

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



**PATOGENIA DE LA NEOSPOROSIS EN EL FETO  
BOVINO Y EN UN MODELO MURINO EXPERIMENTAL**

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

Esther Collantes Fernández

Bajo la dirección del Doctor:

Luis Miguel Ortega Mora

**Madrid, 2003**

**ISBN: 84-669-2674-7**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA  
Dpto. Sanidad Animal**



**PATOGENIA DE LA NEOSPOROSIS EN EL FETO BOVINO Y EN  
UN MODELO MURINO EXPERIMENTAL**

**Dña. Esther Collantes Fernández**

**Madrid, 2003**

Memoria presentada por Dña. Esther Collantes  
Fernández 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 “Patogenia de la neosporosis en el feto bovino y en un modelo murino experimental” que presenta la Licenciada en Veterinaria Esther Collantes Fernández, 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 18 de Diciembre de 2003,

Fdo. Prof. Dr. Luis Miguel Ortega Mora

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la financiación del Ministerio de Educación y Ciencia a través de los proyectos de investigación CICYT AGF98-0804-C02: *La neosporosis bovina: desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico y su aplicación a la epidemiología y al control* y AGL2001-1362: *Patogenia de la neosporosis bovina en el feto y en modelos experimentales. Estudio de las variaciones intraespecíficas en la virulencia*. Durante este trabajo he sido beneficiaria de una beca concedida por el Ministerio de Ciencia y Tecnología perteneciente al programa de Movilidad de Investigadores y Tecnólogos (acción M.I.T.) entre la Facultad de Veterinaria y los Laboratorios HIPRA S.A.

*A Jose*

*y*

*a mi familia*

## AGRADECIMIENTOS

A lo largo de los años en los que se ha llevado a cabo este estudio de tesis doctoral, son muchas las personas e instituciones que han colaborado y a las que espero saber transmitir mi más profunda gratitud.

Mi especial reconocimiento a mi director de tesis por la comprensión, amistad, paciencia, confianza, ayuda, sentido del humor, saber y estímulo que me ha demostrado. Muchas gracias Luis por tu dedicación. Me siento muy afortunada por tenerte como “jefe”.

A Gema y Vanesa mis eternas compañeras. Gracias por ser como sois y haberme regalado momentos inolvidables. No puedo resumir en estas breves líneas mi agradecimiento por la ayuda que me habéis brindado tanto en lo laboral como en lo personal, sólo deciros que para mí sois mucho más que compañeras de trabajo.

A Fran y Aurora. Gracias Fran por dedicarme tu amistad y haberme dado ánimos sobre todo en estos últimos momentos que tú, mejor que nadie, sabes lo mucho que cuestan. Aurora, gracias por enseñarme tantas cosas, por tus respuestas a mis preguntas, por tus ánimos, sinceridad y amistad llena de valores.

A Isabel, Verónica, Inma, Ignacio, Anita, Adriana, Esther, Enrique, Raquel, Javier y Cinta por vuestra generosa ayuda, por ser tan buenos compañeros y aguantarme con tan buen humor. Va a ser difícil encontrar compañeros como vosotros. Mi especial agradecimiento a Isa por regalarme el ciclo biológico de *N. caninum* de su puño y letra y a Vero por esos “taquis” tan bonitos.

A los que ya no estáis en el laboratorio: Cristina, Andrea, Ana, María, Carlos, Mariela, Bea gracias por los momentos que pasamos juntos. A Dévora por ayudarme con mis cientos de muestras. A Enrique Tabarés por brindarme su apoyo y conocimientos en mis comienzos en el laboratorio, gracias Henric por tu amistad.

A Mercedes y a Chema, por su entera disposición en todo momento y su Inapreciable opinión sobre mi trabajo. A Juana Pereira por ofrecerme su apoyo y ayuda.

A Ángel Zaballos por su incalculable ayuda en el desarrollo de la PCR cuantitativa en tiempo real. Gracias Ángel por poder contar siempre contigo y resolver todo con tanto ingenio y acierto.

A los Dres. Ignacio Arnaiz, Gorka Aduriz, Alberto Espí y todas las personas que han colaborado en la recogida de muestras. En particular a Ignacio por el gran interés y la ayuda mostrada durante cuatro largos años.

A Antonio Rodríguez Bertos, Valentín Pérez Pérez, Bernardino Moreno Burgos y Gorka Aduriz por su inestimable colaboración en el análisis histológico y por atender nuestras peticiones. A Alberto por tu gran ayuda con las muestras de los fetos.

A todo el personal del departamento de Sanidad Animal y del laboratorio de Parasitología, en especial a Isabel Simarro, a los profesores de Parasitología y a Pascual Anguitar.

A Xavier Rebordosa, por ser mi tutor en HIPRA y sus informes anuales. A Enrique Espuña por permitir la participación de HIPRA como centro de acogida en el programa de Movilidad de Investigadores y Tecnólogos.

A Chema Bautista por ayudarme en mis inicios con la PCR en tiempo real y dedicarme su tiempo.

A Ricardo García de la Mata del Centro de Cálculo de la UCM, a Eduardo Costas del Dpto. de Producciones de la Facultad de Veterinaria y al Profesor Marcos Rico director del Dpto. de Producción Animal de la ETS de Ingenieros Agrónomos por su orientación y análisis estadístico.

Al Dpto. de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Madrid por permitirme trabajar en sus instalaciones. Al Centro de secuenciación de ADN de la UCM,

al laboratorio de Algete, al Centro Nacional de Biotecnología y a Chema Bautista por cederme el uso del instrumental para la realización de la PCR cuantitativa en tiempo real.

A mis amigos por aguantar los rollos de la "*Neospora*", de la tesis y mis contratiempos laboratoriales. Gracias en especial a Javi, Virginia y Marta.

A mis padres por su imprescindible ayuda y paciencia. Espero saber valorar el cariño y apoyo que me habéis dedicado desde siempre. A mi hermana y a Iñigo por ser maravillosos y animarme siempre. A Lucas por su fiel compañía.

A Jose por compartir conmigo tu tiempo, por confiar en mí, por tu fuerza, por tu cariño.

LISTADO DE FIGURAS.....	ix
LISTADO DE TABLAS.....	xii
LISTADO DE ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	xv
<b>1. ANTECEDENTES</b> .....	1
1.1. <b>NEOSPOROSIS BOVINA: DEFINICIÓN Y EVOLUCIÓN</b> <b>HISTÓRICA</b> .....	2
1.2. <b>ETIOLOGÍA</b> .....	3
1.2.1.  Taxonomía.....	3
1.2.2.  Aislados de <i>Neospora</i> .....	4
1.2.3.  Morfología y ultraestructura del parásito.....	6
1.2.4.  Composición proteica y antigénica.....	7
1.2.5.  Ciclo biológico.....	10
1.2.6.  Cultivo <i>in vitro</i> .....	12
1.3. <b>EPIDEMIOLOGÍA</b> .....	13
1.3.1. <b>Prevalencia y distribución geográfica</b> .....	13
1.3.1.1.  Bovinos adultos.....	13
1.3.1.2.  Fetos bovinos abortados.....	17
1.3.2. <b>Transmisión</b> .....	19
1.3.2.1.  Transmisión vertical.....	19
1.3.2.2.  Transmisión horizontal.....	20
1.3.3. <b>Características epidemiológicas del aborto por</b> <b>neosporosis</b> .....	21
1.3.4. <b>Factores de riesgo</b> .....	23
1.3.4.1.  Aptitud del rebaño, sistema de manejo y tipo de reposición.....	23
1.3.4.2.  Presencia de carnívoros.....	24
1.3.4.3.  Edad.....	25
1.3.4.4.  Antecedentes de aborto.....	26
1.3.4.5.  Infecciones concomitantes y factores inmunodepresores.....	26
1.3.5. <b>Impacto económico</b> .....	27
1.4. <b>PATOGENIA</b> .....	28
1.4.1. <b>Infección aguda</b> .....	29
1.4.2. <b>Infección crónica y reactivación</b> .....	31
1.4.3. <b>Patogenia del aborto y de la transmisión vertical en el</b> <b>ganado bovino</b> .....	32

1.4.3.1.	Edad gestacional e inmunocompetencia del feto.....	32
1.4.3.2.	Respuesta inmune de la madre.....	34
1.4.3.3.	Aislado, vía de inoculación, estadio y dosis infectiva.....	35
1.4.3.4.	Causas de muerte fetal.....	36
1.4.4.	Patogenia de la infección en el modelo murino.....	37
1.4.4.1.	Estirpe murina, tratamiento inmunodepresor y respuesta inmune del hospedador.....	38
1.4.4.2.	Aislado.....	39
1.4.4.3.	Dosis infectiva.....	40
1.4.4.4.	Estadio parasitario y vía de inoculación.....	40
1.4.4.5.	Patogenia de la infección en el modelo murino gestante.....	41
1.5.	RESPUESTA INMUNE.....	42
1.5.1.	En el ganado bovino.....	42
1.5.1.1.	Respuesta inmune celular.....	42
1.5.1.2.	Respuesta inmune humoral.....	44
1.5.2.	En el modelo murino.....	45
1.5.2.1.	Respuesta inmune celular.....	45
1.5.2.2.	Respuesta inmune humoral.....	47
1.6.	SINTOMATOLOGÍA.....	48
1.6.1.	Sintomatología en el ganado bovino.....	48
1.6.2.	Sintomatología en el modelo murino.....	49
1.7.	LESIONES Y LOCALIZACIÓN DEL PARÁSITO.....	49
1.7.1.	En el ganado bovino.....	49
1.7.2.	En el modelo murino.....	52
1.8.	DIAGNÓSTICO.....	53
1.8.1.	Diagnóstico en el ganado bovino durante la vida postnatal.....	54
1.8.1.1.	IFI.....	55
1.8.1.2.	ELISA.....	56
1.8.1.3.	Western-blot.....	57
1.8.1.4.	Aglutinación directa.....	58
1.8.2.	Diagnóstico del aborto por <i>N. caninum</i> .....	58
1.8.2.1.	Serología fetal y maternal.....	61
1.8.2.2.	Examen histológico.....	62
1.8.2.3.	Inmunohistoquímica.....	62

1.8.2.4.	Detección de ácidos nucleicos de <i>N. caninum</i> .....	63
1.8.2.4.1.	PCR basada en el fragmento ITS1.....	63
1.8.2.4.2.	PCR basada en la secuencia Nc-5.....	64
1.8.2.4.3.	PCR basada en el gen que codifica la proteína 14-3-3.....	65
1.8.2.4.4.	PCR basada en el gen nss-ARNr de los Apicomplexa.....	65
1.8.2.5.	Aislamiento.....	66
1.8.3.	Diagnóstico diferencial.....	66
1.9.	PREVENCIÓN Y CONTROL.....	67
1.9.1.	Tratamiento terapéutico.....	67
1.9.2.	Inmunoprofilaxis.....	68
1.9.3.	Medidas higiénico-sanitarias.....	70
1.9.3.1.	Control de la transmisión vertical.....	71
1.9.3.2.	Control de la transmisión horizontal.....	71
2.	PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.....	72
3.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	76
3.1.	MANTENIMIENTO Y PURIFICACIÓN DE TAQUIZOÍTOS DE <i>N. caninum</i> .....	77
3.1.1.	Crecimiento y conservación de las líneas celulares.....	77
3.1.2.	Crecimiento y conservación de los taquizoítos de <i>N. caninum</i> .....	78
3.1.3.	Purificación de taquizoítos de <i>N. caninum</i> .....	79
3.1.3.1.	Antígeno para la prueba de IFI.....	79
3.1.3.2.	Antígeno para la prueba de ELISA.....	80
3.1.3.2.1.	Determinación de la concentración proteica.....	80
3.1.3.3.	Purificación de taquizoítos para la extracción del ADN.....	81
3.1.3.4.	Purificación de taquizoítos para la inoculación en ratón.....	81
3.2.	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	81
3.2.1.	Infección experimental del ratón con <i>N. caninum</i> .....	82
3.2.2.	Protocolos de inmunodepresión.....	82
3.3.	EXAMEN CLÍNICO DE LOS ANIMALES, RECOGIDA Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS.....	83
3.3.1.	De las infecciones experimentales en ratón.....	83

3.3.2.	De los fetos bovinos abortados.....	84
3.4.	<b>ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS.....</b>	85
3.4.1.	<b>Técnicas serológicas.....</b>	85
3.4.1.1.	IFL. ....	85
3.4.1.1.1.	Detección de IgG anti- <i>N. caninum</i> en ratón.....	86
3.4.1.1.2.	Detección de IgG anti- <i>N. caninum</i> en bovino.....	86
3.4.1.2.	ELISA .....	87
3.4.1.2.1.	Detección de los isotipos IgG1 e IgG2a anti- <i>N. caninum</i> en ratón.....	87
3.4.1.2.2.	Detección de IgG anti- <i>N. caninum</i> en bovino.....	88
3.4.2.	<b>Técnicas histológicas.....</b>	88
3.4.2.1.	Inclusión y microtomía.....	88
3.4.2.2.	Determinación de la edad fetal.....	89
3.4.2.3.	Criterio de valoración de lesiones.....	89
3.4.3.	<b>Técnicas genómicas y de PCR.....</b>	91
3.4.3.1.	<b>Extracción del ADN.....</b>	91
3.4.3.1.1.	Extracción del ADN utilizando Chelex-100.....	91
3.4.3.1.2.	Extracción del ADN utilizando una prueba comercial.....	92
3.4.3.2.	<b>Análisis del ADN total extraído.....</b>	94
3.4.3.2.1.	Electroforesis en geles de agarosa.....	94
3.4.3.2.2.	Cuantificación del ADN total extraído.....	94
3.4.3.2.3.	Purificación del ADN total mediante cromatografía de filtración en gel.....	94
3.4.3.3.	<b>Amplificación del ADN de <i>N. caninum</i> por la técnica de PCR.....</b>	95
3.4.3.3.1.	Sensibilidad de las pruebas de PCR para la detección de <i>N. caninum</i> .....	96
3.4.3.3.2.	Detección de los productos de las reacciones de PCR.....	97
3.4.3.4.	<b>Cuantificación de <i>N. caninum</i> por PCR cuantitativa en tiempo real.....</b>	97
3.4.3.4.1.	Construcción de las curvas estándares.....	97
3.4.3.4.2.	Condiciones de la PCR en tiempo real y cuantificación de las muestras.....	98

3.4.3.4.3.	Sensibilidad y especificidad de la PCR cuantitativa en tiempo real.....	99
3.4.3.4.4.	Electroforesis de los productos de amplificación de la PCR en tiempo real.....	100
3.4.3.5.	Medidas para evitar contaminaciones.....	100
3.5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	101
3.5.1.	Estudio de la homogeneidad.....	101
3.5.1.1.	Homogeneidad de un conjunto de muestras.....	101
3.5.1.2.	Homogeneidad de dos muestras: comparación de porcentajes.....	102
3.5.2.	Concordancia entre dos pruebas pruebas diagnósticas.....	102
3.5.3.	Regresión lineal.....	103
3.5.4.	Análisis de regresión logística.....	103
3.5.5.	Análisis de simulación.....	104
4.	<b>OBJETIVO 1.- DESARROLLO DE UNA PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE <i>N. caninum</i></b> .....	105
4.1.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	108
4.1.1.	Diseño de los oligonucleótidos y sondas.....	109
4.1.2.	Determinación de la sensibilidad y especificidad de la PCR en tiempo real.....	110
4.1.3.	Optimización de una PCR en tiempo real para la cuantificación de <i>N. caninum</i> y del gen 28SARNr en un solo tubo.....	111
4.1.4.	Aplicabilidad de la PCR en tiempo real.....	111
4.1.5.	Precisión de la técnica y concordancia entre técnicas.....	112
4.2.	RESULTADOS.....	112
4.2.1.	Diseño de los oligonucleótidos y sondas.....	112
4.2.2.	Sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real para la cuantificación de <i>N. caninum</i> .....	114
4.2.3.	PCR cuantitativa en tiempo real para la cuantificación del ADN del hospedador.....	117
4.2.4.	Optimización de una PCR cuantitativa en tiempo real para la cuantificación de <i>N. caninum</i> y del gen 28S rARN en un solo tubo.....	119
4.2.5.	Cuantificación de <i>N. caninum</i> en muestras clínicas.....	120
4.2.6.	Precisión de la técnica.....	122
4.2.7.	Comparación de la PCR en tiempo real, PCR anidada y análisis histológico.....	124

4.3.	DISCUSIÓN.....	125
<b>5.</b>	<b>OBJETIVO 2.- DESARROLLO DE UN MODELO MURINO</b>	
	<b>EXPERIMENTAL.....</b>	<b>130</b>
5.1.	SUBOBJETIVO 2.1. ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN AL DESARROLLO DE LA INFECCIÓN CRÓNICA POR <i>N. caninum</i> EN EL MODELO MURINO.....	131
5.1.1.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	132
5.1.1.1.	Características de los grupos y muestras recogidas.....	132
5.1.1.2.	Estudio histológico.....	133
5.1.1.3.	Estudio de la carga parasitaria en cerebro.....	134
5.1.1.4.	Estudio serológico.....	134
5.1.1.5.	Análisis estadístico.....	134
5.1.2.	RESULTADOS.....	135
5.1.2.1.	Mortalidad y signos clínicos.....	135
5.1.2.2.	Desarrollo de lesiones.....	135
5.1.2.3.	Estudio de la carga parasitaria en cerebro.....	138
5.1.2.4.	Asociación entre lesión y carga parasitaria en cerebro.....	140
5.1.2.5.	Respuesta inmune humoral.....	141
5.1.3.	DISCUSIÓN.....	142
5.2.	SUBOBJETIVO 2.2. ESTUDIO DE LA PARASITEMIA Y DISTRIBUCIÓN ORGÁNICA DE <i>N. caninum</i> DURANTE LA INFECCIÓN AGUDA Y CRÓNICA EN EL MODELO MURINO.....	147
5.2.1.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	148
5.2.1.1.	Características de los grupos y muestras recogidas.....	148
5.2.1.2.	Extracción del ADN.....	149
5.2.1.3.	PCR cuantitativa en tiempo real.....	149
5.2.1.4.	Determinación de IgG2a e IgG1 anti- <i>N. caninum</i> .....	149
5.2.1.5.	Análisis estadístico.....	150
5.2.2.	RESULTADOS.....	150
5.2.2.1.	Mortalidad y sintomatología.....	150
5.2.2.2.	Cinética del parásito en la sangre y ganglios linfáticos.....	151
5.2.2.3.	Cinética del parásito en bazo, hígado, pulmones y cerebro.....	153

5.2.2.4.	Estudio de simulación por “bootstrap” .....	155
5.2.2.5.	Determinación de IgG2a e IgG1 anti- <i>N. caninum</i> .....	156
5.2.2.6.	Asociación entre sintomatología y la carga parasitaria en cerebro.....	157
5.2.3.	DISCUSIÓN.....	158
<b>6.</b>	<b>OBJETIVO 3.- PATOGENIA DE LA INFECCIÓN POR <i>N. caninum</i> EN EL FETO BOVINO. ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN-CARGA PARASITARIA Y DEL CUADRO LESIONAL.....</b>	<b>167</b>
6.1.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	169
6.1.1.	Recogida de las muestras y datos.....	171
6.1.2.	Análisis de las muestras.....	173
6.1.2.1.	Examen macroscópico y diagnóstico diferencial.....	173
6.1.2.2.	Estudio serológico.....	173
6.1.2.3.	Detección de <i>N. caninum</i> en los órganos fetales.....	174
6.1.2.4.	Cuantificación de <i>N. caninum</i> en los órganos fetales.....	174
6.1.2.5.	Estudio histológico.....	175
6.1.3.	Análisis estadístico.....	175
6.2.	RESULTADOS.....	176
6.2.1.	Examen macroscópico de los fetos.....	176
6.2.2.	Detección de IgG anti- <i>N. caninum</i> .....	176
6.2.3.	Diagnóstico diferencial.....	177
6.2.4.	Detección de <i>N. caninum</i> en los órganos fetales.....	178
6.2.4.1.	Sensibilidad de las pruebas de PCR Nc-5 e ITS1.....	178
6.2.4.2.	Detección del ADN de <i>N. caninum</i> en cerebro, corazón e hígado.....	179
6.2.4.3.	Distribución del ADN de <i>N. caninum</i> en órganos fetales.....	185
6.2.5.	Cuantificación de <i>N. caninum</i> en los órganos fetales.....	186
6.2.6.	Análisis histológico.....	189
6.2.6.1.	Descripción de los hallazgos histopatológicos.....	189
6.2.6.2.	Análisis de las frecuencias de presentación de las lesiones.....	195
6.2.6.3.	Determinación de la gravedad de las lesiones.....	196
6.2.6.4.	Caracterización del cuadro lesional en el cerebro.....	198
6.2.7.	Asociación entre lesión y carga parasitaria.....	202

6.3. DISCUSIÓN.....	203
7. CONCLUSIONES.....	214
8. RESUMEN.....	218
9. SUMMARY.....	222
10. BIBLIOGRAFÍA.....	228

## LISTADO DE FIGURAS

- Figura 1.** Fases del ciclo biológico de *N. caninum*.
- Figura 2.** Ciclo biológico de *N. caninum*.
- Figura 3.** Esquema de una amplificación con los términos más comúnmente usados en la PCR en tiempo real.
- Figura 4.** Esquema del funcionamiento del sistema TaqMan.
- Figura 5.** Fragmento de ADN de la región Nc-5 de *N. caninum* (GenBank no. de acceso X84238) seleccionada para el diseño de los oligonucleótidos y la sonda para la cuantificación de *N. caninum* por PCR en tiempo real.
- Figura 6.** Fragmento de ADN del gen 28SARNr (GenBank no. de acceso X00525) seleccionada para el diseño de los oligonucleótidos y la sonda para la cuantificación del ADN del hospedador por PCR en tiempo real.
- Figura 7.** Productos de la amplificación de *N. caninum* por PCR en tiempo real en gel de agarosa al 3,5 %.
- Figura 8.** (A) Gráfica de amplificación de *N. caninum* por PCR en tiempo real que muestra la fluorescencia emitida por SYBR Green I *versus* número de ciclos de la PCR. (B) Gráfica de amplificación de *N. caninum* que muestra el log de la fluorescencia emitida por SYBR Green I *versus* número de ciclos de la PCR. (C) Curva estándar de *N. caninum*.
- Figura 9.** Ejemplos de las curvas de fusión correspondientes a: (A) muestra con ADN equivalente a 10 taquizoítos y (B) muestra sin ADN de *N. caninum*.
- Figura 10.** (A) Gráfica de amplificación del gen 28S ARNr del ADN del hospedador (B) Curva estándar del gen 28S ARNr.
- Figura 11.** Ejemplos de las curvas de fusión correspondientes a: (A) feto bovino número 4 (muestra con ADN de *N. caninum*), (B) ratón número 5 (muestra con ADN de *N. caninum*), y (C) feto número 5 (muestra sin ADN del parásito).
- Figura 12.** (A) Nódulo glial y (B) manguito perivascular. H&E x200 (grupo 9).
- Figura 13.** Quiste de *N. caninum* en el cerebro de un ratón perteneciente al grupo 10. H&E x1000.
- Figura 14.** Porcentaje de ratones con cerebros positivos a *N. caninum*.
- Figura 15.** Las barras de gráfico representan la mediana y los cuartiles 25% y 75% de la carga parasitaria en cerebro (número de parásitos por  $\mu\text{g}$  de ADN del hospedador) determinada por PCR en tiempo real.

- Figura 16.** Correlación entre el grado de lesión y la carga parasitaria (número de parásitos/ $\mu\text{g}$  ADN) en cerebro mediante un análisis de regresión simple. (A): ratones ICR; (B): ratones BALB/c.
- Figura 17.** Las barras de gráfico representan la mediana y los cuartiles 25% y 75% de los títulos de IgG por IFI a las 8 semanas PI.
- Figura 18.** Cinéticas del número de parásitos en (A) bazo, (B) hígado, (C) pulmón y (D) cerebro de los ratones infectados con NC-1 (grupo 1) y NC-Liv (grupo 2).
- Figura 19.** Distribuciones obtenidas por “bootstrap” en (A) cerebro, (B) hígado, (C) sangre, (D) pulmón y (E) bazo, para el aislado NC-Liv (línea discontinua) y NC-1 (línea continua).
- Figura 20.** Cinéticas de los isotipos IgG2a e IgG1 anti- *N. caninum* de los ratones BALB/c inoculados con los aislados (A) NC-Liv o (B) NC-1. Cada punto representa la mediana del valor de absorbancia del grupo a 450 nm.
- Figura 21.** Carga de parásitos en cerebro de los ratones con síntomas y sin síntomas.
- Figura 22.** Esquema del diseño experimental del objetivo 3.
- Figura 23.** Distribución por edad gestacional de los sueros analizados.
- Figura 24.** (A) Sensibilidad de la PCR Nc-5 (360pb). (B) Sensibilidad de la PCR anidada del segmento ITS1 (213 pb).
- Figura 25.** Distribución de la edad de los 219 fetos analizados por PCR.
- Figura 26.** Las barras de gráfico representan la mediana y los cuartiles 25% y 75% de la carga de parásitos (número de parásitos por  $\mu\text{g}$  de ADN del hospedador) en los diferentes órganos analizados según el periodo de gestación fetos.
- Figura 27.** Las barras de gráfico representan la mediana y los cuartiles 25% y 75% de la carga de parásitos (número de parásitos por  $\mu\text{g}$  de ADN del hospedador) en los diferentes órganos analizados según el tipo de aborto (epidémico o endémico).
- Figura 28.** Corteza cerebral. (A) Foco de malacea asociado a una reacción inflamatoria. H&E x100. (B) Gliosis moderada del neuropilo y focos de hemorragia. H&E x100.
- Figura 29.** Corazón. (A) Miocarditis linfocítica. H&E x100. (B) Pericarditis. H&E x40.
- Figura 30.** (A) Hígado. Foco de necrosis intraParenquimatoso. H&E x100. (B) Pulmón. Alveolitis descamativa. H&E. x400.
- Figura 31.** (A) Timo. Activación zona B. H&E x40. (B) Ganglio linfático. Linfadenitis simple inespecífica. H&E x100. (C) Glándula adrenal. Foco inflamatorio linfocítico en corteza adrenal. H&E x200.

- Figura 32.** Las barras de gráfico representan la mediana y los cuartiles 25% y 75% de la gravedad de la lesión en los diferentes órganos analizados según el periodo de gestación.
- Figura 33.** Las barras de gráfico representan la mediana y los cuartiles 25% y 75% de la intensidad de la lesión en los diferentes órganos analizados según el tipo de aborto (epidémico o endémico).
- Figura 34.** Las barras de gráfico representan la mediana y los cuartiles 25% y 75% de la intensidad de las lesiones en el cerebro según el periodo de gestación.
- Figura 35.** Las barras de gráfico representan la mediana y los cuartiles 25% y 75% de la gravedad de las lesiones en el cerebro según el tipo de aborto (epidémico o endémico).

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Resumen de las características morfológicas y biológicas de la familia Sarcocystidae.
<b>Tabla 2.</b>	Aislados de <i>N. caninum</i> .
<b>Tabla 3.</b>	Peso molecular y localización de los principales antígenos de <i>N. caninum</i> reconocidos por anticuerpos monoclonales.
<b>Tabla 4.</b>	Seroprevalencia individual de la infección por <i>N. caninum</i> en el ganado bovino de aptitud lechera.
<b>Tabla 5.</b>	Seroprevalencia individual de la infección por <i>N. caninum</i> en el ganado bovino de aptitud cárnica.
<b>Tabla 6.</b>	Prevalencia de la infección por <i>N. caninum</i> en fetos bovinos abortados (estudios más reciente).
<b>Tabla 7.</b>	Protocolo de estudio de un problema de abortos en una explotación de vacas de leche.
<b>Tabla 8.</b>	Diagnóstico del aborto causado por <i>N. caninum</i> en los bovinos.
<b>Tabla 9.</b>	Criterio considerado en la valoración de la gravedad de la lesión en el cerebro.
<b>Tabla 10.</b>	Cebadores utilizados en la reacción de PCR de la región Nc-5 e ITS1.
<b>Tabla 11.</b>	Condiciones utilizadas en las reacciones de PCR de las regiones Nc-5 e ITS1.
<b>Tabla 12.</b>	Programa de PCR utilizado para la cuantificación de <i>N. caninum</i> y del gen 28S ARNr utilizando SYBR Green™ o TaqMan™.
<b>Tabla 13.</b>	Cálculo del valor $\kappa$ .
<b>Tabla 14.</b>	Valores de Ct obtenidos con la sonda TaqMan con ADN equivalente a 1 hasta $10^4$ taquizoítos.
<b>Tabla 15.</b>	Valores de Ct obtenidos con la sonda 28S ARNr con 500 a 4 ng de ADN genómico extraído de tejido cerebral.
<b>Tabla 16.</b>	Resultados obtenidos en cerebros procedentes de muestras de fetos bovinos abortados y ratones infectados experimentalmente analizadas por PCR en tiempo real, histología y PCR anidada para la detección de <i>N. caninum</i> .
<b>Tabla 17.</b>	Repetibilidad de la PCR en tiempo real de <i>N. caninum</i> en muestras con ADN de $10^{-1}$ a $10^4$ taquizoítos.

- 
- Tabla 18.** Repetibilidad de la PCR en tiempo real del gen 28S ARNr en muestras con ADN genómico desde una concentración desde 500 ng hasta 0,8 ng.
- Tabla 19.** Repetibilidad de la PCR en tiempo real de *Neospora* y el gen 28S ARNr en muestras de encéfalo de fetos bovinos abortados y ratones inoculados experimentalmente con el parásito.
- Tabla 20.** Resumen de las características de los grupos y factores investigados.
- Tabla 21.** Resumen de los factores y grupos comparados.
- Tabla 22.** Presencia de lesiones compatibles y gravedad de la lesión.
- Tabla 23.** Detección del ADN de *N. caninum* por PCR en tiempo real en sangre, ganglios linfáticos superiores (mediastínicos y cervicales) e inferiores (mesentéricos e ilíacos) de los ratones infectados con el aislado NC-Liv (grupo 1) y NC-1 (grupo 2).
- Tabla 24.** Resultados del análisis de regresión logística.
- Tabla 25.** Laboratorio y lugar de procedencia de los fetos abortados y número de muestras analizadas.
- Tabla 26.** Agentes infecciosos identificados en los fetos analizados.
- Tabla 27.** Distribución geográfica de los 219 fetos analizados por PCR.
- Tabla 28.** Distribución de los fetos positivos por PCR en función del órgano analizado.
- Tabla 29.** Distribución de los fetos positivos por PCR en función del órgano analizado y el periodo de gestación.
- Tabla 30.** Distribución de los fetos positivos por PCR en función del órgano analizado y las características epidemiológicas del aborto.
- Tabla 31.** Distribución de los fetos positivos por PCR en función del órgano analizado, periodo de gestación y características epidemiológicas del aborto.
- Tabla 32.** Distribución del ADN de *N. caninum* por PCR anidada según el periodo de gestación.
- Tabla 33.** Distribución del ADN de *N. caninum* por PCR anidada según las características epidemiológicas del aborto.
- Tabla 34.** Distribución de los fetos con lesiones en función del órgano analizado y el periodo de gestación.

- Tabla 35.** Distribución de los fetos con lesiones compatibles con *N. caninum* en función del órgano analizado y las características epidemiológicas del aborto.
- Tabla 36.** Distribución de las lesiones en el SN+C en función del periodo de gestación.
- Tabla 37.** Distribución de los hallazgos histopatológicos compatibles con *N. caninum* en función de las características epidemiológicas del aborto.

## LISTADO DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

<b>β2M</b>	Receptor beta 2 microglobulina
<b>μMT</b>	Deficiente en células B
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AMP</b>	Acetato de metilprednisolona
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ARNr</b>	ARN ribosomal
<b>BALB/c nu/nu</b>	BALB/c atímicos
<b>C.E.</b>	Concordancia esperada
<b>C.O.</b>	Concordancia observada
<b>CMHI</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I
<b>Ct</b>	Ciclo umbral
<b>CV</b>	Coeficiente de variación
<b>CY</b>	Ciclofosfamida
<b>DAT</b>	Inmunoaglutinación directa
<b>DIA</b>	"DNA-hybridisation immunoassay"
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>dNTP</b>	Desoxinucleósido trifosfato
<b>ELISA</b>	Ensayo inmunoenzimático
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>H</b>	Histología
<b>H&amp;E.</b>	Hematoxilina-eosina
<b>i.m.</b>	Intramuscular
<b>i.p.</b>	intraperitoneal
<b>i.v</b>	Intravenosa
<b>IFI</b>	Inmunofluorescencia indirecta
<b>IFN-γ</b>	Interferón-γ
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>IL-10</b>	Interleuquina 10
<b>IL-12</b>	Interleuquina 12
<b>IL-2</b>	Interleuquina 2
<b>iNOS2</b>	Enzima inducible NO sintetasa
<b>ISCOM</b>	Complejo inmunoestimulante
<b>ITS1</b>	"Internal Transcribed Spacer I"
<b>kb</b>	Kilobase
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>Mab</b>	Anticuerpo monoclonal
<b>ME</b>	Microscopía electrónica
<b>MEM</b>	Medio mínimo esencial

---

<b>Mic</b>	Micronemas
<b>ng</b>	Nanogramo
<b>ng</b>	Picogramo
<b>NK</b>	Células asesinas (“Natural Killer”)
<b>nss-ARNr</b>	Subunidad menor del ARN ribosomal
<b>O.D.</b>	Densidad óptica
<b>p-17</b>	Fracción proteica de 17 kDa
<b>p-33</b>	Fracción proteica de 33 kDa
<b>p-36</b>	Fracción proteica de 36 kDa
<b>p-66</b>	Fracción proteica de 66 kDa
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PI</b>	Post-infección
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>PMSF</b>	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
<b>QC-PCR</b>	PCR cuantitativa-competitiva
<b>Rop</b>	Roptrias
<b>s.c.</b>	Subcutánea
<b>SCID-bg</b>	Deficiente en células T y B funcionales y en un 50% en NK
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>SHI</b>	Suero equino inactivado
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>TBS</b>	Tampón tris salino
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento tumoral $\beta$
<b>TNFR2</b>	Receptor 2 del factor de necrosis tumoral
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral- $\alpha$
<b>UDG</b>	“Uracil DNA glycosidase”
<b>v.o.</b>	Vía oral
<b>VBVD</b>	Virus de la diarrea vírica bovina
<b>VIBR</b>	Virus de la rinotraqueitis bovina infecciosa
<b>VLB</b>	Vinblastina
<b>wb</b>	Western-blot
<b><math>\mu</math>g</b>	Microgramo
<b><math>\kappa</math></b>	kappa

## **1.- Antecedentes**

## 1.1. NEOSPOROSIS BOVINA: DEFINICIÓN Y EVOLUCIÓN HISTÓRICA

La neosporosis bovina es una enfermedad parasitaria producida por *Neospora caninum* que cursa con aborto y nacimiento de terneros con sintomatología neuromuscular o clínicamente sanos, pero crónicamente infectados.

La primera identificación de *N. caninum* tuvo lugar en Noruega; Bjerkas et al. (1984) describieron en perros jóvenes un síndrome caracterizado por encefalomiелitis y miositis causado por un parásito similar a *Toxoplasma gondii*. En 1988, en los EE.UU., Dubey et al. (1988b) propusieron un nuevo género al identificar un protozoo en perros con síntomas neuromusculares al que denominaron *Neospora*, con una única especie representativa hasta ese momento: *N. caninum*. Seguidamente, se consiguió el aislamiento del agente en cultivo celular y se reprodujo la infección experimentalmente en el perro (Dubey et al., 1988a). En 1988 se desarrolló una prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de anticuerpos anti-*N. caninum* y en 1989 se desarrollan técnicas inmunohistoquímicas para la detección del parásito en tejidos de animales infectados (Lindsay & Dubey, 1989b). Utilizando estas técnicas diagnósticas, Bjerkas & Dubey (1991) demostraron que el parásito identificado en 1984 en Noruega era realmente *N. caninum*. El primer modelo experimental para el estudio de la biología, inmunología, patogénesis y quimioterapia de la infección se desarrolló en ratones y ratas (Lindsay & Dubey, 1989d, 1990a, b, c). Paralelamente, se demostró de forma experimental en perros, gatos y ovejas, la transmisión transplacentaria del parásito (Dubey & Lindsay, 1989b, c, 1990).

El interés en el campo veterinario por este protozoo se acrecentó cuando Thilsted & Dubey (1989) identificaron por primera vez a *N. caninum* como agente etiológico de aborto en el ganado bovino y se confirmó que la infección por este protozoo era la primera causa de aborto en el ganado lechero de California (Anderson et al., 1991; Barr et al., 1991a). En 1992 se puso de manifiesto experimentalmente la transmisión vertical del parásito en la especie bovina (Dubey et al., 1992) y en 1993 se consiguió el primer aislado procedente de un feto bovino abortado (Conrad et al., 1993a). Posteriormente, se logró la reproducción del cuadro clínico, produciéndose la infección y muerte fetal en vacas gestantes inoculadas experimentalmente con este aislado (Barr et al., 1994a).

A partir de ese momento, los avances en el conocimiento de la biología molecular del parásito y en la patogenia, diagnóstico y epidemiología de la enfermedad, han sido especialmente significativos. En la historia de este protozoo merecen mención especial dos hechos, el primero es el descubrimiento del perro como el hospedador definitivo de *N. caninum* (McAllister et al., 1998) y, por consiguiente, la posibilidad de transmisión horizontal de la infección; y el segundo la descripción de una nueva especie, *Neospora hughesi*, aislada del tejido nervioso de un caballo adulto con sintomatología nerviosa y que presenta diferencias morfológicas, antigénicas y genéticas respecto a la otra especie del género (Marsh et al., 1996, 1998; Walsh et al., 2001). Actualmente, la neosporosis bovina está considerada una enfermedad parasitaria de distribución cosmopolita y una de las causas más frecuentes de fallo reproductivo en las principales zonas productoras del mundo (Dubey & Lindsay, 1996; Dubey, 1999b, 2003).

## 1.2. ETIOLOGÍA

### 1.2.1. Taxonomía

*Neospora* es un género de protozoos parásitos que se incluye actualmente en el Phylum Apicomplexa, clase Sporozoea, subclase Coccidia, orden Eucoccidia, suborden Eimeriina y familia Sarcocystidae (Dubey & Lindsay, 1996). En la Tabla 1 se resumen las características morfológicas y biológicas de familia Sarcocystidae.

**Tabla 1.** Resumen de las características morfológicas y biológicas de la familia Sarcocystidae.

CLASIFICACIÓN	NOMBRE	CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS
Phylum	Apicomplexa	Formas invasivas con complejo apical
Clase	Sporozoea	Locomoción de formas invasivas mediante movimientos de flexión, ondulación y deslizamiento.
Subclase	Coccidia	El ciclo biológico incluye merogonia, gametogonia, y esporogonia.
Orden	Eucoccidia	La merogonia tiene lugar en hospedadores vertebrados.
Suborden	Eimeriina	Existe desarrollo independiente de gametos masculinos (microgametos) y femeninos (macrogametos).
Familia	Sarcocystidae	Parásitos heteroxenos y formadores de quistes en el hospedador intermediario (diferentes especies de herbívoros). El hospedador definitivo (diferentes especies de carnívoros) elimina ooquistes en las heces.

La situación taxonómica de *N. caninum* ha sido cuestionada desde su descripción, relacionándola con tres especies de importancia humana y veterinaria: *T. gondii*, *Hammondia hammondi* y *Hammondia heydorni*. Estudios filogenéticos basados en el análisis de la secuencia de la subunidad menor del ARN ribosomal (nss-ARNr), mostraron un elevado grado de homología entre *N. caninum* y *T. gondii*, sugiriendo que los dos organismos podrían pertenecer al mismo género (Ellis et al., 1994; Holmdahl et al., 1994). Sin embargo, Guo & Johnson (1995) investigaron el genoma de *Neospora*, *Toxoplasma* y *Sarcocystis* mediante RAPD-PCR y encontraron diferencias significativas entre *Neospora* y *Toxoplasma*. Asimismo, se demostró que los genes B1, p22 y p30 de *T. gondii* no se encontraban en *N. caninum* (Brindley et al., 1993) y que existía una variabilidad significativa en la región ITS1 ("Internal Transcribed Spacer I") de ambas especies (Holmdahl & Mattsson, 1996). Otros estudios concluyen que *N. caninum* estaría filogenéticamente más próximo a *H. heydorni* (Ellis et al., 1999a; Mugridge et al., 1999), debido a lo cual la existencia del género *Neospora* es de nuevo objeto de debate (Mehlhorn & Heydorn, 2000; Heydorn & Mehlhorn, 2002a,b). Sin embargo, se ha demostrado que *N. caninum* difiere biológicamente, inmunológicamente, morfológicamente y molecularmente de *H. heydorni* (Dubey et al., 2002a, b).

### **1.2.2. Aislados de *Neospora***

A partir del primer aislado de *N. caninum* de origen canino (Dubey et al., 1988a) han sido varios los aislados obtenidos. Estos aislados se han obtenido de fetos bovinos, terneros congénitamente infectados, un bovino adulto, tejidos y ooquistes de perros naturalmente infectados y de una oveja (Tabla 2). Los escasos estudios comparativos han demostrado que existen variaciones biológicas, genéticas y patogénicas entre algunos de los aislados estudiados (Atkinson et al., 1999; Shock et al., 2001, Pérez-Zaballos et al., 2002).

Asimismo se han conseguido dos aislados de *N. hughesi* de caballo obtenidos de tejido nervioso, el CN1 (Marsh et al., 1996; Marsh et al., 1998) y el aislado Oregón (Dubey et al., 2001), ambos en EE.UU.

**Tabla 2.** Aislados de *N. caninum*.

DENOMINACIÓN	PAÍS	ORIGEN	MUESTRA	REFERENCIA
NC-1	EE.UU.	Canino	Cerebro	Dubey et al., 1988a
NC-2	EE.UU.	Canino	Cerebro	Hay et al., 1990
NC-3	EE.UU.	Canino	Cerebro	Cuddon et al., 1992
BPA-3	EE.UU.	Ternero	Cerebro	Barr et al., 1993
BPA-4	EE.UU.	Ternero	Cerebro	Barr et al., 1993
NC-Liv	Reino Unido	Canino	Cerebro	Barber et al., 1993
BPA-1	EE.UU.	Feto	Cerebro	Conrad et al., 1993a
BPA-2	EE.UU.	Feto	Cerebro	Conrad et al., 1993a
JPA-1	Japón	Ternero	Cerebro	Yamane et al., 1996
NC-SweB1	Suecia	Ternero	Cerebro	Stenlund et al., 1997
NC-4	EE.UU.	Canino	Cerebro	Dubey et al., 1998a
NC-5	EE.UU.	Canino	Cerebro	Dubey et al., 1998a
JPA-2	Japón	Ternero	Cerebro	Yamane et al., 1998
JPA-4	Japón	Ternero	Cerebro	Yamane et al., 1998
JPA-5	Japón	Ternero	Cerebro	Yamane et al., 1998
BT2	Japón	Ternero	Cerebro	Yamane et al., 1998
CN-1	EE.UU.	Canino	Cerebro	Marsh et al., 1998
NC-LivB1	Reino Unido	Ternero	Cerebro	Davison et al., 1999b
NC-PV1	Italia	Ternero	Cerebro	Magnino et al., 1999
NC-LivB2	Reino Unido	Feto	Cerebro	Trees & Williams, 2000
NC-Beef	EE.UU.	Ternero	Cerebro	McAllister et al., 2000
KBA-1	Corea	Ternero	Cerebro	Kim et al., 2000
KBA-2	Corea	Feto	Cerebro	Kim et al., 2000
NC-GER1	Alemania	Canino	Cerebro	Peters et al., 2000
BT-3	Japón	Vaca	Cerebro	Sawada et al., 2000
NC-Bahia	Brasil	Canino	Cerebro	Gondim et al., 2001
NC-Porto1	Portugal	Feto	Cerebro	Canada et al., 2002
NC6-Argentina	Argentina	Canino	Heces	Basso et al., 2001
NC7-Japón	Japón	Oveja	Cerebro	Koyama et al., 2001
NC-Nowra	Australia	Ternero	Cerebro	Miller et al, 2002
Nc-Illinois	EE.UU.	Ternero	Cerebro	Godim et al., 2002
BNC-PR1	Brasil	Ternero	Cerebro	Locatelli-Dittrich et al., 2003

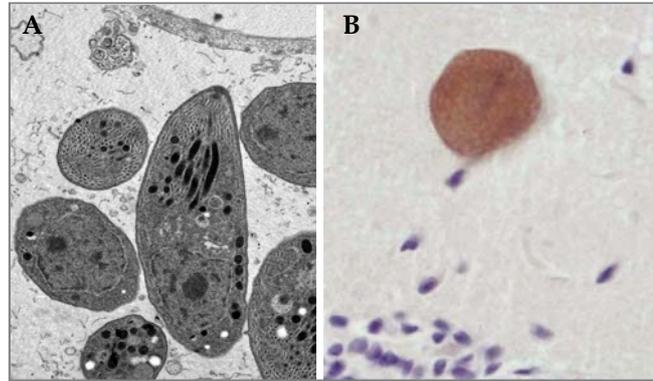
### **1.2.3. Morfología y ultraestructura del parásito**

En el ciclo biológico de *N. caninum* existen tres estadios diferentes: los taquizoítos, los quistes tisulares con bradizoítos en su interior y los ooquistes (Figura 1). Los taquizoítos tienen un tamaño que oscila entre 3-7  $\mu\text{m}$  de longitud y 1-5  $\mu\text{m}$  de anchura y una morfología ovoide, globular o lunar, dependiendo de la etapa de división en la que se encuentren (Dubey & Lindsay, 1996). Ultraestructuralmente, los taquizoítos derivados de cultivo celular son idénticos a los observados *in vivo* (Speer & Dubey, 1989; Lindsay et al., 1993), poseen una película integrada por un plasmalema y una membrana interna, un complejo apical formado por: 22 microtúbulos subpeliculares, dos anillos apicales, un conoide y un anillo polar; organelas secretoras compuestas por: micronemas, 8-24 roptrias y gránulos densos; mitocondria, núcleo, nucleolo, aparato de Golgi, ribosomas, polisomas, 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 quistes miden aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de diámetro, tienen forma redondeada u oval y pueden contener en su interior hasta 200 bradizoítos. La pared quística (que puede alcanzar más de 4  $\mu\text{m}$  de espesor) está formada por dos membranas, la externa, una única membrana electrodensa, y la interna de mayor grosor, granular y con estructuras tubulares (Bjerkas & Dubey, 1991; Dubey & Lindsay, 1996). Los bradizoítos son de aproximadamente 6-8  $\mu\text{m}$  de longitud por 1-1,8  $\mu\text{m}$  de anchura y contienen las mismas organelas que los taquizoítos, aunque en los bradizoítos el número de roptrias es menor y tienen más gránulos de amilopectina (Speer & Dubey, 1989; Jardine et al., 1996).

Los ooquistes de *N. caninum* son morfológicamente similares a los de *T. gondii* y *H. heydorni*; tienen forma esférica o subsférica y su tamaño es de 11,7  $\mu\text{m}$  de longitud y 11,3  $\mu\text{m}$  de anchura. La pared del ooquiste es lisa, de 0,6-0,8  $\mu\text{m}$  de espesor y no contiene micropilo. En su interior se encuentran dos esporoquistes elipsoidales (8,4  $\mu\text{m}$  de longitud por 6,1  $\mu\text{m}$  de anchura) con 4 esporozoítos cada uno (6,5  $\mu\text{m}$  de longitud por 2,0  $\mu\text{m}$  de anchura) de forma alargada y el cuerpo residual esporoquístico (Lindsay et al., 1999c).

**Figura 1.** Fases del ciclo biológico de *N. caninum*. (A) Microscopía electrónica de taquizoítos de NC-1 en cultivo celular, (B) quiste tisular en un cerebro procedente de un feto bovino abortado (inmunohistoquímica x400).



#### **1.2.4. Composición proteica y antigénica**

Los avances en la identificación y caracterización proteica y antigénica de *N. caninum* se han apoyado principalmente en los estudios comparativos y conocimientos previos obtenidos en *T. gondii* e, igualmente, en el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales empleados en ensayos de inmunolocalización o técnicas de inmunodetección sobre genotecas de expresión de ADNc (Hemphill et al., 1999). Sin embargo, la identificación de antígenos específicos de la fase de bradizoíto, no ha sido todavía posible y, únicamente, se han identificado antígenos específicos del taquizoíto o compartidos por el taquizoíto y el bradizoíto (Fuchs et al., 1998).

Mediante los abordajes anteriormente expuestos se han aislado y caracterizado proteínas y antígenos con diferente localización. Björkman et al. (1994) identificaron por western-blot unas proteínas de 17-18 y 30-45 kDa, localizadas en la superficie del taquizoíto. Posteriormente, utilizando anticuerpos monoclonales, Björkman & Hemphill (1998) (Tabla 3) caracterizaron los antígenos inmunodominantes de 18, 30, 32 y 41 kDa y Schares et al. (1999b) identificaron tres antígenos de superficie de 19, 28 y 40 kDa que parecían concordar con los anteriormente descritos. La proteína NcSRS2, de 43 kDa fue la primera proteína clonada de *N. caninum* (Hemphill et al., 1996; Hemphill & Gottstein, 1996; Hemphill et al., 1997b). Esta proteína de superficie se expresa de forma compartida

tanto en taquizoítos como bradizoítos (Fuchs et al., 1998) y está considerada como uno de los antígenos inmunodominantes. A continuación, Hemphill et al. (1997a) caracterizaron la glicoproteína SAG1 de 36 kDa localizada tanto en la superficie del parásito como en el interior de los gránulos densos. Esta proteína se expresa únicamente en la fase de taquizoíto (Fuchs et al., 1998).

En cuanto a las proteínas de *N. caninum* localizadas en los gránulos densos, Bjerkas et al., (1994) identificaron dos proteínas inmunodominantes de 29 y 30 kDa asociadas también 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 las emplearon en una prueba de ELISA. La proteína NcGRA7 se expresa tanto en el taquizoíto como en el bradizoíto (Fuchs et al., 1998). Otras proteínas de gránulos densos son las de 29 y 67 kDa, denominadas NcNTPasa-I (Asai et al., 1998) y NcGRA2 (Ellis et al., 2000). Hasta el momento, sólo se ha identificado una proteína de 17 kDa de las roptrias que está considerada como inmunodominante (Barta et al., 1992). Tan solo se han caracterizado tres proteínas de micronemas, NcMIC3, NcMIC2 y NcMIC1 de 38, 95 y 60 kDa, respectivamente (Lovett et al., 2000; Sonda et al., 2000; Keller et al., 2002). NcMIC3 ha sido identificada como uno de los antígenos inmunodominantes de *N. caninum* (Sonda et al., 2000). Finalmente, la única enzima clonada de *Neospora* es una serin-proteasa de 65 kDa (Louie et al., 1997, 2002) localizada en los micronemas del taquizoíto y denominada NcSUB1.

**Tabla 3.** Peso molecular y localización de los principales antígenos de *N. caninum* reconocidos por anticuerpos monoclonales.

ANTICUERPO MONOCLONAL	PESO MOLECULAR DE LOS ANTÍGENOS (KDa)		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 et al., 1994
4a4-2	-	65	Superf	-	Baszler et al., 1996
D9	-	42	Intracitopl	GD	Sundermann et al., 1997
Ncmab-4	30/32	30/32	Superf Intracitopl	Superf GD	Björkman & Hemphill, 1998
Ncmab-7	18	18	Superf Intracitopl	Superf	Björkman & Hemphill, 1998
Ncmab-10 y 17	41	41	Intracitopl	Superf	Björkman & Hemphill, 1998
Ncmab-13 y 24	Ninguno	61	-	-	Björkman & Hemphill, 1998
5H5 y 4H7	35	-	-	Superf	Howe et al., 1998
6C11	29	-	Superf	Superf	Howe et al., 1998
6D12-G10					Sasai et al., 1998
1.11.1.	40 (38, 36)	-	Superf	-	Schares et al., 1999b
5.2.15	38 (36, 33)	-	-	Superf	Schares et al., 1999b
4.11.5	33 (22, 28, 42)	33 (22, 24, 28)	Intracitopl	GD, VP	Schares et al., 1999b
4.7.12	19	19	Superf	-	Schares et al., 1999b
1E3	-	70	Superf	-	Nishikawa et al., 2000b
1F3	-	70	Superf	-	Nishikawa et al., 2000b
1B8	43	43	Superf	-	Nishikawa et al., 2000b
2C8	43	43	Superf	-	Nishikawa et al., 2000b
2G2	43	43	Superf	-	Nishikawa et al., 2000b
1A5	42	42	Anterior	-	Nishikawa et al., 2000b
1C7	36	-	Superf	-	Nishikawa et al., 2000b
2C11	36	36	Superf	-	Nishikawa et al., 2000b

A: Peso molecular estimado en condiciones no reductoras

B: Peso molecular estimado en condiciones reductoras

\*Superf: IFI: inmunofluorescencia indirecta; ME: Microscopía electrónica; Superficie; Intracitopl: Intracitoplasmático; GD: Gránulos densos; VP: Vacuola parasitófora; Mic: Micronemas; Rop: Roptrias

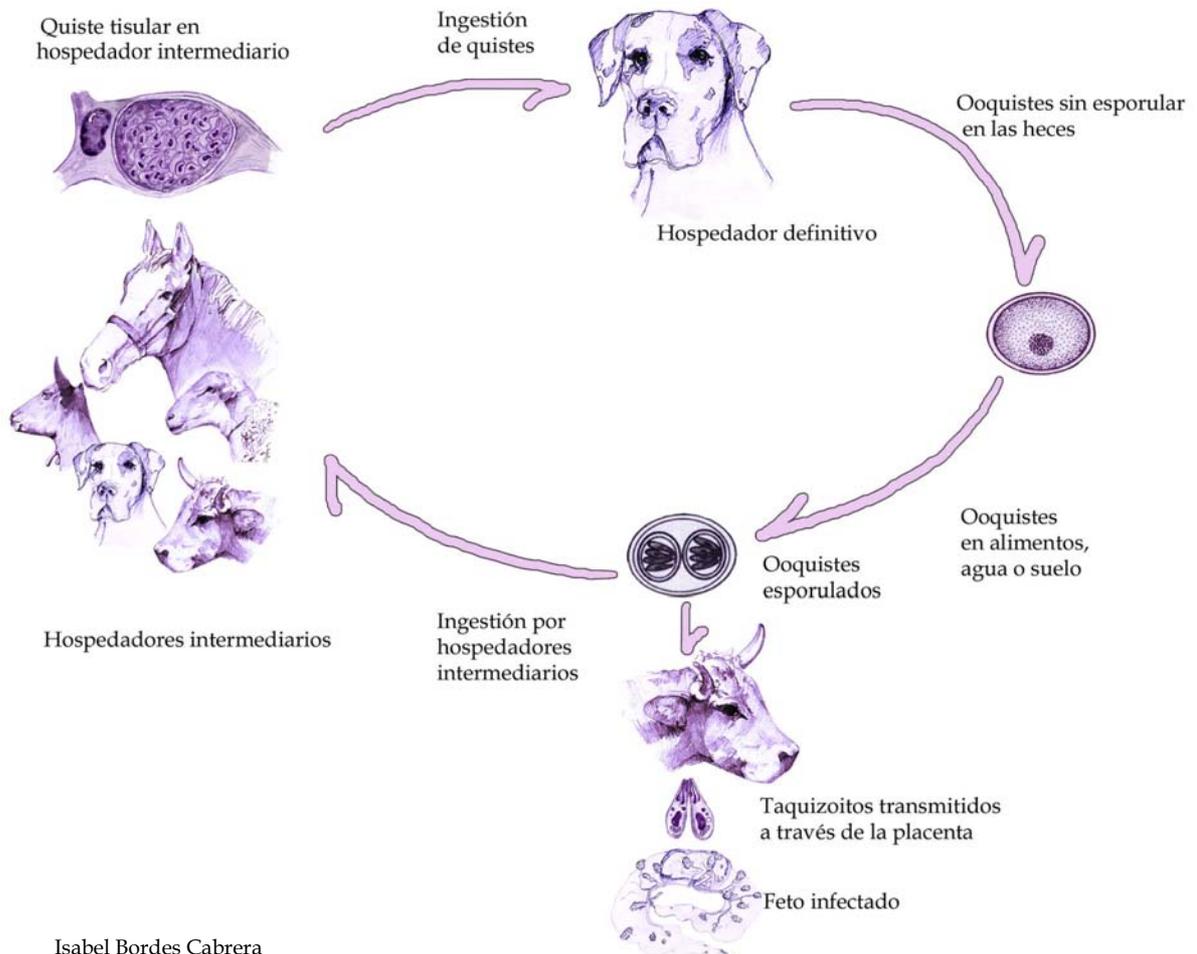
### 1.2.5. Ciclo biológico

*N. caninum* tiene un amplio espectro de hospedadores domésticos y silvestres. Su presencia se ha descrito en el perro, el ganado bovino, la cabra (Barr et al., 1992; Dubey et al., 1996), la oveja (Dubey & Lindsay, 1990), el caballo (Lindsay et al., 1996b), el búfalo de agua (Dubey et al., 1998b; Huong et al., 1998; Guarino et al., 2000), el camello (Hilali et al., 1998), la liebre parda europea (Ezio et al., 2003) y en alpacas y llamas (Serrano-Martínez et al., aceptado). En animales silvestres, la infección ha sido detectada en el ciervo (Woods et al., 1994; Dubey et al., 1996), el antílope (Peters et al., 2001b), el mapache (Lindsay et al., 2001b), el coyote (Lindsay et al., 1996a), el zorro (Jakubek et al., 2001; Schares et al., 2001; Almería et al., 2002), el dingo (Barber et al., 1997), diversos 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, 1990a), la rata (Lindsay & Dubey, 1990c), el gerbo (Dubey & Lindsay, 2000), el gato (Dubey & Lindsay, 1989a, b), el perro (Dubey & Lindsay, 1989c), el coyote (Lindsay et al., 1996a), el zorro (Scharés et al., 2002b), la vaca (Dubey et al., 1992; Barr et al., 1994a; Ho et al., 1997b; Andrianarivo et al., 2000, 2001; Innes et al., 2000, 2001; Macaldowie et al., 2002; Williams et al., 2000, 2003; Almería et al., 2003; Maley et al., 2003), la oveja (McAllister et al., 1996a; Buxton, 1998; Buxton et al., 1998; Buxton et al., 2001; O'Handley et al., 2002), la cabra (Lindsay et al., 1995a), el cerdo (Jensen et al., 1998), el macaco (Barr et al., 1994b; Ho et al., 1997a), y en diversas especies de aves (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 es del todo conocida.

El hospedador definitivo de *N. caninum* se descubrió en 1998; McAllister et al. (1998) identificaron ooquistes en heces de perros a los que se les habían administrado por vía oral cerebros de ratones infectados con el parásito. Los ooquistes se eliminaban sin esporular y esporulaban en el medio ambiente a las 24 h (Lindsay et al., 1999a). Posteriormente, Lindsay et al. (2001a) confirmaron la eliminación de ooquistes en perros que habían sido alimentados con tejido que contenía quistes tisulares procedentes de ratones. De esta manera se demostró que el perro, además de ser hospedador intermediario, actuaría como el hospedador definitivo en el ciclo biológico. Recientemente se ha logrado la transmisión cíclica de *N. caninum* entre perros y terneros (Gondim et al.,

2002). Sin embargo, muchos otros aspectos de este ciclo como los estados enteroepiteliales del parásito antes de la formación del ooquiste, la excrección de ooquistes después de la ingestión de ooquistes esporulados o el papel de los carnívoros silvestres como hospedadores definitivos se desconocen.

En el caso de los hospedadores intermediarios, éstos se infectarían por vía transplacentaria o por transmisión horizontal mediante la ingestión de comida o agua contaminada con ooquistes de *N. caninum* o placentas infectadas (Dubey, 2003) (Figura 2). Los taquizoítos y quistes tisulares con bradizoítos, son las fases asexuales de *N. caninum* que se encuentran en el hospedador intermediario. Los taquizoítos son los responsables de la fase aguda, multiplicándose intracelularmente por endodiogenia en muchos tipos de células, incluyendo macrófagos, neutrófilos, células neuronales, hepatocitos, fibroblastos, miocitos, células endoteliales de los vasos sanguíneos y epiteliales del riñón (Dubey et al., 1988b; Bjerkas & Presthus, 1989; Speer & Dubey, 1989; Hemphill, 1999). En la fase crónica, los taquizoítos se diferencian en bradizoítos formando los quistes tisulares, localizándose principalmente en el tejido nervioso (Dubey et al., 1988b; Barr et al., 1992; Kobayashi et al., 2001). Sin embargo, recientemente, se ha detectado un quiste en el tejido muscular esquelético de un perro y de una vaca con infecciones naturales (Peters et al., 2001a). Los bradizoítos en el interior del quiste tisular conservan su capacidad infectante durante períodos de tiempo prolongados (al menos 1 año en cerebro de ratones con infección experimental), (Lindsay & Dubey, 1990b) y pueden sobrevivir hasta 14 días a 4°C, pero no son infectivos después 1 día a -20°C (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.

**Figura 2.** Ciclo biológico de *N. caninum*.

### 1.2.6. Cultivo *in vitro*

Los taquizoítos de *N. caninum* pueden ser cultivados en muchas líneas celulares tanto primarias como estables. Se mantienen mediante pases en cultivo celular indefinidamente sin pérdida aparente de su infectividad para el ratón, conservando su capacidad de multiplicación en cultivo celular tras su almacenamiento en nitrógeno líquido (Dubey et al., 2002a; Pérez-Zaballos et al., 2002). El cultivo *in vitro* de los taquizoítos ha permitido el estudio de las características ultraestructurales del parásito y los mecanismos de adhesión e invasión celular (Hemphill, 1999), manipulación genética (Beckers et al., 1997; Howe et al., 1997; Howe & Sibley, 1997) y la realización de ensayos

de eficacia farmacológica (Lindsay & Dubey, 1989a; Lindsay et al., 1994; Lindsay et al., 1996c, 1997). El cultivo celular también se ha empleado como fuente de taquizoítos para su uso como antígeno en el desarrollo de pruebas diagnósticas y en el estudio de la conversión taquizoíto-bradizoíto y producción *in vitro* de bradizoítos. Weiss et al. (1999) describieron la formación de quistes tisulares con bradizoítos *in vitro*, aunque con bajo rendimiento. Posteriormente, se ha estudiado el comportamiento del parásito en un cultivo primario de tejido nervioso de ratón (Vonlaufen et al., 2002a) y se ha descrito una mayor tasa de conversión a bradizoítos utilizando tratamientos estresantes en queratinocitos (Vonlaufen et al., 2002b) y en la línea celular Marc-145 (Risco-Castillo et al., enviado). En otras investigaciones empleando otros tipos celulares (macrófagos bovinos, fibroblastos y astrocitos) no se han obtenidos resultados satisfactorios (Tunev et al., 2002).

### **1.3. EPIDEMIOLOGÍA**

#### **1.3.1. Prevalencia y distribución geográfica**

##### **1.3.1.1. Bovinos adultos**

Los datos que se conocen sobre la prevalencia de la infección por *N. caninum* en el ganado bovino proceden principalmente de estudios serológicos. Los valores de seroprevalencia obtenidos son muy variados y muchas veces de difícil comparación. Se observan diferencias en la prevalencia en función del país, región, técnica diagnóstica, punto de corte, tamaño de muestra seleccionado y características del muestreo (ganado de leche o carne, explotaciones con o sin antecedentes de patología abortiva). Se ha observado que las tasas de seropositividad encontradas en explotaciones con causística de aborto son más elevadas que las observadas en aquellas sin problemas de este tipo. Como ejemplo valga comentar que los valores de seroprevalencia obtenidos por ELISA en animales de diferentes grupos de riesgo fueron: 22,1% en 1196 vacas procedentes de 28 explotaciones con antecedentes de aborto por *N. caninum*; 9,2% en 1224 vacas de 31 explotaciones sin aborto; 10,5% de 3162 vacas de 28 explotaciones con índice de aborto bajo; y un 11,2% en 1704 vacas sacrificadas en matadero (Dubey, 2003).

Los primeros datos de seroprevalencia de la infección por *N. caninum* en el ganado bovino se obtuvieron en 1994 en Escocia (Trees et al., 1994). Actualmente, existen numerosos estudios serológicos y la infección se ha descrito en casi todas las partes del mundo, obteniéndose tasas de prevalencia de rebaño e individual elevadas, tanto en ganado de aptitud láctea como cárnica (Dubey & Lindsay, 1996; Dubey, 2003). La Tabla 4 muestra una selección de estudios de seroprevalencia individual en el ganado bovino de aptitud lechera más actuales, sin embargo, hay que resaltar que los datos proporcionados no son comparables debido a la heterogeneidad de las poblaciones estudiadas según se ha manifestado en el párrafo anterior.

