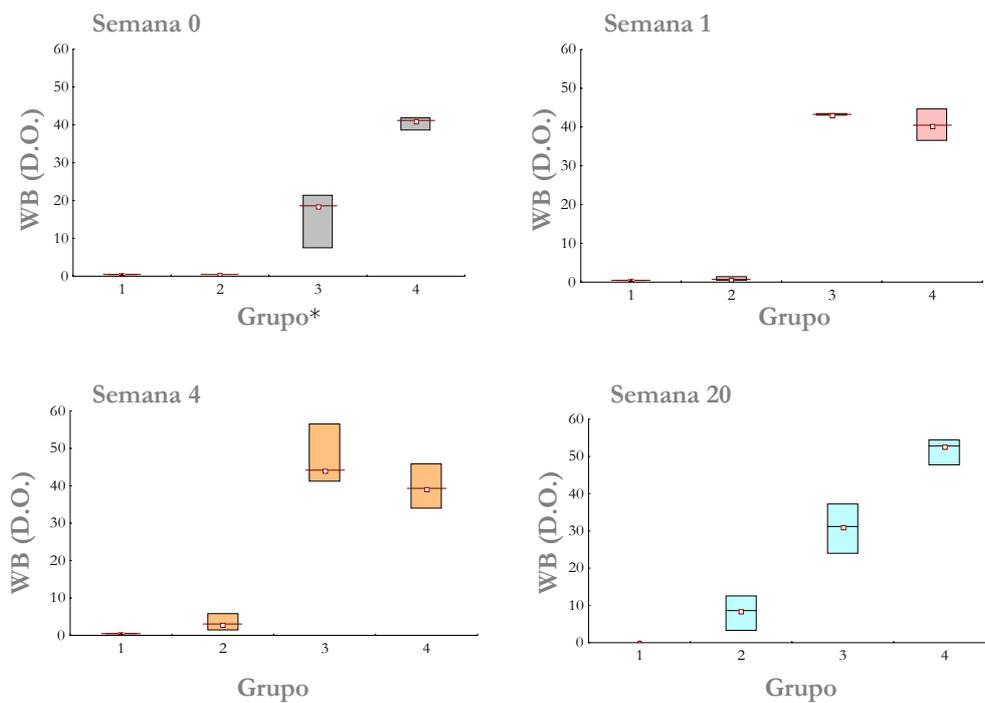


Figura 19: Anticuerpos específicos detectados en reproductoras infectadas experimentalmente mediante wb-17. (Representación de medianas \pm cuartiles)



* Grupo 1: Grupo testigo
 Grupo 2: Infectado en el día 140 de la gestación
 Grupo 3: Infectado antes de la cubrición y en el día 140 de la gestación
 Grupo 4: Infectado antes de la cubrición

Cuando se analizó la evolución del reconocimiento de la p-17 a lo largo del tiempo para los cuatro grupos de reproductoras incluidos en el estudio, se rechazaron las tres hipótesis nulas planteadas en el diseño experimental. Hay diferencias significativas en el reconocimiento de la p-17 a lo largo del tiempo en función del grupo considerado ($P < 0,0001$).

Por otra parte, se detectó una evolución de los niveles de anticuerpos desarrollados frente a la p-17 a lo largo del tiempo ($P < 0,0001$). En concreto, estas diferencias correspondieron al periodo de tiempo transcurrido entre las semanas 0 y 1 ($P < 0,0001$) y entre las semanas 4 y 20 ($P < 0,0001$). Finalmente, se confirmó que esta evolución de los anticuerpos a lo largo del tiempo fue diferente, hecho que dependió del grupo analizado ($P < 0,0001$).

Así mismo, cuando se analizaron las variaciones existentes entre los cuatro grupos de reproductoras para cada una de las semanas analizadas también se obtuvieron diferencias significativas. Además, cuando se analizaron las variaciones existentes entre los tres grupos de reproductoras infectadas experimentalmente, excluyendo el grupo testigo, de nuevo las diferencias existentes fueron significativas tanto en el caso de la IFI como en el wb p-17, excepto cuando se compararon los valores de IFI en la semana 20, tal y como se refleja en la Tabla XXIV.

Tabla XXIV: Análisis estadístico de las variaciones inter-grupo en el título de anticuerpos por IFI y en el reconocimiento de la p-17 en las reproductoras infectadas experimentalmente.

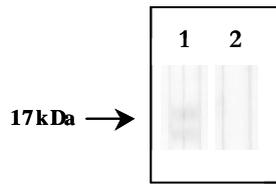
	Semana del muestreo							
	0		1		4		20	
	H	P	H	P	H	P	H	P
IFI	10,863	0,004	11,521	0,003	6,508	0,038	3,585	0,166
WB p-17	11,314	0,003	9,669	0,008	0,005	10,525	10,025	0,006

6.2.2. Terneros

6.2.2.1. Con infección natural

Las muestras precalostrales procedentes de terneros infectados congénitamente presentaron títulos moderados de anticuerpos específicos por IFI, así como un reconocimiento moderado de la p-17 por western blot (Fig. 20). En las muestras precalostrales procedentes de terneros sin infección congénita no se detectaron anticuerpos específicos por IFI ni por western blot.

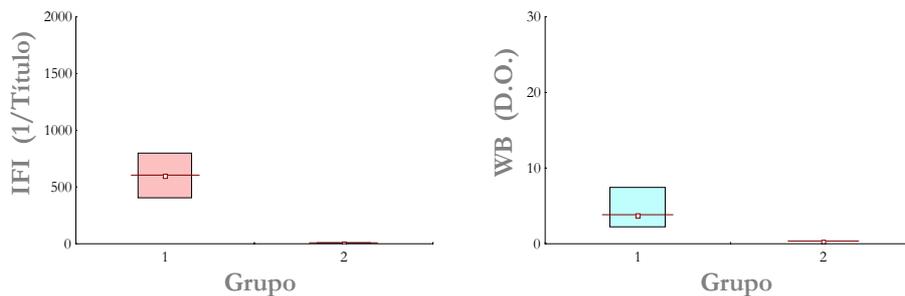
Figura 20: Reconocimiento de la p-17 por IgG de muestras precalostrales de terneros.



- 1 Muestra precalostrales de ternero con infección congénita
- 2 Muestra precalostrales de terneros sin infección congénita

Los valores de los títulos de anticuerpos obtenidos con las muestras positivas y con las muestras negativas muestran la misma tendencia que los valores de D.O. obtenidos en el wb p-17, ya que títulos de anticuerpos moderados coinciden con valores moderados de D.O. y los títulos de anticuerpos negativos por IFI coincidieron con la falta de reconocimiento de la p-17 (Fig. 21).

Figura 21: Anticuerpos específicos detectados en terneros con infección natural mediante IFI y wb-17. (Representación de medianas \pm cuartiles).



- 1: Muestras precalostrales de terneros con infección congénita
- 2: Muestras precalostrales de terneros sin infección congénita

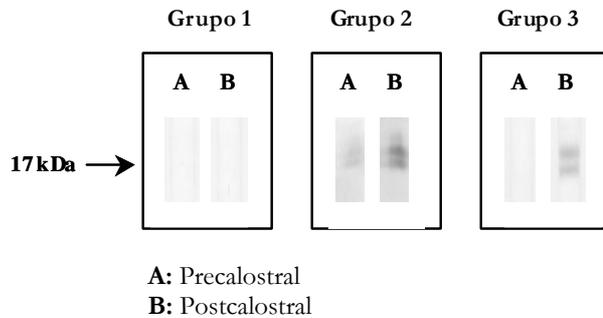
6.2.2.2. Con infección experimental

Del mismo modo que en las reproductoras, se estudiaron los títulos de anticuerpos específicos por IFI y el reconocimiento de la proteína por western blot.

En el estudio de la serología precalostrales, únicamente, se detectaron anticuerpos específicos por IFI y frente a la p-17 por western blot en las muestras de los terneros procedentes de las reproductoras del grupo 2. En el estudio de serología calostrales, los terneros procedentes de las reproductoras de los grupos 2 y 3 presentaron anticuerpos específicos en

ambas pruebas serológicas. Por otra parte, en los terneros procedentes del grupo testigo no se detectaron anticuerpos específicos ni en la serología precalostral ni calostral (Fig. 22).

Figura 22: Reconocimiento de la p-17 por IgG de terneros con reproductoras infectadas experimentalmente.

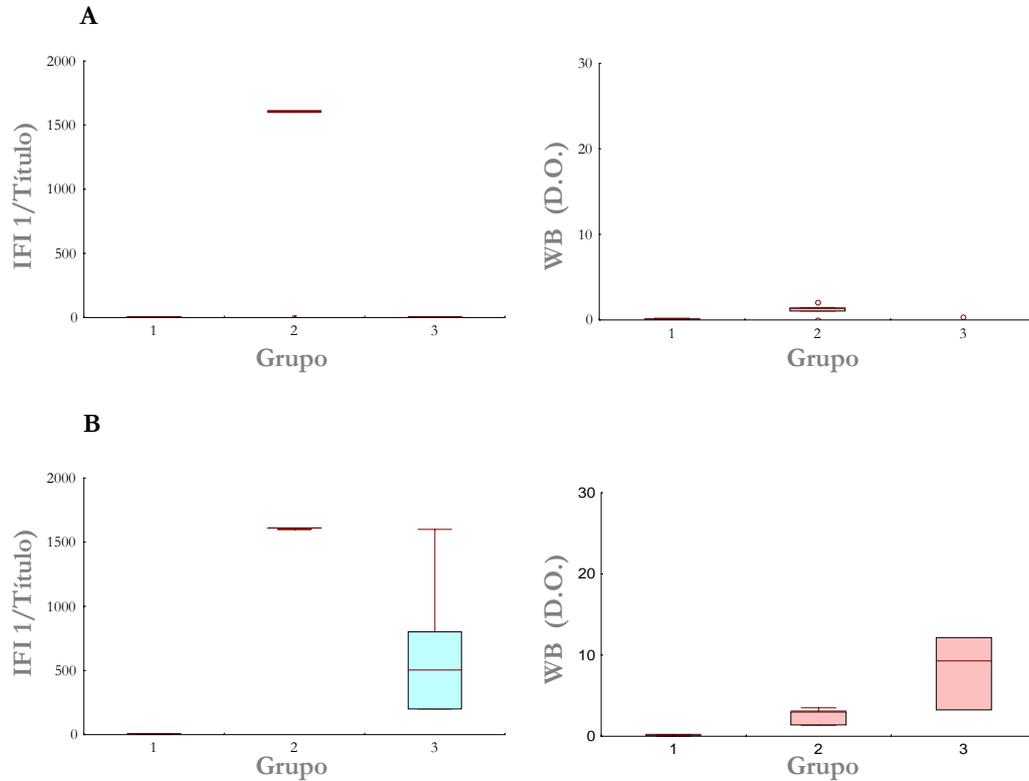


Cuando se analizó la evolución del reconocimiento de la p-17 a lo largo del tiempo de forma global para los tres grupos de terneros, al igual que en el caso de las reproductoras se rechazaron las tres hipótesis nulas planteadas en el diseño experimental. Hay diferencias significativas en el reconocimiento de la p-17 a lo largo del tiempo en función del grupo considerado ($P < 0,05$). Así mismo, existe una evolución significativa de los niveles de anticuerpos a lo largo del tiempo ($P < 0,0001$), la cual, a su vez, depende del grupo analizado ($P < 0,0001$).

Cuando se analizaron las variaciones existentes entre los tres grupos de terneros (variaciones inter-grupo) para la serología precalostral y calostral, en ambos casos se obtuvieron diferencias significativas ($H=6$, $P < 0,01$; $H=11$, $P < 0,01$, respectivamente). Sin embargo, entre la serología calostral del grupo 2 y del 3 no se observaron diferencias significativas, ya que ambos grupos reconocieron la p-17 con una intensidad moderada ($P > 0,05$).

Figura 23: Anticuerpos específicos detectados en terneros con reproductoras infectadas experimentalmente mediante IFI y wb-17. (Representación de medianas \pm cuartiles)

A: Muestras precalostrales; B: Muestras calostrales

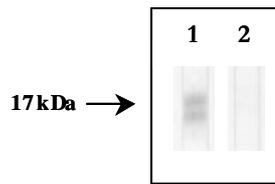


- 1: Terneros con madres testigo del grupo 1
- 2: Terneros con madres infectadas experimentalmente del grupo 2
- 3: Terneros con madres infectadas experimentalmente del grupo 3

6.2.3. Fetos

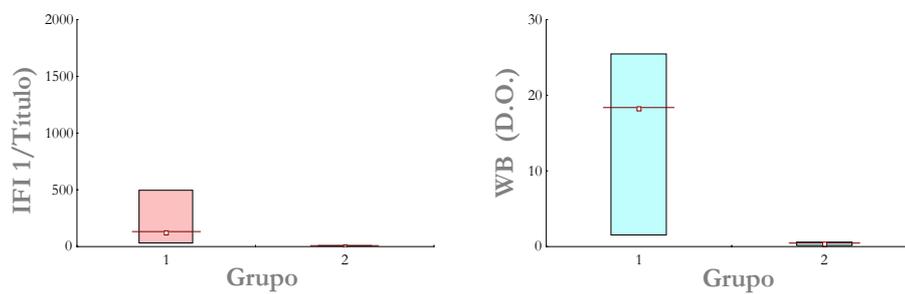
Se analizaron los títulos de anticuerpos por IFI junto con el reconocimiento de la p-17 en 9 fluidos fetales procedentes de fetos positivos (n=5) y negativos (n=4). En el caso de las muestras procedentes de fetos que habían abortado debido a una infección por *Neospora*, éstas reconocieron la p-17 kDa con una intensidad moderada y también presentaron títulos de anticuerpos por IFI moderados (Fig. 24 y 25). En las muestras de fetos abortados por otras causas no se detectaron anticuerpos específicos en ninguna de las dos pruebas serológicas.

Figura 24: Reconocimiento de la p-17 por IgG de fetos abortados.



- 1 Muestra de feto abortado debido a la infección por *Neospora*
- 2 Muestra de feto abortado por otras causas

Figura 25: Anticuerpos específicos detectados en fetos abortados mediante IFI y wb-17. (Representación de medianas \pm cuartiles)



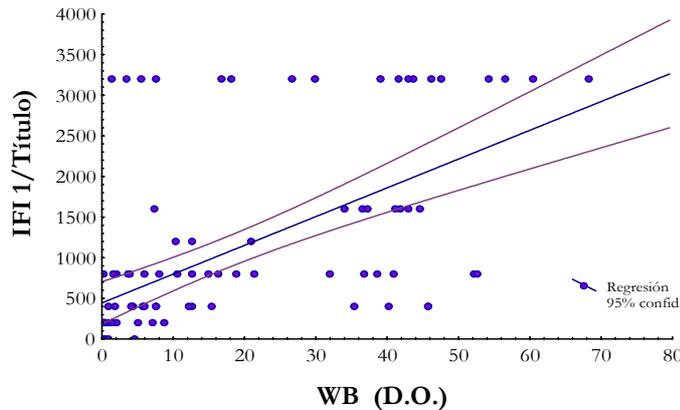
- 1: Grupo de fetos abortados debido a la infección por *Neospora*
- 2: Grupo de fetos abortados debido a otras causas

Finalmente, no se encontraron diferencias significativas en relación a los títulos de anticuerpos y al reconocimiento de la p-17 cuando se compararon los distintos grupos de animales con infección natural -reproductoras, terneros precalostrales y fetos-, si bien el grupo de reproductoras presentó los mayores títulos y la mayor intensidad de reconocimiento de la p-17.

6.2.4. Estudio comparativo de la IFI y el western blot p-17

Cuando se compararon ambas pruebas serológicas, en ningún caso se obtuvieron buenos coeficientes de correlación. El mejor dato de correlación se obtuvo en el caso de las reproductoras con un valor de r^2 de 0,375. Sin embargo, en el caso de los terneros los resultados fueron notablemente peores, obteniéndose un valor de r^2 de 0,062, muy alejado del valor máximo de correlación (1). En ambos casos el análisis de regresión simple fue estadísticamente significativo ($P < 0,05$).

Figura 26: Correlación entre títulos de IFI y valores de D.O. del wb-p17.



Cuando se estableció el grado de concordancia entre ambas pruebas serológicas -la IFI y el western blot- en todos los casos se obtuvo un valor de κ elevado (Tabla XXV).

Tabla XXV: Concordancia (κ) entre la IFI y el wb p-17.

	Reproductoras	Terneros	Reproductoras-terneros-fetos
κ	0,78	0,89	0,86
C.O.	0,92	0,94	0,94
C.E.	0,63	0,49	0,57

C.O.: Concordancia observada
C.E.: Concordancia esperada

6.3. DISCUSIÓN

La fracción proteica de 17 kDa, electroeluída a partir de extracto soluble de proteínas de taquizoítos de *N. caninum*, fue empleada con éxito en la prueba serológica de western blot detectándose los anticuerpos específicos frente a *Neospora* presentes en el suero de animales con infección natural y experimental. El empleo de esta fracción proteica permitió evaluar de forma cuantitativa la respuesta de anticuerpos específicos desarrollada por los distintos grupos de animales infectados. Recientemente, se han realizado aproximaciones similares en otras parasitosis con el objetivo identificar y evaluar el potencial diagnóstico de los antígenos de interés. En estos estudios los antígenos de interés fueron purificados a partir de extracto soluble de proteínas y, posteriormente, evaluados cuantitativamente mediante su empleo en la prueba serológica de dot-blot ELISA. Tanto en el diagnóstico de la fasciolosis (Attallah *et al.*,

2002) como en el de la triquinelosis (Srimanote *et al.*, 2000) el dot-blot ELISA basado en el empleo de antígenos purificados presentó una especificidad muy elevada, resultando ser en el caso de la triquinelosis la prueba diagnóstica de elección. Por otra parte, el empleo de proteína nativa en lugar de proteína recombinante en la prueba diagnóstica permite evaluar su potencial diagnóstico con una mayor fiabilidad, puesto que las modificaciones postraslacionales y conformacionales presentes en las proteínas recombinantes pueden ser diferentes a las de la proteína nativa, lo cual podría influir notablemente en la inmunogenicidad de dicha proteína.

La naturaleza inmunodominante de la p-17, junto con los resultados obtenidos en el presente capítulo, sugieren que este antígeno podría ser un candidato ideal para el desarrollo de pruebas serológicas altamente sensibles y específicas, puesto que un antígeno adecuado para el inmunodiagnóstico debe inducir una fuerte respuesta inmune humoral (Hemphill *et al.*, 1999). En este sentido, Schares *et al.* (2000) han sugerido que las pruebas serológicas basadas en un único IDA podrían ser superiores en términos de repetibilidad y reproducibilidad en comparación a otras pruebas basadas en mezclas de varios antígenos. Hasta el momento, se han desarrollado pruebas ELISA basadas en el empleo de un único antígeno, como es el caso de los antígenos recombinantes -GRA6 y GRA7 (Lally *et al.*, 1996b; Jenkins *et al.*, 1997), N54 y N57 (Louie *et al.*, 1997) y p29 (Howe *et al.*, 2002)- y una proteína purificada por afinidad de 38 kDa (Scharas *et al.*, 2000, 2002a), obteniéndose con todos ellos elevados valores de sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la neosporosis bovina en animales adultos. Estos mismos antígenos podrían, a su vez, emplearse en las pruebas serológicas de estudios de prevalencia, tal y como han demostrado los resultados obtenidos por Schares *et al.* (2000, 2002a) y por Kimbita *et al.* (2001) con las proteínas SRS2 y SAG1 de *N. caninum* y de *T. gondii*, respectivamente. Sin embargo, hasta el momento, en el diagnóstico de la neosporosis bovina no se ha empleado ningún antígeno con un peso molecular similar a la p-17, si bien se han empleado con éxito antígenos de peso molecular similar en el diagnóstico de infecciones por parásitos cercanos a *Neospora* en la escala filogenética, como es el caso de la criptosporidiosis. Priest *et al.* (1999) emplearon en una prueba ELISA una fracción nativa de 17 kDa purificada a partir de extracto crudo de ooquistes sonicados para el diagnóstico de la criptosporidiosis humana obteniendo una elevada sensibilidad y especificidad. Por otra parte, debido a la naturaleza inmunodominante de la fracción de 17-18 kDa también sería interesante considerar el empleo conjunto de dicha fracción con alguno de los antígenos que ya han sido empleados en la prueba ELISA, lo cual podría suponer un aumento de la sensibilidad de las pruebas ya establecidas sin que ello conlleve una disminución de la especificidad. En este sentido, se han

realizado diversos trabajos sobre el diagnóstico de la toxoplasmosis humana que emplean en la prueba ELISA una combinación de varios antígenos recombinantes, cuyos resultados apoyarían nuestra teoría. Lecordier *et al.* (2000) desarrollaron una prueba ELISA basada en el empleo de una mezcla de dos antígenos recombinantes -GRA1 y GRA6- obteniendo un valor de sensibilidad más elevado que cuando los dos antígenos fueron empleados de forma independiente. Así mismo, simultáneamente, Li *et al.* (2000) desarrollaron otra prueba ELISA en el que emplearon una combinación de cuatro antígenos recombinantes -rp22, rp25, rp29 y rp35-, lo cual resultó de gran utilidad no solo para el diagnóstico de la infección sino también para diferenciar entre infección reciente e infección crónica.

El empleo de la fracción antigénica de 17 kDa permitió detectar diferencias significativas en el reconocimiento entre los diferentes grupos de bovinos infectados natural y experimentalmente. En ambos casos hay que destacar la importancia del análisis de varias muestras recogidas de forma secuencial procedentes de un mismo animal, puesto que la validación de antígenos con potencial uso diagnóstico debe incluir no solo un elevado número de muestras sino también muestras seriadas de los animales infectados con el objetivo de evaluar la respuesta de los anticuerpos específicos frente a estos antígenos a lo largo del tiempo (Lally *et al.*, 1996b). Por otra parte, la determinación del nivel de anticuerpos específicos en una única muestra de suero aportaría escasa información sobre la causa del aborto y no resultaría de ayuda salvo que el título de anticuerpos fuese excepcionalmente elevado o no se detectasen anticuerpos específicos. Por otra parte, cabe destacar la elevada especificidad y sensibilidad que se obtuvo con la fracción proteica de 17 kDa cuando se analizaron muestras procedentes de diferentes grupos de edad, puesto que una de las principales limitaciones de la serología basada en el empleo de un único antígeno es la falta de sensibilidad en función de la edad del animal. Hasta el momento, las pruebas ELISA que se han desarrollado basadas en la utilización de un único antígeno han sido validados con muestras de animales adultos tanto con infección natural como experimental. Sin embargo, tan solo la prueba ELISA que empleaba como antígeno una combinación de las proteínas GRA6 y GRA7 (Wouda *et al.*, 1998a), fue utilizada en un estudio de comparación de técnicas serológicas en el que se incluyó muestras de animales con infección natural procedentes tanto de animales adultos como de fetos abortados. En dicho estudio cuando se analizaron las muestras fetales no se obtuvieron valores de correlación elevados con respecto a otras pruebas de ELISA que empleaban como antígeno la fracción soluble de taquizoítos, mientras que los resultados obtenidos con las muestras procedentes de animales adultos fueron satisfactorios.

Al analizar las muestras de reproductoras con infección natural, los resultados obtenidos al emplear la IFI y el wb p-17 mostraron la misma tendencia. En las reproductoras que presentaron aborto se detectaron títulos de anticuerpos y los valores de D.O. notablemente superiores en el momento del aborto comparados con los correspondientes a las muestras recogidas seis meses anteriores o posteriores al aborto. Aunque la etiología del aborto no pudo confirmarse en ningún caso, tanto el origen de los animales, los cuales procedían de granjas con un problema de fallo reproductivo debido a la infección por *N. caninum*, así como su estado serológico serían factores bastante indicativos de una infección por *N. caninum* como causa del aborto. En este sentido, se han publicado diversos estudios que confirmarían nuestra hipótesis, en los cuales se describe que el riesgo de aborto es dos o tres veces más elevado en reproductoras seropositivas en comparación a las reproductoras seronegativas (Dubey *et al.*, 1997; Paré *et al.*, 1997, Moen *et al.*, 1998). Por otra parte, el elevado reconocimiento de la p-17 en western blot en el momento del aborto nos induce a pensar que la intensa detección de dicha fracción proteica podría resultar de utilidad para predecir el aborto, del mismo modo que ha sido sugerido para los títulos elevados de IFI (Quintanilla-Gozalet *et al.*, 2000).

Por lo que se refiere a las reproductoras persistentemente infectadas que no presentaron aborto, en éstas no se apreciaron diferencias en los niveles de anticuerpos de los dos muestreos incluidos en nuestro estudio. Estos resultados sugieren que durante este periodo de tiempo no se produjo recrudescencia de la infección, la cual está asociada a fluctuaciones de anticuerpos y que los animales permanecieron crónicamente infectados con niveles de anticuerpos bajos cercanos al punto de corte considerado. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por diversos autores, los cuales han detectado fluctuaciones de anticuerpos en animales persistentemente infectados a lo largo de la gestación, a veces con valores por debajo del punto de corte empleado (Conrad *et al.*, 1993b; Jenkins *et al.*, 1997; Stenlund *et al.*, 1999).

En relación a las diferencias observadas entre los dos grupos de reproductoras infectadas naturalmente y, de acuerdo con lo expuesto anteriormente, la intensidad de reconocimiento de la proteína estuvo relacionada directamente con los niveles de anticuerpos detectados en la prueba de IFI, ya que la mayor intensidad de reconocimiento de la banda observada en los animales que presentaron aborto coincidió con valores más elevados de D.O. detectados en la prueba de IFI en comparación con las reproductoras infectadas que no

presentaron sintomatología. Estas diferencias observadas entre las reproductoras infectadas que presentaron aborto y las que no abortaron ya han sido previamente observadas por Quintanilla-Gozalo *et al.* (2000), en cuyo estudio los mayores títulos de anticuerpos correspondieron a las vacas que habían presentado aborto en comparación a las no abortadas durante el periodo de gestación donde tiene lugar el mayor número de abortos, entre los cuatro y los siete meses de gestación. Por otra parte, Schares *et al.* (1998) encontraron diferencias significativas entre hembras mayores de dos años que habían abortado y las que no habían abortado. Los resultados preliminares obtenidos en este estudio nos inducen a sugerir la posible utilidad de la fracción de 17 kDa para diferenciar entre infección reciente e infección crónica, puesto que uno de los requerimientos de una prueba serológica es la habilidad para discriminar entre las hembras que se encuentran con riesgo de presentar aborto, aquellas que han abortado debido a la infección por *N. caninum* de aquellos animales que no lo han hecho. En este sentido, resultados similares fueron obtenidos por Priest *et al.* (1999), en cuyo estudio se empleó para el diagnóstico de la criptosporidiosis humana una fracción purificada de 17 kDa en una prueba ELISA y en el cual, si bien las diferencias no fueron significativas, los mayores valores de D.O. correspondieron a pacientes sintomáticos en comparación a los pacientes que no presentaron ningún tipo de sintomatología asociada a la infección. Por lo que se refiere al diagnóstico de la toxoplasmosis, Suzuki *et al.* (2000) obtuvieron buenos resultados cuando realizaron un estudio sobre el diagnóstico serológico de la fase aguda de la toxoplasmosis humana, en el cual se empleó un único antígeno. En dicho estudio, se obtuvo una mayor especificidad en la detección de IgM durante la fase aguda de la infección cuando se empleó como antígeno en una prueba ELISA una proteína de 35 kDa en comparación al empleo de extracto crudo de taquizoítos. En lo referente al diagnóstico de la neosporosis bovina tan solo se ha desarrollado una prueba serológica basada en el empleo de un único antígeno, la proteína de superficie purificada por afinidad de 38 kDa, la cual se empleó para diferenciar rebaños que presentaban aborto epidémico asociado a infección reciente de rebaños con aborto endémico asociado a infección crónica (Scharés *et al.*, 2000; 2002a).

Por lo que se refiere a las reproductoras infectadas experimentalmente, los resultados obtenidos coinciden, en parte, con los obtenidos por otros autores en infecciones naturales, salvo en los resultados concernientes a la transmisión vertical. En el modelo de infección natural se observó un aumento de los niveles de anticuerpos hacia el segundo tercio de gestación relacionado con una posible recrudescencia de la infección y coincidiendo con el momento de la reinfección descrito en las infecciones experimentales (Williams *et al.*, 2000).

En este sentido, los resultados obtenidos en el presente estudio correspondientes al grupo 3 demostraron un incremento de los anticuerpos específicos transcurrida la primera semana después de la reinfección, cuyos niveles se mantuvieron estables y elevados descendiendo ligeramente en el momento del parto. Sin embargo, estos elevados niveles de anticuerpos detectados en las reproductoras infectadas naturalmente están asociados a transmisión vertical (Pereira-Bueno *et al.*, 2000), lo cual sugiere que los anticuerpos no son protectores frente al aborto y son indicativos de una máxima exposición al parásito. Por el contrario, en las reproductoras infectadas experimentalmente los elevados niveles de anticuerpos podrían estar relacionados con una inmunidad humoral protectora desarrollada en combinación con una respuesta inmune de base celular (Innes *et al.*, 2001b). Esta última suposición estaría apoyada por los resultados obtenidos en los otros dos grupos de reproductoras infectadas experimentalmente, el grupo de animales infectados al comienzo de la gestación que no fueron re infectados (grupo 4) y el grupo de reproductoras únicamente infectadas en el día 140 de gestación (grupo 2). El grupo 4 no transmitió la infección a la descendencia y los títulos de anticuerpos se mantuvieron más o menos estables y elevados durante el periodo de gestación estudiado (a partir del día 140) hasta el momento del parto. En el grupo 2, que transmitió la infección a la descendencia, los niveles de anticuerpos empezaron a aumentar notablemente a partir de la semana 4 p.i. manteniéndose considerablemente más bajos que en los dos grupos de reproductoras anteriormente citados. Como los resultados obtenidos en el modelo experimental, aún siendo parecidos al modelo natural, discrepan en aspectos importantes, como es el caso de la transmisión vertical, no podemos afirmar con seguridad que los anticuerpos dirigidos frente a la fracción de 17 kDa tengan un efecto protector frente a la transmisión vertical y al aborto. Sin embargo, los anticuerpos dirigidos frente a la fracción de 17-18 kDa constituyen una fracción mayoritaria de IgG específicas, producidas por los animales infectados por *N. caninum*, interesante desde el punto de vista diagnóstico.

De acuerdo con esta hipótesis podemos destacar los resultados obtenidos en el trabajo realizado por Haumon *et al.* (2000), en el cual los anticuerpos producidos frente a una proteína de superficie inmunodominante de *T. gondii*, la SAG1, no presentaron un papel protector crucial frente a la mortalidad fetal y a la transmisión materno-fetal. Sin embargo, no se descartó el empleo de este antígeno como candidato vacunal puesto que combinado con un adyuvante adecuado estimuló una respuesta inmune Th1 confiriendo protección frente a la infección. Por otra parte, en relación a la utilidad de una proteína de 17 kDa de *Cryptosporidium parvum* en el estudio realizado por Moss *et al.* (1998) se comprobó que las IgG desarrolladas

frente a la proteína de 17 kDa de *C. parvum* son capaces de prevenir la enfermedad, pero no la infección, mientras que Strong *et al.* (2000) señalaron la utilidad diagnóstica y el posible efecto protector del grupo de IDAs de 15 kDa.

En nuestro caso, el empleo de la p-17 permitió detectar anticuerpos específicos no solo en fluidos fetales que presentaron títulos de anticuerpos bajos en la prueba de IFI, sino también en muestras precalostrales procedentes de terneros infectados congénitamente. Por ello, el empleo de la p-17 permite detectar anticuerpos específicos en los diferentes grupos de edad con interés en la neosporosis bovina, ya que los adultos y los fetos son las dos poblaciones bovinas más importantes desde el punto de vista del diagnóstico junto con los terneros precalostrales, los cuales constituyen una población interesante desde el punto de vista del control de la transmisión vertical, tal y como sugirieron Thurmond & Hietala (1995). Nuestros resultados confirman las suposiciones realizadas por Louie *et al.* (1997), en cuyo trabajo ya se indicó el posible valor diagnóstico de una fracción de 17 kDa en la neosporosis bovina. En dicho estudio todos los sueros de animales infectados naturalmente reconocieron una banda intensa de 17 kDa, e incluso en aquellas muestras que presentaban una señal disminuida en el western blot, la banda de 17 kDa permaneció como un IDA. Los resultados obtenidos con la fracción purificada de 17 kDa apoyan y complementan los resultados obtenidos en el apartado 5, donde el antígeno de 17-18 kDa parece ser un buen candidato para el establecimiento de una prueba diagnóstica basada en un único antígeno en la que se empleen muestras procedentes de diferentes grupos de edad bovinos. Sin embargo, no hay que olvidar la importancia del antígeno de 37 kDa en la serología fetal, el cual también fue detectado con una intensidad muy elevada en condiciones no reductoras por Söndgen *et al.* (2001) y que debería tenerse en cuenta a la hora de desarrollar pruebas serológicas basadas en un único antígeno.

En cuanto al estudio comparativo realizado entre la IFI y el western blot, los resultados de concordancia obtenidos entre ambas pruebas ponen de manifiesto la elevada eficacia diagnóstica de la prueba de western blot que emplea como único antígeno la fracción de 17 kDa, a pesar de la baja correlación obtenida. Hay que destacar la elevada concordancia existente entre el reconocimiento de la banda de 17 kDa y los títulos de anticuerpos específicos, la cual fue observada de una manera muy notable tanto en las muestras procedentes de reproductoras y terneros estudiadas de forma individual, así como cuando se consideró en el estudio el conjunto de muestras procedentes de los tres grupos de edad. Los

resultados de concordancia obtenidos por diversos autores entre diferentes técnicas serológicas han sido muy variables, detectándose en algunos casos una concordancia moderada entre técnicas serológicas similares. De este modo, en el estudio realizado por Dubey *et al.* (1997) en el que se compararon 6 pruebas serológicas diferentes, el mejor valor de concordancia ($\kappa=0,89$) se obtuvo entre un ELISA basado en el empleo de partículas “iscoms” y un ELISA que empleaba antígeno soluble. Así mismo, Jenkins *et al.* (2000) compararon 5 pruebas serológicas de las cuales tan solo la IFI y el “iscom” ELISA presentaron una concordancia moderada ($\kappa=0,72$). Por otra parte, cuando Schares *et al.* (1999c) y Söndgen *et al.* (2001) compararon el western blot y la IFI cuando se analizaron muestras de reproductoras y fetos se obtuvieron valores de concordancia bajos en ambos casos. La elevada concordancia observada en el presente trabajo entre la IFI y el wb p-17 posibilitó que las variaciones en los títulos de anticuerpos observadas en los diferentes grupos de animales infectados natural y experimentalmente coincidieran, en la mayoría de los casos, con las observadas en intensidad de reconocimiento de la p-17. Además, cuando se analizaron las muestras procedentes de reproductoras infectadas experimentalmente, los resultados obtenidos mediante las dos técnicas serológicas empleadas en el presente estudio, IFI y western blot, fueron muy similares a los obtenidos por Innes *et al.* (2001b) mediante la técnica de ELISA. Por otra parte, los resultados del estudio de regresión ponen de manifiesto la dificultad de establecer una correlación entre los valores cuantitativos de la IFI y del western blot, sin que esto conlleve una disminución de la sensibilidad y/o especificidad de cualquiera de las pruebas. Con anterioridad, diversos autores han obtenido valores de correlación bajos, especialmente notables cuando las pruebas serológicas comparadas empleaban preparaciones antigénicas diferentes (Björkman *et al.*, 1994; Schares *et al.*, 1999a).

Aunque esta parte de nuestro trabajo no incluyó el estudio de la localización celular de la fracción de 17-18 kDa, en principio y de acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores, éste no sería un factor determinante de la inmunogenicidad de la proteína y, por tanto, de su potencial diagnóstico, ya que se han empleado con éxito en el desarrollo de pruebas serológicas para el diagnóstico de la neosporosis bovina proteínas tanto de origen intracelular como de membrana. Un antígeno de 17 kDa de *N. caninum* ha sido detectado en las roptrias (Bjerkas *et al.*, 1994) y en la membrana del taquizoíto (Björkman *et al.*, 1994; Schares *et al.*, 1999b), sin embargo, la localización de las posibles proteínas componentes de esta fracción de 17 kDa se desconoce hasta el momento. Se han descrito dos IDAs de superficie -SAG1 y SRS2- en *N. caninum*, de los cuales tan solo uno de ellos, la proteína SRS2,

ha sido empleado con éxito en la prueba ELISA (Schaes *et al.*, 2000; 2002a). Sin embargo, otros antígenos de origen intracitoplasmático, procedentes de organelas como los gránulos densos -GRA6 y GRA7- también han demostrado un alto valor diagnóstico cuando fueron empleados en el diagnóstico de la neosporosis bovina (Lally *et al.*, 1996b; Jenkins *et al.*, 1997; Wouda *et al.*, 1998a). En el diagnóstico serológico de la toxoplasmosis en diversas especies animales y en humanos se han empleado no solo IDAs de superficie, como la proteína SAG 1 (Kimbata *et al.*, 2001), sino que también antígenos intracitoplasmáticos procedentes de las organelas características del complejo apical de los protozoos apicomplexa, como los gránulos densos -GRA1, GRA6 (Lecordier *et al.*, 2000) y GRA7 (Jacobs *et al.*, 1999)- y roptrias -una proteína de 54 kDa (van Gelder *et al.*, 1993).

En conclusión, la fracción de 17 kDa podría reemplazar el empleo del extracto crudo de taquizoítos en las pruebas serológicas, puesto que los anticuerpos específicos dirigidos frente a la fracción de 17 kDa constituyen una fracción de IgGs mayoritaria en los animales infectados. Para ello, la evaluación previa de una prueba ELISA recombinante que emplee como antígeno alguno de los componentes antigénicos de la fracción de 17 kDa debería confirmar los resultados obtenidos en esta parte del estudio.

**7. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS
cDNAs DE *N. caninum* RECONOCIDOS POR
ANTICUERPOS DESARROLLADOS FRENTE A LA p-17.**

El objetivo de esta parte del estudio consistió en la búsqueda de los genes que codifican los componentes proteicos de la fracción p-17 mediante la construcción y cribado de una genoteca de cDNA de taquizoítos de *N. caninum*. La elección de dicha proteína vino determinada por su importante papel inmunodiagnóstico en los animales infectados de forma natural y experimental, de acuerdo con los resultados obtenidos en los apartados 5 y 6. Se desconoce, por el momento, la composición proteica de la p-17 y no ha sido utilizada, hasta la fecha, ni con fines diagnósticos ni vacunales.

La mayoría de los estudios en los que se han identificado y clonado genes de *N. caninum* se han realizado mediante el análisis de un conjunto de fragmentos de ácidos nucleicos que representan todo o una parte del genoma y que constituyen las denominadas genotecas recombinantes. En el caso de *N. caninum*, el análisis de genotecas de cDNA ha permitido un crecimiento exponencial del conocimiento de su genoma, identificándose genes con interés en la adhesión e invasión celular y en el inmunodiagnóstico.

En esta parte del trabajo nos propusimos identificar y caracterizar los cDNAs de *N. caninum* que fueron reconocidos por el APA-17. La proyección de este trabajo, en un futuro próximo, sería su utilización para la expresión de proteínas recombinantes, que pudieran emplearse en una prueba de ELISA. En nuestro estudio, la identificación de cDNAs de interés se realizó mediante el cribado de una genoteca de cDNA utilizando un suero policlonal desarrollado frente a la p-17. Para ello, se siguieron los siguientes pasos:

- Estudio de la composición glucídica de la p-17.
- Obtención y selección de los anticuerpos empleados en el cribado de la genoteca.
- Construcción de una genoteca de cDNA del taquizoíto de *N. caninum*.
- Aislamiento e identificación de los clones reconocidos por el suero policlonal (APA-17).
- Caracterización de los cDNAs aislados.

7.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

7.1.1. Estudio de la composición glucídica de la p-17

El estudio de la presencia y participación en la respuesta inmune humoral de los epítomos de naturaleza glucídica en la p-17 es un paso aconsejable antes de realizar la construcción y el cribado de la genoteca de cDNA de taquizoítos de *N. caninum* con el objetivo de identificar posibles candidatos para el inmunodiagnóstico, puesto que si las proteínas recombinantes son expresadas en *E. coli*, éstas no presentarán las modificaciones postraduccionales de las proteínas nativas, como es el caso de las glicosilaciones. Por ello, se realizó el estudio de deglicosilación química como paso previo a la construcción de la genoteca de cDNA, siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.6.4.

7.1.2. Obtención y selección de los anticuerpos empleados en el cribado de la genoteca

Con el objetivo de seleccionar aquellos anticuerpos más apropiados para realizar el cribado de la genoteca, se estudió el reconocimiento de la p-17, analizándose dos anticuerpos monoclonales que reconocían proteínas de peso molecular similar, 18 y 19 kDa (NcMab7 y Mab 4.7.12, respectivamente) junto con un anticuerpo policlonal que se denominó APA-17. El anticuerpo monoclonal Mab 4.7.12. producido frente a una proteína de superficie de 19 kDa en cultivos de hibridomas de ratón (Schaes *et al.*, 1999b), fue amablemente cedido por el Dr. Gereon Schaes (Institut für Epidemiologische Diagnostik, Wusterhausen, Alemania). El anticuerpo monoclonal NcMab7, amablemente cedido por el Dr. Jens Mattsson (Swedish University of Agricultural Sciences; Uppsala, Suecia), fue obtenido en cultivos de hibridomas de ratón y reconocía una proteína de membrana de 19 kDa. El APA-17, el cual fue purificado por afinidad frente a la p-17, fue obtenido en nuestro laboratorio a partir de suero policlonal de conejo siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.8. Debido a que la p-17 podría estar compuesta por varias proteínas, se decidió purificar anticuerpos frente a la fracción completa a partir de suero policlonal de conejo, que permitirían identificar un mayor número de genes que codificaran las proteínas presentes en dicha fracción.

7.1.3. Construcción de una genoteca de cDNA del taquizoíto de *N. caninum*

Una vez que se comprobó que los epítomos de naturaleza glucídica no intervienen de manera decisiva en el reconocimiento del antígeno de interés por parte de los anticuerpos específicos, el siguiente paso para la identificación de los genes codificantes de proteínas presentes en esta fracción fue la construcción de una genoteca de cDNA de taquizoítos de *N. caninum* (apartado 3.9.3.).

El mRNA se obtuvo a partir de RNA total procedente de taquizoítos del aislado NC-1 de *N. caninum*. Para ello, en primer lugar se estudió el rendimiento del aislamiento del RNA total obtenido mediante el empleo de dos sistemas comerciales, el método de Promega y el método de Tripure®. Para ello, se calculó la cantidad de RNA total obtenida con cada método y se estimó de forma precisa el número de taquizoítos de *N. caninum* necesario para obtener 1 mg de RNA total necesario para realizar el aislamiento del mRNA con la prueba comercial FastTrack™ 2.0 (Invitrogen). El procedimiento seguido se ha descrito en el apartado 3.9.2.

En la construcción de la genoteca de cDNA se utilizó el sistema ZAP-cDNA® (Stratagene). La información de las proteínas del parásito codificada por el mRNA se tradujo a una doble cadena de DNA (cDNA). Una vez obtenidos estos cDNAs, se clonaron en un vector de expresión para su aislamiento y caracterización (genoteca de cDNA). El motivo de la elección del sistema ZAP-cDNA® se justificó por las siguientes razones:

- Las soluciones y el material proporcionado por el fabricante están libres de nucleasas, lo que proporciona una seguridad adicional en el manejo.
- Existe una optimización de la cantidad necesaria de material genético en cada uno de los pasos.
- Hay una clonación direccional de los fragmentos de cDNA mediante la introducción en los extremos del cDNA de sitios de restricción Xho I y EcoR I, tal y como se ha descrito en los apartados 3.9.3.2.

La síntesis de la primera cadena de cDNA, se hizo en presencia de 5-metil dCTP para evitar el reconocimiento de posibles dianas internas para las enzimas de restricción EcoR I y Xho I que se encuentran en los adaptadores.

El vector de expresión seleccionado para clonar los cDNAs fue λ -ZAP que posee el gen de la β -galactosidasa que nos permite la discriminación entre recombinantes y no recombinantes. Además, este tipo de vector posee las secuencias de los promotores T3 y T7 para la transcripción RNA lo que posibilita la transcripción *in vitro* de los cDNAs clonados. Es posible, igualmente, la inducción de proteínas de fusión gracias a la presencia del represor *lacZ*, el cual, bloquea la transcripción que tiene lugar desde el promotor *lacZ* en ausencia de IPTG, siendo de utilidad para el cribado de la genoteca con anticuerpos.

Los extractos de empaquetamiento (Gigapack III Gold®) aumentan el tamaño y la eficiencia de las genotecas construidas a partir de DNA metilado, empaquetando 5×10^6 recombinantes/ μ g del vector. El análisis de la genoteca de cDNA se realizó mediante titulación y determinación del tamaño medio de los fragmentos clonados.

7.1.4. Aislamiento e identificación de los clones reconocidos por el suero policlonal (APA-17).

El cribado de la genoteca de cDNA de *N. caninum* para la identificación de clones que expresaran proteínas reconocidas por el anticuerpo policlonal se realizó siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.9.4.

7.1.5. Caracterización de los cDNAs aislados.

Se analizaron un total de 200.000 clones recombinantes. Tras realizar varios cribados consecutivos de los clones positivos detectados con el anticuerpo específico se aislaron varios clones puros. Una vez comprobada la inmunodetección del clon recombinante puro se amplificaron al azar 10 clones presentes en la placa de agar mediante PCR empleando los cebadores universales T3 y T7 (apartado 3.9.5.). De esta forma, se comprobó que todos los clones recombinantes detectados por el anticuerpo presentaban un inserto recombinante de igual tamaño. El tamaño molecular de los cDNAs se determinó mediante PCR y su secuencia nucleotídica se obtuvo mediante secuenciación automática. Las diferentes secuencias obtenidas fueron analizadas realizando una búsqueda en las bases de datos del Genbank que incluía las ESTs de *N. caninum* obtenidas hasta la fecha. Otros estudios fueron realizados sobre las secuencias utilizando los paquetes informáticos mencionados en el apartado 3.9.8.

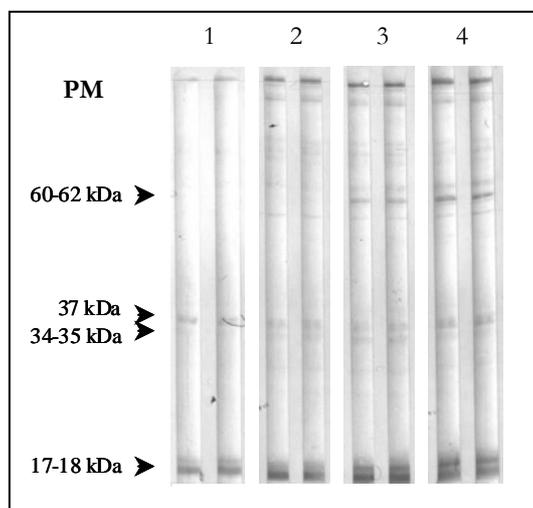
7.2. RESULTADOS

7.2.1. Estudio de la composición glucídica de la p-17

Tal y como se demuestra en la Figura 27, donde cada ensayo se realizó por duplicado, el tratamiento con periodato sódico disminuyó significativamente la reactividad en varios antígenos, hecho que fue significativamente más evidente cuando se emplearon concentraciones crecientes del reactivo. La reducción más notable en el reconocimiento antigénico correspondió a las proteínas localizadas en el rango de 60-62 kDa y a varios antígenos de alto peso molecular (>94 kDa). Con relación a los restantes antígenos inmunodominantes de *N. caninum*, la presencia de epítomos glucídicos influyó de manera menos drástica en la detección de las proteínas de 34-35 y 37 kDa, mientras que en la p-17 apenas se afectó su reconocimiento, hecho que por otra parte no descarta, totalmente, la presencia de posibles residuos de azúcares.

Figura 27: Deglicosilación química de las proteínas del taquizoíto de *N. caninum*:

1 y 2: Calles sometidas a la deglicosilación química con periodato sódico
3 y 4: Calles testigo no sometidas a la deglicosilación química



1: Incubación con acetato sódico y periodato sódico 20 mM

2: Incubación con acetato sódico y periodato sódico 10 mM

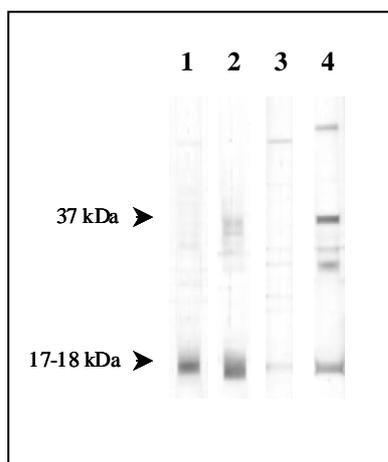
3: Incubación con acetato sódico y sin periodato sódico

4: Incubación sin acetato sódico y sin periodato sódico

7.2.2. Obtención y selección de los anticuerpos empleados en el cribado de la genoteca.

Cuando se analizó el reconocimiento de la p-17 en condiciones reductoras y no reductoras por parte de los dos anticuerpos monoclonales y el anticuerpo policlonal, se obtuvo una mayor intensidad y especificidad de reconocimiento por parte del anticuerpo policlonal APA-17, obtenido a partir de suero policlonal de conejo. El anticuerpo APA-17 detectó con una elevada intensidad y especificidad la proteína tanto en condiciones reductoras como no reductoras, a pesar de detectarse alguna reacción cruzada con varios antígenos localizados en el rango de 33-37 kDa en condiciones no reductoras (Fig. 28). Por lo que se refiere al anticuerpo monoclonal NcMab7, éste reconoció otro antígeno de mayor peso molecular en condiciones reductoras, mientras que en condiciones no reductoras reconoció con una intensidad elevada la p-17 junto con otros 3 antígenos de *N. caninum* de 29, 37 y 62 kDa. Cuando se comparó el reconocimiento de la p-17 kDa el anticuerpo monoclonal Mab-7 reconoció una banda más estrecha y con menor intensidad que el APA-17, el cual reconoció una fracción más ancha en el rango de 17-18 kDa. Finalmente, el anticuerpo monoclonal 4.7.12. detectó la p-17 con una intensidad muy leve en condiciones reductoras.

Figura 28: Reconocimiento de antígenos de *N. caninum* por anticuerpos específicos desarrollados frente a proteínas localizadas en la fracción de 17-18 kDa.



Pocillo 1: APA-17 (condiciones reductoras)
Pocillo 2: APA-17 (condiciones no reductoras)
Pocillo 3: NcMab 7 (condiciones reductoras)
Pocillo 4: NcMab 7 (condiciones no reductoras)

7.2.3. Construcción de una genoteca de cDNA del taquizoíto de *N. caninum*

La cantidad de RNA total obtenido a partir de los taquizoítos de *N. caninum* varió considerablemente en función del sistema comercial empleado. La comprobación de la calidad del RNA total y mRNA se llevó a cabo tras someter a electroforesis una alícuota del material obtenido en un gel de agarosa. La eficacia de cada método, así como la calidad del RNA extraído, queda reflejada en la Tabla XXVI y la Figura 29, respectivamente.

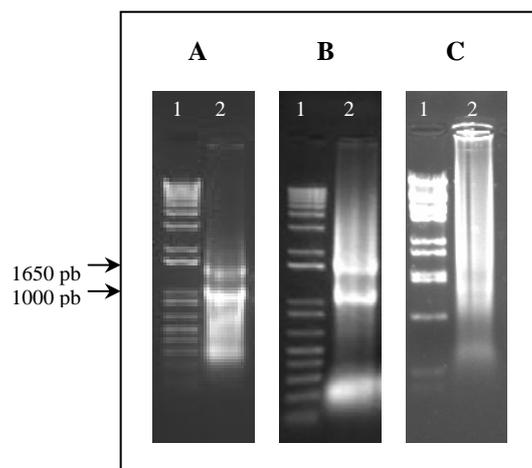
Tabla XXVI: Extracción del RNA total mediante el empleo de diversos sistemas comerciales.

	RNA Total	
	Promega	Tripure®
Nº de taquizoítos	4 x 10 ⁸	10 ⁸
µg RNA	30	87
Razón A ₂₆₀ / A ₂₈₀	2,02	1,79

El sistema de elección para realizar la extracción del RNA total fue el sistema Tripure®, con el cual se obtuvo una mayor cantidad de RNA total y de mejor calidad por la relación observada entre los RNAs ribosómicos. Para ello, se utilizaron 2 x 10⁹ taquizoítos para obtener el RNA total de partida necesario para iniciar el protocolo de aislamiento de mRNA utilizando el sistema Fast Track™2.0., obteniéndose en este último caso una cantidad total de 18 µg, tal como se determinó por espectrofotometría.

Figura 29: Perfil del RNA total y mRNA extraídos:

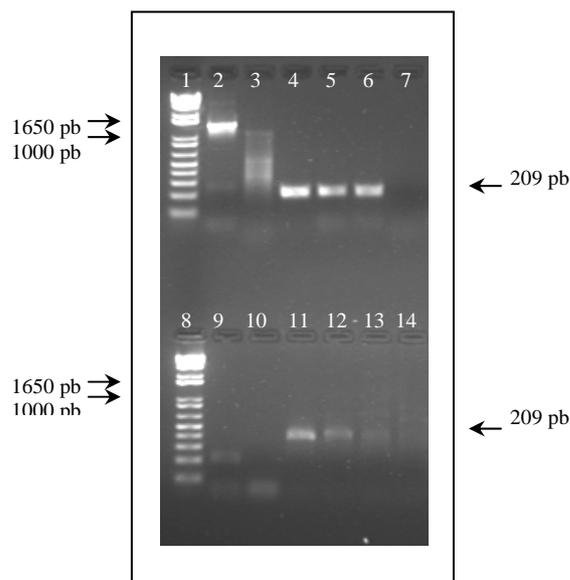
A: RNA total (Promega); B: RNA total (Tripure®); C: mRNA (Invitrogen)



Pocillo 1: Marcador de peso molecular de DNA;
Pocillo 2: RNA

La síntesis de la primera cadena de cDNA se realizó a partir del mRNA obtenido en el apartado anterior (véase apartado 3.9.3.1.). Con el objetivo de comprobar la síntesis del cDNA se emplearon dos parejas de cebadores, NcSUL1-NcSUL2 y NcSUL3-NcSUL4 (apartado 3.9.5.), que amplifican por PCR productos que contienen un tamaño distinto en el caso de amplificar cDNA o DNA genómico. Para ello, se amplificaron diluciones decimales seriadas del cDNA obteniéndose una mayor sensibilidad de la técnica con la pareja NcSUL1-NcSUL2 (Fig. 30).

Figura 30: Análisis de la síntesis del cDNA.

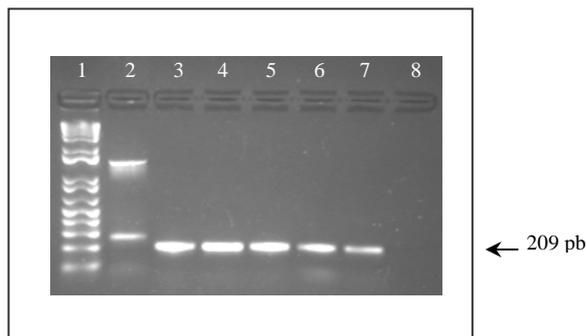


- Pocillos 1 y 8: Marcador de peso molecular de DNA;
 Pocillos 2, 4, 5, 6 y 9: PCR con cebadores Nc-SUL1 y Nc-SUL2
 2: DNA genómico
 4, 5, 6 y 9: cDNA dilución 1:10, 100, 1000, 10000, respectivamente
 7: Testigo negativo
 Pocillos 3, 10, 11, 12, 13 y 14: PCR con cebadores Nc-SUL3 y Nc-SUL4
 3: DNA genómico
 11, 12, 13 y 14: cDNA dilución 1:10, 100, 1000, 10000, respectivamente
 10: Testigo negativo

Una vez comprobada la síntesis del cDNA, se añadieron los adaptadores a los extremos 5' y 3', y el siguiente paso en la construcción de la genoteca fue la separación del cDNA en diferentes fracciones según su tamaño molecular. Para el enriquecimiento de los fragmentos de mayor peso molecular se realizó un fraccionamiento del cDNA de doble cadena siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.9.3.3. mediante el empleo de una columna de filtración en gel de Sepharosa.

Con el objetivo de comprobar la presencia del cDNA tras su fraccionamiento, se amplificó el cDNA con la pareja de cebadores Nc-SUL1 y Nc-SUL2, realizándose de nuevo diluciones decimales del cDNA (Fig. 31).

Figura 31: Análisis de la presencia del cDNA tras el fraccionamiento por columna.



Pocillo 1: Marcador de peso molecular de DNA

Pocillo 2: DNA genómico

Pocillos 3-7: cDNA: diluciones 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, respectivamente)

Pocillo 8: Control negativo

La cuantificación de la cantidad de cDNA obtenido tras el fraccionamiento se llevó a cabo en una placa de agarosa al 1% con BrEt y por comparación directa con un patrón conocido. La cantidad final de cDNA obtenido fue de 300 ng.

Se realizó una ligación empleando 100 ng de inserto en 1 µg de vector, siguiendo la recomendación de la casa comercial fabricante del sistema de construcción.

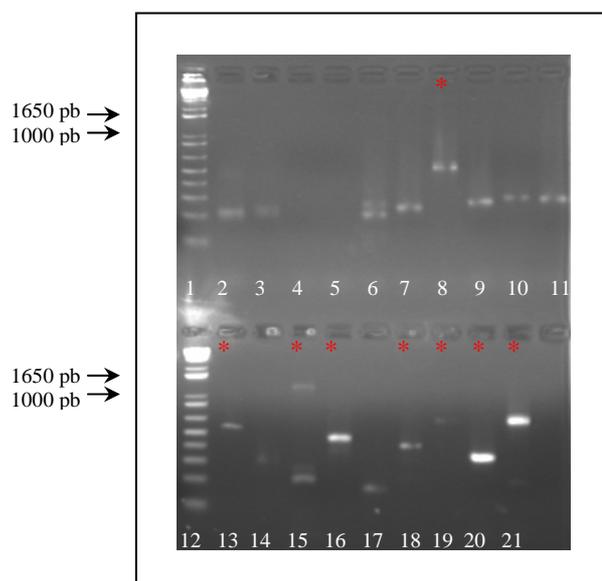
Los cDNAs ligados al vector se empaquetaron usando el extracto de empaquetamiento Gigapack Gold III (Stratagene). De esta forma se utilizaron 4 µl de ligación en una reacción de empaquetamiento. La genoteca empaquetada se denominó genoteca primaria.

Tras la ligación del cDNA en el vector Uni-ZAP XR y su empaquetamiento en Gigapack Gold III (Stratagene), se infectaron bacterias para su análisis. Se efectuó un recuento de las u.f.p. sin inserto (azules) y con inserto (blancas). El título de la genoteca primaria fue de 3×10^5 u.f.p., la cual presentó un 96% de clones recombinantes.

Tras la posterior amplificación de la genoteca primaria se obtuvo un título de $2,3 \times 10^8$ u.f.p. El tamaño medio de los fragmentos clonados en la genoteca se analizó tomando varias placas al azar y amplificando los insertos mediante PCR utilizando los cebadores correspondientes a los promotores T3 y T7 presentes en el vector. Se amplificaron 19 clones

recombinantes de los cuales un 40% de los clones amplificados presentaron un tamaño del fragmento, entre 400 pb y 1 kb, y uno contenía fragmentos superiores a 1 kb (Fig. 32).

Figura 32: Análisis mediante PCR de los insertos contenidos en las distintas u.f.p. tomadas al azar de la genoteca.

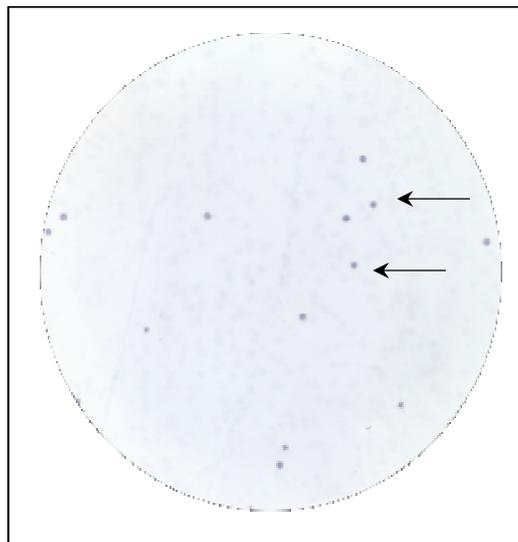


Pocillos 1 y 12: Marcador de peso molecular de DNA
Pocillos 2-3, 6-11 y 13-21: Clones recombinantes amplificados al azar
Pocillos 4 y 5: Testigo negativo
* Fragmentos cuyo tamaño es superior a 400 pb

7.2.4. Aislamiento e identificación de los clones reconocidos por el suero policlonal (APA-17)

El cribado de la genoteca se efectuó siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.9.4. El anticuerpo específico elegido para realizar el cribado inmunológico de la genoteca fue el APA-17, puesto que éste presentó una mayor especificidad e intensidad de reconocimiento de la p-17. Se realizó un primer cribado de la genoteca con el suero policlonal hiperinmune de conejo frente a la p-17 analizándose 200.000 clones recombinantes de los cuales 170 fueron detectados por el anticuerpo (Fig. 33). Posteriormente, se realizó un segundo cribado de los 170 clones con el anticuerpo APA-17, de los cuales 8 fueron detectados y aislados.

Figura 33: Inmunodetección de u.f.p. reconocidas por el APA-17 sobre membranas de nitrocelulosa.