**Tabla 4.** Seroprevalencia individual de la infección por *N. caninum* en el ganado bovino de aptitud lechera.

PAÍS	Nº DE ANIMALES	PREVALENCIA (%)	TÉCNICA DIAGNÓSTICA <sup>a</sup>	REFERENCIAS
Alemania	1357	6,8	ELISA	Weber et al., 2000
Argentina	1048	16,6	IFI	Moore et al., 2002
Bélgica	70	29	IFI	De Meerschman et al., 2000
Brasil	447	14	IFI	Gondim et al., 1999
	172	34,8	ELISA	Locatelli-Dittrich et al., 2001
	223	11,2	IFI	Corbellini et al., 2002
Canadá	2037	21,9	ELISA	Bergeron et al., 2000
	3412	7,0	ELISA	Cramer et al., 2002
	3702	12,1	ELISA	Hobson et al., 2002
	3162	10,5	ELISA	Hobson et al., 2002
Corea	492	23	ELISA	Bae et al., 2000
Costa Rica	3002	39,7	ELISA	Romero et al., 2002
Dinamarca	1561	22,0	ELISA, IFI	Jensen et al., 1999
EE.UU.	1029	28,0	IFI	Dyer et al., 2000
España	889	30,6	ELISA	Mainar-Jaime et al., 1999
	1121	36,8	ELISA	Quintanilla-Gozaló et al., 1999
Francia	1924	5,6	ELISA	Ould-Amrouche et al., 1999
	1170	11,1	ELISA	Pitel et al., 2001b
	2141	17,0	ELISA	Pitel et al., 2001b
Holanda	2430	39,4	ELISA	Dijkstra et al., 2001a
Italia	5912	24,4	IFI	Magnino et al., 1999
Malasia	100	9	IFI	Cheah et al., 2002
Méjico	187	59,0	ELISA	García-Vazquez et al., 2002
Nueva Zelanda	880	7,6	IFI	Reichel, 1998
Paraguay	297	35,7	ELISA	Osawa et al., 2002
Polonia	45	15,6	ELISA	Cabaj et al., 2000
Portugal	119	49	ELISA	Thompson et al., 2001
Reino Unido	4295	17,0	ELISA	Davison et al., 1999d
República Checa	463	3,9	ELISA, IFI	Václavěk et al., 2003
Rusia	391	9,9	ELISA	Conraths et al., 2000
Tailandia	904	6,0	IFI	Suteeraparp et al., 1999
Taiwán	613	44,9	IFI	Ooi et al., 2000
Suiza	1689	11,5	ELISA	Gottstein et al., 1998
Vietnam	200	5,5	ELISA	Huog et al., 1998

<sup>a</sup>Técnica diagnóstica: ELISA: análisis inmunoenzimático; IFI: inmunofluorescencia indirecta

Por el contrario, en los bovinos de carne, los datos sobre la prevalencia de la neosporosis son muy escasos (Tabla 5).

**Tabla 5.** Seroprevalencia individual de la infección por *N. caninum* en el ganado bovino de aptitud cárnica.

PAÍS	Nº DE ANIMALES	PREVALENCIA (%)	TÉCNICA DIAGNÓSTICA <sup>a</sup>	REFERENCIAS
Argentina	400	4,7	IFI	Moore et al., 2002
Bélgica	93	14	IFI	De Meerschman et al., 2000
Canadá	1806	9,0	ELISA	Waldner et al., 1999
Corea	438	4,1	IFI	Kim et al., 2002b
EE.UU.	2585	23	ELISA	Sanderson et al., 2000
	1009	12,9	DAT	Barling et al., 2000
España	1712	17,9	ELISA	Quintanilla-Gozalo et al., 1999
Francia	219	4,1	ELISA	Klein et al., 1997
Paraguay	582	26,6	ELISA	Osawa et al., 2000

<sup>a</sup>Técnica diagnóstica: ELISA: análisis inmunoenzimático; IFI: inmunofluorescencia indirecta; DAT: inmunoaglutinación directa

En España, los estudios de seroprevalencia en el ganado bovino se han llevado a cabo principalmente en la zona noroeste del país. La primera vez que se detectaron anticuerpos anti-*N. caninum* fue en una explotación de leche con problemas de aborto en la provincia de Lugo. La seroprevalencia intra-rebaño observada fue del 23,4% (19/81) y la seropositividad fue significativamente más frecuente en el grupo de animales con problema de aborto (72,7% frente al 15,7%) (Quintanilla-Gozalo et al., 1996). Posteriormente, en 1997, la infección por *N. caninum* se diagnosticó en el 39,3% de los animales pertenecientes a 6 rebaños lecheros con antecedente de aborto (4 en Lugo y 2 en León) y la seroprevalencia intra-rebaño osciló entre el 23,4 y el 56,3% (Quintanilla-Gozalo et al., 1997). En Aragón, en dos explotaciones lecheras, las tasas de seropositividad intra-rebaño estuvieron comprendidas entre el 14,6 y el 18,9%, (Cebrián et al., 1998). Posteriormente, en un estudio epidemiológico realizado en la provincia de León, se observó que el 55,1% (119/216) de los rebaños de carne y el 83,2% (119/143) de los de leche tenían algún animal seropositivo con una seroprevalencia individual del 17,9% (306/1712) en el vacuno de carne y del 35,9% (402/1121) en los animales de aptitud lechera (Quintanilla-Gozalo et al., 1999). 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).

### 1.3.1.2. Fetos bovinos abortados

Desde los primeros estudios que relacionaron la infección del ganado bovino por *N. caninum* con el aborto (Thilsted & Dubey, 1989; Barr et al., 1990; Barr et al., 1991a), se han llevado a cabo numerosas investigaciones conducentes a esclarecer la importancia de esta infección sobre el área reproductiva. La neosporosis está considerada como una de las causas principales de aborto bovino en muchos países, atribuyéndosele entre el 2,7 y 42,5% de los abortos (Dubey & Lindsay, 1996). Se ha observado que las tasas de prevalencia en fetos abortados son más elevadas en las explotaciones con antecedentes de neosporosis que en aquellas con problemas abortivos de etiología desconocida, encontrándose una asociación clara entre la seropositividad del rebaño y la presencia de abortos debidos a la infección (Paré et al., 1997; Davison et al., 1999a; Jensen et al., 1999; Mainar-Jaime et al., 1999; Stenlund et al., 1999; Sager et al., 2001).

Al igual que en los bovinos adultos, los resultados obtenidos varían en función del país, del origen de los fetos (fetos procedentes de estudios epidemiológicos, de explotaciones con o sin antecedente de aborto o remitidos para diagnóstico) y la metodología diagnóstica aplicada, por lo que los datos que se obtienen son de difícil comparación (Tabla 6). Una de las tasas de prevalencia más elevadas se ha observado en un brote epidémico de aborto en el que se diagnosticó la infección por *N. caninum* en un 77% de 226 fetos procedentes de 50 explotaciones (Wouda et al., 1999a) y la más baja correspondió a un estudio realizado en Sudáfrica con un 1,4% (Jardine & Wells, 1995). En Europa, los estudios más recientes demuestran porcentajes de un 21-29% en Suiza (Gottstein et al., 1998; Sager et al., 2001), un 21% en Francia (Pitel et al., 2001a) y un 12,6% en Alemania (Sönger et al., 2001). En Inglaterra y País de Gales, Trees et al. (1999) estimaron que *N. caninum* puede ser el responsable del 12,5% de los 6.000 abortos bovinos que tienen lugar anualmente. En España, los datos obtenidos sitúan a *N. caninum* como el principal agente de naturaleza transmisible implicado en la producción de aborto. En Aragón, la infección se identificó en el 44% (17/39) de los fetos remitidos para diagnóstico (Barberán et al., 1998). En la zona norte, las tasas de participación estuvieron entre el 32%

y el 57% (González et al., 1999) y en otro estudio realizado sobre un total de 80 fetos procedentes de la zona norte y centro de España, la tasa de infección fetal osciló entre el 10,7 y el 38,8%, en dependencia de la técnica diagnóstica utilizada (Pereira-Bueno et al., 2003).

**Tabla 6.** Prevalencia de la infección por *N. caninum* en fetos bovinos abortados (estudios más recientes).

PAÍS	PREVALENCIA (%)	TÉCNICA DIAGNÓSTICA <sup>a</sup>	REFERENCIA
Alemania	12,6 (17/135)	H/IHQ	Söndgen et al., 2001
	21,6 (30/139)	PCR	
	13 (18/138)	WB	
Argentina	24,4 (20/82)	IFI	Venturini et al., 1999
	22,8 (43/188)	H	Moore et al., 2002
	7,3 (26/354)	IHQ	Campero et al., 2003
Bélgica	8 (17/224)	H	De Meerschman et al., 2002
Brasil	47,8 (22/46)	H	Corbellini et al., 2002
Corea	21,1 (45/180)	H/PCR/IFI	Kim et al., 2002a
EE.UU.	5 (34/688)	IHQ	Hattel et al., 1998
España	44,4 (36/81)	H	González et al., 1999
	50,8 (32/63)	IFI	
	31,3 (25/80)	H	
	53,8 (7/13)*	IHQ	
	10,7 (6/56)	IFI/ELISA	
	15,3 (9/59)	PCR	
Francia	21,2 (22/104)	PCR	Pitel et al., 2001a
Holanda	17 (349/2053)	H	Wouda et al., 1997a
Méjico	49 (73/211)	H	Morales et al., 2001a
	77 (41/73)*	IHQ	
Portugal	13,3 (2/15)	IHQ	Thompson et al., 2001
Suiza	29 (24/83)	PCR	Gottstein et al., 1998
	20,6 (50/242)	PCR	

<sup>a</sup>Técnica diagnóstica: H: histología; IHQ: inmunohistoquímica; IFI: Inmunofluorescencia indirecta; ELISA: análisis inmunoenzimático; PCR: Reacción en cadena de la polimerasa; WB: western-blot.

\*La IHQ se aplicó en los fetos con lesiones compatibles con *N. caninum*

### 1.3.2. Transmisión

#### 1.3.2.1. Transmisión vertical

La transmisión vertical transplacentaria es el principal modo de infección en el ganado bovino y parece jugar un papel relevante en la propagación y mantenimiento de la enfermedad (Björkman et al., 1996; Paré et al., 1996; Anderson et al., 1997; Schares et al., 1998). La ausencia de variaciones en las tasas de prevalencia entre los distintos grupos de edad en un rebaño y la detección de anticuerpos precalostrales frente a *N. caninum* en el suero de terneros nacidos de vacas seropositivas, indican la presencia de la infección congénita y la importancia relativamente escasa de la transmisión postnatal (Davison et al., 1999b; Hietala & Thurmond, 1999). 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, con porcentajes que oscilan entre el 50% y el 95% (Paré et al., 1996; Schares et al., 1998; Wouda et al., 1998a; Davison et al., 1999b; Pereira-Bueno et al., 2000). La transmisión vertical transplacentaria se produce tanto en animales en los que no se observa patología abortiva, como en aquellos que han abortado (Dubey & Lindsay, 1996).

La transmisión del parásito de la madre al ternero por el calostro o la leche puede ocurrir, aunque hasta ahora sólo se ha demostrado experimentalmente y no se considera importante desde un punto de vista epidemiológico (Uggla et al., 1998; Davison et al., 2001). En lo que se refiere a la transmisión de la infección por transferencia de embriones; en un estudio reciente, la infección por *N. caninum* no se detectó en ninguno de los 70 fetos o terneros nacidos de vacas seronegativas, las cuales habían recibido embriones de vacas seropositivas, mientras que 5 de 6 terneros procedentes de embriones transferidos de madres seronegativas a seropositivas, estuvieron infectados por el parásito (Baillargeon et al., 2001). Landman et al. (2002) confirmaron este hecho y expusieron que la transferencia comercial de embriones, previene la transmisión del parásito cuando ésta se realiza de vacas seropositivas a receptoras seronegativas. Igualmente, los embriones bovinos preimplantados parecen ser resistentes a la invasión por *N. caninum* durante esta fase del desarrollo (Bielanski et al., 2002).

### 1.3.2.2. Transmisión horizontal

A pesar de que la transmisión vertical es el modo de infección más importante en el ganado bovino, la transmisión horizontal también puede tener lugar. Hasta el momento no existen evidencias de diseminación horizontal entre las vacas aunque se ha sugerido que la ingestión de placentas infectadas podría ser una posible forma de infección (Modry et al., 2001). Anderson et al. (1997), demostraron que vacas seronegativas alojadas con seropositivas permanecían negativas (al igual que su progenie), mientras que las vacas seropositivas tuvieron terneros congénitamente infectados. Por su parte, la infección no fue detectada en el ganado bovino alimentado con placentas infectadas (Davison et al., 2001). La infección por transmisión horizontal del ganado bovino adulto posiblemente tendría lugar por la ruta orofecal, el hospedador definitivo eliminaría pequeñas cantidades de ooquistes (McAllister et al., 1998; Dubey, 1999b) que contaminarían el medio (pastos, forrajes, agua de bebida y piensos almacenados). Se ha demostrado experimentalmente que los ooquistes son infectantes cuando se administran por vía oral a terneros (De Marez et al., 1999; Gondim et al., 2001) y a vacas gestantes (Trees et al., 2002). Existen evidencias seroepidemiológicas que apoyarían la teoría de la infección postnatal, como la presencia de seroconversión en el rebaño junto con la falta de asociación entre los resultados positivos de la serología materna y de su progenie (Paré et al., 1996; Davison et al., 1999b; Hietala & Thurmond, 1999; Dijkstra et al., 2001a, 2002a).

La infección postnatal en el perro puede tener lugar por ingestión de tejidos de bovinos infectados (fetos abortados, placentas y restos de animales muertos), calostro o leche de origen bovino contaminados con taquizoítos de *N. caninum* (Dijkstra et al., 2002c). La infección, probablemente, causaría la eliminación de los ooquistes en las heces del perro, sin embargo, este hecho no se ha observado en perros alimentados con fetos naturalmente infectados (Bergeron et al., 2001b) o calostro contaminado con taquizoítos de cultivo celular (Dijkstra et al., 2001b). Diversos autores han señalado la presencia de *N. caninum* en la placenta (Shivaprasad et al., 1989; Bergeron et al., 2001a) demostrándose la eliminación de ooquistes en las heces de perros alimentados con placentas de vacas seropositivas (Dijkstra et al., 2001b). Por otra parte la cantidad de ooquistes eliminada por los perros después de la ingestión de cerebros de origen murino es baja, describiéndose un mayor número si los perros son alimentados con tejidos de terneros

experimentalmente infectados (Gondim et al., 2002). Por otra parte, en el 51% de 300 perros alimentados con carne cruda de origen bovino, se han encontrado anticuerpos anti-*N. caninum* (Trees & Williams, 2000). La presencia de ooquistes en perros naturalmente infectados se ha referido en contadas ocasiones (Basso et al., 2001; Slapeta et al., 2002; McGarry et al., 2003) y apenas se conoce la frecuencia de eliminación. En este sentido, la administración de placentas infectadas a perros en diferentes días no dio lugar a la excreción repetida de ooquistes (Dijkstra et al., 2001b). No obstante, McGarry et al. (2003) han observado en un perro naturalmente infectado la eliminación de ooquistes en más de una ocasión. En lo que concierne al papel de los carnívoros silvestres como hospedadores definitivos, hasta el momento no se logrado la detección del parásito en las heces aunque se han demostrado anticuerpos anti-*N. caninum* en el zorro (Schaes et al., 2001; Almería et al., 2002), el coyote (Lindsay et al., 1996b) y el dingo (Barber et al., 1997), pero son necesarios más estudios para determinar la importancia real de estos animales en la transmisión de la neosporosis.

La transmisión venérea del parásito podría ser posible, ya que recientemente se ha descrito la presencia esporádica de ADN de *N. caninum* tanto en semen fresco como congelado, procedente de sementales bovinos con infección natural crónica (Ortega-Mora et al., 2003). Por el momento se desconocen las implicaciones de esta posible vía de transmisión en la epidemiología de la neosporosis bovina.

### **1.3.3. Características epidemiológicas del aborto por neosporosis**

En los rebaños infectados por *N. caninum*, los abortos pueden presentarse de forma esporádica, endémica o epidémica (Davison et al., 1999d). La forma esporádica es poco frecuente y ocurre en rebaños dónde la tasa de aborto es baja y los abortos se producen a intervalos irregulares. Los abortos con presentación epidémica, con una elevada tasa anual de abortos localizada en un corto periodo de tiempo, se han descrito en diversos estudios (Thornon et al., 1994; Yaeger et al., 1994; McAllister et al., 1996b, 2000; Moen et al., 1998; Wouda et al., 1999a; Jenkins et al., 2000; Schares et al., 2002a). En uno de los brotes, más del 33% de los animales abortaron en un intervalo de pocos meses (Thornon et al., 1994). Moen et al. (1998) describieron también un episodio de aborto por neosporosis en 4 explotaciones en un período de tiempo de 3 semanas y con presencia de fetos

momificados. El patrón de aborto epidémico se ha asociado con una infección reciente y la transmisión postnatal del parásito, evidenciado por la falta de asociación entre la seropositividad de las madres y la descendencia y la presencia de IgG anti-*N. caninum* de baja avidéz en los animales abortados (Thurmond et al., 1997a; Wouda et al., 1999a; McAllister et al., 2000; Schares et al., 2002a; Crawshaw et al., 2003). Recientemente en un rebaño con aborto epidémico, se han detectado anticuerpos de alta avidéz en algunos animales que no abortaron. Este hecho se ha relacionado con la presencia de animales crónicamente infectados antes de la introducción de la nueva infección y con una protección parcial frente a la reinfección (McAllister et al., 2000; Schares et al., 2002a). En algunos estudios se ha sugerido que los brotes de aborto pueden producirse por la actuación de factores inmunodepresores que causen recrudescencia de la infección en un alto número de animales crónicamente infectados, ya que en algunos rebaños no se encontraron diferencias en la seroprevalencia entre los distintos grupos de edad (Schaes et al., 1998; Wouda et al., 1999a; Atkinson et al., 2000; Dijkstra et al., 2001a). En los brotes epidémicos de aborto debidos a *N. caninum*, se han descrito una seroconversión en una proporción elevada del rebaño, seroprevalencias altas y una asociación muy significativa entre la seropositividad de la madre y el aborto (Moen et al., 1998; Wouda et al., 1999a; Dijkstra et al., 2001a). Por otra parte, las vacas afectadas abortan con cualquier edad y estado de gestación, describiéndose abortos desde los 3 hasta los 8 meses de gestación (Thornton et al., 1994; Yaeger et al., 1994; McAllister et al., 1996b; Thurmond et al., 1997a), aunque la edad gestacional media de los fetos abortados suele estar comprendida entre el quinto y sexto mes (Thilsted et al., 1989; Anderson et al., 1991; Thornton et al., 1994; Moen et al., 1998; Wouda et al., 1999a).

En los rebaños infectados por *N. caninum* que presentan un patrón de abortos endémico, la tasa anual de abortos es elevada y los abortos persisten durante periodos de tiempo prolongados (Anderson et al., 2000). En investigaciones realizadas en dos granjas de leche de California, la tasa anual de abortos atribuidos a neosporosis se estimó en un 10,6-17,3% (Thurmond et al., 1997a). El patrón endémico es la forma más frecuente de presentación de los abortos causados por neosporosis y se presenta en rebaños dónde el parásito se transmite, principalmente, de modo vertical entre generaciones sucesivas. Como ya se ha mencionado, la infección vertical es el principal modo de transmisión de *N. caninum* (Paré et al., 1996; Anderson et al., 1997; Schares et al., 1998; Davison et al.,

1999b) y tiene una eficiencia del 50 al 95% (Paré et al., 1996; Schares et al., 1998; Wouda et al., 1998a; Davison et al., 1999b; Pereira-Bueno et al., 2000). Las madres congénitamente infectadas permanecen en este estado de por vida y tienen hasta 7,4 veces más probabilidades de abortar que una vaca no infectada (Thurmond & Hietala, 1997a; Moen et al., 1998). En los rebaños con aborto endémico, se ha observado una correlación clara entre la seropositividad de las madres y la progenie con una distribución de los animales seropositivos igual en los diferentes grupos de edad (Dijkstra et al., 2001a; Schares et al., 2002a). A su vez en este tipo de rebaños se han detectado anticuerpos de alta afinidad (Schaes et al., 2002a), lo cual evidencia la existencia de una infección crónica.

#### **1.3.4. Factores de riesgo**

Existe poca información sobre los factores de riesgo que pueden estar asociados a la presencia y diseminación de la neosporosis bovina. De entre ellos se ha realizado, como veremos a continuación, una selección de los más estudiados y representativos.

##### **1.3.4.1. Aptitud del rebaño, sistema de manejo y tipo de reposición**

La aptitud del animal y el sistema de manejo pueden ser uno de los factores de riesgo que pueden influir en una mayor posibilidad de transmisión. En granjas de aptitud lechera se han observado tasas de infección más altas que en las de tipo cárnica (Anderson et al., 1991; Paré et al., 1996; Quintanilla-Gozalo et al., 1999; Wouda et al., 1999a). Este hecho podría estar relacionado con el tipo de manejo del ganado y no con una predisposición racial tal y como se ha señalado (Thornton et al., 1991; Paré et al., 1998). El sistema de manejo en las explotaciones de leche normalmente es intensivo, mientras que en las de carne es más frecuente el extensivo, por tanto el hacinamiento de los animales podría contribuir a una mayor exposición a posibles fuentes contaminadas con ooquistes (alimento, agua, cama, etc.), facilitando las posibilidades de contagio (Dijkstra et al., 2002b). 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 y una mayor densidad de animales durante la estabulación invernal, sin embargo, también se han observado brotes de aborto causados por el parásito en explotaciones en régimen extensivo (Campero et al., 1998; Moen et al., 1998). Por otro lado, la presencia de perros es más

frecuente en explotaciones lecheras y el acceso de éstos al material infectivo de origen bovino (placentas, fetos abortados, calostro, etc) estaría favorecida en las explotaciones con régimen intensivo. No obstante, en las explotaciones cárnicas extensivas el riesgo de exposición a la infección también podría ser alto por la presencia de carnívoros silvestres (Barling et al., 2000b).

Una vez presente la infección en el rebaño, el factor de riesgo quizá más importante para su mantenimiento es el tipo de reposición, ya que como se ha expuesto anteriormente, la principal vía de transmisión es la transplacentaria, por lo que la infección pasaría de madres a hijas y así sucesivamente, existiendo una tasa de infección congénita elevada (Schaes et al., 1998). Por otro lado, la adquisición de animales de reposición podría suponer también un riesgo adicional si no se realiza un control sanitario adecuado (Thornton et al., 1991; Mainar-Jaime et al., 1999).

#### **1.3.4.2. Presencia de carnívoros**

Aunque la importancia y significación epidemiológica del perro está todavía por determinar, es un factor de riesgo a tener en cuenta. En diversos estudios se ha señalado que la presencia de este carnívoro en las explotaciones es uno de los factores de riesgo más importante (Wouda et al., 1999b; Dijkstra et al., 2002b). Igualmente, se ha descrito una mayor seroprevalencia en perros de granja frente a los de zonas urbanas y una asociación significativa entre la presencia de perros en las granjas y el porcentaje de vacas seropositivas (Bartels et al., 1999; Wouda et al., 1999b; Sánchez et al., 2003). Recientemente, se han encontrado prevalencias mayores en aquellas explotaciones bovinas más próximas a zonas urbanizadas, lo cual es explicable por una mayor densidad de la población canina (Schaes et al., 2003). Asimismo, se ha observado una relación entre la seroprevalencia en el ganado bovino y la abundancia de zorros y coyotes (Barling et al., 2000).

La presentación epidémica de aborto por neosporosis se ha asociado con una posible exposición a los ooquistes del parásito (McAllister et al., 2000; Dijkstra et al., 2002c), de esta forma en aquellas explotaciones con evidencia de transmisión postnatal,

fue más frecuente la observación de defecaciones en zonas de almacenamiento de comida y el consumo de placentas, fetos abortados o calostro por el perro (Dijkstra et al., 2002c).

#### **1.3.4.3. Edad**

Teóricamente, se podrían diferenciar dos niveles de riesgo en el ganado bovino: el riesgo de infección y el riesgo de aborto. En relación con el riesgo de infección atribuible a la edad, es importante considerar el modo de transmisión del parásito. En estudios realizados en rebaños bovinos infectados endémicamente por *N. caninum*, se ha observado un patrón claro en los títulos de anticuerpos en relación con la edad, existiendo valores significativamente más elevados en los terneros precalostrales y calostrales que en las reproductoras (Anderson et al., 1995; Davison et al., 1999d; Pereira-Bueno et al., 2000). Este hecho es explicable por la existencia de una transmisión congénita reciente, junto con la reactivación de infecciones latentes durante la gestación y el paso de anticuerpos calostrales de la madre al ternero (Quintanilla-Gozalo et al., 2000). Por su parte, los terneros de 6 a 12 meses y las novillas presentan títulos inferiores a las vacas de más edad (Pereira-Bueno et al., 2000), con un claro retorno a la seropositividad a los 25 meses de edad en animales con infección congénita (Hietala & Thurmond, 1999), compatible con estímulos antigénicos al comienzo de la etapa reproductora. Asimismo, otros autores también han descrito un incremento de la seroprevalencia con la edad (Jensen et al., 1999). Estos hallazgos podrían explicarse gracias a la existencia de posibles factores fisiológicos o de manejo durante la gestación, capaces de producir reactivaciones de la infección crónica (Hietala & Thurmond, 1999; Quintanilla-Gozalo et al., 2000). Sin embargo, también podría ser debido al contacto con el agente etiológico proveniente de una fuente exógena y confirmaría la existencia de la transmisión horizontal.

Las diferencias encontradas en relación con el riesgo de aborto de los animales y la edad han sido poco sólidas o no significativas, señalando que la infección se ha diagnosticado en fetos abortados por vacas de edad muy variable (Dubey & Lindsay, 1996). No obstante, el modo de transmisión del parásito también parece influir en el riesgo de aborto en relación con la edad. En casos de abortos epidémicos (asociados con la transmisión horizontal) no se han observado diferencias significativas entre las tasas de aborto obtenidas en los diferentes grupos de edad de los animales abortados. Aún así,

parece que las vacas congénitamente infectadas tienen más probabilidad de abortar en su primera gestación (Thurmond & Hietala, 1997a). En otros estudios, también se ha observado que la proporción de infecciones congénitas disminuía según aumentaba el número de parto, posiblemente debido al desarrollo de una inmunidad protectora (Thurmond & Hietala, 1997a; Wouda et al., 1998a; Dijkstra et al., 2003).

#### **1.3.4.4. Antecedentes de aborto**

La infección por *N. caninum* es más frecuente en los rebaños con problemas de aborto que en las explotaciones sin antecedente de fallo reproductivo, observándose de este modo, tasas de seroprevalencia intra-rebaño más elevadas. Diferentes estudios han descrito una asociación significativa entre la presencia de la infección y el aborto, con un riesgo 2 a 3,5 veces superior en las vacas seropositivas que en las seronegativas (Paré et al., 1997; Wouda et al., 1998a; Davison et al., 1999a; Jensen et al., 1999; Mainar-Jaime et al., 1999; Stenlund et al., 1999). No obstante, el riesgo de aborto parece disminuir en las gestaciones siguientes a dicho acontecimiento y sólo el 4-5% de los animales abortan en más de una ocasión (Dubey & Lindsay, 1996; Anderson et al., 1995), produciéndose en la mayoría de las ocasiones el nacimiento de terneros congénitamente infectados.

#### **1.3.4.5. Infecciones concomitantes y factores inmunodepresores**

Otros agentes patógenos productores de aborto en el ganado bovino pueden coexistir con *N. caninum* provocando en esos casos que el aborto bovino sea un fenómeno multifactorial. En los fetos bovinos abortados con infección por *N. caninum* también se han detectado la presencia de otros agentes que pueden ser causa de muerte fetal. Se han identificado simultáneamente infecciones por *N. caninum* y el virus de la diarrea vírica bovina (VBVD) (Dubey et al., 1990; Nietfeld et al., 1992; Barr et al., 1994a; Caldow et al., 1996; Gottstein et al., 1998; Aduriz et al., 1999, 2001), BHV-4 (Nietfeld et al., 1992), *Salmonella dublin* (McNamee et al., 1996), *Leptospira hardjo* (Otter et al., 1995), *Bacillus licheniformis* (Otter et al., 1995; Caldow et al., 1996), *Actinomyces pyogenes* (Yaeger et al., 1994; Wouda et al., 1997a), *T. gondii* (Gottstein et al., 1998; Sager et al., 2001) y *Pasterella hemolitica* (Otter et al., 1995).

Asimismo, se ha sugerido que la inmunodepresión en el animal podría ocasionar la reactivación de la infección y el aborto o transmisión congénita. En este sentido, Björkman et al. (2000) sugieren que la infección por el VBVD originaría una inmunodepresión capaz de favorecer la acción de otros patógenos como *N. caninum*. Sin embargo, otros investigadores no han encontrado una asociación clara entre ambas infecciones (Gottstein et al., 1998; Bartels et al., 1999; Davison et al., 1999a; Mainar-Jaime et al., 2001; Hässing & Gottstein, 2002). Igualmente, la presencia de micotoxinas en el alimento, el estrés provocado por vacunaciones, las altas temperaturas y factores de la dieta entre otras causas, se han propuesto como factores inmunodepresores que podrían estar involucrados en el desencadenamiento de la enfermedad (Bartels et al., 1999; Thurmond et al., 1995b).

### **1.3.5. Impacto económico**

No existen datos concluyentes acerca de las pérdidas económicas debidas a la neosporosis bovina pero la importancia de este proceso en la industria ganadera está fuera de toda duda. En California y Holanda, el 20% de los abortos bovinos son causados por *N. caninum*; en Bélgica y Reino Unido alrededor del 12,5% (Davison et al., 1999a; De Meerschman et al., 2002); y en España las tasas de participación están entre el 10,7 y el 57%, en dependencia de la técnica diagnóstica utilizada (Barberán et al., 1998; González et al., 1999; Pereira-Bueno et al., 2003). En California se calculan pérdidas de 35 millones de dólares al año (Dubey, 1999a); en Nueva Zelanda y en Australia, donde la infección es responsable de aproximadamente el 25% de los abortos diagnosticados, se considera la causa más importante de pérdidas económicas, con un gasto de 100 millones de dólares australianos anuales (Reichel, 2000). En Canadá se estima que en una explotación de 50 animales, las pérdidas pueden llegar a ser de 2305 dólares canadienses por año (Chi et al., 2002).

Por otra parte, también se deben considerar los costes indirectos asociados al aborto tales como infertilidad, repetición de celo, asistencia veterinaria, gastos de diagnóstico, reposición, posibles pérdidas de producción de leche y compra de ganado en caso de sacrificio. Las pérdidas postnatales debidas a la neosporosis son difíciles de valorar, puesto que en los animales adultos, excluyendo el aborto, la infección es asintomática. En

el estudio realizado por Thurmond & Hietala (1996), se describió una clara asociación entre la probabilidad de sacrificio de las reproductoras seropositivas (1,6 veces) frente a las reproductoras seronegativas. No obstante, en un estudio reciente no se ha encontrado tal asociación (Cramer et al., 2002).

La infección por *N. caninum* también podría afectar a la producción láctea, sin embargo, los datos obtenidos son controvertidos. 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 otro estudio, la infección por *N. caninum* en una explotación en Florida causó el 3-4% de disminución en la producción láctea, ocasionando pérdidas de 128 dólares por vaca en lactación (Hernández et al., 2001). Por el contrario, también se ha señalado un aumento en la producción de leche en vacas seropositivas (Pfeiffer et al., 2002). Hobson et al. (2002) han sugerido que la presencia del aborto es el factor que afecta a la producción láctea y no la seropositividad del animal. En este estudio realizado en 6864 vacas en producción láctea procedentes de 140 granjas en los EE.UU., se ha observado que los animales seropositivos procedentes de explotaciones con problemas de aborto produjeron menos leche que los seronegativos, sin embargo, en las granjas sin problemas de aborto, la cantidad de leche fue la misma en las vacas seropositivas y seronegativas.

En el sector cárnico, las pérdidas económicas debidas a *N. caninum* son menos conocidas debido a la dificultad de cuantificación, sin embargo se ha observado una asociación negativa entre la ganancia de peso y la presencia de anticuerpos anti-*N. caninum* con pérdidas de 15,6 dólares americanos por vaca (Barling et al., 2000a, 2001).

#### **1.4. PATOGENIA**

La neosporosis bovina tiene una patogenia compleja en la que influyen múltiples factores dependientes del hospedador y del parásito. Los diferentes estudios realizados se han llevado a cabo tanto en infecciones naturales y experimentales en la especie bovina como en modelos murinos experimentales. A pesar de que en los últimos años se ha avanzado de forma considerable en su conocimiento, diversos aspectos permanecen todavía sin dilucidar.

### **1.4.1. Infección aguda**

Los taquizoítos son las formas de multiplicación rápida del parásito y los responsables de la fase aguda de la infección. Se multiplican intracelularmente por endodiogenia en muchos tipos de células, mostrando mayor tropismo por las del Sistema Nervioso Central (SNC), de la placenta, células musculares esqueléticas y cardíacas y células endoteliales (Dubey & Lindsay, 1996). La patogénesis de la neosporosis depende del equilibrio entre la capacidad del taquizoíto para penetrar y multiplicarse en las células y la habilidad del hospedador para inhibir la proliferación del parásito. La multiplicación intracelular del parásito causa la destrucción tisular y la aparición de focos de necrosis. Como consecuencia de este daño, se produce una reacción inflamatoria, dando lugar a la infiltración del tejido lesionado con células inflamatorias, principalmente mononucleadas (Buxton et al., 2002).

En los bovinos adultos, el aborto es el único signo clínico observado en las hembras gestantes en la fase aguda de la infección. La muerte del feto podría producirse como consecuencia de las lesiones placentarias o fetales. Durante la parasitemia, los taquizoítos llegarían a la placenta causando la destrucción, necrosis e inflamación del tejido, tanto materno como fetal (Shivaprasad et al., 1989; Barr et al., 1994a; Maley et al., 2003 ). Una vez en la placenta, los taquizoítos colonizarían el feto, donde se ha observado la presencia de lesiones, principalmente en el cerebro, corazón e hígado y con menor frecuencia en los pulmones, riñones y membranas fetales (Dubey & Lindsay, 1996). En los terneros congénitamente infectados, las lesiones localizadas en los músculos y en el sistema nervioso serían las responsables de los síntomas neurológicos y neuromusculares observados ocasionalmente (Dubey et al., 1990a; Barr et al., 1991b; Dubey & Lathunda 1993; Bryan et al., 1994). En el animal adulto sólo se ha observado experimentalmente una respuesta febril y un aumento del tamaño de los ganglios linfáticos a los pocos días de la inoculación del parásito (Innes et al., 2001; Maley et al., 2001, 2003).

Los mecanismos de adhesión y penetración del parásito en la célula han sido ampliamente estudiados en *T. gondii*. En el caso de *N. caninum*, en los escasos estudios realizados sobre la invasión celular, se ha observado la implicación de una serie de receptores de superficie y proteínas del taquizoíto secretadas por los micronemas, las

roptrias y los gránulos densos. Durante la invasión celular, el taquizoíto se reorienta y su extremo apical contacta con el plasmalema de la célula. En este primer contacto están involucrados antígenos inmunodominantes de superficie, como el NcSRS2, por parte del parásito (Hemphill et al., 1996) y residuos de condroitín sulfato por parte de la superficie de la célula hospedadora (Naguleswaran et al., 2002, 2003). En la fase de penetración, el conoide emerge, la membrana de la célula comienza a invaginarse y se secretan a su interior una serie de enzimas proteolíticas como las de tipo aspartil (Naguleswaran et al., 2003), junto con proteínas de adhesión secretadas por los micronemas. Estas últimas ayudarían a formar una zona de unión móvil entre la membrana externa del parásito y el plasmalema de la célula, la cual se desplaza hacia la parte posterior del taquizoíto, impulsándolo al interior de la célula. De esta forma, el taquizoíto quedaría englobado en la vacuola parasitófora, formada conjuntamente por la célula hospedadora y el parásito (Buxton et al., 2002). En cultivo celular se ha observado que a los 45-60 minutos post-infección -PI-, finaliza la invasión celular y comienza la endodiogenia, apareciendo la primera generación de zoítos a las 8-10 horas PI (Hemphill et al., 1996; Sundermann & Estridge, 1999). A las 36 horas PI, se observan células infectadas con más de 10 taquizoítos incluídos 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 PI. El efecto citopático en los cultivos celulares en monocapa comienza a aparecer a los 3 días PI, y a los 4-6 días PI se observa la destrucción total de las células infectadas. La adhesión de los taquizoítos a las células Vero aumenta con un período de incubación corto (10 min) a 37°C (Naguleswaran et al., 2001, 2002, 2003) y se ha relacionado con la secreción de proteínas de micronemas como la NcMIC3 (Naguleswaran et al., 2001). Si los taquizoítos en el cultivo celular no penetran en la célula hospedadora, dejan de ser infectivos a las pocas horas PI (Hemphill et al., 1996). Por otra parte, la presencia de agentes como el interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) en el medio extracelular, pueden afectar a la adhesión e invasión celular ya que inhiben la multiplicación intracelular del parásito (Innes et al., 1995; Yamane et al., 2000).

#### **1.4.2. Infección crónica y reactivación**

Con el desarrollo de la inmunidad, los taquizoítos se transforman en bradizoítos (fase de multiplicación lenta) formando los quistes tisulares localizados en el SNC. Este estadio es el que se mantiene durante la fase crónica de la infección. Los quistes con bradizoítos no ocasionan una acción patógena destacada, por lo que el animal no desarrolla ninguna sintomatología. Sin embargo, los factores que provocan un estado de inmunodepresión en el animal podrían desencadenar la reactivación de la infección. En estos casos, los bradizoítos se liberarían de los quistes transformándose en taquizoítos y se desarrollaría de nuevo la fase aguda de la infección. Una de las posibles explicaciones de la reactivación durante la gestación, vendría dada por el efecto inhibitorio de la progesterona sobre la producción del óxido nítrico (NO), del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), la activación de las células asesinas (NK) y el estímulo de un tipo de respuesta celular Th2 (Quinn et al., 2002b). Esta situación tiene importantes repercusiones sobre la respuesta inmune del animal. En infecciones experimentales en vacas gestantes se ha observado al principio y al final de la gestación un aumento de la respuesta inmune celular y una disminución a mitad de la gestación, lo que podría favorecer la reactivación y multiplicación del parásito en este periodo (Williams et al., 2000; Innes et al., 2001). Este patrón podría relacionarse con el aumento de los niveles de progesterona producidos en las vacas desde el principio a la mitad de la gestión y una disminución en las últimas semanas (Pope et al., 1969). Recientemente, Kobayashi et al. (2002) estudiaron los efectos de tres hormonas esteroideas (progesterona, estradiol-17 $\beta$  y corticosterona) sobre la reactivación de la infección en un modelo murino, pero no observaron ningún cambio en cuanto a la distribución del parásito y las lesiones entre los grupos tratados y los testigos. Por su parte, Guy et al. (2001) midieron en el plasma diferentes parámetros hormonales en vacas gestantes persistentemente infectadas e intentaron relacionarlos con una posible reactivación de la infección y oscilaciones en la respuesta inmune, pero los resultados fueron infructuosos.

Los mecanismos por los cuales los taquizoítos se transforman en bradizoítos son poco conocidos y únicamente se han estudiado *in vitro*, mediante la aplicación de factores estresantes (pH alcalino, nitroprusiato sódico, condiciones sin CO<sub>2</sub>, etc.) (Weis et al., 1999; Vonlaufen et al., 2002b; Tunev et al., 2002; Risco-Castillo et al., enviado). Al igual que

ocurre en *T. gondii*, se ha señalado que el tipo de célula hospedadora y el aislado del parásito pueden ser factores importantes en relación con la capacidad cistogénica (McGuire et al., 1997b).

### **1.4.3. Patogenia del aborto y de la transmisión vertical en el ganado bovino**

Las consecuencias más importantes de la infección por *N. caninum* en el ganado bovino son el aborto y el nacimiento de terneros congénitamente infectados. La patogenia en las hembras gestantes es compleja y depende de múltiples factores todavía no muy bien conocidos. Cualquiera que sea el origen de la infección en la vaca tales como la reactivación de una infección persistente o la ingestión de ooquistes esporulados, es razonable asumir que dicho proceso originaría una parasitemia y la consiguiente invasión del feto por el parásito. No obstante, las consecuencias de la infección varían dependiendo del periodo de gestación en el que se produzca y, posiblemente, de la magnitud o duración de la parasitemia, de la eficacia de la respuesta inmune maternal y de las características del aislado infectante, si bien estos factores no se han definido claramente (Innes et al., 2000, 2002).

#### **1.4.3.1. Edad gestacional e inmunocompetencia del feto**

En relación con la edad gestacional e inmunocompetencia del feto, se ha observado que desempeñan un destacado papel en la patogenia de la neosporosis. Antes de los 100 días de gestación, el feto es incapaz de reconocer ningún patógeno; entre los días 100 y 150 comienza a desarrollar una respuesta inmune y después del día 150 el feto es progresivamente más inmunocompetente (Osburn, 1988; Buxton et al., 2002). Por tanto, debido a la inmadurez del sistema inmune, el feto es más vulnerable a la infección durante las fases tempranas de gestación produciéndose la muerte fetal. En el segundo tercio de gestación, el feto comienza a desarrollar su sistema inmunitario. Sin embargo, la mayoría de los abortos por neosporosis ocurren entre los meses quinto y séptimo de gestación, debido a que la respuesta inmune desarrollada es todavía rudimentaria e insuficiente para superar este proceso (González et al., 1999; Buxton et al., 2002) y la infección del feto durante el segundo tercio de gestación provoca su muerte o el nacimiento de animales congénitamente infectados. Según avanza la gestación, la

posibilidad de transmisión aumenta, consecuentemente, si la infección se produce en la última fase de la gestación ocurre el nacimiento de terneros congénitamente infectados (Buxton et al., 2002; Dubey, 2003).

Los resultados obtenidos tanto en infecciones naturales como experimentales, han demostrado que la edad gestacional determina el desenlace de la infección. En investigaciones realizadas en vacas con infección natural, Dannatt et al. (1995) y Paré et al. (1997) describieron un aumento en el título de anticuerpos en los meses 6-7,5 de gestación que podría estar relacionado con un mayor estímulo antigénico procedente de la multiplicación del parásito en el feto. Stenlund et al. (1999) estudiaron fluctuaciones de anticuerpos antes, durante y después del parto, observando también un aumento en el título de anticuerpos 4-5 meses antes del parto, que disminuían dos meses después. Por su parte, Quintanilla-Gozalo et al. (2000) y Pereira-Bueno et al. (2000) estudiaron las fluctuaciones de anticuerpos durante la gestación en 32 vacas seropositivas, de las cuales sólo abortaron 10. Se observó un incremento en el título de anticuerpos durante el segundo trimestre, más acusado en las vacas que abortaron, y durante el tercer tercio en las vacas que tuvieron terneros congénitamente infectados. Posteriormente, se han realizado observaciones similares; Guy et al. (2001) estudiaron la gestación de 9 vacas gestantes crónicamente infectadas. Los valores de anticuerpos observados alcanzaron niveles elevados, unos días antes de producirse la muerte fetal en las vacas que abortaron y entre las semanas 22 y 36 de gestación en las vacas que tuvieron terneros congénitamente infectados. Las vacas que parieron terneros no infectados, no tuvieron fluctuaciones de anticuerpos durante la gestación.

Por otra parte, los resultados obtenidos en infecciones experimentales han demostrado que en función del período de gestación en el que se realice la inoculación del parásito, puede producirse la muerte fetal, el nacimiento de terneros con transmisión congénita o bien el de terneros no infectados. El efecto de la infección antes del comienzo de la gestación ha sido poco estudiado y parece dar lugar al nacimiento de terneros no infectados (Williams et al., 2000; Innes et al., 2001). Sin embargo la infección durante la primera fase de la gestación suele producir la muerte fetal (Dubey et al., 1992; Barr et al., 1994a; Ho et al., 1997b; Macaldowie et al., 2002; Williams et al., 2000, 2003); como ejemplo valga comentar que la inoculación de 6 vacas con taquizoítos por vía intravenosa (i.v) en

el día 70 de gestación, causó la muerte de 5 fetos en la semana 13 (Williams et al., 2000). La inoculación de taquizoítos en el segundo tercio de gestación tiene consecuencias variables, produciéndose, en la mayoría de los casos, la infección del feto y no su muerte (Barr et al., 1994a; Innes et al., 2000, 2001; Andrianarivo et al., 2001; Almería et al., 2003; Maley et al., 2003). La inoculación en el último tercio ha dado lugar al nacimiento de terneros congénitamente infectados (Innes et al., 2000; Williams et al., 2000).

#### **1.4.3.2. Respuesta inmune de la madre**

Otra cuestión que permanece sin esclarecer es la influencia de la respuesta inmune maternal en relación con la presentación de la enfermedad. En infecciones naturales, se ha observado que en rebaños con abortos de carácter epidémico, las vacas con infección previa son más resistentes a la nueva infección que los animales que han adquirido recientemente la infección por vía horizontal. Este hecho se ha asociado con el desarrollo de una inmunidad protectora en los animales crónicamente infectados que previene frente al aborto después de una reinfección, posiblemente con ooquistes (McAllister et al., 2000; Schares et al., 2002a). En rebaños con neosporosis endémica, también se ha descrito que las vacas congénitamente infectadas tienen más posibilidades de abortar durante la primera gestación que en las sucesivas (Anderson et al., 1995; Dubey & Lindsay, 1996); no obstante el nacimiento de terneros congénitamente infectados se produce a lo largo de la vida productiva del animal y es independiente del número de parto (Björkman et al., 1996; Paré et al., 1996; Anderson et al., 1997; Schares et al., 1998). Recientemente, se ha descrito que la infección experimental de vacas antes de la gestación provoca el desarrollo de una inmunidad que protege de la transmisión vertical por una segunda inoculación del parásito a mitad de gestación (Innes et al., 2001). Asimismo, se ha visto que la inoculación sucesiva de taquizoítos en diferentes gestaciones sólo provoca la infección del feto en la primera inoculación (Ho et al., 1997b). Dichas observaciones están en contradicción con lo observado en las infecciones naturales, donde la transmisión vertical puede llegar a tener una eficiencia del 95% y es el principal modo de infección de *N. caninum* (Paré et al., 1996; Anderson et al., 1997; Schares et al., 1998; Davison et al., 1999a, b). Por el contrario, se ha demostrado experimentalmente que la inmunidad desarrollada en vacas naturalmente infectadas protege frente a una infección exógena (inoculación de taquizoítos) y el subsiguiente aborto. Sin embargo esta inmunidad no protege frente a una recrudescencia

de la infección crónica, produciéndose el aborto o el nacimiento de terneros congénitamente infectados (Williams et al., 2003). Estos estudios demuestran que la infección experimental con taquizoítos no reproduce plenamente el proceso de forma natural y subraya la necesidad de profundizar más en el conocimiento de la patogenia en los bovinos con infección natural.

#### **1.4.3.3. Aislado, vía de inoculación, estadio y dosis infectiva**

La inoculación de taquizoítos por vía parenteral es la forma de infección experimental más frecuente en el ganado bovino gestante, pero resulta difícil establecer una correlación entre los estudios realizados debido a la utilización de diferentes aislados, dosis y vías de inoculación del parásito. Los aislados y vías de inoculación más utilizados han sido taquizoítos de NC-1 inoculados por vía subcutánea (s.c.) a la altura del ganglio linfático prefemoral izquierdo (Innes et al., 2000, 2001; Maley et al., 2003), NC-Liv por vía intravenosa (Williams et al., 2000, 2003), NC-BPA1 administrado simultáneamente por vía i.v. e intramuscular -i.m.- (Barr et al., 1994a; Ho et al., 1997b; Andrianarivo et al., 2000, 2001) o NC-Illinois por vía i.v. (Almería et al., 2003). Las consecuencias de la infección pueden estar condicionadas a su vez por la virulencia del aislado, pero hasta la fecha, se desconoce la influencia de este factor. Las principales variaciones observadas en el curso de la infección experimental parecen estar relacionadas principalmente con la vía de inoculación. Ninguna de las vías utilizadas con mayor frecuencia se asemeja a la vía natural de la infección, no obstante, la que reproduce de forma más parecida lo que ocurre en la naturaleza es la vía i.v, ya que durante la infección natural se originaría una parasitemia y la consiguiente invasión del feto por el parásito. De esta forma, cuando se inocularon las vacas en el día 70 de gestación con el aislado NC-Liv se originó la muerte del feto (Williams et al., 2000, 2003), mientras que la inoculación con NC-1 por vía s.c. a la altura del ganglio linfático prefemoral izquierdo ocasionó el nacimiento de terneros no infectados (Innes et al., 2000). No obstante, Macaldowie et al. (2002) han logrado reproducir la infección con mortalidad y reabsorción fetal con el aislado NC-1 inoculado por vía intravenosa en el día 70 de gestación. Cuando se ha empleado el aislado NC-BPA1 por vía i.v./i.m. o NC-Illinois por vía i.v. se ha producido la muerte del feto o la transmisión vertical del parásito según la fase de gestación en la que haya efectuado la inoculación del organismo.

Las dosis que se han empleado en los bovinos son variables oscilando entre  $5 \times 10^6$  y  $5 \times 10^8$  taquizoítos (Dubey et al., 1992; Barr et al., 1994a; Innes et al., 2000, 2001; Williams et al., 2000, 2003; Andriananarivo et al., 2000, 2001; Macaldowie et al., 2002; Almería et al., 2003; Maley et al., 2003) y aunque las consecuencias parecen ser similares se ha observado que con la dosis más alta ( $5 \times 10^8$ ), se produce antes la invasión de la placenta y el SNC del feto así como lesiones más extensas que con la dosis menor ( $5 \times 10^6$ ) (Maley et al., 2003).

Hasta el momento, los conocimientos sobre la patogenia de la infección en vacas infectadas vía oral (v.o.) con ooquistes son escasos. Se ha demostrado experimentalmente que los ooquistes de perros son infectivos para el ganado bovino (De Marez et al., 1999; Gondim et al., 2002), pero la administración por v.o. de ooquistes a hembras gestantes en la semana 10 de gestación, no causó aborto ni la transmisión transplacentaria del parásito, aunque la infección se confirmó por el desarrollo de una respuesta inmune específica y la detección de ADN de *N. caninum* en el cerebro de las vacas (Trees et al., 2002). Los autores relacionaron la ausencia de infección en el feto con la dosis de ooquistes administrada (600 ooquistes) y su viabilidad.

#### **1.4.3.4. Causas de la muerte fetal**

Las causas que provocan la muerte del feto parecen ser multifactoriales y no se conocen con detalle. Dubey et al. (1990a) señalaron que la muerte del feto podría ser debida a una miocarditis. Si bien, otros autores han postulado que las lesiones en el SNC serían las principales responsables (Barr et al., 1990). Aun así, en muchas ocasiones no se han encontrado graves lesiones en los órganos vitales por lo que la muerte del feto parece depender también de otros factores. En este sentido, se ha sugerido la importancia de la respuesta inmune celular desarrollada por las hembras gestantes, principalmente durante el periodo inicial de gestación. En la gestación se produce un estado de inmunodepresión concretamente en la placenta, con el fin de evitar el rechazo del feto. Las citoquinas pro-inflamatorias del tipo Th1 (IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) que podrían provocar el rechazo del feto están inhibidas y predominan las de tipo Th2 como la IL-10 o el factor de crecimiento tumoral  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Esta situación beneficiaría la multiplicación del parásito y facilita la destrucción focal de la placenta, tanto materna como fetal, así como el desarrollo de una respuesta inflamatoria. A continuación, como consecuencia de la multiplicación del

parásito se desencadenaría una respuesta Th1 en la madre para controlar la replicación del patógeno, la cual puede ser letal para el feto (Buxton et al. 2002; Innes, 2002; Quinn et al., 2002b). Actualmente, no existe ningún trabajo en vacas gestantes que confirme esta hipótesis. Asimismo, se ha sugerido que la muerte fetal podría producirse directamente por la invasión del placentoma por el parásito y el consiguiente daño tisular, interrumpiéndose de esta forma el intercambio de oxígeno y nutrientes. En este sentido, se ha descrito la presencia de lesiones y del parásito en la placenta, tanto en vacas con infección natural (Shivaprasad et al., 1989; Thilsted & Dubey, 1989; Nietfeld et al., 1992; Boulton et al., 1995; Bergeron et al., 2001a) como experimental (Barr et al., 1994a; Innes et al., 2001). En un estudio reciente, Maley et al. (2003) señalan la importancia de la placenta en la patogenia de la infección y su capacidad para limitar o permitir la diseminación de la infección al feto, existiendo una relación entre la presencia de lesiones en la placenta y en el SNC del feto y la detección del ADN del parásito.

#### **1.4.4. Patogenia de la infección en el modelo murino**

En la actualidad el ratón es el modelo animal más usado para el estudio de la patogenia y respuesta inmune de la infección por *N. caninum*, desarrollándose para ello diferentes modelos de infección. Igualmente, el ratón se ha empleado en las pruebas de caracterización patogénica de diferentes aislados de *N. caninum*, para la producción de quistes tisulares y en pruebas de eficacia de fármacos o vacunas. Si bien no se ha descrito la existencia de infecciones naturales en ratones u otros roedores, *N. caninum* es infectivo para el ratón pudiéndose detectar la presencia de lesiones y del parásito en varios órganos del animal (Lindsay & Dubey, 1989d, 1990d; Nishikawa et al., 2001b, d). En la fase aguda de la infección, las lesiones se observan principalmente en el pulmón y en el hígado (Baszler et al., 1999b), mientras que en la fase crónica afectan al SNC (Lindsay et al., 1995b). Sin embargo, la respuesta de los animales a la infección junto con el desarrollo de una neosporosis clínica depende de múltiples factores y de la relación establecida entre el hospedador y el parásito. Aunque los factores que influyen en el desarrollo de la infección no son independientes unos de otros, se pueden dividir en dos grupos: los dependientes del hospedador y los del parásito. Dentro de los factores ligados al hospedador destacan: la estirpe de ratón, el uso de tratamientos inmunodepresores, inmunodeficiencias

selectivas de origen genético y la vía de inoculación. Entre los dependientes del parásito cabe citar: el aislado, la dosis infectiva y el estadio parasitario (Innes et al., 2000).

#### **1.4.4.1. Estirpe murina, tratamiento inmunodepresor y respuesta inmune del hospedador**

En el ratón la infección es posible tanto en estirpes no consanguíneas (Swiss Webster, ICR, CD-1) como en estirpes consanguíneas (BALB/c, CBA/CaA/J, B10.D2, A/J y C57BL/6), observándose variaciones en la receptividad a la infección dependiendo de las diferentes estirpes. Los ratones Swiss Webster son muy poco receptivos a la infección pero sí manifiestan signos clínicos si se inmunodeprimen con corticoesteroides (Lindsay & Dubey, 1989d). Dependiendo de la dosis de corticoides administrada se puede reproducir la forma aguda o crónica de la enfermedad. La estirpe no consanguínea ICR no desarrolla síntomas cuando se infecta con taquizoítos de los aislados NC-1 o NC-3 (Lindsay et al., 1995b) o con aislados atenuados, pero sí cuando se le administra previamente corticoides (Lindsay et al., 1999b). En este sentido, se han utilizado diferentes pautas de tratamientos con metilprednisolona para la obtención de quistes tisulares en ratones ICR (McGuire et al., 1997b). Entre las estirpes consanguíneas se encuentran también diferencias: las estirpes A/J y B10.D2 han mostrado ser resistentes (Khan et al., 1997; Long et al., 1998), mientras que las estirpes BALB/c y CB57/BL pueden desarrollar síntomas nerviosos cuando se les infecta con el aislado NC-1 (Lindsay et al., 1995b; Long et al., 1998).

Por otra parte, la respuesta inmune del hospedador es un factor importante en relación con la presentación de la enfermedad tal y como se ha podido observar en los modelos murinos de estirpes con defectos inmunológicos. Los ratones BALB/c atímicos (*nu/nu*) son muy sensibles a la infección por *N. caninum* incluso con aislados poco patógenos y en la mayoría de las ocasiones las infecciones cursan con sintomatología y mortalidad. Los ratones Swiss Webster defectivos en IFN- $\gamma$  son también muy receptivos y sucumben a la infección rápidamente (Dubey et al., 1998a). La estirpe C57BL/6  $\mu$ MT (deficiente en células B) presentó un mayor número de órganos positivos por PCR, y lesiones más graves en cerebro en comparación con su estirpe parental. Los ratones C57BL/6  $\mu$ MT desarrollaron sintomatología clínica y mortalidad a partir del día 29 PI, sin embargo los ratones C57BL/6 no mostraron ningún signo clínico de infección (Eperon et

al., 1999). Los ratones BALB/c SCID-bg (deficientes en células T y B funcionales y en un 50% en NK) son muy receptivos a *N. caninum*, falleciendo durante la fase aguda, mientras que sus parentales permanecieron clínicamente normales u ocasionalmente con algún síntoma (Dreier et al., 1999). Los ratones defectivos en la enzima inducible NO sintetasa (iNOS2) también fueron más sensibles que sus parentales (Tanaka et al., 2000a). Recientemente se ha estudiado el curso de la infección en ratones BALB/c defectivos en IFN- $\gamma$ , IL-10, iNOS2, en el receptor 2 del factor de necrosis tumoral (TNFR2) y en el receptor beta 2 microglobulina ( $\beta$ 2M) inoculados con los aislados NC-1, NC-2 y el aislado atenuado NCTs-8. Los ratones defectivos en IL-10 e iNOS2 no manifestaron sintomatología, mortalidad o lesiones cuando se infectaron con los tres aislados. Los ratones defectivos en  $\beta$ 2M tienen deficiencias en los linfocitos citotóxicos y en la secreción de IFN- $\gamma$  en las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I (CMH I). Cuando se les inoculó con NC-1 mostraron mortalidad en el día 27 PI, con lesiones en cerebro y pulmón; con NC-2 la infección fue crónica con alguna muerte durante la semana 30 y con NCTs-8 los ratones permanecieron vivos y no se observaron lesiones. En el caso de los ratones defectivos en TNFR2 el curso de la infección también estuvo condicionado por el tipo de aislado de *N. caninum*, siendo resistentes a NCTs-8, pero receptivos a NC-1 y NC-2, con muertes a partir del día 63 PI y lesiones tanto en cerebro como en pulmón. Los ratones defectivos en IFN- $\gamma$  murieron rápidamente localizándose las lesiones y el parásito en hígado y bazo (Ritter et al., 2002).

#### **1.4.4.2. Aislado**

El tipo de aislado es un factor crítico que condiciona la gravedad de los síntomas y lesiones que presenta el animal tal y como se ha podido comprobar en el párrafo anterior. Hasta la fecha, la información disponible sobre la diversidad patogénica, genética y biológica de los diferentes aislados de *N. caninum* es escasa. En los primeros estudios utilizando un modelo murino, el aislado NC-1 demostró ser más virulento NC-3 (Lindsay et al., 1995b). Atkinson et al. (1999) compararon 2 aislados en ratones BALB/c y observaron importantes diferencias en cuanto a la patogenicidad, ya que los ratones inoculados con el aislado NC-Liv (origen canino) desarrollaron síntomas y lesiones más graves que los infectados con NC-SweB1 (origen bovino). En este estudio también se encontraron diferencias biológicas y genéticas entre los dos aislados mediante un análisis

por la técnica de RAPD-PCR. Asimismo, los ratones BALB/c inoculados con el aislado Japonés JPA1 no desarrollaron sintomatología, detectándose muy pocas lesiones y de carácter leve en los diversos órganos estudiados (Shibahara et al., 1999). El aislado Australiano NC-Nowra mostró también poca patogenicidad cuando se inoculó a ratones BALB/c; sólo 3 de 10 ratones mostraron síntomas siendo las lesiones observadas en el cerebro de grado leve a moderado (Miller et al., 2002)

#### **1.4.4.3. Dosis infectiva**

El desarrollo de la infección por *N. caninum* en el modelo murino ha mostrado tener un comportamiento dependiente de la dosis del parásito. En este sentido, Long et al. (1998) observaron una asociación evidente entre dosis elevadas de taquizoítos y un incremento en el número de lesiones, carga parasitaria en cerebro, presencia de síntomas y mortalidad. Posteriormente, Gottstein et al. (2001) encontraron en ratones de la estirpe C57BL/6 inoculados con diferentes dosis, una asociación evidente entre dosis elevadas de taquizoítos, el incremento de la tasa de morbilidad y mortalidad y la presencia del parásito en cerebro. Concretamente, esta estirpe de ratón inoculada con  $10^5$  taquizoítos NC-1 no mostró ningún síntoma (Eperon et al., 1999) pero sí cuando se inoculó con  $2 \times 10^7$  taquizoítos (Long et al., 1998).

#### **1.4.4.4. Estadio parasitario y vía de inoculación**

Las infecciones experimentales llevadas a cabo en el modelo murino se han realizado mediante la inoculación de taquizoítos por vía intraperitoneal (i.p.), s.c. o v.o., aunque hasta el momento las vías más utilizadas han sido la i.p. y s.c. Lindsay & Dubey (1990b) observaron que los ratones infectados con taquizoítos por vía i.p. morían antes que los inoculados por vía s.c. o v.o. En otro estudio, los animales inoculados por vía i.p. no desarrollaron signos clínicos de la enfermedad ni lesiones en el cerebro en contraposición con los inoculados por vía s.c. (Atkinson et al., 1999). En un estudio reciente de un modelo de ratona gestante (Quinn et al., 2002a) también se ha descrito que las lesiones en el cerebro son más graves en los ratones inoculados por vía s.c.

A su vez se ha estudiado la patogenia de la infección con bradizoítos obtenidos de quistes tisulares e inoculados por vía s.c. o v.o., mostrando resultados parecidos a las infecciones causadas con taquizoítos (Lindsay & Dubey, 1990b).

Los ratones han demostrado ser muy poco sensibles a las infecciones con ooquistes de *N. caninum* por v.o. (Lindsay et al., 1999a). Sin embargo, los gerbos son muy receptivos (Dubey & Lindsay, 2000)

#### **1.4.4.5. Patogenia de la infección en el modelo murino gestante**

El modelo murino gestante se encuentra actualmente en desarrollo. No obstante, todos los resultados obtenidos hasta la fecha indican un alto grado de similitud con los obtenidos en el modelo bovino. La transmisión congénita de *N. caninum* en el ratón está en relación con el día de la gestación en el que la madre es infectada (Long et al., 1996; Cole et al., 1995; Liddell et al., 1999b). Cuando la infección se realiza con el aislado NC-1 en ratones BALB/c antes de la gestación o al principio de ésta (día 5), el parásito no se ha detectado ni en los tejidos del feto ni en la placenta en los días 13-19 de gestación (Long et al., 1996). Por otro lado, en un modelo gestante con ratones no consanguíneos (estirpe Quackenbush) infectados con el aislado NC-Liv en el día 5 de gestación, la tasa de transmisión en el día 7 post-parto fue del 91% (Quin et al., 2002a). De este modo, el período de tiempo transcurrido entre la infección y el sacrificio parece ser crucial para la multiplicación del parásito y el establecimiento de la infección. En ratonas BALB/c infectadas con NC-1 entre el día 8 y 12 de gestación y sacrificadas en días sucesivos, el parásito se ha detectado en placenta, músculo esquelético y cerebro del feto y en algunos casos con altas tasas de transmisión (Long et al., 1996; Liddell et al., 1999b). Si la infección se realiza entre los días 13-15 de gestación, el parásito sólo se ha detectado por PCR en un número reducido de crías (Liddell et al., 1999b). La localización de *N. caninum* en las crías también varía en función de la edad; en los animales de 2-4 días de edad, el parásito se ha detectado en cerebro y pulmón, mientras que a los 7-23 días se detecta, únicamente, en cerebro (Liddell et al., 1999b)

La pérdida fetal en el modelo murino gestante es también dependiente del período de gestación en el que ocurra la infección. Así cuando se infectan ratonas BALB/c en el

día 10 después de la cubrición, el número de ratones por camada fue significativamente menor que en los testigos. La infección en el día 5 de gestación con el aislado NC-1 originó una tasa de reabsorciones en el día 14 casi tres veces más que en las hembras no infectadas (33% *versus* 12%) (Long et al., 1996). En el día 8 de gestación en el modelo gestante con ratones Quackenbush infectados con el aislado NC-SweB, se observó en el día 14 un 25% de fetos no viables por camada, significativamente mayor que en los testigos, mientras que con NC-Liv no se observó un aumento significativo y la media fue sólo del 2,8% (Quinn et al., 2002a). Por otra parte, no se observaron pérdidas fetales en hembras infectadas al final de la gestación (Long et al., 1996).

## **1.5. RESPUESTA INMUNE**

La inmunidad que se desarrolla en el hospedador como consecuencia de la infección desempeña un papel crítico en sus consecuencias. Varios estudios han señalado que la respuesta inmune de tipo celular es el componente más importante involucrado en el control de la infección. *N. caninum*, como la mayoría de los patógenos intracelulares obligados, estimula en el hospedador una respuesta tipo Th1 caracterizada por la producción de IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-12 y TNF- $\alpha$ , que a su vez conlleva la producción de NO y metabolitos potencialmente letales para el parásito (Innes et al., 2002). Por otra parte, tanto en el modelo murino como en el modelo bovino se ha demostrado que tras la infección se estimula una fuerte respuesta humoral.

### **1.5.1. En el ganado bovino**

#### **1.5.1.1. Respuesta inmune celular**

Aunque la información sobre la respuesta inmune celular en el ganado bovino es limitada, se ha demostrado su desarrollo como consecuencia de la infección. En novillas infectadas experimentalmente se han descrito altos niveles de IFN- $\gamma$  y la proliferación *in vitro* de linfocitos con antígeno del parásito (Lundén et al., 1998; Marks et al., 1998) destacando la participación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> como responsables de los procesos de proliferación y de producción de IFN- $\gamma$  (Marks et al., 1998). En infecciones experimentales con ooquistes de *N. caninum* en terneros se ha descrito una

linfoproliferación desde la primera semana hasta los dos meses y medio PI (De Marez et al., 1999).

En vacas gestantes con infección natural se ha señalado la presencia de niveles de IFN- $\gamma$  más elevados en aquellas reproductoras que no transmitieron la infección a la descendencia (Guy et al., 2001). Por otro lado, en vacas gestantes infectadas experimentalmente con taquizoítos se han observado diferencias en la magnitud de la respuesta inmune celular en relación con el periodo de gestación, describiéndose una respuesta inmune celular más intensa al principio y al final así como niveles más bajos en la mitad de la gestación (Williams et al., 2000; Innes et al., 2000, 2001; Andrianarivo et al., 2001). Sin embargo, Almería et al. (2003) detectaron a los 124 días PI bajos porcentajes de células CD3+, CD4+, CD8+ e IL-2R+ en la sangre, pero altos en los órganos linfoides, indicando que la respuesta inmune de la madre puede estar compartimentada. Por su parte, los datos referentes al TNF- $\alpha$  son contradictorios. Mientras algunos autores han señalado que la infección experimental por *N. caninum* en vacas gestantes no produce altos niveles (Williams et al., 2000), otros autores han descrito un incremento en la expresión de TNF- $\alpha$  (Almería et al., 2003). La infección en vacas gestantes parece estimular una respuesta tipo Th1 con un destacado papel de los linfocitos T CD4+ como responsables de los procesos de proliferación y producción de IFN- $\gamma$  (Andrianarivo et al., 2001). Sin embargo, *N. caninum* parece también inducir la expresión de citoquinas Th2 como la IL-4 (Almería et al., 2003). Por otra parte, las vacas gestantes infectadas con ooquistes también desarrollaron una inmunidad celular desde la semana 1 a la 20 PI (Trees et al., 2002).

En fetos procedentes de vacas experimentalmente infectadas en el día 159 o 169 de gestación, la respuesta inmune celular fue muy variable, detectándose la producción de IFN- $\gamma$  en un número reducido de ellos. En uno de los fetos con niveles de IFN- $\gamma$  bajos, al igual que su madre, se observaron las lesiones mas graves y fue el único donde se detectó el parásito (Andrianarivo et al., 2001), indicando el papel protector del IFN- $\gamma$  frente a la infección. Asimismo, se ha señalado la existencia de niveles altos de expresión del IFN- $\gamma$ , del TNF- $\alpha$  y de la IL-10 y la presencia de linfocitos CD3+ en fetos procedentes de infecciones experimentales (Almería et al., 2003).

### 1.5.1.2. Respuesta inmune humoral

La infección por *N. caninum* en el ganado bovino estimula el desarrollo de una respuesta inmune humoral, si bien se desconoce el papel que juegan estos anticuerpos en el desarrollo de una inmunidad protectora existiendo datos contradictorios al respecto. En la infección natural se ha puesto de manifiesto la presencia de fluctuaciones en los niveles de anticuerpos a lo largo de la vida del animal, detectándose niveles elevados durante la gestación capaces de predecir el aborto o la infección congénita (Paré et al., 1997; Quintanilla-Gozalo et al., 2000; Pereira-Bueno et al., 2000; Guy et al., 2001) o valores bajos incluso negativos en otros momentos (Conrad et al., 1993b; Pereira-Bueno et al., 2000). Los niveles altos podrían estar causados por una reactivación de la infección y re-estimulación en la producción de anticuerpos o por reinfecciones a partir de una fuente externa (Conrad et al., 1993b; Jenkins et al., 1997; Paré et al., 1997).

En novillas infectadas experimentalmente se detectaron IgM específicas a partir del día 12 PI mientras que la respuesta de IgG fue más tardía, detectándose a partir del día 29 PI y presentando un máximo en el día 35 PI (Lundén et al., 1998). Maley et al., (2001) realizaron un seguimiento serológico en animales inoculados experimentalmente con una dosis baja y otra alta de taquizoítos observando niveles de IgG elevados, al menos durante un año, en ambos grupos con algunas fluctuaciones, principalmente en el grupo inoculado con la dosis menor. En reproductoras gestantes inoculadas en diferentes momentos de la gestación, se ha observado un aumento del nivel de anticuerpos a las 4-6 semanas PI, alcanzando un pico alrededor de la séptima semana y disminuyendo a partir de la semana 10. Por otra parte, en los bovinos, la producción de IgG2 viene mediada por citoquinas del tipo Th1, mientras las citoquinas Th2 aumentan la producción de anticuerpos de la subclase IgG1 (Estes et al., 1995). En el estudio realizado por Williams et al. (2000) en vacas experimentalmente infectadas, se describieron altos niveles de IgG2 e IFN- $\gamma$ . Sin embargo, Andrianarivo et al. (2001) observaron en vacas inoculadas en el día 159 o 169 de gestación tres patrones: (i) niveles más altos de IgG2 que IgG1, (ii) mezcla de IgG1 e IgG2 y (iii) niveles más elevados de IgG1 que IgG2. Tampoco observaron una correlación entre los niveles de IgG2 y los de IFN- $\gamma$  sugiriendo que otros factores podrían regular la producción de IgG2 en el ganado bovino. En infecciones experimentales en terneros con ooquistes de *N. caninum*, se ha detectado una respuesta humoral específica

mediada por IgG1 e IgG2 desde la segunda y cuarta semana PI, respectivamente (De Marez et al., 1999). Las vacas gestantes infectadas con ooquistes desarrollaron una respuesta humoral desde la semana 3 PI, permaneciendo elevada durante 12-14 semanas, después los niveles de anticuerpos fueron disminuyendo hasta alcanzar valores por debajo del punto de corte (Trees et al., 2002).

La respuesta humoral en fetos bovinos abortados por neosporosis depende de la edad gestacional y del tiempo transcurrido entre la infección y el aborto. A partir de los 5 meses de gestación, cuando el feto es inmunocompetente, se observa un incremento en el número de fetos seropositivos (Barr et al., 1995; González et al., 1999; Pereira-Bueno et al., 2003). También se ha observado en fetos procedentes de vacas infectadas experimentalmente, el desarrollo de una marcada respuesta inmune humoral con producción de IgG1 anti-*N. caninum* (Andrianarivo et al., 2001).

### **1.5.2. En el modelo murino**

#### **1.5.2.1. Respuesta inmune celular**

En la actualidad el ratón es el modelo animal más utilizado para el estudio de la respuesta inmune producida por *N. caninum*. En este sentido, el desarrollo de modelos murinos con inmunodeficiencias selectivas de origen genético ha sido de gran ayuda en el estudio de inmunidad celular frente a la infección.

Durante la infección por *N. caninum*, se activan diferentes componentes de la inmunidad celular innata como macrófagos, células NK y células dendríticas, las cuales responden liberando citoquinas del tipo IL-12 e IFN- $\gamma$  que, junto con los linfocitos CD4+ y CD8+, intervienen en la regulación de la respuesta celular Th1/Th2, que es crucial en la respuesta protectora desarrollada frente al parásito (Kasper & Khan, 1998; Nishikawa et al., 2002). Diversos estudios han señalado el papel del IFN- $\gamma$  e IL-12 en la resistencia frente al parásito durante la fase aguda de la infección. Así, los ratones de la estirpe A/J (resistentes a la infección) expresan en esplenocitos niveles significativos de ARNm de IL-12 a las 24 h PI y de IFN- $\gamma$  a los 7 días PI. Asimismo, la neutralización *in vivo* con anticuerpos monoclonales de estas dos citoquinas originó en esta estirpe murina un

aumento de la sensibilidad a la infección (Khan et al., 1997). En otros estudios relacionados se ha visto un aumento de la mortalidad y de la carga parasitaria en los ratones tratados con anticuerpos monoclonales frente a IL-12 e IFN- $\gamma$ , al igual que en ratones defectivos genéticamente en IFN- $\gamma$  (Dubey et al., 1998a; Ritter et al., 2002). Contrariamente, cuando los ratones fueron tratados con IL-12 recombinante, mostraron una disminución en la gravedad de los síntomas y lesiones en cerebro y una menor carga parasitaria, aunque el curso de la infección no se vió alterado a largo plazo (Baszler et al., 1999b). Tanaka et al. (2000b) obtuvieron resultados parecidos al administrar un anticuerpo monoclonal frente a IFN- $\gamma$ , observando que los ratones morían a los 18 días PI, mientras que los no tratados sobrevivían más de 30 días. Por otra parte, la sensibilidad a la infección en el modelo murino parece estar relacionada con una respuesta Th2 y niveles elevados de IL-4. En este sentido, Long et al. (1998) describieron los perfiles de citoquinas que se producían en tres estirpes de ratones con diferente receptividad a la infección. Los ratones de las estirpes BALB/c y C57BL/6 (sensibles a la infección) tuvieron niveles más altos de IL-4 que los ratones de la estirpe B10.D2 (resistente a la infección). Por otra parte cabe destacar que la IL-10 es una importante citoquina producida por las células Th2 que inhibe las funciones de las células Th1 durante la infección con *T. gondii* (Gazzinelli et al., 1996). En *N. caninum*, se han relacionado niveles bajos de IL-10 con una mayor sensibilidad a la infección (Eperon et al., 1999). Por el contrario, en ratones tratados con anticuerpos monoclonales frente a la IL-12 se ha observado un aumento en el ARNm de la IL-10 (Khan et al., 1997), y en ratones defectivos en IL-10 una menor receptividad a la infección (Ritter et al., 2002). Igualmente, los ratones BALB/c deficientes en IFN- $\gamma$  tuvieron elevados niveles de IL-10 (Nishikawa et al., 2003). El papel que desempeña el NO tampoco se conoce con exactitud, mientras que Tanaka et al. (2000a) demuestran que es importante en la resistencia a la infección, tal y como se ha observado experimentalmente en ratones defectivos en la enzima iNOS2, los cuales muestran una mayor receptividad; Ritter et al. (2002) observan que los ratones sin iNOS2 son resistentes a la infección. El TNF- $\alpha$  ha inhibido la multiplicación *in vitro* del parásito (Nishikawa et al., 2001a), pese a esto, no parece desempeñar un papel crítico en la infección aguda o crónica en ratones (Ritter et al., 2002)

Las poblaciones de linfocitos T, CD4+ y CD8+ juegan un papel importante en la prevención de la infección por *Neospora* en las fases más avanzadas (Nishikawa et al.,

2002). Las células T CD8<sup>+</sup> son sólo parcialmente responsables de la protección frente a *N. caninum* al contrario que en *T. gondii* donde las CD8<sup>+</sup> juegan un papel esencial en la protección (Tanaka et al., 2000b). En fases más avanzadas de la infección, las células CD4<sup>+</sup> jugarían un papel más importante que el IFN- $\gamma$ . Al principio de la interacción, las células T CD4<sup>+</sup> activadas por el IFN- $\gamma$  originan una respuesta inmune de tipo Th1, activando a su vez los linfocitos CD4 citotóxicos que se encargarían de destruir las células infectadas con el parásito. En un estudio reciente se muestra que los linfocitos T citotóxicos podrían contribuir al control de la replicación del parásito en pulmón durante la fase aguda de la infección (Ritter et al., 2002). Finalmente, se ha señalado que las células CD4<sup>+</sup> y los macrófagos desempeñan un importante papel en la respuesta inmune mediada por IFN- $\gamma$  (Nishikawa et al., 2001b).

El modelo murino gestante también se ha empleado para estudiar el papel que juegan las citoquinas durante la gestación en la infección por *N. caninum*. Así Long & Baszler (2000) demostraron que la modulación de las citoquinas Th2 puede reducir la frecuencia de transmisión vertical. Para ello inyectaron a ratonas gestantes anticuerpos neutralizantes de la IL-4 y una dosis de taquizoítos, observando que la tasa de transmisión vertical no disminuía. Sin embargo, cuando este mismo protocolo se efectuó antes de la gestación repitiendo la inoculación de taquizoítos durante la preñez, la transmisión vertical disminuyó. Este resultado se relacionó con niveles de IL-4 reducidos y de IFN- $\gamma$  aumentados.

### **1.5.2.2. Respuesta inmune humoral**

La respuesta humoral en el modelo murino parece ser importante en la resistencia a la infección por *N. caninum*. Así los ratones deficientes en células B y, por tanto, sin la capacidad de sintetizar anticuerpos, fueron más receptivos a la infección que sus parentales (Eperon et al., 1999). En el ratón, los isotipos IgG2a e IgG1 se han asociado con un perfil de citoquinas de Th1 (IL-12 e IFN- $\gamma$ ) y Th2 (IL-4), respectivamente. En ratones BALB/c y C57BL/6 se han detectado mayores niveles de IgG2a que de IgG1 en las fases iniciales de la infección pero posteriormente se produjeron niveles parecidos de ambos isotipos (Long et al., 1998).

En el modelo murino gestante desarrollado por Quinn et al. (2002a), el perfil de la respuesta humoral dependió del aislado, dosis y vía de inoculación utilizados. Por ejemplo, los animales inoculados por vía s.c. con  $10^6$  taquizoítos del aislado NC-SweB, produjeron más IgG1, mientras que en las mismas condiciones pero con NC-Liv, se observó una respuesta caracterizada por IgG2a. El isotipo IgG2a dominó cuando se utilizó la vía i.p.

## 1.6. SINTOMATOLOGÍA

### 1.6.1. En el ganado bovino

La manifestación clínica más importante de la infección por *N. caninum* en el ganado bovino es el aborto en vacas gestantes. Generalmente puede producirse en cualquier época del año presentándose de forma esporádica, endémica o epidémica y tiene lugar entre el tercer y noveno mes de gestación, siendo más frecuente en torno a los 5-6 meses. Los fetos que mueren pueden ser reabsorbidos, momificarse o estar autolíticos. Los fetos abortados 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. La placenta suele ser eliminada con el feto abortado sin que exista retención (Dubey & Lindsay, 1996).

Lo más frecuente es el nacimiento de terneros vivos clínicamente sanos pero crónicamente infectados y con altos títulos de anticuerpos precalostrales (Anderson et al., 2000). Sin embargo, en terneros menores de 2 meses se han descrito ocasionalmente síntomas neuro-musculares, apareciendo los primeros signos clínicos a los 4-5 días después del parto, aunque estos pueden retrasarse hasta transcurridas dos semanas. Los síntomas que se han observado van desde incoordinación ligera hasta parálisis completa, debilidad y dificultad para levantarse. Los miembros anteriores 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, ceguera, deformaciones asociadas con la lesión de las células nerviosas embrionarias, hidrocefalia, estrechamiento de la médula

espinal (Dubey et al., 1990a; Barr et al., 1991b; Dubey & Lathunda 1993; Bryan et al., 1994; Locatelli-Dittrich et al., 2003).

### **1.6.2. En el modelo murino**

Como ya se ha indicado anteriormente, la presentación de signos clínicos en el ratón va a depender de múltiples factores. En los animales que desarrollan una neosporosis clínica podemos diferenciar dos fases con sintomatología diferente. Durante la neosporosis aguda en los primeros días de la infección, los ratones muestran dificultad respiratoria, inactividad con pérdida de apetito o erizamiento del pelo probablemente debidos a un estado febril. Si la infección es muy grave pueden incluso morir. En la fase crónica, los ratones pueden desarrollar sintomatología nerviosa con debilidad y parálisis del tercio posterior, torneo, ataxia, temblor de cabeza, torneo y marcha en círculos. También se observa pérdida de peso, apatía y mortalidad (Lindsay & Dubey, 1989d, 1990b; Atkinson et al., 1999; Lindsay et al., 1995b; Eperon et al., 1999; McGuire et al., 1997b; Gottstein et al., 2001).

## **1.7. LESIONES Y LOCALIZACIÓN DEL PARÁSITO**

### **1.7.1. En el ganado bovino**

En el feto, la lesiones más frecuentes se observan en el SNC, corazón e hígado (Barr et al., 1990, 1991a; Nietfeld et al., 1992; Dubey & Lindsay, 1996; Wouda et al., 1997a). La lesión más característica de la infección por *N. caninum* afecta al SNC y es una encefalomiелitis no purulenta de distribución multifocal. Esta lesión se caracteriza por la presencia de uno o varios focos de necrosis que ocasionalmente, pueden presentar 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 así como áreas con gliosis, proliferación de la microglía y de los astrocitos. Las lesiones pueden afectar tanto a la sustancia blanca como a la gris y con frecuencia se localizan próximas a vasos sanguíneos, por lo que es frecuente apreciar manguitos perivasculares de células mononucleares (Dubey & Lindsay, 1996; González et al., 1999).

En el corazón la alteración típica es una miocarditis o pericarditis de extensión variable, que puede ser focal o difusa. Está constituida por macrófagos, linfocitos y en menor número células plasmáticas, todas ellas localizadas entre las fibras musculares las cuales pueden mostrar signos de degeneración e incluso necrosis con posterior calcificación (Barr et al., 1990; Wouda et al., 1997a).

El hígado presenta una hepatitis periportal o difusa no purulenta caracterizada por una necrosis de los hepatocitos asociada a un infiltrado de macrófagos y linfocitos (Barr et al., 1990; Wouda et al., 1996, 1997a).

Con menor frecuencia pueden detectarse infiltrados inflamatorios semejantes a los descritos en otros órganos como el pulmón, el riñón, el páncreas o la glándula adrenal. En los ganglios linfáticos únicamente se observa una hiperplasia reactiva con presencia de folículos linfoides prominentes (Anderson et al., 1990; Dubey & Lindsay, 1996).

Las lesiones en la placenta consisten en focos de necrosis e hipertrofia o hiperplasia del trofoblasto afectado. Como respuesta celular, se produce edema con acúmulo de células mononucleares en el mesénquima de las vellosidades. En procesos avanzados hay regeneración conjuntiva con fibrosis e incluso calcificación de los focos necróticos (Barr et al., 1994a; Maley et al., 2003).

En lo que se refiere a la localización del agente en el feto, *N. caninum* se ha detectado principalmente en el SNC pudiéndose observar tanto taquizoítos como quistes tisulares con bradizoítos (Dubey & Lindsay, 1996). Sin embargo, en la mayoría de las ocasiones son necesarias secciones seriadas del tejido y la utilización de técnicas inmunohistoquímicas o de PCR para poner de manifiesto la presencia del parásito. En el SNC, *N. caninum* puede localizarse tanto en el neuropilo como en el interior del citoplasma de las neuronas (Barr et al., 1991b; Bryan et al., 1994). Aunque con menos frecuencia, la presencia del parásito se ha descrito en el corazón, donde los taquizoítos se localizan en el interior de las fibras del miocardio (Wouda et al., 1997a; Morales et al., 2001a) y también en el hígado, en el interior de los hepatocitos (Wouda et al., 1997a). En la musculatura esquelética es posible visualizar taquizoítos en el interior de las fibras musculares (Barberán et al., 1998) así como quistes del parásito (Peters et al., 2001a). Su

presencia en el resto de los órganos es más rara incluida la placenta (Dubey & Lindsay 1996; Boulton et al., 1995; Piergili et al., 2000; Bergeron et al., 2001a).

Los taquizoítos normalmente se localizan próximos a las zonas lesionadas, en los márgenes de las mismas (Anderson et al., 1990; Campero et al., 1998; González et al., 1999; Corbellini et al., 2002, De Meerschman et al., 2002), aunque también se han visualizado en zonas no lesionadas (Hattel et al., 1998). En cuanto a los quistes lo más frecuente es su observación sin reacción inflamatoria alrededor (Anderson et al., 1991; Bryan et al., 1994; Otter et al., 1995), pero ocasionalmente, se ha observado la formación de granulomas lo que podría indicar la rotura del quiste y la reacción inflamatoria del hospedador (Dubey et al., 1990a; Morales et al., 2001a).

En los terneros congénitamente infectados, sin sintomatología, la presencia de lesiones es rara y se restringe principalmente al SNC. Las lesiones observadas son de carácter leve consistentes en algún nódulo glial o manguitos perivasculares. La detección del parásito es también difícil y con frecuencia en forma de quistes tisulares (Ogino et al., 1992; Barr et al., 1993; Piergili et al., 2000). En los terneros congénitamente infectados con sintomatología, las principales lesiones se van a localizar también en el SNC (Barr et al., 1991b; Bryan et al., 1994). Microscópicamente, se aprecia una encefalomiелitis no purulenta con necrosis moderada y presencia de macrófagos, células de Gitter, linfocitos, células plasmáticas y ocasionalmente eosinófilos. Del mismo modo, 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 lo más común es la observación de taquizoítos tanto en el encéfalo o en la médula espinal como en el músculo esquelético. La presencia de quistes es más rara que en los terneros sin sintomatología (Dubey et al., 1992, 1998a; Dubey & Lahunta 1993).

En el bovino adulto, la presencia de lesiones se ha observado en contadas ocasiones. En una vaca con historial de aborto por neosporosis se observaron áreas multifocales de

manguitos perivasculares y nódulos gliales en el cerebro y mesencéfalo (Sawada et al., 2000). El parásito no se detectó durante el examen histológico pero se consiguió el aislamiento del agente a partir del tejido nervioso. También ha sido posible la detección en el SNC de *N. caninum* en vacas con infección natural y experimental utilizando la técnica de PCR (Ho et al., 1997b)

### **1.7.2. En el modelo murino**

Las lesiones observadas en las infecciones experimentales en el ratón son muy similares a las mostradas en los bovinos. En la fase aguda de la infección, las lesiones que se observan son principalmente en el pulmón e hígado (Baszler et al., 1999b), mientras que en la fase crónica se presentan en el SNC (Lindsay et al., 1995b). En el cerebro es típica una meningoencefalitis no supurativa multifocal de distribución variable con focos de necrosis y presencia de macrófagos, células de Gitter, linfocitos, gliosis y manguitos perivasculares. En el sistema nervioso periférico se ha citado la presencia de gangliorradiculoneuritis incluyendo degeneración axonal de los nervios espinales, necrosis focal de las neuronas y células de Swann así como desmineralización. En el pulmón es característica la presencia de una neumonía intersticial con pequeños nódulos de células linfoides, a veces asociados a los vasos sanguíneos. En el hígado se ha descrito una hepatitis no supurativa con necrosis multifocal de los hepatocitos e infiltración de linfocitos. En el páncreas, las lesiones que se han citado son una necrosis difusa de las células acinares e infiltración de células inflamatorias en el tejido conectivo pancreático. También se han observado, aunque con menos frecuencia, lesiones en las glándulas adrenales, músculo esquelético y útero (Lindsay & Dubey, 1989d, 1990b; Lindsay et al., 1995b; Atkinson et al., 1999; Dreier et al., 1999; Shibahara et al., 1999; Lundén et al., 2002).

La presencia del parásito en los diferentes órganos se ha detectado mediante inmunohistoquímica y PCR. En las etapas iniciales de la infección, el parásito se ha localizado en varios órganos, principalmente, en pulmón y en la fase crónica en cerebro. En ratones BALB/c inoculados con  $10^6$  taquizoítos del aislado NC-1 se detectó ADN del parásito en corazón, hígado, pulmón, riñón, bazo y cerebro desde el día 4 al 8 PI. El pulmón y cerebro también fueron positivos hasta el último día del estudio (día 10 PI) (Nishikawa et al., 2001b). Mediante inmunohistoquímica, los taquizoítos también se han

visualizado ocasionalmente en otros órganos como en el estómago, oviducto, músculo esquelético, páncreas y diafragma (Lindsay & Dubey, 1989d, 1990b; Shibahara et al., 1999). En cerebro, la presencia de *N. caninum* se ha podido detectar hasta el día 463 PI (Dubey & Lindsay, 1996). La observación de quistes tisulares en el cerebro de ratones infectados experimentalmente es poco frecuente, describiéndose su presencia a partir de la tercera semana PI (Lindsay & Dubey, 1989d). Si bien, el modelo murino se ha utilizado para la producción de quistes tisulares (McGuire et al., 1997b).

## 1.8. DIAGNÓSTICO

Dadas las características de la enfermedad, el diagnóstico de la neosporosis bovina es dificultoso debido a la inexistencia de manifestaciones clínicas en los animales infectados crónicamente y al escaso número de parásitos presente en los fetos abortados (Jenkins et al., 2002). La valoración adecuada de los datos de la anamnesis y la investigación epidemiológica así como los datos obtenidos en el examen clínico de los animales afectados pueden ayudar (Tabla 7), pero la confirmación de la infección requiere la asistencia de un laboratorio de diagnóstico veterinario.

**Tabla 7.** Protocolo de estudio de un problema de abortos en una explotación de vacas de leche (Ferre et al., 2003).

<p><b>1. Confirmar la magnitud del problema</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ ¿Ha aumentado la incidencia anual de abortos en la granja?</li> <li>➤ ¿Nos enfrentamos ante un brote de abortos?</li> </ul>
<p><b>2. Acudir a los registros de la explotación</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <u>Recoger datos de las vacas abortadas y de las no abortadas</u> Nº de identificación, nº de lactación, datos reproductivos y de partos, diagnóstico de gestación, inseminaciones, fechas de aborto, valor de la vaca, historial sanitario.</li> <li>➤ <u>Recoger datos sobre el manejo de la granja</u> Llegada de animales, historial de vacunaciones, instalación y manejo de los parques, manejo reproductivo, agrupamiento de animales, nutrición, sanidad, política de desvieje.</li> </ul>
<p><b>3. Confeccionar una lista retrospectiva de los sucesos que hayan ocurrido en la granja hasta 3-6 meses antes del comienzo del problema</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Llegada de nuevos animales, cambios en la nutrición, vacunaciones, enfermedades, cambios en el manejo, calidad y cantidad de leche en tanque.</li> </ul>
<p><b>4. Procesar los datos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Relacionar los sucesos ocurridos en la granja y los resultados productivos de leche en tanque con el comienzo de los problemas de aborto.</li> </ul>
<p><b>5. Realizar la comparación de las vacas caso y control</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Comparar los historiales de las vacas que abortan con las gestantes que no abortan. En el caso de la neosporosis bovina, Sager et al. (2001) realizan un estudio caso-control en Suiza y Thurmond &amp; Hietala (1995) ofrecen un enfoque epidemiológico para el diagnóstico de la neosporosis en el rebaño.</li> </ul>
<p><b>6. Recoger muestras de las vacas del grupo de riesgo</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Recoger un número de muestras representativo (mínimo 10 muestras de sangre).</li> </ul>

En este apartado se contempla por separado el diagnóstico de la infección en fetos abortados y durante la vida postnatal.

### **1.8.1. Diagnóstico en el ganado bovino durante la vida postnatal**

La detección de la infección en los bovinos durante la vida postnatal se fundamenta en la detección de anticuerpos específicos en el suero frente a *N. caninum* mediante técnicas serológicas. Por otro lado, la transmisión congénita también se evalúa mediante la determinación de anticuerpos en el suero precalostrado de terneros recién nacidos puesto que en los bovinos no existe transferencia de anticuerpos de la madre al feto durante la gestación (Paré et al. 1996; Thurmond & Hietala, 1997a).

Las técnicas serológicas presentan una elevada sensibilidad y especificidad y hacen posible el examen *in vivo* de los animales, no obstante, en el diagnóstico de la neosporosis

bovina existen todavía discrepancias entre los diferentes laboratorios debidas a las propiedades de la técnica empleada y a los diferentes puntos de corte utilizados. Recientemente, se ha sugerido 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 (Álvarez-García et al., 2003). Por otra parte, la sensibilidad y la especificidad de estas pruebas diagnósticas pueden variar por diversos factores como la edad del animal o la fase de la infección. Así, un resultado serológico positivo ayuda a identificar un animal adulto infectado, pero un resultado negativo no descarta definitivamente la infección porque los anticuerpos séricos frente a *N. caninum* pueden fluctuar con la edad y el estado de la gestación (Pereira-Bueno et al., 2000; Quintanilla-Gozalo et al., 2000).

Para detectar anticuerpos específicos frente a *N. caninum* se han desarrollado diferentes pruebas serológicas como la inmunofluorescencia indirecta (IFI), enzimoimmunoanálisis (ELISA), western-blot (WB) e inmunoaglutinación directa (DAT), aunque las más utilizadas han sido la IFI y el ELISA.

#### **1.8.1.1. IFI**

La técnica de IFI fue la primera técnica serológica aplicada a la neosporosis y se ha utilizado en varias ocasiones como prueba de referencia. Utiliza como antígeno taquizoítos cultivados en medio libre de suero o con suero equino, es específica y no se han detectado reacciones cruzadas con otros protozoos relacionados (Dubey & Lindsay, 1996). Sin embargo, tiene una serie de inconvenientes como el de poseer un cierto grado de subjetividad en la interpretación de los resultados y el requerimiento de experiencia previa (Björkman & Uglá, 1999).

Los puntos de corte empleados en la IFI varían entre los diferentes laboratorios. En el ganado bovino adulto se han empleado puntos de corte que oscilan entre 1:200 (Schaes et al., 1998) y 1:640 (Conrad et al., 1993b).

### 1.8.1.2. ELISA

La prueba de ELISA posee numerosas ventajas como son la sencillez, rapidez, facilidad de interpretación de los resultados, capacidad de automatización y bajo coste económico, ésto hace que sea la técnica más utilizada cuando se analizan un número elevado de muestras.

Se han desarrollado numerosas pruebas de ELISA para la detección inmunoenzimática de anticuerpos específicos frente a *N. caninum* y que utilizan distintos tipos de antígenos. Los ELISAs convencionales emplean antígeno soluble de taquizoítos (Paré et al., 1995; Björkman & Uggla, 1999) con alguna variante como el ELISA de competición, en el que se emplea un anticuerpo monoclonal que compite con los anticuerpos específicos del suero problema, confiriendo 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. También se han empleado taquizoítos fijados con formalina (Williams et al., 1997) o antígenos incluídos en ISCOM (Björkman et al., 1994). Las primeras proteínas recombinantes empleadas como antígeno en el ELISA fueron las proteínas de gránulos densos NcGRA6 y NcGRA7 (Lally et al., 1996b; Jenkins et al., 1997). Otros antígenos recombinantes utilizados son las proteínas de 20 y 29 kDa (N57 y N54, respectivamente) (Louie et al., 1997), Nc-p43 (Ahn et al., 2003) y la forma recombinante de los antígenos de superficie SAG1 (Howe et al., 2002) y SRS2 (Nishikawa et al., 2001f). También se ha desarrollado un ELISA con el antígeno inmunodominante p-38 purificado por afinidad (Schaes et al., 2000).

En los últimos tiempos, se han desarrollado diferentes ELISAs que permite cuantificar la avidéz de las IgG anti-*N. caninum* presentes en el suero de los animales infectados y distinguir entre infecciones recientes y crónicas. El primer ELISA de avidéz desarrollado se basó en el empleo de partículas ISCOM (Björkman et al., 1999), utilizado posteriormente por Jenkins et al. (2000) y McAllister et al. (2000) para estudiar la posible relación entre los abortos que presentaba el rebaño objeto del estudio y una infección reciente e investigar si las vacas con antecedentes de infección por *Neospora* tenían una

mayor probabilidad de presentar abortos o parir terneros congénitamente infectados. Recientemente, 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 de animales que presentan abortos endémicos. Por su parte, Sager et al. (2003) han demostrado mediante el empleo de un ELISA de avidéz, que si bien los bajos niveles de avidéz pueden ayudar a predecir el aborto, éstos no están necesariamente asociados a infecciones recientes.

Asimismo la prueba de ELISA se ha aplicado en la detección de anticuerpos anti-*N. caninum* en tanque de leche (Björkman et al., 1997; Chanlum et al., 2002; Schares et al., 2003).

#### **1.8.1.3. Western-blot**

Mediante inmunoblot se han identificado antígenos inmunodominantes de 17, 29/30, 37 y 46 kDa y proteínas con un peso molecular de 25, 65 y 116 kDa en el suero de bovinos infectados naturalmente (Baszler et al., 1996, Atkinson et al., 2000a, b, Söndgen et al., 2001; Álvarez-García et al., 2002). Sin embargo, el inmunoblot no se ha utilizado como un método habitual de diagnóstico sino como técnica confirmatoria de otras pruebas serológicas (Atkinson et al., 2000a, b; Söndgen et al., 2001). Así, el reconocimiento de tres o cuatro antígenos inmunodominantes de 17, 29/30, 37 y 46 kDa por el suero de vacas infectadas naturalmente se ha considerado como confirmación de la infección (Scharés et al., 1998). Recientemente, se ha llevado a cabo un estudio donde se demuestra una asociación entre los títulos de anticuerpos IFI y el número de antígenos reconocidos por WB, correspondiendo los mayores títulos de anticuerpos, así como el número de antígenos reconocidos y la intensidad de reconocimiento de los antígenos inmunodominantes, a las vacas abortadas, en comparación con los fetos y los sementales. 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 (Álvarez-García et al., 2002, Álvarez-García, 2003).

En el futuro, el conocimiento del patrón de reconocimiento específico de taquizoítos y bradizoítos podría ser muy útil para distinguir entre las fases aguda y crónica de la infección por *N. caninum*.

#### **1.8.1.4. Aglutinación directa**

Se han normalizado las pruebas de aglutinación directa cuyas ventajas son su simplicidad y el no requerir anticuerpos secundarios específicos aunque sólo se puede detectar IgG y la cantidad de antígeno que se necesita es elevada (Björkman & Ugla, 1999).

#### **1.8.2. Diagnóstico del aborto causado por *N. caninum***

En el diagnóstico del aborto bovino causado por neosporosis, la historia clínica y los datos epidemiológicos pueden ser orientativos, pero el diagnóstico definitivo precisa del examen del feto en un laboratorio de diagnóstico equipado adecuadamente. En el diagnóstico laboratorial se realizan diferentes exámenes: histología e inmunohistoquímica, técnicas de PCR y serología de la madre y del feto (Tabla 8). La recogida de muestras para cada uno de los análisis debe hacerse lo antes posible después de producido el aborto. Lo idóneo es el envío al laboratorio del feto completo, si ésto no fuera posible, las muestras a remitir serían el cerebro, corazón, hígado y placenta, ya que son las localizaciones más frecuentes dónde se ha observado la presencia de lesiones y del parásito (Dubey, 2003). Estas muestras deben ser recogidas para el examen histológico e inmunohistoquímico, fijándose en formol salino tamponado al 10% y almacenándose a temperatura ambiente hasta su utilización. Las muestras destinadas para ser analizadas mediante PCR deben recogerse con sumo cuidado para evitar cualquier contaminación, ya que este tipo de técnica es muy sensible y deben conservarse congeladas. Las muestras de suero pueden obtenerse del fluido serosanguinolento acumulado en las cavidades corporales fetales y pueden almacenarse a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su estudio.

La detección del parásito o de anticuerpos específicos en el feto no determina que *N. caninum* sea la causa del aborto, ya que como ya se ha mencionado anteriormente, la mayoría de las infecciones congénitas no conducen al fallo reproductivo. Por tanto, los criterios diagnósticos para definir una infección fetal y el aborto asociado a *N. caninum*

necesitan definirse y basarse no sólo en la demostración de la infección fetal, sino también como ya se ha sugerido (Anderson et al., 2000, Jenkins et al., 2002), en la extensión e intensidad de las lesiones en el feto, la edad fetal y el estatus serológico de la neosporosis en el rebaño. La escasa concordancia observada entre las técnicas diagnósticas, subraya la necesidad de utilizar técnicas diferentes diagnósticas para aumentar la probabilidad de detectar la infección por *N. caninum* en el feto abortado (Pereira-Bueno et al., 2003).

**Tabla 8.** Diagnóstico del aborto causado por *N. caninum* en los bovinos (Ferre et al., 2003).

PROBLEMA MUESTRAS TÉCNICA RESULTADO	VACA ABORTADA		FETO ABORTADO			
	- Suero - IFI, ELISA		- Suero - IFI, ELISA, IB		- Órganos (cerebro, corazón, hígado, etc) - Examen histopatológico	
RESULTADO	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
CONCLUSIONES	<p>➤ Vaca no infectada</p> <p><u>Problema:</u> ¿existe fluctuación de anticuerpos?</p>	<p>➤ Exposición a <i>N. caninum</i> ¿Ha participado <i>N. caninum</i> en el aborto?</p> <p>-<u>Individual:</u> ELISA de avidéz (infección aguda/crónica) <u>Problema:</u> ¿recrudescencia?</p> <p>-<u>Rebaño:</u> la seropositividad en vacas abortadas es mayor que en vacas no abortadas</p>	<p>➤ No descarta la participación de <i>N. caninum</i></p> <p>- Falta de inmunocompetencia fetal - Intervalo de tiempo corto entre infección y aborto - Autólisis y degradación de Ig</p>	<p>➤ Existe infección fetal.</p> <p>- Confirmar mediante histología.</p>	<p>No se observan lesiones compatibles</p> <p>- Confirmar mediante serología materna y fetal</p>	<p>Existen lesiones compatibles</p> <p><u>Problema:</u> <i>sarcocystiosis</i> y otras</p> <p>Confirmar mediante la detección de <i>N. caninum</i></p> <p>- <u>IHQ:</u> poco sensible, problemas con fetos autolíticos - <u>PCR:</u> muy sensible y específica, eficaz con fetos autolíticos - <u>Aislamiento:</u> lento y laborioso</p>

### 1.8.2.1. Serología fetal y maternal

Para la detección de anticuerpos frente a *N. caninum* en el suero o fluidos fetales se han utilizado principalmente la prueba de IFI (Conrad et al., 1993b; Paré et al., 1995; Slotved et al., 1999) o ELISA (Paré et al., 1995; Slotved et al., 1999). Estas técnicas han presentado una baja sensibilidad (Jenkins et al., 2002) y se ha sugerido el empleo de la técnica de western-blot para aumentar la sensibilidad del diagnóstico (Söndgen et al., 2001). En la serología fetal, los puntos de corte más aceptados varían desde 1:50 (Wouda et al., 1997a) hasta 1:80 (Barr et al., 1995). 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.

La detección de anticuerpos en el feto indica la existencia de una infección por el parásito ya que no existe transmisión transplacentaria de anticuerpos de la madre al feto. Aun así, los resultados negativos en los líquidos fetales no excluyen la infección debido a: (i) la baja sensibilidad de la serología fetal; (ii) la falta de inmunocompetencia fetal (fetos de menos de cuatro meses); (iii) un intervalo de tiempo corto entre la infección y la muerte fetal o (iv) la autólisis fetal que puede degradar las inmunoglobulinas y de esta manera disminuir la cantidad de anticuerpos específicos (Barr et al., 1995; Reichel & Drake 1996; Wouda et al., 1997b; Gottstein et al., 1998; Slotved et al., 1999; Söndgen et al., 2001). Por otra parte, la detección de anticuerpos anti-*N. caninum* en los fluidos fetales no demuestra que la infección haya causado la muerte fetal porque la mayoría de terneros con anticuerpos precalostrales son clínicamente normales. Por ello, la serología fetal no puede usarse como única prueba diagnóstica para diagnosticar el aborto por *N. caninum* en fetos abortados, aunque sí como resultado complementario para confirmar la infección.

La seropositividad de la madre no es prueba suficiente para atribuir el aborto a la infección por *N. caninum* (Sager et al., 2001), aunque puede ser de gran ayuda a la hora de predecir el riesgo de aborto (Quintanilla-Gozalet al., 2000) sobre todo si el suero materno se recoge inmediatamente después de la expulsión del feto. Por otra parte, la comparación de la prevalencia de la infección en las vacas que abortan y aquellas que no lo hacen (Thurmond & Hietala, 1995b), nos puede ayudar a conocer si la neosporosis es

causa del fallo reproductivo existente. 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., 1997; 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 disminuyen considerablemente después de 2 meses de producirse el aborto (incluso hasta valores considerados negativos) y aumentan de nuevo si se produce otra gestación.

### **1.8.2.2. Examen histológico**

El principal método de diagnóstico de la infección en fetos abortados se ha basado en el examen histológico de los tejidos fetales mediante la tinción con hematoxilina y eosina. La observación de lesiones compatibles, las típicas de infecciones por protozoos (encefalitis no supurativa, miocarditis, hepatitis, placentitis, etc.) (Barr et al, 1991a, Wouda et al., 1997a), permiten emitir un diagnóstico presuntivo de aborto por neosporosis. La histología se ha utilizado como técnica de referencia aunque es necesario siempre confirmar la presencia del parásito ya que otros protozoos, como diversas especies del género *Sarcocystis*, podrían causar lesiones similares (Jenkins et al., 2002).

### **1.8.2.3. Inmunohistoquímica**

El método más utilizado para la detección de *N. caninum* es la inmunohistoquímica (Lindsay & Dubey, 1989b). En la práctica habitual, se analizan por técnicas inmunohistoquímicas los tejidos fetales que presentan “lesiones compatibles” en el examen histológico con el fin de confirmar la presencia de restos de antígeno, taquizoítos enteros o quistes con bradizoítos en los tejidos afectados. Sin embargo, la inmunohistoquímica es una técnica poco sensible para detectar parásitos en el feto debido a que existen en escaso número en los tejidos infectados y porque la demostración de los antígenos de *Neospora* mediante inmunohistoquímica depende del número de cortes histológicos realizados y del tiempo invertido en examinarlos (Wouda et al. 1997a; Boger & Hattel 2003). Además, el estado frecuentemente autolítico de los fetos puede disminuir

la precisión diagnóstica. Esta falta de sensibilidad es una de las razones por las que la inmunohistoquímica no ha sido considerada como una técnica útil en el diagnóstico de la neosporosis fetal.

#### **1.8.2.4. Detección de ácidos nucleicos de *N. caninum***

La detección del ADN parasitario en los tejidos sospechosos mediante PCR, es una de las opciones más utilizadas en el diagnóstico del aborto bovino en los últimos años. Las razones de la amplia utilización de esta técnica son obvias y se sustentan en diversos puntos, entre ellos: rapidez, tolerancia con la calidad de la muestra original, gasto relativamente bajo y facilidad de realización en un laboratorio de diagnóstico. En contraposición, su utilización práctica no ha carecido de impedimentos como el riesgo de falsos positivos debidos a contaminaciones o la necesidad de estandarización y calibración entre laboratorios.

En la práctica, la técnica de PCR ha sido utilizada principalmente en el diagnóstico del aborto bovino, aunque también en estudios de patogenia, epidemiológicos y en estudios filogenéticos. En los últimos años se han desarrollado varios métodos de PCR que utilizan diferentes secuencias diana del genoma del parásito (principalmente la región ITS1 y la secuencia Nc-5 de *N. caninum*) con diferentes modificaciones (PCR anidada o semianidada), tratando de incrementar la sensibilidad y especificidad de la técnica.

##### **1.8.2.4.1. PCR basada en la amplificación del fragmento ITS1**

Las secuencias de ITS1, ITS2 y 5.8S de *N. caninum* fueron descritas por Payne & Ellis (1996), seleccionando el fragmento ITS1 para el desarrollo de pruebas de PCR específicas de *N. caninum*, ya que esta región mostraba sólo un 80% de similitud con *T. gondii*. Las secuencias diferentes entre *N. caninum* y *T. gondii* fueron utilizadas para el diseño de dos cebadores específicos de *N. caninum* correspondientes a un fragmento de 279 pares de bases (pb), no amplificándose este fragmento ni en *T. gondii* ni en 4 especies de *Sarcocystis*. Esta PCR fue lo suficientemente sensible como para detectar 5 taquizoítos (Holmdahl & Mattsson, 1996). En los últimos años, se han diseñado varias pruebas de PCR basadas en esta región con diferentes modificaciones como una PCR anidada que ha sido empleada

en un estudio de patogenia en ovejas (Buxton et al., 1998) y en el diagnóstico de abortos bovinos (Schock et al., 2000). Esta misma PCR se aplicó para diagnosticar la infección por el parásito en fetos bovinos en la zona norte de España, obteniéndose resultados positivos en el 15,3% (9/59) (Pereira-Bueno et al., 2003). Otra PCR anidada, basada en la amplificación del fragmento ITS1 en un solo tubo, ha sido usada con éxito para el diagnóstico conjunto de *N. caninum* y *T. gondii*, analizando los cerebros en formol y en parafina de fetos bovinos positivos a la infección por inmunohistoquímica e IFI y de un perro con neosporosis. Los cebadores usados amplificaban un fragmento de 147 pb pudiendo detectarse hasta 10 fg de ADN genómico de *N. caninum* (Ellis et al., 1999b).

#### 1.8.2.4.2. PCR basada en la secuencia Nc-5

Descrita por Kaufmann et al. (1996), esta secuencia pertenece al genoma de *N. caninum* y no se encuentra en otro grupo taxonómico. La primera PCR que se diseñó sobre esta región amplificaba un fragmento de 944 pb específico de *N. caninum* detectando hasta 100 pg de genoma del parásito. Con el objetivo de aumentar la sensibilidad de esta PCR, Yamage et al. (1996) realizaron diversas combinaciones de cebadores; entre las 19 utilizadas, los pares Np21/Np6, Np21/Np4 y Np7/Np6 resultaron ser específicos de *Neospora*, obteniéndose un umbral de detección de 10 pg de genoma del parásito y el par Np21/Np6 fue capaz de detectar 1 sólo taquizoíto en 2 mg de muestra de tejido cerebral de ratón. En este caso, la longitud del fragmento resultante fue de 328 pb. Para optimizar el uso de la PCR en el diagnóstico de rutina, se ha introducido el sistema UDG (“uracil DNA glycosidase”) que elimina potenciales contaminaciones procedentes de fragmentos amplificados en reacciones previas, y el DIA (“DNA-hybridisation immunoassay”) que facilita la lectura de los resultados mediante la utilización de una sonda fluorescente de captura específica de *Neospora* (Müller et al., 1996). Los cebadores Np21plus/Np6plus amplifican un fragmento de 337 pb (Müller et al., 1996) y han sido empleados en la detección del parásito en fetos bovinos abortados (Gottstein et al., 1998; Pitel et al., 2001a; Sager et al., 2001; Söndgen et al., 2001).

Finalmente, una PCR semianidada que utiliza como cebadores Np4/Np7 y Np6/Np7 amplificando un fragmento de 275 pb de la región Nc-5 de *N. caninum*, se ha empleado sobre tejidos de 61 fetos bovinos abortados. El ADN fue obtenido de diferentes

tejidos frescos o congelados y fijados en formol y en parafina. Primeramente, los fetos se analizaron por histología e inmunohistoquímica, agrupándose en 3 grupos: positivos a las dos técnicas, positivo a la primera pero negativo a la inmunohistoquímica y negativo frente a ambas. Al procesarlos por PCR se concluyó que la probabilidad de detectar el parásito era mayor en aquellos tejidos sometidos a fijación química y en las zonas lesionadas. La PCR fue más sensible comparada con la inmunohistoquímica y debería emplearse conjuntamente con la histología para confirmar el diagnóstico de la infección (Baszler et al., 1999a). Posteriormente esta PCR semianidada se ha utilizado en estudios de aborto bovino por neosporosis en Corea (Kim et al., 2002a).

Asimismo, la región Nc-5 también se ha utilizado en la detección del parásito en infecciones experimentales en ratones. Yamage et al. (1996) probaron los cebadores Np21/Np6 en los cerebros de ratones infectados experimentalmente y posteriormente los cebadores Np21plus/Np6plus se han usado para estudiar la transmisión vertical de *N. caninum* en ratones (Liddell et al., 1999b) y en estudios de distribución (Eperon et al., 1999; Nishikawa et al., 2001b, d). Por último, una PCR cuantitativa-competitiva (QC-PCR) con los cebadores Np21/Np6 se ha empleado para estudiar los niveles de parásitos en el cerebro y pulmones de crías de ratonas infectadas experimentalmente con *N. caninum* (Liddell et al., 1999a) y una PCR cuantitativa en tiempo real para estudiar la proliferación de *N. caninum* en cultivo celular (Müller et al., 2002).

#### **1.8.2.4.3. PCR basada en el gen que codifica la proteína 14-3-3**

Este gen codifica la síntesis de una proteína de eucariotas altamente conservadas a lo largo de la evolución. Se empleó para el diseño de una PCR anidada amplificándose un segmento de 614 pb y detectando 5000 parásitos por gramo de tejido cerebral (25 taquizoítos por cada 5mg de tejido cerebral) (Lally et al., 1996a). Sin embargo esta PCR no se ha aplicado ni en estudios de patogenia ni en el diagnóstico del aborto bovino

#### **1.8.2.4.4. PCR basada en el gen nss-ARNr de los Apicomplexa**

Esta PCR utiliza como cebadores los fragmentos COC-1 y COC-2 amplificando un producto de 294 pb. Para detectar *N. caninum* y diferenciarlo de otros apicomplexa, se

diseñó una sonda específica de *N. caninum* obteniéndose un umbral de detección de 1 taquizoíta (Ho et al., 1996, 1997a, b). Este sistema se ha aplicado en estudios de patogenia y distribución del parásito en infecciones experimentales en vacas (Ho et al., 1997b).

#### **1.8.2.5. Aislamiento**

El aislamiento del parásito se realiza mediante la inoculación de tejidos o fluidos fetales en cultivo celular o en ratones. El inconveniente del aislamiento del parásito es que no es una técnica fácil y su éxito depende del número de parásitos presentes y grado de autólisis de las muestras (Conrad et al., 1993a). En principio, debe ser descartada como técnica rutinaria de diagnóstico ya que el porcentaje de aislamientos a partir de fetos bovinos con neosporosis confirmada histológicamente no supera el 2%. Los resultados mejoran cuando el aislamiento se realiza primero en ratones atímicos o defectivos en IFN- $\gamma$  y posteriormente se realiza la inoculación de los tejidos o fluidos del ratón infectado en cultivo celular.

#### **1.8.3. Diagnóstico diferencial**

Los abortos constituyen una de las mayores pérdidas económicas de la industria del ganado vacuno y la neosporosis bovina es sólo una más de las causas que deben contemplarse en el diagnóstico de los abortos bovinos. La etiología del aborto sólo se consigue diagnosticar en el 20-50% de los casos.

Entre las causas productoras de mortalidad embrionaria y aborto, las de etiología transmisible suponen más del 90% del total diagnosticadas. Entre los agentes de etiología vírica destacan dos enfermedades: la rinotraqueitis bovina infecciosa (IBR) y la diarrea vírica bovina (BVD). Entre los de etiología bacteriana: *Brucella sp.*, *Actinomyces pyogenes*, *Campylobacter foetus veneralis*, *Salmonella sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus sp.* y *E.coli*. También la listeriosis y el aborto micótico suponen 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 como son: *Tritrichomonas foetus* y *Campylobacter foetus var. venerealis*.

Por último, en el diagnóstico diferencial del aborto, aunque su demostración es más difícil, no hay que excluir aquellas causas de origen físico (traumatismo, estrés, transporte, condiciones ambientales, etc.); genético (anormalidades cromosómicas, mutaciones, factores hereditarios, etc.); tóxico (plantas, medicamentos, compuestos químicos, micotoxinas, etc.); o nutricional (déficits de vitaminas o minerales, exceso de proteína y nitrógeno no proteico, etc.).

## **1.9. PREVENCIÓN Y 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.

### **1.9.1. Tratamiento terapéutico**

Para que un fármaco fuese eficaz en el tratamiento de la neosporosis tendría que ser activo frente al parásito siendo capaz de distribuirse sistémicamente y de atravesar la barrera placentaria. Reichel & Ellis (2002) han sugerido que el tratamiento químico de reproductoras gestantes podría ser de utilidad para prevenir la reactivación de la infección durante la gestación y consecuentemente el aborto o el nacimiento de terneros congénitamente infectados. Sin embargo, los elevados costes de un posible tratamiento, la aparición de posibles resistencias y los residuos en carne o leche limitan la quimioterapia como medida de control.

La mayoría de los ensayos farmacológicos se han realizado en cultivo celular, probándose la eficacia frente a taquizoítos de 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 hidrocloreto) (Lindsay & Dubey, 1989a; Lindsay et al., 1994). 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. Recientemente se han probado *in vitro* productos naturales como la *artemisinina* (una hierba china) que inhibía la replicación intracelular de los taquizoítos (Kim et al., 2002) y el depudecin (aislado de la *Altermaria brassicicola*) que también ha mostrado tener una actividad anti-protozoaria (Kwon et al., 2003) al igual que otros extractos de hierbas como *Torilis japónica* y *Sophora flavescens* (Youn et al., 2003).

Los ensayos de eficacia farmacológicos *in vivo* son muy limitados. En la actualidad, sólo se ha probado el toltrazuril y el ponazuril en el modelo murino (Gottstein et al., 2001) obteniéndose buenos resultados. De acuerdo con estas observaciones obtenidas en el ratón, se empleó el ponazuril en un modelo experimental con terneros (Kritzner et al., 2002) no detectándose el parásito en ninguno de los animales tratados.

### **1.9.2. Inmunoprofilaxis**

Las investigaciones llevadas a cabo en los últimos años para la elaboración de una vacuna frente a *N. caninum* han incluido la evaluación de vacunas muertas, vivas o de subunidades casi siempre en el modelo murino y con resultados variables. En este sentido, Liddell et al. (1999c) vacunaron ratonas BALB/c con extracto completo de taquizoítos mezclado con el adyuvante ImmuMZXSR™ (Zonagen Inc., TX, USA) antes de la cubrición, obteniéndose una protección eficaz frente a la transmisión vertical. Sin embargo, no existen a fecha de hoy resultados sobre su eficacia en ganado bovino. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Baszler et al. (2000) donde la vacunación con antígeno soluble utilizando adyuvante completo de Freund, exacerbó la sintomatología nerviosa y originó una inadecuada respuesta inmune. Adrianarivo et al. (1999) vacunaron al ganado bovino con taquizoítos muertos emulsionados con cuatro adyuvantes diferentes

(Havlogen, Polygen, Montanide ISA 773 y una mezcla de Havlogen y Bay R-1005), detectándose una ligera respuesta inmune de base celular con el adyuvante Polygen. Sin embargo, cuando se inocularon reproductoras gestantes no se logró evitar la infección fetal (Adrianarivo et al., 2000). Lundén et al. (2002) inmunizaron ratones BALB/c con una dosis baja de taquizoítos, antígenos incluidos en ISCOMS o extracto soluble de taquizoítos mezclado con Quil A o con PBS, observándose menos lesiones en el cerebro en los grupos inmunizados con ISCOMS o Quil A. Actualmente la única vacuna frente a *N. caninum* se ha registrado en los Estados Unidos y corresponde a una vacuna inactivada, NeoGuard™, que parece no conferir un alto nivel de protección en vacas gestantes frente al aborto (Andrianarivo et al., 2000).

En lo que respecta al empleo vacunal 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, aunque presentando el problema de originar animales persistentemente infectados. En la actualidad, las investigaciones se están dirigiendo hacia el diseño de vacunas empleando diversos antígenos recombinantes. En este sentido, se ha utilizado con éxito el vector herpesvirus para expresar NcSRS2, una proteína de la superficie del taquizoíto, e inmunizar a perros (Nishikawa et al., 2000) observándose una remisión de la infección. También se ha utilizado el virus “vaccine” para clonar los antígenos NcSRS2 y NcSAG1 previniendo con éxito en ratonas la transmisión vertical (Nishikawa et al., 2001e). Sin embargo, todavía es difícil pronosticar sobre su eficacia y seguridad por los escasos trabajos de los que se dispone. Cannas et al. (2003b) vacunaron ratones con las proteínas recombinantes NcSAG1 o NcSRS2, o una combinación de las dos y con vacunas ADN de ambas proteínas. Los resultados más satisfactorios se observaron con la vacuna ADN de NcSAG1 y un recuerdo con la misma proteína recombinante NcSAG1. La vacunación con la proteína recombinante NcMIC3 en el modelo murino también ha mostrado ser eficaz en relación con el establecimiento de la infección en el SNC (Cannas et al., 2003a).

### **1.9.3. Medidas higiénico-sanitarias**

Debido a la inexistencia de un tratamiento y vacunación eficaz frente a la neosporosis bovina, los esfuerzos para el control de la infección deben dirigirse por tanto, a la instauración de medidas higiénico-sanitarias con el fin de evitar la propagación de la infección y reducir el nivel de infección. Teniendo en cuenta el ciclo biológico del parásito y sus posibles vías de transmisión, las prácticas de manejo a instaurar se han dividido en función de la transmisión vertical u horizontal.

#### **1.9.3.1. Control de la transmisión vertical**

En la actualidad la única medida para controlar la infección congénita va encaminada a reducir el efectivo infectado mediante el desecho y reposición selectivas (Thurmond & Hietala, 1995; French et al., 1999; Jensen et al., 1999). Inicialmente se recomienda estudiar la tasa de aborto presente en el rebaño; si es superior a los niveles admitidos (en torno al 3-10%) (Forar et al., 1995) se debería diagnosticar la etiología del mismo. Las medidas de control deben plantearse a nivel de rebaño y siempre en función de la tasa de seroprevalencia y aborto. La eliminación de las vacas seropositivas puede ser la medida más adecuada si la seroprevalencia es baja, 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. En los animales seropositivos podemos encontrar, al menos, dos tipos de manifestaciones que influirán en la decisión a tomar: (i) vacas con aborto o aborto repetido, las cuales se deben considerar como causa de desecho; y (ii) vacas seropositivas sin antecedentes de aborto. Es posible que estos animales actúen como portadores de la infección, por tanto, se debe evitar utilizar su descendencia para reposición. Si la vaca es de alto valor genético y se desea conservar su descendencia, se recomienda realizar una serología precalostrál y dejar para reposición sólo las crías negativas. También se ha sugerido que la transferencia de embriones de vacas seropositivas de alto valor genético a receptoras seronegativas, es una medida de control útil (Baillargeon et al., 2001; Landmann et al., 2002). Independientemente de lo expuesto, no se puede excluir que la vaca aborte, si ésto ocurre se pasaría a la categoría anterior.

### **1.9.3.2. Control de la transmisión horizontal**

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. Teniendo ésto en cuenta, se tomarían sobre todo medidas higiénicas con objeto de evitar la infección de los animales seronegativos y encaminadas a reducir la posible contaminación ambiental por las diferentes fases del parásito como: (i) eliminar los fetos, fluídos y placentas, vacas y terneros muertos, evitando que puedan ser ingeridos por los perros, lamidos por la hembra abortada o entrar en contacto con otras vacas; (ii) evitar la exposición del efectivo, del alimento (pienso, agua) y la cama a las heces de perros, manteniendo los alimentos en lugares cerrados o silos, protegiendo el forraje mediante empaquetado, etc; y (iii) controlar la población de perros y roedores principalmente en los establos.

## **2.- Planteamiento y Objetivos**

En el estudio de la patogenia como en sus posibles implicaciones diagnósticas, un punto importante a tener en cuenta, es la metodología utilizada, siendo necesaria en la mayoría de los casos la utilización de más de una técnica diagnóstica para la confirmación de la infección. El diagnóstico de la infección en fetos abortados, se ha basado en el examen histológico de los tejidos fetales mediante la tinción con hematoxilina y eosina y la observación de lesiones compatibles, típicas de las infecciones por protozoos, combinado frecuentemente con la serología maternal o fetal permitiendo así emitir un diagnóstico presuntivo de aborto por neosporosis. La localización e identificación del parásito se lleva a cabo mediante técnicas inmunohistoquímicas. Los inconvenientes de estas técnicas son varios: lesiones no patognomónicas, baja sensibilidad por el reducido número de parásitos presentes en los tejidos, difícil localización e identificación de los taquizoítos por el estado de los fetos (macerados, momificados, autolíticos, etc.) que imposibilitan muchas veces su procesado, todo ello unido a una gran laboriosidad y lentitud en su procesado. Alternativamente en los últimos años se han desarrollado diversas técnicas de PCR que han sido de gran utilidad en el diagnóstico de la infección en fetos bovinos abortados. Las ventajas de esta técnica son su elevada especificidad y sensibilidad y la capacidad de amplificar pequeñas cantidades de ADN del parásito en una gran variedad de tejidos. Además, la PCR permite la amplificación de fragmentos de ADN tan reducidos como los que en la práctica se obtienen de muestras clínicas autolíticas o sometidas a fijación química. De esta forma el desarrollo de una metodología basada en la PCR que permita la cuantificación del parásito en los diferentes tejidos del hospedador sería un instrumento útil en el estudio de la patogenia y distribución de *N. caninum* en los diversos tejidos del hospedador.

En la actualidad, el conocimiento sobre la patogenia de *N. caninum* es muy limitado, siendo de gran ayuda la utilización de modelos experimentales para el estudio de la infección por *N. caninum*. Se han realizado infecciones experimentales en la especie bovina, sin embargo existen todavía dificultades para la reproducción experimental de la enfermedad debido a la importancia de la transmisión vertical y al desconocimiento de los factores que determinan el desenlace de la infección. En este sentido, el desarrollo de un modelo murino experimental sería una herramienta útil para el estudio de los diferentes aspectos de la infección. A nuestro entender, la utilización de un modelo murino, en vez del modelo natural (ganado bovino) queda justificada en primer lugar, por la ausencia de

un modelo definido de la infección en la especie bovina, y en segundo lugar por su facilidad de manejo y estudio: tamaño pequeño, coste económico, disponibilidad de reactivos, y principios de ética animal. Sin embargo son muchos los factores que parecen influir en la receptividad del ratón a la infección, siendo necesaria la caracterización de este modelo animal.

En los fetos bovinos abortados, los órganos afectados, por frecuencia de aparición, son el Sistema Nervioso Central, el corazón y el hígado. El cerebro es el órgano donde se ha detectado una mayor cantidad de taquizoítos y quistes tisulares, aunque también se han señalado casos en los que no se han detectado parásitos en el cerebro y sí en otros órganos (Anderson et al., 1991; De Meerscham et al., 2002). Sin embargo, no se ha descrito un modelo definido en relación con la gravedad de las lesiones, la distribución del parásito y la carga parasitaria presente en cada órgano y su posible relación con la edad fetal. Por otra parte, tampoco se ha observado una correlación clara entre la presencia del parásito y la gravedad de las lesiones, normalmente los taquizoítos se localizan en focos de necrosis aunque estudios recientes no han detectado la presencia de taquizoítos en cerebros fetales con lesiones histológicas compatibles con la infección (Venturini et al., 1999; Sager et al., 2001).

En función de lo anteriormente expuesto, en el presente estudio de tesis doctoral se han planteado por una parte, el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico más sensibles y específicas capaces de detectar y cuantificar pequeñas cantidades de ADN del parásito en los tejidos, y por otra, el estudio de la patogenia del parásito en un modelo murino experimental y en fetos bovinos abortados aplicando para ello la técnica anteriormente desarrollada.

El **primer objetivo** comprendió **el desarrollo de una PCR cuantitativa en tiempo real para la detección y cuantificación de *N. caninum*** aplicada al estudio de la patogenia de la infección. Un método similar fue desarrollado para la cuantificación del ADN del hospedador con el fin de poder comparar la carga parasitaria en diferentes muestras, órganos, hospedadores y corregir la presencia de potenciales inhibidores de la PCR en las muestras. Como sistemas de cuantificación de la PCR en tiempo real se probaron el

método SYBR Green I™ y las sondas TaqMan™, seleccionándose el sistema más sensible y adecuado para la cuantificación de *N. caninum* en tejidos infectados.

El **segundo objetivo** que se planteó fue **el desarrollo de un modelo murino experimental para el estudio de la patogenia de la infección por *N. caninum***. Para su cumplimiento se propusieron dos subobjetivos:

Subobjetivo 2.1.: Estudio de los factores que afectan al desarrollo de la infección crónica por *N. caninum* en el modelo murino. En este subobjetivo se desarrolló un modelo murino experimental para el estudio de la infección por *N. caninum*. Para ello, se determinó la influencia de la estirpe murina, pautas de inmunodepresión, vías de inoculación y dosis infectivas sobre la respuesta inmune del hospedador, gravedad de las lesiones, carga parasitaria en cerebro, así como la asociación entre gravedad de la lesión y carga parasitaria en cerebro.