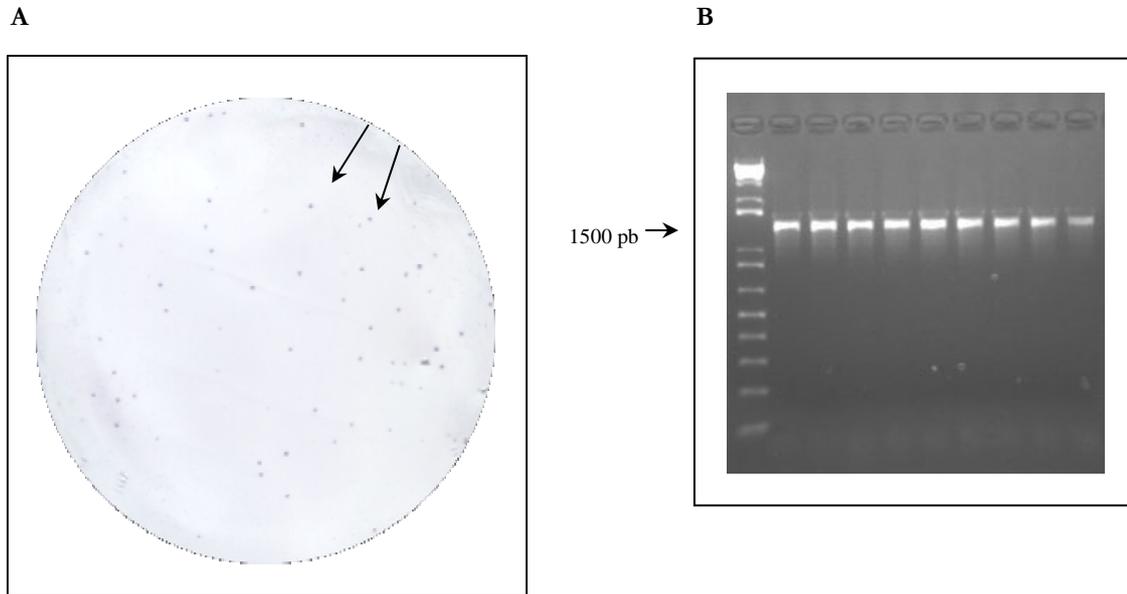
7.2.5. Caracterización de los cDNAs aislados

Una vez aislados los fagos, se realizó un estudio preliminar del tamaño de los diferentes insertos mediante PCR utilizando como cebadores las secuencias de los promotores T3 y T7 presentes en el fago a ambos lados del inserto. De los 8 clones inicialmente reconocidos por el APA-17 un 75% (n=6) presentó un tamaño de 1500 pb, mientras que el tamaño de inserto amplificado de los dos clones restantes correspondió a 850 y 400 pb, respectivamente. De acuerdo con estos resultados se aislaron y secuenciaron tres clones puros, los cuales fueron denominados como clon4.1 (Fig. 34 y 35), clon5.9 (Fig. 36 y 37) y clon10.5 (Fig. 38), y cuyos insertos recombinantes presentaron un tamaño de 1500, 850 y 400 pb, respectivamente. Mientras que el clon 4.1 fue reconocido por el APA-17 con una intensidad elevada, los clones 5.9 y 10.5 fueron detectados con una intensidad notablemente más reducida.

Figura 34: Inmunodetección y aislamiento del clon 4.1.

A: Inmunodetección del clon 4.1 por el APA-17

B: Amplificación por PCR de varios clones positivos procedentes del clon 4.1



La secuencia obtenida correspondiente al clon 4.1 estuvo compuesta por un total de 1210 pb (Fig. 35). Dicha secuencia fue comparada con las existentes en la base de datos del Genbank, obteniéndose una identidad del 99% con una secuencia expresada de 1180 pb obtenida a partir de mRNA de taquizoítos de *N. caninum* por Lally *et al.* (1996). Esta última secuencia presenta una fase de lectura que codifica una proteína de 33 kDa localizada en los gránulos densos denominada GRA7 y descrita por Lally *et al.* (1997). Cuando se comparó la secuencia de la proteína GRA7 con la secuencia de la fase de lectura presente en el clon 4.1 se obtuvo una identidad del 100%, por lo que se puede asegurar que la proteína presente en el clon 4.1 y detectada por el APA-17 corresponde a la proteína GRA7 descrita por Lally *et al.* (1997). En dicha secuencia se detectó la presencia de un péptido señal localizado entre los residuos 1 y 27, dos zonas de posible unión a la membrana situadas entre los residuos 4-24 y 137-157, respectivamente, y un posible sitio de N-glicosilación (entre los residuos 191 y 194, cuya secuencia aminoacídica es NGSS).

Figura 35: Secuencia de nucleótidos del clon 4.1.

```

1   gtttactgctatTTtatttcgTggcagTatctcgGatgcaaagTtgTgggtgccaagcgtct 60
      *
61   tgcgagTgcgTcacgctgcccgcTcgctgTtctctgtaggcttttccatattatTTTTcgt 120
121  cgtctctatagagTtaggcaaggctctacctctttggagcttgcaaactgtcctgTtttg 180
181  acaagccttcttgTtcattcagacgcgTctcagTgtcctcctaaaatggccccgacaagca 240
      M A R Q A
241  accttcacTcgTggctctgTgcgTttgTggactggcaatcgcgggcctgccgaggctcgct 300
      T F I V A L C V C G L A I A G L P R L A
301  agcgctggagactTggcaaccgaacagcatgaagggacatcgGataggggttagggca 360
      S A G D L A T E Q H E G D I G Y G V R A
361  tatgccggcgTttcaaactatgacggcgatgacgatgctgcaggaaccctgtcgactcg 420
      Y A G V S N Y D G D D D A A G N P V D S
421  gatgtgactgacgatgccattacagatggTgagTggccacgTgtTgtatcggggcagaag 480
      D V T D D A I T D G E W P R V V S G Q K
481  ccgcacacgactcagaaaggcagctTgatcaagaagctggcagTaccgTgTcgggcgt 540
      P H T T Q K G S L I K K L A V P V V G A
541  cttacgTcgTatctTgtTgctgacagggTgctgcccgagTtgacttctgcagaagaagaa 600
      L T S Y L V A D R V L P E L T S A E E E
601  ggaacagagTccatccccggTaaaaaacgTgtcaagactgcccTgggcatagcccgcgTta 660
      G T E S I P G K K R V K T A V G I A A L
661  gTtgCagcagccgcatTtTgctggattgggTctcgcgagaacattcaggcattTcgTgcca 720
      V A A A A F A G L G L A R T F R H F V P
721  aaaaagTcaaagcggTtTgcgagTgaggactctgcgctcggaacagTgaagagcagTat 780
      K K S K T V A S E D S A L G N S E E Q Y
781  gtggaaggaaccgTgaacgggagcagTgatccggaacaggagcgggTgggTcctctt 840
      V E G T V N G S S D P E Q E R A G G P L
841  atccccggaaggagacgagcaggaagtagacaccgaatagttatggcaaacagatcgTtg 900
      I P E G D E Q E V D T E
901  cgcagctaacaTgtgTttaaCattTTTTTtctgTgtcccagatgacagctgctactgTttgt 960
961  gtattgTtgacagTccacagatgcgtagctgccgctcccgTgtagaggaaactTTTTctt 1020
1021 ttttcgcctacctggccgagTgagTtccgggagTgTgcagTttgTcatagggagctaccccc 1200
1101 tccaaatggagTtctgCgaaccccgTgcatgTgctTgCggatttatgctaattgacagac 1160
1161 tcgTtttctcgatcacgaaaatccgTaatTtgaggccggTtgagTatgtct 1210
      *

```

* cDNA de 1180 pb correspondiente a la secuencia descrita por Lally *et al.* (1996) cuyo código en el Genebank es U82229.1

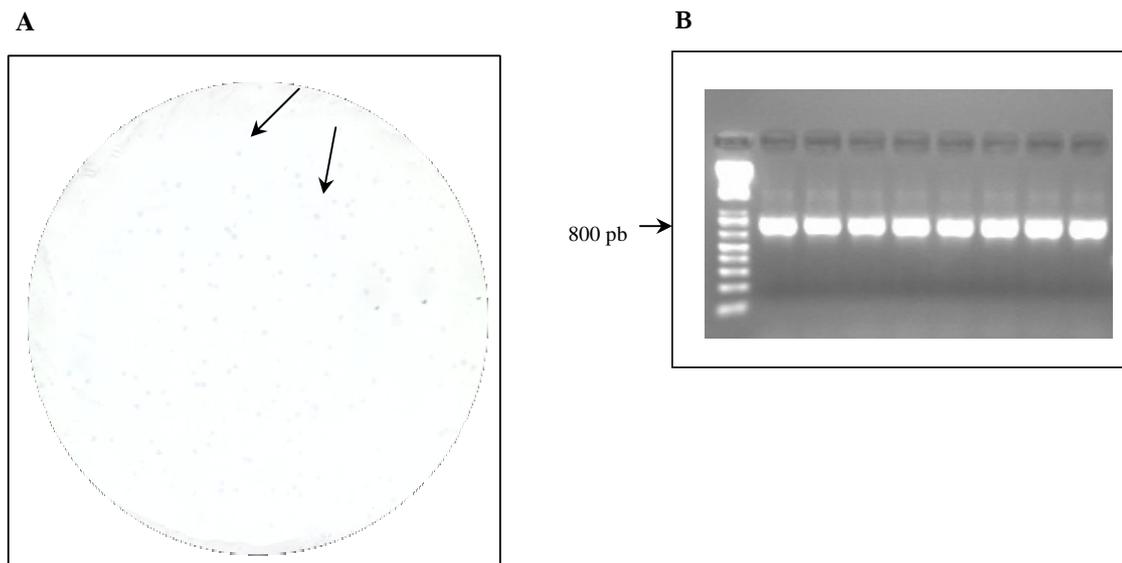
- En rojo destacan los codones de iniciación y de terminación de la ORF que se encuentra en la misma fase de lectura que tiene el gen de la β galactosidasa inserto en el plásmido p-Bluescript que codifica la proteína GRA7.
- En morado aparece delimitada la secuencia de nucleótidos de la ORF y subrayado el péptido señal.
- En naranja aparece la secuencia aminoacídica codificada por la ORF.

El clon 5.9 presentó un inserto recombinante de 800 pb, de las cuales se logró secuenciar 684 pb (Fig. 36 y 37).

Figura 36: Inmunodetección y aislamiento del clon 5.9.

A: Inmunodetección del clon 5.9 por el APA-17

B: Amplificación por PCR de varios clones positivos procedentes del clon 5.9



Cuando la secuencia de 561 pb contenida en el clon 5.9 fue comparada con las bases de datos existentes, un fragmento del cDNA de 295 pb localizado entre las posiciones 3 y 293 presentaron una identidad del 99% con la EST AW119284 de 485pb obtenida a partir de cDNA de taquizoítos del aislado NC-Liv de *N. caninum*.

Figura 37: Secuencia de nucleótidos del clon 5.9.

```

1  acctatgaggagagggcgctgcttgatccgtacggcggcatgactaaagca 50
      M R R G A A Z
51  ccgtcactcacatattttttgtattacccatggaggtggcgcggttgcggc 100
101 tgttggtgactcttcacgggcttgcggccgcgatgcatagagggagttgt 150
151 ttttgcttgcttctttcggcatgcttcgctccttgtgtgataagagaacctc 200
201 aggcctgaagggatggccatgtagcctttaattgtgggaatggactggtg 250
251 ctgcccggttgatgtggaggtgggccctcatgttcaaggccgtccaggag 300
301 cagtagccggttatcgtctagcatagttttctgctggtgatgacgtaaaa 350
351 gttgcattttcaatgacgatgctgcagctacttggtcattcgtatccagtgg 400
401 ggatgctgatactgaccagacattagagaagtgattgcagacggtggcat 450
451 ggtattaacagttgcctgtggttgtggcggtgtgccccactcaaaaaagggc 500
501 acccgctgccgacggacgccaatggctgggaattttcttcaaaagaaagc 550
551 gtggttcaatcg
    
```

- En rojo destacan los codones de iniciación y de terminación.
- En morado aparece delimitada la secuencia de una posible zona codificante.
- En naranja aparece la secuencia aminoacídica.

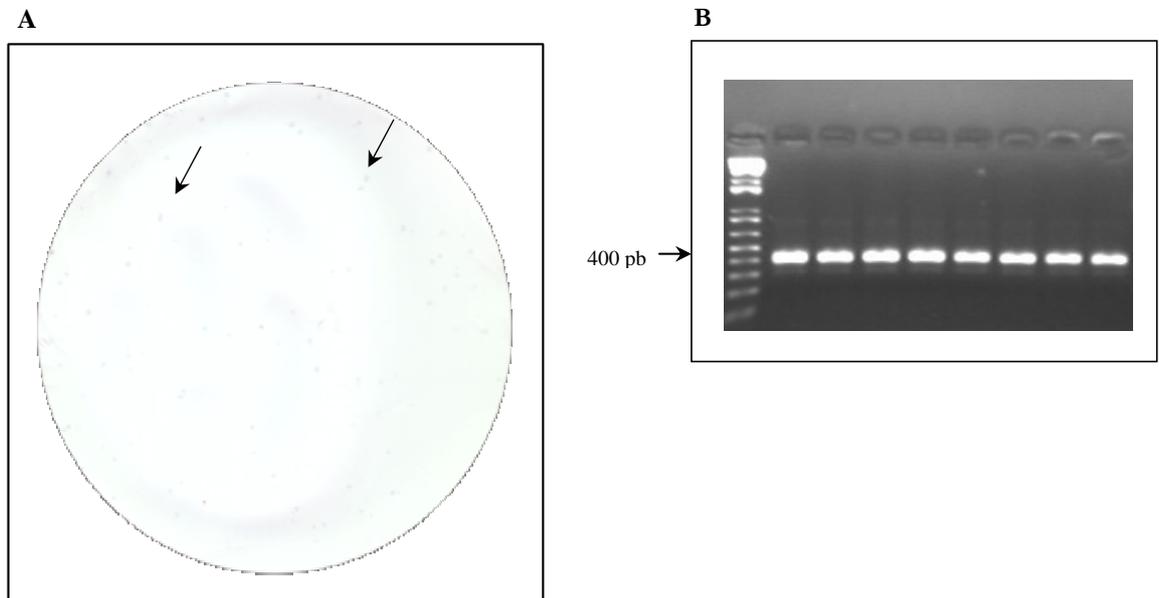
Con respecto al clon 10.5, el cDNA obtenido corresponde a una EST genuina de *N. caninum* no descrita hasta la fecha ya que no se encontró homología con ninguna de las ESTs obtenidas a partir de cDNA de taquizoítos de *N. caninum* (Fig. 38).

Figura 42: Inmunodetección y aislamiento del clon 10.5.

A: Inmunodetección del clon 10.5 por el APA-17

B: Amplificación por PCR de varios clones positivos procedentes del clon 10.5

C: Secuencia de nucleótidos del clon 10.5



C

```

1  gttcggtaggcaattacgaatgtagttgcagatgagtttgcgaggcgcgggcac 50
                                M L Q M S L R G A G T
51  acgagcacgtagttgtatgttacggcgtgtagggccttgtgttttgca 100
    R A R Z
101 cgtgcagagttgtatcgtcgcttgtagcgaggcgagaggtttgtgagca 150
151 gggctaagcactggtaccataacttgcgttgatccagttaataagacgat 200
201 gatatc 206
    
```

- En rojo destacan los codones de iniciación y de terminación.
- En morado aparece delimitada la secuencia genómica de una posible zona codificante.
- En naranja aparece la secuencia aminoacídica.

Tras analizar las secuencias de ambos clones, en cada uno de ellos se detectó la presencia de una posible región codificante que además de no estar en fase con el gen de la β galactosidasa del plásmido p-Bluescript tan solo codificaba péptidos de 7 y 15 aminoácidos, respectivamente, tal y como se demuestra en las Fig. 37 y 38. Además, en cualquiera de las tres fases se encontró codones de terminación cercanos, razón por la cual existe una probabilidad muy baja de que estos fragmentos sean codificantes. Por ello, podemos concluir que ambos clones a pesar de contener fragmentos de cDNA genuinos de *N. caninum*, estos no codifican

ningún péptido tratándose de artefactos que, sin embargo, reaccionaron con el anticuerpo APA-17 kDa.

Finalmente, cuando se analizaron las correspondientes secuencias aminoacídicas obtenidas en las tres fases de lectura, destacó la presencia de dos secuencias aminoacídicas similares, YEERR y YECCR, en los clones 5.9 y 10.5, respectivamente. En el clon 4.1 no se detectó ninguna secuencia de aminoácidos similar.

7.3. DISCUSIÓN

Se construyó una genoteca de cDNA de taquizoítos de *N. caninum* con el objetivo de identificar y caracterizar, desde el punto de vista molecular, alguno de los componentes de la fracción p-17, previamente estudiada en los apartados 5 y 6. La construcción de la genoteca fue un objetivo fundamental para la obtención de las proteínas recombinantes con interés en el inmunodiagnóstico.

Para ello, en primer lugar se estudió la presencia y participación de los posibles epítomos glucídicos de las proteínas constituyentes de la p-17 en las reacciones antígeno-anticuerpo. Las glicoproteínas de la superficie celular de *N. caninum* no solo intervienen en la adhesión e invasión de la célula hospedadora (Hemphill, 1996), sino que también participan en el desarrollo de la respuesta inmune (Woodward *et al.*, 1985; Baszler *et al.*, 1996; Björkman & Hemphill 1998). Por otra parte, las proteínas expresadas en *E. coli* no presentan estas modificaciones postransduccionales, las cuales sí están presentes en la estructura de la proteína nativa. Por tanto, la deglicosilación *in vitro* de las proteínas de *N. caninum* es un paso necesario que debe realizarse con anterioridad al cribado de la genoteca con anticuerpos específicos, ya que la presencia de epítomos de naturaleza glucídica en las proteínas pueden repercutir directamente en la localización de los clones de interés.

Los resultados obtenidos en el estudio de deglicosilación de las proteínas de *N. caninum* ponen de manifiesto tanto la presencia de glicosilaciones en un gran número de los antígenos del taquizoíto, entre ellos los antígenos inmunodominantes, como la participación de estos epítomos de naturaleza glucídica en el reconocimiento de las proteínas por parte de los anticuerpos específicos en mayor o menor medida dependiendo de la proteína estudiada. Nuestros resultados están en concordancia con el estudio realizado por Fuchs *et al.* (1999), en

el cual se detectó la presencia de numerosas glicosilaciones en la superficie de *N. caninum*, asociadas a antígenos con pesos moleculares de 36, 37/38, 43, 51, 52/53, 60, 72 y 100 kDa. Algunos de estos antígenos podrían coincidir en gran medida con los antígenos inmunodominantes de 34-35, 37 y 60-62 kDa considerados en nuestro estudio, puesto que la técnica de western blot en ambos estudios se realizó en condiciones reductoras. Por lo que se refiere a las proteínas localizadas en la fracción de 60-62 kDa, existen bastantes evidencias de que alguna de estas proteínas corresponda a una proteína de 65 kDa o bien a una de 60 kDa, previamente descritas por Baszler *et al.* (1996) y Keller *et al.* (2002), respectivamente. Baszler *et al.* (1996) desarrollaron una prueba de ELISA basada en el empleo de un anticuerpo monoclonal dirigido frente a un epítipo sensible al tratamiento con periodato sódico localizado en una proteína de 65 kDa. Por otra parte, Fuchs *et al.* (1999) demostraron la presencia de epítipos glucídicos en una proteína de 60 kDa, la cual, posteriormente, ha sido identificada como una proteína de micronemas y denominada NcMIC1 (Keller *et al.*, 2002).

En relación a la p-17, cabe destacar la presencia de epítipos de naturaleza glucídica, ya que se observó un ligero descenso en el reconocimiento de dicha fracción cuando las proteínas fueron sometidas a un tratamiento con periodato sódico. La presencia de residuos de azúcares en proteínas de bajo peso molecular no es un fenómeno excepcional si tenemos en cuenta proteínas de otros parásitos cercanos a *N. caninum* en la escala filogenética. Este sería el caso de dos proteínas localizadas en la superficie de *C. parvum* y de *T. gondii* denominadas p17 y SAG4, respectivamente. La proteína p17, con un peso molecular de 17 kDa, es una proteína inmunodominante de *C. parvum* que presenta dos lugares de anclaje a la membrana del esporozoíto mediante residuos glucídicos (Strong *et al.*, 2000; Priest *et al.*, 2001). La proteína SAG4, cuyo peso molecular es de 18 kDa, es una proteína específica del estadio de bradizoíto que presenta una zona hidrofóbica en la región N-terminal de la secuencia aminoacídica, la cual podría constituir una posible zona de glicosilación (Odberg-Ferragut *et al.*, 1996).

La identificación de las proteínas recombinantes con interés en el inmunodiagnóstico se realizó mediante el cribado de una genoteca de cDNA de taquizoítos de *N. caninum* con un suero policlonal de conejo purificado por afinidad frente a la fracción inmunodominante de 17-18 kDa. La construcción de una genoteca de cDNA, representa un abordaje relativamente novedoso en la identificación y caracterización de antígenos de interés de *N. caninum*. Por otra parte, el empleo de anticuerpos purificados por afinidad frente a proteínas del taquizoíto de

Neospora sp. a partir de sueros policlonales de conejo y de ratón ha resultado de enorme utilidad no solo en el cribado de genotecas para la identificación y obtención de proteínas recombinantes sino también en los estudios de localización celular. De este modo, se han caracterizado antígenos de superficie, como las proteínas NcSAG1 y NcSRS2, la enzima NcSUB1 (Louie & Conrad, 1999) y antígenos de secreción, como las proteínas de micronemas NcMIC1, NcMIC2 (Lovett *et al.*, 2000) y NcMIC3 (Sonda *et al.*, 2000) y proteínas de gránulos densos como la enzima NcNTPasa tipo I (Asai *et al.*, 1998) y la proteína NcGRA1 (Atkinson *et al.*, 2001).

En nuestro caso, mediante el empleo de esta metodología, el anticuerpo APA-17 detectó de forma mayoritaria clones recombinantes que contenían un inserto cuyo tamaño una vez secuenciado fue de 1210 pb. Una vez que la secuencia obtenida fue comparada con las bases de datos de ESTs de *Neospora* sp. mediante “Blast” en el Genbank se comprobó que dicho fragmento presentaba una identidad del 99% con un cDNA obtenido a partir de taquizoítos, el cual contenía una fase de lectura de 654 pb que expresaba la proteína de gránulos densos GRA7. Dicha proteína fue descrita por primera vez por Lally *et al.* (1996b), en cuyo estudio se describió su utilidad diagnóstica en una prueba de ELISA. Posteriormente, se realizó una caracterización molecular más completa en la que se describió tanto su secuencia genómica como aminoacídica, observándose que esta proteína presentaba una homología del 50% con la proteína de gránulos densos GRA7 de *T. gondii* (Lally *et al.*, 1997). El gen de la proteína GRA7 codifica una proteína con un peso molecular estimado de 26 kDa, la cual presenta en condiciones nativas un peso molecular de 33 kDa mientras que su forma recombinante migra a una altura de 37 kDa. Sin embargo, no se logró determinar si alguna de las secuencias de nucleótidos que codifica alguno de los componentes polipeptídicos de la fracción p-17 está incluida dentro de la secuencia de la GRA7. La presencia de epítomos comunes en distintas proteínas, el procesamiento proteolítico de un precursor de la p-17 de mayor peso molecular o reacciones inespecíficas del APA-17 podrían ser posibles explicaciones a nuestros resultados.

Atkinson *et al.* (2001) realizaron el cribado de una genoteca de cDNA de taquizoítos del aislado NC-Liv detectando junto con dos clones recombinantes de *N. caninum* -GRA1 y p20-, un clon que contenía el inserto que codificaba para el antígeno GRA7. En este caso, se empleó un anticuerpo purificado por afinidad de ratón dirigido frente a un grupo de antígenos cuyo peso molecular era inferior a 30 kDa, por lo que el clon fue aislado de forma accidental

debido a la presencia de una pequeña cantidad de anticuerpos específicos frente a la proteína GRA7 de 33 kDa. En nuestro caso, el anticuerpo empleado en el cribado de la genoteca presentó una elevada especificidad, ya que fue purificado exclusivamente frente a la p-17 y no frente a una fracción cercana a los 30 kDa muy próxima al rango de 33 kDa donde se localizaría la proteína GRA7. El anticuerpo APA-17, demostró ser un anticuerpo bastante específico de la p-17, tal y como demuestran los resultados del reconocimiento de la fracción inmunogénica en el western blot realizado en condiciones reductoras. Sin embargo, el aislamiento mayoritario del clon que expresa la proteína GRA7, junto con la reacción cruzada observada en condiciones no reductoras con un grupo de antígenos localizados en la fracción de 33-37 kDa nos induce a especular con la posibilidad de que existan epítomos compartidos entre ambas proteínas o que la p-17 se origine a partir de un precursor de mayor peso molecular, como sería el caso de la proteína GRA7.

El reconocimiento de cuatro antígenos de *N. caninum* por parte del anticuerpo monoclonal Mab-7 en condiciones no reductoras -17, 29, 33 y 37 kDa- pone de manifiesto la presencia de epítomos comunes en las proteínas del parásito, hecho que podría dificultar el aislamiento de una determinada proteína recombinante de interés mediante el cribado de la genoteca con un anticuerpo específico. Diversos autores han señalado, previamente, la presencia de epítomos compartidos entre diversas proteínas de *N. caninum*. En el estudio realizado por Bjerkas *et al.* (1994) los anticuerpos policlonales mono-específicos generados frente a una proteína de 17 kDa reconocieron también un antígeno inmunodominante de 37 kDa de *Neospora*. Así mismo, Cole *et al.* (1994) estudiaron la reactividad de un anticuerpo monoclonal Mab 6G7 obtenido en ratón frente a diversos antígenos del taquizoíto de *N. caninum* y sugirieron la presencia de epítomos conservados en varias proteínas localizadas en roptrias, micronemas y gránulos densos. Por otra parte, el intenso reconocimiento de la fracción de 17-18 kDa en condiciones reductoras por parte del anticuerpo Mab-7 y del APA-17 nos induce a pensar que la proteína de membrana reconocida por el anticuerpo Mab-7 de 19 kDa (Björkman & Hemphill, 1998) podría ser uno de los componentes polipeptídicos de la p-17 reconocida por el APA-17.

Existen bastantes evidencias, en relación a las proteínas de *N. caninum* y de otros parásitos estrechamente relacionados como *T. gondii* y *C. parvum*, que apoyarían la hipótesis de que la p-17 sea el producto de un precursor de mayor peso molecular que sufriría un procesamiento proteolítico inmediatamente después de su síntesis. La proteólisis es una

modificación post-translacional que tiene lugar con frecuencia en las proteínas de secreción de *T. gondii* sintetizadas en organelas como micronemas y roptrias. En *T. gondii* no se han descrito modificaciones proteolíticas en las proteínas de gránulos densos, mientras que sí se han comprobado en todas las proteínas de roptrias y la mayoría de las proteínas de micronemas. En estos casos, las modificaciones tienen lugar inmediatamente después de la síntesis o después de su secreción hacia la superficie del parásito (Cérède *et al.*, 2002).

Un posible precursor de la p-17 podría ser la proteína de gránulos densos denominada GRA7, basándonos en el reconocimiento del clon recombinante que expresa dicha proteína por parte del anticuerpo específico APA-17. La información existente sobre la secuencia de la proteína GRA7 apoyaría nuestra hipótesis, puesto que el gen que codifica una proteína de 26 kDa presenta un posible sitio de actuación de las peptidasas entre los residuos aminoacídicos 27 y 28, donde termina la secuencia correspondiente al péptido señal. Tras la ruptura de la secuencia original se podría obtener un péptido de aproximadamente 20,3 kDa (Lally *et al.*, 1996b) o de 23 kDa (Lally *et al.*, 1997). Lidell *et al.* (1998) también señalaron la posibilidad de que otra proteína de gránulos densos, denominada GRA6, sufriese un procesamiento proteolítico similar originando un péptido de menor tamaño. El gen de la proteína GRA6, que codifica para una proteína de 24 kDa, presenta una zona de ruptura, la cual podría originar un péptido de 19 kDa debido a la acción de las peptidasas.

Por lo que concierne a proteínas de peso molecular similar presentes en otros protozoos Apicomplexa, Priest *et al.* (2000) clonaron una proteína inmunodominante de 17 kDa de *C. parvum*, la cual se correspondió con el fragmento carboxi-terminal de una ORF que codificaba una proteína de 33 kDa. Simultáneamente, Strong *et al.* (2000) identificaron un precursor de 60 kDa que se procesa de forma proteolítica dando lugar a dos glicoproteínas localizadas en la superficie del esporozoíto y del merozoíto cuyos pesos moleculares son de 45 y 15 kDa.

Por otra parte, mientras que en *N. caninum* tan solo se han clonado dos antígenos con un peso molecular inferior a 20 kDa (Atkinson *et al.*, 2001) mediante la construcción y cribado de genotecas de cDNA, en el caso de *T. gondii*, tan solo se han identificado y clonado dos proteínas de 18 kDa siguiendo un abordaje diferente a la construcción y el cribado de una genoteca de cDNA. Previo al clonaje de las proteínas SAG4 (proteína de superficie exclusiva del estadio de bradizoíto) y MIC10 (proteína de micronemas), Ödberg-Ferragut *et al.* (1996) y

Hoff. *et al.* (2001), respectivamente, realizaron una secuenciación N-terminal de las proteínas purificadas. Por otra parte, los datos correspondientes a las 10 ESTs más abundantes en el genoma de *T. gondii* obtenidas hasta el momento codifican proteínas con pesos moleculares superiores a 21 kDa (Ajioka *et al.*, 1998).

Finalmente, hay que destacar la utilidad tanto diagnóstica como vacunal que podría tener la proteína GRA7 obtenida en el presente trabajo, ya que se ha comprobado que las proteínas de gránulos densos son, desde el punto de vista inmunológico, potentes inductores de una fuerte respuesta inmune mediada tanto por células B como por células T. Lally *et al.* (1996b) desarrollaron dos ELISAs que empleaban como antígeno dos proteínas recombinantes, Nc4.1 y Nc.14.1, denominadas posteriormente como NCDG1 o GRA7 y NCDG2 o GRA6, respectivamente. Estas dos pruebas presentaron una mayor sensibilidad que la IFI cuando se analizaron sueros bovinos procedentes de infecciones naturales. La proteína GRA7 de *T. gondii* también ha sido empleada con éxito en el desarrollo de pruebas diagnósticas. Hasta el momento, se han desarrollado tres pruebas ELISA que emplean como antígeno la proteína GRA7, para el diagnóstico de la infección por *T. gondii* humanos. Jacobs *et al.* (1999) desarrollaron el primer ELISA que utilizaba como único antígeno la proteína GRA7, el cual resultó de utilidad, especialmente, en el diagnóstico de la fase aguda de la infección. Posteriormente, Aubert *et al.* (2000) y Li *et al.* (2000) emplearon en un ELISA una mezcla de antígenos recombinantes de diversas organelas del taquizoíto, entre los cuales se encontró la proteína GRA7, obteniendo buenos resultados no solo en el diagnóstico de la infección sino también en la diferenciación entre la fase aguda y crónica de la misma.

Hasta el momento, se desconoce el efecto protector que puede originar el empleo de la proteína GRA7 en una vacuna frente a la infección por *N. caninum*. Sin embargo, los resultados obtenidos tras el empleo de la proteína GRA7 de *T. gondii* nos induce a pensar que dicha proteína podría ser un buen candidato vacunal a tener en cuenta en el control de la neosporosis bovina. En *T. gondii*, se ha comprobado que la invasión celular puede ser bloqueada con anticuerpos dirigidos contra las proteínas de las organelas apicales. Prigione *et al.* (2000) comprobaron que los antígenos de excreción-secreción de *T. gondii*, procedentes de micronemas y gránulos densos, juegan un papel importante en la estimulación del sistema inmune tanto en animales con infección aguda como en los infectados de forma crónica. En dicho estudio se observó que la proteína GRA2 junto con la SAG1 intervenían en el mantenimiento de la respuesta inmune de base celular de memoria desarrollada frente a *T.*

gondii por personas que presentaban una infección crónica. Por otra parte, Zenner *et al.* (1999) destacaron la participación de la proteína de gránulos densos, GRA5, en el desarrollo de la respuesta inmune protectora frente a la transmisión de la toxoplasmosis congénita en ratas gestantes. En relación a la proteína GRA7, tan solo se ha realizado un estudio de vacunación en ratones, los cuales desarrollaron una notable respuesta inmune protectora frente a la infección por *T. gondii* cuando fueron inoculados con plásmidos que codificaban las proteínas GRA1, GRA7 y ROP2 (Vercammen *et al.* 2000).

Los resultados obtenidos en esta parte de nuestro trabajo constituyen la base de partida tanto para el desarrollo de nuevas pruebas diagnósticas basadas en el empleo de antígenos recombinantes, como para la obtención de proteínas con un potencial uso vacunal. Además, otro aspecto importante a tener en cuenta en el desarrollo de nuevas pruebas diagnósticas es la identificación y obtención de proteínas específicas de estadio. En este sentido se desconoce por el momento si la p-17 es un antígeno exclusivo de la fase de taquizoíto o si por el contrario se trata de un antígeno compartido por el taquizoíto y el bradizoíto. La caracterización de proteínas específicas de la fase de bradizoíto aportaría una información valiosa no solo para la mejora de las actuales técnicas de diagnóstico sino también para el conocimiento de la patogenia y epidemiología de la infección.

**8. CARACTERIZACIÓN DE LA p-17 DE *N. caninum*
MEDIANTE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL**

La caracterización de la p-17, cuyo valor diagnóstico ha sido estudiado en los capítulos 5 y 6, se complementó con el estudio de su composición polipeptídica. Para ello, en primer lugar, se realizó la secuenciación aminoacídica *N*-terminal de dicha fracción, cuyos resultados pusieron de manifiesto su complejidad. De acuerdo con estos resultados, la caracterización de dicha fracción proteica se continuó con el empleo conjunto de la electroforesis en geles de poliacrilamida bidimensionales (2D-PAGE) y la técnica de western blot, usando anticuerpos específicos y suero de reproductoras bovinas con infección natural por *N. caninum*, con el objetivo de identificar y caracterizar los componentes proteicos inmunogénicos de la p-17, desconocidos hasta el momento y con interés en el inmunodiagnóstico.

La técnica de secuenciación *N*-terminal de las proteínas permite obtener la secuencia aminoacídica de proteínas transferidas a membranas de PVDF tras su separación en geles uni y bidimensionales. Un abordaje similar ha sido empleado con éxito en la caracterización de las proteínas inmunodominantes de *N. caninum* SAG1 y SRS2, las cuales fueron transferidas a membranas de PVDF tras la electroforesis en geles SDS-PAGE (Howe *et al.*, 1999). Sin embargo, esta técnica no permite obtener una secuencia aminoacídica a partir de una mezcla compleja de proteínas.

El análisis del proteoma [conjunto de proteínas expresadas por el material genético de una célula o un tejido (Wilkins *et al.*, 1996)] mediante la técnica de 2D-PAGE es una metodología relativamente novedosa que permite caracterizar un gran número de proteínas y antígenos a partir de una mezcla compleja de proteínas e identificar las modificaciones postranscripcionales presentes en las proteínas. Además, el empleo de esta metodología ofrece una información valiosa acerca de la composición proteica de un organismo ya que existe una falta de correlación entre los niveles de mRNA específicos y sus correspondientes proteínas, constituyendo, por todo ello, un abordaje complementario a los estudios genómicos que incluyen la caracterización de los cDNAs aislados mediante el cribado de una genoteca de cDNA con un anticuerpo específico.

Por otra parte, el empleo conjunto de 2D-PAGE y el western blot permite identificar nuevas dianas terapéuticas. Esta aproximación, se ha empleado, recientemente, en la identificación y caracterización de antígenos de interés en otros parásitos como *T. gondii* (Geißler *et al.*, 1999), *Leishmania infantum* (El Fakhri *et al.*, 2002), *Trichinella* spp. (Dea-Ayuela *et al.*, 2001) y *Fasciola gigantica* (Jefferies *et al.*, 2001), entre otros. Sin embargo, en *N. caninum* la

información disponible al respecto es escasa, existiendo, por ello, la necesidad de disponer de una mapa proteico bidimensional normalizado que sienta la base para futuros estudios de identificación y caracterización de antígenos con interés diagnóstico y vacunal.

Con todos estos antecedentes el objetivo fundamental del presente estudio fue identificar y caracterizar la fracción p-17, en primer lugar mediante secuenciación *N*-terminal, y, a continuación, mediante 2D-PAGE y western blot. En la caracterización mediante 2-DE fue necesario la construcción previa de un mapa bidimensional de referencia de las proteínas de *N. caninum* para, de esta forma, obtener una visión global del proteoma de *N. caninum*. Una vez normalizado el mapa proteico de *N. caninum* se procedió a identificar mediante 2D-PAGE y western blot diferentes antígenos con interés en el inmunodiagnóstico, centrando nuestro interés en el estudio de la p-17. Para ello, se determinó el peso molecular y el punto isoeléctrico de los diferentes componentes polipeptídicos inmunogénicos de dicha fracción identificados mediante el análisis de diferentes sueros con el objetivo de identificar posibles marcadores diagnósticos de la neosporosis bovina. Simultáneamente, se identificaron otros antígenos con posible utilidad en el inmunodiagnóstico diferentes de la p-17.

8.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

8.1.1. Secuenciación aminoacídica *N*-terminal de la p-17

Las proteínas solubles de *N. caninum* fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y transferidas a membranas de PVDF siguiendo la metodología descrita en los apartados 3.6.1.1. y 3.6.1.2.2., respectivamente. A continuación la p-17 fue localizada mediante western blot y recortada de la membrana para proceder a su secuenciación mediante el método de degradación de Edman.

8.1.2. Mapa proteico bidimensional de los taquizoítos de *N. caninum*

Con el objetivo de conseguir una mayor reproducibilidad en la electroforesis bidimensional, los taquizoítos empleados para la obtención de proteína soluble fueron purificados a partir del cultivo celular transcurridas 84 horas de la invasión celular, eliminando, de este modo, las posibles diferencias existentes en cuanto a la expresión de proteínas dependiente de la fase celular del parásito. A continuación, se estandarizó la separación de las

proteínas del taquizoíto de *N. caninum* mediante 2D-PAGE realizando la primera dimensión en un rango de pH de 3 a 10 no lineal siguiendo la metodología descrita en los apartados 3.6.2. y 3.7.3. En la construcción del mapa proteico bidimensional se determinó tanto el peso molecular como el pI de las diferentes proteínas de interés mediante el empleo de marcadores internos de 2D-PAGE.

8.1.3. Caracterización de la p-17 mediante 2D-PAGE

La caracterización de la p-17 incluyó, por una parte, la determinación del peso molecular y el pI de sus diferentes componentes polipeptídicos y, por otra, el estudio de la inmunogenicidad de éstos con el objetivo de identificar posibles marcadores diagnósticos de la neosporosis bovina.

El reconocimiento de dicha fracción se realizó mediante el empleo de dos anticuerpos específicos -el APA-17 y el anticuerpo monoclonal NcMab7, descritos previamente en el apartado 7.3.1- en la prueba de western blot bidimensional.

A continuación se realizó un estudio preliminar comparativo de la inmunogenicidad de los diferentes componentes polipeptídicos de la p-17. En primer lugar, se identificaron los componentes de dicha fracción que eran reconocidos tanto por el APA-17 como por sueros bovinos procedentes de animales con infecciones naturales y, simultáneamente, se identificaron los polipéptidos más inmunogénicos de dicha fracción reconocidos por cada uno de los sueros analizados.

Las muestras de suero empleadas en esta parte del estudio procedían de dos reproductoras y se seleccionaron teniendo en cuenta una serie de criterios clínicos, epidemiológicos y serológicos. En el caso del suero procedente de la reproductora con infección aguda se consideró la presencia de aborto reciente y la procedencia de una explotación con antecedentes de fallo reproductor por *N. caninum* durante los últimos tres años. Así mismo, se detectaron niveles elevados de anticuerpos específicos por IFI y un intenso reconocimiento de la p-17 por western blot tras electroforesis unidimensional. En el caso de la reproductora con infección crónica, se consideró la ausencia de aborto, la procedencia de una explotación con características similares al caso anteriormente descrito, la detección de títulos de anticuerpos estables y moderados por IFI a lo largo de varios meses y

el reconocimiento de la p-17 por el método de western blot. Finalmente, se empleó como testigo negativo de la reacción el suero procedente de una reproductora que procedía de una explotación sin antecedentes de fallo reproductor debido a la infección por *N. caninum* durante los últimos tres años, que no presentó anticuerpos específicos frente a *N. caninum* ni por IFI ni por western blot.

Con el objetivo de comparar los resultados obtenidos en el gel bidimensional y en el western blot dos geles bidimensionales fueron preparados en paralelo, siendo uno de ellos teñido con nitrato de plata y utilizado como mapa de referencia en la estimación de los pesos moleculares y pI de las manchas proteicas detectadas en el western blot.

8.1.4. Identificación de otras proteínas inmunodominantes de *N. caninum* mediante 2D-PAGE

Se realizó un estudio preliminar del reconocimiento de otras proteínas inmunogénicas de *N. caninum* detectadas por western blot en dos dimensiones con el objetivo de identificar otros marcadores antigénicos de interés en el inmunodiagnóstico mediante el empleo de las mismas muestras, previamente explicadas en el apartado anterior.

8.2. RESULTADOS

8.2.1. Secuenciación aminoacídica N-terminal de la p-17 kDa

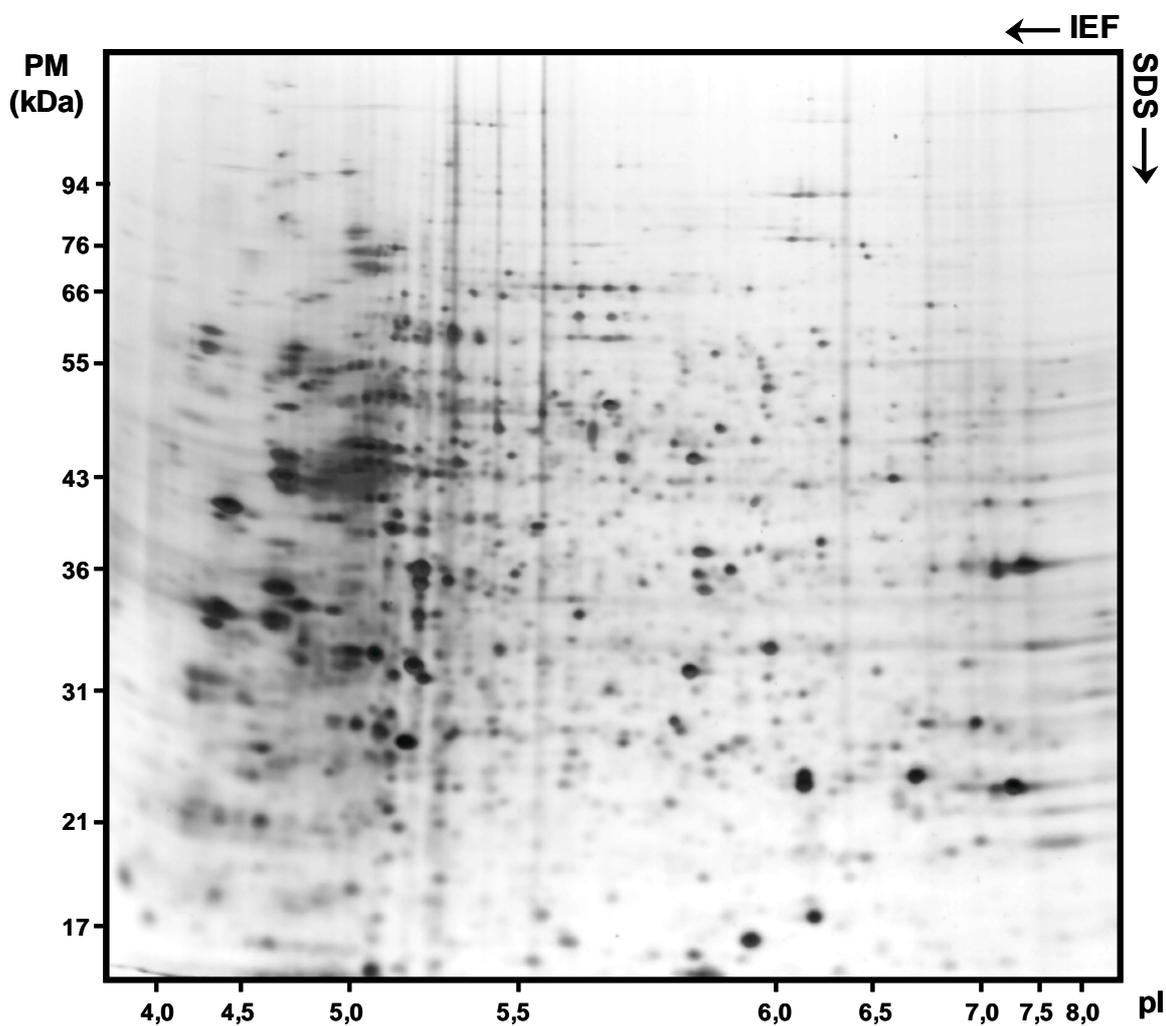
Únicamente se obtuvo la secuencia aminoacídica correspondiente a los 12 primeros residuos, obteniendo varios aminoácidos posibles para cada una de las posiciones, razón por la cual no fue posible realizar una comparación de la secuencia obtenida con las existentes en las bases de datos. Estos resultados indican que la p-17 es una fracción proteica compuesta por varias proteínas.

8.2.2. Mapa proteico bidimensional de los taquizoítos de *N. caninum*

Aproximadamente 700 polipéptidos, cuyos pesos moleculares oscilaron entre 15 y 150 kDa y con valores de pI entre 3 y 10, respectivamente, se resolvieron y visualizaron cuando las proteínas del taquizoíto de *N. caninum* fueron separadas en geles bidimensionales y teñidas con

nitrate de plata. La mayoría de las proteínas, que se resolvieron con un alto grado de repetibilidad y reproducibilidad, aparecieron distribuidas de forma homogénea a lo largo de todo el mapa proteico. Sin embargo, merece la pena resaltar una mayor expresión de aquellas proteínas localizadas en el rango de pH ácido entre 4 y 5,5 y en el rango de peso molecular de 31 a 66 kDa. Los pesos moleculares y los puntos isoeléctricos de las proteínas resueltas en los geles bidimensionales aparecen reflejados en la Figura 39.

Figura 39: Patrón de proteínas de *N. caninum* visualizado en un gel bidimensional teñido con nitrato de plata.

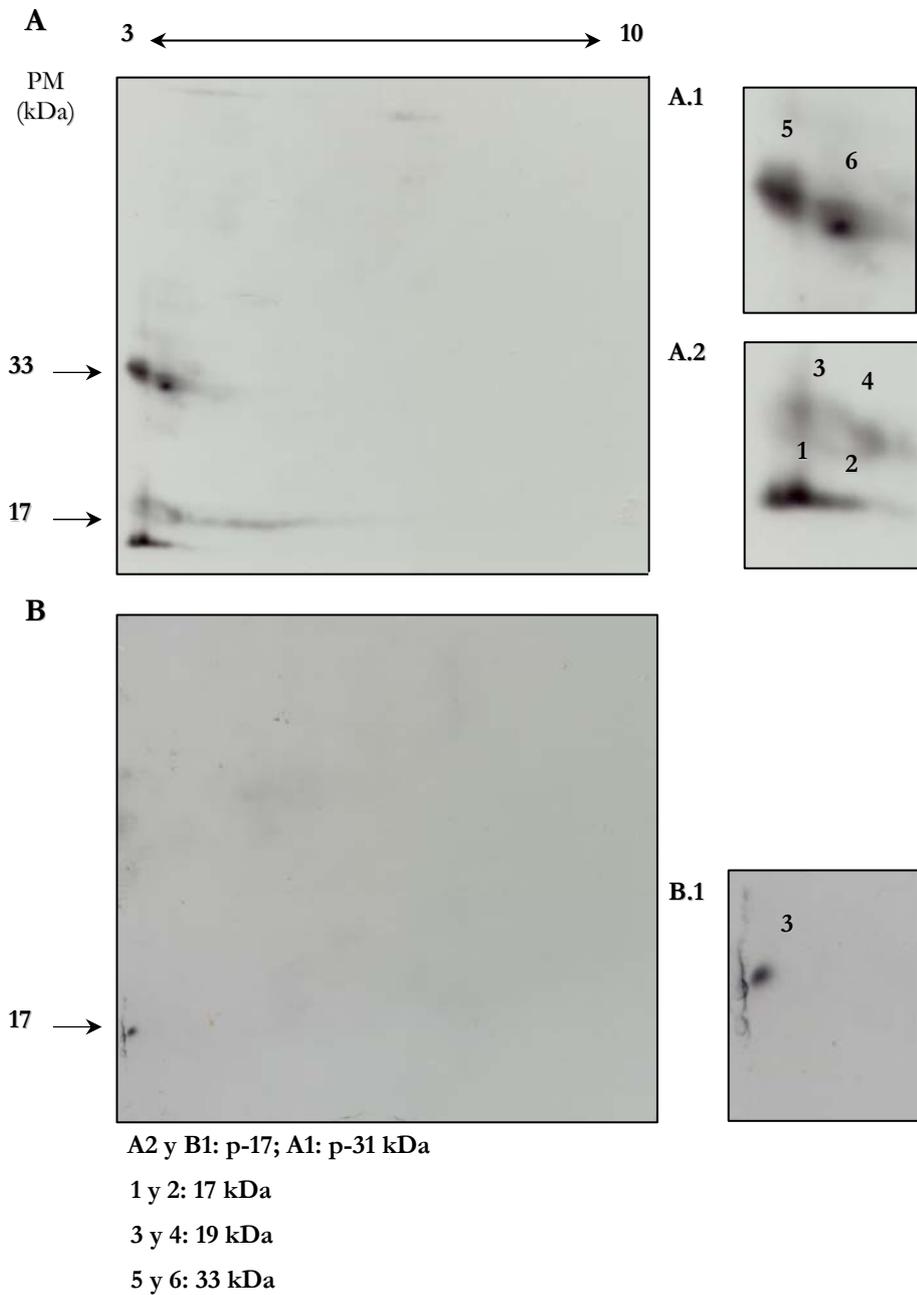


8.2.3. Caracterización de la p-17 mediante 2D-PAGE

De acuerdo con los resultados obtenidos en relación al reconocimiento de los diferentes componentes de la p-17 por parte del APA-17, dicha fracción está compuesta por, al menos, cuatro polipéptidos con dos proteínas de aproximadamente 17 y 19 kDa, cada una de las cuales presentarían dos isoformas ácidas localizadas en el rango de pH de 3,5-4,5 (Fig. 40). Estas estimaciones preliminares de los pesos moleculares y *pI* son bastante aproximadas y deberán ser confirmadas en estudios futuros. El APA-17, además, reconoció otras dos proteínas con un peso molecular de 33 kDa en un rango de pH similar al de la p-17.

Cuando se analizó el reconocimiento que presentó el anticuerpo monoclonal Nc-Mab7, éste únicamente reconoció un polipéptido de 19 kDa que coincidió, a su vez, con uno de los componentes polipeptídicos reconocidos por el APA-17 kDa.

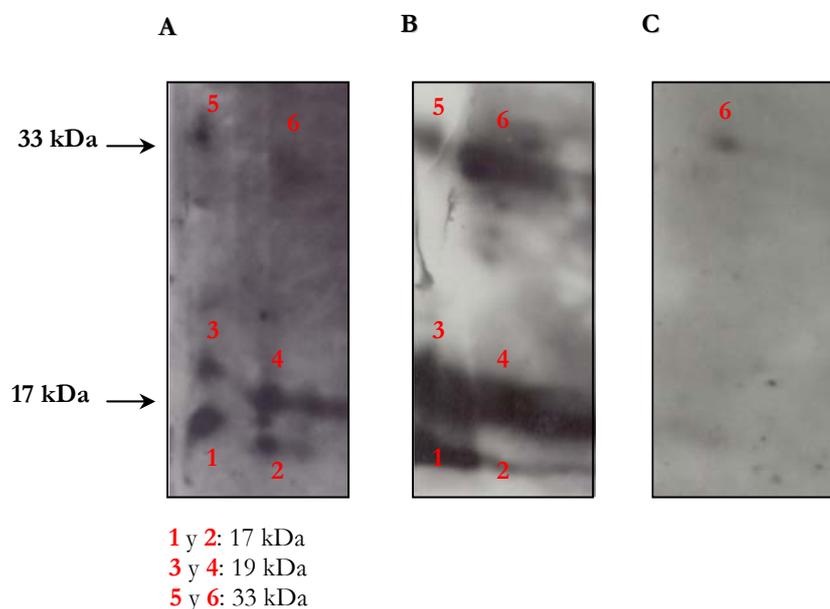
Figura 40: Reconocimiento de la p-17 por dos anticuerpos específicos en western blot bidimensional:
A: APA-17; B: Mab-7



Finalmente, los componentes polipeptídicos reconocidos por el APA-17 en el rango de 17 (p-17) y 33 kDa (p-33) fueron también detectados por el suero procedente de la reproductora que presentó aborto, mientras que la reproductora no abortada tan solo detectó una proteína de 33 kDa con un pI ácido (Fig. 41).

Figura 41: Reconocimiento de la p-17 y p-31 por el APA-17 y por sueros de dos reproductoras con infección natural por *N. caninum* en western blot bidimensional.

A: APA; B: Reproductora infectada abortada; C: Reproductora infectada no abortada



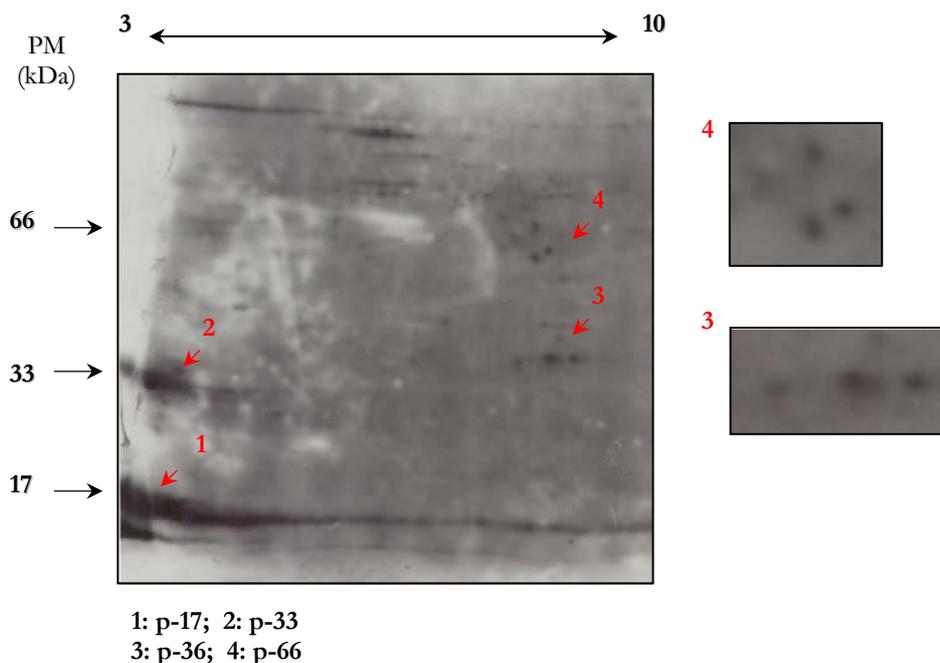
Por otra parte, el nivel de expresión de las proteínas localizadas en las fracciones de 17 y 33 kDa, detectado por la intensidad de las diferentes manchas en los geles teñidos con nitrato de plata, no se correspondió con su inmunogenicidad, demostrando ser dos fracciones inmunodominantes y minoritarias dentro del total de proteínas de *N. caninum* resueltas en los geles bidimensionales ya que las proteínas localizadas en las fracciones de 17 kDa y 33 kDa apenas se visualizaron en el gel teñido con nitrato de plata.

8.2.4. Identificación de otras proteínas inmunodominantes de *N. caninum* mediante 2D-PAGE

Tal y como se demuestra en la Figura 42, la reproductora que presentó aborto reconoció aproximadamente 50 antígenos, destacando el reconocimiento de las dos fracciones inmunodominantes ácidas localizadas en los rangos de 17 y 33 kDa, y otras dos fracciones inmunodominantes neutras localizadas en los rangos de 36 y 66 kDa integradas, a su vez, por 3 y 4 manchas proteicas, respectivamente. Estos resultados preliminares no permitieron establecer una correspondencia entre las fracciones inmunodominantes de 36 y 66 kDa y las proteínas resueltas en los geles bidimensionales con el objetivo de determinar su grado de expresión dentro del proteoma de *N. caninum*. La reproductora que no presentó aborto, tan

solo reconoció una proteína de 33 kDa, tal y como se ha demostrado en la Figura 41 del apartado anterior. Estos resultados deberían ser confirmados empleando un número mayor de sueros con el objetivo de identificar posibles marcadores de infección tanto aguda como crónica, lo cual debería tenerse en cuenta a la hora mejorar el inmunodiagnóstico.

Figura 42: Reconocimiento de los antígenos inmunodominantes del taquizoíto de *N. caninum* por una reproductora abortada en western blot bidimensional.



8.3. DISCUSIÓN

La electroforesis bidimensional es un método que permite obtener una alta resolución de proteínas y mejora considerablemente los estudios realizados sobre la diversidad antigénica, ya que permite estudiar la expresión de genes y de proteínas a nivel de un organismo completo (Carucci *et al.*, 2002). La existencia de ciertas reacciones cruzadas entre los antígenos del taquizoíto de *N. caninum* y de *T. gondii* han sido evidenciadas mediante la electroforesis de las proteínas en geles unidimensionales y western blot (Bjerkas *et al.*, 1994; Sundermann *et al.*, 1997). Además, la información obtenida a partir de geles SDS-PAGE es muy limitada debido a la relativa baja resolución de proteínas o polipéptidos separados, por lo que es aconsejable emplear un método, como la 2D-PAGE, que permita obtener una elevada resolución de las proteínas y, de este modo, mejorar considerablemente los estudios realizados sobre la caracterización de antígenos de interés de *N. caninum*. Esta tecnología, relativamente novedosa

(Klose, 1975), constituye uno de los métodos de elección, combinado con la secuenciación de proteínas, para identificar y caracterizar un gran número de proteínas a partir de una mezcla compleja (Barret *et al.*, 2000) y junto con el western blot permite definir los perfiles antigénicos con mayor precisión. Esta última estrategia permite solventar algunas limitaciones del empleo de exclusivo de la 2D-PAGE, tales como la detección de proteínas minoritarias (Cohen *et al.*, 2002), puesto que mediante la técnica de western blot se pueden detectar proteínas minoritarias altamente inmunogénicas.

Con el objetivo de visualizar la expresión de proteínas del taquizoíto de *N. caninum* y detectar de forma más precisa los componentes inmunogénicos con interés en el inmunodiagnóstico se empleó de manera conjunta la electroforesis bidimensional en combinación con la técnica de western blot, siguiendo una aproximación proteómica similar a la realizada en estudios de identificación de proteínas inmunogénicas de otros microorganismos (Geißler *et al.*, 1999; Pitarch *et al.*, 1999). En primer lugar, se construyó un mapa proteico bidimensional, en el cual se resolvieron aproximadamente 700 polipéptidos en un rango de pH 3-10 no lineal y que ha permitido obtener una información preliminar sobre la expresión de las proteínas de *N. caninum*. Nuestros resultados son comparables, en gran medida, a los publicados en el único trabajo realizado hasta el momento sobre la composición antigénica de *N. caninum* mediante 2D-PAGE realizado por Heckerroth *et al.* (2000), donde se separaron 500 polipéptidos en un rango de pH 4-7 lineal. Sin embargo, la información obtenida a partir de un único gel es limitada, ya que no incluye el proteoma completo del parásito. Por esta razón, estos resultados obtenidos en un único rango de pH son preliminares y deberían completarse realizando un estudio más pormenorizado mediante la construcción y análisis de subproteomas de acuerdo con los resultados obtenidos para *T. gondii*, donde se resolvieron un mayor número de proteínas cuando se emplearon rangos de pH diferentes (Cohen *et al.*, 2002). Se ha comprobado en *T. gondii* que las muestras de taquizoítos obtenidos en diferentes momentos de infección en cultivo celular presentan ciertas variaciones en la expresión proteica relacionadas con el ciclo de invasión y ruptura de las células por parte del taquizoíto. En nuestro caso, con el objetivo de obtener resultados reproducibles, las muestras de proteínas separadas mediante 2D-PAGE fueron se obtuvieron siempre a partir de taquizoítos procedentes de cultivo celular y transcurridas 84 horas de la inoculación.

Aunque la composición antigénica de *N. caninum* ha sido investigada en diversos trabajos mediante la electroforesis en geles SDS-PAGE, el empleo de un nuevo abordaje en el campo de la proteómica -2D-PAGE- nos ha permitido profundizar en la detección de antígenos inmunodominantes y determinar, en algunos casos, su composición polipeptídica. En primer lugar, no se observó una relación entre la expresión de proteínas y su reconocimiento por western blot, reduciéndose notablemente el número de antígenos reconocidos por los anticuerpos específicos en relación a las proteínas expresadas. De nuevo, estos resultados están en consonancia con los obtenidos previamente por Heckerroth *et al.* (2000), en cuyo estudio tan solo se identificaron entre 20 y 50 manchas, que reaccionaban con las inmunoglobulinas específicas presentes en los sueros de animales infectados experimentalmente, a partir de aproximadamente 500 polipéptidos resueltos en los geles bidimensionales.