Una vez establecidos los factores más adecuados para la reproducción de la infección por el parásito en el modelo murino, se planteó el siguiente subobjetivo.

Subobjetivo 2.2.: Estudio de la parasitemia y distribución orgánica durante la infección aguda y crónica de *N. caninum* en el modelo murino. Se investigó la parasitemia, distribución-cuantificación orgánica del parásito, respuesta inmune del hospedador y las variaciones existentes en función del aislado utilizado.

Finalmente, el **tercer objetivo** fue **el estudio de la patogenia de la infección en el feto bovino investigando la relación distribución-carga parasitaria y el cuadro lesional en fetos bovinos abortados**. En este último objetivo se investigó en el modelo natural de la infección la presencia del parásito en los principales órganos y tejidos fetales, así como la relación con el desarrollo de lesiones, siempre en relación con las variables siguientes: edad fetal (primer, segundo y tercer periodo de gestación); y características epidemiológicas del aborto (esporádico, endémico o epidémico).

### **3.- Material y Métodos**

### 3.1. MANTENIMIENTO Y PURIFICACIÓN DE TAQUIZOÍTOS DE *N. caninum*:

En este estudio se utilizaron los siguientes aislados: NC-1 obtenido en 1988 (Dubey et al., 1988a) a partir del cerebro de un perro en los EE.UU. y NC-Liv aislado de un perro en el Reino Unido (Barber et al., 1993). Dichos aislados fueron cedidos por la Dra. E.A. Innes (Moredun Research Institute, Edimburgo, Reino Unido) y la Dra. D. J. L. Williams (Liverpool School of Tropical Medicine, Reino Unido), respectivamente.

Los taquizoítos de *N. caninum* (NC-1 y NC-Liv) se mantuvieron mediante pases en cultivos celulares de las líneas Vero y Marc-145. La línea celular Vero procede de células tipo fibroblasto de riñón de mono verde africano adulto y la Marc-145 procede de un clon de la línea MA-104 originada de células epiteliales de riñón de feto de mono verde africano (Kim et al., 1993).

#### 3.1.1. Crecimiento y conservación de las líneas celulares

Para el crecimiento de las líneas celulares se emplearon diferentes medios en función de su posterior utilización. Para el mantenimiento de las células se utilizó el medio HAM-10 (Gibco-BRL) al que se añadieron los siguientes componentes en condiciones de esterilidad: Ultrosseg al 2% (Gibco-BRL), HEPES (Gibco-BRL), penicilina/estreptomicina (100 U.I./ $\mu$ l, 100  $\mu$ g/ml) (Gibco-BRL) y suero fetal bovino (FBS) al 20% (Gibco-BRL). Para el mantenimiento y multiplicación de los taquizoítos de *N. caninum* se empleó Medio Mínimo Esencial (MEM) (Sigma), el cuál fue reconstituido con agua desmineralizada y desionizada (sistema Milli Q de Millipore). Posteriormente se añadió penicilina/estreptomicina (100 U.I./ $\mu$ l, 100  $\mu$ g/ml), suero equino inactivado (SHI) al 2-5% (Sigma) y bicarbonato sódico (2,2 g/L) (Sigma) y se esterilizó mediante un sistema de filtración (filtros Steritop GP de 0,22  $\mu$ m, Millipore).

El mantenimiento de las líneas celulares Vero y Marc-145 se realizó mediante pases seriados en cabina de flujo laminar vertical (Telstar, mod. AV-100) dos veces por semana. Para ello se sembraron  $7 \times 10^5$  y  $2 \times 10^6$  células en frascos de cultivo de 25 y 75 cm<sup>2</sup>, respectivamente (TPP). Cuando las células estaban confluentes se lavaron con PBS, y se separaron por tripsinización (solución de tripsina 200 mg/l y EDTA 500 mg/l, Sigma)

resuspendiéndose en un volumen adecuado de medio de cultivo, con incubación posterior (Forma Scientific) a 37°C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. El número y viabilidad de las células se determinó mediante dilución 1:2 en Tripán azul (Merck) al 0,05%. La viabilidad se evaluó mediante la captación selectiva de este colorante por las células con la membrana celular alterada y el recuento se realizó en un hemocitómetro (Neubauer mejorado, Brand).

Las células se criopreservaron en tubos estériles de 2 ml, resuspendiéndose para ello en medio de cultivo con dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) al 10% como crioprotector, a una concentración final de 10<sup>7</sup> células/vial. Tras 24 horas a -80°C se conservaron en tanques de nitrógeno líquido (-196°C) (Air Liquide, mod. Arpege 40). Para descongelar las células, el contenido del vial se atemperó a 37°C, se mezcló lentamente con 20 ml de medio HAM-10 y se centrifugó (600 × g, 5 minutos) para eliminar el DMSO. El sedimento se añadió al frasco de cultivo junto con medio HAM-10.

### **3.1.2. Crecimiento y conservación de los taquizoítos de *N. caninum***

Los aislados NC-1 y NC-Liv 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 CO<sub>2</sub>. El día anterior a la infección del cultivo celular con taquizoítos de *N. caninum* se sembraron las células (2 × 10<sup>6</sup> células/frasco de 75 cm<sup>2</sup>) utilizando medio de cultivo MEM con 2% de SHI. A las 24 horas, se añadieron 4 × 10<sup>6</sup> taquizoítos de *N. caninum* a cada frasco de 75 cm<sup>2</sup>. Los taquizoítos se recogieron 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 se recogió con pipetas estériles (Biotech) y, en algunos casos, se utilizaron previamente raspadores de plástico (Nunc) para despegar los restos de tapiz celular con taquizoítos en su interior. La viabilidad de los taquizoítos se evaluó mediante la captación selectiva del colorante tripán azul y para su recuento se empleó una cámara de Neubauer.

Los pases más bajos de cada uno de los aislados fueron criopreservados en Nitrógeno líquido hasta su utilización (NC-1 pase 39; NC-Liv pase 15). Para ello, el sobrenadante del cultivo celular se centrifugó a 600 × g durante 15 minutos, evaluándose

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 2 ml alcanzando una concentración final de  $10^7$  taquizoítos/ml. Finalmente, se añadió DMSO (10%) y se guardó a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, los viales se almacenaron a  $-196^{\circ}\text{C}$  en Nitrógeno líquido.

Siempre que fue necesario se descongelaron alguno de los aislados. La descongelación se llevó a cabo en baño María a  $37^{\circ}\text{C}$  resuspendiéndose el contenido del vial en 20 ml de medio MEM. Para eliminar los restos de DMSO, tóxico para el cultivo celular, se centrifugaron los viales a  $600 \times g$ , 5 min, y el sedimento se añadió al cultivo celular junto con medio MEM y SHI al 2%. Aproximadamente, transcurridos 8-10 días, comenzaron a visualizarse los primeros taquizoítos en el interior de las células.

### **3.1.3. Purificación de taquizoítos de *N. caninum***

Los taquizoítos del aislado NC-1 obtenidos en cultivo celular fueron purificados para su utilización como antígeno en la prueba de IFI, para la obtención del antígeno soluble utilizado en las diversas técnicas de ELISA empleadas y para el aislamiento del ADN del parásito empleado en las técnicas de PCR. Los taquizoítos de los aislados NC-1 y NC-Liv también se utilizaron para la inoculación en ratón.

#### **3.1.3.1. Antígeno para la prueba de IFI**

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

El sobrenadante del cultivo celular que contenía los taquizoítos se pasó primero por una aguja de  $0,8 \times 40$  mm y, posteriormente, por una aguja de  $0,5 \times 16$  mm con objeto de romper los restos de células remanentes y liberar los taquizoítos que hubiese en su interior. A continuación, los taquizoítos fueron lavados dos veces mediante centrifugación en PBS ( $600 \times g$ , 15 min) y, antes del último lavado, la suspensión de taquizoítos se pasó por un filtro de  $5 \mu\text{m}$  (Biotech) para eliminar las células y restos celulares, realizándose

posteriormente el recuento, no sólo 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.

### **3.1.3.2. Antígeno para ELISA**

Como antígeno para esta prueba se utilizaron proteínas solubles del taquizoíto de *N. caninum*. Los taquizoítos se purificaron de la misma forma que en el apartado anterior (ver apartado 3.1.3.1. Antígeno para la prueba de IFI). Tras comprobar la ausencia de células, el sedimento se guardó a -80°C hasta su uso. Las proteínas solubles se obtuvieron siguiendo un protocolo similar al descrito por Voller et al. (1976) adaptado para nuestros propósitos.

Los taquizoítos del aislado NC-1 se sometieron a dos ciclos de congelación-descongelación y, posteriormente, se resuspendieron en 4 ml de una solución 10 mM de Tris-HCl (pH 7,0) que contenía 2 mM de fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) (Sigma) como inhibidor de proteasas. Posteriormente, los taquizoítos se sonicaron (sonicador Branson, mod. Sonifier 450) utilizando 5-6 ciclos de 20 s. Durante todo el proceso la muestra se mantuvo en un baño con hielo picado para evitar su calentamiento y la consiguiente desnaturalización de las proteínas. La suspensión resultante fue centrifugada ( $12000 \times g$ , 30 min a 4°C) y el sobrenadante obtenido se dividió en alícuotas, previa determinación de la concentración de proteínas y se almacenó a -80°C.

#### **3.1.3.2.1. Determinación de la concentración de proteica**

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

### 3.1.3.3. Purificación de taquizoítos para la extracción del ADN

Los taquizoítos empleados en el aislamiento del ADN de *N. caninum* fueron del aislado NC-1 y se purificaron siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (ver apartado 3.1.3.1. Antígeno para la prueba de IFI). La viabilidad y el número de los taquizoítos se evaluaron en una cámara de Neubauer, mediante recuento por quintuplicado en una solución con 0,05% del colorante tripán azul, comprobándose al mismo tiempo la ausencia de células del cultivo. Como resultado definitivo se consideró la media de los cinco recuentos (error estándar de la media  $\leq 5\%$ ). Después de un último lavado con PBS, el sedimento que contenía los taquizoítos se guardó en tubos estériles de 1,5 ml a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### 3.1.3.4. Purificación de taquizoítos para la inoculación en ratón

La inoculación experimental de los ratones se realizó con taquizoítos de los aislados NC-1 o NC-Liv (según el caso), mantenidos en cultivo celular según se detalla en el apartado 3.1.2. Con el objetivo de preparar el inóculo, los taquizoítos del parásito se recogieron del cultivo celular al tercer-cuarto día del mismo, cuando el tapiz celular no estaba totalmente destruido y se observaron una gran cantidad de vacuolas parasitóforas y taquizoítos libres. Para desprender el tapiz celular se utilizaron raspadores de plástico (Nunc) y el contenido de cada frasco de cultivo se pasó por una aguja de  $0,8 \times 40$  mm y de  $0,5 \times 16$  mm para romper las células y liberar los taquizoítos que hubiese en su interior. A continuación, se realizó un recuento por triplicado de los taquizoítos en cámara de Neubauer, evaluándose así mismo la viabilidad, tal y como se ha descrito previamente en el apartado 3.1.2. Finalmente la dosis se ajustó con PBS a un volumen de  $200 \mu\text{l}$  por ratón.

## 3.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

En el objetivo 2: “Desarrollo de un modelo murino experimental para el estudio de la patogenia de la infección por *N. caninum*”, se utilizaron ratones hembras de 4 semanas de edad de dos estirpes distintas: no consanguíneos (ICR) y consanguíneos (BALB/c) (Criffa, Barcelona). Los animales se alojaron en jaulas de plástico, en grupos de 5 animales por jaula en el animalario del departamento de Sanidad Animal de la Facultad de

Veterinaria de la U.C.M. Se mantuvieron a una temperatura ambiente de 20°C y sometidos a un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad. El pienso y el agua se suministraron *ad libitum*.

### **3.2.1. Infección experimental del ratón con *N. caninum***

La infección experimental de los ratones se realizó con taquizoítos de *N. caninum* de los aislados NC-1 o NC-Liv, según procedía. Con el objetivo de preparar el inóculo, los taquizoítos se recogieron del cultivo celular según se detalla en el apartado 3.1.3.4. (Purificación de taquizoítos para la inoculación en ratón) ajustándose las dosis con PBS a un volumen de 200 µl por ratón. Para las inoculaciones se utilizaron jeringas de insulina con agujas de diámetro 0,5 x 16 mm y el inóculo se administró por vía i.p. o s.c., según el caso. Todas las infecciones experimentales se llevaron a cabo en un tiempo inferior a una hora desde la recogida de los taquizoítos del cultivo celular hasta su inoculación, con el fin de mantener una viabilidad óptima de los taquizoítos.

### **3.2.2. Protocolos de inmunodepresión**

Para el objetivo 2.1: “Estudio de los factores que afectan al desarrollo de la infección crónica por *N. caninum* en el modelo murino”, los ratones ICR se sometieron a tres tratamientos inmunodepresores distintos: acetato de metilprednisolona (Urbasón), ciclofosfamida (Sigma) y vinblastina (Sigma). Cuando se empleó el acetato de metilprednisolona se realizaron dos aplicaciones del fármaco, una semana antes de la infección con una dosis de 2 mg/ratón vía i.p. y el mismo día de la infección con 2,5 mg/ratón vía i.p., (McGuire et al., 1997b). En el caso de la ciclofosfamida y la vinblastina se administraron a dosis de 15-20 mg/kg y 1,2 mg/ratón por vía i.p., respectivamente, los días -30 y -9 PI.

### 3.3. EXAMEN CLÍNICO DE LOS ANIMALES, RECOGIDA Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS

#### 3.3.1. De las infecciones experimentales en ratón

Todos los ratones infectados fueron examinados diariamente, anotándose cualquier incidencia o manifestación clínica que presentaron. Asimismo, los animales que desarrollaron síntomas graves y eran incapaces de comer y beber, se sacrificaron recogiendo las muestras pertinentes. El estudio clínico se basó en la observación de los síntomas compatibles con la infección por *N. caninum* en el ratón (Lindsay & Dubey 1989d, 1990b; Lindsay et al., 1995b). De esta forma los animales se clasificaron en función de la presencia (1) o ausencia (0) de la sintomatología observada.

Con anterioridad a la recogida de muestras de los ratones, se procedió a su sacrificio en campana de CO<sub>2</sub>. De cada individuo se realizó una recogida sistemática de muestras con distintos fines.

En primer lugar e inmediatamente después del sacrificio se obtuvo sangre mediante punción intracardíaca con jeringa de insulina y aguja de diámetro 0,5 x 16 mm. Las muestras de sangre se depositaron en tubos de 1,5 ml sin EDTA para la obtención del suero o en tubos con EDTA cuando el volumen extraído (200-500 µl) se destinó al estudio de la parasitemia. Las muestras de sangre sin EDTA permanecieron 12 horas a temperatura ambiente hasta la retracción del coágulo. Finalmente, se centrifugaron a 600 x g durante 10 min recuperándose el suero, el cuál se almacenó a -80°C hasta la determinación de IgG frente a *N. caninum* por la técnica de IFI (ver apartado 3.4.1.1.1.). Las muestras con EDTA, se centrifugaron a 2000 x g durante 10 min. El sobrenadante (plasma) se conservó a -80°C hasta la determinación de los isotipos IgG1 e IgG2a mediante ELISA (ver apartado 3.4.1.2.1.). El sedimento formado por células sanguíneas se conservó no más de 24 h a 4°C hasta la extracción del ADN.

Posteriormente, se realizó la necropsia de cada individuo procediendo a la apertura de las cavidades abdominal y torácica, valorándose la presencia de lesiones macroscópicas y extrayéndose, por orden, cuando así se requirió, los siguientes órganos:

hígado, bazo, ganglios linfáticos mesentéricos e ilíacos, corazón, pulmones, ganglios mediastínicos y cervicales y cerebro. En los experimentos del subobjetivo 2.1, el hígado, el corazón, los pulmones y un hemisferio cerebral, se fijaron en formol salino tamponado al 10% hasta su procesamiento para el estudio histológico (ver apartado 3.4.2.). El otro hemisferio cerebral se destinó al estudio de la carga parasitaria por PCR cuantitativa en tiempo real y se congeló a -80°C en un tubo de 1,5 ml estéril hasta la extracción del ADN (ver apartado 3.4.3.1.2.). En el caso del subobjetivo 2.2 se recogieron todos los órganos mencionados anteriormente, exceptuando el corazón, y se conservaron a -80°C en tubos de 1,5 ml estériles hasta la extracción del ADN.

### **3.3.2. De los fetos bovinos abortados**

Las muestras fetales fueron recolectadas y remitidas a nuestra institución por los Dres. Alberto Espí, Gorka Aduriz e Ignacio Arnaiz del Laboratorio de Sanidad Animal (Gijón), Instituto de Investigación y Desarrollo Agrario (Neiker, Derio, País Vasco) y del Laboratorio de Sanidad y Producción Animal de Galicia (Lugo), respectivamente. En todos los casos, las muestras fueron recogidas en el curso de la necropsia en condiciones asépticas, valorándose, previamente, el estado general de cada feto (fresco, momificado o autolítico), la presencia de lesiones macroscópicas 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 recogieron de la cavidad torácica y abdominal utilizando una jeringa estéril. Ambos fluidos se centrifugaron a 600 x g durante 10 minutos para eliminar restos celulares y se almacenaron a -80°C para su posterior estudio. Posteriormente, se recogieron los siguientes órganos: hígado, bazo, ganglios linfáticos mesentéricos, glándulas adrenales, riñón, diafragma, ganglios linfáticos mediastínicos, pulmones, corazón, timo y encéfalo. Para el estudio mediante técnicas histológicas se tomó de 1/2 a 1/4 de cada órgano y se fijó con formol salino tamponado al 10% hasta su procesamiento. Las muestras se guardaron en recipientes debidamente identificados y se almacenaron a temperatura ambiente. Otra parte de los mismos órganos se guardó en una bolsa individual rotulada adecuadamente y se almacenó a -80°C hasta la extracción del ADN.

Las muestras de cada feto se acompañaron de una ficha individual con los datos del feto (referencia, estado del feto y edad fetal), historial de la explotación (censo, número de reproductoras útiles, raza, aptitud, tipo de monta, vacunas, número de abortos en el último año y si los abortos habían tenido lugar en un periodo inferior a tres meses) y diagnóstico diferencial con otros procesos abortivos (resultados serológicos, bacteriológicos y virológicos).

El suero de la madre y del feto abortado, siempre que fue posible, también se remitió junto con las muestras fetales. Para la obtención del suero de la madre, los tubos con la sangre entera 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 600 x g durante 10 minutos y el suero fue almacenado en tubos de 1,5 ml a -80°C hasta su posterior estudio por las técnicas serológicas: IFI y ELISA.

### **3.4. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS**

#### **3.4.1. Técnicas serológicas**

##### **3.4.1.1. IFI**

La detección de anticuerpos específicos frente a *N. caninum* mediante IFI (Trees et al., 1993) se realizó en los sueros de los ratones infectados experimentales y en los sueros de los fetos y vacas abortadas. Como antígeno se empleó taquizoítos de *N. caninum* (aislado NC-1) obtenidos de cultivo celular según se detalla en el apartado 3.1.3.1.

Inicialmente, se depositaron 8 µl de una suspensión de 10<sup>7</sup> taquizoítos formalinizados/ml, 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 (Panreac) durante 10 minutos a -20°C.

Tras la fijación, se añadió el suero problema, diluido en PBS (10 µl/pocillo), y se incubó 30 min a 37°C en una cámara húmeda. Posteriormente, los portaobjetos se lavaron

dos veces con PBS (10 min 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 min cada vez) realizándose un último lavado de 10 min con agua destilada, tras el cual, los pocillos se secaron al aire 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 x400 (Nikon, Lámpara de mercurio modelo HB-10101AF).

#### **3.4.1.1.1. Detección de IgG anti *N. caninum* en ratón**

Las diluciones de los sueros de los ratones se realizaron en PBS comenzando por una dilución 1:50 y realizándose diluciones seriadas hasta conseguir la última dilución en la cual los sueros dejaron de ser positivos.

El conjugado anti IgG de ratón unido a fluoresceína (Sigma, referencia F-0257) fue utilizado a una dilución 1:128 en una solución PBS-azul de Evans (1:10000).

Como testigo negativo de la reacción se utilizaron los sueros de los ratones inoculados con PBS y como blanco de la reacción se utilizó PBS.

#### **3.4.1.1.2. Detección de IgG anti *N. caninum* en bovino**

Los sueros problema se diluyeron en PBS comenzando por una dilución 1:16 para los líquidos fetales y en 1:250 en el caso de las reproductoras, realizándose diluciones seriadas de los mismos. Como punto de corte se consideró la dilución 1:16 y 1:250 para los líquidos fetales y sueros de las madres abortadas, respectivamente (Álvarez-García et al., 2003).

El conjugado anti IgG de bovino unido a fluoresceína (Sigma, referencia F-7887) fue utilizado a una dilución 1:150 en una solución PBS-azul de Evans (1:10000).

Como testigos negativos y positivos se emplearon sueros de fetos y de reproductoras adultas infectados naturalmente por *N. caninum* y caracterizados previamente por IFI, ELISA y western-blot procedentes del estudio de tesis doctoral de la Dra. Gema Álvarez García (Álvarez-García, 2003). También se utilizó PBS como blanco de la reacción.

### 3.4.1.2. ELISA

#### 3.4.1.2.1. Detección de IgG1 e IgG2a anti-*N. caninum* en ratón

Para la caracterización de la respuesta inmune humoral (IgG1 e IgG2a) desarrollada por los ratones inoculados experimentalmente con *N. caninum* en el subobjetivo 2.2 se utilizó un ELISA indirecto con proteínas solubles de *N. caninum* como antígeno.

Se utilizaron placas de ELISA de fondo plano (Greiner), las cuales se tapizaron con 100 µl/pocillo de antígeno soluble de *N. caninum* a una concentración de 0,5 µg/pocillo en agua destilada estéril y se incubaron durante toda la noche a 37°C. Pasado este tiempo el antígeno se fijó con 100 µl/pocillo de formol salino tamponado al 10% durante 15 min a temperatura ambiente, después, las placas se lavaron tres veces con agua destilada. El bloqueo de las placas se realizó con PBS-T-BSA (PBS con 0,05% Tween-20 y 1% de albúmina sérica bovina) durante 2 h a 37°C. Tras lavar las placas tres veces con PBS-T (PBS con 0,05% Tween-20) se añadieron 100 µl/pocillo de la muestra problema diluida 1:100 en PBS-T-BSA y se incubaron a 37°C durante 1 h. A continuación se lavaron las placas cuatro veces con PBS-T y se añadieron 100 µl/pocillo del conjugado (anti-IgG1 o anti-IgG2a de ratón obtenidas en cabra y marcadas con peroxidasa) (Southern Biotechnology) a una dilución 1:5000 en PBS-T-BSA e incubándose a 37°C durante 1 h. Después se realizaron cuatro lavados con PBS-T y se añadieron 100 µl/pocillo de la solución de sustrato preparada con 0,6 mg/ml de *o*-dihidrocloruro-diamino-fenileno (OPD, Sigma) en tampón citrato 0,05 M, pH 5 (ácido cítrico 0,1 M y fosfato disódico 0,2 M) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma) al 0,045%. Las placas se incubaron en oscuridad 30 min y la reacción enzimática se frenó con 100 µl/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. 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. Los resultados se expresaron como valores de densidad óptica (OD).

#### **3.4.1.2.2. Detección de IgG anti *N. caninum* en bovino**

Para la detección de la IgG anti *N. caninum* en los sueros de los fetos y vacas abortadas se utilizaron dos pruebas comerciales de ELISA indirecto: IDEXX S.A. (EE.UU.) (Paré et al., 1995) e HIPRA (España) (Rebordosa et al., 2000), siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. El análisis de las muestras se realizó en el Laboratorio de Sanidad y Producción Animal de Galicia (Lugo) con la colaboración del Dr. Ignacio Arnaiz.

### **3.4.2. Técnicas histológicas**

#### **3.4.2.1. Inclusión y microtomía**

Las muestras fijadas procedentes de las infecciones experimentales en ratón (subobjetivo 2.1), fueron procesadas en el Laboratorio de Histología de la Facultad de Veterinaria de León. Por su parte, las muestras fetales bovinas recogidas (objetivo 3), se procesaron en el Laboratorio de Histología del Hospital Clínico Veterinario de la Facultad de Veterinaria de la U.C.M y las procedentes del País Vasco en su lugar de origen (Neiker).

Las piezas fijadas en formol salino tamponado al 10% fueron incluidas en parafina sintética con un punto de fusión de 56°C, utilizándose un procesador automático de tejidos, con un programa de cambios automáticos de alcoholes de creciente graduación y bencenos. Los bloques fueron realizados en una unidad formadora de bloques, consola Tissue-Teck® (dispensador de parafina, consola térmica y crioconsola de Miles Scientific).

Sobre las piezas incluidas en parafina se realizaron cortes de 4 µm de grosor usando un microtomo de rotación (Leica RM 2155) con portacuchillas y cuchillas desechables. Las secciones se desparafinaron en xilol, se deshidrataron con una serie decreciente de alcoholes, y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) convencional mediante el empleo del teñidor automático (Leica ST4040). A continuación, se deshidrataron en una serie de

alcoholes y se montaron en portaobjetos usando como compuesto montador DPX® (Nustain).

#### **3.4.2.2. Determinación de la edad fetal**

La edad de los fetos analizados, además de determinarse según la distancia entre la región occipital y la base de la cola (Gjesdal, 1969) se confirmó basándose en los distintos periodos del desarrollo fetal del pulmón en el bovino de los cuales destacamos los siguientes: periodo glandular, canalicular y sacular.

El período glandular del pulmón (primer tercio de gestación) se caracteriza por la presencia de formaciones acinares tapizadas por un epitelio cúbico simple que forman pequeños lóbulos delimitados por un mesénquima muy indiferenciado. En algunas áreas del mesénquima se aprecian formaciones de luz más amplia, tapizadas por un epitelio cúbico a cilíndrico y en cuya pared se aprecia la presencia de músculo liso y cartílago (divisiones dicotómicas del árbol bronquial primitivo).

En el periodo canalicular (segundo tercio de gestación) las formaciones acinares se abren, observándose una interconexión entre ellas formando el parenquima pulmonar, constituido principalmente por alveolos y bronquiolos respiratorios, los cuales terminan de desarrollarse en la fase sacular. En esta última fase (tercer tercio) se aprecia una mayor distensión de las formaciones alveolares, observándose incluso el septo alveolar con los capilares y toda la estructura conductora (bronquial y bronquiolar). El desarrollo final del pulmón en los bóvidos se produce tras el nacimiento con la secreción del surfactante y el establecimiento del periodo alveolar, típico de los mamíferos adultos.

#### **3.4.2.3. Criterio de valoración de lesiones**

El estudio histológico de los ratones (subobjetivo 2.1.) se basó en la observación de las lesiones características provocadas por *N. caninum* en el ratón (Lindsay & Dubey 1989b; Lindsay et al., 1995b). Las muestras fueron examinadas por el Dr. Valentín Pérez Pérez (Facultad de Veterinaria de León) adaptando el siguiente criterio de clasificación: cerebro (meningitis, nódulos gliales, áreas de mineralización, granulomas y manguitos perivasculares), corazón (miocarditis), hígado (actividad portal y microgranulomas) y

pulmones (neumonía intersticial). Cada lesión se graduó en función de la intensidad que presentaba en ausente (0), leve (1), moderada (2) o grave (3). Finalmente, se calculó la media de estos valores para cada ratón y se representó la mediana de los valores correspondientes a cada grupo y órgano.

Para el estudio histológico de los fetos bovinos abortados (objetivo 3) se contó con la colaboración del Dr. Antonio Rodríguez Bertos (Servicio de Anatomía Patológica Facultad Veterinaria de Madrid) y del Dr. Bernardino Moreno Burgos (Instituto de Investigación y Desarrollo Agrario, Neiker, Derio, País Vasco). En los órganos fetales remitidos se describieron los hallazgos histopatológicos observados de acuerdo a las lesiones establecidas para la infección por *N. caninum* en la especie bovina (Barr et al., 1990; González et al., 1999) así como la presencia de fases del parásito. Las lesiones en corazón, hígado, riñón y pulmón se graduaron según la extensión e intensidad de la inflamación que presentaban en ausentes (0), leves (1), moderadas (2) o graves (3). Teniendo en cuenta que la presencia de lesiones en el SNC son las más importantes y características de la infección por el parásito, se consideraron, con el mismo baremo de intensidad establecido anteriormente, las siguientes lesiones: necrosis, infiltración de células redondas en el parénquima cerebral, manguitos perivascuales, nódulos gliales y gliosis. La clasificación global de los cambios histopatológicos en el cerebro para cada feto se realizó atendiendo al criterio descrito en la Tabla 9. Finalmente, se calculó la media de estos valores para cada feto y se representó la mediana de los valores correspondientes a cada grupo y órgano.

**Tabla 9.** Criterio considerado en la valoración de la gravedad de la lesión en el cerebro.

<b>Grado 0</b>	- Necrosis grado 0, infiltrado de células redondas <sup>a</sup> grado (0), nódulos gliales grado 0, gliosis grado 0-1
<b>Grado 1</b>	- Necrosis grado 0, infiltrado de células redondas grado 0-3, nódulos gliales grado 1-3, gliosis grado 1-3
<b>Grado 2</b>	- Necrosis grado 1 o 2 más el resto de lesiones con grado 0-3
<b>Grado 3</b>	- Necrosis grado 3 - Necrosis grado 2 con infiltrado de células redondas grado 3 y/o, nódulos gliales grado 3, gliosis grado 3

<sup>a</sup>Infiltrado de células redondas: infiltrado de mononucleares en el parénquima cerebral y manguitos perivascuales.

### **3.4.3. Técnicas genómicas y de PCR**

La detección del ADN parasitario en los tejidos fetales se realizó por una técnica de PCR (Buxton et al., 1998). Para la cuantificación del parásito en las muestras de tejido y sangre procedentes de las infecciones experimentales en ratón y órganos fetales, se empleó una PCR cuantitativa en tiempo real desarrollada en el objetivo 1. Para llevar a cabo estas técnicas de PCR se realizaron los siguientes pasos.

#### **3.4.3.1. Extracción del ADN**

Se utilizaron dos métodos de extracción diferentes según la procedencia y destino de la muestra. Para la detección del ADN de *N. caninum* por PCR anidada en muestras fetales, se empleó la resina Chelex-100. Por otra parte, cuando se requirió un ADN de elevada calidad, como en la PCR cuantitativa, el método de aislamiento que se utilizó fue una prueba comercial.

La extracción del ADN a partir de los órganos recogidos de los ratones se realizó sobre 10-20 mg de tejido fresco conservado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para el aislamiento del ADN de las muestras de tejidos fetales, con independencia del método utilizado, se realizó un macerado del órgano en PBS. Para ello se pesaron, de diferentes zonas del órgano, un total de 2-4 g y se maceraron con PBS a una dilución 1:10 en un digestor automático ("Masticator" IUL) de 2 a 5 min. El macerado se distribuyó en alícuotas de 1 ml y se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la extracción del ADN. En ganglios linfáticos, glándulas suprarrenales y diafragma no se realizaron macerados ya que la textura de estos órganos no lo permitió.

##### **3.4.3.1.1. Extracción del ADN utilizando Chelex-100**

El Chelex-100 es una resina utilizada para quelar iones metálicos polivalentes, con efectos nucleolíticos a altas temperaturas, que ha sido utilizada para el aislamiento de ADN de muestras forenses (Walsh et al., 1991).

La técnica de extracción del ADN por Chelex-100 consistió en la utilización de una solución de Chelex-100 al 5% (Bio-Rad) preparada en agua ultrapura estéril. En primer lugar, se recogieron 200 µl de esta solución bajo agitación magnética en un tubo estéril de 1,5 ml, al que se añadieron 2 µl de Proteinasa K (solución 20 mg/ml) (Sigma), 12 µl de solución 1M de Ditioneitol (DTT, Sigma) y 200 µl de la muestra macerada. A continuación, se agitó la mezcla vigorosamente durante 10 s y se incubó a 56°C durante 45 min en baño María. Pasado este tiempo, la mezcla se agitó de nuevo vigorosamente durante 10 s y se sometió a ebullición 8 min en baño María. Finalmente y después de agitar la mezcla de nuevo 10 s, se centrifugó a 12000 × g durante 8 min y se guardó a -20°C hasta su utilización. Cuando se necesitó, las muestras fueron descongeladas, se agitaron vigorosamente 10 s y se centrifugaron a 12000 × g durante 8 min, utilizando el sobrenadante para la PCR.

#### **3.4.3.1.2. Extracción del ADN utilizando una prueba comercial**

Para la cuantificación de *N. caninum* por PCR cuantitativa en muestras de tejido procedentes de las infecciones experimentales en ratón y de fetos bovinos abortados, se empleó como método de extracción una prueba comercial: "Genomic-Prep cell and tissue DNA isolation kit" (Amershan Biosciences). La extracción del ADN se realizó a partir de 10-20 mg de tejido fresco congelado (disgregado con bisturí), de 200µl de macerado biológico y de cinco cortes de 5 µm en el caso de tejidos fijados en parafina. En primer lugar, se añadieron 600 µl del tampón de lisis del ADN (suministrado en la prueba comercial) a la muestra y 3 µl de proteinasa K (solución 20 mg/ml, Sigma) y se resuspendió la mezcla mediante agitación. Seguidamente, se procedió a una incubación a 56°C en baño María durante toda la noche. Terminada la incubación se añadió 3 µl de RNAsa con una concentración de 4 mg/ml (contenida en la prueba comercial) al lisado y se incubó a 37° C durante 30 min en baño María. Posteriormente, las muestras se enfriaron en hielo y se añadieron 200 µl de una solución para la precipitación de las proteínas. Se agitó la muestra vigorosamente 20 s y se centrifugó a 13000-16000 × g durante 5 min. Las proteínas precipitadas formaron un sedimento blanquecino, el sobrenadante de las muestras se transfirió a un tubo limpio de 1,5 ml y el sedimento con las proteínas se eliminó. Finalmente, se procedió a la precipitación del ADN, para ello se añadieron 600 µl de isopropanol 100% frío (guardado a -20°C), se invirtieron las muestras 50 veces y se

incubaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 30 min para favorecer la precipitación del ADN. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 13000-16000 x g durante 15 min y se eliminó el sobrenadante, con cuidado de no desprender el ADN precipitado y que parecía como un pequeño sedimento blanquecino. El sedimento de ADN se lavó con 600  $\mu\text{l}$  de etanol al 70% frío ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) y seguidamente las muestras se centrifugaron a 13000-16000 x g durante 5 min. Después se desechó el etanol y se dejaron secar las muestras al aire hasta la completa evaporación del alcohol. El sedimento se resuspendió en 50  $\mu\text{l}$  de la solución de hidratación de ADN -TE- (suministrada en la prueba comercial) y se dejó toda la noche a temperatura ambiente hasta su completa hidratación. Por último, se midió la concentración de cada muestra mediante espectrofotometría (ver apartado 3.4.3.2.2. Cuantificación del ADN total extraído) ajustándose la concentración a 30-50 ng/ $\mu\text{l}$  en agua ultrapura estéril. Las muestras se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis.

Para la construcción de la curva patrón de *N. caninum* utilizada para la cuantificación del parásito y las pruebas de sensibilidad de la PCR cuantitativa en tiempo real, se extrajo ADN de  $10^7$  taquizoítos de *N. caninum* (aislado NC-1) empleando la misma prueba comercial y procediendo de igual forma que para los tejidos frescos.

La extracción de ADN a partir de muestras de sangre para el estudio de parasitemia en el modelo murino (subobjetivo 2.2) se llevó a cabo utilizando la prueba comercial: "Genomic-Prep cell and blood DNA isolation kit" (Amershan Biosciences). Primeramente, al sedimento de células sanguíneas, obtenido tras centrifugar las muestras de sangre y retirar el plasma, se le añadieron 900  $\mu\text{l}$  de un tampón de lisis de glóbulos rojos (contenido en la prueba comercial). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente 10 min y se centrifugaron a 13000-16000 x g durante 5 min. Seguidamente, se eliminó el sobrenadante y se obtuvo un sedimento limpio y libre de eritrocitos, el cual se resuspendió en 600  $\mu\text{l}$  del tampón de lisis de ADN al que se añadieron 3  $\mu\text{l}$  de RNAsa a 4 mg/ml al lisado, incubándose a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 min en baño María. Después, se procedió a la eliminación de las proteínas y precipitación del ADN según se ha explicado anteriormente.

### **3.4.3.2. Análisis del ADN total extraído**

#### **3.4.3.2.1. Electroforesis en geles de agarosa**

Para visualizar el ADN total extraído y comprobar la calidad del mismo (no degradado, sin ARN), se procedió a una electroforesis en agarosa siguiendo los protocolos descritos por Sambrook et al. (1989). Los geles de agarosa (Ecogen) se utilizaron a un porcentaje de 0,8% conteniendo 0,1 µg/ml de bromuro de etidio (BrEt), en tampón TBE 0,5x. Como marcador de tamaño molecular se utilizó un patrón de ADN comercial (DNA Ladder 1Kb plus, Gibco-BRL) a una concentración de 100 ng/µl en solución de carga para ADN (solución de carga x 5; EDTA 25 mM, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,01%). El ADN se visualizó mediante un sistema de captación de imágenes Gel Printer (TDI) con luz ultravioleta.

#### **3.4.3.2.2. Cuantificación del ADN total extraído**

La concentración del ADN de las muestras se determinó mediante la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro (Pharmacia-Biotech Mod.Ultrospec 3000 uv/visible spectrophotometer). Se realizó una dilución 1:100 de la muestra en agua destilada y se utilizó para su lectura una cubeta de cuarzo de 1 ml. La longitud de onda seleccionada fue de 260 nm (1 OD = 50 µg/ml de ADN) y 280 nm para determinar su pureza, calculándose la razón OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>. Valores entre 1,6 y 2 indicaron una buena calidad del ADN (Sambrook et al., 1989).

#### **3.4.3.2.3. Purificación del ADN total mediante cromatografía de filtración en gel**

Para eliminar fragmentos de ADN degradado de bajo peso molecular (< 300 pb) se utilizó una columna de cromatografía (Chroma Spin-1000, Clontech), paso previo a la PCR cuantitativa.

El equilibrado y compactación del gel de filtración se realizó por centrifugación a 700 x g durante 5 min, eliminándose el tampón TE contenido en cada columna. A

continuación, se colocó un tubo de 2 ml debajo de la columna y se pasaron 70 µl de la muestra, centrifugando la columna de nuevo a 700 x g durante 5 min. El ADN eluido fue conservado a -20°C.

### 3.4.3.3. Amplificación del ADN de *N. caninum* por la técnica de PCR

Para la detección del ADN parasitario se utilizaron dos tipos de pruebas de PCR de diferentes regiones del genoma de *N. caninum*. La primera está basada en la región Nc-5 de *N. caninum* (Kauffmann et al., 1996) y utiliza los oligonucleótidos Np6 plus y Np21 plus (Tabla 10) (Müller et al., 1996). La segunda es una PCR anidada que amplifica la región ITS1 del ADN ribosomal de *N. caninum* (Payne & Ellis, 1996) en dos reacciones utilizando cuatro oligonucleótidos específicos (Tabla 10) según describen Buxton et al. (1998).

**Tabla 10.** Cebadores utilizados en las reacciones de PCR de la región Nc-5 e ITS1.

REGIÓN Nc-5		PCR ANIDADA DE LA REGIÓN ITS1	
Np6 plus	Np21 plus	Oligonucleótidos externos	Oligonucleótidos internos
CCCAGTGCGTCCA ATCCTGTAAC	CTCGCCAGTCAAC CTACGTCTTCT	<b>NN1:</b> TCAACCTTTGAATCCCAA <b>NN2:</b> CGAGCCAAGACATCCATT	<b>NP1:</b> TACTACTCCCTGTGAGTTG <b>NP2:</b> TCTCTCCCTCAACGCT

La PCR basada en la región Nc-5 utilizando los oligonucleótidos Np6 plus y Np21 plus se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito en la bibliografía (Müller et al., 1996). La mezcla de PCR (25 µl) contenía 20 pmoles de cada oligonucleótido, 1x del tampón de PCR Gene Amp (Applied Biosystems), 200 µM de dNTPs (Sigma), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems) y 0,625 U de Amplitaq Gold® ADN polimerasa (Applied Biosystems). Las reacciones de PCR se hicieron en tubos de 0,2 ml para PCR en un termociclador Eppendorf (Modelo Gradient) según los pasos descritos en la Tabla 11.

La PCR anidada del fragmento ITS1 se llevó a cabo en dos reacciones. La mezcla para la primera reacción de PCR (50 µl) se compuso de 0,15 µM de los oligonucleótidos NN1 y NN2 (Sigma), 200 µM de dNTPs (Sigma), 1x del tampón de reacción (75 mM Tris

pH 9, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50 mM KCl,) (Biotools), 2 mM de MgCl<sub>2</sub> (Biotools) y 1,25 unidades de ADN polimerasa (Biotools). Del ADN extraído de cerebro, corazón e hígado utilizando el método Chelex-100 se utilizaron 20, 15 o 10 µl del sobrenadante, respectivamente. La segunda amplificación se realizó en un volumen de 25 µl utilizándose la mezcla descrita anteriormente, aunque en esta ocasión se emplearon los oligonucleótidos NP1 y Np2 y se añadió 0,625 unidades de ADN polimerasa (Biotools) y 4 µl del producto de la primera reacción. Las reacciones de PCR se hicieron en tubos de 0,2 ml o placas de 96 pocillos para PCR en un termociclador Eppendorf (Modelo Gradient), según las condiciones que se indican a continuación.

**Tabla 11.** Condiciones utilizadas en la reacciones de PCR de las regiones Nc-5 e ITS1.

REGIÓN Nc-5		PCR ANIDADA DE LA REGIÓN ITS1			
		Primera Amplificación		Segunda Amplificación	
1 ciclo	95°C/10 min	1 ciclo	94°C/5 min	25 ciclos	94°C/30 s
25 ciclos	94°C/1 min	25 ciclos	94°C/1 min		48°C/30 s
	63°C/1 min		48°C/1 min		72°C/30 s
	74°C/3,5 min		72°C/1 min		72°C/30 s
1 ciclo	74°C/10 min	1 ciclo	72°C/5 min	1 ciclo	72°C/5 min

En todas las reacciones se utilizaron como testigo positivo el ADN obtenido de taquizoítos de *N. caninum* y como negativo agua ultrapura estéril.

#### 3.4.3.3.1. Sensibilidad de las pruebas de PCR para la detección de *N. caninum*

Se determinó la sensibilidad de la PCR de la región Nc-5 y la del segmento ITS1 a partir del ADN purificado de taquizoítos de *N. caninum* utilizando una prueba comercial (ver apartado 3.4.3.1.2.). Para ello se realizaron diluciones decimales seriadas (en agua ultrapura estéril) del ADN equivalente a 10<sup>5</sup> hasta 10<sup>-3</sup> taquizoítos y se procedió a las amplificaciones por PCR según se ha detallado anteriormente.

### 3.4.3.3.2. Detección de los productos de las reacciones de PCR

Los productos resultantes de la PCR de la región Nc-5 (340 pb) y de la segunda amplificación de la PCR anidada (210 pb), se visualizaron en un gel de agarosa al 1,8-2% teñido con bromuro de etidio (0,1 µg/ml). En cada pocillo del gel se añadieron 15 µl del producto amplificado en solución de carga para ADN. Como marcador de tamaño molecular se utilizó un patrón de ADN comercial (DNA Ladder 1Kb plus, Gibco-BRL o DNA Ladder 100 pb, Biotools). El ADN se visualizó mediante un sistema de captación de imágenes Gel Printer (TDI) con luz ultravioleta.

### 3.4.3.4. Detección y cuantificación de *N. caninum* por PCR cuantitativa en tiempo real

La estimación de la carga parasitaria se realizó mediante una PCR cuantitativa en tiempo real desarrollada en el primer objetivo. Esta técnica se utilizó para la cuantificación de *N. caninum* y del gen 28S ARNr del hospedador. A continuación se describe la técnica tal y como se utiliza en apartados posteriores.

#### 3.4.3.4.1. Construcción de las curvas estándares

Para la construcción de la curva estándar con el fin de cuantificar el número de parásitos presentes en la muestra a analizar, se procedió a la extracción del ADN a partir de  $10^7$  taquizoítos del aislado NC-1. Posteriormente, se hicieron diluciones decimales del ADN del parásito hasta la cantidad de  $10^{-1}$  taquizoítos en ADN genómico extraído del cerebro de un ratón a una concentración de 20 ng/µl. Para la cuantificación del ADN del hospedador se construyó otra curva estándar con diluciones 1:5 de ADN genómico extraído del cerebro de un ratón (500-0,8 ng) en agua estéril ultrapura. La concentración de ADN se calculó mediante la lectura en un espectrofotómetro según lo descrito en el apartado 3.4.3.2.2.

### 3.4.3.4.2. Condiciones de la PCR cuantitativa en tiempo real y cuantificación de las muestras

Las reacciones para la cuantificación de *N. caninum* y el gen 28S ARNr se realizaron por duplicado en tubos separados en un termociclador “ABI 7700 Prism Sequence Detector” (Applied Biosystems). Cuando se utilizó SYBR Green I™ la mezcla de PCR (25 µl) consistió en 5 µl del ADN molde; 20 pmoles de cada oligonucleótido: PF20 (5'-ACTGGAGGCACGCTGAACAC-3') y PR21 (5'-AACAATGCTTCGCAAGAGGAA-3'), para la cuantificación del parásito, y PF28S (5'-TGCCATGGTAATCCTGCTCA-3') y PR28S (5'-CCTCAGCCAAGCACATACACC-3'), para la cuantificación del ADN del hospedador (Amersham Biosciences); 1x SYBR Green PCR Buffer; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 µM de dATP, dCTP y dGTP; 400 µM dUTP; 0,625 U de Amplitaq Gold® ADN polimerasa y 0,25 U de AmpErase UNG® (uracil-*N*-glicosilasa), todo incluido en el la prueba comercial “SYBR Green PCR Core” (Applied Biosystems). Cuando se probó el sistema TaqMan™ se utilizó el “kit TaqMan PCR Core” (Applied Biosystems), la mezcla de 25 µl se compuso de 200 nM de cada sonda (*Neospora*: 5'-TATGTCGTAAATCGGAGTTGCTTCTATGTGGC-3' y 28S ARNr: 5'-TACGAGAGGAACCGCAGGTTTCAGACATT-3'), 1x TaqMan PCR Buffer, 20 pmoles de cada oligonucleótido -PF21 y PR20, PF28S y PR28S- (Amersham Biosciences) y los mismos componentes citados anteriormente. Las condiciones de amplificación utilizadas para la cuantificación de *N. caninum* y del gen 28S ARNr mediante SYBR Green o TaqMan fueron las recomendadas por el fabricante según se muestra en la Tabla 12. Todas las reacciones se hicieron en placas de 96 pocillos tapadas con láminas ópticas (Applied Biosystems).

**Tabla 12.** Programa de PCR utilizado para la cuantificación de *N. caninum* y del gen 28S ARNr utilizando SYBR Green I™ o TaqMan™.

Pasos iniciales		Cada 40 ciclos	
Activación de la AmpErase®	Activación de Taq Gold® DNA polimerasa	95°C/15 s	60°C/1 min
50°C/ 2 min	95°C/10 min		

La determinación del valor de ciclo umbral o Ct y el número de copias en cada muestra se calculó mediante el programa informático “Sequence detector 7700” (Applied

Biosystems) y los datos se exportaron a Microsoft Excel para su análisis. La cuantificación de *N. caninum* y del ADN del hospedador se llevó a cabo mediante interpolación del Ct de la muestra sobre la curva estándar construida con concentraciones conocidas de ADN del parásito o del ADN genómico respectivamente, frente a los Ct correspondientes. Los resultados finales fueron expresados como número de parásitos por  $\mu\text{g}$  de ADN del hospedador.

#### **3.4.3.4.3. Sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real**

El límite de detección de la PCR cuantitativa para la cuantificación de *N. caninum* se determinó mediante diluciones decimales seriadas del ADN del parásito equivalente a  $10^{-2}$  -  $10^4$  taquizoítos en 100 ng de ADN genómico extraído de tejido cerebral.

La verificación del tamaño de los productos amplificados se determinó a través de la comparación por electroforesis del fragmento amplificado con el peso molecular del marcador de ADN 100 pb (Biotools). Asimismo, los productos de la PCR obtenidos tras amplificar el ADN del parásito se enviaron a secuenciar con el objetivo de comprobar que el producto obtenido correspondía a la región Nc-5 de *N. caninum*. Para 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® (Amersham Biosciences). Dicha prueba contiene una mezcla de dos enzimas hidrolíticas, la Exonucleasa I y la Shrimp Fosfatasa alcalina, la cuales degradan los cebadores y nucleótidos, respectivamente. Como las enzimas son activas en el tampón de la reacción de PCR, se añadió por cada 5  $\mu\text{l}$  del producto de PCR 2  $\mu\text{l}$  de la mezcla ExoSAP-IT, y todo ello se incubó a 37°C 15 min, tras este periodo, las enzimas fueron inactivadas mediante una incubación a 80°C durante 15 min. La secuenciación automatizada de las muestras fue realizada por el Centro Nacional de Biotecnología (CNB) de Madrid. La concentración de oligonucleótidos para realizar la secuenciación fue de 5 pmoles/ $\mu\text{l}$  y la de ADN 10 ng/ $\mu\text{l}$  en un volumen de 6  $\mu\text{l}$ .

Cuando se utilizó el sistema SYBR Green I y después de la amplificación de la secuencia Nc-5 de *N. caninum* se obtuvieron las curvas de fusión de los productos de la

PCR mediante un programa de incremento de temperatura de 55 a 95°C durante 20 min. El SYBR Green I se intercala inespecíficamente a cualquier doble hebra que se genere en la reacción de PCR, incluido tanto bandas inespecíficas como dímeros de oligonucleótidos. Los productos amplificados se pueden distinguir unos de otros por sus distintas temperaturas de fusión. La temperatura de fusión de un fragmento específico depende de su longitud y su contenido en G+C, de forma que pueden obtenerse curvas por cada producto amplificado. El análisis de los datos fue realizando empleando el software Dissociation curves 1.0 f. (Applied Biosystems).

#### **3.4.3.4.5. Electroforesis de los productos de amplificación de la PCR cuantitativa en tiempo real**

Los productos de la amplificación de la PCR de *N. caninum* y del gen 28S ARNr fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa de alta resolución al 3,5% (AG-7, Ecogen) en TBE x0,5 con bromuro de etidio. Como marcador de tamaño molecular se utilizó el patrón de ADN comercial "100 pb Ladder" (Biotools). Los fragmentos amplificados fueron visualizados mediante un sistema de captación de imágenes Gel Printer (TDI) con luz ultravioleta.

#### **3.4.3.5. Medidas para evitar contaminaciones**

Para prevenir posibles contaminaciones en la realización de la PCR o de la PCR cuantitativa en tiempo real, se siguieron las recomendaciones habituales (Sambrook et al., 1989). Se mantuvieron áreas y material de trabajo separado para la extracción del ADN, preparación de la mezcla de PCR, amplificación y zona de electroforesis, no trasladando nunca material de un área a otra. Para evitar la formación de aerosoles se emplearon recipientes con lejía diluida para el desecho de las puntas, se procuró abrir y cerrar los tubos delicadamente, centrifugándolos después de hervir las muestras o realizar digestiones con calor. Los guantes se cambiaron frecuentemente y siempre al cambiar de área de trabajo y se utilizaron puntas con filtro. El material empleado se limpió periódicamente y se esterilizó por radiaciones ultravioletas.

Para evitar la contaminación derivada de productos de amplificación, se empleó en la PCR cuantitativa en tiempo real el sistema uracil-N-glucosilasa® (Longo et al., 1990). Este sistema consiste en la utilización del nucleótido dUTP en vez de dTTP y de la enzima "AmpErase UNG", la cual hidroliza el enlace entre uracilo y desoxirribosa, desestabilizando la cadena e impidiendo la acción posterior de la ADN-polimerasa.

### 3.5. 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 8.02 (SAS Institute Inc.)

Para la representación de los datos, cuando se trabaja con pruebas estadísticas no paramétricas, se consideraron como medida de centralización la mediana y los percentiles (25% y 75%) como medida de dispersión.

En el apartado 4.2.6. se estimaron los coeficientes de variación (CV), necesarios para evaluar la precisión de la PCR cuantitativa desarrollada. En el cálculo del coeficiente de variación se considera la media y la desviación típica de la muestra.

$$CV = \frac{\alpha}{M} \times 100$$

$\alpha$  = desviación típica  
M = media

#### 3.5.1. Estudio de la homogeneidad

##### 3.5.1.2. Homogeneidad de un conjunto de muestras

Para comprobar la homogeneidad entre dos grupos de valores se utilizó la prueba no paramétrica *U* de Mann Whitney. La prueba no paramétrica *H* de Kruskal-Wallis se empleó para comparar más de dos grupos. Cuando se observaron diferencias estadísticamente significativas se compararon los grupos dos a dos aplicando una prueba no paramétrica de comparaciones múltiples. En este caso, un valor de  $P < 0,05/[k \times (k-$

1)/2] fue considerado como estadísticamente significativo, siendo  $k$  el número de grupos analizados.

### 3.5.1.3. Homogeneidad de dos muestras: comparación de porcentajes

La valoración de las diferencias entre porcentajes se realizó mediante la prueba estadística Chi-cuadrado ( $X^2$ ) con tablas de contingencia  $2 \times 2$  y la prueba  $F$  de Fisher cuando la cifra más baja de la tabla es menor de 5.

### 3.5.2. Concordancia entre dos pruebas diagnósticas

El grado de concordancia entre dos pruebas diagnósticas se evaluó mediante el valor  $\kappa$ , un estadístico que nos indica la proporción de concordancia potencial no debida al azar que se produce entre dos pruebas. Para el cálculo de  $\kappa$  es necesario utilizar una tabla de contingencia  $2 \times 2$  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  $\kappa$  (Tabla 13).

El estadístico  $\kappa$  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 13.** Cálculo del valor  $\kappa$ .

		PRUEBA 1		
		Positiva	Negativa	Total
PRUEBA 2	Positiva	a	b	a+b
	Negativa	c	d	c+d
	Total	a+c	b+d	a+b+c+d = n

C.O. =  $a + d / n$

C.E. =  $[(a + b) / n \times (a + c) / n] + [(c + d) / n \times (b + d) / n]$

Valor  $\kappa = (CO - CE) / (1 - CE)$

### 3.5.3. Regresión lineal

Con el fin de establecer una correlación entre variables cuantitativas 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.

### 3.5.4. Regresión logística

Para estimar la probabilidad de ocurrencia de un proceso (presencia de sintomatología) en función de ciertas variables (carga parasitaria en cerebro y aislado del parásito) se aplicó un análisis de regresión logística (ver apartados 5.2.1.5 y 5.2.2.6.). En esta técnica estadística existe una variable dependiente "Y", que en este caso es dicotómica (presencia -1- o ausencia de síntomas -0-) y una o más variables independientes "X". La probabilidad de que  $Y=1$  se expresará como  $\pi$ . La forma analítica en que la probabilidad objeto de interés se vincula con las variables independientes es la siguiente:

$$\pi = \frac{1}{1 + \exp(-\alpha - \beta_1 x_1 - \beta_2 x_2 - \dots - \beta_k x_k)}$$

Esta expresión es la que se conoce como función logística; donde  $\exp$  denota la función exponencial y  $\alpha, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k$  son los parámetros del modelo. La función exponencial  $\pi$  tomará sólo valores entre 0 y 1. Si  $\beta$  es positiva (mayor que 0) entonces la función es creciente y decreciente en el caso contrario. Un coeficiente positivo indica que  $\pi$  crece cuando lo hace la variable. El exponencial de los  $\beta_i$  se corresponde con el riesgo relativo y es una medida de la influencia de la variable  $X_i$  sobre el riesgo de que ocurra ese hecho suponiendo que el resto de las variables del modelo permanezcan constantes. Un intervalo de confianza para el exponencial de  $\beta$  que contenga el valor 1 indica que la variable no tiene una influencia significativa en la ocurrencia del suceso y, por el

contrario, valores más alejados de éste indican una mayor influencia de la variable (Walter & Duncan, 1967).

En el subobjetivo 2.2. se evaluó el efecto de la carga parasitaria en cerebro y el aislado sobre la presencia de síntomas aplicando un análisis de regresión logística. En un primer paso, el log de la carga parasitaria en cerebro y los síntomas se analizaron utilizando el siguiente modelo:  $\text{Log}(\pi/1-\pi) = \alpha + \beta_0 + \beta_1 X$ . Dónde “ $\pi$ ” es la probabilidad de la presencia de síntomas para una determinada carga parasitaria en cerebro ( $X$ ), “ $\alpha$ ” es el aislado del parásito, “ $\beta_0$ ” es la ordenada en el origen de la línea de regresión y  $\beta_1$  su pendiente. En el segundo paso, se analizaron el log de la carga parasitaria en cerebro del aislado NC-Liv utilizando el modelo 2:  $\text{Log}(\pi/1-\pi) = \beta_0 + \beta_1 X$ . Dónde “ $\beta_0$ ” muestra el valor predictivo de la carga parasitaria en cerebro sobre los síntomas.

### **3.5.5. Análisis de simulación por “bootstrap”**

Para estimar las distribuciones de la carga parasitaria obtenidas en el subobjetivo 2.2. con el aislado NC-Liv y NC-1 en los diferentes órganos, se aplicó el método estadístico de simulación “bootstrap” (ver apartados 5.2.1.5 y 5.2.2.4.). Con este método, mediante un remuestreo con reemplazamiento, se genera un elevado número de muestras aleatorias a partir de los valores observados. De esta forma, se obtiene una distribución de valores en la cual se puede calcular la dispersión (análogo del error estándar) y determinar unos límites de confianza (Bradley & Tibshirani, 1973). Según lo expuesto, se construyó un intervalo de confianza para cada aislado en cada órgano y se representaron los valores del log de la carga parasitaria presente en cada órgano (eje de abscisas) *versus* número de observaciones (eje de ordenadas) o remuestreos efectuados para cada aislado.

## **4.- Objetivo 1: Desarrollo de una PCR Cuantitativa en Tiempo Real para la Detección y Cuantificación de *N. caninum*\***

\*Los resultados de este objetivo han sido comunicados en un congreso internacional y publicados en el Journal Clinical of Microbiology:

**Collantes-Fernández, E., A. Zaballos, G. Álvarez-García, L. M. Ortega-Mora.** 2001. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted foetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. A symposium on all aspects of bovine neosporosis. Edinburgh, Scotland 13-15 September.

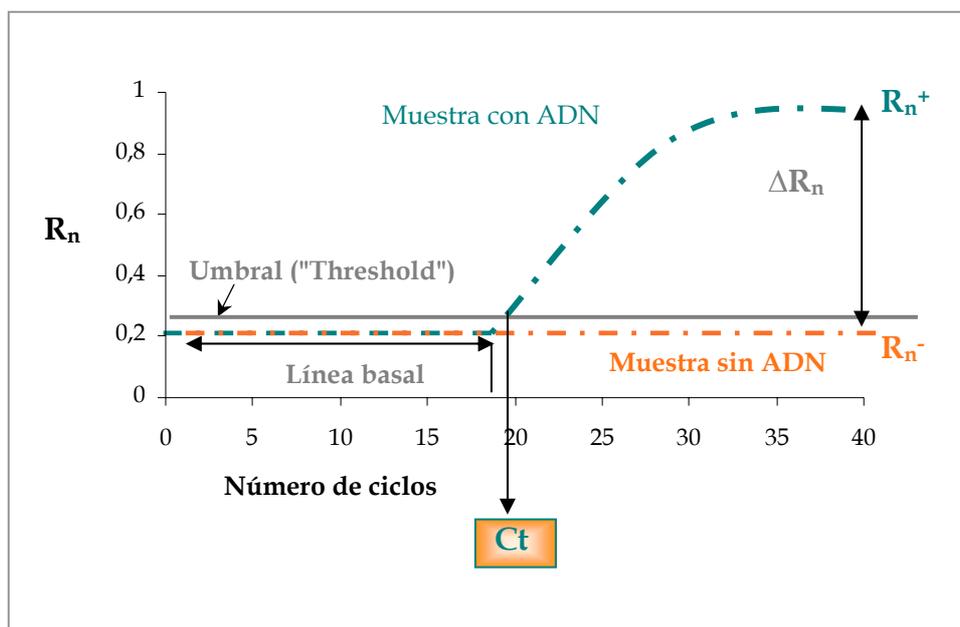
**Collantes-Fernández, E., A. Zaballos, G. Álvarez-García, L. M. Ortega-Mora.** 2002. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted foetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. J. Clin. Microbiol **40**: 1194-1198.

La técnica de PCR ha demostrado ser una herramienta útil en el diagnóstico de la infección por *N. caninum* en los fetos bovinos abortados y en el estudio de la distribución del agente etiológico en los diversos tejidos del hospedador, tanto en infecciones naturales como experimentales. Sin embargo, la PCR no permite la cuantificación de *N. caninum* en los tejidos del hospedador y hasta ahora, para el estudio de la carga parasitaria, sólo se han empleado técnicas poco sensibles, lentas y laboriosas como la inmunohistoquímica (Wouda et al., 1997a; Long et al., 1998) o una PCR semi-cuantitativa de tipo competitivo (Liddell et al., 1999a). En este sentido, el desarrollo de un método rápido y eficaz para la cuantificación de *N. caninum* en los diferentes tejidos del hospedador sería de gran utilidad. Además, este método debería presentar una elevada sensibilidad, siendo capaz de detectar bajas cargas parasitarias, y una especificidad alta, ya que en muchas ocasiones en las muestras a analizar puede estar presente otros agentes.

Recientemente, se ha desarrollado una tecnología novedosa que permite la cuantificación en tiempo real del producto amplificado en la PCR y reúne las características anteriormente mencionadas (Heid et al., 1996). El fundamento de esta técnica se basa en la existencia de una relación cuantitativa entre la cantidad del ADN molde inicial y el producto que se amplifica. Para la detección del producto de PCR que se va sintetizando en el curso de la reacción se utilizan sistemas de marcado con fluorescencia. La cantidad de fluorescencia emitida procedente del producto que se está sintetizando durante la PCR se incrementa con cada ciclo de amplificación y se mide continuamente durante la reacción de PCR, por eso se dice que la reacción está monitorizada en tiempo real. Para la detección de la fluorescencia se utiliza un termociclador con un sistema capaz de adquirir y cuantificar la señal de fluorescencia al final de cada ciclo de PCR y un programa informático para el análisis. La cuantificación se realiza durante la fase exponencial de la PCR, cuando la cantidad de fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de ADN molde inicial presente en la muestra. El termociclador detecta y representa este incremento de fluorescencia ( $\Delta R$ ) *versus* número de ciclos de la PCR. Durante los primeros ciclos de la amplificación no hay incremento de fluorescencia, es decir su valor permanece en una línea basal; cuando hay suficiente producto de doble cadena formado, se incrementa la fluorescencia y ese punto es lo que se define como ciclo umbral o Ct ("Cycle threshold") (Figura 3): ciclo en el cuál la fluorescencia supera 10 veces la desviación estándar de la media de la fluorescencia basal

en los primeros ciclos de la reacción (Heid et al., 1996). Toda muestra que alcance ese valor umbral se considera positiva. El valor del Ct es proporcional al logaritmo del número de copias inicial y es predictivo de la cantidad de ADN molde inicial. Usando patrones de concentraciones conocidos, se determina la concentración de la muestra. Para ello, se construye una curva patrón donde se representa el Ct (eje de ordenadas) frente al log de concentraciones conocidos (eje de abscisas) del ADN molde, de esta forma conociendo el valor de Ct de una muestra y por interpolación se puede averiguar la cantidad del ADN molde inicial.

**Figura 3.** Esquema de una amplificación con los términos más comúnmente usados en la PCR en tiempo real.  $R_n$  indica la intensidad de la fluorescencia,  $\Delta R_n$  la magnitud de la señal generada para cada reacción de PCR y viene dado por la siguiente fórmula:  $\Delta R_n = (R_n^+) - (R_n^-)$ . dónde  $R_n^+$  es el valor de  $R_n$  de una reacción, la cual contiene todos los componentes incluido el ADN y  $R_n^-$  el valor de  $R_n$  sin ADN o el obtenido en los primeros ciclos de la PCR en los cuales todavía no se detectan incrementos en la fluorescencia.