Mientras que en *N. caninum*, la información relativa a la composición antigénica en dos dimensiones es muy escasa, en *T. gondii* se han publicado diversos trabajos. La electroforesis en geles bidimensionales ya ha sido empleada previamente en la identificación y caracterización de diversos antígenos de *T. gondii*, empleando sueros monoclonales y policlonales, para analizar tanto la composición de una proteína en particular como para la identificación de nuevos antígenos con valor diagnóstico. Kasper *et al.* (1987) determinó mediante 2D-PAGE que el antígeno p30 estaba compuesto por varios polipéptidos. También se han identificado y caracterizado antígenos de gránulos densos como la GRA1 y la GRA8 (Dlugonska *et al.*, 2001) y la GRA7 (Fischer *et al.*, 1998; Neudeck *et al.*, 2002) y otros antígenos específicos de estadio, como la proteína de roptrias -TgROP9- exclusiva de la fase de taquizoíto. Así mismo, el empleo de esta tecnología ha permitido identificar antígenos responsables de estimular la respuesta inmune de base celular, los cuales podrían ser candidatos vacunales para prevenir la infección por *T. gondii*, como es el caso de la proteína de micronemas TgM2AP y la LDH1 (Rabenau *et al.*, 2001; Reichmann *et al.*, 2002).

En el presente estudio destaca el reconocimiento de dos fracciones proteicas ácidas localizadas en el rango de peso molecular de 17 y 33 kDa. El reconocimiento similar de ambas fracciones tanto por el APA-17 como por el suero policlonal de una reproductora abortada demuestra que los componentes polipeptídicos de la p-17 reconocidos por el APA-17 son inmunodominantes y, por tanto, de interés inmunodiagnóstico en la neosporosis bovina. Por otra parte, la localización de ambas fracciones proteicas no coincidió con la de las proteínas

mayoritarias visualizadas en los geles teñidos con nitrato de plata, por lo que si bien estas fracciones son muy inmunogénicas serían minoritarias dentro del proteoma de *N. caninum*.

No ha sido posible establecer una clara relación entre los antígenos reconocidos en el western blot bidimensional con otros componentes antigénicos de *N. caninum* identificados, básicamente, mediante la realización de western blot en una dimensión, puesto que la información disponible hasta la fecha es muy limitada. Aunque la p-17 de *N. caninum* ha sido estudiada empleando geles en una dimensión en el apartado 4, sin embargo su composición polipeptídica, así como su representación en relación al conjunto de proteínas expresadas de *N. caninum*, se desconoce por el momento. Por ello, el empleo de la electroforesis bidimensional nos ha permitido avanzar en su caracterización. De acuerdo con nuestros resultados, la p-17 está compuesta por 4 polipéptidos ácidos con pesos moleculares entre 17 y 19 kDa. Uno de ellos es una isoforma ácida de aproximadamente 19 kDa, cuyo peso molecular es muy similar al de la proteína de 18 kDa descrita por Björkman & Hemphill localizada en la membrana celular del taquizoíto de *N. caninum*, puesto que ésta fue reconocida por el anticuerpo monoclonal Nc-Mab-7. El anticuerpo Nc-Mab-7 no reaccionó frente a ninguna otra proteína, lo cual sugiere que se trataría de una única proteína muy inmunogénica que forma parte de la p-17 y que no es producto de degradación de ninguna otra proteína (datos parecidos a los obtenidos en el caso de la proteína de roptrias de *T. gondii* Tg M2AP por Rabenau *et al.* (2001). Diversos autores han descrito una proteína de 17 kDa de *C. parvum* que presentaría, al igual que en el caso de la p-17 de *N. caninum*, un pI ácido de aproximadamente 4,2-4,4 (Strong *et al.*, 2000; Priest *et al.*, 2001). Por otra parte, los cuatro componentes de la p-17 fueron reconocidos con una intensidad elevada por el suero procedente de la reproductora abortada, mientras que apenas fueron detectados por el suero de la reproductora con infección crónica. Estos resultados coinciden con los presentados en el capítulo 5 donde el antígeno de 17-18 kDa fue reconocido más intensamente por las reproductoras gestantes abortadas en comparación con las reproductoras gestantes no abortadas. Estos resultados abren las puertas a futuros estudios que incluyan un panel de sueros representativo de la población diana con el objetivo de confirmar estas diferencias en función de la fase de la infección y determinar el papel de la p-17 como marcador de infección aguda. Un estudio reciente realizado sobre el reconocimiento de antígenos de *N. caninum* por sueros de perros con infecciones naturales también ha puesto en evidencia el valor diagnóstico de un polipéptido de 18 kDa (Tenter & Heckerroth, 2002).

Otra fracción proteica que resultó ser inmunodominante en western blot bidimensional se localizó en el rango de 33 kDa, la cual está compuesta por dos polipéptidos y de acuerdo con su peso molecular y pI ácido podría coincidir con la proteína de gránulos densos GRA7. Esta hipótesis concuerda con los resultados obtenidos en el capítulo 7, donde el APA reconoció mayoritariamente un clon que contenía el inserto de cDNA que codificaba dicha proteína. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio no permiten confirmar si algún componente de la p-17 es un producto de degradación procedente del procesamiento proteolítico de la GRA7 o si ambas fracciones proteicas presentan epítomos compartidos. En diversos estudios realizados sobre la caracterización de la proteína GRA7 de *T. gondii* mediante 2D-PAGE ésta presentó un pI ácido de 4,7, similar a lo observado en el caso de la p-33. Sin embargo, en el caso de la GRA7 de *N. caninum*, se especula con la posibilidad de que esta proteína sea mayoritaria puesto que se ha comprobado la existencia de numerosas ESTs correspondientes a GRA7 de *Neospora* en las bases de datos (Ellis *et al.*, 2000a), si bien es cierto que a veces existe una falta de correlación entre los niveles de mRNA y la expresión de su correspondiente proteína (Barret *et al.*, 2000). El empleo de métodos de secuenciación como la huella peptídica o la espectrometría de masas a partir de los polipéptidos de interés resueltos en geles bidimensionales son técnicas que permitirían confirmar alguna de estas hipótesis, previamente planteadas en el capítulo 7 al comparar los resultados de secuenciación con la información existente en las bases de datos.

Con independencia de la identidad de la p-33, esta fracción proteica debe considerarse, junto con la p-17, como una herramienta útil en el inmunodiagnóstico y en el estudio de la respuesta inmune humoral desarrollada por los animales infectados con *N. caninum*. En el estudio de los antígenos de *T. gondii* mediante 2D-PAGE, los sueros procedentes de pacientes humanos con infección aguda y crónica reconocieron con mayor frecuencia, entre otros, varios antígenos con un peso molecular entre 32 y 33 kDa. Los resultados obtenidos en este estudio ponen de manifiesto que al menos un componente de una fracción de *N. caninum* con un peso molecular similar es reconocido tanto por animales con infección aguda como crónica.

Finalmente, el suero de la reproductora que presentó aborto reconoció otras dos fracciones proteicas inmunodominantes, compuestas por varias proteínas, en los rangos de peso molecular de 36 y 66 kDa. Estos resultados preliminares ponen de manifiesto que las cuatro fracciones inmunodominantes de *N. caninum* detectadas mediante 2D-PAGE presentan

pesos moleculares similares a los antígenos inmunodominantes descritos en el capítulo 5, por lo que el empleo de la 2D-PAGE junto con el western blot y espectrometría de masas podría ayudar considerablemente a la caracterización de estos antígenos.

Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo de tesis doctoral confirman la dificultad que existe para caracterizar la p-17 de *N. caninum*, ya que se trata de una fracción inmunogénica minoritaria dentro del conjunto de proteínas visualizadas en los geles bidimensionales y el anticuerpo específico APA-17 reconoce junto con la p-17 otra fracción inmunodominante, la p-33. Por otra parte, el mapa proteico de *N. caninum* constituye el primer paso para realizar futuros análisis del proteoma de *N. caninum*, los cuales deberán incluir la secuenciación de las proteínas de interés, ya que la combinación de la 2D-PAGE con la secuenciación por huella peptídica (espectrometría de masas) resulta de gran utilidad a la hora de interpretar los resultados mediante la comparación de los conjuntos de masas peptídicas experimentales con las masas peptídicas teóricas calculadas para cada una de las proteínas existentes en las bases de datos.

9. CONCLUSIONES

De la validación de técnicas diagnósticas serológicas en la neosporosis bovina

Primera. El proceso de validación de la IFI y el ELISA realizado en este trabajo ha demostrado la existencia de dos poblaciones bovinas serológicas independientes -fetos y reproductoras- junto con la necesidad de emplear diferentes puntos de corte para cada una de las técnicas serológicas en función de la edad del animal y el objetivo de la técnica (diagnóstico de la infección o del aborto).

Segunda. Se sugiere el empleo de dos puntos de corte distintos en las reproductoras infectadas, uno para máxima sensibilidad, cuando la finalidad de la técnica es investigar el estado serológico de un animal antes de su entrada en un rebaño libre de la infección por *Neospora*, y otro para máxima especificidad, cuando se pretende evaluar la presencia de la infección en una región. Por el contrario, en el caso de asumir un coste equivalente de los falsos positivos y negativos, se emplearán los dos puntos de corte junto con una prueba *a posteriori* -el western blot- que confirme los resultados dudosos.

Tercera. Los puntos de corte estimados en este estudio permiten emplear ambas pruebas serológicas -la IFI y el ELISA- de forma indistinta en el diagnóstico de la neosporosis bovina, ya que han demostrado una eficacia diagnóstica similar.

De los antígenos del taquizoíto de *N. caninum* con importancia para el inmunodiagnóstico en la especie bovina

Primera. Se describen cuatro antígenos inmunodominantes, cuyos pesos moleculares son de 17-18, 34-35, 37 y 60-62 kDa, que son reconocidos por las tres poblaciones bovinas estudiadas (fetos, reproductoras y sementales). Por otra parte, el patrón general de reconocimiento de antígenos específicos fue similar en vacas infectadas abortadas y no abortadas, excepto en lo referente a una mayor intensidad de reconocimiento de las proteínas de 17-18 y 34-35 kDa por parte de las reproductoras abortadas en el primer y segundo trimestre de gestación, respectivamente.

Segunda. Existe una relación entre los títulos de anticuerpos detectados por IFI y el número de antígenos reconocidos, correspondiendo los mayores títulos de anticuerpos, número de

antígenos reconocidos e intensidad de reconocimiento de los antígenos inmunodominantes a las vacas abortadas en comparación con los fetos y los sementales.

Tercera. La fracción antigénica de 17-18 kDa es el mejor marcador de la infección en las tres poblaciones bovinas estudiadas, y está directamente implicado en las fluctuaciones de los títulos de anticuerpos que tienen lugar durante la gestación en las reproductoras infectadas que abortan. Su mayor intensidad de reconocimiento en el momento del aborto sugiere su empleo como marcador de reactivación en los animales infectados *a priori* de forma crónica.

De la utilidad de la fracción proteica de 17 kDa para el diagnóstico de la infección por *N. caninum* en el ganado bovino

Primera. La fracción inmunodominante de 17-18 kDa ha demostrado tener un elevado valor diagnóstico con independencia de la edad de los animales analizados, razón por la cual podría ser un candidato ideal para el desarrollo de futuras pruebas diagnósticas serológicas basadas en antígenos recombinantes. Además, dicha fracción permite detectar ligeras variaciones de los niveles de anticuerpos en los diferentes grupos de edad bovinos infectados natural y experimentalmente, por lo que podría ser una alternativa al empleo de antígeno soluble para la detección de anticuerpos en los animales infectados por *N. caninum*.

De la identificación y caracterización de los cDNAs de *N. caninum* reconocidos por anticuerpos desarrollados frente a la p-17

Primera. Se confirma la presencia de epítomos de naturaleza glucídica altamente inmunogénicos en un gran número de las proteínas del taquizoíto de *N. caninum*. Sin embargo, los epítomos glucídicos presentes en la fracción proteica de 17 kDa no influyen notablemente en el reconocimiento proteico por parte de los anticuerpos específicos.

Segunda. El reconocimiento mayoritario por parte del APA-17 del clon que contiene una fase de lectura que codifica la proteína de gránulos densos GRA7 y la presencia de sitios de corte específicos para peptidasas en la secuencia de nucleótidos de GRA7 indican la posibilidad de que el antígeno de 17 kDa proceda de un procesamiento proteolítico de la proteína GRA7 o que ambas proteínas compartan epítomos.

De la caracterización de la p-17 de *N. caninum* mediante electroforesis bidimensional

Primera. Se ha construido un mapa preliminar del proteoma de *N. caninum* en el que se han resuelto aproximadamente 700 proteínas, el cual podría servir de referencia en futuros estudios de expresión y caracterización de proteínas.

Segunda. Se han identificado y caracterizado dos fracciones proteicas inmunodominantes, pero minoritarias de *N. caninum* en western blot bidimensional: la p-17 y la p-33, las cuales están compuestas por 4 y 2 polipéptidos, respectivamente. El reconocimiento de ambas fracciones proteicas por parte del anticuerpo APA-17 refuerza la hipótesis de un posible procesamiento proteolítico de la GRA7 o de la existencia de epítomos compartidos por ambas proteínas.

10. RESUMEN

Neospora caninum es un protozoo Apicomplexa que afecta fundamentalmente al ganado bovino y está considerado como uno de los agentes transmisibles productores de aborto más importantes en esta especie doméstica. La detección de anticuerpos específicos en el ganado bovino se viene realizando como técnica de rutina de diagnóstico para poner en evidencia la infección por *N. caninum* en los animales adultos y se utiliza como técnica complementaria en el diagnóstico de la neosporosis en fetos abortados. Sin embargo, el diagnóstico serológico presenta una serie de limitaciones ya que pueden influir factores como la edad del animal o el objetivo de la técnica y, por ello, no se ha establecido un punto de corte común para las diferentes técnicas serológicas. Por otra parte, la identificación y caracterización de los antígenos inmunodominantes de *N. caninum* implicados en la respuesta inmune humoral desarrollada por la especie bovina abre las puertas al desarrollo de nuevas pruebas inmunodiagnósticas más sensibles y específicas.

El primer objetivo de esta tesis doctoral fue validar dos de las técnicas inmunodiagnósticas más utilizadas en el diagnóstico serológico de la neosporosis bovina, la IFI y el ELISA, con el objetivo de esclarecer algunos aspectos controvertidos del diagnóstico serológico y, así, poder establecer una serie de pautas desde el punto de vista práctico a la hora de afrontar el control de la infección. El estudio confirmó la existencia de dos poblaciones bovinas serológicas independientes -fetos y reproductoras- y justificó la necesidad de emplear diferentes puntos de corte para cada una de las técnicas serológicas en función de la edad del animal y el objetivo de la técnica (diagnóstico de la infección o del aborto). En el caso de las reproductoras infectadas se recomendó el empleo de dos puntos de corte distintos, uno para máxima sensibilidad y otro para máxima especificidad junto con el western blot, únicamente, con el objetivo de confirmar los resultados dudosos.

El segundo objetivo que se planteó fue el estudio del patrón de reconocimiento de los antígenos de *N. caninum* en tres poblaciones bovinas con infecciones naturales importantes desde el punto de vista clínico y del diagnóstico de la neosporosis bovina (fetos, reproductoras y sementales). Las tres poblaciones bovinas reconocieron 4 antígenos inmunodominantes de 17-18, 34-35, 37 y 60-62 kDa. En concreto, la identificación de la fracción antigénica de 17-18 kDa fue el mejor marcador de la infección en las tres poblaciones bovinas estudiadas. Además, este antígeno estuvo directamente implicado en las fluctuaciones de los títulos de anticuerpos que tienen lugar durante la gestación en las reproductoras infectadas que abortan, razón por la

cual se sugirió su empleo como marcador diagnóstico de reactivación en los animales infectados *a priori* de forma crónica.

El tercer objetivo fue estudiar la utilidad diagnóstica de los antígenos inmunodominantes definidos en el apartado anterior. Para ello, se purificó el antígeno p-17 y se analizó su reconocimiento por parte de sueros procedentes de animales de diferentes grupos de edad con infección natural y experimental en la prueba de western blot. La p-17 demostró tener un elevado valor diagnóstico con independencia de la edad de los animales analizados, razón por la cual podría ser un candidato ideal para el desarrollo de futuras pruebas diagnósticas serológicas basadas en antígenos recombinantes. Además, la p-17 permitió detectar ligeras variaciones de los niveles de anticuerpos en los bovinos infectados natural y experimentalmente, por lo que podría sustituir al antígeno soluble en estudios de respuesta inmune desarrollada por los animales infectados con *N. caninum*.

Finalmente, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las tres primeras partes de este estudio, nos planteamos la realización del cuarto y quinto objetivos para caracterizar los antígenos inmunodominantes de *N. caninum* con interés en el inmunodiagnóstico.

El cuarto objetivo propuesto comprendió la identificación de los genes codificadores de los antígenos de interés. Para ello, se construyó una genoteca de cDNA de taquizoítos de *N. caninum* y se realizó su cribado con anticuerpos específicos dirigidos frente a la fracción proteica de interés. El anticuerpo policlonal -APA-17- purificado frente a la p-17 empleado en el cribado de la genoteca del cDNA del taquizoíto de *N. caninum* reconoció de forma mayoritaria el clon 4.1 que contiene una fase de lectura que codifica para la proteína de gránulos densos GRA7. La elevada especificidad del anticuerpo APA-17 y el reconocimiento del clon 4.1 apuntaron a la posibilidad de que la p-17 podría proceder de un procesamiento proteolítico de la proteína GRA7 o la existencia de epítomos compartidos entre ambas proteínas.

Finalmente, el quinto objetivo incluyó la caracterización de la proteína inmunodominante de interés mediante electroforesis en geles bidimensionales y western blot. En un primer paso, se construyó un mapa de referencia del proteoma de *N. caninum* en el que se resolvieron aproximadamente 700 proteínas. Las fracciones proteicas inmunodominantes

-p-17 y p-33- caracterizadas mediante 2D-PAGE y western blot estuvieron compuestas por 4 y 2 polipéptidos, respectivamente. Además, se identificaron otras dos fracciones proteicas inmunodominantes con interés en el inmunodiagnóstico localizadas en el rango de peso molecular de 36 y 66 kDa integradas por proteínas neutras.

11. SUMMARY

Neospora caninum is an apicomplexan protozoan that mainly infects bovine species and it is considered to be the major cause of infectious bovine abortion world-wide. At present, the detection of anti-*Neospora* antibodies is a routine diagnostic tool in adult animals, whereas in foetuses it is used as a complementary technique. However, the serological diagnosis has several limitations, since factors such as the age of the animal or the purpose of testing can affect the results of the test. For this reason a commonly accepted cut-off point has not yet been established for the different techniques. On the other hand, the identification and characterization of the *Neospora* immunodominant antigens involved in the humoral immune responses developed by infected animals could lead to the development of more sensitive and specific immunodiagnostic tests.

The first objective of this doctoral thesis was to validate two of the most widely used immunodiagnostic techniques for the serological diagnosis of bovine neosporosis, the IFAT and the ELISA, in order to clarify several problematic aspects of serological diagnosis and, consequently, to set practical guidelines for the control of the infection. The present study confirmed the existence of two independent bovine subpopulations -foetuses and breeding cattle- and justified the need to employ different cut-off points according to animal age and purpose of testing for each serological test. For infected breeding cattle, the use of two cut-off points was suggested, one for maximum sensitivity and the other for maximum specificity, together with the western blot technique in order to confirm intermediate results.

The second planned objective was to investigate the recognition pattern of *N. caninum* antigens detected by three important naturally infected bovine subpopulations from a clinical and diagnostic viewpoint (foetuses, breeding cattle and bulls). The three bovine populations recognised four immunodominant antigens with an apparent molecular weight of 17-18, 34-35, 37 y 60-62 kDa. More specifically, the antibodies directed against the 17-18 kDa immunodominant antigen represent a major fraction of IgGs developed by *N. caninum* infected animals. Identification of the 17-18 kDa antigen was, therefore, the best marker to detect infection in all the bovine populations included in this part of the study. Besides, the 17-18 kDa antigen was directly involved in the antibody fluctuations described throughout gestation in aborting breeding cattle. Thus, this antigen has been proposed as a diagnostic marker to be used to detect a recrudescence of the infection in chronically infected animals.

The third objective corresponded to studying the diagnostic value of the immunodominant antigens identified in the previously described part of the study. To do this, the p-17 antigen was purified and its recognition was analysed using sera belonging to naturally and experimentally infected animals. The p-17 antigen proved to be an ideal candidate for the development of future diagnostic tests based on specific recombinant antigens and also permitted to slight fluctuations in the antibody levels in naturally and experimentally infected bovines to be detected.

Finally, according to the results obtained at this point two objectives were established with the common aim of characterising the *N. caninum* immunodominant antigens with immunodiagnostic value.

The fourth objective proposed concerned the identification of the genes, which encode the antigens of interest. For this purpose, a cDNA library was constructed from *N. caninum* tachyzoites and the immunological screening was accomplished with specific antibodies directed against the antigenic fraction of interest. The purified polyclonal antibody APA-17, which was employed in the immunoscreening, mainly recognised the clon named 4.1 containing an ORF, which encodes the dense granule protein GRA7. The high specificity shown by the polyclonal antibody APA-17 could be explained by a possible proteolytic processing of GRA7 or the existence of shared epitopes by both proteins (p-17 and GRA7).

The final objective corresponded to characterization of the immunodominant protein of interest by two dimensional electrophoresis in combination with the western blot technique. The first step involved the construction of a reference proteome map of the tachyzoite stage of *N. caninum*, and over 700 protein spots were resolved. The immunodominant antigenic fractions -p-17 y p-33- characterised by 2D-PAGE and the western blot technique were composed of 4 and 2 acid polypeptides, respectively. Apart from these results, another two neutral immunodominant antigenic fractions of immunodiagnostic interest in the molecular weight ranges of 36 and 66 kDa were also identified.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Aduriz, G., Atxaerandio, R., González, L., Juste, R. A., García-Peña, F., Moreno, B. (1999). El diagnóstico de los abortos del ganado vacuno en Neiker. *Laboratorio Veterinario (AVEDILA)*. 10, 14-16.
- Aduriz, G., Atxaerandio, R., Moreno, B. (2001). El diagnóstico laboratorial del aborto bovino. *Albeitar*. 50, 4-5.
- Agerholm, J. S., Willadsen, C. M., Nielsen, T. K., Giese, S. B., Holm, E., Jensen, L., and Agger, J. F. (1997). Diagnostic studies of abortion in Danish dairy herds. *Zentralbl.Veterinarmed.A* 44, 551-558.
- Ajioka, J. W., Boothroyd, J. C., Brunk, B. P., Hehl, A., Hillier, L., Manger, I. D., Marra, M., Overton, G. Ch., Roos, D. S., Wan, K.L., Waterston, R., Sibley, L. D. (1998). Gene discovery by EST sequencing in *Toxoplasma gondii* reveals sequences restricted to the Apicomplexa. *Genome Res.* 8, 18-28.
- Almería, S., De Marez, T., Dawson, H., Araujo, R., Dubey, J. P., Gasbarre, L. C. (2002a). Experimental infection of pregnant cows with *Neospora caninum*: immune responses in dam and fetus. Cost-Action 854, Protozoal Reproduction Losses in Farm Ruminants. Schloss Münchenwiler, Switzerland.
- Almería, S., Ferrer, D., Pabon, M., Castella, J., Manas, S. (2002b). Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. *Vet.Parasitol.* 107, 287-294.
- Anderson, M. L., Blanchard, P. C., Barr, B. C., Dubey, J. P., Hoffman, R. L., and Conrad, P. A. (1991). *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 198, 241-244.
- Anderson, M. L., Palmer, C. W., Thurmond, M. C., Picanso, J. P., Blanchard, P. C., Breitmeyer, R. E., Layton, A. W., McAllister, M., Daft, B., Kinde, H. (1995). Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 207, 1206-1210.
- Andrianarivo, A. G., Barr, B. C., Anderson, M. L., Rowe, J. D., Packham, A. E., Sverlow, K. W., Conrad, P. A. (2001). Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum*. *Parasitol.Res.* 87, 817-825.
- Andrianarivo, A. G., Choromanski, L., McDonough, S. P., Packham, A. E., Conrad, P. A. (1999). Immunogenicity of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite preparation formulated with different adjuvants. *Int.J.Parasitol.* 29, 1613-1625.
- Andrianarivo, A. G., Rowe, J. D., Barr, B. C., Anderson, M. L., Packham, A. E., Sverlow, K. W., Choromanski, L., Loui, C., Grace, A., Conrad, P. A. (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.
- Appleford, P., Smith, J. E. (2000). Strain and stage specific variation in *Toxoplasma gondii* antigens. *Int. J. Parasitol.* 30, 1187-1191.
- Asai, T., Howe, D. K., Nakajima, K., Nozaki, T., Takeuchi, T., Sibley, L. D. (1998). *Neospora caninum*: tachyzoites express a potent type-I nucleoside triphosphate hydrolase. *Exp.Parasitol.* 90, 277-285.
- Ashburn, D., Davidson, M. M., Joss, A. W. L., Pennington, T. H., Ho-Yen, D. O. (1998). Improved diagnosis of reactivated toxoplasmosis. *J. Clin. Pathol.* 51, 105-109.
- Atkinson, R. A., Cook, R. W., Reddacliff, L. A., Rothwell, J., Broady, K. W., Harper, P., Ellis, J. T. (2000a). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection following an abortion outbreak in a dairy cattle herd. *Aust.Vet.J.* 78, 262-266.
- Atkinson, R. A., Ryce, C., Miller, C. M., Balu, S., Harper, P. A., Ellis, J. T. (2001). Isolation of *Neospora caninum* genes detected during a chronic murine infection. *Int.J.Parasitol.* 31, 67-71.
- Atkinson, R., Harper, P. A., Reichel, M. P., Ellis, J. T. (2000b). Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. *Parasitol.Today* 16, 110-114.

- Atkinson, R., Harper, P. A., Ryce, C., Morrison, D. A., Ellis, J. T. (1999). Comparison of the biological characteristics of two isolates of *Neospora caninum*. *Parasitology* 118 (Pt 4), 363-370.
- Attallah, A. M., Karawia, E. A., Ismail, H., Tabll, A. A., Nawar, A. A., Ragab, W. A., Abdel Aziz, M. M., El-Dosoky, I. (2002). Identification and characterization of a 26- to 28-kDa circulating antigen of *Fasciola gigantica*. *Ann Trop Med. Parasitol.* 96, 271-82.
- Aubert, D., Maine, G. T., Villena, I., Hunt, J. C., Howard, L., Sheu, M., Brojanac, S., Chovan, L. E., Nowlan, S. F., Pinon, J. M. (2000). Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay. *J.Clin.Microbiol.* 38, 1144-1150.
- Baillargeon, P., Fecteau, G., Pare, J., Lamothe, P., Sauve, R. (2001). Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 218, 1803-1806.
- Baker, D. G., Morishita, T. Y., Brooks, D. L., Shen, S. K., Lindsay, D. S., Dubey, J. P. (1995). Experimental oral inoculations in birds to evaluate potential definitive hosts of *Neospora caninum*. *J.Parasitol.* 81, 783-785.
- Barber, J. S., Gasser, R. B., Ellis, J., Reichel, M. P., McMillan, D., Trees, A. J. (1997). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. *J.Parasitol.* 83, 1056-1058.
- Barber, J. S., Holmdahl, O. J., Owen, M. R., Guy, F., Ugglá, A., Trees, A. J. (1995). Characterization of the first European isolate of *Neospora caninum* (Dubey, Carpenter, Speer, Topper and Ugglá). *Parasitology* 111 (Pt 5), 563-568.
- Barber, J., Trees, A. J., Owen, M., Tennant, B. (1993). Isolation of *Neospora caninum* from a British dog. *Vet.Rec.* 133, 531-532.
- Barberán, M., Cebrián, L., Ferrer, L., Esteban, I. (1998). Aplicación de la histopatología, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia indirecta al diagnóstico de los abortos por *Neospora* en bóvidos. *Libro de Ponencias V Congreso Internacional de Medicina Bovina A.N.E.M.B.E.* Sitges, Mayo, 203-204.
- Barling, K. S., Sherman, M., Peterson, M. J., Thompson, J. A., McNeill, J. W., Craig, T. M., Adams, L. G. (2000). Spatial associations among density of cattle, abundance of wild canids, and seroprevalence to *Neospora caninum* in a population of beef calves. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 217, 1361-1365.
- Barr, B. C., Anderson, M. L., Dubey, J. P., Conrad, P. A. (1991a). *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. *Vet.Pathol.* 28, 110-116.
- Barr, B. C., Anderson, M. L., Sverlow, K. W., Conrad, P. A. (1995). Diagnosis of bovine fetal *Neospora* infection with an indirect fluorescent antibody test. *Vet.Rec.* 137, 611-613.
- Barr, B. C., Anderson, M. L., Woods, L. W., Dubey, J. P., Conrad, P. A. (1992). *Neospora*-like protozoal infections associated with abortion in goats. *J.Vet.Diagn.Invest* 4, 365-367.
- Barr, B. C., Conrad, P. A., Breitmeyer, R., Sverlow, K., Anderson, M. L., Reynolds, J., Chauvet, A. E., Dubey, J. P., Ardans, A. A. (1993). Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: four cases (1990-1992). *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 202, 113-117.
- Barr, B. C., Conrad, P. A., Dubey, J. P., Anderson, M. L. (1991b). *Neospora*-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. *J.Vet.Diagn.Invest* 3, 39-46.
- Barr, B. C., Conrad, P. A., Sverlow, K. W., Tarantal, A. F., Hendrickx, A. G. (1994a). Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. *Lab Invest* 71, 236-242.
- Barr, B. C., Rowe, J. D., Sverlow, K. W., BonDurant, R. H., Ardans, A. A., Oliver, M. N., Conrad, P. A. (1994b). Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. *J.Vet.Diagn.Invest* 6, 207-215.