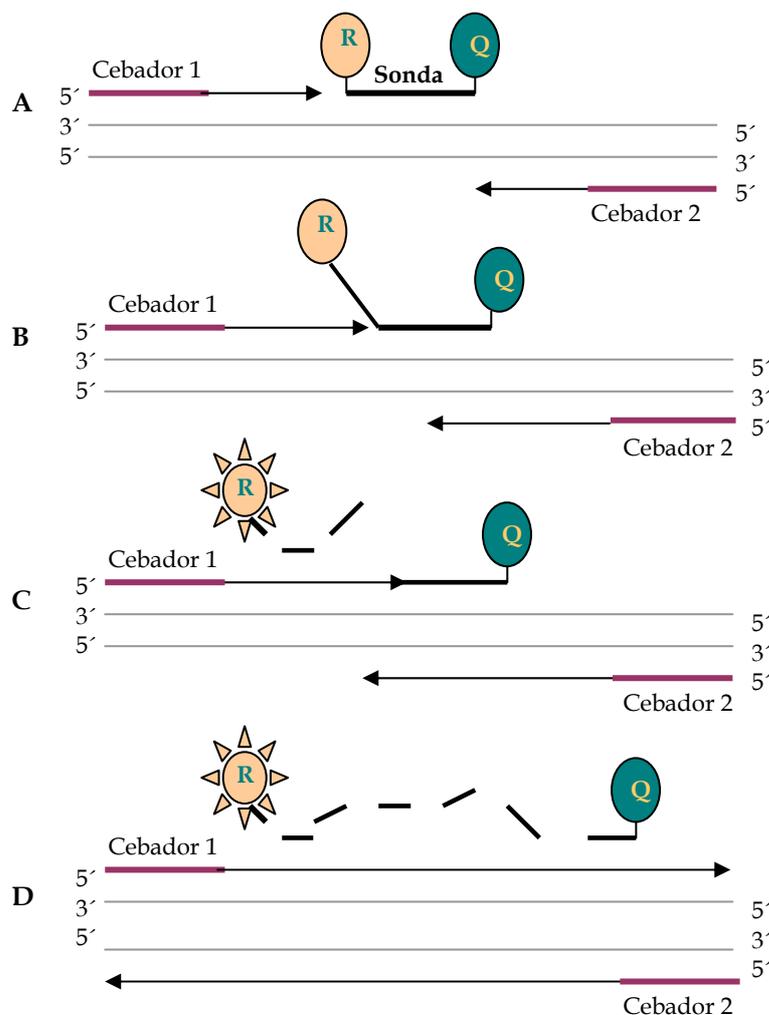


En este primer objetivo se abordó el desarrollo de una PCR cuantitativa en tiempo real para la detección y cuantificación de *N. caninum* y el ADN del hospedador en muestras clínicas, con el propósito de comparar la carga parasitaria en diferentes muestras, órganos, hospedadores y corregir la presencia de potenciales inhibidores de la PCR en las muestras.

#### 4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Como sistemas de cuantificación de la PCR en tiempo real se probaron el método SYBR Green I™ y las sondas TaqMan™ (Applied Biosystems). El SYBR Green I es un agente intercalante análogo al bromuro de etidio que se une al ADN de doble cadena recién sintetizado en cada ciclo de amplificación, produciéndose un incremento de la fluorescencia que es proporcional a la concentración del ADN. El sistema TaqMan se basa en la utilización de una sonda la cual se une a la región complementaria del ADN que se desea amplificar localizada entre los sitios de alineamiento de dos oligonucleótidos. La sonda está marcada en el extremo 5' con un fluoróforo llamado "reporter" y con otro en el extremo 3' denominado "quencher", cuya función es absorber la emisión de fluorescencia del "reporter" cuando la sonda está intacta. En la reacción de PCR, cuando el producto de amplificación está presente, los dos oligonucleótidos y la sonda se hibridan a la región complementaria del ADN. Durante la fase de extensión, la enzima Taq polimerasa por su actividad 5'-3' exonucleasa (Holland et al., 1991) hidroliza la sonda a partir del extremo 5', de esta forma la fluorescencia emitida por el "reporter" puede ser detectada, aumentando su intensidad en función del número de copias que se están amplificando (Figura 4).

**Figura 4.** Esquema del funcionamiento del sistema TaqMan. (A) Los cebadores y la sonda TaqMan, marcada en su extremo 5' con el "reporter" (R) y en el otro extremo 3' con el "quencher" (Q), están hibridados al ADN. (B) Durante la fase de extensión, la polimerasa empieza a desplazar la sonda. (C y D) La polimerasa hidroliza la sonda produciéndose la fluorescencia.



#### 4.1.1. Diseño de los oligonucleótidos y sondas

Para la cuantificación de *N. caninum* y del ADN del hospedador por PCR en tiempo real, las regiones seleccionadas para el diseño de los oligonucleótidos y las sondas fueron la región Nc-5 del genoma de *N. caninum* (Kaufmann et al., 1996) (GenBank no. X84238) y el gen 28S ARNr (GenBank no. X00525), respectivamente. Considerando la posibilidad de realizar las dos reacciones en un mismo tubo, las sondas diseñadas se marcaron con fluorocromos diferentes los cuales se registran a distintas longitudes de onda, pudiéndose

detectar la señal correspondiente a cada sonda por separado. La sonda de *N. caninum* se marcó con el fluoróforo VIC como "reporter" y la del gen 28S ARNr con 6-carboxifluoresceína (FAM), como "quencher" se empleó 6-carboxi-tetrametilrodamina (TAMRA) para ambas sondas.

El diseño de los oligonucleótidos se llevó a cabo con el programa informático "Primer Express" 1.0 (Applied Biosystems) cumpliendo una serie de requisitos sugeridos por el fabricante y expuestos a continuación. El tamaño del amplicón debe ser pequeño entre 50 y 150 pb y ambos oligonucleótidos deben estar lo más próximo posible a la sonda, pero sin solaparse con ella. Se deben evitar series de más de 3 guaninas seguidas y más de una o dos G+C entre los cinco últimos nucleótidos del extremo 3' de cada oligonucleótido, para evitar la formación de horquillas. El porcentaje de G+C debe estar entre 20 y 80%, proporcionando una  $T_m$  entre 58 y 60°C. En relación con los requisitos de la sonda, ésta debe tener una longitud de 20-40 pb para asegurar una hibridación correcta y específica. La sonda no debe llevar guaninas en el extremo 5' porque la señal del "reporter" se amortigua y se deben evitar también series de más de 3 guaninas seguidas. El porcentaje de G+C debe estar entre 20 y 80%, este rango varía con la longitud de la sonda encontrándose un compromiso entre el porcentaje de G+C y la longitud de la sonda para conseguir una  $T_m$  al menos 5°C superior a la de los oligonucleótidos.

#### **4.1.2. Determinación de la sensibilidad y especificidad de la PCR en tiempo real**

La siguiente parte del estudio comprendió la determinación de la sensibilidad y especificidad de la técnica utilizando el método SYBR Green I y las sondas TaqMan. El límite de detección de *N. caninum* fue determinado mediante diluciones decimales seriadas del ADN del parásito en 100 ng de ADN genómico (ver apartado 3.4.3.4.3.). En el caso de la PCR para el gen 28S ARNr se realizaron diluciones seriadas 1:5 de ADN genómico extraído de tejido cerebral de ratón y cuantificado por espectrofotometría. Las reacciones de *N. caninum* y el gen 28S ARNr se realizaron por duplicado en tubos separados según las condiciones reflejadas en el apartado 3.4.3.4.2. de Material y Métodos.

Con relación a la especificidad de la técnica, primeramente se procedió a la comprobación de la especificidad de los oligonucleótidos y las sondas diseñados. Sus

secuencias se compararon con todas las contenidas en la base de datos mediante un programa de alineamiento local de secuencias (BLAST “Basic Lineal Alignment Search Tool”; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>). La especificidad de la PCR de *N. caninum* fue también estudiada incluyendo en la reacción ADN de taquizoítos de *T. gondii* (cepa RH) cedido por el “Moredun Research Institute” (Edimburgo, Reino Unido). La verificación del tamaño de los productos amplificados se determinó por visualización en geles de agarosa (apartado 3.4.3.4.4.). Asimismo, los productos de la PCR obtenidos tras amplificar el ADN del parásito se secuenciaron (apartado 3.4.3.4.3.). Además, cuando se utilizó el sistema SYBR Green I, después de la amplificación de la secuencia Nc-5 de *N. caninum* se obtuvieron las curvas de fusión de los productos de la PCR para verificar la formación de un único producto de amplificación (apartado 3.4.3.4.3.)

#### **4.1.3. Optimización de la PCR cuantitativa en tiempo real para la cuantificación de *N. caninum* y del gen 28S ARNr en un solo tubo**

Se consideró la posibilidad realizar las amplificaciones de *N. caninum* y del ADN del hospedador en un mismo tubo debido a las ventajas que supondría la cuantificación de *N. caninum* y del gen 28S ARNr en una única reacción. Para ello, se utilizó el sistema TaqMan™. En este caso, son de crucial importancia la selección de las concentraciones óptimas de los oligonucleótidos y las sondas, debiendo asegurar que la amplificación de uno de los productos no interfiera o desplace la del otro y que la concentración de oligonucleótidos y sonda seleccionada sea la que proporcione el valor más alto de  $\Delta R_n$  y el menor de Ct. Cuando se empleó la sonda de *N. caninum* y la del gen 28S ARNr en un solo tubo, se probaron diferentes concentraciones de oligonucleótidos de *N. caninum* y del 28S ARNr, tanto del directo como del reverso (desde 50 nM hasta 400 nM) y la concentración de cada sonda fue de 200 nM. También se probaron diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub> (1 mM-2,5 mM).

#### **4.1.4. Aplicabilidad de la PCR cuantitativa en tiempo real**

Una vez valorado y seleccionado el sistema más sensible y adecuado en la cuantificación de *N. caninum*, la técnica desarrollada se aplicó para la cuantificación de *N. caninum* sobre diferentes muestras de encéfalo: 12 fetos bovinos abortados clasificados

como positivos o negativos de acuerdo con la observación de lesiones compatibles con la infección por el parásito; 9 ratones BALB/c infectados experimentalmente divididos en 3 grupos (ratones con y sin lesiones y testigos negativos); y, por último, 6 muestras de tejidos en parafina correspondientes a cerebros de fetos abortados y ratones infectados experimentalmente. De los ratones BALB/c dos fueron inoculados por vía s.c. con  $5 \times 10^6$  taquizoítos del aislado NC-1; dos con  $10^6$  taquizoítos inoculados por vía i.p. y otros dos ratones con  $10^6$  taquizoítos por vía s.c. Los tres ratones testigos se inocularon por vía i.p. con PBS. El método utilizado para el aislamiento del ADN de las muestras mencionadas anteriormente fue la prueba comercial "Genomic-Prep cell and tissue DNA isolation kit" (Amershan Biosciences). La cuantificación de *N. caninum* y del ADN del hospedador se llevó a cabo mediante interpolación del Ct de la muestra en la curva estándar construida con concentraciones conocidas del ADN del parásito o del ADN genómico del hospedador, respectivamente (apartado 3.4.3.4.1.), frente a los Ct correspondientes.

Todas las muestras fueron también analizadas mediante la PCR anidada de la región ITS1 del ADN ribosomal de *N. caninum* (según se ha descrito en el apartado 3.4.3.3.) que fue empleada como técnica de referencia.

#### **4.1.5. Precisión de la técnica y concordancia entre técnicas**

La precisión de la PCR en tiempo real desarrollada se estimó con una medida de repetibilidad mediante el cálculo del coeficiente de variación (apartado 3.5.). La técnica desarrollada también se comparó con la PCR anidada de la región ITS1 de *N. caninum* y con la histología, realizándose una estimación de la concordancia existente entre dichas técnicas (apartado 3.5.2.).

## **4.2. RESULTADOS**

### **4.2.1. Diseño de los oligonucleótidos y sondas**

La región seleccionada para el diseño de los oligonucleótidos y la sonda fue la correspondiente a un fragmento de 76 pb entre los pb 247 y 323 de la región Nc-5 del genoma de *N. caninum* (Kaufmann et al., 1996) (GenBank no. X84238). Para la

cuantificación del ADN del hospedador, los cebadores y la sonda se diseñaron sobre el gen 28S ARNr amplificándose un fragmento de 71 pb (GenBank no. X00525). Las secuencias de los oligonucleótidos y las sondas diseñados están reflejadas en las Figuras 5 y 6.

**Figura 5.** Fragmento de ADN de la región Nc-5 de *N. caninum* (GenBank no. de acceso X84238) seleccionado para el diseño de los oligonucleótidos y la sonda para la cuantificación de *N. caninum* por PCR en tiempo real. El oligonucleótido directo e indirecto están subrayados y en color verde y la sonda en color naranja.

```

1  ACGGGTTGCG GGGCAGGATG GACGAAGTGG CAGGAGCAGG ATGACAACGG GTTTTGGTGA
61  GGCTTCATGC GAGGTCTCGC GATGCCGTCC TCACGCATGA GGCCGGAGAA TGAGAGCGAT
121 TTCCAGGTGT CTTCTTCTG AGTCGGGTTG TGTTTGGCTG TGAAGGACAG GGTGGGTAT
181 CGCGGTGGAG CTGGGTTGCT GTGCTCGCTG GGACTTCAGG AGCGGCATCG GAGGACATCG
241 CTCACTGACT GGAGGCACGC TGAACACCGT ATGTCGTAAA TCGGAGTTGC TTCTATGTGG
301 CATTCCTCTT GCGAAGCATT GTTGGTGGAG CAGCGCAGCG GTGTTGGCTG GAGGCGGCAG
361 CAGCGAGGGA GGTGTGGTGG AGGTATAGGA GAGAGAATTT CGTGGAAGGG CGGAATGGAA
421 GGAATTGAGT GGAGGCAGGG GGGAGGGTGT GCGTCCAATC CTGTAACGTG TTGCTCTGCT
    
```

**Figura 6.** Fragmento de ADN del gen 28S ARNr (GenBank no. de acceso X00525) seleccionado para el diseño de los oligonucleótidos y la sonda para la cuantificación del ADN del hospedador por PCR en tiempo real. El oligonucleótido directo e indirecto están subrayados y aparecen en color naranja y la sonda en color verde.

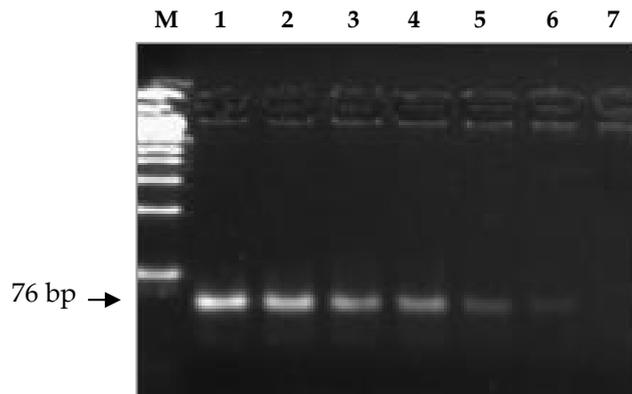
```

4081 GTCGCTTTTT GATCCTTCGA TGTCGGCTCT TCCTATCATT GTGAAGCAGA ATTCACCAAG
4141 CGTTGGATTG TTCACCCACT AATAGGGAAC GTGAGCTGGG TTTAGACCGT CGTGAGACAG
4201 GTTAGTTTTA CCCTACTGAT GATGTGTTGT TGCCATGGTA ATCCTGCTCA GTACGAGAGG
4261 AACCGCAGGT TCAGACATTT GGTGTATGTG CTTGGCTGAG GAGCCAATGG GGCGAAGCTA
4321 CCATCTGTGG GATTATGACT GAACGCCTCT AAGTCAGAAAT CCGCCCAAGC GGAACGATAC
4381 GGCAGCGCCG AAGGAGCCTC GGTGGGCCCG GGATAGCCGG GTCCCCGTCC GTCCCCTCG
4441 GCGGGGTCCC CGCGTCGCCC CGCGGCGGCG CGGGGTCTCC CCCC GCCGGG CGTCGGGACC
4501 GGGGTCCGGT GCGGAGAGCC GTTCGTCTTG GGAAACGGGG TGCGGCCGGA AAGGGGGCCG
    
```

#### 4.2.2. Sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real para la cuantificación de *N. caninum*

El límite de detección de *N. caninum* fue determinado mediante diluciones decimales seriadas del ADN del parásito en 100 ng de ADN genómico. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 3,5%, observándose una banda de 76 pb en un rango de ADN equivalente a  $10^{-1}$  hasta  $10^4$  taquizoítos (Figura 7). En las diluciones que contenían menos ADN no se observó producto de amplificación.

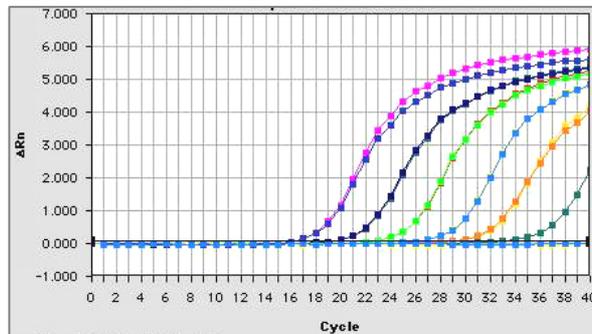
**Figura 7.** Productos de la amplificación de *N. caninum* por PCR en tiempo real en gel de agarosa al 3,5 %. Líneas 1-6: ADN del parásito equivalente a  $10^4$ - $10^{-1}$  taquizoítos en 100 ng ADN de cerebro de ratón, línea 7: ADN extraído de cerebro de un ratón no infectado y línea M: Marcador de peso molecular 100-bp DNA Ladder.



Cuando se realizó el ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real para *N. caninum* utilizando el sistema SYBR Green I, se obtuvo una curva estándar lineal con ADN equivalente a  $10^{-1}$  hasta  $10^4$  taquizoítos ( $R^2 = 0,998$ ; pendiente = -3,36). Los valores de Ct aumentaron linealmente según disminuía la cantidad de ADN del parásito (Figura 8), hasta el nivel de  $10^{-1}$  taquizoítos.

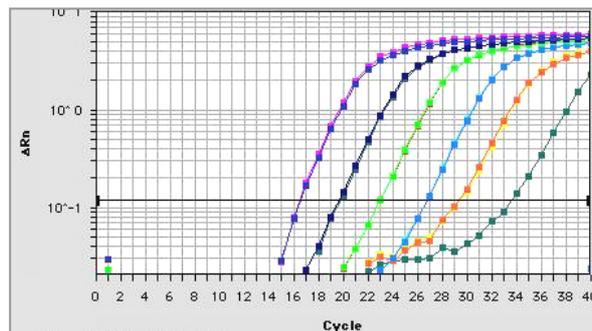
**Figura 8. (A)** Gráfica de amplificación de *N. caninum* por PCR en tiempo real que muestra la fluorescencia emitida por SYBR Green I *versus* número de ciclos de la PCR. Las señales se produjeron con  $10^4$  (izquierda) a  $10^{-1}$  (derecha) taquizoítos. La muestra equivalente a 0 taquizoítos no tuvo señal (Ct=40).

**A**



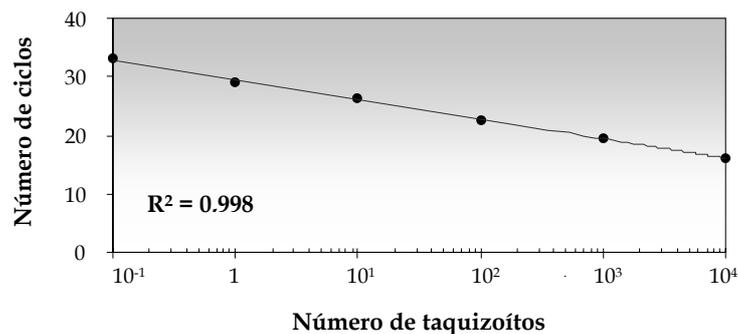
**(B)** Gráfica de amplificación de *N. caninum* que muestra el log de la fluorescencia emitida por SYBR Green I *versus* número de ciclos de la PCR.

**B**



**(C)** Curva estándar de *N. caninum* construida con los valores de Ct (eje de ordenadas) *versus* log de diluciones decimales seriadas de ADN del parásito equivalentes a  $10^{-1}$ - $10^4$  taquizoítos (eje de abscisas). Todos los puntos correspondientes a los valores de Ct representan la media de duplicados.

**C**



Cuando se empleó el método TaqMan y para el mismo valor umbral ("threshold") (0,1) se obtuvo un Ct 4 o 5 ciclos más alto que en el sistema SYBR Green I (Tabla 14) detectándose hasta 1 taquizoíto en 100 ng de ADN del hospedador. Con la dilución correspondiente a 0,1 taquizoíto no se obtuvo ninguna señal (Ct = 40).

**Tabla 14.** Valores de Ct obtenidos con la sonda TaqMan con ADN equivalente a 1 hasta  $10^4$  taquizoítos. Los valores de Ct representan la media de duplicados de un ensayo.

Número de taquizoítos	Valor de Ct
$10^4$	21
$10^3$	24,7
$10^2$	28,3
10	32,1
1	35,14

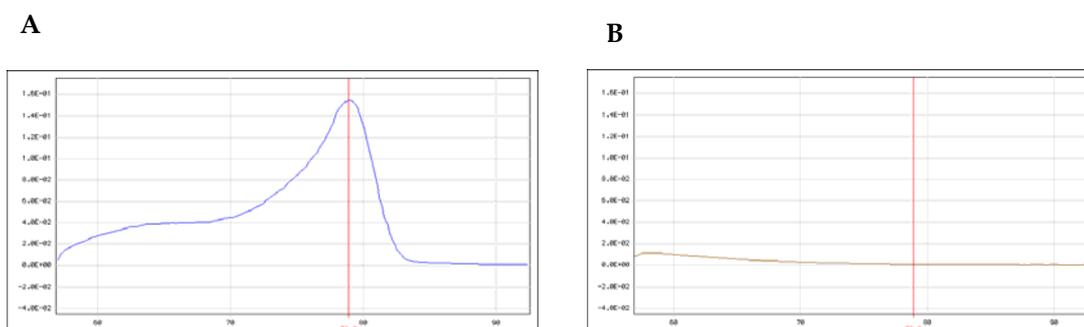
Con relación a la especificidad de la técnica, cuando se analizaron las secuencias correspondientes a los oligonucleótidos y las sondas diseñados utilizando el sistema BLAST, el programa mostró total coincidencia con la región Nc-5 de *N. caninum* y muy baja homología con otras secuencias no relacionadas.

La verificación del tamaño de los productos amplificados se determinó por electroforesis, visualizándose una única banda a la altura del tamaño esperado (76 pb). En las muestras que no contenían ADN molde o solo tenían ADN genómico (100 ng) no se observó ningún producto de amplificación. La banda observada se secuenció con el objetivo de asegurar que el producto amplificado correspondía a *N. caninum*. El resultado de la secuenciación confirmó la identidad del producto como secuencia de la región Nc-5.

La posibilidad de hibridaciones cruzadas con otros patógenos que pudieran estar presentes en muestras clínicas se aseguró utilizando el ADN de otro parásito, *T. gondii*, el cual está estrechamente relacionado con *N. caninum*, no detectándose ninguna señal o banda con el ADN equivalente a  $10^4$  taquizoítos de *T. gondii*.

Por otra parte, cuando se empleó SYBR Green, se realizó un análisis de las curvas de fusión detectándose un solo producto en las muestras con ADN del parásito equivalente a  $10^{-1}$  -  $10^4$  taquizoítos, con una temperatura de fusión de 79°C. En las muestras sin ADN del parásito no se observó ninguna curva (Figura 9).

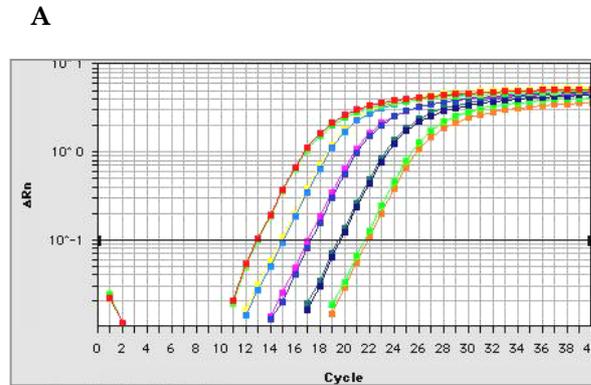
**Figura 9.** Ejemplos de las curvas de fusión correspondientes a: (A) muestra con ADN equivalente a 10 taquizoítos y (B) muestra sin ADN de *N. caninum*. En el eje de ordenadas está representada la intensidad de la fluorescencia y en el de las abscisas la temperatura (°C).



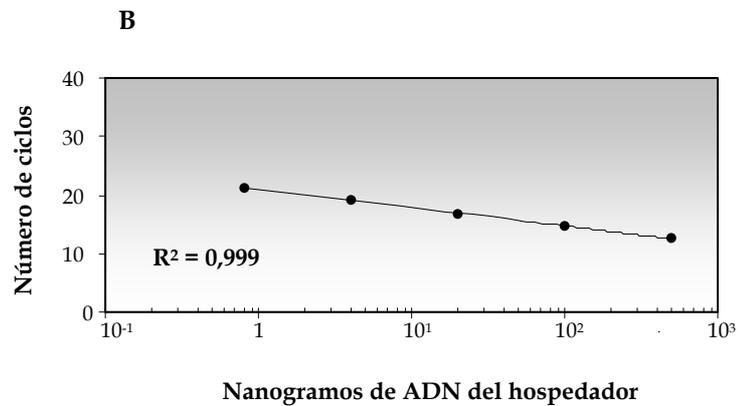
#### 4.2.3. PCR cuantitativa en tiempo real para la cuantificación del ADN del hospedador

La cantidad de ADN por muestra fue normalizada mediante la cuantificación del gen 28 ARNr por PCR cuantitativa. Para la construcción de la curva estándar se hicieron diluciones seriadas 1:5 del ADN genómico extraído de tejido cerebral de ratón y cuantificado por espectrofotometría, obteniéndose una linealidad perfecta ( $R^2 = 0,998$ ) desde 500 ng hasta 0,8 ng de ADN (Figura 10). Cantidades superiores a 500 ng inhibieron la reacción.

**Figura 10. (A)** Gráfica de amplificación del gen 28S ARNr del ADN del hospedador que muestra el log de la fluorescencia emitida por SYBR Green I *versus* número de ciclos de la PCR. Las señales están producidas con 500 ng (izquierda) hasta 0,8 ng (derecha) de ADN.



**(B)** Curva estándar del gen 28S ARNr construida con los valores de Ct *versus* log de diluciones del ADN del hospedador (0,8-500 ng).



Cuando se utilizó la sonda TaqMan y para el mismo valor umbral (0,08), los valores de Ct de la curva estándar fueron también más elevados (6 o 7 ciclos más) que cuando se empleó sistema SYBR Green I (Tabla 15).

**Tabla 15.** Valores de Ct obtenidos con la sonda 28S ARNr con 500 a 4 ng de ADN genómico extraído de tejido cerebral. Los valores dados de Ct representan la media de duplicados de un ensayo.

Nanogramos de ADN	Valores de Ct
500	18,6
100	21
20	22,6
4	24,9

#### **4.2.4. Optimización de una PCR cuantitativa en tiempo real para la cuantificación de *N. caninum* y del gen 28S ARNr en un solo tubo**

Para poner a punto esta técnica, se probaron diferentes concentraciones de oligonucleótidos de *N. caninum* y del 28S ARNr, tanto del directo como del reverso (50 nM-500 nM) y diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub> (1 mM-2,5 mM). En los primeros experimentos de optimización de la técnica se utilizaron concentraciones de oligonucleótidos de *N. caninum* y de 28S ARNr del mismo rango logrando solo detectar hasta 10<sup>3</sup> taquizoítos en 100 ng de ADN genómico. En las diluciones que contenían menos de 10<sup>3</sup> taquizoítos, la reacción se desplazó totalmente hacia la amplificación del gen 28S ARNr. Para solventar este problema se limitó la del gen 28S ARNr a 50 nM y se aumentó la concentración de oligonucleótidos y de la sonda de *N. caninum*, seleccionándose a su vez la concentración de MgCl<sub>2</sub> que había dado una mayor señal en los experimentos iniciales (2,25 M). Con estas nuevas condiciones se consiguió un límite de detección de 10<sup>2</sup> taquizoítos. En las restantes diluciones, la amplificación del ADN genómico dominó la de *N. caninum*, desplazando de nuevo la reacción. La concentración de oligonucleótidos del gen 28S ARNr no se pudo limitar más ya que concentraciones menores afectaron a la eficacia de la amplificación.

Dado que existieron diferencias de sensibilidad entre el sistema SYBR Green y las sondas TaqMan empleadas, se utilizó el SYBR Green para la cuantificación de *N. caninum* y del ADN del hospedador en los trabajos posteriores.

#### **4.2.5. Cuantificación de *N. caninum* en muestras clínicas**

La aplicabilidad de la técnica desarrollada fue probada en muestras congeladas y fijadas en parafina de cerebros procedentes de fetos bovinos abortados y de ratones BALB/c infectados experimentalmente. Algunas veces, debido posiblemente a una gran cantidad de ADN de la muestra, la reacción de PCR resultó estar inhibida, por esta razón se consideró analizar también una dilución 1:10 de todas las muestras y evitar así posibles inhibiciones que pudieran encontrarse en muestras sin diluir. Sólo la muestra que amplificó correctamente el gen 28S ARNr se sometió a la cuantificación mediante PCR cuantitativa para *N. caninum*. El número de parásitos y la cantidad de ADN presente en cada muestra se cuantificaron por interpolación de los correspondientes valores de Ct en las dos curvas estándares, una para *N. caninum* y la otra para el gen 28S ARNr. Una muestra fue considerada positiva cuando el valor de Ct fue mayor al que corresponde a  $10^{-1}$  taquizoíto, ya que esta cantidad se consideró como el límite de detección de la técnica. Los resultados finales fueron expresados como número de parásitos por  $\mu\text{g}$  de ADN del hospedador.

La cantidad extrapolada de número de parásitos/ $\mu\text{g}$  de ADN cuantificada por PCR en tiempo real varió de 2,9 a 26,6 en cerebros de fetos bovinos abortados y de 3,0 a 109,6 en muestras procedentes de ratones, según puede observarse en la Tabla 16.

**Tabla 16.** Resultados obtenidos en cerebros procedentes de muestras de fetos bovinos abortados y ratones inoculados experimentalmente analizadas por PCR en tiempo real, histología y PCR anidada para la detección de *N. caninum*.

Muestra	Tipo de tejido	Nº parásitos /µg de ADN <sup>a</sup>	Resultado de:	
			Histología <sup>b</sup>	PCR anidada
<b>Fetos</b>				
1	Congelado	0	-	-
	Parafinado	10,2		+
2	Congelado	7,5	-	+
3	Congelado	3,7	-	+
4	Congelado	2,9	-	+
5	Congelado	0	-	-
6	Congelado	0	-	-
7	Congelado	13	+	+
8	Congelado	17,4	+	+
	Parafinado	0		-
9	Congelado	26,6	+	+
10	Congelado	13,2	+	+
11	Congelado	9,7	+	+
	Parafinado	0		-
12	Congelado	0	+	+
<b>Ratones<sup>c</sup></b>				
1	Congelado	3,1	-	+
2	Congelado	0	-	-
	Parafinado	0		-
3	Congelado	0	-	-
	Parafinado	0		-
4	Congelado	3	+	+
	Parafinado	0		-
5	Congelado	109,6 <sup>d</sup>	+	+
6	Congelado	3,5	+	+
Testigos	Congelado	0	-	-

<sup>a</sup> Los valores representados son la media de dos o más ensayos.

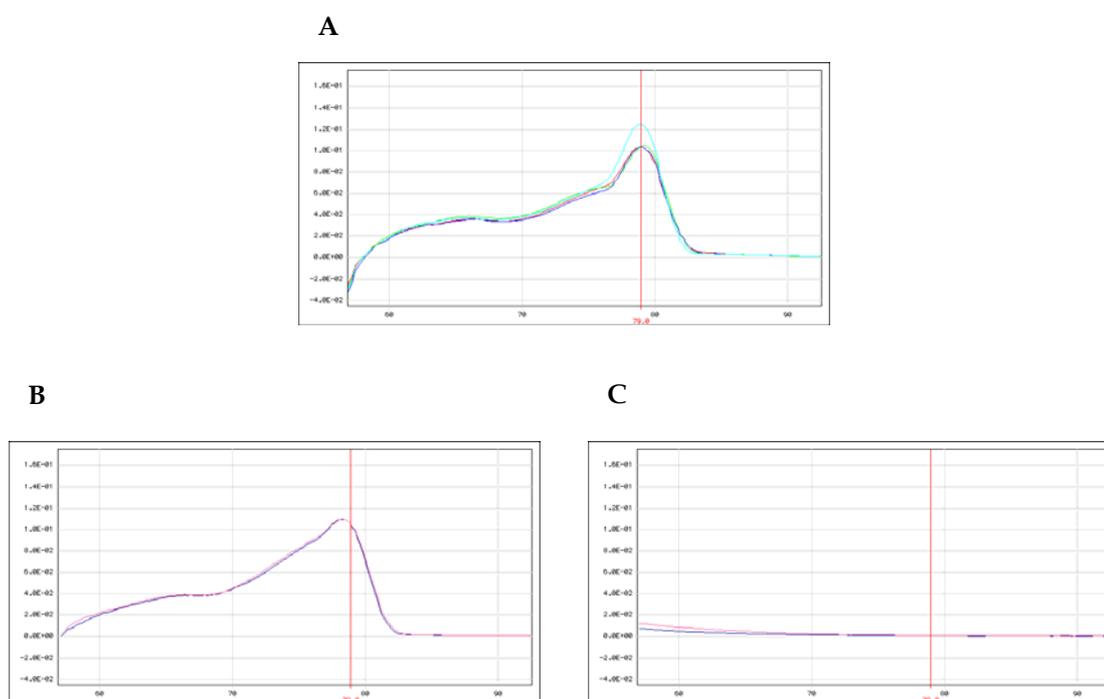
<sup>b</sup> Estudio histológico; + indica una muestra de cerebro con lesiones compatibles o características con la infección por *N. caninum*.

<sup>c</sup> Ratones nº 1 y 4 fueron infectados por vía s.c. con  $5 \times 10^6$  taquizoítos del aislado NC-1; nº 2, 6 con  $10^6$  taquizoítos por vía i.p. y ratones nº 3 y 5 con  $10^6$  taquizoítos por vía s.c.

<sup>d</sup> Durante el examen histológico se observaron quistes tisulares de origen parasitario.

El análisis de las curvas de temperatura de fusión detectó un único producto en las muestras de fetos bovinos y ratones con ADN de *N. caninum*, con una temperatura de 79,0°C y ninguno en las muestras sin ADN del parásito (Figura 11).

**Figura 11.** Ejemplos de las curvas de fusión correspondientes a: (A) feto bovino número 4 (muestra con ADN de *N. caninum*); (B) ratón número 5 (muestra con ADN de *N. caninum*); y (C) feto número 5 (muestra sin ADN del parásito). En el eje de ordenadas está representada la intensidad de la fluorescencia y en el de abscisas la temperatura (°C).



#### 4.2.6. Precisión de la técnica

La precisión de la técnica se estimó con una medida de repetibilidad mediante el cálculo del CV (ver apartado 3.5.).

Para determinar los CV interensayo de la PCR cuantitativa de *N. caninum* se hicieron seis ensayos idénticos con ADN de  $10^{-1}$  a  $10^4$  taquizoítos en 100 ng de ADN genómico. Los CV de los valores de Ct fueron mayores en las muestras con ADN equivalente a 0,1 taquizoíto (Tabla 17).

**Tabla 17.** Repetibilidad de la PCR en tiempo real de *N. caninum* en muestras con ADN de  $10^{-1}$  a  $10^4$  taquizoítos.

Número de taquizoítos	Valores de Ct <sup>a</sup>		
	Media	DS	CV % <sup>b</sup>
10 <sup>4</sup>	16,42	0,23	1,41
10 <sup>3</sup>	19,51	0,31	1,58
10 <sup>2</sup>	22,61	0,40	1,78
10	26,47	0,26	0,97
1	29,03	0,30	1,03
10 <sup>-1</sup>	32,95	0,63	1,91

<sup>a</sup> Los valores dados corresponden a la media de los duplicados de seis ensayos diferentes de PCR en tiempo real

<sup>b</sup> CV, coeficiente de variación interensayo

El CV interensayo de la PCR cuantitativa del gen 28S ARNr se calculó en tres ensayos independientes obteniendo los valores que se reflejan en la tabla 18.

**Tabla 18.** Repetibilidad de la PCR en tiempo real del gen 28S ARNr en muestras con ADN genómico desde una concentración de 500 hasta 0,8 ng.

Nanogramos de ADN	Valores de Ct <sup>a</sup>		
	Media	DS	CV% <sup>b</sup>
500	12,38	0,18	1,45
100	14,55	0,08	0,56
20	16,6	0,21	1,26
4	18,83	0,36	1,94
0,8	21,24	0,11	0,53

<sup>a</sup> Los valores dados corresponden a la media de los duplicados de tres ensayos diferentes de PCR en tiempo real

<sup>b</sup> CV, coeficiente de variación interensayo

Por último se estimó la repetibilidad de la de la PCR cuantitativa de *Neospora* y del gen 28S ARNr en muestras clínicas. Para ello se cuantificaron seis muestras de fetos

bovinos y tres de ratones en tres ensayos independientes bajo las mismas condiciones (Tabla 19).

**Tabla 19.** Repetibilidad de la PCR en tiempo real de *N. caninum* y el gen 28S ARNr en muestras de encéfalo de fetos bovinos abortados y ratones infectados experimentalmente con el parásito.

N° de muestra	Número de parásitos <sup>a</sup>			µg de ADN del hospedador		
	Media	DS	CV% <sup>b</sup>	Media	DS	CV% <sup>b</sup>
<b><u>Fetos</u></b>						
1	0	0	0	21,9	0,8	3,5
2	13,3	0,6	4,3	1,7	0,1	5,4
3	16,7	3,1	18,3	4,6	0,8	17,6
4	43,3	12,7	29,2	14,9	0,8	5,1
7	36	1,0	2,8	2,8	0,2	8,3
10	46	8,5	18,6	3,5	0,4	13,0
<b><u>Ratones</u></b>						
1	22,7	4,2	18,4	7,4	1,2	16,7
4	19,7	7,2	36,8	6,6	1,5	22,9
5	265,3	18,1	6,8	2,4	0,2	10,5

<sup>a</sup> Los valores dados corresponden a la media de los duplicados de tres ensayos diferentes de PCR en tiempo real

<sup>b</sup> CV, coeficiente de variación interensayo.

#### **4.2.7. Comparación de la PCR en tiempo real, PCR anidada y análisis histológico**

El estudio se realizó en las muestras congeladas de los cerebros procedentes de doce fetos bovinos abortados y seis ratones BALB/c. Las dos técnicas que presentaron una mayor concordancia fueron la PCR en tiempo real y la PCR anidada, con una concordancia casi perfecta ( $\kappa = 0,86$ ). Sin embargo cuando la histología fue comparada con la PCR cuantitativa y la PCR anidada, solo se obtuvo un moderado grado de concordancia ( $\kappa = 0,44$  y  $0,55$ , respectivamente) y en varias muestras de cerebro sin lesiones se detectó ADN de *N. caninum*.

### 4.3. DISCUSIÓN

En el presente objetivo se ha desarrollado y estandarizado una PCR en tiempo real para la cuantificación de *N. caninum* en tejidos infectados del hospedador. La cuantificación del parásito en diferentes tejidos es de gran utilidad en el estudio de la patogenia de la neosporosis, así como en la evaluación de vacunas o medidas terapéuticas para el control de la infección por *N. caninum* en los hospedadores naturales y en modelos experimentales.

Las técnicas empleadas hasta ahora en la cuantificación de *N. caninum* en tejidos han sido las técnicas inmunohistoquímicas y una PCR cuantitativa de tipo competitivo. La inmunohistoquímica es una técnica laboriosa, tediosa, poco sensible (Dubey & Lindsay, 1996; Wouda et al. 1997b; Gottstein et al., 1998) y requiere para su interpretación de personal experimentado. En la PCR cuantitativa competitiva se analizan los productos de amplificación al final de la reacción de PCR. En este punto, las diferencias entre el producto amplificado y la concentración inicial pueden ser importantes, debido principalmente a una reducción de la síntesis del producto por el agotamiento de los componentes de la reacción y a una acumulación de los posibles efectos inhibitorios presentes en la reacción de PCR. Además, la cuantificación en la etapa final de la PCR requiere manipulaciones después de la reacción para valorar la intensidad relativa del producto mediante revelado en geles de electroforesis, aumentando el riesgo de contaminaciones y el tiempo empleado, lo que conlleva una limitación en el número de muestras que se pueden analizar. El uso de la PCR en tiempo real posee numerosas ventajas sobre las técnicas de PCR convencionales, como por ejemplo, la amplificación, detección y cuantificación del producto en un mismo proceso, posibilitando el análisis de un elevado número de muestras y obviando la necesidad de manipulaciones después de la PCR, reduciendo así el riesgo de posibles contaminaciones.

Actualmente, son varios los sistemas utilizados para la cuantificación por PCR en tiempo real (Bell et al., 2002), entre ellos está el SYBR Green I, que es una sustancia que se intercala en la doble cadena del ADN emitiendo fluorescencia; o los sistemas que utilizan la actividad 5'-3' exonucleasa de la ADN polimerasa para hidrolizar una sonda, como las sondas TaqMan o las sondas "molecular beacons" con forma de horquilla. Otros sistemas

que podemos encontrar son: las sondas "dual hybridization probes", dos sondas que se enfrentan al alinearse y que al excitarse una molécula (donante), situada en el extremo 3' de una de las sondas, transfiere una energía ("fluorescence resonance energy transfer": FRET) al receptor, emplazado en el extremo 5' de la sonda adyacente, emitiendo una fluorescencia; "Bi-probes", que también utilizan la tecnología FRET pero sólo con una sonda marcada como receptor y el SYBR Green I actuando como donante; y oligonucleótidos modificados como "Sunrise primers" que son adaptaciones de las sondas "molecular beacons" o "Scorpion Primer" en forma de horquilla con un "quencher" y un fluoróforo.

En Parasitología, los métodos más utilizados para la cuantificación de ADN han sido las sondas TaqMan empleadas, entre otros, en *T. gondii* (Jauregui et al., 2001; Lin et al., 2000; Kupferschmidt et al., 2001) y *Plasmodium falciparum* (Hermsen et al., 2001); y las "dual hybridization probes" usadas, por ejemplo, para la monitorización de reactivaciones en *T. gondii* (Costa et al., 2000) y la estimación de la proliferación *in vitro* de *N. caninum* (Müller et al., 2002). En nuestro estudio se ha evaluado la utilización de SYBR Green I y las sondas TaqMan, ya que cuando se planteó el estudio eran los métodos más conocidos y utilizados así como en los que se tenía una mayor experiencia.

Con independencia del sistema utilizado, se eligió para el desarrollo de la PCR en tiempo real la secuencia Nc-5 de *N. caninum* por varias razones: esta secuencia aparentemente no se ha encontrado en otros órdenes taxonómicos; es una secuencia repetitiva (Kaufmann et al., 1996; Yamage et al., 1996); y, finalmente, ha mostrado una sensibilidad excelente cuando se ha usado en la PCR cuantitativa-competitiva desarrollada para la cuantificación de *N. caninum* en ratones (Liddell et al., 1999a) y en PCR convencional utilizada en el diagnóstico de fetos bovinos abortados (Baszler et al., 1999a; Gottstein et al., 1998; Sager et al., 2001). En la PCR en tiempo real utilizando SYBR Green I, se logró detectar hasta 0,1 taquizoito por reacción en 100 ng de ADN del hospedador, lo cual equivale aproximadamente a 10 fg de ADN del parásito. Además, las diferencias existentes entre los valores de Ct de las muestras con 0,1 taquizoito y muestras sin ADN o negativas (33 *versus* 40) permitieron una discriminación precisa entre tejidos infectados o no infectados. Esta sensibilidad es comparable a la señalada para una PCR en tiempo real para la cuantificación de *T. gondii*, donde se detectaron 0,05 parásitos por

reacción (Lin et al., 2000) y a otros protocolos de PCR de *N. caninum* basados en la región Nc-5, como la PCR cuantitativa-competitiva (1 parásito/0,45 mg de tejido de ratón) (Liddell et al., 1999a) o una PCR convencional, donde el límite de detección fue de 1 taquizoíto en la presencia de 2 mg de tejido cerebral (Yamaga et al., 1996). Cuando se empleó el método TaqMan, se logró detectar 1 parásito en 100 ng de ADN del hospedador, aunque este límite no se consiguió alcanzar en todas las ocasiones. Debido al reducido número de parásitos presentes en los tejidos infectados por *N. caninum* y a que hubo diferencias de sensibilidad entre el sistema SYBR Green I y TaqMan, se decidió utilizar el SYBR Green I para la cuantificación de *N. caninum*. El SYBR Green I presenta la ventaja sobre las sondas TaqMan de no requerir el uso de sondas de hibridación lo que facilita enormemente su aplicabilidad y disminuye los costes de la síntesis y marcado de las sondas. La limitación principal del SYBR Green I es su falta de especificidad, ya que se une a cualquier doble cadena de ADN, incluyendo dímeros de oligonucleótidos. Para mejorar la sensibilidad y especificidad de la PCR se realizó de manera automática el procedimiento denominado "hot start" utilizando para ello la enzima Amplitaq Gold® ADN Polimerasa (Applied Biosystems) evitando, de esta forma, la formación de productos inespecíficos o dímeros de oligonucleótidos. En nuestro caso, no se obtuvo ninguna señal con ADN de *T. gondii*, ni con ADN genómico de tejido cerebral. Además, como puede observarse en la Figura 7, no se perciben bandas de ADN inespecíficas ni dímeros de oligonucleótidos, observándose una única banda con el tamaño esperado (76 pb) en las muestras que contienen ADN del parásito. Además en el análisis de las curvas de fusión, sólo detectamos un único producto con una temperatura de 79°C.

Por otra parte, las variaciones en la cantidad y calidad del ADN extraído procedente de muestras de diferente origen (congelado *versus* parafinado, bovino *versus* murino) pueden afectar a una cuantificación directa en términos de número de parásitos por cantidad de ADN del hospedador. Con el objetivo de obtener una medida indirecta de la cantidad de ADN analizado, que permitiera una comparación adecuada del número de parásitos por muestra en diferentes hospedadores o tejidos, se desarrolló en paralelo una PCR en tiempo real utilizando el gen 28S ARNr para la cuantificación del ADN del hospedador en la muestra. La combinación de diversos factores como una alta conservación de este gen entre las especies de hospedadores, su presencia en la especie bovina y murina así como su alto número de copias, hicieron del gen 28S ARNr un buen

candidato para nuestro ensayo. Además, la amplificación de este gen compensaría la presencia de potenciales inhibidores presentes en las muestras y excluiría falsos negativos debidos a una pobre calidad del ADN. Otro criterio para el diseño de los oligonucleótidos correspondientes a la región Nc-5 de *N. caninum* y al gen 28S ARNr fue que amplificaran un fragmento de pequeño tamaño, ya que las muestras de fetos frecuentemente están autolíticas o se conservan durante tiempo fijadas en formol o en parafina, por lo que el ADN podría estar degradado (Ellis, 1998).

La técnica desarrollada para cuantificar *N. caninum* en tejidos fue aplicada sobre muestras de cerebros de hospedadores natural y experimentalmente infectados. El SNC es el órgano más frecuentemente parasitado por los dos estadios de *N. caninum* en el hospedador intermediario y donde, con más continuidad se detectan lesiones específicas o compatibles en fetos bovinos abortados por neosporosis (Barr et al., 1990; Baszler et al., 1999a; Hattel et al., 1998) y en ratones infectados experimentalmente (Lindsay et al., 1995b; Long et al., 1998). En este sentido, la carga parasitaria observada en cerebro procedente de los ratones infectados experimentalmente fue similar a la observada en los cerebros de los fetos bovinos infectados naturalmente, lo que sugiere que el ratón podría ser un modelo de laboratorio apropiado para estudiar la distribución y carga de *N. caninum*.

La presencia del ADN del parásito en las muestras examinadas por PCR en tiempo real se confirmó en la mayoría de las muestras por una PCR anidada y se observó una alta concordancia entre ambas técnicas de PCR. Los resultados discrepantes (Feto n° 12) podrían deberse a un número muy bajo de parásitos detectados sólo por técnicas altamente sensibles, como la PCR anidada. Cuando ambas técnicas se compararon con la histología, solo se observó una débil concordancia, ya que se detectó ADN del parásito en varias muestras sin lesiones. Esta menor sensibilidad de la técnica histológica frente a las de PCR puede ser debida a un mal estado de la muestra (autolítica) o al proceso de muestreo, ya la localización de las lesiones y del parásito no es uniforme y la observación de las lesiones depende muchas veces del número de preparaciones examinadas y tiempo empleado en examinarlas (Wouda et al., 1997b; Boger & Hattel, 2003). Por otra parte, este hecho también podría ser debido a la presencia del parásito y a la ausencia de lesiones.

En resumen, se ha desarrollado un método rápido y adaptable para la cuantificación de *N. caninum* utilizando el método SYBR Green I. Esta técnica puede emplearse como alternativa al recuento de formas parasitarias por inmunohistoquímica o a la laboriosa técnica de PCR cuantitativa competitiva. El procedimiento desarrollado aquí, permite una cuantificación precisa de *N. caninum* en muestras de tejido por una técnica reproducible y sensible, pudiendo servir también como instrumento de diagnóstico, debido al elevado número de muestras que se pueden analizar y al corto periodo de tiempo en el que se obtienen los resultados. La cuantificación de *N. caninum* en muestras de tejido puede ser de utilidad para el estudio de la patogenia, reactivación, inmunoprofilaxis y tratamiento de la infección en el ganado bovino y en modelos experimentales.

## 5.- Objetivo 2: Desarrollo de un Modelo Murino Experimental\*

\*Los resultados de este objetivo han sido comunicados en dos congresos internacionales y los resultados del objetivo 2.1. han sido aceptados para su publicación en el Journal of Parasitology:

**Collantes-Fernández, E., G. Álvarez-García, V. Pérez-Pérez, J. Pereira-Bueno, L. M. Ortega-Mora.** 2001. A mouse model of chronic neosporosis: influence of host and parasite factors on the outcome of the infection. A symposium on all aspects of bovine neosporosis. Edinburgh, Scotland, September 13-15.

**Collantes-Fernández, E., G. Álvarez-García, I. López-Pérez, L. M. Ortega-Mora.** 2002. Parasite load in blood and organs related to systemic immune response during acute and chronic *Neospora caninum* infection in mice. European Union International Congress Cost- 854. Münchenwiler, Switzerland, December 20.

**Collantes-Fernández, E., G. Álvarez-García, V. Pérez-Pérez, J. Pereira-Bueno, L. M. Ortega-Mora.** Characterization of pathology and parasite load in outbred and inbred mouse models of chronic *Neospora caninum* infection. (Aceptado en el J. Parasitol.)

En esta parte del estudio se desarrolló un modelo murino experimental para el estudio de la patogenia de la infección por *N. caninum*. Para su cumplimiento se propusieron dos subobjetivos. En el subobjetivo 2.1. se estudiaron diversos factores que afectan al desarrollo de la infección crónica por *N. caninum* en el modelo murino. Una vez establecidos las condiciones más adecuadas para la reproducción de la infección en el modelo murino, se desarrolló el subobjetivo 2.2.: Estudio de la parasitemia y distribución orgánica durante la infección aguda y crónica por *N. caninum* en el modelo murino.

### **5.1. SUBOBJETIVO 2.1. ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN AL DESARROLLO DE LA INFECCIÓN CRÓNICA POR *N. caninum* EN EL MODELO MURINO.**

Desde el descubrimiento de *N. caninum* en 1988 (Dubey et al., 1988b), la mayoría de la información sobre la patogénesis y la respuesta inmune de la infección procede de infecciones experimentales en las que se ha utilizado al ratón como modelo de laboratorio (Khan et al., 1997; Long et al., 1998; Baszler et al., 1999b; Eperon et al., 1999; Shibahara et al., 1999; Tanaka et al., 2000b). Sin embargo, dependiendo de la estirpe de ratón utilizada, el aislado del parásito, dosis y vía de inoculación o tratamiento inmunodepresor (Innes et al., 2000) los ratones pueden ser resistentes a la infección, desarrollar una infección subclínica o una enfermedad de curso mortal. Debido a estas variaciones, la caracterización de la interacción entre el parásito y el hospedador, así como la determinación de la influencia de estos factores es necesaria con el fin de desarrollar un modelo reproducible de la infección que facilite el desarrollo de futuras estrategias de prevención y tratamiento de la infección en los animales domésticos.

Debido a que la infección crónica y reactivación son las formas más importantes que utiliza el parásito para transmitirse y persistir en el hospedador, el desarrollo de un modelo experimental de infección crónica sería de gran utilidad para estudiar los mecanismos que influyen en la reactivación, aborto y transmisión congénita de *N. caninum*. La infección crónica se ha evaluado en diferentes modelos de ratón (Lindsay & Dubey 1989d, 1990b; Lindsay et al., 1995b; McGuire et al., 1997b; Long et al., 1998), aún así, existe poca información acerca de la influencia de los factores dependientes del hospedador o del parásito sobre el curso de la infección. Asimismo, un componente

importante que condiciona el desarrollo de la infección es la carga parasitaria presente en los tejidos del hospedador (Long et al., 1998) y a pesar de los numerosos estudios de infecciones experimentales realizados en el ratón, la información acerca de este parámetro es limitada (Long et al., 1998; Baszler et al., 1999b; Liddell et al., 1999a).

El objetivo de este estudio fue investigar la interacción de la dosis y vía de inoculación, estirpe de ratón y tratamientos inmunodepresores sobre: (i) la gravedad de la lesión en diferentes órganos (hígado, pulmón, corazón y cerebro); (ii) la carga parasitaria en cerebro; y (iii) la respuesta inmune del hospedador durante la fase crónica de la infección. Asimismo, se estudió la relación entre la carga parasitaria y la lesión en el cerebro. La estimación de la carga parasitaria en el cerebro se evaluó utilizando la PCR cuantitativa en tiempo real desarrollada en el primer objetivo.

### 5.1.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

#### 5.1.1.1. Características de los grupos y muestras recogidas

La Tabla 20 recoge las diferentes estirpes de ratones, dosis de inoculación, tratamientos inmunodepresores, vías de inoculación y número de animales empleados. Los ratones ICR se inmunodeprimieron con tres tratamientos diferentes (acetato de metilprednisolona -AMP-, ciclofosfamida -Cy- y vinblastina -VLB-) y fueron inoculados por vía i.p. o s.c. con  $4 \times 10^5$  o  $10^6$  taquizoítos del aislado NC-1. Los grupos de ratones BALB/c fueron inoculados por vía i.p. o s.c. con  $10^6$  o  $5 \times 10^6$  taquizoítos de NC-1. Los grupos testigos de ratones BALB/c, ICR e ICR inmunodeprimidos se inocularon por vía i.p. con 200  $\mu$ l de PBS.

**Tabla 20.** Resumen de las características de los grupos y factores investigados.

Grupo	Estirpe murina	Tratamiento inmunodepresor	Dosis de NC-1	Vía de inoculación <sup>a</sup>
1, 2	ICR	AMP <sup>b</sup>	10 <sup>6</sup>	s.c./i.p.
3, 4	ICR	AMP	4×10 <sup>5</sup>	s.c./i.p.
5, 6	ICR	Cy <sup>c</sup>	4×10 <sup>5</sup>	s.c./i.p.
7, 8	ICR	VLB <sup>d</sup>	4×10 <sup>5</sup>	s.c./i.p.
9, 10	BALB/c		5×10 <sup>6</sup>	s.c./i.p.
11, 12	BALB/c		10 <sup>6</sup>	s.c./i.p.
13, 14	ICR		4×10 <sup>5</sup>	s.c./i.p.
15	ICR	AMP	PBS	i.p.
16	ICR		PBS	i.p.
17	BALB/c		PBS	i.p.

<sup>a</sup> 10 ratones por vía de inoculación: s.c. (subcutánea) e i.p. (intraperitoneal)

<sup>b</sup> AMP (acetato de metil prednisolona): se administró 2 mg/animal por vía i.p. el día -7 y 2,5 mg/animal el día 0 PI. (McGuire et al., 1997b).

<sup>c</sup> Cy (Ciclofosfamida): se administró 15-20 mg/kg por vía i.p. los días -30 y -9 PI.

<sup>d</sup> VLB (Vinblastina): se administró 1,2 mg/ratón por vía i.p. los días -30 y -9 PI.

Los animales fueron inoculados a las 6 semanas de edad y sacrificados a las 8 semanas PI. La sangre fue obtenida mediante punción intracardíaca (ver apartado 3.3.1.) y las muestras de suero se guardaron a -80°C hasta la determinación de las IgG por IFI. Uno de los hemisferios cerebrales fue congelado a -80°C para la cuantificación de *N. caninum* por PCR en tiempo real y el otro hemisferio cerebral, corazón, hígado y pulmones se fijaron en formol tamponado al 10% hasta ser procesados histológicamente.

Los animales fueron evaluados diariamente, sacrificando a aquellos que estaban moribundos o en fases muy avanzadas de la enfermedad, recolectando sus muestras según se ha indicado anteriormente.

#### 5.1.1.2. Estudio histológico

Los tejidos fijados en formol tamponado al 10% fueron procesados según se detalla en el Material y Métodos (ver apartado 3.4.2.1.). El análisis histológico se basó en la

observación de las lesiones características causadas por *N. caninum* en el ratón (Lindsay & Dubey, 1989d; Lindsay et al., 1995b) siguiendo el criterio descrito en el apartado 3.4.2.3.

#### **5.1.1.3. Estudio de la carga parasitaria en cerebro**

La cuantificación de *N. caninum* a partir del ADN extraído de 20 mg de tejido cerebral (ver apartado 3.4.3.1.2.) se llevó a cabo empleando la PCR en tiempo real con el sistema SYBR Green I. Para la cuantificación del parásito y del ADN del hospedador se utilizaron los oligonucleótidos de la región Nc-5 y del gen 28S ARNr, respectivamente. Las reacciones para la secuencia Nc-5 y el gen 28S ARNr se hicieron en tubos separados y las muestras se analizaron por duplicado, según se explica en Material y Métodos (ver apartado 3.4.3.4.2. Condiciones de la PCR cuantitativa en tiempo real). El análisis de las curvas de fusión del producto de amplificación de la secuencia Nc-5 se realizó después de la reacción de PCR (ver apartado 3.4.3.4.3.).

#### **5.1.1.4. Estudio serológico**

El estudio de las IgG específicas anti-*N. caninum* en el suero de los ratones se realizó por la técnica de IFI. El método se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en el Material y Métodos (ver apartado 3.4.1.1.1.).

#### **5.1.1.5. Análisis estadístico**

Los factores y grupos estudiados en este experimento se compararon según la Tabla 21 siguiendo las indicaciones de Morrison (2002). La prueba *U* de Mann-Whitney se empleó para analizar el factor dosis infectiva y estirpe de ratón y el procedimiento de Bonferroni para el factor vía de inoculación. El factor tratamiento inmunodepresor se analizó utilizando la prueba *H* de Kruskal-Wallis y se aplicó una prueba no paramétrica de comparaciones múltiples cuando se observaron diferencias estadísticamente significativas para indicar entre que grupos estaba presente dicha significación. En este caso un valor de  $P < 0,05/[k \times (k-1)/ 2]$  fue considerado como estadísticamente significativo, siendo *k* el número de grupos analizados.

La comparación del número de parásitos entre las muestras procedentes de cerebros de ratones con y sin lesiones se hizo empleando la prueba *U* de Mann-Whitney. Finalmente, para evaluar la correlación entre la gravedad de la lesión y la carga parasitaria en cerebro se llevó a cabo un análisis de regresión, determinando el coeficiente de correlación de Pearson (*r*), y *r*<sup>2</sup> para determinar el grado de asociación. Un valor de *P* < 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

**Tabla 21.** Resumen de los factores y grupos comparados.

Dosis infectiva		Estirpe	Tratamiento	Vía de inoculación
10 <sup>6</sup> vs 4×10 <sup>5</sup>	5×10 <sup>6</sup> vs 10 <sup>6</sup>	ICR vs BALB/c	AMP vs Cy vs VLB	s.c. vs i.p.
1 vs 3	9 vs 11	1 vs 11	3 vs 5 vs 7	1 vs 2, 3 vs 4, 5 vs 6
2 vs 4	10 vs 12	2 vs 12	4 vs 6 vs 8	7 vs 8, 9 vs 10, 11 vs 12

*vs: versus*

## 5.1.2. RESULTADOS

### 5.1.2.1. Mortalidad y signos clínicos

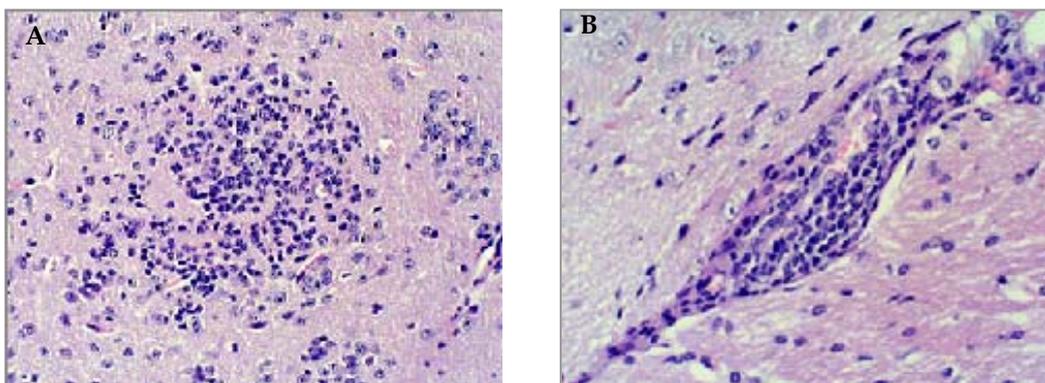
Muy pocos animales murieron o presentaron síntomas clínicos de la enfermedad. Los síntomas presentes (inactividad, erizamiento, debilidad y parálisis del tercio posterior) se observaron desde la semana 5 a la 8 PI. Un animal de los grupos n° 5 y 11 falleció el día 40 y 53 PI, respectivamente, y dos ratones (grupo n° 9) en los días 50 y 53 PI. Los signos clínicos de la enfermedad se observaron en tres ratones del grupo 4 (semana 5 PI) y en un ratón de los grupos 10 y 11 (semana 7 PI). El resto de los animales infectados y los grupos testigos permanecieron clínicamente normales durante las 8 semanas de estudio.

### 5.1.2.2. Desarrollo de lesiones

El número de animales con lesiones compatibles con la infección fue más elevado, mostrando una mayor frecuencia los grupos n° 1 al 4 (AMP-ICR) y los grupos n° 9 al 12 (BALB/c) en hígado y cerebro (Tabla 22). La intensidad de las lesiones varió de ausente (0) a leve (1) en los grupos infectados con el parásito (grupos no. 1 al 14). Los órganos

menos afectados fueron el pulmón y el corazón y el que más el cerebro, fundamentalmente, en los ratones BALB/c, donde varios animales presentaron lesiones de grado 1-2 (Figura 12).

**Figura 12.** (A) Nódulo glial y (B) manguito perivascular (grupo 9). H&E. x 200.



**Tabla 22.** Presencia de lesiones compatibles y gravedad de la lesión.

N° grupo	Hígado			Pulmón			Corazón			Cerebro		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
1	10/10	1	0,5-1	4/10	0	0-1	1/10	0	0-0	6/10	0,2	0-0,2
2	7/10	0,5	0-1	4/10	0	0-1	3/10	0	0-1	6/10	0,2	0-0,2
3	5/10	0	0-0,5	2/10	0	0-0	0/10	0	0-0	2/10	0	0-0
4	6/10	0,5	0-0,5	3/10	0	0-0	1/10	0	0-0	1/10	0	0-0
5	7/9	0,5	0,5-1	3/9	0	0-1	2/9	0	0-1	3/9	0	0-0
6	5/10	0,3	0-0,5	0/10	0	0-0	0/10	0	0-0	0/10	0	0-0
7	5/9	0,5	0-0,5	1/10	0	0-0	0/9	0	0-0	1/9	0	0-0
8	4/10	0	0-0,5	2/10	0	0-0	0/10	0	0-0	0/10	0	0-0
9	4/9	0	0-0,5	3/9	0	0-1	2/9	0	0-0	4/9	0	0-1,2
10	8/10	0,5	0-0,5	3/10	0	0-1	4/10	0	0-1	6/10	0,4	0-0,8
11	9/10	0,5	0-0,5	1/10	0	0-0	2/10	0	0-0	5/10	0,1	0-1,2
12	5/10	0	0-0	0/10	0	0-0	4/10	0	0-1	5/10	0,1	0-1
13	1/5	0	0-0,5	0/5	0	0-0	0/5	0	0-0	0/5	0	0-0
14	0/5	0	0-0	0/5	0	0-0	0/5	0	0-0	0/5	0	0-0

a: Número de ratones con lesiones/número de ratones analizados.

b: Mediana de los valores de gravedad de lesión.

c: Cuartiles 25% y 75%.