- Barret, J., Jefferies, J. R., Brophy, P. M. (2000). Parasite proteomics. *Parasitol. Today*. 16, 400-403.
- Barta, J. R., Dubey, J. P. (1992). Characterization of anti-*Neospora caninum* hyperimmune rabbit serum by western blot analysis and immunoelectron microscopy. *Parasitol. Res.* 78, 689-694.
- Bartels, C. J., Wouda, W., Schukken, Y. H. (1999). Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology* 52, 247-257.
- Baszler, T. V., Adams, S., Vander-Schalie, J., Mathison, B. A., 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.
- Baszler, T. V., Gay, L. J., Long, M. T., Mathison, B. A. (1999a). Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. *J. Clin. Microbiol.* 37, 4059-4064.
- Baszler, T. V., Knowles, D. P., Dubey, J. P., Gay, J. M., Mathison, B. A., McElwain, T. F. (1996). Serological diagnosis of bovine neosporosis by *Neospora caninum* monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1423-1428.
- Baszler, T. V., Long, M. T., McElwain, T. F., Mathison, B. A. (1999b). Interferon-gamma and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. *Int. J. Parasitol.* 29, 1635-1646.
- Baszler, T. V., McElwain, T. F., Mathison, B. A. (2000). Immunization of BALB/c mice with killed *Neospora caninum* tachyzoite antigen induces a type 2 immune response and exacerbates encephalitis and neurological disease. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 7, 893-898.
- Bergeron, N., Fecteau, G., Villeneuve, A., Girard, C., Pare, J. (2001a). Failure of dogs to shed oocysts after being fed bovine fetuses naturally infected by *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 97, 145-152.
- Bergeron, N., Girard, C., Pare, J., Fecteau, G., Robinson, J., Baillargeon, P. (2001b). Rare detection of *Neospora caninum* in placentas from seropositive dams giving birth to full-term calves. *J. Vet. Diagn. Invest* 13, 173-175.
- Bjerkas, I., Dubey, J. P. (1991). Evidence that *Neospora caninum* is identical to the Toxoplasma-like parasite of Norwegian dogs. *Acta Vet. Scand.* 32, 407-410.
- Bjerkas, I., Jenkins, M. C., Dubey, J. P. (1994). Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 1, 214-221.
- Bjerkas, I., Presthus, J. (1989). The neuropathology in toxoplasmosis-like infection caused by a newly recognized cyst-forming sporozoon in dogs. *APMIS* 97, 459-468.
- Björkman, C., Alenius, S., Manuelsson, U., Ugglå, A. (2000). *Neospora caninum* and bovine virus diarrhoea virus infections in Swedish dairy cows in relation to abortion. *Vet. J.* 159, 201-206.
- Björkman, C., Hemphill, A. (1998). Characterization of *Neospora caninum* iscom antigens using monoclonal antibodies. *Parasite Immunol.* 20, 73-80.
- Björkman, C., Holmdahl, O. J., Ugglå, 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.
- Björkman, C., Johansson, O., Stenlund, S., Holmdahl, O. J., Ugglå, A. (1996). *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208, 1441-1444.
- Björkman, C., Lunden, A., Holmdahl, J., Barber, J., Trees, A. J., Ugglå, A. (1994). *Neospora caninum* in dogs: detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. *Parasite Immunol.* 16, 643-648.
- Björkman, C., McAllister, M. M., Frossling, J., Naslund, K., Leung, F., Ugglå, A. (2003). Application of the *Neospora caninum* IgG avidity ELISA in assessment of chronic reproductive losses after an outbreak of neosporosis in a herd of beef cattle. *J. Vet. Diagn. Invest* 15, 3-7.

- Björkman, C., Naslund, K., Stenlund, S., Maley, S. W., Buxton, D., Uggla, A.** (1999). An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. *J.Vet.Diagn.Invest* 11, 41-44.
- Björkman, C., Uggla, A.** (1999). Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Int.J.Parasitol.* 29, 1497-1507.
- Bohne, W., Gross, U., Ferguson, D. J., Heesemann, J.** (1995). Cloning and characterization of a bradyzoite-specifically expressed gene (hsp30/bag1) of *Toxoplasma gondii*, related to genes encoding small heat-shock proteins of plants. *Mol. Microbiol.* 16, 1221-1230.
- Blackman, M., Bannister, L.** (2001). Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 117, 11-25.
- Boulton, J. G., Gill, P. A., Cook, R. W., Fraser, G. C., Harper, P. A., Dubey, J. P.** (1995). Bovine *Neospora* abortion in north-eastern New South Wales. *Aust.Vet.J.* 72, 119-120.
- Bryan, L. A., Gajadhar, A. A., Dubey, J. P., and Haines, D. M.** (1994). Bovine neonatal encephalomyelitis associated with a *Neospora* sp. protozoan. *Can.Vet.J.* 35, 111-113.
- Burg, J.L., Perelman, D., Kasper, L.H., Ware, P.L., Boothroyd, J.C.** (1988). Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 141, 3584-91.
- Buxton, D.** (1998). Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. *Vet.Res.* 29, 289-310.
- Buxton, D., Caldow, G. L., Maley, S. W., Marks, J., Innes, E. A.** (1997). Neosporosis and bovine abortion in Scotland. *Vet.Rec.* 141, 649-651.
- Buxton, D., Maley, S. W., Wright, S., Thomson, K. M., Rae, A. G., Innes, E. A.** (1998). The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. *J.Comp Pathol.* 118, 267-279.
- Buxton, D., McAllister, M. M., Dubey, J. P.** (2002). The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends Parasitol.* 18, 546-552.
- Buxton, D., Wright, S., Maley, S. W., Rae, A. G., Lunden, A., Innes, E. A.** (2001). Immunity to experimental neosporosis in pregnant sheep. *Parasite Immunol.* 23, 85-91.
- Cabaj, W., Choromanski, L., Rogers, S., Moskwa, B., Malczewski, A.** (2000). *Neospora caninum* infections in aborting dairy cows in Poland. *Acta Parasitologica.* 45, 113-114.
- Caldow, G. L.** (1998). Bovine abortion outbreak associated with *Neospora* and other infectious agents. *Vet.Rec.* 142, 118-119.
- Campero, C. M., Anderson, M. L., Conosciuto, G., Odriozola, H., Bretschneider, G., Poso, M. A.** (1998). *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in Argentina. *Vet.Rec.* 143, 228-229.
- Canada, N., Meireles, C. S., Rocha, A., Sousa, S., Thompson, G., Dubey, J. P., Romand, S., Thulliez, P., Correia da Costa, J. M.** (2002). First Portuguese isolate of *Neospora caninum* from an aborted fetus from a dairy herd with endemic neosporosis. *Vet.Parasitol.* 110, 11-15.
- Carucci, D. J., Yates, J. R., Florens, L.** (2002). Exploring the proteome of *Plasmodium*. *Int. J. Parasitol.* 32, 1539-1542.
- Cazabonne, P., Bessieres, M. H., Seguela, J. P.** (1994). Kinetics study and characterisation of target excreted/secreted antigens of immunoglobulin G, A, M and E antibodies from mice infected with different strains of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Res.* 80, 58-63.
- Cebrián, L., Barberán, M., Ramos, J., Senent, J.** (1998). Detección de animales infectados por *Neospora* mediante inmunofluorescencia indirecta y su aplicación al control de la enfermedad. *Libro de Ponencias V Congreso Internacional de Medicina Bovina A.N.E.M.B.E.* Sitges, Mayo, 201-202.

- Cédère, O., Dubremetz, J. F., Bout, D., Lebrun, M. (2002). The *Toxoplasma gondii* protein MIC3 requires pro-peptide cleavage and dimerization to function as adhesin. *The EMBO Journal*. 21, 2526-2536.
- Cesbron-Delauw, M. F., Tomavo, S., Beauchamps, P., Fourmaux, M. P., Camus, D., Capron, A., Dubremetz, J. F. (1994). Similarities between the primary structures of two distinct major surface proteins of *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 269, 16217-22.
- Cheadle, M. A., Spencer, J. A., Blagburn, B. L. (1999). Seroprevalences of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in nondomestic felids from southern Africa. *J.Zoo.Wildl.Med.* 30, 248-251.
- Cheah, T. S., Sani, R. A., Chandrawathani, P. (2001). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in a dairy cattle farm in Malaysia. *WAAVP*, Stresa, Italia, 19.
- Cohen, A. M., Rumpel, K., Coombs, G. H., Wastling, J. M. (2002). Characterisation of global protein expression by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry: proteomics of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 32, 39-51.
- Cole, R. A., Lindsay, D. S., Blagburn, B. L., Dubey, J. P. (1995). Vertical transmission of *Neospora caninum* in mice. *J.Parasitol.* 81, 730-732.
- Cole, R. A., Lindsay, D. S., Dubey, J. P., Toivio-Kinnucan, M. A., Blagburn, B. L. (1994). Characterization of a murine monoclonal antibody generated against *Neospora caninum* tachyzoites by use of western blot analysis and immunoelectron microscopy. *Am.J.Vet.Res.* 55, 1717-1722.
- Collantes-Fernandez, E., Zaballo, A., Alvarez-Garcia, G., Ortega-Mora, L. M. (2002). Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. *J.Clin.Microbiol.* 40, 1194-1198.
- Conrad, P. A., Barr, B. C., Sverlow, K. W., Anderson, M., Daft, B., Kinde, H., Dubey, J. P., Munson, L., Ardans, A. (1993a). In vitro isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine foetuses. *Parasitology* 106, 239-249.
- Conrad, P. A., Sverlow, K., Anderson, M., Rowe, J., BonDurant, R., Tuter, G., Breitmeyer, R., Palmer, C., Thurmond, M., Ardans, A. (1993b). Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *J.Vet.Diagn.Invest* 5, 572-578.
- Conraths, F. J., Bauer, C., Becker, W. (1996). [Detection of antibodies against *Neospora caninum* in cows on Hessian farms with abortion and fertility problems]. *Dtsch.Tierarztl.Wochenschr.* 103, 221-224.
- Conraths, F. J., Schares, G. (2000). Seroepidemiological evidence for bovine neosporosis and *Neospora caninum*-associated abortions in the Russian Federation, in: Hemphill, A., Gottstein, B. A European perspective on *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 30, 877-924.
- Corbellini, L. G., Driemeier, D., Cruz, C. F., Gondim, L. F., Wald, V. (2002). Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Vet.Parasitol.* 103, 195-202.
- Cuddon, P., Lin, D. S., Bowman, D. D., Lindsay, D. S., Miller, T. K., Duncan, I. D., deLahunta, A., Cummings, J., Suter, M., Cooper, B. (1992). *Neospora caninum* infection in English Springer Spaniel littermates. Diagnostic evaluation and organism isolation. *J.Vet.Intern.Med.* 6, 325-332.
- Dannatt, L., Guy, F., Trees, A. J. (1995). Abortion due to *Neospora* species in a dairy herd. *Vet.Rec.* 137, 566-567.
- Darcy, F., Torpier, G., Cesbron-Delauw, M.F., Decoster, A., Ridel, P.R., Duquesne, V., Charif, H., Godard, I., Pierce, R.J., Auriault, C. (1989). Antigens of *Toxoplasma gondii* with a diagnostic and potential immunoprophylactic value: new strategies of identification. *Ann. Biol. Clin.* 47, 451-7.
- Davison, H. C., French, N. P., Trees, A. J. (1999a). Herd-specific and age-specific seroprevalence of *Neospora caninum* in 14 British dairy herds. *Vet.Rec.* 144, 547-550.

- Davison, H. C., Guy, C. S., McGarry, J. W., Guy, F., Williams, D. J., Kelly, D. F., Trees, A. J. (2001). Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. *Res.Vet.Sci.* 70, 163-168.
- Davison, H. C., Guy, F., Trees, A. J., Ryce, C., Ellis, J. T., Otter, A., Jeffrey, M., Simpson, V. R., Holt, J. J. (1999b). In vitro isolation of *Neospora caninum* from a stillborn calf in the UK. *Res.Vet.Sci.* 67, 103-105.
- Davison, H. C., Otter, A., Trees, A. J. (1999c). Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *Int.J.Parasitol.* 29, 1683-1689.
- Davison, H. C., Greiner, M., Trees, A. J. (1999d). Quantitative analysis of *Neospora caninum* serological data obtained from dairy cattle. *Proceedings of the Society of Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine*, Annual Conference, Bristol, UK, 172-181.
- De Marez, T., Liddell, S., Dubey, J. P., Jenkins, M. C., Gasbarre, L. (1999). Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. *Int.J.Parasitol.* 29, 1647-1657.
- De Meerschman, F., Speybroeck, N., Berkvens, D., Rettignera, C., Focant, C., Leclipteux, T., Cassart, D., Losson, B. (2002). Fetal infection with *Neospora caninum* in dairy and beef cattle in Belgium. *Theriogenology* 58, 933-945.
- Dea-Ayuela, M. A., Ubeira, F. M., Pitarch A., Gil, C., Martinez-Fernandez, A. R., Bolas, F. (2001). A comparison of antigenic peptides in muscle larvae of several *Trichinella* species by two-dimensional western-blot analysis with monoclonal antibodies. *Parasite* 2, 117-119.
- DeLong E. R., DeLong D. M., Clarke-Pearson D. L. (1998). Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristics curves: A nonparametric approach. *Biometrics* 44, 837-845.
- Dijkstra, T., Barkema, H. W., Bjorkman, C., Wouda, W. (2002a). A high rate of seroconversion for *Neospora caninum* in a dairy herd without an obvious increased incidence of abortions. *Vet.Parasitol.* 109, 203-211.
- Dijkstra, T., Barkema, H. W., Eysker, M., Hesselink, J. W., Wouda, W. (2002b). Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. *Vet.Parasitol.* 105, 99-104.
- Dijkstra, T., Barkema, H. W., Hesselink, J. W., Wouda, W. (2002c). Point source exposure of cattle to *Neospora caninum* consistent with periods of common housing and feeding and related to the introduction of a dog. *Vet.Parasitol.* 105, 89-98.
- Dijkstra, T., Barkema, H. W., Eysker, M., Wouda, W. (2001a). Evidence of postnatal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. *Int. J. Parasitol.* 31, 209-215.
- Dijkstra, T., Eysker, M., Schares, G., Conraths, F. J., Wouda, W., Barkema, H. W. (2001b). Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int.J.Parasitol.* 31, 747-752.
- Dreier, K. J., Stewarter, L. W., Kerlin, R. L., Ritter, D. M., Brake, D. A. (1999). Phenotypic characterisation of a *Neospora caninum* temperature-sensitive strain in normal and immunodeficient mice. *Int.J.Parasitol.* 29, 1627-1634.
- Dubey, J. P. (1999a). Neosporosis in cattle: biology and economic impact. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 214, 1160-1163.
- Dubey, J. P. (1999b). Neosporosis--the first decade of research. *Int.J.Parasitol.* 29, 1485-1488.
- Dubey, J. P. (1999c). Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Vet.Parasitol.* 84, 349-367.
- Dubey, J. P., Barr, B. C., Barta, J. R., Bjerkas, I., Björkman, C., Blagburn, B. L., Bowman, D. D., Buxton, D., Ellis, J. T., Gottstein, B., Hemphill, A., Hill, D. E., Howe, D. K., Jenkins, M. C., Kobayashi, Y., Koudela, B., Marsh, A. E., Mattsson, J. G., McAllister, M. M., Modry, D., Omata, Y., Sibley, L. D., Speer, C. A., Trees, A. J., Uggla, A., Upton, S. J., Williams, D. J., Lindsay, D. S. (2002a). Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *Int.J.Parasitol.* 32, 929-946.

- Dubey, J. P., Carpenter, J. L., Speer, C. A., Topper, M. J., Uggla, A. (1988a). Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192, 1269-1285.
- Dubey, J. P., de Lahunta, A. (1993). Neosporosis associated congenital limb deformities in a calf. *Appl. Parasitol.* 34, 229-233.
- Dubey, J. P., Dorrough, K. R., Jenkins, M. C., Liddell, S., Speer, C. A., Kwok, O. C., Shen, S. K. (1998a). Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. *Int. J. Parasitol.* 28, 1293-1304.
- Dubey, J. P., Hartley, W. J., Lindsay, D. S. (1990). Congenital *Neospora caninum* infection in a calf with spinal cord anomaly. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 197, 1043-1044.
- Dubey, J. P., Hattel, A. L., Lindsay, D. S., Topper, M. J. (1988b). Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193, 1259-1263.
- Dubey, J. P., Hill, D. E., Lindsay, D. S., Jenkins, M. C., Uggla, A., Speer, C. A. (2002b). *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* are separate species/organisms. *Trends Parasitol.* 18, 66-69.
- Dubey, J. P., Jenkins, M. C., Adams, D. S., McAllister, M. M., Anderson-Sprecher, R., Baszler, T. V., Kwok, O. C., Lally, N. C., Björkman, C., Uggla, A. (1997). Antibody responses of cows during an outbreak of neosporosis evaluated by indirect fluorescent antibody test and different enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Parasitol.* 83, 1063-1069.
- Dubey, J. P., Liddell, S., Mattson, D., Speert, C. A., Howe, D. K., Jenkins, M. C. (2001). Characterization of the Oregon isolate of *Neospora hughesi* from a horse. *J. Parasitol.* 87, 345-353.
- Dubey, J. P., Lindsay, D. S. (1989a). Fatal *Neospora caninum* infection in kittens. *J. Parasitol.* 75, 148-151.
- Dubey, J. P., Lindsay, D. S. (1989b). Transplacental *Neospora caninum* infection in cats. *J. Parasitol.* 75, 765-771.
- Dubey, J. P., Lindsay, D. S. (1989c). Transplacental *Neospora caninum* infection in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 50, 1578-1579.
- Dubey, J. P., Lindsay, D. S. (1990). *Neospora caninum* induced abortion in sheep. *J. Vet. Diagn. Invest* 2, 230-233.
- Dubey, J. P., Lindsay, D. S. (1996). A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet. Parasitol.* 67, 1-59.
- Dubey, J. P., Lindsay, D. S. (2000). Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocysts. *Parasitol. Res.* 86, 165-168.
- Dubey, J. P., Morales, J. A., Villalobos, P., Lindsay, D. S., Blagburn, B. L., Topper, M. J. (1996a). Neosporosis-associated abortion in a dairy goat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208, 263-265.
- Dubey, J. P., Rigoulet, J., Lagourette, P., George, C., Longeart, L., LeNet, J. L. (1996b). Fatal transplacental neosporosis in a deer (*Cervus eldi siamensis*). *J. Parasitol.* 82, 338-339.
- Dubey, J. P., Romand, S., Hilali, M., Kwok, O. C., Thulliez, P. (1998b). Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Egypt. *Int. J. Parasitol.* 28, 527-529.
- Dubremetz, J. F., Garcia-Reguet, N., Conseil, V., Fourmaux, M. N. (1998). Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *Int. J. Parasitol.* 28, 1007-13.
- Duglonska, H., Dytynska, K., Reichman, G., Stachelhaus, S. (2001). Towards the *Toxoplasma gondii* proteome: position of 13 parasite excretory antigens on a standardised map of two-dimensionally separated tachizoyte proteins. *Parasitol. Res.* 87, 634-637.
- Dyer, R. M., Jenkins, M. C., Kwok, O. C., Douglas, L. W., Dubey, J. P. (2000). Serologic survey of *Neospora caninum* infection in a closed dairy cattle herd in Maryland: risk of serologic reactivity by production groups. *Vet. Parasitol.* 90, 171-181.

- El Fakhri, Y., Oullete, M., Papadopoulo, B. (2002). A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. *Proteomics*. 2, 1007-1017.
- Ellis, J. T., McMillan, D., Ryce, C., Payne, S., Atkinson, R., Harper, P. A. (1999a). Development of a single tube nested polymerase chain reaction assay for the detection of *Neospora caninum* DNA. *Int.J.Parasitol.* 29, 1589-1596.
- Ellis, J. T., Morrison, D. A., Liddell, S., Jenkins, M. C., Mohammed, O. B., Ryce, C., Dubey, J. P. (1999b). The genus *Hammondia* is paraphyletic. *Parasitology* 118 (Pt 4), 357-362.
- Ellis, J. T., Ryce, C., Atkinson, R., Balu, S., Holmdahl, O. J. M. (2000a). *Neospora caninum*: gene discovery through analysis of expressed sequence tags, in: Hemphill, A., Gottstein, B. A European perspective on *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 30, 877-924.
- Ellis, J. T., Ryce, C., Atkinson, R., Balu, S., Jones, P., Harper, P. A. (2000b). Isolation, characterization and expression of a GRA2 homologue from *Neospora caninum*. *Parasitology* 120 (Pt 4), 383-390.
- Ellis, J., Luton, K., Baverstock, P. R., Brindley, P. J., Nimmo, K. A., Johnson, A. M. (1994). The phylogeny of *Neospora caninum*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 64, 303-311.
- Entrican, G. (2002). New technologies for studying immune regulation in ruminants. *Vet Immunol Immunopathol.* 87, 485-90.
- Fazaeli, A., Carter, P. E., Pennington, T. H. (2000). Intergenic spacer (IGS) polymorphism: a new genetic marker for differentiation of *Toxoplasma gondii* strains and *Neospora caninum*. *J.Parasitol.* 86, 716-723.
- Fischer, H.G., Stachelhaus, S., Sahm, M., Meyer, H. E., Reichmann, G. (1998). GRA7, an excretory 29 kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* 91, 251-62.
- Franzen, C., Muller, A., Bialek, R., Diehl, V., Salzberger, B., Fatkenheuer, G. (2000). Taxonomic position of the human intestinal protozoan parasite *Isospora belli* as based on ribosomal RNA sequences. *Parasitol.Res.* 86, 669-676.
- French, N. P., Clancy, D., Davison, H. C., Trees, A. J. (1999). Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control. *Int.J.Parasitol.* 29, 1691-1704.
- Fuchs, N., Sonda, K., Butikofer, P., Hemphill, A. (1999). Detection of surface-associated and intracellular glycoconjugates and glycoproteins in *Neospora caninum* tachyzoites. *Int.J.Parasitol.* 29, 1597-1611.
- Fuchs, N., Sonda, S., Gottstein, B., Hemphill, A. (1998). Differential expression of cell surface- and dense granule-associated *Neospora caninum* proteins in tachyzoites and bradyzoites. *J.Parasitol.* 84, 753-758.
- Fulton, J. D., Turk, J. L. (1959). Direct agglutination test for *Toxoplasma gondii*. *Lancet.* 11, 1068-9.
- Garcia-Vazquez, Z., Cruz-Vazquez, C., Medina-Espinoza, L., Garcia-Tapia, D., Chavarria-Martinez, B. (2002). Serological survey of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Aguascalientes, Mexico. *Vet.Parasitol.* 106, 115-120.
- Geißler, S., Sokolowska-Köhler, W., Bollmann, R., Jungblut, P. R., Presber W. (1999). *Toxoplasma gondii* infection: analysis of serological response by 2-de immunoblotting. *FEMS Immunol. Med. Mic.* 25, 299-311.
- Gjesdal, F. (1969). Age determination of bovine foetuses. *Acta vet. Scand.* 10, 197-218.
- Gondim, L. F., Gao, L., McAllister, M. M. (2002). Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. *J.Parasitol.* 88, 1159-1163.
- Gondim, L. F., Sartor, I. F., Hasegawa, M., Yamane, I. (1999). Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. *Vet.Parasitol.* 86, 71-75.

- González, L., Achaerandio, R., Buxton, D., Cuervo, L., Marco, J., Aduriz, G. (1996). Identificación de *Neospora* spp en casos de aborto en ganado bovino. *Proceedings VIII Reunión SEAPV*. Córdoba, Junio, 59.
- González, L., Buxton, D., Atxaerandio, R., Aduriz, G., Maley, S., Marco, J. C., Cuervo, L. A. (1999). Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain. *Vet.Rec.* 144, 145-150.
- Gottstein, B., Eperon, S., Dai, W. J., Cannas, A., Hemphill, A., Greif, G. (2001). Efficacy of toltrazuril and ponazuril against experimental *Neospora caninum* infection in mice. *Parasitol.Res.* 87, 43-48.
- Gottstein, B., Hentrich, B., Wyss, R., Thur, B., Busato, A., Stark, K. D., Müller, N. (1998). Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. *Int.J.Parasitol.* 28, 679-691.
- Greiner, M., Gardner, I. A. (2000). Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. *Prev. Vet. Med.* 45, 3-22.
- Greiner, M. (1995). Two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC) - a Microsoft- Excel template for the selection of cut-off values in diagnostic tests. *J. Immunol. Methods.* 185, 145-146.
- Guarino, A., Fusco, G., Savini, G., Di Francesco, G., Cringoli, G. (2000). Neosporosis in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Southern Italy. *Vet.Parasitol.* 91, 15-21.
- Guo, Z. G., Johnson, A. M. (1995). Genetic comparison of *Neospora caninum* with *Toxoplasma* and *Sarcocystis* by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. *Parasitol.Res.* 81, 365-370.
- Guy, C. S., Williams, D. J. L., Kelly, D. F., McGarry, J. W., Guy, F., Bjorkman, C., Smith, R. F., Trees, A. J. (2001). *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. *Vet.Rec.* 149, 443-449.
- Harkins, D., Clements, D. N., Maley, S., Marks, J., Wright, S., Esteban, I., Innes, E. A., Buxton, D. (1998). Western blot analysis of the IgG responses of ruminants infected with *Neospora caninum* and with *Toxoplasma gondii*. *J.Comp Pathol.* 119, 45-55.
- Harmelin, A., Perl, S., Nyska, A., Yakobson, B., Shpigel, N., Orgad, U., Dubey, J. P. (1995). Neosporosis-associated bovine abortion in Israel. *Vet.Rec.* 136, 80.
- Hassl, A., Aspöck, H. (1990). Antigens of *Toxoplasma gondii* recognised by sera of AIDs patients before, during and after clinical important infections. *Int. J. Med. Microbiol.* 272, 514-525.
- Hattel, A. L., Castro, M. D., Gummo, J. D., Weinstock, D., Reed, J. A., Dubey, J. P. (1998). Neosporosis-associated bovine abortion in Pennsylvania. *Vet.Parasitol.* 74, 307-313.
- Hay, W. H., Shell, L. G., Lindsay, D. S., Dubey, J. P. (1990). Diagnosis and treatment of *Neospora caninum* infection in a dog. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 197, 87-89.
- Haumont, M., Delhay, L., Garcia, L., Jurado, M., Mazzu, P., Daminet, V., Verlant, V., Bollen, A., Biemans, R., Jacquet, A. (2000). Protective immunity against congenital toxoplasmosis with recombinant SAG1 protein in a guinea pig model. *Infect. Immun.* 68, 4948-4953.
- Heckerroth, A. R., Tenter, A. M., Hemphill, A., Innes, E. A., Buxton, D. (2000). Evaluation of cross-reactivity between tachyzoites of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* by two-dimensional gel electrophoresis, in: Hemphill, A., Gottstein, B. A European perspective on *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 30, 877-924.
- Hedman, K., Lappalainen, M., Seppaia, I., Makela, O. (1989). Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J. Infect. Dis.* 159, 736-40.
- Hemphill, A., Felleisen, R., Connolly, B., Gottstein, B., Hentrich, B., Muller, N. (1997a). Characterization of a cDNA-clone encoding Nc-p43, a major *Neospora caninum* tachyzoite surface protein. *Parasitology* 115 (Pt 6), 581-590.

- Hemphill, A., Fuchs, N., Sonda, S., Gottstein, B., Hentrich, B. (1997b). Identification and partial characterization of a 36 kDa surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. *Parasitology* 115 (Pt 4), 371-380.
- Hemphill, A., Fuchs, N., Sonda, S., Hehl, A. (1999). The antigenic composition of *Neospora caninum*. *Int.J.Parasitol.* 29, 1175-1188.
- Hemphill, A., Gajendran, N., Sonda, S., Fuchs, N., Gottstein, B., Hentrich, B., Jenkins, M. (1998). Identification and characterisation of a dense granule-associated protein in *Neospora caninum* tachyzoites. *Int.J.Parasitol.* 28, 429-438.
- Hemphill, A., Gottstein, B. (1996). Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. *Parasitol.Res.* 82, 497-504.
- Hemphill, A., Gottstein, B., Kaufmann, H. (1996). Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. *Parasitology* 112 (Pt 2), 183-197.
- Hentrich, B., Waldvogel, A., Hemphill, A., Müller, N., Wyss, R., Hässig, M., Bruckner, L., Gottstein, B. (1997). Comparative assessment of molecular and immunodiagnostic methods based upon experimental and natural *Neospora* sp infection. *Proceedings EU COST820 Annual Workshop*. Oxford, UK, September, 82.
- Heydorn, A. O., Mehlhorn, H. (2002a). A re-evaluation of *Neospora* and *Hammondia* spp. *Trends Parasitol.* 18, 246.
- Heydorn, A. O., Mehlhorn, H. (2002b). *Neospora caninum* is an invalid species name: an evaluation of facts and statements. *Parasitol.Res.* 88, 175-184.
- Hietala, S. K., Thurmond, M. C. (1999). Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. *Int.J.Parasitol.* 29, 1669-1676.
- Higashi, N., Matsumoto, A., Tabaka, K., Nagatomo, Y. (1967). Electron microscope study of development of *Chikungunya* virus in green monkey Kidney (VERO) cells. *Virology.* 33, 55-69.
- High, K. P., Joiner, K. A., Handschumacher, R. E. (1994). Isolation, cDNA sequences, and biochemical characterization of the major cyclosporin-binding proteins of *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 269, 9105-9112.
- Hilali, M., Romand, S., Thulliez, P., Kwok, O. C., Dubey, J. P. (1998). Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in sera from camels from Egypt. *Vet.Parasitol.* 75, 269-271.
- Hill, D. E., Liddell, S., Jenkins, M. C., Dubey, J. P. (2001). Specific detection of *Neospora caninum* oocysts in fecal samples from experimentally-infected dogs using the polymerase chain reaction. *J.Parasitol.* 87, 395-398.
- Ho, M. S., Barr, B. C., Marsh, A. E., Anderson, M. L., Rowe, J. D., Tarantal, A. F., Hendrickx, A. G., Sverlow, K., Dubey, J. P., Conrad, P. A. (1996). Identification of bovine *Neospora* parasites by PCR amplification and specific small-subunit rRNA sequence probe hybridization. *J.Clin.Microbiol.* 34, 1203-1208.
- Ho, M. S., Barr, B. C., Rowe, J. D., Anderson, M. L., Sverlow, K. W., Packham, A., Marsh, A. E., Conrad, P. A. (1997a). Detection of *Neospora* sp. from infected bovine tissues by PCR and probe hybridization. *J.Parasitol.* 83, 508-514.
- Ho, M. S., Barr, B. C., Tarantal, A. F., Lai, L. T., Hendrickx, A. G., Marsh, A. E., Sverlow, K. W., Packham, A. E., Conrad, P. A. (1997b). Detection of *Neospora* from tissues of experimentally infected rhesus macaques by PCR and specific DNA probe hybridization. *J.Clin.Microbiol.* 35, 1740-1745.
- Hoar, B. R., Ribble, C. S., Spitzer, C. C., Spitzer, P. G., Janzen, E. D. (1996). Investigation of pregnancy losses in beef cattle herds associated with *Neospora* sp. infection. *Can.Vet.J.* 37, 364-366.
- Hoff, E. F., Cook, S. H., Sherman, G. D., Harper, J. M., Ferguson, D. J., Dubremetz, J. F., Carruthers, V. B. (2001). *Toxoplasma gondii*: molecular cloning and characterization of a novel 18-kDa secretory antigen, TgMIC10. *Exp.Parasitol.* 97, 77-88.