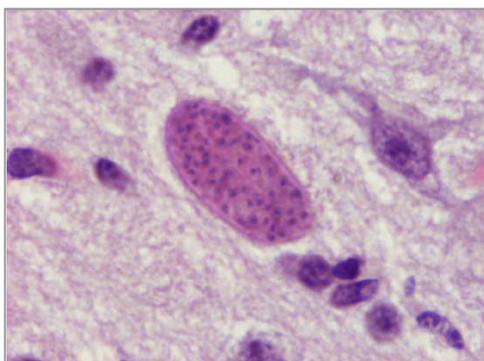
Al comparar los diferentes factores se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la gravedad de las lesiones. La lesión fue más grave en los grupos infectados con las dosis más altas, observándose diferencias significativas en el cerebro de los ratones ICR inmunodeprimidos con AMP (2 *versus* 4,  $P < 0,05$ , *U* de Mann-Whitney) y en el hígado de los ratones ICR-AMP (1 *versus* 3,  $P < 0,001$ ) y BALB/c (10 *versus* 12,  $P < 0,05$ ). Una tendencia parecida se encontró en los otros órganos estudiados pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Dependiendo del órgano analizado, la gravedad de la lesión varió según la estirpe de ratón. El hígado y el pulmón fueron los órganos más afectados en los ratones ICR (hígado: 1 *versus* 11,  $P < 0,05$ ; 2 *versus* 12,  $P < 0,01$  y pulmón: 2 *versus* 12,  $P < 0,05$ ), mientras que en la estirpe BALB/c fue el SNC (1 *versus* 11,  $P < 0,05$ ).

Por otra parte, en relación con el tratamiento inmunodepresor utilizado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ , *H* de Kruskal-Wallis). A pesar de ello, los ratones inmunodeprimidos con AMP tuvieron lesiones más graves en cerebro que los tratados con Cy y VLB, pero en corazón y pulmón los resultados fueron variables. En referencia a la vía de inoculación, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los ratones inoculados subcutánea e intraperitonealmente.

Cuando se compararon los grupos infectados con los grupos testigos no infectados (grupos nº 15-17), se obtuvieron diferencias significativas principalmente en el hígado (grupos nº 1, 2, 4, 5, 6 y 10) y en el cerebro (grupos nº 2, 9, 10 y 12). Los grupos de ratones ICR inmunodeprimidos (grupos nº 4, 5 y 6) mostraron significativamente lesiones más graves en hígado que los grupos de ICR infectados no inmunodeprimidos (grupos nº 13 y 14).

La presencia de taquizoítos de *N. caninum* en los diferentes órganos se detectó, ocasionalmente, durante el examen de las preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina. En el cerebro se observaron grupos de taquizoítos del parásito de un caso (grupo nº 10) y quistes tisulares en tres (grupos nº 9, 10 y 11) (Figura 13).



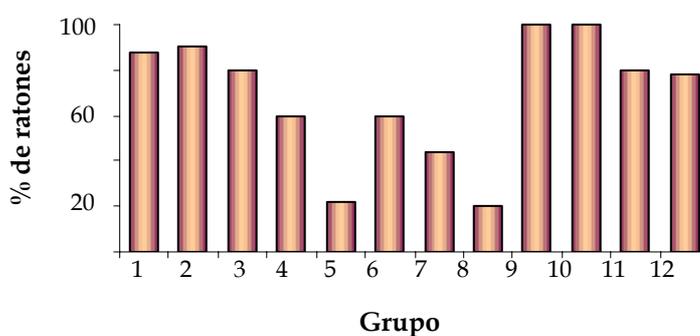
**Figura 13.** Quiste de *N. caninum* en el cerebro de un ratón perteneciente al grupo 10. H&E x1000.

### 5.1.2.3. Estudio de la carga parasitaria en cerebro

Los resultados finales se expresaron como número de parásitos por  $\mu\text{g}$  de ADN del hospedador. Cada muestra fue normalizada basándose en la cantidad de ADN del hospedador utilizando la PCR en tiempo real del gen 28S ARNr, de esta forma los valores obtenidos son comparables entre las diferentes muestras. La amplificación del gen 28S ARNr fue también utilizada para excluir falsos negativos de la PCR de *N. caninum*. Por otra parte, el análisis de las curvas de temperatura de fusión detectó un único producto en las muestras con ADN de *N. caninum* con una temperatura de  $79,0^{\circ}\text{C}$ .

La presencia del ADN del parásito se detectó en el cerebro por PCR en tiempo real en un mayor número de ratones procedentes de los grupos 1 al 4 (ICR-AMP) y del 9 al 12 (BALB/c) (Figura 14).

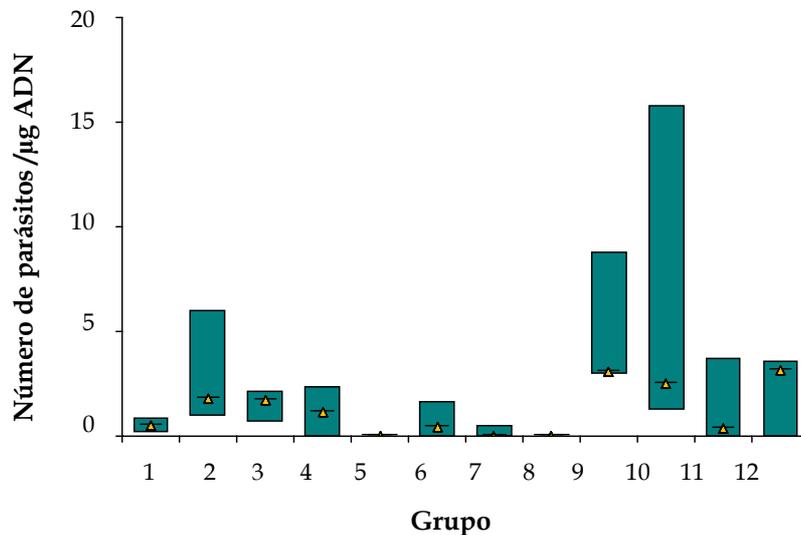
**Figura 14.** Porcentaje de ratones con cerebros positivos a *N. caninum*.



Cuando los resultados se analizaron estadísticamente, el aumento de la carga parasitaria se relacionó con un aumento de la dosis infectiva (Figura 15), encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los ratones BALB/c inoculados con  $5 \times 10^6$  taquizoítos y los inoculados con  $10^6$  (9 versus 11,  $P < 0,05$ ,  $U$  de Mann-Whitney). Por el contrario, un aumento en la dosis infectiva en los ratones ICR sólo tuvo un efecto mínimo, no estadísticamente significativo, sobre la carga de ADN del parásito en cerebro ( $P > 0,05$ ).

En relación con el tratamiento inmunodepresor administrado se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ,  $H$  de Kruskal-Wallis). Utilizando una prueba no paramétrica de comparaciones múltiples, las diferencias significativas se obtuvieron entre AMP y Cy, observándose una mayor carga parasitaria en los ratones inmunodeprimidos con AMP que con Cy (3 versus 5,  $P < 0,01$ ).

**Figura 15.** Las barras del gráfico representan la mediana y los cuartiles 25% y 75% de la carga parasitaria en cerebro (número de parásitos por  $\mu\text{g}$  de ADN del hospedador) determinada por PCR en tiempo real.



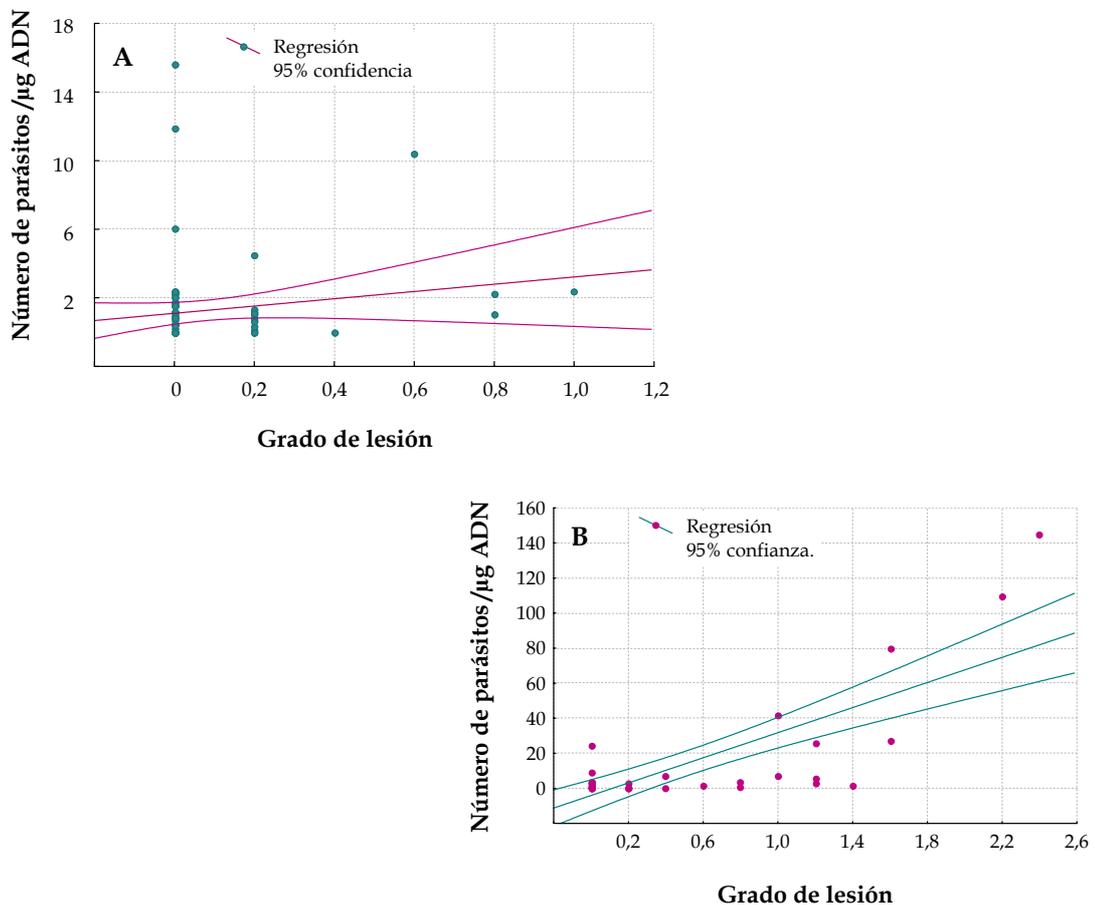
Cuando se analizó el factor vía de inoculación no se detectaron diferencias estadísticamente significativas. Por otra parte, se observó una relación entre la carga parasitaria y la presencia de quistes del parásito detectados en cerebro durante el examen histológico. Cuando los tres ratones BALB/c con quistes tisulares se analizaron por PCR en tiempo real, se obtuvieron altos niveles de ADN del parásito en dos de ellos (144,8 y

109,6 zoítos/ $\mu\text{g}$  de ADN) en comparación con la mediana del grupo correspondiente (3,1 y 0,4 zoítos/ $\mu\text{g}$  de ADN, respectivamente).

#### 5.1.2.4. Asociación entre lesión y carga parasitaria en cerebro

Se comparó la carga parasitaria en muestras de cerebro con lesiones y sin lesiones, observándose un número de parásitos/ $\mu\text{g}$  de ADN significativamente más elevado en las muestras procedentes de cerebros con lesiones que en aquellas sin lesiones ( $P < 0,01$ ,  $U$  de Mann-Whitney). También se realizó un análisis de regresión simple para establecer una relación entre la gravedad de la lesión y la carga parasitaria en cerebro. En los ratones ICR, el coeficiente de correlación fue bajo y no significativo ( $r^2 = 0,01$ ;  $P > 0,05$ ) mientras que en los ratones BALB/c se observó una correlación estadísticamente significativa con un grado de asociación moderado ( $r^2 = 0,6$ ;  $P < 0,0001$ ) (Figura 16).

**Figura 16.** Correlación entre el grado de lesión y la carga parasitaria (número de parásitos/ $\mu\text{g}$  ADN) en cerebro mediante un análisis de regresión simple. (A): ratones ICR; (B): ratones BALB/c.



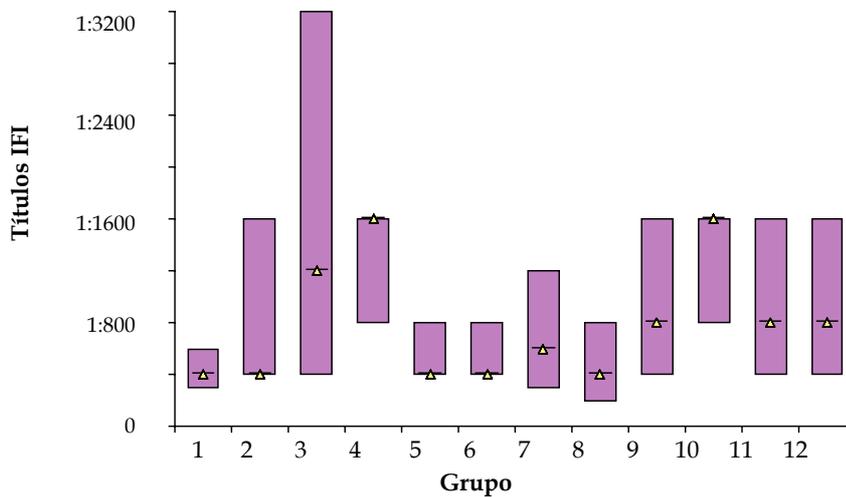
### 5.1.2.5. Respuesta inmune humoral

Los títulos de anticuerpos fueron significativamente más altos en los ratones BALB/c que en los AMP-ICR (grupo 1 *versus* 11,  $P < 0,05$ ,  $U$  de Mann-Whitney) (Figura 17).

También se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el factor tratamiento inmunodepresor ( $P < 0,05$ ,  $H$  de Kruskal-Wallis) siendo más elevados en los ratones AMP-ICR comparados con Cy y VLB (grupo 4 *versus* 6 y 8,  $P < 0,01$ , prueba no paramétrica de comparaciones múltiples).

Por otra parte, no se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se analizaron los factores dosis infectiva o vía de inoculación.

**Figura 17.** Las barras representan la mediana y los cuartiles 25% y 75% de los títulos de IgG determinados por IFI a las 8 semanas PI



### 5.1.3. DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue investigar la influencia de diferentes factores dependientes del hospedador y del parásito sobre el desarrollo de la infección crónica en el ratón. La infección causada por *N. caninum* en el bovino no gestante es generalmente persistente y asintomática, sin embargo las consecuencias en vacas gestantes son el aborto, nacimiento de terneros débiles o sanos pero congénitamente infectados (Innes et al., 2002). El desarrollo de modelos de infección crónica en el ratón podrían ser de utilidad para comprender la persistencia del parásito en el SNC y conocer los factores que pueden influir en la reactivación del parásito.

Con el objetivo de establecer una infección crónica caracterizada por la presencia de lesiones y del parásito en el cerebro (Lindsay et al., 1995b), se seleccionaron diversas dosis infectivas y protocolos de inmunodepresión. La presencia y cuantificación del parásito se determinaron en el cerebro, órgano dónde con más frecuencia se localizan en la infección crónica las dos fases del parásito, tanto en los hospedadores naturales como experimentales.

En el presente estudio, la infección fue clínicamente inaparente en la mayoría de los casos, asociada con un bajo número de parásitos y lesiones leves. Sin embargo, diferentes factores influyeron en su desarrollo, como por ejemplo la estirpe de ratón. Las estirpes utilizadas en este estudio fueron BALB/c e ICR. Los ratones BALB/c pueden desarrollar neosporosis clínica y son los más utilizados como modelo de laboratorio de la infección por *N. caninum*. Por otro lado, los ratones no consanguíneos son relativamente resistentes a la infección, sin embargo se han empleado en el modelo de ratona gestante (Cole et al., 1995; Quinn et al., 2002a), para producir quistes en el cerebro (McGuire et al., 1997b) o para el aislamiento del parásito inoculando los tejidos procedentes de animales naturalmente infectados en ratones inmunodeprimidos (Dubey et al., 1998a; Canada et al., 2002). En este sentido, el tratamiento con fármacos inmunodepresores como el AMP es necesario para superar la resistencia a la infección, produciéndose una infección aguda o crónica según la cantidad de AMP administrada (Lindsay & Dubey, 1989d). Al comparar las dos estirpes de ratón, las lesiones en cerebro fueron más reproducibles y observamos una mayor carga parasitaria en la estirpe BALB/c que en la ICR. Esto indica que los ratones BALB/c fueron

más receptivos a una infección crónica por *N. caninum* que los ICR, a pesar de estar inmunodeprimidos. Los resultados serológicos también revelaron diferencias entre las dos estirpes, observándose títulos más altos en los ratones BALB/c que en los ICR, seguramente debido al efecto del tratamiento inmunodepresor sobre el sistema inmune. Asimismo, se detectaron sólo quistes parasitarios en el cerebro de ratones BALB/c aunque en un número muy reducido, pero debemos señalar que es difícil la observación de fases del parásito mediante la tinción con hematoxilina y eosina y que quizá con técnicas inmunohistoquímicas hubiera sido posible la identificación de un número más elevado de quistes tisulares o taquizoítos. En este sentido, un estudio anterior realizado por McGuire et al. (1997b) utilizando técnicas inmunohistoquímicas con el anticuerpo anti-BAG5, el cuál se une específicamente a las proteínas de los bradizoítos, encuentran un mayor número de quistes tisulares en ratones ICR inmunodeprimidos con AMP que en BALB/c. Sin embargo, en dicho estudio utilizaron otros aislados del parásito (NC-2 y NC-Liv). Particularmente, con el aislado NC-Liv encuentran un mayor número de quistes que con NC-2. En nuestro experimento, NC-1 indujo el desarrollo de un reducido número de quistes tisulares, lo que evidencia diferencias notables en la capacidad de formación de quistes entre los distintos aislados de *N. caninum*. Otros estudios han examinado también la receptividad de diferentes estirpes de ratón a la infección por *N. caninum*. Khan et al. (1997) investigaron la receptividad a la infección durante las dos primeras semanas PI entre las estirpes consanguíneas A/J, C57BL/6, BALB/c y la estirpe CD-1 no consanguínea y no detectaron diferencias. Los ratones mostraron una leve inflamación y algún taquizoíto en el cerebro. El resto de los órganos permanecieron normales y los animales no desarrollaron sintomatología. La receptividad entre las estirpes consanguíneas BALB/c, C57BL/6 y B10.D2 fue también investigada en otro estudio a las 6 semanas PI. En este caso sí se observaron diferencias, siendo las estirpes BALB/c y C57BL/6 más sensibles al desarrollo de lesiones cerebrales que los ratones B10.D2 (Long et al., 1998).

En nuestro experimento también se evaluó el efecto del tratamiento inmunodepresor incluyendo corticoides (AMP) y agentes citotóxicos (Cy y VLB) en los ratones ICR. El acetato de metilprednisolona es un glucocorticoide usado ampliamente como inmunodepresor y antiinflamatorio y entre sus efectos está el reducir los monocitos en sangre y las subpoblaciones de células T *in vivo*, modular la producción y los efectos de las citoquinas e inhibir la inducción de la síntesis de NO en macrófagos y otras células

fagocíticas (Rousseau et al., 1998). La ciclofosfamida y vinblastina son, además de inmunodepresores celulares, potentes citostáticos utilizados como antitumorales. La ciclofosfamida induce pancitopenia y es particularmente tóxica para los neutrófilos con mínimos efectos sobre los macrófagos (Barthold & Souza, 1995). La vinblastina, al igual que la ciclofosfamida, inhibe la replicación del ADN, la mitosis y la respuesta inmune. El desarrollo de las infecciones en los ratones se vió parcialmente afectado por la administración de estos tratamientos. El hígado y los pulmones fueron los órganos más afectados, mientras que las lesiones y cargas parasitarias en el cerebro fueron mínimas. Este resultado podría indicar que los ratones ICR sufrieron una infección aguda, pero seguramente su sistema inmune pudo controlar la infección en fases avanzadas. Este hecho podría haber estado también relacionado con la inhibición de la multiplicación asexual del taquizoíto, al ser la Cy y VLB fármacos antimitóticos o que a las dosis administradas sólo hayan tenido un efecto bajo-medio sobre el establecimiento de la infección crónica. El tratamiento inmunodepresor con AMP fue el más apropiado para reproducir la infección crónica como ya se ha descrito previamente (Lindsay & Dubey, 1989d). Los ratones inmunodeprimidos con AMP tuvieron lesiones más graves y mayor carga parasitaria en el cerebro que los inmunodeprimidos con Cy y VLB.

En lo que concierne a la dosis infectiva, se ha podido observar que a mayor dosis, mayor intensidad de las lesiones, y, en la estirpe BALB/c también mayor cargas del parásito en el cerebro. Estos hallazgos sugieren que la habilidad del animal para controlar la expansión de la infección parece depender de la dosis infectiva inicial. Long et al. (1998) describieron un incremento significativo en el número de lesiones asociado a un aumento del inóculo del parásito. Gottstein et al. (2001) observaron síntomas más graves y un aumento en la detección del ADN del parásito por PCR en los grupos de ratones inoculados con la dosis más alta. La influencia de la dosis infectiva sobre la respuesta inmune desarrollada ha sido también estudiada en infecciones experimentales en el modelo bovino. En este caso en los animales inoculados con una dosis más alta de taquizoítos, las IgG específicas se detectaron antes y los títulos fueron más elevados desde la segunda a la quinta semana PI (Maley et al., 2001). En nuestro experimento no observamos diferencias al analizar el factor dosis en relación con el título de anticuerpos, este hecho puede ser debido a que sólo se midieron los niveles de IgG al final del experimento (semana octava) cuando los anticuerpos han llegado a su nivel máximo.

También se demostró en este estudio una asociación entre la gravedad de la lesión y la carga parasitaria en el cerebro, pero sólo en los ratones de la estirpe BALB/c, los cuales presentaron en el cerebro una lesión más grave y mayor carga de parásitos. En el caso de los ratones ICR inmunodeprimidos esta relación no existió. En los animales sin lesiones o con una lesión leve en el cerebro se detectó una carga parasitaria baja, por esta razón se podría sugerir que la presencia del parásito en cerebro contribuye al desarrollo de la lesión pero parece que es necesario al menos un número de parásitos umbral. Shibahara et al. (1999) demuestran que la inflamación es más intensa según aumenta el número de taquizoítos y Long et al. (1998) usando inmunohistoquímica, observan un número más elevado de taquizoítos intralesionales en los ratones BALB/c y C57BL/6, los cuales habían tenido lesiones más graves en cerebro que los ratones B10.D2 resistentes.

Finalmente, el presente estudio proporciona información sobre la respuesta a la infección en función de la vía de inoculación. En el caso de la inoculación por vía i.p., supuestamente el parásito estaría presente primero en cavidad peritoneal infectando todos los órganos adyacentes y produciéndose la exposición rápida e intensa de los taquizoítos por las células presentadoras de antígeno. La inoculación por la vía s.c. posiblemente provoque que los taquizoítos migren al nódulo linfático local y el antígeno sea procesado de forma diferente. Los resultados obtenidos en trabajos anteriores relacionados con la vía de inoculación son contradictorios. Un estudio reciente en un modelo de ratona gestante (Quinn et al., 2002a) describe que las lesiones en el cerebro son más graves en los animales inoculados por vía s.c. Esta observación coincide con otro estudio del mismo grupo investigador en el que demostraban que los ratones infectados por vía i.p. no desarrollaron signos clínicos de la enfermedad ni lesiones en el cerebro (Atkinson et al., 1999). Sin embargo, otros grupos han demostrado que los ratones experimentalmente infectados con *N. caninum* por vía i.p. morían antes después de sufrir neumonía, miositis o encefalitis que los inoculados por vía s.c. (Lindsay & Dubey, 1989d). En nuestro experimento no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar las dos vías de inoculación.

En conclusión, este estudio proporciona evidencias de que diferentes aspectos de la interacción entre el hospedador y el parásito pueden contribuir al desarrollo de la infección por *N. caninum*. Los resultados obtenidos sugieren que la infección en el ratón

estuvo influenciada por (i) la estirpe del ratón: BALB/c fue más apropiada para el desarrollo de la infección crónica que la estirpe ICR; (ii) tratamiento inmunodepresor: AMP fue más efectivo que Cy y VLB y (iii) dosis infectiva: la dosis más alta produjo una mayor gravedad de la infección. Además la PCR en tiempo real permitió estudiar la relación entre lesión y carga parasitaria.

Una vez establecidos los factores más adecuados para la reproducción de la infección por el parásito en el modelo murino, como son la estirpe de ratón (BALB/c), dosis ( $\geq 10^6$  taquizoítos) y vía de inoculación (s.c. o i.p.) se realizó el siguiente subobjetivo, en el cuál se investigó la parasitemia, distribución-cuantificación orgánica del parásito, respuesta inmune del hospedador y las variaciones existentes en función del aislado utilizado.

## **5.2. SUBOBJETIVO 2.2. ESTUDIO DE LA PARASITEMIA Y DISTRIBUCIÓN ORGÁNICA DE *N. caninum* DURANTE LA INFECCIÓN AGUDA Y CRÓNICA EN EL MODELO MURINO.**

La infección por *N. caninum* en el ratón se caracteriza por una fase inicial en la que se observa una hepatitis necrótica y una neumonía granulomatosa y linfocitocítica, y una fase crónica consistente en la presencia del parásito en el SNC y encefalitis como lesión principal (Lindsay & Dubey, 1989d, 1990b; Lindsay et al., 1995b; Baszler et al., 1999b). Los órganos donde con más frecuencia se ha detectado el parásito en diferentes experimentos con ratones han sido el pulmón y cerebro (Eperon et al., 1999; Liddell et al., 1999b; Nishikawa et al., 2001b).

Por otra parte, el ratón ha ofrecido un buen modelo para caracterizar y comparar la patogenicidad entre los aislados de *N. caninum* (Lindsay et al., 1995b; Atkinson et al., 1999; Quin et al., 2002a), demostrándose que la gravedad de la infección puede variar en función del aislado empleado. El desarrollo de la infección también depende del tipo de respuesta inmune desarrollada. La resistencia a *N. caninum* ha sido asociada con una respuesta celular de tipo Th1 (IL-12 e IFN- $\gamma$ ) mientras que una mayor sensibilidad a la infección está relacionada principalmente con el tipo Th2 (IL-4) (Long et al., 1998; Baszler et al., 1999b; Baszler et al., 2000). Las células B también desempeñan un importante papel en el desarrollo de una inmunidad protectora (Eperon et al., 1999).

Actualmente, no hay ningún estudio referente a la presencia, duración y multiplicación del parásito en la sangre y en los diversos órganos en el modelo murino. Por tanto, en este subobjetivo se determinó en qué órganos se localizaba el parásito durante la fase aguda y crónica de la infección y se comparó la patogenicidad de dos

aislados de *N. caninum* (NC-Liv y NC-1) en el modelo murino. Para este propósito, se estudió la carga parasitaria en diferentes órganos y la respuesta inmune del hospedador (IgG1 y IgG2a) durante el curso de la infección en ratones BALB/c inoculados con taquizoítos de los aislados NC-Liv y NC-1. La presencia del parásito en sangre y ganglios linfáticos fue también analizada con el objetivo de estudiar la vía de diseminación del parásito en el hospedador.

La cuantificación de *N. caninum* en los tejidos del hospedador se llevó a cabo mediante la PCR en tiempo real desarrollada en el objetivo 1, la cual además fue empleada para estudiar la relación entre la presencia de síntomas y la carga parasitaria en el cerebro.

## **5.2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **5.2.1.1. Características de los grupos y muestras recogidas**

Cincuenta y cinco ratones BALB/c fueron infectados a las 6 semanas de edad con  $10^6$  taquizoítos del aislado NC-Liv (grupo 1) o NC-1 (grupo 2) por vía i.p. El grupo testigo (grupo 3) estuvo formado por 54 ratones BALB/c inoculados con 200  $\mu$ l de PBS por vía i.p. Tres animales de cada grupo se sacrificaron aleatoriamente en los días 1, 2, 3, cada dos días hasta el día 21 y, finalmente, una vez a la semana hasta el día 63 PI, en el cual, todos los ratones que sobrevivieron fueron sacrificados. El día de la inoculación fue considerado como el día 0 PI.

Los ratones fueron examinados diariamente por la misma persona, anotándose la presencia de sintomatología e incidencias. Los animales con sintomatología grave, incapaces de comer y beber se sacrificaron y se procedió a la recogida de muestras.

La sangre fue obtenida mediante punción intracardiaca (300-500  $\mu$ l) depositándose en tubos con EDTA (ver apartado 3.3.1.). El plasma se obtuvo por centrifugación, guardándose a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la determinación de IgG1 e IgG2a por ELISA. El sedimento formado por células sanguíneas se conservó no más de 24 h a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta la extracción del ADN para la cuantificación del parásito en sangre. Al realizar la necropsia se recogieron:

bazo, ganglios linfáticos mesentéricos, ilíacos, mediastínicos y cervicales, hígado, pulmones y cerebro. Estos órganos se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la cuantificación de *N. caninum* por PCR.

### **6.1.2. Extracción de ADN**

El ADN para la realización de la PCR en tiempo real fue extraído de 10-20 mg procedente de los órganos recogidos utilizando para ello una prueba comercial (ver apartado 3.4.3.1.2.). Los ganglios linfáticos mesentéricos e ilíacos se procesaron en una única muestra denominada ganglios linfáticos inferiores y los mediastínicos y cervicales como ganglios linfáticos superiores. El ADN de las muestras de sangre se aisló empleando la prueba comercial “GenomicPrep blood DNA isolation kit” (Amersham Pharmacia).

### **6.1.3. PCR cuantitativa en tiempo real**

Para la determinación de la carga parasitaria en las muestras de sangre y en los órganos recogidas se llevó a cabo la PCR en tiempo real desarrollada en el objetivo 1 utilizando el método SYBR Green I (ver apartado 3.4.3.4.2.). El análisis de las curvas de fusión del producto de amplificación de la secuencia Nc-5 se realizó después de la reacción de PCR (ver apartado 3.4.3.4.3.). La cuantificación de *N. caninum* y del ADN del hospedador se llevó a cabo mediante interpolación del Ct de la muestra sobre una curva estándar construida con concentraciones conocidas del ADN del parásito o del ADN genómico, respectivamente (ver apartado 3.4.3.4.1.). Los resultados se expresaron como número de parásitos por  $\mu\text{g}$  de ADN analizado y se representaron como la mediana de los valores correspondientes a cada grupo y órgano.

### **5.2.1.4. Determinación de IgG2a e IgG1 anti-*N. caninum***

Los isotipos IgG2a e IgG1 anti-*N. caninum* se determinaron mediante un ELISA indirecto en el plasma de los ratones sacrificados en los días señalados anteriormente (ver apartado 3.4.1.2.1.). Los resultados se expresaron como valores de densidad óptica a 450 nm y se representaron como la mediana en cada grupo.

### 5.2.1.5. Análisis estadístico

Las diferencias entre los grupos fueron analizadas por la prueba no paramétrica *U* de Mann-Whitney considerando los valores de  $P < 0,05$  estadísticamente significativos. Para estimar si las distribuciones de la carga parasitaria obtenidas con los dos aislados en los diferentes órganos, correspondían a un mismo modelo de población, se aplicó el método estadístico de simulación “bootstrap”, mediante el cual se remuestran los datos obtenidos un número elevado de veces (ver apartado 3.5.5.). Para comparar el número de parásitos entre las muestras procedentes de cerebros de ratones con y sin síntomas se empleó la prueba *U* de Mann-Whitney. Por otra parte, para evaluar el efecto de la carga parasitaria en cerebro y el aislado sobre la presencia de síntomas se aplicó un análisis de regresión logística (ver apartado 3.5.4.). En un primer paso, el log de la carga parasitaria en cerebro y los síntomas se analizaron utilizando el siguiente modelo:  $\text{Log}(\pi/1-\pi) = \alpha + \beta_0 + \beta_1 X$ . En el segundo paso, se analizaron el log de la carga parasitaria en cerebro del aislado NC-Liv utilizando el modelo 2:  $\text{Log}(\pi/1-\pi) = \beta_0 + \beta_1 X$ . Los análisis de “bootstrap” y de regresión logística se realizaron tomando el logaritmo de la carga parasitaria y los cálculos se llevaron a cabo con el programa SAS versión 8.02 (SAS Institute Inc.)

## 5.2.2. RESULTADOS

### 5.2.2.1. Mortalidad y sintomatología

Los ratones de los grupos infectados (grupos 1 y 2) permanecieron sin signos de enfermedad aparentes durante los primeros días PI, sin embargo a partir del día 10 PI se observaron síntomas compatibles con neosporosis en algunos animales. Los primeros síntomas que se observaron fueron erizamiento del pelo y apatía, y después inmovilidad y apatía. Progresivamente, un mayor número de animales infectados con el aislado NC-Liv desarrollaron sintomatología y tres animales de este grupo mostraron síntomas nerviosos (debilidad y parálisis del tercio posterior, temblores de la cabeza, torneo y marcha en círculo). Un ratón inoculado con NC-Liv tuvo que ser sacrificado en el día 28 PI debido a la presencia de sintomatología nerviosa grave. Alrededor de la quinta semana PI, los signos de enfermedad se fueron resolviendo en la mayoría de los ratones.

El resto de los ratones infectados y testigos permanecieron clínicamente normales hasta el final del experimento (día 63 PI). El número de animales con síntomas compatibles con la infección por *N. caninum* varió considerablemente entre los grupos infectados, en los ratones inoculados con el aislado NC-Liv (grupo 1), un total de 14 animales de 55 tuvieron síntomas, por el contrario en el grupo inoculado con NC-1, sólo un ratón de 55 mostró sintomatología.

Al realizar la necropsia se observó linfadenopatía y esplenomegalia en los animales infectados con ambos aislados desde el día 3 al 19 PI.

#### **5.2.2.2. Cinética del parásito en sangre y ganglios linfáticos**

El ADN de *N. caninum* se detectó en sangre desde el día 1 al 5 PI en todos los animales infectados. En el día 7 PI el parásito fue detectado sólo en tres animales, dos inoculados con NC-1 y uno con NC-Liv. El número de parásitos más elevado se observó en el día 1 PI, disminuyendo rápidamente a partir de este día hasta el 7 PI (Tabla 23). Después, la parasitemia fue transitoria, detectándose esporádicamente y con niveles del parásito muy reducidos. Comparando los dos aislados, el grupo de ratones BALB/c infectados con NC-Liv (grupo 1) tuvo mayor carga parasitaria en sangre que el grupo infectado con NC-1 (grupo 2) pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ , *U* de Mann-Whitney).

En los ganglios linfáticos superiores (mediastínicos y cervicales) e inferiores (mesentéricos e ilíacos) se detectó una cantidad de ADN de *N. caninum* muy baja y de manera intermitente durante el curso del experimento y hasta el día 49 PI (Tabla 23).

En el grupo testigo (grupo 3) todas las muestras fueron negativas, según se esperaba. Por otro lado, el análisis de las curvas de fusión detectó un solo producto con una temperatura de 79,0°C en las muestras con ADN de *N. caninum* de sangre y ganglios linfáticos.

**Tabla 23.** Detección del ADN de *N. caninum* por PCR en tiempo real en sangre, ganglios linfáticos superiores (mediastínicos y cervicales) e inferiores (mesentéricos e ilíacos) de los ratones infectados con el aislado NC-Liv (grupo 1) y NC-1 (grupo 2).

Días	Sangre <sup>a</sup>		Ganglios superiores <sup>a</sup>		Ganglios inferiores <sup>a</sup>	
	NC-Liv (grupo 1)	NC-1 (grupo 2)	NC-Liv (grupo 1)	NC-1 (grupo 2)	NC-Liv (grupo 1)	NC-1 (grupo 2)
1	3/3 +++++	3/3 +++	2/2 +++	2/2 +++	3/3 +	2/2 +
2	3/3 +++++	3/3 +++	ND	ND	2/3 +	3/3 +
3	3/3 ++	3/3 +	2/3 +	0/3 -	3/3 +	3/3 +++
5	3/3 ++	3/3 +	2/3 +	2/2 +	1/3 +	1/3 +
7	2/3 +	2/3 +	1/3 +	0/3 -	1/3 +	1/3 +
9	0/3 -	0/3 -	0/2 -	3/3 +	2/3 +	0/3 -
11	1/3 +	0/3 -	1/3 +	0/3 -	0/3 -	0/3 -
13	0/3 -	0/3 -	1/3 +	0/3 -	0/3 -	0/3 -
15	0/3 -	0/3 -	3/3 +	3/3 +	3/3 +	3/3 +
17	0/3 -	0/3 -	2/3 ++	2/3 +	2/3 +	2/3 +
19	1/3 +	0/3 -	0/2 -	0/3 -	2/3 +	0/3 -
21	0/3 -	0/3 -	2/3 +	2/3 +	2/3 +	2/3 +
28	0/4 -	0/3 -	2/4 +	0/3 -	2/4 +	2/3 +
35	0/3 -	0/3 -	0/3 -	0/3 -	2/3 +	2/3 +
42	0/3 -	0/3 -	0/3 -	0/3 -	0/3 -	0/3 -
49	0/3 -	0/3 -	3/3 +	1/3 +	0/3 -	1/3 +
56	0/3 -	1/3 +	0/3 -	0/3 -	0/3 -	0/3 -
63	0/3 -	0/4 -	0/3 -	0/4 -	0/3 -	0/4 -

En los días indicados se sacrificaron 3 ratones por grupo, exceptuando el grupo 1 en el día 28, en el que se sacrificaron 4 animales (el cuarto ratón tuvo que ser sacrificado debido a la presencia de síntomas nerviosos graves), y el día 63, en el se sacrificaron 3 y 4 animales correspondientes a los grupos 1 y 2, respectivamente.

<sup>a</sup> Las fracciones representan número de ratones positivos por PCR en tiempo real/ número de ratones analizados. Los valores representan carga parasitaria expresada como mediana del número de parásitos por µg de ADN del hospedador. Una "-" indica 0 parásitos/ µg de ADN, "+" 0-1, "++" >1-10, "+++" >10-10<sup>2</sup>, "++++" >10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> y "+++++" >10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> parásitos/µg de ADN.

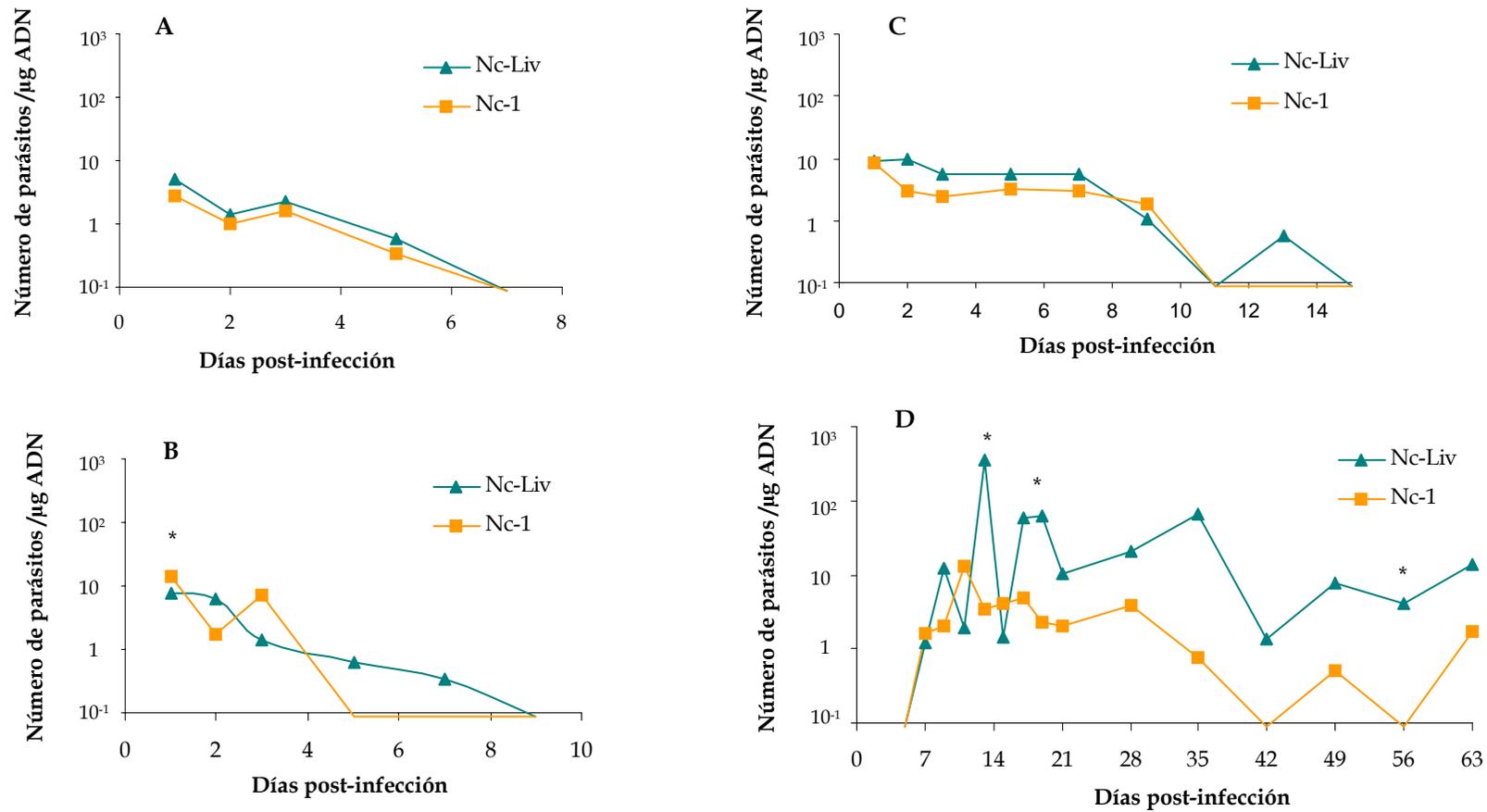
ND: muestras no disponibles

### 5.2.2.3. Cinética del parásito en bazo, hígado, pulmón y cerebro

Aunque hubo variaciones individuales, los ratones infectados con NC-1 o NC-Liv tuvieron patrones de carga parasitaria en bazo y hígado parecidos a los presentados en sangre periférica (Figura 18). En bazo e hígado el ADN de *N. caninum* fue detectado desde el día 1 PI hasta el 5 y 7 PI, respectivamente. El número máximo de parásitos se observó en el día 1 PI, después disminuyó llegando ser indetectable en ambos órganos, excepto en el bazo de un ratón infectado con NC-Liv el cual fue sacrificado en el día 28 PI. Cuando la carga parasitaria fue investigada en los pulmones, se detectó ADN del parásito desde el día 1 al 11-13 PI. En lo que se refiere a la carga parasitaria se observó el máximo en los días 1 o 2 PI en los ratones infectados con NC-1 y NC-Liv, respectivamente. La carga parasitaria en bazo, hígado y pulmones fue muy parecida entre los ratones infectados con ambos aislados y no se detectaron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ , *U* de Mann-Whitney), excepto en el día 1 PI en hígado donde los ratones infectados con NC-1 tuvieron mayor carga parasitaria que los infectados con NC-Liv ( $P < 0,05$ ). En cerebro, el ADN de *N. caninum* fue detectado desde el día 5-7 hasta el final del experimento (día 63). En el grupo infectado con NC-Liv (grupo 1) sólo un ratón fue positivo en el día 5, sin embargo en el día 7 PI resultaron todos positivos ( $n = 3$ ). En el caso de los ratones infectados con NC-1, el ADN del parásito fue detectado en dos animales el día 7 PI, y en todos ( $n = 3$ ) en el día 9 PI. Respecto a la carga parasitaria ésta alcanzó un pico el día 13 PI, que fue más marcado en el grupo de ratones infectado con el aislado NC-Liv que en los infectados con NC-1. Después, a pesar de las variaciones individuales presentes, el número de parásitos disminuyó gradualmente, pudiéndose detectar el ADN del parásito hasta el final del experimento. Comparando la carga parasitaria entre los grupos 1 y 2, el grupo de ratones infectado con NC-Liv tuvo mayor número de parásitos que los inoculados con NC-1 ( $P < 0,05$ , *U* de Mann-Whitney), encontrándose también diferencias estadísticamente significativas en los días 13, 19 y 56 PI ( $P < 0,05$ ).

No se detectó ADN de *N. caninum* en los animales testigos durante todo el experimento y en el análisis de las curvas de fusión se detectó un solo producto con una temperatura de 79,0°C en las muestras con ADN de *N. caninum*.

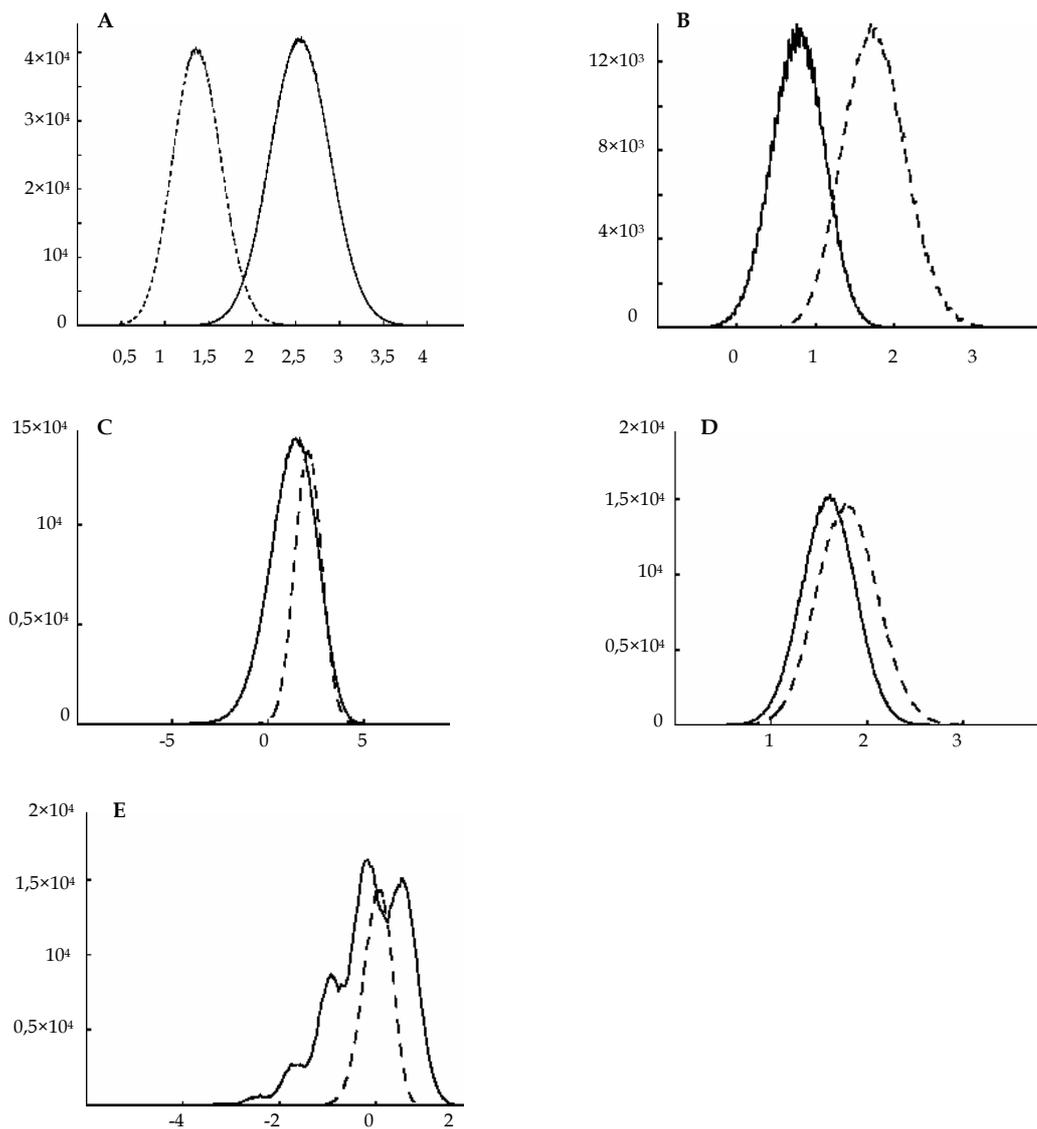
**Figura 18.** Cinéticas del número de parásitos en (A) bazo, (B) hígado, (C) pulmón y (D) cerebro de los ratones infectados con NC-1 (grupo 1) y NC-Liv (grupo 2). En los días indicados se sacrificaron 3 ratones por grupo, exceptuando el grupo 1 en el día 28, en el que se sacrificaron 4 animales (el cuarto ratón tuvo que ser sacrificado debido a la presencia de síntomas nerviosos graves), y en el día 63, en el que se sacrificaron 3 y 4 animales correspondientes a los grupos 1 y 2, respectivamente. Los resultados están expresados como la mediana del número de parásitos por  $\mu\text{g}$  de ADN del hospedador. Teniendo en cuenta que el límite de detección de la PCR en tiempo real es  $10^{-1}$  taquizoítos, todas las muestras positivas fueron  $\geq 0,1$  taquizoítos y las negativas (0 taquizoítos) se representaron en la escala logarítmica con un valor  $< 0,1$  taquizoíto. \*  $P < 0,05$ .



#### 5.2.2.4. Estudio de simulación por “bootstrap”

El estudio de simulación por “bootstrap” mostró importantes diferencias en la carga parasitaria en cerebro entre los aislados NC-Liv y NC-1, correspondiendo la mayor carga parasitaria al aislado NC-Liv. En el hígado, la gráfica sugiere también dos distribuciones diferentes para cada aislado, perteneciendo, en este caso, la mayor carga parasitaria al aislado NC-1. Las distribuciones de ambos aislados en el resto de los órganos fueron comparables (Figura 19).

**Figura 19.** Distribuciones obtenidas por “bootstrap” en (A) cerebro, (B) hígado, (C) sangre, (D) pulmón y (E) bazo, para el aislado NC-Liv (línea discontinua) y NC-1 (línea continua). En el eje de abscisas están representados los valores del log de la carga parasitaria y en el de ordenadas el número de observaciones o remuestreos efectuados.



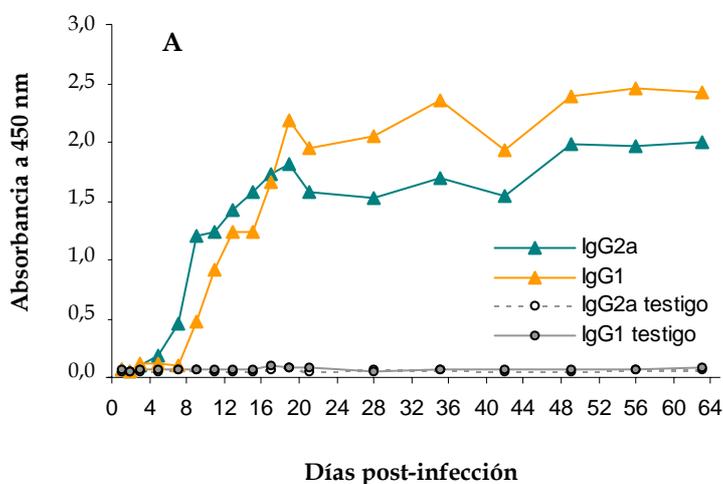
### 5.2.2.5. Determinación de IgG2a e IgG1 anti-*N. caninum*

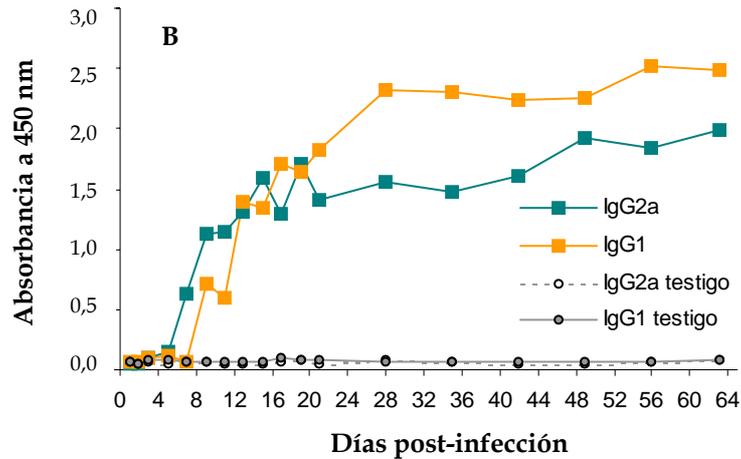
La cinética de los isotipos IgG2a e IgG1 específicas de *N. caninum* fue similar en los grupos 1 y 2 (Figura 20). Los niveles de IgG2a e IgG1 permanecieron al mismo nivel que el grupo testigo durante los dos primeros días PI. En el día 3 PI se detectó un ligero aumento de las inmunoglobulinas IgG2a, que fue más evidente en el día 7 PI. Los niveles más altos de IgG2a se observaron durante las últimas tres semanas PI (desde el día 49 al 63 PI). El incremento de las inmunoglobulinas IgG1 fue detectado desde el día 5 PI hasta el final del experimento, alcanzando un pico desde el día 49 al 63 PI.

Aunque se detectaron niveles altos de ambos isotipos específicos de *N. caninum*, los ratones tuvieron mayor concentración de IgG2a que de IgG1 durante las dos primeras semanas PI, después la producción de IgG1 fue la predominante hasta el final del experimento.

Los ratones testigos permanecieron seronegativos a *N. caninum* (OD<0,08 unidades) durante todo el experimento.

**Figura 20.** Cinéticas de los isotipos IgG2a e IgG1 anti- *N. caninum* de los ratones BALB/c infectados con los aislados (A) NC-Liv o (B) NC-1. Cada punto representa la mediana del valor de absorbancia del grupo a 450 nm.

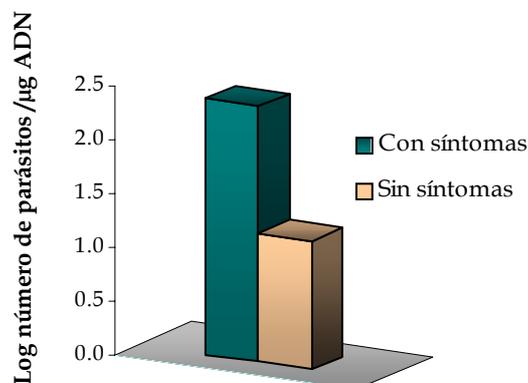




#### 5.2.2.6. Asociación entre síntomas y carga parasitaria en cerebro

Para determinar si la presencia de síntomas estaba relacionada con la carga parasitaria en cerebro, se comparó el número de parásitos en el cerebro de los ratones con y sin signos sintomatología. Los grupos que se compararon estaban formados por 15 ratones con signos clínicos compatibles con neosporosis (14 inoculados con NC-Liv y 1 con NC-1) y 95 ratones infectados sin síntomas. Los resultados mostraron un número de parásitos significativamente superior en las muestras de los ratones con síntomas que en aquellos sin síntomas ( $P < 0,05$ ,  $U$  de Mann-Whitney) (Figura 21).

**Figura 21.** Carga parasitaria en cerebro de los ratones con y sin síntomas.



Por otra parte, aplicando un análisis de regresión logística se evaluó si la carga parasitaria en cerebro y el aislado interactuaban sobre la presencia de síntomas. Los resultados obtenidos en el primer modelo (Tabla 24) demostraron que la capacidad infectiva de los dos aislados fue diferente, lo que se confirmó con los resultados del modelo 2 donde el log de la carga parasitaria en cerebro resultó un adecuado predictor de la presencia de sintomatología para el aislado NC-Liv.

**Tabla 24.** Resultados del análisis de regresión logística.

Parámetro	Estimador	Error Std	Intervalo de Confianza	Límite	Chi-cuadrado	Probabilidad
<b>MODELO 1</b> $\alpha_1 - \alpha_2$	5,8158	1,8149	2,2587	9,3728	10,27	0,0014
Coordenada en el origen	-7,8892	2,2297	-12,2593	-3,5191	12,52	0,0004
Log carga parasitaria	1,4161	0,4486	0,5369	2,2952	9,97	0,0016
<b>MODELO 2</b> Coordenada en el origen	-23461	0,7933			8,7464	0,0031
Log carga parasitaria	1,6323	0,5439			9,0072	0,0027

$\alpha_1$ : Aislado NC-1;  $\alpha_2$ : aislado NC-Liv

### 5.2.3. DISCUSIÓN

En este subobjetivo se ha estudiado y caracterizado en el modelo murino la localización, distribución y evolución de la carga parasitaria en las diferentes fases de la infección experimental. Asimismo, se ha investigado la influencia del aislado en el curso de la infección y se ha comparado la patogenicidad de dos aislados en el modelo murino. Diversas consideraciones prácticas, como el alto coste de la experimentación en el ganado bovino, el tiempo empleado en la evaluación clínica, la toma de muestras, el difícil manejo y la dificultad de realizar un estudio exhaustivo de la infección que conllevaría un alto número de sacrificios, impusieron para este estudio el uso de un modelo animal experimental. Por otra parte, el empleo de un sistema cuantitativo como la PCR en tiempo real permitió valorar la intensidad de la infección y distribución del parásito mediante la estimación precisa y reproducible del número de parásitos en los diferentes tejidos del hospedador. De la misma forma, facilitó la comparación de los dos aislados seleccionados (NC-Liv y NC-1).

En el modelo murino, la estirpe del ratón es un factor importante que determina el desarrollo de la infección por *N. caninum* (Lindsay et al., 1995b; Long et al., 1998). En este estudio se empleó la estirpe BALB/c la cual había sido más sensible a la infección por el parásito en el subobjetivo 2.1 y en otros estudios relacionados (Lindsay et al., 1995b; Long et al., 1998). La dosis infectiva ( $10^6$  taquizoítos) y vía de inoculación (i.p.) se seleccionaron según los resultados obtenidos en el subobjetivo 2.1. y los aislados (NC-Liv y NC-1) en base a las diferencias en la virulencia que habíamos observado en un estudio anterior (Pérez-Zaballos et al., 2002).

Con el objetivo de abarcar todas las posibles fases, la infección por *N. caninum* en el ratón fue examinada durante un periodo de 63 días. Atendiendo a los resultados obtenidos, el curso de la infección se pudo dividir en tres fases. La primera (desde el día 1 al 5-7 PI) se caracterizó por una distribución sistémica de los taquizoítos vía sanguínea o linfática y su multiplicación en diferentes órganos sin una localización preferente. *N. caninum* se detectó en cerebro más tarde (día 5-7), debido seguramente a la dificultad del parásito para atravesar la barrera hematoencefálica. Durante este periodo existió parasitemia y el máximo número de parásitos detectado en sangre en el día 1 PI, coincidió con el pico de carga parasitaria en bazo, hígado y pulmones. La segunda fase (desde el día 5-7 hasta el 11-13 PI) coincidió con el desarrollo de la respuesta inmune del hospedador, los taquizoítos fueron eliminados de los tejidos, siendo únicamente detectados en el pulmón y el cerebro. El número de parásitos disminuyó en el pulmón gradualmente pero aumentó en el cerebro, observándose la mayor carga parasitaria en el día 13 PI en este órgano. En la tercera fase (a partir del día 13 PI), la infección se cronificó y el parásito permaneció con cargas bajas en cerebro hasta el final del experimento (día 63 PI). En los ganglios linfáticos, el parásito fue detectado intermitentemente con cargas muy bajas durante todo el experimento y hasta el día 49 PI.

El patrón de distribución de *N. caninum* es similar al que muestran los ratones infectados con *T. gondii*, en este modelo, durante la fase aguda, el parásito se detecta en sangre y en diferentes órganos (incluidos ganglios linfáticos) y durante la fase crónica en cerebro (Luo et al., 1997; Zenner et al., 1999). Estos resultados concuerdan también con experimentos anteriores utilizando ratones infectados con *N. caninum* (Eperon et al., 1999; Liddell et al., 1999b; Nishikawa et al., 2001b), en los cuales los órganos parasitados más

frecuentemente fueron los pulmones y el cerebro. Sin embargo, estos estudios no fueron cuantitativos, indicando sólo resultados positivos o negativos, la infección sólo se examinó durante un número reducido de días y no se investigó la presencia del parásito en sangre o ganglios linfáticos.

Es importante considerar que la técnica de PCR utilizada es incapaz de distinguir entre organismos vivos o muertos y podría cuestionarse si el ADN del parásito detectado en las muestras representa ADN de parásitos viables. El ADN detectado podría proceder de la distribución del inóculo de taquizoítos en los diferentes tejidos y en la sangre, con la subsiguiente fagocitosis por las células polimorfonucleares o del sistema mononuclear fagocitario. Aunque estos argumentos no pueden ser descartados, en otros experimentos realizados en nuestro laboratorio con ratones BALB/c inoculados con taquizoítos inactivados por ciclos de congelación-descongelación, no hemos detectado ADN del parásito en sangre, pulmón y cerebro en los días 1, 3, 7 y 14 PI. En estudios similares utilizando taquizoítos inactivados, tampoco se ha detectado ADN del parásito o la presencia de anticuerpos anti-*N. caninum* en los ratones (Eperon et al., 1999; Gottstein et al., 2001). Además, se han detectado lesiones compatibles con la infección por *N. caninum* en los diferentes órganos del ratón inoculado experimentalmente (Lindsay et al., 1995a; Shibabara et al., 1997; Baszler et al., 1999b; Lundén et al., 2002). Este hecho apoyaría la hipótesis de una multiplicación de los taquizoítos durante la fase aguda causando lesiones en los diferentes órganos, posteriormente en fases más avanzadas de la infección, el hospedador controlaría la multiplicación del parásito, eliminándolo de los distintos órganos excepto del SNC. La técnica de aislamiento del parásito en cultivo celular podría haber sido de gran utilidad para analizar si el ADN de *N. caninum* detectado en sangre y los diferentes tejidos por PCR en tiempo real procedía o no de parásitos viables. Sin embargo, esta técnica no fue utilizada debido a la gran dificultad para aislar el parásito mediante la inoculación directa de tejidos infectados en cultivos celulares, como ya se ha observado en el aislamiento del parásito a partir de animales naturalmente infectados (Dubey, 2003).

En lo que se refiere a la presencia del parásito en sangre, diferentes estudios han indicado que el tiempo e intensidad de la parasitemia durante la gestación es uno de los factores críticos en el desarrollo de la enfermedad (Innes et al., 2000). La parasitemia en la

madre podría ocurrir como consecuencia de un primer contacto con el parásito o debido a una recrudescencia de una infección anterior (Innes et al., 2002). Es conocido que el ganado bovino infectado por *N. caninum* sufre fluctuaciones en los niveles de anticuerpos, y el aumento de éstos podría ser un indicador de una recrudescencia de la infección (Paré et al., 1997; Stenlund et al., 1999; Quintanilla-Gozalo et al., 2000; Guy et al., 2001). Los estudios experimentales referentes a la presencia de *N. caninum* en la sangre son muy escasos (Ho et al., 1996; Williams et al., 2000; Innes et al., 2001; O'Handley et al., 2002; Maley et al., 2003) y sólo se ha descrito parasitemia en vacas y monos inoculados con taquizoítos (Ho et al., 1996) y ovejas infectadas con ooquistes de *N. caninum* (O'Handley et al., 2002). Hasta el momento, durante la infección natural no se ha detectado parasitemia (Guy et al., 2001). En el presente estudio se describe el patrón de parasitemia tras la inoculación experimental de taquizoítos de dos aislados de *N. caninum* de diferente patogenicidad en el ratón. El parásito está presente en sangre desde el día 1 hasta el 5-7 PI y en los días 11, 13, 19 y 56 PI, hecho que podría deberse a reactivaciones del parásito a partir del órgano de acantonamiento. El número de parásitos en sangre empezó a disminuir cuando los anticuerpos comenzaron a ser detectados, sin embargo el ADN del parásito también fue detectado esporádicamente en sangre en presencia de anticuerpos. Por esta razón, la presencia de ADN de *N. caninum* en sangre podría considerarse como una característica importante de una infección activa, siendo útil para un diagnóstico precoz de la infección antes de la aparición de anticuerpos específicos o para detectar posibles reactivaciones. Ho et al., (1996) también detectaron ADN de *N. caninum* en sangre intermitentemente y lo atribuyeron al número reducido de taquizoítos presentes o al hecho de que los parásitos circulan en sangre durante un periodo de tiempo limitado. En ratones infectados experimentalmente con *Toxoplasma* también se detectó el parásito en sangre por PCR esporádicamente (Shibata et al., 1995).