- Holmdahl, O. J., Mattsson, J. G. (1996). Rapid and sensitive identification of *Neospora caninum* by in vitro amplification of the internal transcribed spacer 1. *Parasitology* 112 (Pt 2), 177-182.
- Howe, D. K., Crawford, A. C., Lindsay, D., Sibley, L. D. (1998). The p29 and p35 immunodominant antigens of *Neospora caninum* tachyzoites are homologous to the family of surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect.Immun.* 66, 5322-5328.
- Howe, D. K., Sibley, L. D. (1999). Comparison of the major antigens of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Int.J.Parasitol.* 29, 1489-1496.
- Howe, D. K., Tang, K., Conrad, P. A., Sverlow, K., Dubey, J. P., Sibley, L. D. (2002). Sensitive and specific identification of *Neospora caninum* infection of cattle based on detection of serum antibodies to recombinant Ncp29. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 9, 611-615.
- Huong, L. T., Ljungstrom, B. L., Uggla, A., Björkman, C. (1998). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes in southern Vietnam. *Vet.Parasitol.* 75, 53-57.
- Innes, E. A., Andrianarivo, A. G., Björkman, C., Williams, D. J., Conrad, P. A. (2002). Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends Parasitol.* 18, 497-504.
- Innes, E. A., Buxton, D., Eperon, S., Gottstein, B. (2000a). Immunology of *Neospora caninum* infection in cattle and mice, in: Hemphill, A., Gottstein, B. A European perspective on *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 30, 877-924.
- Innes, E. A., Buxton, D., Maley, S., Wright, S., Marks, J., Esteban, I., Rae, A., Schock, A., Wastling, J. (2000b). Neosporosis. Aspects of epidemiology and host immune response. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 916, 93-101.
- Innes, E. A., Lunden, A., Esteban, I., Marks, J., Maley, S., Wright, S., Rae, A., Harkins, D., Vermeulen, A., McKendrick, I. J., Buxton, D. (2001a). A previous infection with *Toxoplasma gondii* does not protect against a challenge with *Neospora caninum* in pregnant sheep. *Parasite Immunol.* 23, 121-132.
- Innes, E. A., Pantou, W. R., Marks, J., Trees, A. J., Holmdahl, J., Buxton, D. (1995). Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of 3H uracil. *J.Comp Pathol.* 113, 95-100.
- Innes, E. A., Wright, S. E., Maley, S., Rae, A., Schock, A., Kirvar, E., Bartley, P., Hamilton, C., Carey, I. M., Buxton, D. (2001b). Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int.J.Parasitol.* 31, 1523-1534.
- Jacobs, D., Vercammen, M., Saman, E. (1999). Evaluation of recombinant dense granule antigen 7 (GRA7) of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies and analysis of a major antigenic domain. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6, 24-29.
- Jacobson R. H., Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. (1998) *Rev. Sci. Tech.* 17, 507-526.
- Jakubek, E. B., Brojer, C., Regnersen, C., Uggla, A., Schares, G., Björkman, C. (2001). Seroprevalences of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Swedish red foxes (*Vulpes vulpes*). *Vet.Parasitol.* 102, 167-172.
- Jardine, J. E., Last, R. D. (1995). The prevalence of neosporosis in aborted bovine fetuses submitted to the Allerton Regional Veterinary Laboratory. *Onderstepoort J.Vet.Res.* 62, 207-209.
- Jefferies, J., Campbell, A. M., van Rossum, A. J., Barret, J., Brophy, P. (2001). Proteomic analysis of *Fasciola hepatica* excretory- secretory products. *Proteomics.* 1, 1128-1132.
- Jenkins, M. C. (2001). Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 101, 291-310.
- Jenkins, M. C., Baszler, T., Björkman, C., Schares, G., Williams, D. (2002). Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Int.J.Parasitol.* 32, 631-636.

- Jenkins, M. C., Caver, J. A., Björkman, C., Anderson, T. C., Romand, S., Vinyard, B., Uggla, A., Thulliez, P., Dubey, J. P. (2000). Serological investigation of an outbreak of *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in southeastern United States. *Vet. Parasitol.* 94, 17-26.
- Jenkins, M. C., Wouda, W., Dubey, J. P. (1997). Serological response over time to recombinant *Neospora caninum* antigens in cattle after a neosporosis-induced abortion. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 4, 270-274.
- Jensen, A. M., Björkman, C., Kjeldsen, A. M., Wedderkopp, A., Willadsen, C., Uggla, A., Lind, P. (1999). Associations of *Neospora caninum* seropositivity with gestation number and pregnancy outcome in Danish dairy herds. *Prev.Vet.Med.* 40, 151-163.
- Jensen, L., Jensen, T. K., Lind, P., Henriksen, S. A., Uggla, A., Bille-Hansen, V. (1998). Experimental porcine neosporosis. *APMIS* 106, 475-482.
- Jenum, P. A., Stray-Pedersen, B., Gundersen, A. G. (1997). Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma immunoglobulin G avidity. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1972-1977.
- Kasper, L. H., Khan, I. A. (1998). Antigen-specific CD8+ T cells protect against lethal toxoplasmosis in mice infected with *Neospora caninum*. *Infect.Immun.* 66, 1554-1560.
- Kasper, L. (1987). Isolation and characterization of a monoclonal anti-p30 antibody resistant mutant of *Toxoplasma gondii*. *Parasit. Immunol.* 9, 433-445.
- Kaufmann, H., Yamage, M., Roditi, I., Dobbelaere, D., Dubey, J. P., Holmdahl, O. J., Trees, A., Gottstein, B. (1996). Discrimination of *Neospora caninum* from *Toxoplasma gondii* and other apicomplexan parasites by hybridization and PCR. *Mol.Cell Probes* 10, 289-297.
- Keller, N., Naguleswaran, A., Cannas, A., Vonlaufen, N., Bienz, M., Björkman, C., Bohne, W., Hemphill, A. (2002). Identification of a *Neospora caninum* microneme protein (NcMIC1) which interacts with sulfated host cell surface glycosaminoglycans. *Infect.Immun.* 70, 3187-3198.
- Khan, I. A., Schwartzman, J. D., Fonseka, S., Kasper, L. H. (1997). *Neospora caninum*: role for immune cytokines in host immunity. *Exp.Parasitol.* 85, 24-34.
- Kim, H. S. K., Yoon, I. J., Joo, H. S., Frey, M. L. (1993). Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch. Virol.* 133, 477-483.
- Kim, J. H., Lee, J. K., Hwang, E. K., Kim, D. Y. (2002a). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in Korean native beef cattle. *J.Vet.Med.Sci.* 64, 941-943.
- Kim, J. H., Lee, J. K., Lee, B. C., Park, B. K., Yoo, H. S., Hwang, W. S., Shin, N. R., Kang, M. S., Jean, Y. H., Yoon, H. J., Kang, S. K., Kim, D. Y. (2002b). Diagnostic Survey of Bovine Abortion in Korea: With Special Emphasis on *Neospora caninum*. *J.Vet.Med.Sci.* 64, 1123-1127.
- Kim, J. H., Sohn, H. J., Hwang, W. S., Hwang, E. K., Jean, Y. H., Yamane, I., Kim, D. Y. (2000). In vitro isolation and characterization of bovine *Neospora caninum* in Korea. *Vet.Parasitol.* 90, 147-154.
- Kimbita, E. N., Xuan, X., Huang, X., Miyazawa, T., Fukumoto, S., Mishima, M., Suzuki, H., Sugimoto, C., Nagasawa, H., Fujisaki, K., Suzuki, N., Mikami, T., Igarashi, I. (2001). Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cats by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant SAG1. *Vet. Parasitol.* 102, 35-44.
- Klein, F., Hietala, S., Berthet, H., Very, P., Gradinaru, D. (1997). *Neospora caninum*: enquête sérologique sur les avortements des bovines normands et charolais. *Le Point Vétérinaire.* 88, 1283-1286.
- Klose, J. (1975). Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetic.* 26, 231-243.

- Knoll, L. J., Boothroyd, J. C.** (1998). Isolation of developmentally regulated genes from *Toxoplasma gondii* by a gene trap with the positive and negative selectable marker hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *Mol. Cell. Biol.* 18, 807-14.
- Knowler, C. and Wheeler, S. J. (1995). *Neospora caninum* infection in three dogs. *J.Small Anim Pract.* 36, 172-177.
- Kobayashi, Y., Yamada, M., Omata, Y., Koyama, T., Saito, A., Matsuda, T., Okuyama, K., Fujimoto, S., Furuoka, H., Matsui, T.** (2001). Naturally-occurring *Neospora caninum* infection in an adult sheep and her twin fetuses. *J.Parasitol.* 87, 434-436.
- Kritzner, S., Sager, H., Blum, J., Krebber, R., Greif, G., Gottstein, B.** (2002). An explorative study to assess the efficacy of Toltrazuril-sulfone (Ponazuril) in calves experimentally infected with *Neospora caninum*. *Ann.Clin.Microbiol.Antimicrob.* 1, 4.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.
- Lally, N. C., Jenkins, M. C., Dubey, J. P.** (1996a). Development of a polymerase chain reaction assay for the diagnosis of neosporosis using the *Neospora caninum* 14-3-3 gene. *Mol.Biochem.Parasitol.* 75, 169-178.
- Lally, N. C., Jenkins, M. C., Dubey, J. P.** (1996b). 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, 275-279.
- Lally, N., Jenkins, M., Liddell, S., Dubey, J. P.** (1997). A dense granule protein (NCDG1) gene from *Neospora caninum*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 87, 239-243.
- Landmann, J. K., Jillella, D., O'Donoghue, P. J., McGowan, M. R.** (2002). Confirmation of the prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle by the use of embryo transfer. *Aust.Vet.J.* 80, 502-503.
- Lane, A., Soete, M., Dubremetz, J. F., Smith, J. E.** (1996). *Toxoplasma gondii*: appearance of specific markers during the development of tissue cysts in vitro. *Parasitol. Res.* 82, 340-6.
- Lappalainen, M., Koskela, P., Koskiniemi, M., Ammala, P., Hiilesmaa, V., Teramo K., Raivio, K. O., Remington, J. S., Hedman, K.** (1993). Toxoplasmosis acquired during pregnancy: improved serodiagnosis based on avidity of IgG. *J. Infect. Dis.* 167, 691-7.
- Lecordier, L., Fourmaux, M. P., Mercier, C., Dehecq, E., Masy, E., Cesbron-Delauw, M. F.** (2000). Enzyme-linked immunosorbent assays using the recombinant dense granule antigens GRA6 and GRA1 of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies. *Clin.Diagn.Lab.Immunol.* 7, 607-611.
- Lekutis, C., Ferguson, D. J., Boothroyd, J. C.** (2000). *Toxoplasma gondii*: identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2. *Exp. Parasitol.* 96, 89-96.
- Li, L., Brunk, B. P., Kissinger, J. C., Pape, D., Tang, K., Cole, R. H., Martin, J., Wylie, T., Dante, M., Fogarty, S. J., Howe, D. K., Liberator, P., Diaz, C., Anderson, J., White, M., Jerome, M. E., Johnson, E. A., Radke, J. A., Stoeckert, C. J., Jr., Waterston, R. H., Clifton, S. W., Roos, D. S., Sibley, L. D.** (2003). Gene Discovery in the Apicomplexa as Revealed by EST Sequencing and Assembly of a Comparative Gene Database. *Genome Res.* 13, 443-454.
- Li, S., Galvan, G., Araujo, F. G., Suzuki, Y., Remington, J. S., Parmley, S.** (2000). Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection using an enzyme-linked immunosorbent assay with a combination of recombinant antigens. *Clin.Diagn.Lab.Immunol.* 7, 781-787.
- Liddell, S., Jenkins, M. C., Dubey, J. P.** (1999a). A competitive PCR assay for quantitative detection of *Neospora caninum*. *Int.J.Parasitol.* 29, 1583-1587.
- Liddell, S., Jenkins, M. C., Dubey, J. P.** (1999b). Vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice determined by polymerase chain reaction detection. *J.Parasitol.* 85, 550-555.

- Liddell, S., Lally, N. C., Jenkins, M. C., Dubey, J. P. (1998). Isolation of the cDNA encoding a dense granule associated antigen (NCDG2) of *Neospora caninum*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 93, 153-158.
- Lind, P., Kjeldsen, A., Björkman, C., Uggla, A., Willadsen, C., Wedderkopp, A., Jensen, A. (1997). Seroepidemiological studies of *Neospora* infection in Danish cattle herds. *Proceedings EU COST820 Workshop*. Oxford, UK, September.
- Lindsay, D. S., Blagburn, B. L., Dubey, J. P. (1992). Factors affecting the survival of *Neospora caninum* bradyzoites in murine tissues. *J.Parasitol.* 78, 70-72.
- Lindsay, D. S., Butler, J. M., Blagburn, B. L. (1997). Efficacy of decoquinate against *Neospora caninum* tachyzoites in cell cultures. *Vet.Parasitol.* 68, 35-40.
- Lindsay, D. S., Butler, J. M., Rippey, N. S., Blagburn, B. L. (1996a). Demonstration of synergistic effects of sulfonamides and dihydrofolate reductase/thymidylate synthase inhibitors against *Neospora caninum* tachyzoites in cultured cells, and characterization of mutants resistant to pyrimethamine. *Am.J.Vet.Res.* 57, 68-72.
- Lindsay, D. S., Dubey, J. P. (1989a). Evaluation of anti-coccidial drugs' inhibition of *Neospora caninum* development in cell cultures. *J.Parasitol.* 75, 990-992.
- Lindsay, D. S., Dubey, J. P. (1989b). Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *Am.J.Vet.Res.* 50, 1981-1983.
- Lindsay, D. S., Dubey, J. P. (1989c). In vitro development of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) from dogs. *J.Parasitol.* 75, 163-165.
- Lindsay, D. S., Dubey, J. P. (1989d). *Neospora caninum* (Protozoa: apicomplexa) infections in mice. *J.Parasitol.* 75, 772-779.
- Lindsay, D. S., Dubey, J. P. (1989e). *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) infections in rats. *Can.J.Zool.* 68, 1595-1599.
- Lindsay, D. S., Dubey, J. P. (1990a). Effects of sulfadiazine and amprolium on *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) infections in mice. *J.Parasitol.* 76, 177-179.
- Lindsay, D. S., Dubey, J. P. (1990b). Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa). *J.Parasitol.* 76, 410-413.
- Lindsay, D. S., Dubey, J. P., Duncan, R. B. (1999). Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Vet.Parasitol.* 82, 327-333.
- Lindsay, D. S., Kelly, E. J., McKown, R. D., Stein, F. J., Plozer, J., Herman, J., Blagburn, B. L., Dubey, J. P. (1996b). Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in coyotes (*Canis latrans*) and experimental infections of coyotes with *Neospora caninum*. *J.Parasitol.* 82, 657-659.
- Lindsay, D. S., Lenz, S. D., Blagburn, B. L., Brake, D. A. (1999a). Characterization of temperature-sensitive strains of *Neospora caninum* in mice. *J.Parasitol.* 85, 64-67.
- Lindsay, D. S., Lenz, S. D., Cole, R. A., Dubey, J. P., Blagburn, B. L. (1995a). Mouse model for central nervous system *Neospora caninum* infections. *J.Parasitol.* 81, 313-315.
- Lindsay, D. S., Rippey, N. S., Cole, R. A., Parsons, L. C., Dubey, J. P., Tidwell, R. R., Blagburn, B. L. (1994). Examination of the activities of 43 chemotherapeutic agents against *Neospora caninum* tachyzoites in cultured cells. *Am.J.Vet.Res.* 55, 976-981.
- Lindsay, D. S., Rippey, N. S., Powe, T. A., Sartin, E. A., Dubey, J. P., Blagburn, B. L. (1995b). Abortions, fetal death, and stillbirths in pregnant pygmy goats inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum*. *Am.J.Vet.Res.* 56, 1176-1180.

- Lindsay, D. S., Ritter, D. M., Brake, D. (2001a). Oocyst excretion in dogs fed mouse brains containing tissue cysts of a cloned line of *Neospora caninum*. *J.Parasitol.* 87, 909-911.
- Lindsay, D. S., Speer, C. A., Toivio-Kinnucan, M. A., Dubey, J. P., Blagburn, B. L. (1993). Use of infected cultured cells to compare ultrastructural features of *Neospora caninum* from dogs and *Toxoplasma gondii*. *Am.J.Vet.Res.* 54, 103-106.
- Lindsay, D. S., Spencer, J., Rupprecht, C., Blagburn, B. L. (2001b). Prevalence of agglutinating antibodies to *Neospora caninum* in raccoons, *Procyon lotor*. *J.Parasitol.* 87, 1197-1198.
- Lindsay, D. S., Steinberg, H., Dubielzig, R. R., Semrad, S. D., Konkle, D. M., Miller, P. E., Blagburn, B. L. (1996c). Central nervous system neosporosis in a foal. *J.Vet.Diagn.Invest* 8, 507-510.
- Lindsay, D. S., Upton, S. J., Dubey, J. P. (1999c). A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. *Int.J.Parasitol.* 29, 1521-1523.
- Long, M. T., Baszler, T. V. (2000). Neutralization of maternal IL-4 modulates congenital protozoal transmission: comparison of innate versus acquired immune responses. *J.Immunol.* 164, 4768-4774.
- Long, M. T., Baszler, T. V., Mathison, B. A. (1998). Comparison of intracerebral parasite load, lesion development, and systemic cytokines in mouse strains infected with *Neospora caninum*. *J.Parasitol.* 84, 316-320.
- Louie, K., Conrad, P. A. (1999). Characterization of a cDNA encoding a subtilisin-like serine protease (NC-p65) of *Neospora caninum*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 103, 211-223.
- Louie, K., Nordhausen, R., Robinson, T. W., Barr, B. C., Conrad, P. A. (2002). Characterization of *Neospora caninum* protease, NcSUB1 (NC-P65), with rabbit anti-N54. *J.Parasitol.* 88, 1113-1119.
- Louie, K., Sverlow, K. W., Barr, B. C., Anderson, M. L., Conrad, P. A. (1997). Cloning and characterization of two recombinant *Neospora* protein fragments and their use in serodiagnosis of bovine neosporosis. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 4, 692-699.
- Lovett, J. L., Howe, D. K., Sibley, L. D. (2000). Molecular characterization of a thrombospondin-related anonymous protein homologue in *Neospora caninum*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 107, 33-43.
- Lunden, A., Marks, J., Maley, S. W., Innes, E. A. (1998). Cellular immune responses in cattle experimentally infected with *Neospora caninum*. *Parasite Immunol.* 20, 519-526.
- Macaldowie, C., Maley, S. W., Wright, S., Bartley, P., Esteban-Redondo, I., Buxton, D., Innes, E. A. (2002). Placental pathology associated with foetal death in cattle experimentally infected with *Neospora caninum* by two different challenge routes in early pregnancy. Cost-Action 854, Protozoal Reproduction Losses in Farm Ruminants. Schloss Münchenwiler, Switzerland.
- Magnino, S., Vigo, P. G., Fabbi, M., Colombo, M., Bandi, C., Genchi, C. (1999). Isolation of a bovine *Neospora* from a newborn calf in Italy. *Vet.Rec.* 144, 456.
- Magnino, S., Vigo, P. G., Rosignoli, L., Boldini, M., Vezzoli, F., Alborali, L., Cammi, G., Foni, E., Colombo, M., Colombo, N., Bergami, C., Mellini, A., Fabbi, M., Genchi, G. (2000). Neosporosi bovina in Italia: un biennio de attività diagnostica. *La Selezione Veterinaria.* 2000, 515-523.
- Mainar-Jaime, R. C., Berzal-Herranz, B., Arias, P., Rojo-Vazquez, F. A. (2001). Epidemiological pattern and risk factors associated with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in a non-vaccinated dairy-cattle population from the Asturias region of Spain. *Prev.Vet.Med.* 52, 63-73.
- Mainar-Jaime, R. C., Thurmond, M. C., Berzal-Herranz, B., Hietala, S. K. (1999). Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain. *Vet.Rec.* 145, 72-75.
- Marsh, A. E., Barr, B. C., Madigan, J., Lakritz, J., Nordhausen, R., Conrad, P. A. (1996). Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 209, 1907-1913.

- Marsh, A. E., Barr, B. C., Packham, A. E., Conrad, P. A. (1998). Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). *J.Parasitol.* 84, 983-991.
- Marsh, A. E., Howe, D. K., Wang, G., Barr, B. C., Cannon, N., Conrad, P. A. (1999). Differentiation of *Neospora hughesi* from *Neospora caninum* based on their immunodominant surface antigen, SAG1 and SRS2. *Int.J.Parasitol.* 29, 1575-1582.
- Mayhew, I. G., Smith, K. C., Dubey, J. P., Gatward, L. K., McGlennon, N. J. (1991). Treatment of encephalomyelitis due to *Neospora caninum* in a litter puppies. *J. Small Anim. Pract.* 32, 609-612.
- McAllister, M. M., Bjorkman, C., Anderson-Sprecher, R., Rogers, D. G. (2000). Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 217, 881-887.
- McAllister, M. M., Dubey, J. P., Lindsay, D. S., Jolley, W. R., Wills, R. A., McGuire, A. M. (1998). Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int.J.Parasitol.* 28, 1473-1478.
- McAllister, M. M., Huffman, E. M., Hietala, S. K., Conrad, P. A., Anderson, M. L., Salman, M. D. (1996a). Evidence suggesting a point source exposure in an outbreak of bovine abortion due to neosporosis. *J.Vet.Diagn.Invest* 8, 355-357.
- McAllister, M. M., McGuire, A. M., Jolley, W. R., Lindsay, D. S., Trees, A. J., Stobart, R. H. (1996b). Experimental neosporosis in pregnant ewes and their offspring. *Vet.Pathol.* 33, 647-655.
- McAllister, M., Wills, R. A., McGuire, A. M., Jolley, W. R., Tranas, J. D., Williams, E. S., Lindsay, D. S., Björkman, C., Belden, E. L. (1999). Ingestion of *Neospora caninum* tissue cysts by *Mustela* species. *Int.J.Parasitol.* 29, 1531-1536.
- McGuire, A. M., McAllister, M. M., Jolley, W. R. (1997a). Separation and cryopreservation of *Neospora caninum* tissue cysts from murine brain. *J.Parasitol.* 83, 319-321.
- McGuire, A. M., McAllister, M. M., Jolley, W. R., Anderson-Sprecher, R. C. (1997b). A protocol for the production of *Neospora caninum* tissue cysts in mice. *J.Parasitol.* 83, 647-651.
- McNamee, P. T., Trees, A. J., Guy, F., Moffett, D., Kilpatrick, D. (1996). Diagnosis and prevalence of neosporosis in cattle in Northern Ireland. *Vet.Rec.* 138, 419-420.
- Mehlhorn, H., Heydorn, A. O. (2000). *Neospora caninum*: is it really different from *Hammondia heydorni* or is it a strain of *Toxoplasma gondii*? An opinion. *Parasitol.Res.* 86, 169-178.
- Meleady, E., Yearlsey, D., O' Brien, D., Egan, J. (2000). Serum antibodies to *Neospora caninum*, *Leptospira hardjo* and *Salmonella Dublin* in cows in the Republic of Ireland. *Irish Veterinary Journal.* 53, 266.
- Miller, C. M., Quin, H. E., Windsor, P. A., Ellis, J. T. (2002). Characterisation of the first Australian isolate of *Neospora caninum* from cattle. *Aust. Vet. J.* 80, 620-625.
- Moen, A. R., Wouda, W., De Gee, A. (1996). Clinical and serological observations of bovine *Neospora* abortion in three Dutch dairy herds. *Proceedings XIX World Buiatrics Congress, BCVA.* Edimburgh, 198-202.
- Moen, A. R., Wouda, W., Mul, M. F., Graat, E. A., van Werven, T. (1998). Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks: a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. *Theriogenology* 49, 1301-1309.
- Moore, D. P., Campero, C. M., Odeon, A. C., Posso, M. A., Cano, D., Leunda, M. R., Basso, W., Venturini, M. C., Spath, E. (2002). Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. *Vet.Parasitol.* 107, 303-316.
- Morales, E., Trigo, F. J., Ibarra, F., Puente, E., Santacruz, M. (2001a). Seroprevalence study of bovine neosporosis in Mexico. *J.Vet.Diagn.Invest* 13, 413-415.

- Morales, E., Trigo, F. J., Ibarra, F., Puente, E., Santacruz, M. (2001b). Neosporosis in Mexican dairy herds: lesions and immunohistochemical detection of *Neospora caninum* in fetuses. *J.Comp Pathol.* 125, 58-63.
- Moss, D. M., Chappell, C. L., Okhuysen, P. C., DuPont, H. L., Arrowood, M. J., Hightower, A. W., Lammie, P. J. (1998). The antibody response to 27-, 17-, and 15-kDa *Cryptosporidium* antigens following experimental infection in humans. *J. Infect. Dis.* 178, 827-833.
- Mugridge, N. B., Morrison, D. A., Heckerroth, A. R., Johnson, A. M., Tenter, A. M. (1999). Phylogenetic analysis based on full-length large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveals that *Neospora caninum* is more closely related to *Hammondia heydorni* than to *Toxoplasma gondii*. *Int.J.Parasitol.* 29, 1545-1556.
- Mugridge, N. B., Morrison, D. A., Jakel, T., Heckerroth, A. R., Tenter, A. M., Johnson, A. M. (2000). Effects of sequence alignment and structural domains of ribosomal DNA on phylogeny reconstruction for the protozoan family sarcocystidae. *Mol.Biol.Evol.* 17, 1842-1853.
- Müller, N., Felleisen, R. (1995). Bacterial expression systems as tools for the production of immunodiagnostic parasite antigens. *Parasitol. Today.* 11, 476-480.
- Müller, N., Vonlaufen, N., Gianinazzi, C., Leib, S. L., Hemphill, A. (2002). Application of real-time fluorescent PCR for quantitative assessment of *Neospora caninum* infections in organotypic slice cultures of rat central nervous system tissue. *J.Clin.Microbiol.* 40, 252-255.
- Naguleswaran, A., Cannas, A., Keller, N., Vonlaufen, N., Schares, G., Conraths, F. J., Björkman, C., Hemphill, A. (2001). *Neospora caninum* microneme protein NcMIC3: secretion, subcellular localization, and functional involvement in host cell interaction. *Infect.Immun.* 69, 6483-6494.
- Nam, H. W., Kang, S. W., Choi, W. Y. (1998). Antibody reaction of human anti-*Toxoplasma gondii* positive and negative sera with *Neospora caninum* antigens. *Korean J.Parasitol.* 36, 269-275.
- Neudeck, A., Stachelhaus, S., Nischik, N., Striepen, B., Reichmann, G., Fischer, H. G. (2002). Expression variance, biochemical and immunological properties of *Toxoplasma gondii* dense granule protein GRA7. *Microbes Infect.* 4, 581-590.
- Nishikawa, Y., Ikeda, H., Fukumoto, S., Xuan, X., Nagasawa, H., Otsuka, H., Mikami, T. (2000a). Immunization of dogs with a canine herpesvirus vector expressing *Neospora caninum* surface protein, NcSRS2. *Int.J.Parasitol.* 30, 1167-1171.
- Nishikawa, Y., Inoue, N., Xuan, X., Nagasawa, H., Igarashi, I., Fujisaki, K., Otsuka, H., Mikami, T. (2001a). Protective efficacy of vaccination by recombinant vaccinia virus against *Neospora caninum* infection. *Vaccine* 19, 1381-1390.
- Nishikawa, Y., Iwata, A., Nagasawa, H., Fujisaki, K., Otsuka, H., Mikami, T. (2001b). Comparison of the growth inhibitory effects of canine IFN-alpha, -beta and -gamma on canine cells infected with *Neospora caninum* tachyzoites. *J.Vet.Med.Sci.* 63, 445-448.
- Nishikawa, Y., Kousaka, Y., Tragoolpua, K., Xuan, X., Makala, L., Fujisaki, K., Mikami, T., Nagasawa, H. (2001c). Characterization of *Neospora caninum* surface protein NcSRS2 based on baculovirus expression system and its application for serodiagnosis of *Neospora* infection. *J.Clin.Microbiol.* 39, 3987-3991.
- Nishikawa, Y., Mishima, M., Nagasawa, H., Igarashi, I., Fujisaki, K., Otsuka, H., Mikami, T. (2001d). Interferon-gamma-induced apoptosis in host cells infected with *Neospora caninum*. *Parasitology* 123, 25-31.
- Nishikawa, Y., Tragoolpua, K., Inoue, N., Makala, L., Nagasawa, H., Otsuka, H., Mikami, T. (2001e). In the absence of endogenous gamma interferon, mice acutely infected with *Neospora caninum* succumb to a lethal immune response characterized by inactivation of peritoneal macrophages. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 8, 811-816.
- Nishikawa, Y., Xuan, X., Nagasawa, H., Igarashi, I., Fujisaki, K., Otsuka, H., Mikami, T. (2000b). Monoclonal antibody inhibition of *Neospora caninum* tachyzoite invasion into host cells. *Int.J.Parasitol.* 30, 51-58.

- Nishikawa, Y., Xuan, X., Nagasawa, H., Igarashi, I., Fujisaki, K., Otsuka, H., Mikami, T. (2001f). Prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice by recombinant vaccinia virus carrying NcSRS2 gene. *Vaccine* 19, 1710-1716.
- Odberg-Ferragut, C., Soete, M., Engels, A., Samyn, B., Loyens, A., van Beeumen, J., Camus, D., Dubremetz, J. P. (1996). Molecular cloning of the *Toxoplasma gondii* SAG4 gene encoding an 18 kDa bradyzoite specific surface protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* 82, 237-244.
- Ogino, H., Watanabe, E., Watanabe, S., Agawa, H., Narita, M., Haritani, M., Kawashima, K. (1992). Neosporosis in the aborted fetus and newborn calf. *J.Comp Pathol.* 107, 231-237.
- O'Handley, R., Liddell, S., Parker, C., Jenkins, M. C., Dubey, J. P. (2002). Experimental infection of sheep with *Neospora caninum* oocysts. *J.Parasitol.* 88, 1120-1123.
- Ooi, H. K., Huang, C. C., Yang, C. H., Lee, S. H. (2000). Serological survey and first finding of *Neospora caninum* in Taiwan, and the detection of its antibodies in various body fluids of cattle. *Vet.Parasitol.* 90, 47-55.
- Osawa, T., Wastling, J., Acosta, L., Ortellado, C., Ibarra, J., Innes, E. A. (2002). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Paraguay. *Vet.Parasitol.* 110, 17-23.
- Osawa, T., Wastling, J., Maley, S., Buxton, D., Innes, E. A. (1998). A multiple antigen ELISA to detect *Neospora*-specific antibodies in bovine sera, bovine foetal fluids, ovine and caprine sera. *Vet.Parasitol.* 79, 19-34.
- Osburn, B.I. (1988). Ontogeny of immune responses in cattle. In: Morrison, I., Ivan, W., (Eds.), The ruminant immune system in health and disease. Great Britain, pp. 252-260.
- Otter, A., Jeffrey, M., Griffiths, I. B., Dubey, J. P. (1995). A survey of the incidence of *Neospora caninum* infection in aborted and stillborn bovine fetuses in England and Wales. *Vet.Rec.* 136, 602-606.
- Ould-Amrouche, A., Klein, F., Osdoit, C., Mohammed, H. O., Touratier, A., Sanaa, M., and Mialot, J. P. (1999). Estimation of *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle from Normandy, France. *Vet.Res.* 30, 531-538.
- Packham, A. E., Sverlow, K. W., Conrad, P. A., Loomis, E. F., Rowe, J. D., Anderson, M. L., Marsh, A. E., Cray, C., Barr, B. C. (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, 467-473.
- Page, M. J., Amess, B. C., Stubberfield, C., Parekh, R. (1999). Proteomics a major new technology for the drug discovery process. *Drug Discou Today.* 4, 55-62.
- Paré, J., Fecteau, G., Fortin, M., Marsolais, G. (1998). Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 213, 1595-1598.
- Paré, J., Hietala, S. K., Thurmond, M. C. (1995). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *J.Vet.Diagn.Invest* 7, 352-359.
- Paré, J., Thurmond, M. C., Hietala, S. K. (1996). Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhoo mortality. *Can.J.Vet.Res.* 60, 133-139.
- Paré, J., Thurmond, M. C., Hietala, S. K. (1997). *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J.Parasitol.* 83, 82-87.
- Parmley, S. F., Yang, S., Harth, G., Sibley, L. D., Sucharczuk, A., Remington, J. S. (1994). Molecular characterization of a 65-kilodalton *Toxoplasma gondii* antigen expressed abundantly in the matrix of tissue cysts. *Mol. Biochem. Parasitol.* 66, 283-96.
- Payne, S., Ellis, J. (1996). Detection of *Neospora caninum* DNA by the polymerase chain reaction. *Int.J.Parasitol.* 26, 347-351.