La cinética de distribución del parásito observada en el transcurso de la infección sugiere una regulación inmunitaria de la infección. En este experimento se estudiaron los niveles en plasma de los isotipos IgG2a e IgG1, asociados en ratón con un perfil de citoquinas tipo Th1 (IL-12 e IFN- $\gamma$ ) y Th2 (IL-4), respectivamente (Liew, 2001). Los ratones infectados mostraron a los pocos días PI una respuesta de anticuerpos IgG2a e IgG1. Durante las primeras dos semanas PI, los niveles de IgG2a fueron ligeramente mayores que los de IgG1, coincidiendo con el control de la multiplicación del parásito en sangre,

bazo, hígado y pulmones. La eliminación de *N. caninum* durante este periodo podría relacionarse con los niveles más elevados de IgG2a que de IgG1. Estas observaciones coinciden con diferentes estudios en los que se ha descrito una respuesta de tipo Th1 asociada a una resistencia a la infección de *N. caninum* en fases iniciales (Khan et al., 1997; Long et al., 1998). Asimismo, en ratones tratados con IL-12 recombinante se observó una disminución de la carga parasitaria en cerebro asociado con niveles más altos de IgG2a que IgG1 (Long et al., 1998). Añadir también, que el IFN $\gamma$  inhibe la multiplicación intracelular del parásito en cultivo celular (Innes et al., 1995; Nishikawa et al., 2001a, c) y es el principal mediador de la resistencia a *N. caninum* durante la fase aguda de la infección (Khan et al., 1997; Baszler et al., 1999b). Durante la fase crónica, se detectaron niveles altos de ambos isotipos, pero la producción de IgG1 predominó sobre la de IgG2a. En este periodo el parásito se detectó únicamente en cerebro y permaneció en este órgano hasta el final del experimento. Igual que en otros estudios, una mayor sensibilidad a la infección y cargas parasitarias elevadas en el cerebro se han relacionado con respuesta inmune mixta caracterizada por un cociente IFN $\gamma$ : IL-4 bajo (Long et al., 1998).

La habilidad para causar una infección crónica y producir reactivaciones es crucial para la perpetuación de *N. caninum* en la naturaleza. En este estudio se demuestra que el parásito permanece en cerebro hasta el día 63 PI y corrobora que el SNC es el lugar principal de persistencia del parásito. Los resultados obtenidos concuerdan con estudios anteriores en los que se describe al cerebro como el órgano dónde con más frecuencia se detectan el parásito como las lesiones compatibles en los hospedadores naturales (Barr et al., 1990; Hattel et al., 1998; Baszler et al., 1999a; Sawada et al., 2000). Los mecanismos de persistencia del parásito en el SNC se pueden atribuir a la situación inmunológicamente privilegiada del SNC o a mecanismos de escape del parásito frente a la respuesta inmune, como es la transformación de taquizoítos a bradizoítos formando quistes tisulares, al igual que ocurre en *T. gondii*. En el cerebro se ha descrito la presencia de quistes del parásito dentro de las neuronas (Barr et al., 1991b; Bryan et al., 1994). Éstas no son células diana para las células T citotóxicas como consecuencia de la falta de expresión de antígenos del MCH de clase I (Joly et al., 1991) ofreciendo de esta forma, ventajas nutricionales e inmunológicas para el parásito. Sin embargo, inicialmente el parásito debe acceder al SNC. Este hecho podría ocurrir mediante el transporte del parásito dentro de una célula como los monocitos o linfocitos, o por diseminación hematológica e infección de las células

endoteliales. Diversos estudios realizados en *N. caninum* han mencionado la tinción antigénica del citoplasma de células del tipo mononuclear fagocitario (Wouda et al., 1997a; Boger & Hattel, 2003), así como lesiones adyacentes a capilares con parásitos localizados alrededor de los vasos y en células endoteliales (Barr et al., 1991a; Buxton et al., 1998; Shibahara et al., 1999). Asimismo, es conocido que el parásito muestra gran tropismo por las células endoteliales (Dubey & Lindsay, 1996). En este estudio pudimos observar, a diferencia de otros órganos, la presencia del parásito en pulmón hasta el día 11-13 PI, lo que podría explicarse por la gran irrigación y cantidad de células endoteliales de este órgano que facilitaría la multiplicación del parásito.

Por su parte, el ADN de *N. caninum* también se detectó intermitentemente y con niveles muy bajos en ganglios linfáticos durante 49 días. La carga parasitaria tan baja y la detección esporádica podrían deberse a una menor frecuencia del ADN del parásito, no pudiéndose detectar continuamente con la técnica empleada. Este hecho podría ser también compatible con la fagocitosis e inactivación del parásito en los órganos o sangre por monocitos/macrofagos o linfocitos, los cuales volverían vía linfática a los ganglios linfáticos, detectándose aquí los restos antigénicos del parásito. En el SNC, el parásito sería fagocitado por las células de la microglia, que a través de los fluidos extracelulares llegarían a los ganglios linfáticos cervicales (Harling-Berg, et al., 1999). Otra razón podría ser la existencia de posibles reactivaciones del parásito durante la fase crónica de la infección asociado a células del sistema inmune, como las del sistema mononuclear fagocitario, las cuales pueden estar involucradas en el transporte del parásito por vía sanguínea o linfática, ya que los anticuerpos circulantes y el sistema de complemento probablemente matarían los taquizoítos extracelulares. Además *N. caninum* es un parásito intracelular obligado y sólo puede multiplicarse en las células del hospedador, por esta razón el parásito pasará la mayor parte del tiempo de forma intracelular siendo sólo extracelular durante un tiempo limitado (Hemphill, 1999). Ejemplos de persistencia *in vivo* después de una fase aguda unida a niveles infecciosos mínimos o no detectables en células inmunes como monocitos, se han descrito en los virus miembros del grupo Arteriviridae (Sur et al., 1996; Allende et al., 2000; Wills et al., 2003) o alfa- o gamma-Herpesviridae (Shefly et al., 1973; Osorio et al., 1982, 1983; Egyed et al., 1994). En el caso de *T. gondii* se ha descrito que es capaz de resistir la lisis en el macrófago (MacLeod et al., 1991) y puede infectar a los leucocitos (Channon et al., 2000). Recientemente, se ha

señalado que la migración de los taquizoítos de *T. gondii* a través de las barreras biológicas podría ser un proceso activo o estar asociado a una célula como monocito o linfocito (Barragán & Dubey, 2003). Sin duda, es necesario la realización de futuros experimentos para caracterizar la localización celular del parásito y determinar el papel de las células inmunes en sangre y ganglios linfáticos como lugares de persistencia o vías de diseminación de *N. caninum*. Así pues, el modelo murino podría ser particularmente útil para examinar las bases moleculares de la persistencia y reactivación de *N. caninum*.

Los mecanismos responsables de la eliminación del parásito de determinados órganos y la persistencia en otros no se conocen muy bien. La respuesta inmune (innata y específica) del hospedador durante la fase aguda parece ser suficiente para limitar la multiplicación del parásito en sangre y en la mayoría de los órganos que se analizaron, pero durante la fase crónica el parásito persiste en el cerebro del hospedador. En el caso de otro protozoo intracelular como *Leishmania*, se ha sugerido que la carga parasitaria podría afectar a la respuesta inmune desarrollada. Interesantemente, cuando la carga parasitaria es baja, la IL-12 puede inhibir la respuesta Th2. No obstante, cuando la infección está ya establecida y hay células Th2 en el hospedador, una carga parasitaria elevada favorecería una respuesta Th2 la cual directamente actuaría inhibiendo la Th1 (Hondowicz et al., 2002). En nuestro experimento se observó un comportamiento similar, después de la segunda semana la producción del isotipo IgG1 fue más elevada que IgG2a y coincidió con cargas del parásito elevadas en el cerebro. Por otra parte, la respuesta inmune periférica dirigida por la presencia del antígeno retenido en el SNC también deriva en el desarrollo de una respuesta Th2. Se ha demostrado que el antígeno en el parénquima cerebral drena a los ganglios linfáticos cervicales y allí se induce una población de linfocitos B activados y linfoblastos Th2. Estas células, que entran en la circulación sanguínea, llegan a bazo y probablemente a médula ósea, donde se promueve una respuesta Th2. Asimismo, si se producen linfocitos Th1 en la periferia, las citoquinas secretadas por estos linfoblastos Th2 podrían inhibir la respuesta Th1. Las células Th2 producidas en los ganglios linfáticos cervicales tiene la función de destruir el antígeno en el SNC causando el mínimo daño posible, al igual que lo descrito en otros órganos como la placenta o el ojo (Harling-Berg et al., 1999). Por tanto es posible que la presencia del agente y las cargas parasitarias en el SNC modulen la respuesta inmune en el hospedador promoviendo la situación más favorable para la multiplicación o persistencia del parásito.

Haciendo referencia a las diferencias entre los aislados NC-Liv y NC-1 encontradas, el hallazgo más importante relacionado con la virulencia fue la presencia de síntomas y la carga del parásito en el cerebro. Durante las primeras dos semanas de la infección no se observaron síntomas, sin embargo a partir de la segunda semana PI y coincidiendo con cargas altas en el SNC e inicio de la fase crónica, sólo los ratones infectados con NC-Liv mostraron sintomatología, la cual en algunos de los ratones, fue de carácter neurológico. No obstante, en las fases más avanzadas de la infección y cuando las cargas en el cerebro fueron disminuyendo todos los síntomas desaparecieron. De esta forma, se demostró una asociación entre la carga parasitaria en cerebro y la presencia de sintomatología, los ratones que mostraron síntomas tuvieron significativamente mayor número de parásitos en el cerebro que los que permanecieron asintomáticos. Por otra parte, el análisis de regresión logística demostró que la capacidad infectiva de los dos aislados fue distinta y la carga parasitaria en el cerebro es un factor de riesgo para el desarrollo de sintomatología para el aislado NC-Liv. En este sentido, los ratones infectados con NC-Liv tuvieron mayor carga parasitaria que el grupo de animales infectados con NC-1.

Por otra parte, en hígado se observó en el día 1 PI mayor carga parasitaria en el grupo de ratones infectado con NC-1. Estos resultados fueron confirmados al analizar los datos por "bootstrap", donde se pudo observar que la distribución de la carga parasitaria en hígado y cerebro fue distinta, indicando que los aislados NC-Liv y NC-1 podrían tener un comportamiento y tropismo tisular diferente en función de la fase de la infección. Este hallazgo puede tener importantes connotaciones. Durante la fase crónica el aislado NC-Liv fue más virulento que NC-1, no obstante, NC-1 parece replicarse más rápido en órganos implicados en la fase aguda de la infección, pudiendo tener un mayor potencial patogénico que NC-Liv en el animal gestante, ya que se multiplicaría más activamente en la placenta y feto, causando el aborto. La hipótesis aquí descrita concuerda con los resultados obtenidos en el modelo murino gestante con ratones Quackenbush, donde con el aislado NC-SweB1 se observó en el día 14 de gestación un 25% de fetos no viables por camada, mientras que con NC-Liv la media fue sólo del 2,8% (Quinn et al., 2002a).

En trabajos anteriores también se han descrito variaciones entre los diferentes aislados de *N. caninum* en relación con la patogenicidad en ratón, variabilidad genética, crecimiento en cultivo celular y respuesta inmune (Atkinson et al., 1999; Schock et al.,

2001; Quinn et al., 2002a). Atendiendo a las diferencias de crecimiento en cultivo celular el aislado NC-Liv también se multiplicó más rápido que NC-1 (Schock et al., 2001), al igual que lo que nosotros hemos observado *in vivo*. En el modelo murino, el aislado NC-Liv fue también más patagénico Nc-SweB1, causando importantes lesiones en cerebro así como alta morbilidad y mortalidad (Atkinson et al., 1999).

En conclusión, este estudio describe el patrón de distribución y la persistencia de *N. caninum* en un modelo murino y la influencia del aislado del parásito en el desarrollo de la infección. También pone de manifiesto la importancia de cuantificar el parásito para seguir el curso de la infección y conocer posibles variaciones en la virulencia existentes entre los diferentes aislados. El desarrollo de un modelo de laboratorio para conocer la patogenicidad de *N. caninum* es esencial para el desarrollo de futuras estrategias de control. En este sentido, la cuantificación de *N. caninum* en los órganos diana en la infección aguda y crónica en el modelo murino, podría ser utilizando para la evaluación de la eficacia de tratamientos o vacunas dirigidas frente a la infección por *N. caninum*.

**6.- Objetivo 3: Patogenia de la Infección por *N. caninum*  
en el Feto Bovino. Estudio de la Distribución-Carga  
Parasitaria y del Cuadro Lesional**

En los últimos años se ha avanzado de forma considerable en el conocimiento de la neosporosis, sin embargo la infección en el ganado bovino tiene una patogenia compleja y son muchos los aspectos que permanecen todavía sin esclarecer. Se ha demostrado experimentalmente que *N. caninum* puede atravesar la placenta e infectar al feto y dependiendo de la edad del feto en el momento de la infección, se produce el aborto o el nacimiento de terneros congénitamente infectados (Buxton et al., 2002; Dubey, 2003). En vacas con infección natural, se ha descrito un incremento en el título de anticuerpos durante el segundo trimestre en las vacas que abortaron y durante el tercer tercio en las vacas que tuvieron terneros congénitamente infectados (Paré et al., 1997; Quintanilla-Gozalo et al., 2000; Guy et al., 2001). Experimentalmente, se ha observado que según avanza la gestación la posibilidad de transmisión aumenta. De esta forma, la infección del feto en el primer periodo de la gestación produce el aborto (Williams et al., 2000, 2003; Macaldowie et al., 2002), en el segundo tercio, las consecuencias son variables, produciéndose en la mayoría de los casos la infección del feto y no su muerte (Barr et al., 1994a; Innes et al., 2000, 2001; Andrianarivo et al., 2001; Maley et al., 2003) y finalmente si la infección se realiza en la última fase de la gestación se observa el nacimiento de terneros congénitamente infectados (Innes et al., 2000; Williams et al., 2000). De esta forma, las características de las lesiones observadas en el feto también pueden variar en función del momento de la gestación en el que se produzca la infección, habiéndose descrito en el cerebro una mayor necrosis y presencia de mayor número de parásitos en fetos jóvenes y una mayor reacción inflamatoria en fetos inmunocompetentes (Barr et al., 1991a; Corbellini et al., 2002; Kim et al., 2002a). Este diferente patrón lesional en el SNC según la edad del animal, también se ha sugerido en otros estudios; así en tres fetos abortados de 5 meses se observaron necrosis y en un feto de 7 meses y un ternero fue más frecuente la presencia de gliosis y manguitos perivasculares (Ongino et al., 1992).

El modo de transmisión del parásito y el desarrollo de la respuesta inmune de la madre también pueden influir en la patogenia del aborto y en la naturaleza de las lesiones presentes en el feto. En infecciones naturales, se ha observado que en rebaños con abortos de carácter epidémico, las vacas con infección previa son más resistentes a la nueva infección que los animales que han adquirido recientemente la infección por vía horizontal. Este hecho se ha asociado al desarrollo de una inmunidad protectora en los animales crónicamente infectados que previene el aborto después de una reinfección,

posiblemente con ooquistes (McAllister et al., 2000; Schares et al., 2002a). Por su parte, en fetos de abortos epidémicos (asociados con la transmisión horizontal) se ha observado con más frecuencia hepatitis y mayor número de parásitos que en los fetos procedentes de abortos esporádicos (Wouda et al., 1997a). En rebaños con neosporosis endémica, también se ha descrito que las vacas congénitamente infectadas tienen más posibilidades de abortar durante la primera gestación que en las sucesivas (Anderson et al., 1995; Dubey & Lindsay, 1996). Recientemente, se ha demostrado experimentalmente que la inmunidad desarrollada en vacas naturalmente infectadas protege frente a una reinfección (inoculación de taquizoítos) y el aborto. Sin embargo esta inmunidad no protege frente a la reactivación de la infección crónica, produciéndose el aborto o el nacimiento de terneros congénitamente infectados (Williams et al., 2003).

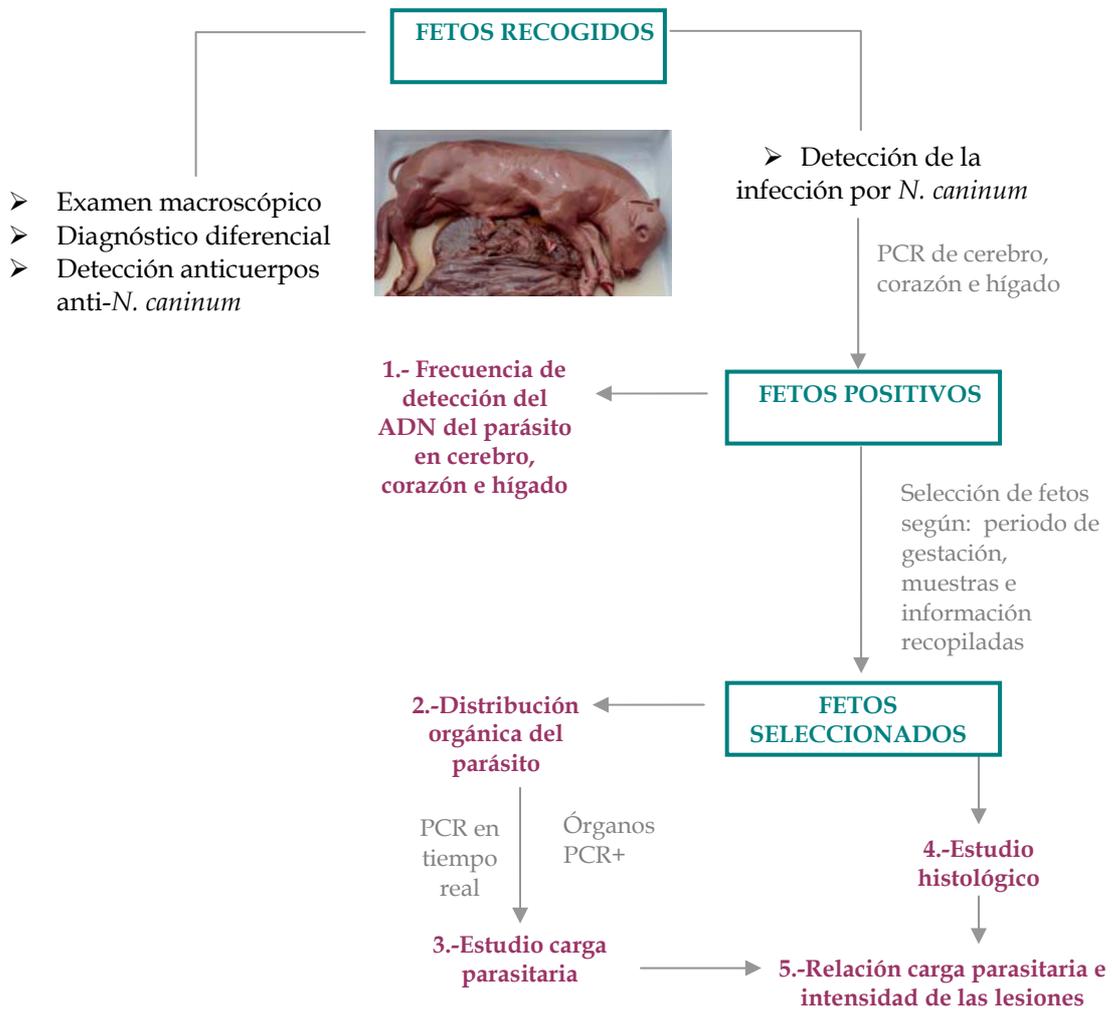
En este objetivo se investigó la distribución del parásito, la carga parasitaria y el cuadro lesional en fetos bovinos abortados en relación con la edad gestacional (primer, segundo y tercer periodo de gestación) y las características epidemiológicas del aborto (epidémico, endémico, esporádico).

## 6.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la realización de este objetivo se siguió el planteamiento recogido en el esquema de la Figura 22. En primer lugar, se procedió a la detección de la infección por *N. caninum* en los fetos recogidos y para lo cual se empleó la técnica de PCR. Antes de analizar las muestras fetales, se probaron dos tipos de pruebas de PCR de diferentes zonas del genoma de *N. caninum* (región Nc-5 y fragmento ITS1) buscando la máxima sensibilidad. El límite de detección de *N. caninum* fue determinado mediante diluciones decimales seriadas del ADN del parásito. La PCR que mostró una mayor sensibilidad fue la que se utilizó para la amplificación del ADN del parásito en el cerebro, corazón e hígado, que son considerados los órganos diana en el diagnóstico de la neosporosis y en los cuales se ha detectado con mayor frecuencia la presencia de lesiones y del parásito (Dubey & Lindsay, 1996; Dubey, 2003). Complementariamente y cuando así fue posible, en todos los fetos recogidos se realizó el diagnóstico diferencial con otros procesos abortivos, un examen macroscópico y la detección de anticuerpos anti-*N. caninum* por IFI y ELISA en los fetos y madres abortadas.

Una vez identificados los fetos positivos por PCR se analizó la frecuencia de detección del ADN del parásito en cerebro, corazón e hígado en función del órgano analizado, periodo de gestación y características epidemiológicas del aborto. Posteriormente, se eligió un número representativo de fetos del primer, segundo y tercer periodo de gestación según las muestras e información y recopiladas y se estudió en función del órgano analizado, edad fetal y patrón del aborto: (i) la distribución del parásito, (ii) la carga parasitaria presente en cada órgano, (iii) la frecuencia de presentación y (iv) la gravedad de las lesiones. Por último se investigó la relación entre la carga parasitaria y la gravedad de la lesión en los principales órganos fetales. Para el estudio de la distribución del parásito se analizaron por PCR, además de cerebro, corazón e hígado, los siguientes órganos: riñón, pulmón, timo, ganglios linfáticos mediastínicos y mesentéricos, bazo, diafragma y glándula suprarrenal. La carga parasitaria se determinó utilizando la PCR cuantitativa en tiempo real desarrollada en el primer objetivo en cerebro, corazón, hígado, riñón y pulmón, que a su vez habían sido positivos previamente por la PCR convencional. Por su parte, el estudio histológico (frecuencia y gravedad de las lesiones) se realizó en cerebro, corazón, hígado, riñón y pulmón, aunque también en algunos fetos se examinaron otros órganos como timo, bazo, ganglios linfáticos y glándula adrenal.

Figura 22. Esquema del diseño experimental del objetivo 3.



### 6.1.1. Recogida de muestras y datos

Las muestras de los fetos bovinos abortados fueron proporcionadas por los Laboratorios de Sanidad Animal (Gijón), de Sanidad y Producción Animal de Galicia (Lugo) y del Instituto de Investigación y Desarrollo Agrario (Neiker, Derio, País Vasco). En total se analizaron 219 fetos (Tabla 25) que fueron recogidos y remitidos a nuestro laboratorio entre los años 2000-2003 y según el protocolo que aparece reflejado en el apartado 3.3.2.

**Tabla 25.** Laboratorio y lugar de procedencia de los fetos abortados y número de muestras analizadas.

Procedencia		Nº de fetos	Nº de líquidos	Nº de sueros
Laboratorio	Comunidad Autónoma	analizados	fetales	de la madre
Gijón	Asturias	35	32	0
Lugo	Galicia	158	143	87
Derio	País Vasco	9	3	1
	Galicia	8	4	0
	Navarra	3	2	0
	Castilla La Mancha	2	1	0
	Castilla-León	1	1	0
	Madrid	1	0	0
	Cataluña	1	1	0
	Aragón	1	0	0
<b>TOTAL</b>		219	187	88

Las muestras de cada feto se acompañaron de una ficha individual con los datos de la edad fetal, historial de la explotación y los resultados del diagnóstico diferencial con otros agentes o causas de aborto (ver apartado 3.3.2.).

De acuerdo con la información recopilada, los abortos bovinos se clasificaron en fetos de primer, segundo o tercer periodo de gestación. El primer periodo de gestación comprendió el intervalo de tiempo desde los 46 días hasta los 100-120, aproximadamente en el cual el sistema inmune del feto no está apenas desarrollado, incluyéndose por tanto en este periodo los fetos menores de 4 meses. El segundo periodo comprendió desde los 120 hasta los 195 días de gestación cuando el feto bovino comienza a ser inmunocompetente. Finalmente, en el tercer periodo de gestación se incluyeron los fetos mayores de 195 días de edad con el sistema inmune ya desarrollado. La segunda categoría en la que se clasificaron los abortos fue atendiendo a las características epidemiológicas del aborto: epidémico, endémico y esporádico. Se consideró como aborto epidémico cuando la tasa anual de aborto en la explotación (relación entre el número de abortos y el número de animales en riesgo de abortar) fue igual o superior al 3% o más de los animales en riesgo y ocurrió en un período de tres meses; cuando la tasa fue igual a la anterior pero se distribuyó a lo largo de todo el año se definió como aborto endémico y, por último, se consideró como aborto esporádico cuando éste tuvo lugar en los animales en riesgo a

intervalos irregulares y la tasa anual de aborto nunca fue superior al 3% (Davidson et al., 1999d).

### **6.1.2. Análisis de las muestras**

#### **6.1.2.1. Examen macroscópico y diagnóstico diferencial**

Los laboratorios encargados de la recogida de muestras realizaron un examen macroscópico del feto consistente en: presencia de lesiones macroscópicas, estado general del feto (fresco, autolítico, momificado, macerado, malformado o putrefacto) y edad gestacional valorada en función de la longitud craneocaudal (Gjesdal, 1969).

Las pruebas laboratoriales complementarias para un diagnóstico diferencial con otros procesos se llevaron a cabo en los laboratorios de origen. Para el diagnóstico de las infecciones fetales por los virus de la diarrea vírica bovina (VBVD) se realizó un ELISA de captura en órganos fetales y un ELISA de competición para la detección de anticuerpos anti P-80 en el suero de la madre o en los líquidos fetales. Para la detección de la infección por el virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (VIBR) se hizo una inmunofluorescencia directa (IFD) sobre órganos fetales y un ELISA indirecto para la determinación de anticuerpos. También, se realizaron cultivos bacteriológicos del contenido abomasal y de diversos órganos fetales.

#### **6.1.2.2. Estudio serológico**

El laboratorio de Sanidad y Producción Animal de Galicia (Lugo) colaboró en la detección de anticuerpos anti-*N. caninum* de los líquidos fetales (líquido abdominal y líquido torácico) y de los sueros de las madres empleando para ello un ELISA indirecto (ver apartado 3.4.1.2.2.). Por su parte, las mismas muestras se analizaron en nuestro laboratorio utilizando la prueba de IFI cuyo protocolo aparece reflejado en el apartado 3.4.1.1.2.

### 6.1.2.3. Detección de *N. caninum* en los órganos fetales

La detección de la infección por *N. caninum* en los fetos recogidos se realizó empleando la técnica de PCR. Primeramente se determinó la sensibilidad de una PCR basada en la región Nc-5 específica de *N. caninum* y de una PCR anidada del fragmento ITS1 del ADN ribosomal del parásito (ver apartado 3.4.3.3.1.). La PCR que mostró una mayor sensibilidad se utilizó para la amplificación del ADN del parásito en cerebro, corazón e hígado.

Para el estudio de la distribución del parásito se analizaron también por PCR los siguientes órganos: riñón, pulmón, timo, ganglios linfáticos mediastínicos y mesentéricos, bazo, diafragma y glándula suprarrenal. El ADN se extrajo a partir de un macerado del órgano utilizando la resina Chelex-100 (ver apartado 3.4.3.1.1.). En ganglios linfáticos, glándula suprarrenal y diafragma no se realizaron macerados por la textura de estos órganos y el ADN se aisló utilizando una prueba comercial según se detalla en el apartado 3.4.3.1.2.

### 6.1.2.4. Cuantificación de *N. caninum* en los órganos fetales

La carga parasitaria se determinó utilizando la PCR cuantitativa en tiempo real desarrollada en el primer objetivo en los siguientes órganos: cerebro, corazón, hígado, riñón y pulmón, que a su vez habían sido positivos previamente por la PCR convencional.

El ADN de los órganos fetales para su utilización como molde en la PCR cuantitativa se extrajo mediante una prueba comercial y posteriormente se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa para comprobar la calidad del mismo. Si el ADN estaba degradado se pasó por una columna de cromatografía (ver apartado 3.4.3.2.3.) con el fin de eliminar fragmentos de ADN degradado de bajo peso molecular, los cuales, según se observó, interferían en la PCR cuantitativa.

#### 6.1.2.5. Estudio histológico

Los tejidos fetales fijados en formol de los fetos positivos seleccionados, fueron procesados según se detalla en el apartado 3.4.2.1. Complementariamente, la edad de los fetos seleccionados se determinó basándose en los distintos periodos de desarrollo fetal del pulmón en los bóvidos (ver apartado 3.4.2.2.).

La categorización de las lesiones se llevó a cabo según el criterio establecido en el apartado 3.4.2.3. Primeramente, se realizó la descripción de los hallazgos histopatológicos observados en los fetos objeto de estudio, seguido por un análisis de la frecuencia de presentación de las lesiones en cerebro, corazón, hígado, riñón y pulmón así como de la gravedad de la lesión observada en dichos órganos. Por último, se propuso un análisis del cuadro lesional en el cerebro considerando los hallazgos histopatológicos más característicos de la infección por *N. caninum* (necrosis, infiltración de células redondas en el parenquima cerebral, manguitos perivasculares, nódulos gliales y gliosis) de los cuales se analizaron también la frecuencia de presentación y la gravedad de la lesión.

#### 6.1.3. Análisis estadístico

La valoración estadística de la relación entre la detección del parásito por PCR, la presencia de lesiones en los diferentes órganos y las variables a estudiar (periodo de gestación y características epidemiológicas del aborto) se realizó mediante la prueba estadística Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) y la prueba de *F* de Fisher para valores menores de 5. Las cargas parasitarias y los grados de la intensidad de las lesiones se analizaron utilizando la prueba *H* de Kruskal-Wallis si se compararon más de dos grupos. Cuando se observaron diferencias estadísticamente significativas se compararon los grupos dos a dos mediante una prueba no paramétrica de comparaciones múltiples. En este caso un valor de  $P < 0,05/[k \times (k-1)/2]$  fue considerado como estadísticamente significativo, siendo *k* el número de grupos analizados. Cuando se compararon dos grupos se empleó la prueba no paramétrica *U* de Mann-Whitney. Para el estudio de la relación de la carga parasitaria en función de la gravedad de la lesión se emplearon los mismos métodos no paramétricos aquí descritos.

## 6.2. RESULTADOS

### 6.2.1. Examen macroscópico de los fetos

La presencia de lesiones macroscópicas en los fetos analizados se observaron únicamente en ocho fetos (3,65%). Los hallazgos más destacados fueron el engrosamiento de la piel con formación de costras de bordes regulares en párpados, región costal y dorso junto con el aspecto rugoso de la superficie del hígado observados en un feto en el que se aisló *Aspergillus*; y malformaciones congénitas en otro feto del que se sospechó la infección por el VBVD. En relación con el aspecto general del feto, la mayoría fueron fetos frescos y solo ocho presentaron autólisis y ninguno momificación.

La edad gestacional se determinó en el 87,2% (191/219) de los fetos remitidos. El mayor porcentaje de fetos correspondió a los meses 5, 6, y 7 de gestación (Figura 23), representando un 16,4% (36/219), 17,8% (39/219) y un 20,5% (45/219), respectivamente. Fetos de 4 y 8 meses se examinaron en el 9,6% (21/219) y 12,3% (27/219) de los casos. Los fetos menos frecuentes fueron los de nueve meses, en los que únicamente se remitió un caso y menores de cuatro meses con un 5,9% (13/219), entre los cuales uno correspondió a un feto de 2 meses y otro de un mes y medio. En este punto hay que señalar que debido al bajo número de fetos del primer tercio de gestación analizados y con el fin de incrementar el tamaño de la muestra, se puso especial interés durante el último año en la recogida y análisis de fetos menores de 4 meses de edad.

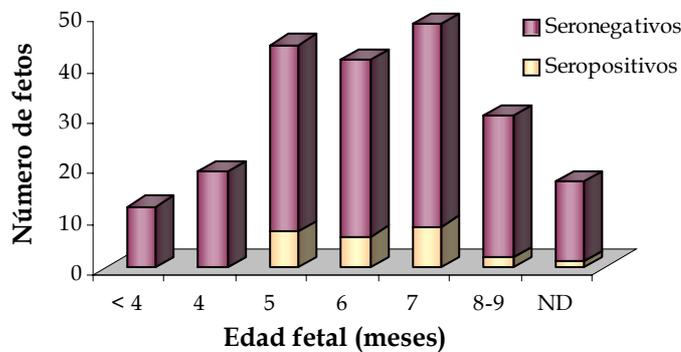
### 6.2.2. Detección de IgG anti-*N. caninum*

Se analizaron, mediante IFI o ELISA, 187 líquidos fetales, detectándose anticuerpos específicos frente a *N. caninum* en un 12,8% (24/187). En el 83,3% (20/24) de los fetos seropositivos se detectó posteriormente ADN del parásito en alguno de los órganos analizados por PCR (apartado 6.2.4.2.). En función de la edad del feto, en el segundo periodo de gestación el 14,13% (13/92) de los sueros analizados en este periodo fueron positivos, concretamente el 18,9% (7/37) y 17,1% (6/35) correspondieron al quinto y sexto mes de gestación, respectivamente. En el tercer tercio de gestación el 15,2% (10/66) fueron seropositivos y predominaron los fetos positivos del mes séptimo con un 20% (8/40)

frente a un 7,7% (2/26) correspondientes al octavo (Figura 23). En lo referente a los títulos de anticuerpos obtenidos mediante IFI, oscilaron entre 1:16 y 1:512.

Utilizando también las técnicas de IFI y ELISA se analizaron 88 sueros procedentes de las madres abortadas. En el 43,2% (38/88) de los casos se detectaron IgG anti-*N. caninum* y el 86,8% (33/38) fueron madres de fetos positivos a *N. caninum* por PCR. Los títulos de anticuerpos obtenidos variaron entre 1:250 y 1:4000.

**Figura 23.** Distribución por edad gestacional de los sueros analizados.



### 6.2.3. Diagnóstico diferencial

En un 29,2% de los 219 fetos bovinos analizados, se logró la identificación de algún agente infeccioso (ver Tabla 26). De estos fetos, en un 15,6% (10/64) se detectó posteriormente la presencia de *N. caninum* por PCR.

**Tabla 26.** Agentes infecciosos identificados en los 219 fetos analizados.

AGENTE ETIOLÓGICO	Nº FETOS	TOTAL (%)
▪ <b>Bacterias</b>	<b>38</b>	<b>17,4</b>
<i>Escherichia coli</i> <sup>a</sup>	18	8,2
<i>Bacillus licheniformis</i>	5	2,3
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	4	1,8
<i>Brucella sp.</i>	1	0,5
<i>Salmonella</i>	1	0,5
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0,5
<i>Yersinia enterocolítica</i>	1	0,5
<i>Enterococcus faecalis</i> -grupo A	3	1,4
<i>Enterococcus hirae</i> -grupo D	1	0,5
<i>Enterococcus casseliflavus</i> -grupo D	1	0,5
<i>Streptococcus bovis</i> (var)-grupo D	1	0,5
<i>Staphylococcus</i>	1	0,5
▪ <b>Leptospira</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>
▪ <b>Hongos: <i>Aspergillus fumigatus</i></b>	<b>3</b>	<b>1,4</b>
▪ <b>Virus</b>	<b>22</b>	<b>10</b>
VBVD <sup>b</sup>	18	8,2
VIBR	4	1,8
<b>TOTAL</b>	<b>64</b>	<b>29,2</b>

<sup>a</sup> En 6 fetos también se detectó ADN *N. caninum*.

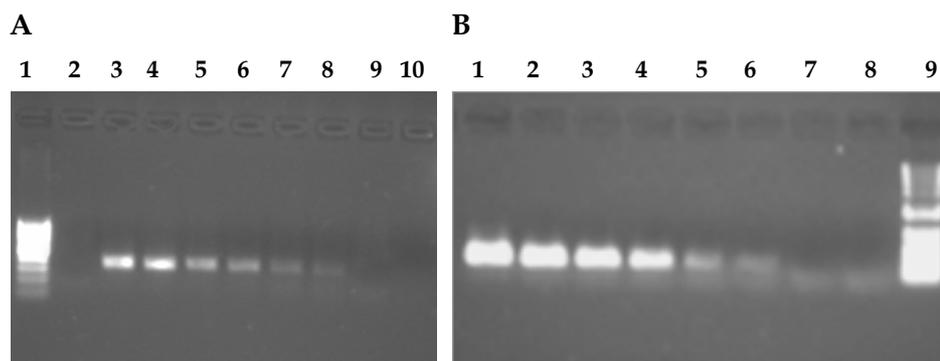
<sup>b</sup> En 4 fetos también se detectó ADN *N. caninum*

#### 6.2.4. Detección de *N. caninum* en órganos fetales

##### 6.2.4.1. Sensibilidad de la PCR Nc-5 y de la PCR anidada ITS1

El límite de detección de *N. caninum* fue determinado mediante diluciones decimales seriadas del ADN del parásito. Los resultados obtenidos se muestran en las Figura 24, dónde se puede observar el producto de amplificación de ADN equivalente a 1 taquizoíto cuando se probó la PCR Nc-5 o hasta 10<sup>-2</sup> con la PCR anidada.

**Figura 24.** (A) Sensibilidad de la PCR Nc-5 (360 pb). Carriles 2-10: diluciones decimales seriadas del ADN del parásito desde  $10^5$  hasta  $10^{-2}$  taquizoítos, carril 1: Marcador de peso molecular 100-bp DNA Ladder (Biotools) y línea 2: testigo negativo (agua ultrapura). (B) Sensibilidad de la PCR anidada del segmento ITS1 (213 pb). Carriles 1-7: diluciones decimales seriadas del ADN del parásito desde  $10^3$  hasta  $10^{-3}$  taquizoítos, carril 8: testigo negativo (agua ultrapura) y carril 9: Marcador de peso molecular DNA Ladder 1Kb plus, (Gibco-BRL).

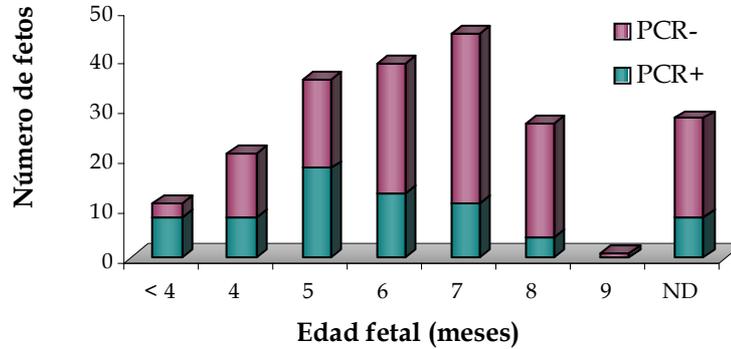


De acuerdo con los resultados obtenidos, se empleó la PCR anidada para la detección del ADN de *N. caninum* en los órganos fetales.

#### 6.2.4.2. Detección del ADN de *N. caninum* en cerebro, corazón e hígado

La presencia del ADN del parásito se detectó en el 32,8% de los fetos analizados (72/219). Predominaron los fetos positivos del segundo periodo de gestación con un 40,6% (39/96), en el último periodo fueron positivos el 20,5% (15/73) y en el primero el 72,7% (8/11). En un 28,6% (8/28) de los fetos positivos no se conoció la edad gestacional. La distribución por edad gestacional de los fetos positivos por PCR está reflejada en la Figura 25.

**Figura 25.** Distribución de la edad de los 219 fetos analizados por PCR.



La distribución geográfica de los fetos positivos aparece reflejada en la Tabla 27. El número más elevado de fetos positivos por PCR corresponde a Galicia y el menor a Asturias.

**Tabla 27.** Distribución geográfica de los 219 fetos analizados por PCR.

Procedencia		Nº de fetos	Nº de fetos
Laboratorio	Comunidad Autónoma	analizados	positivos
Gijón	Asturias	35	6
Lugo	Galicia	158	57
	País Vasco	9	3
	Galicia	8	3
	Navarra	3	0
Derio	Castilla La Mancha	2	1
	Castilla-León	1	0
	Madrid	1	0
	Cataluña	1	1
	Aragón	1	1
<b>TOTAL</b>		219	72

De acuerdo con la información recopilada, los fetos positivos por PCR se clasificaron atendiendo a las características epidemiológicas en tres categorías: aborto epidémico, endémico y esporádico. El tipo de aborto no se pudo determinar en el 37,5% (27/72) de los casos, el resto correspondieron principalmente a abortos de naturaleza endémica,

representando el 37,5% (27/72), el patrón epidémico estuvo presente en el 19,4% (14/72) y el menos frecuente fue el tipo esporádico con sólo un 5,5% (4/72).

En lo que se refiere a la frecuencia de detección del ADN de *N. caninum* en función del órgano analizado (Tabla 28), el cerebro fue el órgano dónde con más frecuencia se detectó el ADN del parásito ( $P < 0,0001$ , Chi-cuadrado) y únicamente tres fetos fueron negativos en cerebro y positivos en corazón o hígado. El segundo órgano más frecuente fue el corazón ( $P < 0,01$ ) y el tercero el hígado. El parásito se detectó con más frecuencia en más de un órgano (normalmente cerebro y corazón) que en uno sólo (54,29% versus 45,71%) pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ).

**Tabla 28.** Distribución de los fetos positivos por PCR en función del órgano analizado.

Órgano analizado	% Positivos <sup>a</sup>
Cerebro	95,8% (68/71)
Corazón	49,3% (35/71)
Hígado	22,5% (16/71)
Cerebro & Corazón	32,9% (23/70)
Cerebro & Hígado	5,6% (4/71)
Corazón & Hígado	1,4% (1/70)
Cerebro & Corazón & Hígado	15,7% (11/70)

<sup>a</sup> Número de muestras positivas sobre el total de fetos positivos por PCR. En 4 fetos no se pudieron analizar los tres órganos.

También se analizó la frecuencia de detección del ADN de *N. caninum* en función del órgano analizado y del periodo de gestación (Tabla 29). En los fetos correspondientes al primer periodo ( $n = 10$ ), el parásito se detectó principalmente en cerebro y corazón, y después en hígado (90% versus 40%;  $P < 0,05$ , *F* de Fisher). También fue más frecuente encontrar más de un órgano positivo por PCR que uno sólo (90% versus 10%;  $P < 0,05$ , *F* de Fisher), e incluso los tres órganos, detectándose en un 30% de los casos ( $P > 0,05$ , *F* de Fisher). En el segundo periodo ( $n = 40$ ) el cerebro continuó siendo el órgano dónde con más frecuencia (97,5%) se obtuvieron resultados positivos ( $P < 0,0001$ , Chi-cuadrado), después el corazón (42,5%) y por último el hígado (23,1%), aunque entre estos dos órganos no se observaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ , Chi-cuadrado). En comparación con el primer periodo se observó una disminución de la detectabilidad del parásito en corazón ( $P < 0,05$ , *F* de Fisher) y en hígado, aunque aquí las diferencias no

fueron estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ,  $F$  de Fisher). Este hallazgo también se observó al comparar la frecuencia de detección del parásito en más de un órgano ( $P > 0,05$ ,  $F$  de Fisher). En los fetos pertenecientes al tercer periodo de gestación ( $n = 14$ ) el ADN de *N. caninum* se detectó principalmente en cerebro (92,9%;  $P < 0,05$ ,  $F$  de Fisher) y sólo en el 28,6% de los fetos en corazón y el 7,1% en hígado. Muy pocos fetos (28,57%) tuvieron más de un órgano positivo por PCR (cerebro y corazón), y no se observó ninguno con los tres órganos positivos. La frecuencia de detección en corazón en los fetos del tercer periodo fue menor respecto al primero ( $P < 0,05$ ,  $F$  de Fisher) y segundo tercio de gestación ( $P > 0,05$ ,  $F$  de Fisher), al igual que en hígado ( $P > 0,05$ ,  $F$  de Fisher). Al comparar la frecuencia de detección del parásito en más de un órgano, solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el primer y tercer periodo ( $P < 0,05$ ,  $F$  de Fisher).

**Tabla 29.** Distribución de los fetos positivos por PCR en función del órgano analizado y el periodo de gestación.

	Primer periodo	Segundo periodo	Tercer periodo
<b>Cerebro</b>	90% (9/10)	97,5% (39/40)	92,9% (13/14)
<b>Corazón</b>	90% (9/10)	43,6% (17/39)	28,6% (4/14)
<b>Hígado</b>	40% (4/10)	23,1% (9/39)	7,1% (1/14)
<b>1 órgano positivo</b>	10% (1/10)	46,2% (18/39)	71,4% (10/14)
<b>2 órganos positivos</b>	60% (6/10)	34,2% (13/38)	28,6% (4/14)
<b>3 órganos positivos</b>	30% (3/10)	18% (7/39)	0% (0/14)

También se estudió la frecuencia de detección del ADN de *N. caninum* en los órganos analizados en abortos de tipo epidémico y endémico (Tabla 30). La presentación del aborto esporádico no se incluyó en el estudio por el reducido número de fetos que la presentaron (4/72), sólo mencionar al respecto que el cerebro fue positivo en tres fetos, el corazón en dos y el hígado en uno. En los abortos de naturaleza epidémica ( $n = 14$ ), el cerebro fue el órgano dónde principalmente se detectó ADN de *N. caninum* (100%;  $P < 0,001$ , Chi-cuadrado) después el corazón (64,3%) y por último el hígado (35,7%) ( $P > 0,05$ ,  $F$  de Fisher). También fue más frecuente encontrar más de un órgano positivo que uno sólo ( $P < 0,01$ ). En los abortos con historial endémico ( $n = 27$ ), el cerebro fue también el

órgano más frecuentemente positivo (92,6%;  $P < 0,0001$ , Chi-cuadrado), en segundo lugar corazón (37%) y en último hígado (18,5%) ( $P > 0,05$ ,  $F$  de Fisher). El 59,3% de los fetos tuvieron más de un órgano positivo (principalmente cerebro y corazón) frente a un 40,7% en los que el parásito se detectó únicamente en cerebro ( $P > 0,05$ ,  $F$  de Fisher). A pesar de que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ,  $F$  de Fisher) el parásito se detectó más frecuentemente en corazón e hígado en los fetos epidémicos que endémicos (corazón: 64,3% *versus* 37% e hígado: 35,7% *versus* 18,5%). También fue más frecuente encontrar más de un órgano positivo por PCR en los abortos epidémicos que en los endémicos ( $P < 0,05$ ,  $F$  de Fisher), y los tres órganos (21,4% *versus* 7,4%) aunque aquí las diferencias fueron menos evidentes ( $P > 0,05$ ,  $F$  de Fisher).

**Tabla 30.** Distribución de los fetos positivos por PCR en función del órgano analizado y las características epidemiológicas del aborto.

	Epidémico	Endémico
<b>Cerebro</b>	100% (14/14)	92,6% (25/27)
<b>Corazón</b>	64,3% (9/14)	37% (10/27)
<b>Hígado</b>	35,7% (5/14)	18,5% (5/27)
<b>1 órgano positivo</b>	14,3% (2/14)	59,3% (16/27)
<b>2 órganos positivos</b>	64,3% (9/14)	33,3% (9/27)
<b>3 órganos positivos</b>	21,4 % (3/14)	7,4% (2/27)

El mismo tipo de análisis se aplicó atendiendo al periodo de gestación y a las características epidemiológicas del aborto (Tabla 31). En el primer periodo de gestación ( $n = 10$ ) tres de los fetos procedían de abortos epidémicos, cinco de endémicos, uno esporádico y el restante, el tipo de aborto no pudo ser determinado. En el segundo periodo ( $n = 40$ ) nueve fueron epidémicos, quince endémicos, tres esporádicos y el resto de presentación desconocida, y en el último tercio de gestación ( $n = 14$ ) sólo dos de los abortos fueron epidémicos, siete endémicos y los demás sin determinar. Debido al tamaño de la muestra, el estudio únicamente se llevó a cabo entre los abortos epidémicos y endémicos y en el primer y segundo tercio de gestación. Como puede observarse en la Tabla 31, en el primer periodo las diferencias en frecuencia de detección del parásito entre abortos epidémicos y endémicos, se observaron principalmente en el hígado, el cual fue

más veces positivo en epidémico que en endémico (66,8% *versus* 20%;  $P > 0,05$ ,  $F$  de Fisher), también fue más frecuente detectar ADN del parásito en los tres órganos analizados en los abortos de naturaleza epidémica que en los endémicos (66,8% *versus* 20%;  $P > 0,05$ ,  $F$  de Fisher). En el segundo periodo de gestación estas diferencias también estuvieron presentes en el hígado (epidémico: 33,3% *versus* endémico: 20%;  $P > 0,05$ ,  $F$  de Fisher) y en el corazón el cual en los abortos epidémicos fue positivo en el 66,7% de los casos frente a un 26,7% en endémicos ( $P > 0,05$ ,  $F$  de Fisher). También fue más frecuente encontrar más de un órgano positivo en los abortos de presentación epidémica que en endémica (77,8% *versus* 26,7%;  $P < 0,05$ ,  $F$  de Fisher). En ambos tipos de abortos sólo un animal tuvo los tres órganos positivos. En el último periodo aunque los resultados no se analizaron estadísticamente debido al reducido número de casos de la presentación epidémica, el parásito se detectó principalmente en cerebro tanto en epidémico como endémico, encontrándose muy pocos resultados positivos en corazón (uno endémico y otro epidémico) y ninguno en hígado. En relación con los abortos esporádicos, en el primer periodo de gestación el parásito se detectó en el único aborto esporádico en corazón e hígado, y en el segundo periodo el cerebro de los tres abortos con esta presentación fue positivo, y el corazón en uno de ellos. En el tercer periodo no hubo ningún aborto esporádico.

**Tabla 31.** Distribución de los fetos positivos por PCR en función del órgano analizado, periodo de gestación y características epidemiológicas del aborto.

	Primer periodo		Segundo periodo		Tercer periodo	
	Epidémico	Endémico	Epidémico	Endémico	Epidémico	Endémico
<b>Cerebro</b>	100% (3/3)	100%(5/5)	100% (9/9)	93,3%(14/15)	100% (2/2)	85,7%(6/7)
<b>Corazón</b>	100% (3/3)	100%(5/5)	66,7% (6/9)	26,7%(4/15)	50% (1/2)	14,3%(1/7)
<b>Hígado</b>	66,7% (2/3)	20%(1/5)	33,3% (3/9)	20%(3/15)	0% (0/2)	14,3%(1/7)
<b>1 órgano positivo</b>	0% (0/3)	0%(0/5)	11,1% (1/9)	66,7%(10/15)	50% (1/2)	85,7%(6/7)
<b>2 órganos positivos</b>	33,3%(1/3)	80%(4/5)	77,8%(7/9)	26,7% (4/15)	50% (1/2)	14,3%(1/7)
<b>3 órganos positivos</b>	66,7% (2/3)	20%(1/5)	11,1%(1/9)	6,7% (1/15)	0% (0/2)	0%(0/7)

**6.2.4.3. Distribución del ADN de *N. caninum* en órganos fetales**

El estudio de la distribución del parásito se realizó sobre 34 fetos seleccionados en función de la información y muestras recopiladas, de los cuales se analizaron por PCR además de cerebro, corazón e hígado, los siguientes órganos: riñón, pulmón, timo, ganglios linfáticos mediastínicos y mesentéricos, bazo, diafragma y glándula suprarrenal. Según se refleja en la Tabla 32, la mayoría de los órganos correspondientes a los fetos del primer periodo fueron positivos por PCR. Durante el segundo periodo, el ADN de *N. caninum* fue detectado también en la mayoría de los órganos analizados pero el número de órganos positivos disminuyó respecto al primer periodo. Durante el tercer periodo de gestación el parásito sólo se detectó en cerebro y en menor proporción en otros órganos. Así pues, y de acuerdo con lo descrito anteriormente, el parásito se detectó principalmente en cerebro durante los tres periodo de gestación. La presencia del parásito en corazón y diafragma se detectó predominantemente durante el primer y segundo periodo, y en muy pocos animales en el último periodo. En el riñón, pulmón e hígado, el parásito se detectó sólo en el primer y segundo periodo. El timo y bazo fueron positivos en muy pocos fetos (principalmente en el primer periodo) y finalmente, los ganglios linfáticos y glándula suprarrenal fueron los órganos en los que menos se detectó la presencia de *N. caninum*, sin embargo en ganglios linfáticos se pudo detectar ADN del parásito en algún feto perteneciente al último periodo.

**Tabla 32.** Distribución del ADN de *N. caninum* por PCR anidada según el periodo de gestación.

	<b>Primer periodo</b>	<b>Segundo periodo</b>	<b>Tercer periodo</b>	<b>TOTAL</b>
<b>Cerebro</b>	8/8 (100%)	16/16 (100%)	10/10 (100%)	34/34 (100%)
<b>Corazón</b>	8/8 (100%)	8/16 (50%)	2/10 (20%)	18/34 (52,9%)
<b>Hígado</b>	4/8 (50%)	6/16 (37,5%)	0/10 (0%)	10/34 (29,4%)
<b>Riñón</b>	5/7 (71,4%)	8/15 (53,3%)	0/9 (0%)	13/31 (41,9%)
<b>Pulmón</b>	5/8 (62,5%)	8/16 (50%)	0/10 (0%)	13/34 (38,2%)
<b>Diafragma</b>	5/7 (71,4%)	6/15 (40%)	4/9 (44,4%)	15/31 (48,4%)
<b>Timo</b>	3/8 (37,5%)	1/14 (7,1%)	0/10 (0%)	4/32 (12,5%)
<b>Bazo</b>	4/8 (50%)	2/16 (12,5%)	0/10 (0%)	6/34 (17,7%)
<b>G.L. Mediastínicos</b>	2/7 (28,6%)	3/11 (27,3%)	1/6 (16,7%)	6/24 (25%)
<b>G.L. Mesentéricos</b>	1/7 (14,3%)	3/12 (25%)	2/7 (28,6%)	6/26 (23,1%)
<b>Suprarrenal</b>	1/6 (16,7%)	1/7 (14,3%)	0/5 (0%)	2/18 (11,1%)

Por otra parte al agrupar los datos según las características del aborto no se observaron diferencias evidentes en cuanto a la distribución del parásito (Tabla 33).

**Tabla 33.** Distribución del ADN de *N. caninum* por PCR anidada según características epidemiológicas del aborto.

	Epidémico	Endémico	Esporádico
<b>Cerebro</b>	6/6 (100%)	11/11 (100%)	3/3 (100%)
<b>Corazón</b>	8/9 (88,9%)	17/18 (94,4%)	3/3 (100%)
<b>Hígado</b>	9/9 (100%)	16/17 (94,1%)	1/1 (100%)
<b>Riñón</b>	6/6 (100%)	11/14 (78,6%)	3/3 (100%)
<b>Pulmón</b>	4/8 (50%)	7/14 (50%)	0/3 (0%)
<b>Diafragma</b>	4/9 (44,4%)	9/16 (56,3%)	1/3 (33,3%)
<b>Timo</b>	1/8 (12,5%)	2/18 (11,1%)	0/2 (0%)
<b>Bazo</b>	1/9 (11,1%)	4/18 (22,2%)	0/3 (0%)
<b>G.L. Mediastínicos</b>	3/8 (37,5%)	2/13 (15,4%)	0/2 (0%)
<b>G.L. Mesentéricos</b>	3/8 (37,5%)	3/16 (18,8%)	0/2 (0%)
<b>Suprarrenal</b>	1/6 (16,7%)	1/11 (9,1%)	0/1 (0%)

### 6.2.5. Cuantificación de *N. caninum* en órganos fetales

La carga parasitaria se determinó utilizando la PCR cuantitativa en tiempo real en los siguientes órganos: cerebro, corazón, hígado, riñón y pulmón, que a su vez habían sido positivos previamente por la PCR anidada. Al igual que en el apartado anterior el estudio se realizó sobre 34 fetos, y se compararon las cargas en función del periodo de gestación y características del aborto. En los órganos en los que se obtuvo un resultado negativo por PCR anidada se consideró como valor de carga parasitaria 0 zoítos/ $\mu$ g de ADN.

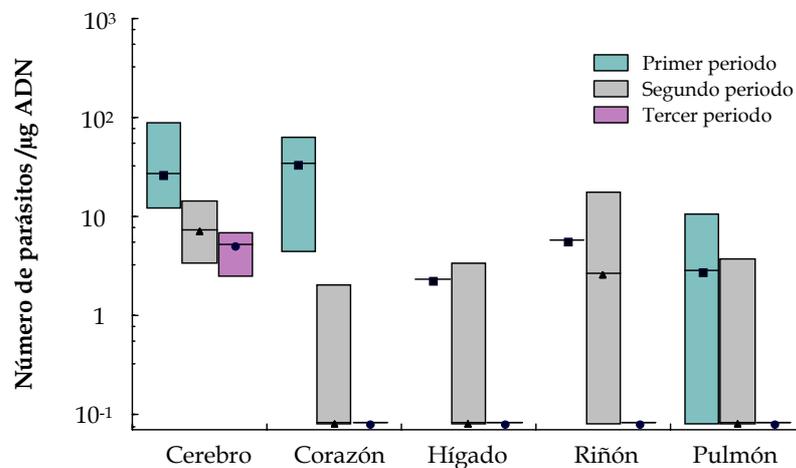
En el primer periodo de gestación (n = 8) los órganos con más carga parasitaria fueron cerebro y corazón, y los que menos hígado y pulmón ( $P < 0,05$ , *H* de Kruskal-Wallis) (Figura 26). Para averiguar entre qué órganos se encontraban estas diferencias se aplicó una prueba no paramétrica de comparaciones múltiples, pero no se obtuvieron valores significativos ( $P > 0,005$ ). En este tipo de pruebas se considera como

estadísticamente significativo un valor de  $P < 0,05/[k \times (k-1)/2]$ , siendo  $k$  el número de grupo (en este caso  $k = 5$ ). Por lo tanto y a pesar de obtener valores de  $P < 0,05$  (cerebro *versus* hígado,  $P = 0,009$ ; cerebro *versus* pulmón,  $P = 0,01$ ; corazón *versus* hígado,  $P = 0,03$ ; cerebro *versus* pulmón,  $P = 0,04$ ) las diferencias no son significativas. En estos de casos cuando los resultados difieren entre ambas pruebas los resultados obtenidos aplicando la prueba de Kruskal-Wallis se consideran preferentes (Morrinson, 2002). En el segundo periodo ( $n = 16$ ) el cerebro continuó siendo el órgano en el que se observó un mayor número de parásitos ( $P < 0,05$ ,  $H$  de Kruskal-Wallis), y en el resto de los órganos analizados las cargas disminuyeron y fueron de una cuantía similar. No obstante al igual que lo ocurrido anteriormente, al realizar una prueba no paramétrica de comparaciones múltiples, las diferencias no fueron significativas ( $P > 0,005$ ). Sin embargo, se obtuvieron valores de  $P$  muy próximos a la significación al comparar la carga de cerebro *versus* hígado ( $P = 0,0055$ ) y relativamente cercanos entre cerebro y pulmón ( $P = 0,008$ ). En el tercer periodo ( $n = 10$ ) el parásito sólo se detectó en cerebro (10/10) y corazón (2/10), y el mayor número de parásitos correspondió a cerebro. Al comparar el número de parásitos, las diferencias observadas fueron significativas ( $P < 0,0001$ ,  $H$  de Kruskal-Wallis) y en este caso al aplicar una prueba no paramétrica de comparaciones múltiples, sí se obtuvieron valores de  $P$  significativos entre cerebro y corazón ( $P < 0,005$ ), y cerebro e hígado, riñón y pulmón ( $P < 0,0005$ ).

Al comparar la carga parasitaria de los diferentes órganos entre los tres periodos de gestación se obtuvieron los siguientes resultados. En cerebro, la mayor carga se observó en los fetos pertenecientes al primer periodo, y la menor en los del último ( $P < 0,005$  prueba no paramétrica de comparaciones múltiples). Sin embargo, al comparar la carga parasitaria en cerebro entre el segundo y el resto de los periodos, las diferencias no fueron significativas ( $P > 0,01$ , prueba no paramétrica de comparaciones múltiples). En corazón, la mayor carga de parásitos también se observó en el primer periodo, seguido del segundo y tercero, y las diferencias significativas se obtuvieron entre los fetos del primer y tercer periodo de gestación ( $P < 0,005$ , prueba no paramétrica de comparaciones múltiples). En pulmón y riñón el mayor número de parásitos se obtuvo también en los fetos del primer periodo, después en los correspondientes al segundo y tercer periodo de gestación ( $P < 0,05$ ,  $H$  de Kruskal-Wallis). Pero al establecer la significación 2 a 2 entre los tres periodos de gestación, no se obtuvo tal significación ( $P > 0,01$ , prueba no paramétrica

de comparaciones múltiples). En hígado, a pesar de que se observó una mayor carga de parásitos en el primer periodo respecto al segundo y tercero, las diferencias no fueron significativas ( $P > 0,05$ ,  $H$  de Kruskal-Wallis).

**Figura 26.** Las barras del gráfico representan la mediana y los cuartiles 25% y 75% de la carga de parásitos (número del parásitos por  $\mu\text{g}$  de ADN del hospedador) en los diferentes órganos analizados según el periodo de gestación. Teniendo en cuenta que el límite de detección de la PCR en tiempo real es  $10^{-1}$  zoítos, todas las muestras positivas fueron  $\geq 0,1$  zoítos y las negativas (0 zoítos) se representaron en la escala logarítmica con un valor  $< 0,1$  zoíto.

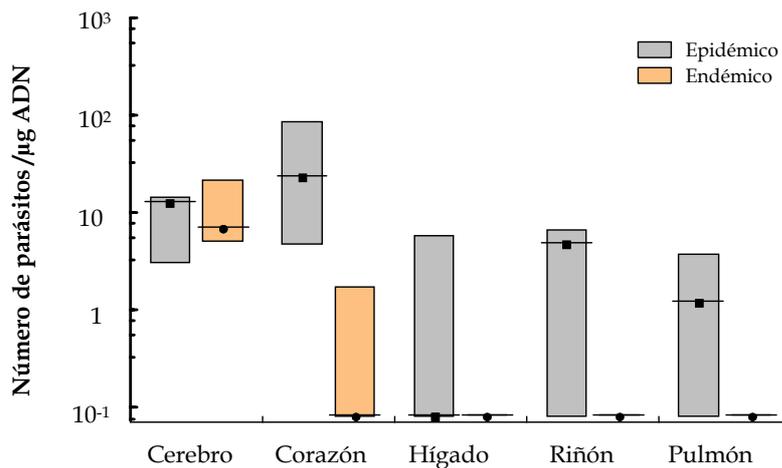


También se estudió la carga de *N. caninum* según las características epidemiológicas del aborto. Los 34 fetos incluidos en el estudio, 18 fetos correspondieron a abortos con presentación endémica, 9 a epidémica, 3 a esporádica y en 4 no se pudo determinar el historial abortivo de la explotación. En los abortos epidémicos el corazón tuvo mayor carga parasitaria que el cerebro, riñón, pulmón e hígado ( $P < 0,05$ ,  $H$  de Kruskal-Wallis) (Figura 27). Sin embargo, al aplicar una prueba no paramétrica de comparaciones múltiples, no se obtuvieron diferencias significativas ( $P > 0,005$ ) a pesar de obtener valores de  $P < 0,05$  (corazón *versus* hígado,  $P = 0,01$ ; corazón *versus* pulmón,  $P = 0,02$ ; corazón *versus* riñón,  $P = 0,04$ ; cerebro *versus* hígado,  $P = 0,05$ ). En los abortos de naturaleza endémica, el órgano con mayor número de parásitos fue el cerebro y al contrastar la carga entre los diferentes órganos se obtuvieron diferencias entre el cerebro y el resto de los órganos analizados (cerebro *versus* corazón y riñón:  $P < 0,001$ ; cerebro *versus* hígado y pulmón:  $P < 0,0001$ , prueba no paramétrica de comparaciones múltiples). En los

esporádicos no se encontraron diferencias ( $P > 0,05$ ,  $H$  de Kruskal-Wallis), seguramente debido al reducido tamaño de muestra.

Del mismo modo se comparó la carga parasitaria presente en los diferentes órganos analizados según el tipo de aborto. El estudio indicado únicamente se realizó en los abortos de tipo epidémico y endémico. En los abortos de naturaleza epidémica se observó un mayor número de parásitos en corazón ( $P < 0,05$ ,  $U$  de Mann-Whitney) y en el cerebro, hígado, pulmón y riñón ( $P > 0,05$ ,  $U$  de Mann-Whitney) que en los endémicos.

**Figura 27.** Las barras del gráfico representan la mediana y los cuartiles 25% y 75% de la carga de parásitos (número de parásitos por  $\mu\text{g}$  del ADN del hospedador) en los diferentes órganos analizados según el tipo de aborto (epidémico o endémico)



### 6.2.6. Análisis histológico

El examen histológico se realizó en el cerebro, corazón, hígado, pulmón, riñón, intestino, glándula adrenal y órganos linfoides (timo, bazo, ganglios linfáticos mesentéricos y mediastínicos) procedente de los 34 fetos del estudio anterior.