- Pereira-Bueno, J., Quintanilla-Gozaolo, A., Pérez-Pérez, V., Espi-Felgueroso, A., Álvarez-García, G., Collantes-Fernández, E., Ortega-Mora, L. M. (2003). Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. *Vet.Parasitol.* 111, 143-152.
- Pereira-Bueno, J., Quintanilla-Gozaolo, A., Seijas-Carballedo, A., Costas, E., Ortega-Mora, L. M. (2000). Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: pattern of transmission and age-related antibody fluctuations, in: Hemphill, A., Gottstein, B. A European perspective on *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 30, 877-924.
- Peters, M., Lutkefels, E., Heckerroth, A. R., Schares, G. (2001a). Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. *Int.J.Parasitol.* 31, 1144-1148.
- Peters, M., Wagner, F., Schares, G. (2000). Canine neosporosis: clinical and pathological findings and first isolation of *Neospora caninum* in Germany. *Parasitol.Res.* 86, 1-7.
- Peters, M., Wohlsein, P., Knieriem, A., Schares, G. (2001b). *Neospora caninum* infection associated with stillbirths in captive antelopes (*Tragelaphus imberbis*). *Vet.Parasitol.* 97, 153-157.
- Petersen, E., Lebech, M., Jensen, L., Lind, P., Rask, M., Bagger, P., Bjorkman, C., Uggla, A. (1999). *Neospora caninum* infection and repeated abortions in humans. *Emerg.Infect.Dis.* 5, 278-280.
- Pfeiffer, D. U., Williamson, N. B., Reichel, M. P. (2000). Long-term serological monitoring as a tool for epidemiological investigation of *Neospora caninum* infection in dairy cattle in New Zealand. *Proceedings of the IX Symposium of the International Society of Veterinary Epidemiology and Economics* 524.
- Pitarch, A., Pardo, M., Jiménez, A., Pla, J., Gil, C., Sánchez, M., Nombela, C. (1999). Two-dimensional gel electrophoresis as analytical tool for identifying *Candida albicans* immunogenic proteins. *Electrophoresis* 20, 1001-1010.
- Priest, J. W., Kwon, J. P., Arrowood, M. J., Lammie, P. J. (2000). Cloning of the immunodominant 17-kDa antigen from *Cryptosporidium parvum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 106, 261-271.
- Priest, J. W., Kwon, J. P., Moss, D. M., Roberts, J. M., Arrowood, M. J., Dworkin, M. S., Juranek, D. D., Lammie, P. J. (1999). Detection by enzyme immunoassay of serum immunoglobulin G antibodies that recognize specific *Cryptosporidium parvum* antigens. *J.Clin.Microbiol.* 37, 1385-1392.
- Priest, J. W., Xie, L.T., Arrowood, M. J., Lammie, P. J. (2001). The immunodominant 17-kDa antigen from *Cryptosporidium parvum* is glycosylphosphatidylinositol-anchored. *Mol. Biochem. Parasitol.* 113, 117-126.
- Prigione, I., Facchetti, P., Lecordier, L., Desléé, D., Chiesa, S., Cesbron-Delauw, M. F., Pistoia, V. (2000). T-cell clones raised from chronically infected healthy humans by stimulation with *Toxoplasma gondii* excretory-secretory antigens cross react with live tachyzoites: characterization of the fine antigenic specificity of the clones and implications for vaccine development. *J. Immunol.* 164, 3741-3748.
- Prince, J. B., Auer, K. L., Huskinson, J., Parmley, S. F., Araujo, F. G., Remington, J. S. (1990). Cloning, expression, and cDNA sequence of surface antigen P22 from *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 43, 97-106.
- Quintanilla-Gozaolo, A., Pereira-Bueno, J., Seijas-Carballedo, A., Costas, E., Ortega-Mora, L. M. (2000). Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: relationship infection-abortion and gestational antibody fluctuations, in: Hemphill, A., Gottstein, B. A European perspective on *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 30, 877-924.
- Quintanilla-Gozaolo, A., Pereira-Bueno, J., Seijas-Carballedo, A., De La Fuente, R., Ortega-Mora, L. (1996). Seroprevalencia de anticuerpos frente a *Neospora* sp en un rebaño bovino con antecedentes de aborto. *Libro de Ponencias IV Congreso Internacional de Medicina bovina A.N.E.M.B.E.* Gijón, Octubre, 107.
- Quintanilla-Gozaolo, A., Pereira-Bueno, J., Tabares, E., Innes, E. A., Gonzalez-Paniello, R., Ortega-Mora, L. M. (1999). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Spain. *Int.J.Parasitol.* 29, 1201-1208.

- Rabenau, K. E., Sohrabi, A., Tripathy, A., Reitter, C., Ajioka, J. W., Tomley, F. M., Carruthers, V. B. (2001). TgM2AP participates in *Toxoplasma gondii* invasion of host cells and is tightly associated with the adhesive protein TgMIC2. *Mol. Microbiol.* 41, 537-547.
- Rebordosa X., Álvarez-García G., Collantes E., Ortega L.M. Artigas C. Desarrollo de un ELISA indirecto para la valoración de anticuerpos contra *Neospora caninum*. (2000) *Laboratorio Veterinario, Avedila* 17, 5-8.
- Redlich, A., Muller, W.A. (1998). Serodiagnosis of acute toxoplasmosis using a recombinant form of the dense granule antigen GRA6 in a enzyme-linked immunosorbent assay. *Parasitol. Res.* 84, 700-6.
- Reichel, M. P., Ellis, J. T. (2002). Control options for *Neospora caninum* infections in cattle: current state of Knowledge. *New Zealand Veterinary Journal.* 50, 86-92.
- Reichel, M. P., Pfeiffer, D. U. (2002). An analysis of the performance characteristics of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle. *Vet.Parasitol.* 107, 197-207.
- Reichmann, G., Dlugonska, H., Fischer, H. G. (1997). Murine Th1 clone defines a 60 kD tachyzoite antigen of *Toxoplasma gondii*. *Parasite. Immunol.* 19, 229-34.
- Reichmann, G., Dlugonska, H., Fischer, H. G. (2002). Characterization of TgROP9 (p36), a novel rhoptry protein of *Toxoplasma gondii* tachyzoites identified by T cell clone. *Mol. Biochem. Parasitol.* 119, 43-54.
- Rodriguez, I., Choromanski, L., Rodgers, S. J., Weinstock, D. (2002). Survey of *Neospora caninum* Antibodies in Dairy and Beef Cattle from Five Regions of the United States. *Vet.Theor.* 3, 396-401.
- Rogers, D. G., Grotelueschen, D. M., Anderson, M. L., McCullough, M. S., Shain, W. S., Dubey, J. P. (1993). Endemic protozoal abortions in a dairy cow herd. *Agri. Practice.* 14, 16-21.
- Romand, S., Thulliez, P., Dubey, J. P. (1998). Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Parasitol.Res.* 84, 50-53.
- Romero, J. J., Perez, E., Dolz, G., Frankena, K. (2002). Factors associated with *Neospora caninum* serostatus in cattle of 20 specialised Costa Rican dairy herds. *Prev.Vet.Med.* 53, 263-273.
- Sager, H., Fischer, I., Furrer, K., Strasser, M., Waldvogel, A., Boerlin, P., Audige, L., Gottstein, B. (2001). A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. *Vet.Parasitol.* 102, 1-15.
- Sager, H., Gloor, M., Bjorkman, C., Kritzner, S., Gottstein, B. (2003). Assessment of antibody avidity in aborting cattle by a somatic *Neospora caninum* tachyzoite antigen IgG avidity ELISA. *Vet.Parasitol.* 112, 1-10.
- Sanderson, M. W., Gay, J. M., Baszler, T. V. (2000). *Neospora caninum* seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the northwestern United States. *Vet.Parasitol.* 90, 15-24.
- Sasai, K., Lillehoj, H. S., Hemphill, A., Matsuda, H., Hanioka, Y., Fukata, T., Baba, E., Arakawa, A. (1998). A chicken anti-conoid monoclonal antibody identifies a common epitope which is present on motile stages of *Eimeria*, *Neospora*, and *Toxoplasma*. *J.Parasitol.* 84, 654-656.
- Sawada, M., Kondo, H., Tomioka, Y., Park, C., Morita, T., Shimada, A., Umemura, T. (2000). Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected adult dairy cow. *Vet.Parasitol.* 90, 247-252.
- Schaes, G., Barwald, A., Staubach, C., Sondgen, P., Rauser, M., Schroder, R., Peters, M., Wurm, R., Selhorst, T., Conraths, F. J. (2002a). p38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Vet.Parasitol.* 106, 293-305.
- Schaes, G., Conraths, F. J., Reichel, M. P. (1999a). Bovine neosporosis: comparison of serological methods using outbreak sera from a dairy herd in New Zealand. *Int.J.Parasitol.* 29, 1659-1667.
- Schaes, G., Dubremetz, J. F., Dubey, J. P., Barwald, A., Loyens, A., Conraths, F. J. (1999b). *Neospora caninum*: identification of 19-, 38-, and 40-kDa surface antigens and a 33-kDa dense granule antigen using monoclonal antibodies. *Exp.Parasitol.* 92, 109-119.

- Schares, G., Heydorn, A. O., Cuppers, A., Mehlhorn, H., Geue, L., Peters, M., Conraths, F. J. (2002b). In contrast to dogs, red foxes (*Vulpes vulpes*) did not shed *Neospora caninum* upon feeding of intermediate host tissues. *Parasitol.Res.* 88, 44-52.
- Schares, G., Peters, M., Wurm, R., Barwald, A., Conraths, F. J. (1998). The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. *Vet.Parasitol.* 80, 87-98.
- Schares, G., Peters, M., Wurm, R., Tackmann, K., Henning, K., Conraths, F. J. (1997). [*Neospora caninum* causes abortions in a cattle herd in North Rhine Westphalia]. *Dtsch.Tierärztl.Wochenschr.* 104, 208-212.
- Schares, G., Rauser, M., Söndgen, P., Rehberg, P., Barwald, A., Dubey, J. P., Edelhofer, R., Conraths, F. J. (2000). Use of purified tachyzoite surface antigen p38 in an ELISA to diagnose bovine neosporosis. *Int.J.Parasitol.* 30, 1123-1130.
- Schares, G., Rauser, M., Zimmer, K., Peters, M., Wurm, R., Dubey, J. P., de Graaf, D. C., Edelhofer, R., Mertens, C., Hess, G., Conraths, F. J. (1999c). Serological differences in *Neospora caninum*-associated epidemic and endemic abortions. *J.Parasitol.* 85, 688-694.
- Schares, G., Wenzel, U., Muller, T., Conraths, F. J. (2001). Serological evidence for naturally occurring transmission of *Neospora caninum* among foxes (*Vulpes vulpes*). *Int.J.Parasitol.* 31, 418-423.
- Schock, A., Buxton, D., Wastling, J., Spence, J., Rae, A., Yamane, J., Low, J. (1998). Histopathological survey with special reference to *Neospora caninum* induced abortion and preliminary molecular characterization of the *Neospora* isolates. *Proceedings EU COST820 Annual Workshop*. Toledo, España, Octubre, 65.
- Schock, A., Innes, E. A., Yamane, I., Latham, S. M., Wastling, J. M. (2001). Genetic and biological diversity among isolates of *Neospora caninum*. *Parasitology* 123, 13-23.
- Schoenle, E. J., Adams, L. D., Sammons, D. W. (1984). Insulin-induced rapid decrease of a major protein in fat cell plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 259, 12112.
- Shibahara, T., Kokuho, T., Eto, M., Haritani, M., Hamaoka, T., Shimura, K., Nakamura, K., Yokomizo, Y., Yamane, I. (1999). Pathological and immunological findings of athymic nude and congenic wild type BALB/c mice experimentally infected with *Neospora caninum*. *Vet.Pathol.* 36, 321-327.
- Shivaprasad, H. L., Ely, R., Dubey, J. P. (1989). A *Neospora*-like protozoon found in an aborted bovine placenta. *Vet.Parasitol.* 34, 145-148.
- Slotved, H. C., Jensen, L., Lind, P. (1999). Comparison of the IFAT and Iscom-ELISA response in bovine fetuses with *Neospora caninum* infection. *Int.J.Parasitol.* 29, 1165-1174.
- Smith, R. D., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goetze, N. M., Olson, B. J., Klenj, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
- Sôte, M., Fortier, B., Camus, D., Dubremetz, J. F. (1993). *Toxoplasma gondii*: kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion in vitro. *Exp. Parasitol.* 76, 259-64.
- Sonda, S., Fuchs, N., Gottstein, B., Hemphill, A. (2000). Molecular characterization of a novel microneme antigen in *Neospora caninum*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 108, 39-51.
- Söndgen, P., Peters, M., Barwald, A., Wurm, R., Holling, F., Conraths, F. J., Schares, G. (2001). Bovine neosporosis: immunoblot improves foetal serology. *Vet.Parasitol.* 102, 279-290.
- Spano, F., Ricci, I., Di Cristina, M., Possenti, A., Tinti, M., Dendouga, N., Tomavo, S., Crisanti, A. (2002). The SAG5 locus of *Toxoplasma gondii* encodes three novel proteins belonging to the SAG1 family of surface antigens. *Int. J. Parasitol.* 32, 121-31.
- Speer, C. A., Dubey, J. P. (1989). Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum*. *J.Protozool.* 36, 458-463.

- Speer, C. A., Dubey, J. P., McAllister, M. M., Blixt, J. A. (1999). Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Int.J.Parasitol.* 29, 1509-1519.
- Spencer, J. A., Witherow, A. K., Blagburn, B. L. (2000). A random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction technique that differentiates between *Neospora* species. *J.Parasitol.* 86, 1366-1368.
- Srimanote, P., Ittiprasert, W., Sermsart, B., Chaisri, U., Mahannop, P., Sakolvaree, Y., Tapchaisri, P., Maleewong, W., Kurazono, H., Hayashi, H., Chaicumpa, W. (2000). *Trichinella spiralis*-specific monoclonal antibodies and affinity-purified antigen-based diagnosis. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 18, 37-45.
- Stenlund, S., Bjorkman, C., Holmdahl, O. J., Kindahl, H., Ugglä, A. (1997). Characterization of a Swedish bovine isolate of *Neospora caninum*. *Parasitol.Res.* 83, 214-219.
- Stenlund, S., Kindahl, H., Magnusson, U., Ugglä, A., Bjorkman, C. (1999). Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet.Parasitol.* 85, 227-234.
- Strong, W. B., Gut, J., Nelson, R. G. (2000). Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60-kilodalton glycoprotein and characterization of its 15- and 45-kilodalton zoite surface antigen products. *Infect.Immun.* 68, 4117-4134.
- Sundermann, C. A., Estridge, B. H. (1999). Growth of and competition between *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in vitro. *Int.J.Parasitol.* 29, 1725-1732.
- Sundermann, C. A., Estridge, B. H., Branton, M. S., Bridgman, C. R., Lindsay, D. S. (1997). Immunohistochemical diagnosis of *Toxoplasma gondii*: potential for cross-reactivity with *Neospora caninum*. *J.Parasitol.* 83, 440-443.
- Suteeraparp, P., Pholpark, S., Pholpark, M., Charoenchai, A., Chompoochan, T., Yamane, I., Kashiwazaki, Y. (1999). Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* and associated abortion in dairy cattle from central Thailand. *Vet.Parasitol.* 86, 49-57.
- Suzuki, Y., Ramirez, R., Press, C., Li, S., Parmley, S., Thulliez, P., Remington, J. S. (2000). Detection of immunoglobulin M antibodies to P35 antigen of *Toxoplasma gondii* for serodiagnosis of recently acquired infection in pregnant women. *J.Clin.Microbiol.* 38, 3967-3970.
- Tanaka, T., Hamada, T., Inoue, N., Nagasawa, H., Fujisaki, K., Suzuki, N., Mikami, T. (2000). The role of CD4(+) or CD8(+) T cells in the protective immune response of BALB/c mice to *Neospora caninum* infection. *Vet.Parasitol.* 90, 183-191.
- Tarleton, R. L., Kissinger, J. (2001). Parasite genomics: current status and future prospects. *Curr. Opin. Immunol.* 13, 395-402.
- Tennent-Brown, B. S., Pomroy, W. E., Reichel, M. P., Gray, P. L., Marshall, T. S., Moffat, P. A., Rogers, M., Driscoll, V. A., Reeve, O. F., Ridler, A. L., Ritvanen, S. (2000). Prevalence of *Neospora* antibodies in beef cattle in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal.* 48, 149-150.
- Tenter, A. M., Heckerroth, A. R. (2002). Differential recognition of *Neospora* antigens by diseased and non-diseased animals. Cost-Action 854, Protozoal Reproduction Losses in Farm Ruminants. Schloss Münchenwiler, Switzerland.
- Thilsted, J. P., Dubey, J. P. (1989). Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1, 205-209.
- Thompson, G., Canada, N., do Carmo, T. M., Silva, E., Vaz, F., Rocha, A. (2001). First confirmed case of *Neospora caninum*-associated abortion outbreak in Portugal. *Reprod.Domest.Anim* 36, 309-312.
- Thornton, R., Thompson, E., Dubey, J. P. (1991). *Neospora* abortion in New Zealand cattle. *N.Z. Vet. J.* 39, 129-133.

- Thrusfield M.** (1995). Diagnostic testing, in: Blackwell Science Ltd (Ed.). *Veterinary Epidemiology*, The University Press, Cambridge, Great Britain, 266-285.
- Thurmond, M. C., Anderson, M. L., Blanchard, P. C.** (1995). Secular and seasonal trends of *Neospora* abortion in California dairy cows. *J.Parasitol.* 81, 364-367.
- Thurmond, M. C., Hietala, S. K.** (1996). Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. *Am.J.Vet.Res.* 57, 1559-1562.
- Thurmond, M. C., Hietala, S. K.** (1997a). Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. *Am.J.Vet.Res.* 58, 1381-1385.
- Thurmond, M. C., Hietala, S. K.** (1997b). Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first-lactation dairy cows. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 210, 672-674.
- Thurmond, M. C., Johnson, W. O., Munoz-Zanzi, C. A., Su, C. L., Hietala, S. K.** (2002). A method of probability diagnostic assignment that applies bayes theorem for use in serologic diagnostics, using an example of *Neospora caninum* infection in cattle. *Am.J.Vet.Res.* 63, 318-325.
- Thurmond, M., Hietala, S.** (1995). Strategies to control *Neospora infection* in cattle. *The bovine practitioner.* 4, 29-32.
- Tranas, J., Heinzen, R. A., Weiss, L. M., McAllister, M. M.** (1999). Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 6, 765-767.
- Trees, A. J., Davison, H. C., Innes, E. A., Wastling, J. M.** (1999). Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. *Int.J.Parasitol.* 29, 1195-1200.
- Trees, A. J., Guy, F., Low, J. C., Roberts, L., Buxton, D., Dubey, J. P.** (1994). Serological evidence implicating *Neospora* species as a cause of abortion in British cattle. *Vet.Rec.* 134, 405-407.
- Trees, A. J., Guy, F., Tennant, B. J., Balfour, A. H., Dubey, J. P.** (1993). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in a population of urban dogs in England. *Vet.Rec.* 132, 125-126.
- Trees, A. J., McAllister, M. M., Guy, C. S., McGarry, J. W., Smith, R. F., Williams, D. J.** (2002). *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. *Vet.Parasitol.* 109, 147-154.
- Trees, A. J., Williams, D. J. L.** (2000). Neosporosis in the United Kingdom, in: Hemphill, A., Gottstein, B. A European perspective on *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 30, 877-924.
- Uggla, A., Stenlund, S., Holmdahl, O. J., Jakubek, E. B., Thebo, P., Kindahl, H., Björkman, C.** (1998). Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. *Int.J.Parasitol.* 28, 1467-1472.
- Vaitukaitis, J. L.** (1981). Production of antisera with small doses immunogen: multiple intradermal injections. *Methods Enzymol.* 73, 46-52.
- van Gelder, P., Bosma, F., de Meuter, F., van Heuverswyn, H., Herion, P.** (1993). Serodiagnosis of toxoplasmosis by using a recombinant form of the 54-kilodalton rhoptry antigen expressed in *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 31, 9-15.
- Venturini, M. C., Venturini, L., Bacigalupe, D., Machuca, M., Echaide, I., Basso, W., Unzaga, J. M., Di Lorenzo, C., Guglielmone, A., Jenkins, M. C., Dubey, J. P.** (1999). *Neospora caninum* infections in bovine foetuses and dairy cows with abortions in Argentina. *Int.J.Parasitol.* 29, 1705-1708.
- Vercammen, M., Scorza, T., Huygen, K., De Brackeleer, J., Diet, R., Jacobs, D., Saman, E., Verschueren, H.** DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7 y ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. (2000). *Infect. Immun.* 68, 38-45.
- Voller, A., Bidwell, D. E., Bartlett, A., Fleck, D. G., Perkins, M., Oladehim, B.** (1976). A microplate enzyme-immunoassay for *Toxoplasma gondii* antibody. *J. Clin. Pathol.* 29, 150-153.

- Waldner, C. L., Henderson, J., Wu, J. T., Coupland, R., Chow, E. Y. (2001). Seroprevalence of *Neospora caninum* in beef cattle in northern Alberta. *Can.Vet.J.* 42, 130-132.
- Waldner, C. L., Janzen, E. D., Henderson, J., Haines, D. M. (1999). Outbreak of abortion associated with *Neospora caninum* infection in a beef herd. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 215, 1485-1489.
- Walsh, C. P., Duncan, R. B., Zajac, A. M., Blagburn, B. L., Lindsay, D. S. (2000). *Neospora hughesi*: experimental infections in mice, gerbils, and dogs. *Vet.Parasitol.* 92, 119-128.
- Walsh, C. P., Vemulapalli, R., Sriranganathan, N., Zajac, A. M., Jenkins, M. C., Lindsay, D. S. (2001). Molecular comparison of the dense granule proteins GRA6 and GRA7 of *Neospora hughesi* and *Neospora caninum*. *Int.J.Parasitol.* 31, 253-258.
- Wilkins, M. R., Sánchez, J. C., Gooley, A. A., Appel, R. D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D. F., Williams, K. L. (1996). Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 13, 19-50.
- Williams, D. J., Davison, H. C., Helmick, B., McGarry, J., Guy, F., Otter, A., Trees, A. J. (1999). Evaluation of a commercial ELISA for detecting serum antibody to *Neospora caninum* in cattle. *Vet.Rec.* 145, 571-575.
- Williams, D. J., Guy, C. S., McGarry, J. W., Guy, F., Tasker, L., Smith, R. F., MacEachern, K., Cripps, P. J., Kelly, D. F., Trees, A. J. (2000). *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology* 121 (Pt 4), 347-358.
- Williams, D. J., McGarry, J., Guy, F., Barber, J., Trees, A. J. (1997). Novel ELISA for detection of *Neospora*-specific antibodies in cattle. *Vet.Rec.* 140, 328-331.
- Williams, J. H., Espie, I., van Wilpe, E., Matthee, A. (2002). Neosporosis in a white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) calf. *J.S.Afr.Vet.Assoc.* 73, 38-43.
- Woods, L. W., Anderson, M. L., Swift, P. K., Sverlow, K. W. (1994). Systemic neosporosis in a California black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*). *J.Vet.Diagn.Invest* 6, 508-510.
- Woodward, M. P., Young, W. W., Bloodgood, R. A. (1985). Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. *J. Immunol. Methods.* 78, 143-153.
- Wouda, W., Moen, A., De Gee, A., Van Knapen, F. (1996). Laboratory and field experiences with bovine *Neospora* abortion in Dutch dairy herds. *Proceedings 41st Annual meeting AAVP*. Louisville, Kentucky, July, 21.
- Wouda, W., Bartels, C. J., Moen, A. R. (1999a). Characteristics of *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology* 52, 233-245.
- Wouda, W., Brinkhof, J., van Maanen, C., de Gee, A. L., Moen, A. R. (1998a). Serodiagnosis of neosporosis in individual cows and dairy herds: A comparative study of three enzyme-linked immunosorbent assays. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 5, 711-716.
- Wouda, W., Dijkstra, T., Kramer, A. M., van Maanen, C., Brinkhof, J. M. (1999b). Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *Int.J.Parasitol.* 29, 1677-1682.
- Wouda, W., Dubey, J. P., Jenkins, M. C. (1997a). Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. *J.Parasitol.* 83, 545-547.
- Wouda, W., Moen, A. R., Schukken, Y. H. (1998b). Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. *Theriogenology* 49, 1311-1316.
- Wouda, W., Moen, A. R., Visser, I. J., van Knapen, F. (1997b). Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver. *J.Vet.Diagn.Invest* 9, 180-185.

- Wouda, W., Moen, A., Damsma, A., Visser, I., Van Knapen, F.** (1994). Bovine neosporosis. *Abstracts XII Meeting European Society of Veterinary Pathology*. Mondovi, Septiembre, 29.
- Yamaga, 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, 272-279.
- Yamane, I., Kitani, H., Kokuho, T., Shibahara, T., Haritani, M., Hamaoka, T., Shimizu, S., Koiwai, M., Shimura, K., Yokomizo, Y.** (2000). The inhibitory effect of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha on intracellular multiplication of *Neospora caninum* in primary bovine brain cells. *J.Vet.Med.Sci.* 62, 347-351.
- Yamane, I., Kokuho, T., Shimura, K., Eto, M., Haritani, M., Ouchi, Y., Sverlow, K. W., Conrad, P. A.** (1996). In vitro isolation of a bovine *Neospora* in Japan. *Vet.Rec.* 138, 652.
- Yamane, I., Shibahara, T., Kokuho, T., Shimura, K., Hamaoka, T., Haritani, M., Conrad, P. A., Park, C. H., Sawada, M., Umemura, T.** (1998). An improved isolation technique for bovine *Neospora* species. *J.Vet.Diagn.Invest* 10, 364-368.
- Zenner, L., Estaquier, J, Darcy, F., Maes, P., Capron, A., Cesbron-Delauw, M. F.** (1999). Protective immunity in the rat model of congenital toxoplasmosis and the potential of excreted-secreted antigens as vaccine components. *Parasite Immunol.* 21, 261-272.
- Zhang, Y. W., Halonen, S. K., Ma, Y. F., Wittner, M., Weiss, L. M.** (2001). Initial characterization of CST1, a *Toxoplasma gondii* cyst wall glycoprotein. *Infect. Immun.* 69, 501-7.
- Zhang, Y. W., Smith, J. E.** (1995). *Toxoplasma gondii*: identification and characterization of a cyst molecule. *Exp. Parasitol.* 80, 228-33.

13. APÉNDICES

Apéndice A: Soluciones empleadas para la obtención de taquizoítos y de proteína soluble

PBS

NaCl 137 mM
KCl 2,7 mM
Na₂HPO₄ 10 mM
KH₂PO₄ 2 mM

Solución tampón inhibidora de proteasas

Tris-HCl 10 mM (pH 7,0)
PMSF 2 mM

Apéndice B: Soluciones empleadas en la prueba de ELISA

Tampón carbonato-bicarbonato

Carbonato sódico 0,795g
Bicarbonato sódico 1,465g
H₂O destilada 500 ml
pH 9,6

Apéndice C: Soluciones empleadas en el análisis de proteínas

Rojo Ponceau al 1%

Rojo Ponceau 1% (p/v)
Ácido acético 10%
Agua milli-Q 89%

Solución de bloqueo

TBS
Tween 20 0,05%
BSA 3% (p:v)

Solución de desteñido de geles

Metanol 40%
Ácido acético 10%
Agua milli-Q 50%

Solución de lavado de membrana

TBS
Tween 20 0,05%

Solución de sustrato para peroxidasa

TBS 100ml
4 Cloro-1Naftol 60 mg
Metanol 20 ml
H₂O₂ 60 µl

Solución de tñido de geles

Azul de Coomassie R-250 0,1%
Sulfato amónico 1%
Metanol 41,7%
Ácido acético 16,7%

Solución de tñido de membranas

Rojo Ponceau al 1% 1ml
Agua Milli-Q 40 ml

Solución para fijar las proteínas

Etanol 30%
Ácido acético 30%
Agua milli Q 60%

Tampón de carga 1X

Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8)
SDS 2%
Azul de bromofenol 0,001%
Glicerol 10%

Tampón de electroelución

Tris 25 mM
Glicina 192 mM
SDS 1%
pH 8,3

Tampón de electroforesis SDS-PAGE

Tris 25 mM
Glicina 192 mM
SDS 1%
pH 8,3

Tampón de electrotransferencia para membranas de nitrocelulosa

Tris 25 mM
Glicina 192 mM
Metanol 20%
pH 8,3

Tampón de electrotransferencia para membranas PVDF

CAPS 10mM pH 11
Metanol 10%

Tampón de equilibrado

Urea 6 M
Tris-HCl 50 mM (pH 6,8)
Glicerol 30%
SDS 2%
DTE 2%

Tampón de rehidratación

Urea 7 M
Tiourea 2 M
CHAPS 2%
DTE 65 mM
Anfolitos 2%
Trazas de azul de bromofenol

TBS

Tris-HCl 10 mM (pH 7,4)
ClNa 150 mM

Apéndice D: Soluciones empleadas en el análisis de ácidos nucleicos

TAE 1X

Tris-acetato 40 mM
EDTA 1 mM

Tampón de carga de geles de agarosa 5x

Azul de bromofenol 0,25%
Xilencianol 0,25%
Glicerol 30%

TBE 0,5X

Tris-borato 45 mM
EDTA 1 mM

Apéndice E: Soluciones relacionadas con la genoteca de cDNA

Solución de lisis para la obtención de mRNA

NaCl 200 mM
Tris-HCl 200 mM pH 7,5
MgCl₂ 1,5 mM
SDS 2%
Solución de RNasa/Proteasa 1:50

STE

Tris-HCl 10 mM pH 8
NaCl 0,1 mM
EDTA 1 mM pH 8

Tampón de lavado

NaCl 250 mM
Tris-HCl 10 mM pH 7,5

Tampón SM

NaCl 100 mM
Tris-HCl 50 mM pH 7,5
MgSO₄ 10 mM
Gelatina 0,01%

Tampón de unión

NaCl 500 mM
Tris-HCl 10 mM pH 7,5

Apéndice F: Soluciones empleadas para la siembra de bacterias

LB

Bactotriptófano 1%
Extracto de levadura 0,5%
ClNa 10 mM
pH7

NZY

NaCl 85 mM
MgSO₄ 7H₂O 8 mM
Extracto de levadura 0,5%
NZ amine 1%
pH 7,5

NZY-Agar

NZY
Agarosa al 0,7% (p/v)

Top-Agar

LB
Agarosa al 0,7% (p/v)