#### 6.2.6.1. Descripción de los hallazgos histopatológicos

Los hallazgos histopatológicos más relevantes encontrados en los 34 fetos objeto de estudio fueron los siguientes. En el cerebro la mayoría de las lesiones fueron localizadas

en la corteza cerebral y médula oblongada. En los animales con grado 0 no presentaron lesiones compatibles con la infección por *N. caninum*. Los abortos encuadrados en el grado 1 presentaron nódulos gliales o infiltrado de células redondas en el parenquima cerebral, presencia de manguitos linfocíticos perivasculares y algunos de ellos meningitis no supurativa. En el grado 2 se observaron áreas de necrosis junto con los hallazgos descritos anteriormente. Finalmente, en el grupo de fetos con lesiones de grado 3 se observaron lesiones similares a las del grado 2 pero de mayor gravedad, con áreas extensas de necrosis por coagulación rodeadas por microglias y células redondas (linfocitos, histiocitos y células plasmáticas) (Figura 28A), así como focos de hemorragia en algún feto (Figura 28B). La presencia de quistes parasitarios sin reacción inflamatoria a su alrededor, se pudo observar en tres fetos, dos pertenecientes al primer periodo de gestación y uno al último. En el cerebro, sólo fue posible el análisis de 24 fetos, en los 10 restantes no se pudo llevar a cabo el análisis debido a la consistencia semilíquida del órgano o porque no fue recogido.

La presencia de lesiones en el corazón fue constante al igual que en el SNC. Éstas se caracterizaron por un infiltrado linfoplasmocitario de intensidad variable principalmente en el epicardio (epicarditis linfocítica) (Figura 29B). Además se pudo observar una inflamación crónica difusa del músculo cardíaco (Figura 29A) de moderada a grave en los dos primeros tercios de la gestación. La presencia de taquizoítos se detectó en el mismo feto del primer periodo en el que se visualizó el quiste tisular. En un feto de los 34 analizados no se pudo realizar el examen histológico por el elevado grado de autólisis que presentaba el corazón.

Histológicamente, el hígado presentaba la típica estructura del lobulillo hepático con la disposición trabecular radial hacia la vena centrolobulillar. En los tres periodos de la gestación se aprecia la presencia de numerosos megacariocitos, como corresponde al estadio hematopoyético del hígado en estadios fetales. La valoración histológica no se pudo llevar a cabo en 3 fetos por la avanzada autólisis, en los 31 restantes se observó una ligera a moderada infiltración perivascular de células redondas (linfocitos y células plasmáticas) en el espacio porta y abundante presencia de células de Kupffer. En 9 fetos (4 epidémicos y 5 endémicos) pertenecientes al primer (n = 4), segundo (n = 4) y al tercer

(n = 1) periodo de gestación, se apreciaron focos de necrosis aislados (Figura 30A) en las zonas periportal y media del lobulillo hepático de gravedad variable.

En el riñón se observó un discreto infiltrado de linfocitos principalmente en el intersticio de la zona medular o, en menor medida, en la zona cortical y ocasionalmente perivascularitis focal. La valoración de las lesiones renales en túbulos y glomérulos fue muy difícil debido a que en la mayoría de los casos el riñón presentaba un avanzado estado de autólisis no siendo posible el análisis de 5 muestras. En otros 2 fetos no se remitió muestra de este órgano.

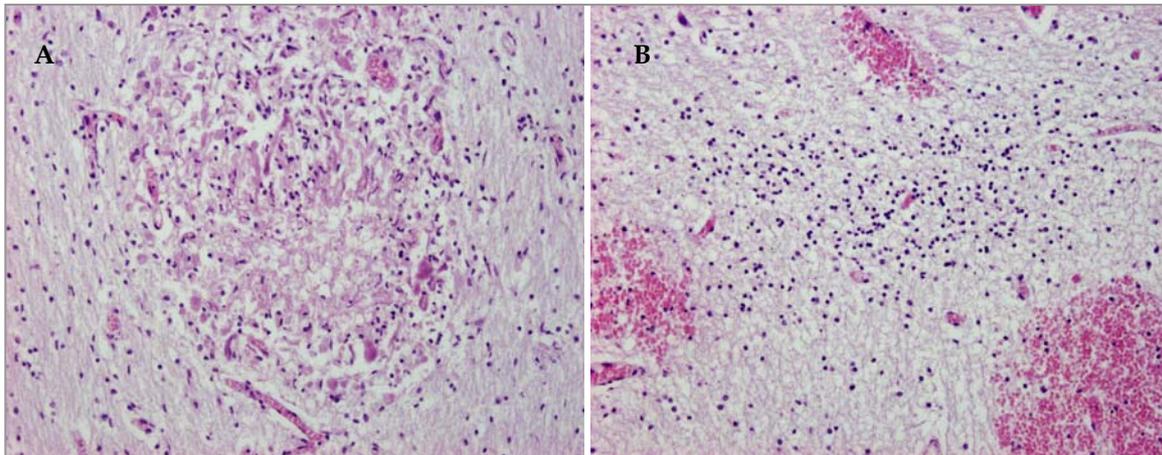
En el pulmón de los abortos bovinos estudiados también se ha podido observar un edema variable del tejido conjuntivo que delimita los futuros lobulillos pulmonares, así como una infiltración linfoplasmocitaria que fue más grave en los animales que pertenecían al primer periodo de gestación (periodo glandular del pulmón). También se pudo observar en algún feto una ligera alveolitis macrofágica muy focal (Figura 30B) y perivascularitis. En un feto perteneciente al segundo periodo de gestación se apreció una neumonía necrótica multifocal, vasculitis con células necróticas, edema intersticial con focos de células inflamatorias, algunas de ellas necróticas. En 6 fetos no se remitió muestra del pulmón.

En 11 fetos de los analizados se remitieron las glándulas adrenales. Debido en muchas ocasiones al estado de autólisis de los fetos, no siempre fue posible visualizar y recoger este órgano. Sin embargo, se pudo comprobar la presencia de un discreto proceso inflamatorio crónico en el intersticio de la zona cortical (Figura 31C). Es interesante destacar la presencia de ganglios nerviosos periféricos en la grasa perirrenal en los que se apreció de forma constante una infiltración linfocítica perineural en 4 fetos.

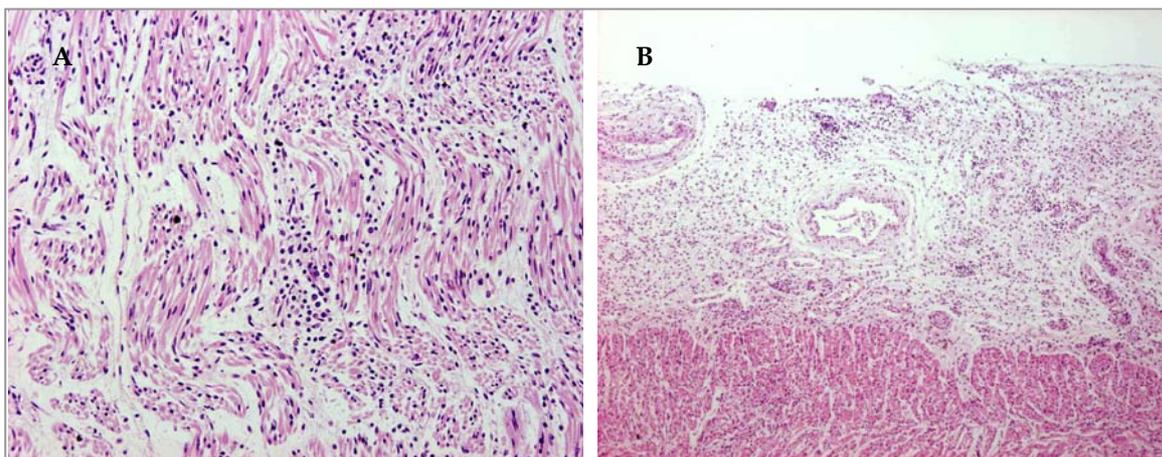
Para el estudio del tejido linfoide se tomaron muestras de timo, bazo y ganglios linfáticos (ganglios mesentéricos y mediastínicos). De las 25 muestras de timo analizadas pudimos comprobar dos lesiones de forma predominante. La primera lesión prevaleció en los fetos del primer y segundo periodo de gestación y estuvo marcada por una activación de la zona B en algunos de los animales (Figura 31A), correspondiente a un mayor desarrollo de la forma medular. La segunda lesión se caracterizó por la presencia, no de

forma constante (n=6 animales), de una deplección linfoide definida por una práctica ausencia de linfocitos en el centro germinal, siendo sustituidos por detritus celulares y una infiltración histiocítica. En dos casos se observaron zonas de necrosis central en el centro germinal. En el bazo se observó en algunas muestras hiperplasia de la pulpa roja, esplenitis o deplección linfoide. En el estudio histopatológico de los ganglios observamos en 6 animales una evidente linfadenitis simple inespecífica (Figura 31B) caracterizada por un edema y una marcada desorganización arquitectural, no asociada con ningún tercio de gestación concreto. Sin embargo, pudimos apreciar cierta hiperplasia folicular en 9 animales correspondientes en su mayoría al último tercio de gestación, en la que se apreció un aumento del número y tamaño de los folículos linfoides, además de una discreta histiocitosis sinusal.

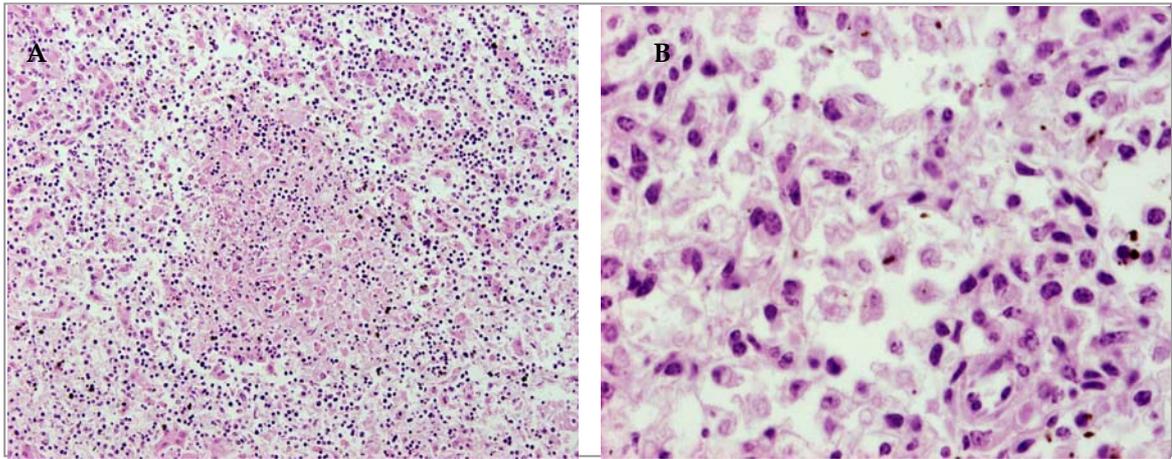
**Figura 28.** Corteza cerebral. (A) Foco de malacea asociado a una reacción inflamatoria. (B) Gliosis moderada del neuropilo y focos de hemorragia. H&E x100.



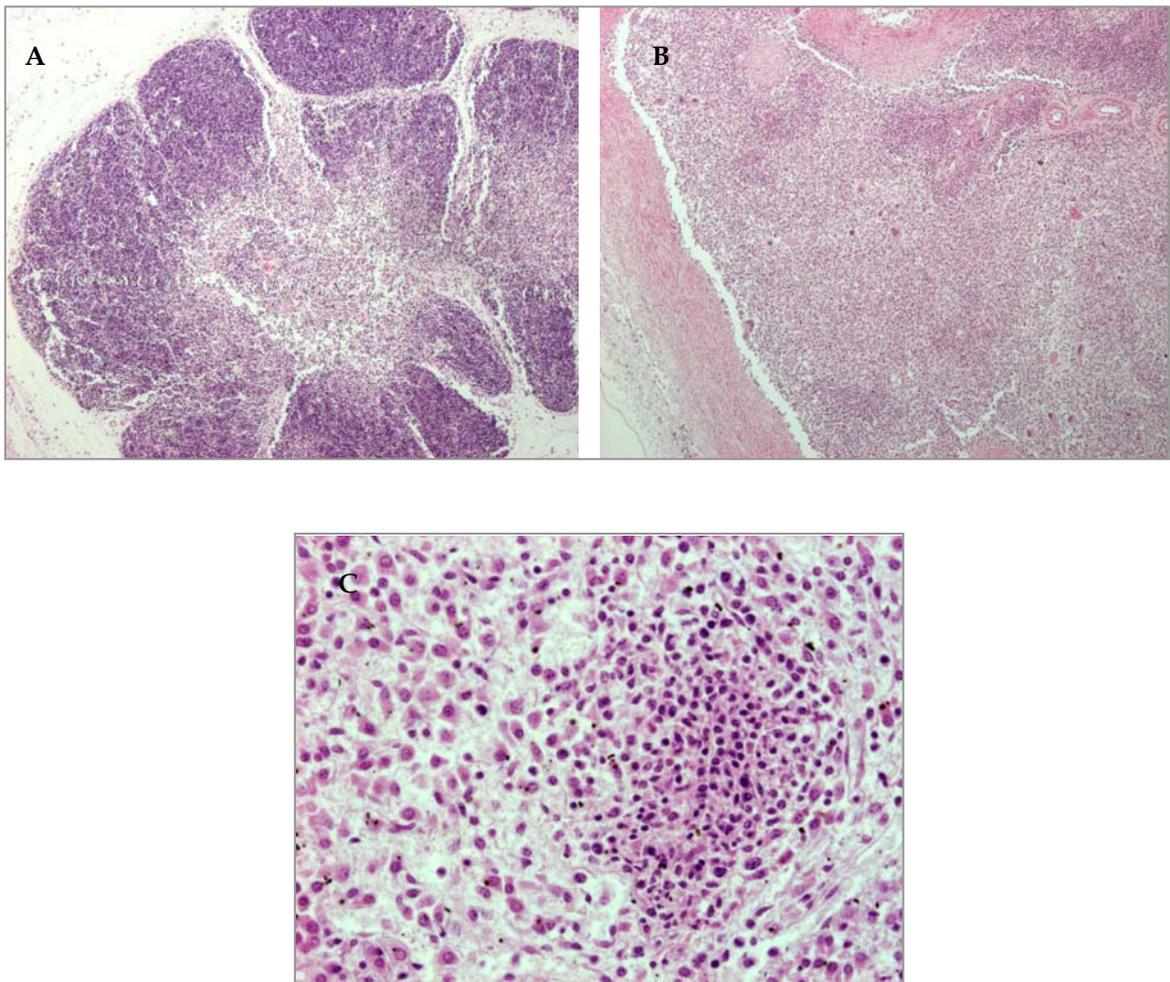
**Figura 29.** Corazón. (A) Miocarditis linfocítica. H&E x100. (B) Pericarditis. H&E x40



**Figura 30.** (A) Hígado. Foco de necrosis intraparenquimatoso. H&E x100. (B) Pulmón. Alveolitis descamativa H&E x400.



**Figura 31.** (A) Timo. Activación zona B. H&E x40. (B) Ganglio linfático. Linfadenitis simple inespecífica. H&E x100.(C) Glándula adrenal. Foco inflamatorio linfocítico en corteza adrenal. H&E x200.



### 6.2.6.2. Estudio de las frecuencias de presentación de las lesiones

El estudio de las frecuencias de presentación de las lesiones compatibles con *N. caninum* se realizó en el cerebro, corazón, hígado, riñón y pulmón de los 34 fetos analizados. Al igual que en el caso de la carga parasitaria, el estudio se llevó a cabo en función de los órganos analizados, del periodo de gestación y de las características epidemiológicas del aborto.

Las lesiones se observaron principalmente en el cerebro, hígado y corazón de los fetos analizados con un 95,8% (23/24), 93,5% (29/31) y 90,9% (30/33), respectivamente, seguidos del riñón con 85,2% (23/27) y del pulmón con el 53,6% (15/28). Las diferencias estadísticamente significativas sólo se observaron al comparar las frecuencias del pulmón con las del resto de los órganos ( $P \leq 0,001$ , *F* de Fisher).

Según se refleja en la Tabla 34, en la mayoría de los órganos correspondientes a los fetos del primer y segundo periodo de gestación se observaron lesiones compatibles con la infección. En el tercer periodo, aunque la frecuencia de presentación de las lesiones fue también alta, se observó una ligera disminución en algunos de los órganos analizados. No obstante, al comparar la frecuencia de los diferentes órganos en función del periodo de gestación no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ , *F* de Fisher).

**Tabla 34.** Distribución de los fetos con lesiones en función del órgano analizado y el periodo de gestación.

	Primer periodo	Segundo periodo	Tercer periodo	TOTAL
<b>Cerebro</b>	3/3 <sup>a</sup> (100%)	12/12 (100%)	8/9 (88,9%)	23/24 (95,8%)
<b>Corazón</b>	8/8 (100%)	14/15 (93,3%)	8/10 (80%)	30/33 (90,9%)
<b>Hígado</b>	8/8 (100%)	14/14 (100%)	7/9 (77,8%)	29/31 (93,5%)
<b>Riñón</b>	7/7 (100%)	11/14 (78,6%)	5/6 (83,3%)	23/27 (85,2%)
<b>Pulmón</b>	5/8 (62,5%)	7/14 (50%)	3/6 (50%)	15/28 (53,6%)

<sup>a</sup> En el primer periodo de gestación sólo fue posible el análisis de tres cerebros, en los cinco restantes no se pudo llevar a cabo la fijación y el análisis histológico debido a la consistencia semilíquida del órgano.

También se estudió la frecuencia de presentación de las lesiones según el órgano analizado en los abortos de tipo epidémico y endémico (Tabla 35). Tanto en los abortos de naturaleza epidémica como endémica, los órganos donde principalmente se observaron las lesiones compatibles con la infección fueron cerebro, hígado, corazón y riñón y en último lugar el pulmón. A pesar de que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ,  $F$  de Fisher) las lesiones se observaron más frecuentemente en el riñón e hígado de los fetos epidémicos, y en el corazón de los endémicos, pero las diferencias fueron inapreciables. La presentación del aborto esporádica no se analizó estadísticamente.

**Tabla 35.** Distribución de los fetos con lesiones compatibles con *N. caninum* en función del órgano analizado y las características epidemiológicas del aborto.

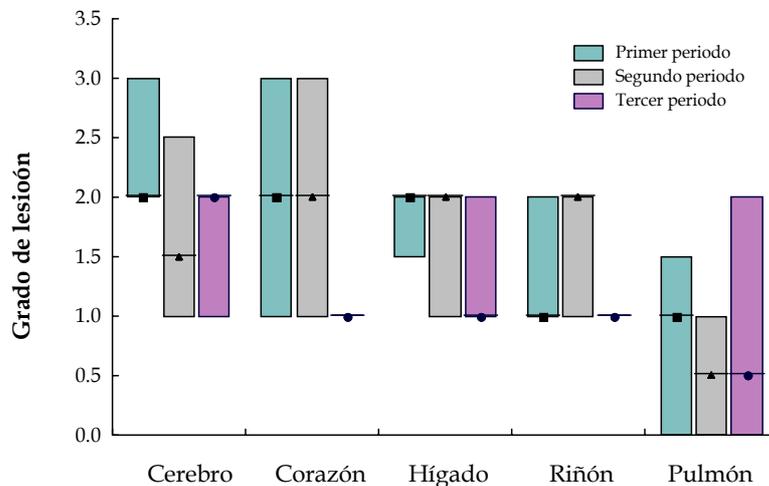
	Epidémico	Endémico	Esporádico
<b>Cerebro</b>	100% (6/6)	100% (11/11)	100% (3/3)
<b>Corazón</b>	88,9% (8/9)	94,4% (17/18)	100% (3/3)
<b>Hígado</b>	100% (9/9)	94,1% (16/17)	100% (1/1)
<b>Riñón</b>	100% (6/6)	78,6% (11/14)	100% (3/3)
<b>Pulmón</b>	50% (4/8)	50% (7/14)	0% (0/3)

### 6.2.6.3. Determinación de la gravedad de las lesiones

La gravedad de las lesiones varió de ausente (0) a grave (3) en los órganos analizados. Los órganos menos afectados fueron el riñón y el pulmón mientras que los más afectados fueron el cerebro, corazón e hígado. En función del periodo de gestación (Figura 32), los órganos más lesionados en el primer y segundo periodo fueron el cerebro, corazón e hígado, y los que menos el riñón y el pulmón ( $P < 0,005$ ,  $H$  de Kruskal-Wallis). No obstante, no se obtuvieron valores estadísticamente significativos al aplicar la prueba no paramétrica de comparaciones múltiples ( $P > 0,005$ ) pese a obtener valores de  $P < 0,05$  entre cerebro, corazón e hígado *versus* pulmón. En el tercer periodo, los resultados fueron muy parecidos a los anteriormente descritos, la mayor gravedad de la lesión correspondió al cerebro y en el resto de los órganos los valores fueron similares pero las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ,  $H$  de Kruskal-Wallis). Al

comparar la gravedad de las lesiones de los diferentes órganos entre los tres periodos de gestación no se obtuvieron, en ningún caso, diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ,  $H$  de Kruskal-Wallis). En el cerebro, los valores obtenidos en los tres periodos fueron muy parecidos. En el resto de los órganos las lesiones más graves se observaron en los fetos del primer y segundo periodo, excepto en el pulmón donde las lesiones más graves correspondieron a los fetos del primer periodo.

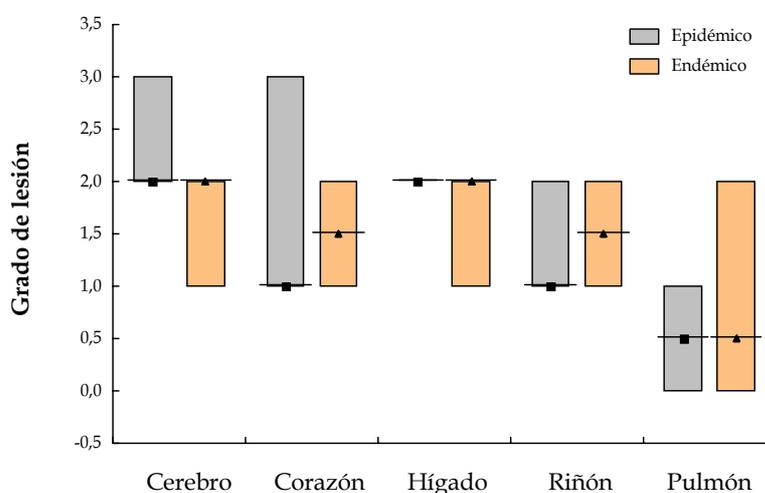
**Figura 32.** Las barras del gráfico representan la mediana y los cuartiles 25% y 75% de la gravedad de la lesión en los diferentes órganos analizados según el periodo de gestación.



También se comparó la gravedad de la lesión en los diferentes órganos analizados según el tipo de aborto (Figura 33). En los abortos de tipo epidémico y endémico los órganos más afectados fueron cerebro, corazón, hígado y riñón mientras que el pulmón fue el que menos. No obstante, sólo se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en el grupo epidémico ( $P < 0,05$ ,  $H$  de Kruskal-Wallis) y al establecer la significación 2 a 2 entre los diferentes órganos se obtuvieron diferencias significativas entre el cerebro y el hígado *versus* pulmón ( $P < 0,005$ , prueba no paramétrica de comparaciones múltiples). En corazón *versus* pulmón aunque se obtuvo un valor  $P < 0,05$  no fue estadísticamente significativo. En el grupo de fetos con aborto esporádico las lesiones más graves se encontraron en cerebro y corazón mientras que en el pulmón fueron de grado 0 ( $P > 0,05$ ,  $H$  de Kruskal-Wallis). De la misma forma que en los estudios anteriores se comparó el grado de lesión presente en los diferentes órganos analizados

entre los abortos de tipo epidémico y endémico pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ,  $U$  de Mann-Whitney). A pesar de ésto, en el grupo epidémico se observaron en cerebro y corazón más fetos con lesiones más graves. La presentación del aborto esporádica no se incluyó en este estudio estadístico por el reducido número de fetos.

**Figura 33.** Las barras del gráfico representan la mediana y los cuartiles 25% y 75% de la gravedad de la lesión en los diferentes órganos analizados según el tipo de aborto (epidémico o endémico).



#### 6.2.6.4. Caracterización del cuadro lesional en el cerebro

Teniendo en cuenta que la lesión en el SNC es la más importante y característica de la infección por el parásito, se propuso un análisis del cuadro lesional en este órgano. Para ello, se consideraron los siguientes hallazgos histopatológicos compatibles con la infección por *N. caninum*: necrosis, infiltración de células redondas en el parenquima cerebral, manguitos perivasculares, nódulos gliales y gliosis. Se analizó la frecuencia de presentación y la gravedad de cada lesión en función del periodo de gestación y de las características epidemiológicas del aborto.

Los hallazgos microscópicos predominantes fueron el nódulo glial con un 91,7% (22/24) e infiltración de células redondas con un 70,8% (17/24), seguidos de gliosis, necrosis y manguitos perivasculares con un 66,7% (16/24), 58,3% (14/24) y 50% (12/24),

respectivamente. La diferencias estadísticamente significativas sólo estuvieron presentes al comparar la frecuencia de presentación entre el nódulo glial y la necrosis ( $P < 0,05$ ,  $F$  de Fisher) o el manguito perivascular ( $P < 0,01$ ,  $F$  de Fisher). Por otra parte, la lesiones más graves fueron la gliosis y la necrosis (con una mediana de 2 y 1,5, respectivamente), seguidas del nódulo glial y el infiltrado de células redondas (mediana 1). La más leve fueron los manguitos perivasculares (mediana 0,5).

En relación con la frecuencia de presentación de cada lesión en función del periodo de gestación (Tabla 36), en el primer periodo de gestación los tres cerebros analizados presentaron necrosis, manguitos perivasculares, nódulos gliales y gliosis; y dos de ellos infiltración de células redondas ( $P > 0,05$ ,  $F$  de Fisher). En el segundo periodo los principales hallazgos encontrados fueron infiltración de células redondas y nódulo glial, seguidos de gliosis, necrosis y manguitos perivasculares ( $P < 0,05$ ,  $F$  de Fisher). Por su parte, las lesiones más prevalentes en el tercer tercio fueron nódulo glial y gliosis y las de menor frecuencia necrosis, encefalitis y manguitos perivasculares ( $P > 0,05$ ,  $F$  de Fisher). Al comparar los tres periodos de gestación la infiltración de células redondas fue más frecuente en el segundo periodo (segundo periodo *versus* tercero  $P < 0,05$ ,  $F$  de Fisher). En los manguitos perivasculares se observó una disminución en la frecuencia de presentación en el tercer periodo respecto al primero y segundo ( $P > 0,05$ ,  $F$  de Fisher) y en el resto de lesiones las frecuencias obtenidas fueron similares principalmente entre el segundo y el tercero ( $P > 0,05$ ,  $F$  de Fisher). Hay que destacar que en el primer periodo de gestación sólo fue posible el análisis de tres cerebros por lo que los datos obtenidos no son muy representativos.

**Tabla 36.** Distribución de las lesiones en el SNC en función del periodo de gestación.

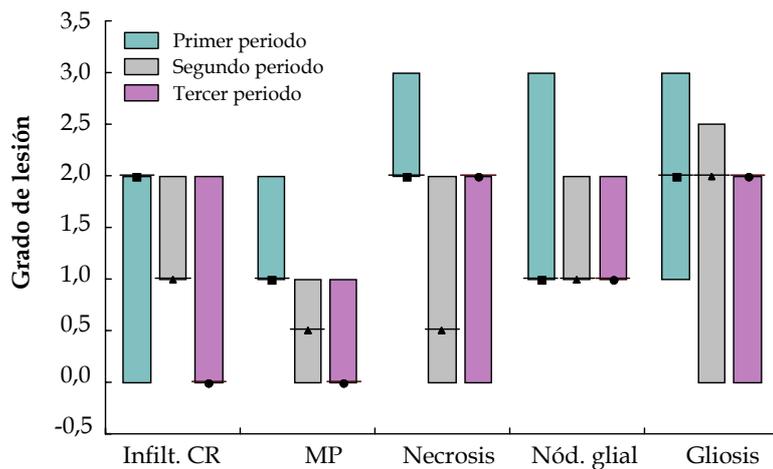
	Primer periodo	Segundo periodo	Tercer tercio	TOTAL
Infiltración de CR <sup>a</sup>	2/3 (66,7%)	11/12 (91,7%)	4/9 (44,4%)	17/24 (70,8%)
MP <sup>b</sup>	3/3 (100%)	6/12 (50%)	3/9 (33,3%)	12/24 (50%)
Necrosis	3/3 (100%)	6/12 (50%)	5/9 (55,5%)	14/24 (58,3%)
Nódulo glial	3/3 (100%)	11/12 (91,7%)	8/9 (88,9%)	22/24 (91,7%)
Gliosis	3/3 (100%)	7/12 (58,3%)	6/9 (66,7%)	16/24 (66,7%)

<sup>a</sup> Infiltración de células redondas en el parenquima

<sup>b</sup> Manguitos perivasculares

En las lesiones consideradas no se observaron importantes variaciones en relación con la gravedad de la lesión según el periodo de gestación (Figura 34), no encontrándose en ningún caso diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ,  $H$  de Kruskal-Wallis). En el primer periodo, a pesar del reducido número de muestras analizadas, las lesiones más graves fueron la infiltración de células redondas, necrosis y gliosis (grado 2). En el segundo periodo la lesión más grave fue la gliosis, el resto de las lesiones consideradas presentaron menor grado que en el primer periodo, exceptuando el nódulo glial. Lo mismo ocurrió con las lesiones de los fetos pertenecientes al tercer periodo, todas ellas (menos necrosis) fueron de igual (nódulo glial y gliosis) o menor (infiltración de células redondas y manguitos perivasculares) gravedad respecto al primer y segundo periodo.

**Figura 34.** Las barras del gráfico representan la mediana y los cuartiles 25% y 75% de la gravedad de las lesiones en el cerebro según el periodo de gestación.



El cuadro lesional en los abortos con historial epidémico se caracterizó por la elevada prevalencia del nódulo glial, gliosis, infiltración de células redondas, necrosis y en menor frecuencia los manguitos perivasculares ( $P > 0,05$ ,  $F$  de Fisher) (Tabla 37). En la presentación endémica la lesión nódulo glial fue el hallazgo histopatológico más frecuente mientras que el resto de las lesiones tuvieron una prevalencia similar ( $P > 0,05$ ,  $F$  de Fisher). A pesar de que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ,  $F$  de Fisher), los porcentajes de todas las lesiones (exceptuando los manguitos perivasculares) en el grupo epidémico fueron superiores que en el endémico. Cabe destacar la alta prevalencia observada de gliosis en los abortos epidémicos *versus*

endémicos, con un valor de  $P$  muy próximo a la significación ( $P = 0,07$ ,  $F$  de Fisher). En los abortos esporádicos por el reducido número de muestra no se llevó a cabo el análisis estadístico, pero los resultados fueron similares a los de endémicos.

**Tabla 37.** Distribución de los hallazgos histopatológicos compatibles con la infección por *N. caninum* en función de las características epidemiológicas del aborto.

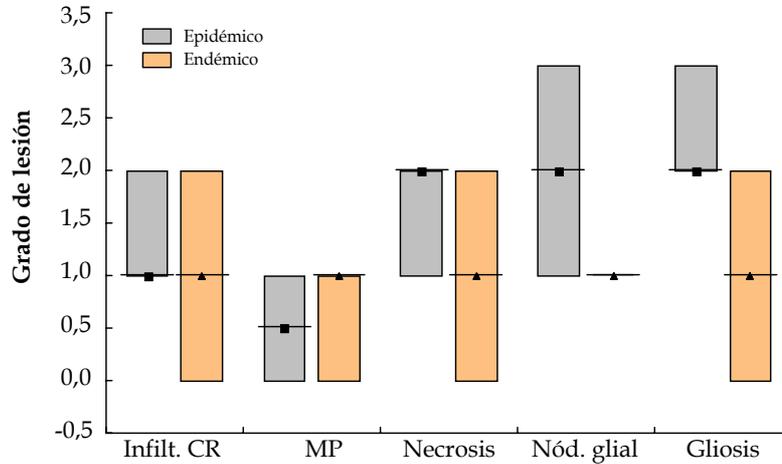
	Epidémico	Endémico	Esporádico
<b>Infiltración de CR<sup>a</sup></b>	5/6 (83,3%)	7/11 (63,6%)	2/3 (66,7%)
<b>MP<sup>b</sup></b>	3/6 (50%)	7/11 (63,6%)	1/3 (33,3%)
<b>Necrosis</b>	5/6 (83,3%)	6/11 (54,5%)	2/3 (66,7%)
<b>Nódulo glial</b>	6/6 (100%)	10/11 (90,9%)	3/3 (100%)
<b>Gliosis</b>	6/6 (100%)	6/11 (54,5%)	3/3 (100%)

<sup>a</sup> Infiltración de células redondas en el parenquima

<sup>b</sup> Manguitos perivasculares

Las lesiones más graves en los abortos epidémicos fueron la necrosis, el nódulo glial y la gliosis (mediana grado 2) seguidas de la infiltración de células redondas (mediana grado 1) y los manguitos perivasculares (mediana grado 0,5) (Figura 35). Por su parte todas las lesiones en el grupo endémico fueron de carácter leve (mediana grado 1). Al comparar los dos grupos se observó que la gravedad de la necrosis, el nódulo glial y la gliosis en los fetos epidémicos fue superior a aquellos con patrón endémico, sin embargo las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ,  $U$  de Mann-Whitney). Aunque no se consideró significativo en el nódulo glial y la gliosis se obtuvieron valores de  $P$  de 0,054 y 0,07, respectivamente, en el resto fueron  $P > 0,1$ . En los esporádicos la lesión más grave fue la necrosis (mediana 3), seguida de la infiltración de células redondas y la gliosis (mediana 2), el nódulo glial (mediana 1) y los manguitos perivasculares (mediana 0).

**Figura 35.** Las barras del gráfico representan la mediana y los cuartiles 25% y 75% de la intensidad de las lesiones en el cerebro según el tipo de aborto (epidémico o endémico).



### 6.2.7. Asociación entre lesión y carga parasitaria

Se estudió la carga parasitaria obtenida en función de la gravedad de la lesión observada. En primer lugar se comparó las cargas parasitarias obtenidas para cada grado de lesión (0-3), obteniéndose una relación positiva entre ambas variables ( $P < 0,05$ ,  $H$  de Kruskal-Wallis). Al establecer la significación 2 a 2 entre los diferentes grupos se obtuvieron diferencias significativas entre la carga parasitaria obtenida en los órganos con lesión grado 4 *versus* grado 0 ( $P < 0,005$ , prueba no paramétrica de comparaciones múltiples) observándose una gran similitud entre las medianas de carga parasitaria del grado 0 y 1, al igual que para el grado 2 y 3. Cuando se procedió a realizar el mismo estudio para cada órgano por separado se comparó el valor central de la carga parasitaria en los fetos con lesión 0-1 frente a los de lesión 2-3. Se decidió agrupar la gravedad de la lesión en 2 grados debido a la semejanza en el valor de las medianas y al reducido tamaño de muestra presente en algunos de los niveles. Cuando se analizaron los datos estadísticamente sólo se encontró un número de parásitos/ $\mu\text{g}$  de ADN significativamente más elevado en las muestras con lesiones de grado 2-3 *versus* grado 0-1 en corazón e hígado ( $P < 0,005$  y  $P < 0,05$ , respectivamente,  $U$  de Mann-Whitney). En cerebro, la mediana de la carga parasitaria correspondiente a los fetos con grado 0-1 fue muy similar a la presentada para el grado 2-3 (5,9 *versus* 5,5 número de parásitos/ $\mu\text{g}$  ADN,

respectivamente), observándose en algunos casos la presencia de un bajo número de parásitos y una lesión grave o altas cargas parasitarias y lesiones leves. En riñón y pulmón las diferencias tampoco fueron significativas.

### 6.3. DISCUSIÓN

Como ya se ha mencionado en capítulos anteriores, la manifestación clínica más importante de la infección por *N. caninum* es el aborto en las hembras gestantes. El estudio de la distribución-carga parasitaria y del cuadro lesional en fetos abortados en distintos periodos de gestación o procedentes de explotaciones con diferentes patrones epidemiológicos de la infección, podría ayudar a comprender la patogenia de la infección en el feto abortado.

Los diferentes estudios realizados sobre la patogenia de la infección en el ganado bovino se han llevado a cabo tanto en infecciones naturales como experimentales. Aunque muchos de los resultados obtenidos son similares, todavía no se ha logrado reproducir totalmente lo que ocurre de manera natural en los bovinos gestantes, ya que son numerosos los factores que parecen influir en el desarrollo de la infección (periodo de gestación, dosis infectante, aislado, vía de infección, etc). El aborto por *N. caninum* puede tener lugar entre el tercer y el noveno mes de gestación siendo más frecuente entre el cuarto y sexto mes (Lindsay & Dubey, 1996). Experimentalmente, sólo se ha reproducido el aborto mediante la inoculación de taquizoítos por vía i.v. en el día 70 de gestación (Williams et al., 2000). Cuando la infección se ha realizado en el segundo tercio de gestación o se han empleado la vía s.c. o i.m. se ha originado, en la mayoría de las ocasiones, la transmisión vertical del parásito y, raramente, la muerte del feto (Barr et al., 1994a; Innes et al., 2000, 2001; Andriananarivo et al., 2000, 2001; Maley et al., 2003). Por otra parte, la administración por v.o. de ooquistes a hembras gestantes en el día 70 de gestación, no causó el aborto ni la transmisión transplacentaria del parásito (Trees et al., 2002). Estos hechos justifican la utilización en este trabajo de fetos abortados procedentes de bovinos con infección natural, subrayando la importancia de estudiar la infección en el modelo natural. Para la consecución de este objetivo se analizaron un total de 219 fetos de los que se detectó la presencia del parásito por PCR en el 32,8% (72/219), quedando nuevamente demostrada la alta prevalencia de la infección en los fetos bovinos abortados

en España. En cuanto a la edad fetal del aborto, el mayor porcentaje de fetos positivos al igual que en otros muchos estudios sobre neosporosis (Dubey, 2003) se sitúan en torno a los 5-6 meses de edad. La tasa de infección obtenida es similar a la encontrada en un estudio realizado recientemente en España dónde se detectó la infección en un 10,7-38,8% de los fetos estudiados, en dependencia de la técnica diagnóstica utilizada (Pereira-Bueno et al., 2003).

El desenlace de la infección en los bovinos gestantes parece estar determinado principalmente por el periodo de gestación en el que ocurre la infección. Los estados de gestación tempranos son muy sensibles a la infección debido a la falta de inmunocompetencia del feto, produciéndose en la mayoría de las ocasiones el aborto. En el último tercio de gestación, el sistema inmune del feto está suficientemente desarrollado para producir una respuesta inmune eficaz frente a la infección y la consecuencia más frecuente de la infección en este periodo es el nacimiento de terneros congénitamente infectados. Sin embargo, también se ha observado la presencia de abortos por neosporosis en el último tercio de gestación, principalmente en el séptimo mes. En el presente estudio, los fetos analizados menores de 120 días mostraron una amplia distribución orgánica del parásito y una elevada carga parasitaria en varios de los órganos analizados, principalmente en cerebro y corazón. Estos resultados concuerdan con lo observado por Dubey et al. (1992) y Wouda et al. (1997a) quienes encontraron por inmunohistoquímica más taquizoítos al principio que al final de la gestación en cerebro y corazón, respectivamente. Por su parte, también se ha observado una mayor presencia de quistes tisulares en fetos menores de 4 meses (Barr et al., 1991a). La identificación de quistes tisulares en el cerebro de los fetos pertenecientes a este periodo sólo fue posible en dos casos, pero debemos señalar que la identificación de fases del parásito mediante la tinción con hematoxilina y eosina es difícil y que quizá con técnicas inmunohistoquímicas hubiera sido posible la identificación de un número más elevado de quistes tisulares o taquizoítos. En los fetos analizados en el segundo periodo, el ADN de *N. caninum* fue detectado también en la mayoría de los órganos analizados pero el número de órganos positivos, al igual que la carga parasitaria disminuyó respecto al primer periodo. En el último periodo de gestación el parásito sólo se detectó y con cargas más bajas en cerebro y, ocasionalmente, en corazón, diafragma y ganglios linfáticos. Este hecho coincidió con la

presencia de anticuerpos anti-*N. caninum* en muchos de los fetos analizados del segundo y tercer periodo de gestación, predominando los fetos seropositivos del séptimo mes.

Estos hallazgos son similares a los observados en infecciones con el VBVD, donde los fetos de los periodos iniciales de gestación muestran una amplia distribución del virus, mientras que aquellos del final de la gestación la localización del virus fue más restringida y las cargas virales encontradas más bajas (Casaro et al., 1971; Braun et al., 1973; Scherer et al., 2001). Por otra parte, la detección del parásito principalmente en cerebro y, ocasionalmente, en corazón y diafragma en el tercer periodo, demuestra que la infección se cronifica y el parásito persiste en esos órganos fetales al igual que ocurre en los animales adultos. Hay numerosas similitudes con los resultados obtenidos en la infección por *T. gondii*. En este caso el parásito también se ha detectado, principalmente, en cerebro y corazón en fetos o corderos neonatos (Ducanson et al., 2001) y cerebro, músculo cardíaco o esquelético en ovejas (Dubey & Sharma, 1980; Esteban-Redondo & Innes, 1998). En *N. caninum* es también conocido que el cerebro es el principal órgano diana de la infección durante la fase crónica y dónde se localizan los quistes tisulares, sin embargo también se ha detectado la presencia de un quiste tisular en el corazón de un feto (Anderson et al., 1991) y en el músculo esquelético de un ternero (Peters et al., 2001a).

En los fetos objeto de estudio, las lesiones se detectaron en cerebro, corazón e hígado, pero también en riñón y pulmón. Estas observaciones coinciden con diferentes estudios realizados en fetos abortados por neosporosis (Anderson et al., 1990; Barr et al., 1990; Nietfeld et al., 1992; Boulton et al., 1995; Wouda et al., 1997a; Campero et al., 1998; Hattel et al., 1998; Morales et al., 2001a). En los fetos del primer y segundo periodo de gestación, las lesiones estuvieron presentes en la mayoría de los órganos analizados mostrando una intensidad moderada o grave, siendo el cerebro, corazón e hígado los órganos más afectados. En la infección por *T. gondii* se ha descrito que las lesiones en el cerebro fueron más graves en los corderos nacidos de ovejas infectadas a mitad de gestación y de carácter más leve en los nacidos de las infectadas al final (Buxton et al., 1982). Por tanto, en el tercer trimestre de gestación, cabría esperar que los fetos al ser más inmunocompetentes controlen mejor la infección y las lesiones que presentaran fueran de carácter leve (González et al., 1999). A pesar de que la frecuencia de presentación de las lesiones en el último periodo fue alta, sí se pudo observar una ligera disminución en la

frecuencia de presentación en algunos de los órganos analizados, respecto a los fetos del primer y segundo periodo. Por su parte, la gravedad de las lesiones en los diferentes órganos de los fetos del tercer periodo fue ligeramente menor que en los periodos anteriores, pero las diferencias no fueron significativas.

Estos resultados son similares a los descritos por De Meerschman et al. (2002) quienes apuntan que los fetos jóvenes tienen mayor probabilidad de presentar en el cerebro lesiones compatibles con la infección por *N. caninum*. Los resultados obtenidos en nuestro estudio demuestran que entre los tres periodos de gestación considerados las diferencias en cuanto a la presentación de las lesiones y la gravedad de las mismas fueron escasas. Sin embargo, se pudo observar una tendencia en los fetos del último periodo a presentar una distribución más restringida con intensidad decreciente en los órganos analizados, pero en absoluto comparable con la reducción de la carga parasitaria o distribución del parásito observada en estos fetos. Este hecho puede sugerir que no en todas las ocasiones existe una relación positiva entre la presencia del parásito y la lesión o la gravedad de la misma. Los resultados procedentes de estudios anteriores referentes a la presencia del parásito en el área de la lesión son controvertidos. En diferentes estudios histológicos en fetos bovinos abortados por *N. caninum* se ha descrito la presencia de taquizoítos en los focos de inflamación y necrosis o en zonas adyacentes (Anderson et al., 1990, 1991; Boulton et al., 1995; Campero et al., 1998; González et al., 1999). En un estudio reciente se ha demostrado que los taquizoítos se localizan en el foco de la encefalitis independientemente de la presencia de necrosis (De Meerschman et al., 2002). Por su parte, Kim et al. (2002a) señalaron que cuando el grado de inflamación es leve, la PCR es incapaz de detectar ADN del parásito y Corbellini et al. (2002) observaron una mayor frecuencia de taquizoítos en los cerebros con lesiones más graves. Sin embargo también se ha observado en otros casos de aborto que la localización de las lesiones no se correlaciona con la presencia de taquizoítos *N. caninum* (Hattel et al., 1998, Venturini et al., 1999). Wouda et al. (1997a) describieron la presencia de taquizoítos en vasos sanguíneos sin respuesta inflamatoria. En el presente estudio realizamos un análisis para determinar si, en las muestras con lesiones más graves, las cargas parasitarias eran mayores. Los resultados obtenidos así lo demostraron en corazón e hígado pero no en el resto de los órganos. En pulmón y riñón donde la mayoría de los fetos presentaron lesiones de carácter leve y baja carga parasitaria no se observó esta relación debido probablemente al

bajo número de muestras en el grupo con lesiones de mayor gravedad. En el cerebro tampoco se encontró una relación entre el número de parásitos y la gravedad de la lesión. En algunos fetos se observó la presencia del parásito y a veces alta carga parasitaria y lesiones de carácter leve en el cerebro. Este hecho podría explicarse con varios argumentos: uno de ellos podría deberse al bajo potencial patogénico del aislado parasitario causante de la infección, aunque según se ha observado en el modelo murino (subobjetivo 2.2.) la alta capacidad de multiplicación del parásito parece estar relacionada con una elevada patogenicidad; un segundo que tendría relación con la distribución aleatoria de las lesiones y del parásito, pudiéndose obtener diferencias entre estos dos parámetros debido al proceso del muestreo (Pereira-Bueno et al., 2003); y un tercero por las propias características de la inflamación en el cerebro, ya que se ha señalado que los niveles de antígeno requeridos en el SNC para que se produzca la respuesta inflamatoria son al menos diez veces mayores y la inflamación tarda más en desarrollarse que en los tejidos periféricos (Matyszak, 1998). Por otra parte, existieron muestras de cerebro con lesiones moderadas o graves y bajas cargas parasitarias, principalmente en los fetos del segundo y tercer periodo. En éstos las lesiones observadas podrían ser como consecuencia de la destrucción de las células infectadas por el sistema inmune más que por el daño tisular causado directamente por el parásito, sugiriéndose que la respuesta inmune producida frente al parásito podría modular o exacerbar el desarrollo de lesiones en el SNC, al igual que lo descrito en otros agentes como el VBVD (Roeder et al., 1986). Asimismo, la capacidad de regeneración del tejido en el SNC es lenta y limitada (Matyszak, 1998), por lo que los daños y la inflamación causados inicialmente por la replicación del agente persisten, aún y cuando la multiplicación del parásito haya sido controlada.

Por otra parte también se ha sugerido que el cuadro lesional en el cerebro difiere con la edad del feto, siendo más frecuente la observación de necrosis en fetos jóvenes y gliosis o manguitos perivasculares en fetos de siete meses o en terneros infectados (Ongino et al., 1992). Sin embargo otros autores no encuentran diferencias en la naturaleza de las lesiones según la edad de los fetos (Wouda et al., 1997a). En el presente estudio se determinó el cuadro lesional en el cerebro en los tres periodos de gestación establecidos. En el primer periodo de gestación hay que destacar que sólo fue posible el análisis de tres cerebros por lo que los datos obtenidos no son muy representativos. Aún así, se pudo observar en los

tres cerebros la presencia de extensas áreas de necrosis, manguitos perivasculares, nódulos gliales y gliosis. La infiltración de células redondas en el parenquima cerebral se observó en dos de los fetos analizados. Diferentes autores han señalado que en el cerebro de fetos jóvenes (menores de 4-5 meses), el número de focos de necrosis es superior y la reacción inflamatoria producida es inaparente o de carácter leve, debido seguramente a la inmadurez del sistema inmune del feto (Barr et al., 1991a; Ogino et al., 1992; Otter et al., 1995; Kim et al., 2002a). En el presente estudio a pesar de que no se obtuvieron diferencias significativas, la gravedad de la necrosis fue superior en los fetos pertenecientes al primer periodo lo que concuerda con lo observado previamente. Sin embargo, la observación en el tejido lesionado de un infiltrado de células redondas de intensidad moderada, contradice lo anteriormente descrito. En estos tres fetos sólo pudo determinarse su edad gestacional basándose en el desarrollo embrionario del pulmón. Aunque es un método adecuado para conocer el tercio de gestación en el cual se encuentra el feto, no permite conocer con exactitud la edad del animal, por lo que quizá estos fetos estén muy próximos al periodo en el que el sistema inmune se empieza a desarrollar. La inmunocompetencia en el feto bovino se desarrolla de manera gradual y aunque existe cierta variabilidad individual, alrededor del día 100-120, el feto es capaz de sintetizar anticuerpos frente a varios antígenos (Swift & Kennedy, 1972). Por otra parte, los monocitos y granulocitos están presentes en la circulación sanguínea del feto desde los 45 días pero se desconoce cuando son funcionales (Osburn , 1988). También se ha señalado la inducción de una respuesta inmune celular en fetos infectados experimentalmente con *N. caninum* a los 120 días (Almería et al., 2003). Estos hechos sugieren que los fetos con edades cercanas a los 100-120 días de gestación podrían desarrollar una reacción inflamatoria, de hecho en un trabajo reciente se ha descrito en un feto de 4 meses una encefalitis con pequeños focos de células mononucleares (Corbellini et al., 2002). Por otra parte, las edades de los restantes fetos correspondientes al primer periodo de gestación se determinaron por la distancia craneocaudal y variaron de 60 a 115 días. En estos animales no se dispuso del encéfalo pero el resto de los órganos analizados presentaron un infiltrado de células inflamatorias de intensidad leve o moderada. En el hígado también fue frecuente observar áreas de necrosis. En otro estudio también se ha observado un infiltrado mononuclear en cerebro, corazón e hígado en fetos de 3-4 meses (Wouda et al., 1997a). En el segundo periodo de gestación las lesiones más prevalentes fueron la infiltración de células redondas y los nódulos gliales y, en el tercer periodo, los nódulos gliales. Al comparar los tres periodos

de gestación, la infiltración de células redondas fue significativamente más frecuente en el segundo periodo. En lo referente a la gravedad de cada lesión no se encontraron diferencias significativas. Por tanto, podríamos concluir que aunque no existieron importantes diferencias en el cuadro lesional presentado entre los tres periodos de gestación, en los fetos del primer periodo se encontraron amplias zonas de necrosis, en el segundo periodo la infiltración de células redondas en el parenquima cerebral fue más frecuente que en los otros periodos y, en el tercer tercio, predominó el nódulo glial frente al resto de lesiones.

Por otra parte, el carácter epidemiológico del aborto (esporádico, endémico o epidémico) puede también condicionar la distribución del parásito, así como la naturaleza y características de las lesiones presentes en el feto. El patrón de aborto epidémico tendría lugar en explotaciones con escasa o nula prevalencia del parásito y se ha asociado con una infección reciente y la transmisión postnatal del parásito. El endémico se presenta en rebaños donde el parásito se transmite verticalmente entre generaciones sucesivas (McAllister et al., 2000; Schares et al., 2002a). La presentación endémica fue la forma más frecuente que encontramos en los abortos remitidos para este estudio y la esporádica la menor. El estado endémico de la infección es atribuible a la amplia distribución de la infección en las explotaciones bovinas y a la habilidad del parásito para establecer infecciones crónicas y transmitirse verticalmente a la descendencia. En la patogenia de la neosporosis se ha sugerido que la magnitud y duración de la parasitemia, así como la respuesta inmune de la madre pueden influenciar el desenlace de la infección en las hembras gestantes (Innes et al., 2000). En la presentación epidémica, el hospedador al contactar por primera vez con el parásito carece de una respuesta inmune eficaz que limite la multiplicación del parásito produciéndose una infección generalizada. Si la hembra está gestante posiblemente un gran número de taquizoítos llegarán al feto. En el patrón endémico, el animal permanece infectado crónicamente, cuando se produce una reactivación de la infección, las pequeñas dosis del parásito liberados de los lugares de ubicación de los quistes activarían la memoria del sistema inmune, controlándose de esta forma la multiplicación del parásito. En estos casos, cabe esperar que la intensidad y duración de la parasitemia sean de baja magnitud así como el número de taquizoítos que llegue al feto. Los resultados obtenidos en este estudio parecen concordar con estas hipótesis. En los fetos procedentes de explotaciones

con un historial de abortos epidémico, el parásito se detectó más frecuentemente en corazón e hígado siendo significativa la presencia del parásito en más de un órgano que en los endémicos. Al comparar las cargas parasitarias entre ambos tipos de abortos, en los epidémicos se observaron un mayor número de parásitos en todos los órganos analizados, principalmente en corazón. Asimismo, el corazón fue el órgano con mayor carga parasitaria en el grupo epidémico y el cerebro en el endémico. Estos resultados sugieren que la infección en los fetos de abortos epidémicos fue más generalizada y con una mayor replicación y distribución del parásito en los órganos analizados, sobre todo en el corazón. Por el contrario, en los endémicos la infección se cronifica antes y el parásito se multiplica principalmente en cerebro, seguramente porque el número de parásitos que cruza la placenta es muy bajo y el feto puede controlar la infección antes. En este sentido cabe pensar que las diferencias obtenidas podrían deberse al periodo de gestación en el que se recogieron los fetos de ambos tipos de abortos. Sin embargo al compararlos por periodos de gestación, en el primer y segundo periodo se hicieron las mismas observaciones, detectándose con más frecuencia el parásito en hígado y corazón en los fetos con presentación epidémica y en el cerebro en los endémicos. En el último periodo, el parásito se detectó principalmente en cerebro tanto en epidémicos como endémicos.

En el estudio histológico a pesar de no obtener diferencias significativas, en el grupo epidémico se encontraron en cerebro y corazón un número más elevado de fetos con lesiones más graves. En el hígado se observaron áreas de necrosis en mayor número de fetos epidémicos que en los endémicos. Estos resultados son similares a los obtenidos anteriormente, en los que se observa con mayor frecuencia lesiones y mayor número de taquizoítos en hígado en fetos procedentes de abortos epidémicos *versus* esporádicos (Wouda et al., 1997a).

Actualmente, se desconoce si el cuadro lesional en el cerebro difiere entre los fetos procedentes de explotaciones con historial epidémico o endémico. En el presente estudio observamos una alta prevalencia de la gliosis muy próxima a la significación en los abortos epidémicos *versus* endémicos. Por su parte, la gravedad de la necrosis, los nódulos gliales y la gliosis en los fetos epidémicos fue superior a los endémicos. Aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, quizá por el número reducido de muestras, los resultados obtenidos son bastantes sugerentes y podrían explicarse por las

diferentes formas de la infección en ambos modelos. De manera general, en el epidémico la cantidad de parásitos que llegan al cerebro probablemente es más alta que en los endémicos, provocando al multiplicarse extensas áreas de necrosis. El primer mecanismo de respuesta al daño celular sería la activación de células microgliales para reparar el tejido dañado y actuar como células fagocíticas. Si el daño de la organización parenquimal es masivo, las microglia residentes son asistidas por un aflujo de monocitos sanguíneos, los cuales adoptan rápidamente un fenotipo microglial cuando penetran en el parenquima del SNC. De ésta forma, no es posible discriminar las microglia activadas de los monocitos sanguíneos, en base a su morfología o propiedades inmunocitoquímicas (Kiao & Link, 1998; Stoll & Jander, 1999). Por su parte, en el patrón endémico, la carga parasitaria y el daño celular es menor por lo que el número de células reclutadas en las lesiones del SNC es mucho menor y la activación microglial es más retardada.

La detección de la infección por *N. caninum* en el feto o en la madre no permite garantizar que el parásito sea la causa directa del aborto, ya que la infección en la mayoría de las ocasiones origina el nacimiento de terneros congénitamente infectados, (Wouda et al., 1998a; Davison et al., 1999b; Pereira-Bueno et al., 2000). Se ha sugerido que la observación de lesiones que comprometan la vida del animal permitirían diagnosticar a *N. caninum* como la causa del aborto (Thurmond et al., 1998). En este estudio, los fetos analizados pertenecientes a los dos primeros periodos de gestación y, principalmente, al primer periodo, mostraron importantes lesiones y una amplia diseminación del parásito, así como altas cargas parasitarias en varios de los órganos analizados. Basándose en los resultados obtenidos se podría sugerir que *N. caninum* fue la causa primaria de la muerte del feto, fundamentalmente, en el primer periodo de la gestación. Thurmond & Hietala (1997a) señalaron que el mayor riesgo de aborto en vacas congénitamente infectadas está entre el día 90 y 180 días. Asimismo, la inoculación de taquizoítos por vía i.v. en la semana 10 de gestación provocó la muerte de feto a la tercera semana PI (Williamns et al., 2000, 2003). Sin embargo, las infecciones naturales durante el primer tercio de gestación son difíciles de diagnosticar, ya que muchas de las veces si la muerte del embrión ocurre muy pronto, se produciría la reabsorción y la salida a celo. La consecuencia que se puede extraer a partir de esta observación es que es que la aparente mayor prevalencia de la infección por *N. caninum* entre los meses 4 y 6 (Lindsay & Dubey, 1996) puede estar sesgada por el tipo de fetos que se remiten a los laboratorios de diagnóstico. La

consecuencia más frecuente de la infección de *N. caninum* de las hembras gestantes durante el último trimestre es el nacimiento de terneros congénitamente infectados (Quintanilla-Gozalo et al., 2000; Williams et al., 2000; Guy et al., 2001). No obstante también se describen abortos en este tercio de gestación. En los fetos analizados en este periodo, la localización del ADN se restringió principalmente al SNC y las cargas parasitarias observadas fueron muy reducidas. Asimismo en muchos de ellos las lesiones observadas tampoco fueron de consideración. En este periodo, otros factores podrían haber estado implicados siendo el aborto en estos casos, un proceso multifactorial. Entre éstos se ha sugerido que hormonas o citoquinas de la madre o la infección con otros patógenos como el VBVD pueden influir. En este sentido, en cuatro fetos detectamos infecciones mixtas por *N. caninum* y el VBVD y sólo uno de ellos perteneció al tercer periodo, por lo que no parece que sea un importante factor de riesgo. Sólo en un estudio se ha encontrado una asociación entre *N. caninum* y la infección por el VBVD (Björkman et al., 2000); otros autores no han observado tal relación (Gottstein et al., 1998; Bartels et al., 1999; Davison et al., 1999a; Mainar-Jaime et al., 2001; Hässing & Gottstein, 2002). Por lo que respecta a los fetos procedentes de abortos epidémicos, el mayor porcentaje mostró importantes hallazgos que inducen a pensar que *N. caninum* fuera la causa del aborto.

En la actualidad, uno de los problemas más importantes asociados a la neosporosis son las dificultades inherentes a la detección del agente etiológico en los tejidos diana de los individuos sospechosos, unido a la interpretación de la significación de los hallazgos laboratoriales en relación con el aborto. En el diagnóstico del aborto bovino por neosporosis, la observación de lesiones compatibles en el SNC y corazón asociadas con la detección del parásito por inmunohistoquímica o PCR, (Sager et al., 2001; Kim et al., 2002a; Boger & Hattel, 2003), se ha considerado como criterio diagnóstico de la infección. En este estudio para detectar la infección por *N. caninum* se analizaron por una PCR anidada cerebro, corazón e hígado. El protocolo empleado mostró ser muy eficaz en detectar la presencia del parásito en fetos abortados, incluso en muestras autolíticas. De los resultados obtenidos aquí se pueden derivar una serie de recomendaciones prácticas desde un punto de vista diagnóstico: (i) el cerebro es el principal órgano donde se detecta el parásito, independientemente del periodo de gestación y de las características epidemiológicas del mismo, por lo que su análisis es indispensable para realizar el diagnóstico; (ii) el corazón fue el segundo órgano dónde más frecuentemente se detectó al

parásito seguido del hígado, siendo especialmente recomendado el análisis de estos órganos en fetos abortados en los primeros periodos de gestación y en aquellos procedentes de brotes epidémicos.

En conclusión, este estudio señala que la presencia y carga del parásito así como la naturaleza y distribución de las lesiones en los tejidos fetales, fue dependiente del periodo de gestación en el que se produjo la muerte del feto y de las características epidemiológicas del aborto. Por otra parte subrayamos la necesidad de utilizar el modelo natural de infección para profundizar en el conocimiento de la patogenia de la infección en la especie bovina.

## **7.- Conclusiones**

**DEL DESARROLLO DE UNA PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *N. caninum*:**

**Primera.** La PCR en tiempo real desarrollada permite la cuantificación de *N. caninum* en los tejidos del hospedador natural o experimentalmente infectado con una alta especificidad, sensibilidad y precisión. El método desarrollado es una alternativa a la inmunohistoquímica y a otras técnicas de PCR para la valoración de la carga parasitaria en diferentes fluidos y tejidos. También resulta de utilidad como técnica de diagnóstico, debido al elevado número de muestras que se pueden analizar y al corto periodo de tiempo en el que se obtienen los resultados.

**DEL DESARROLLO DE UN MODELO MURINO EXPERIMENTAL:**

Estudio de los factores que afectan al desarrollo de la infección crónica por *N. caninum* en el modelo murino.

**Primera.** La infección crónica por *N. caninum* en el modelo murino está influenciada por: (i) la estirpe del ratón utilizada, siendo la estirpe no consanguínea BALB/c más apropiada para el desarrollo de la infección crónica que la estirpe consanguínea ICR; por el (ii) tratamiento inmunodepresor con una mayor eficacia del acetato de metilprednisolona comparado con la ciclofosfamida o vinblastina y (iii) por la dosis infectiva, ya que cuando se incrementa la dosis también lo hace la gravedad de las lesiones. A diferencia de lo señalado por otros autores, no hay diferencias patogénicas importantes dependientes de la vía de inoculación.

**Segunda.** En los ratones de la estirpe BALB/c existe una asociación entre la gravedad de la lesión y la carga parasitaria en el cerebro que no se presenta en el caso de los ratones ICR inmunodeprimidos. Este hecho sugiere que la presencia del parásito en el cerebro contribuye al desarrollo de la lesión pero parece que es necesario al menos un número de parásitos umbral para causarla.

Estudio de la parasitemia y distribución orgánica durante la infección aguda y crónica de *N. caninum* en el modelo murino.

**Tercera.** En la infección por *N. caninum* en el modelo murino se pueden diferenciar tres fases. La primera (desde el día 1 al 5-7 PI) caracterizada por una diseminación sistémica de los taquizoítos vía sanguínea o linfática y su multiplicación en diferentes órganos sin una localización preferente. La segunda fase (desde el día 5-7 hasta el 11-13 PI) que coincide con el desarrollo de la respuesta inmune humoral del hospedador y la desaparición del parásito de los órganos exceptuando el pulmón y el cerebro. En la tercera fase (a partir del día 13 PI), la infección se cronifica y el parásito sólo se detecta en el cerebro donde permanece hasta el final del experimento (día 63 PI), corroborándose que el SNC es el principal lugar de persistencia del parásito.

**Cuarta.** Existen importantes diferencias en relación con la patogenicidad de los aislados NC-Liv y NC-1 en el modelo murino demostrándose una asociación entre la carga parasitaria en cerebro y la presencia de sintomatología. Se sugiere que una de las diferencias en virulencia entre ambos aislados podría deberse a la mayor capacidad de replicación del parásito en el cerebro, siendo de gran importancia la cuantificación orgánica del parásito para conocer las variaciones existentes en la virulencia entre los diferentes aislados de *N. caninum*.

**DEL ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN-CARGA PARASITARIA Y DEL CUADRO LESIONAL EN FETOS BOVINOS ABORTADOS:**

**Primera.** La presencia y carga del parásito así como la naturaleza y distribución de las lesiones en los tejidos fetales es dependiente del periodo de gestación en el que se produce la muerte del feto y de las características epidemiológicas del aborto. Los fetos pertenecientes a los dos primeros periodos de gestación y, principalmente, al primer periodo, así como los procedentes de brotes epidémicos, muestran importantes lesiones, una amplia diseminación orgánica del parásito y altas cargas parasitarias.

**Segunda.** En el corazón y en el hígado existe una relación entre la gravedad de la lesión y la carga parasitaria. El cuadro lesional en el SNC está influenciado por el grado de

desarrollo del sistema inmune del feto y las características de la infección (endémica o epidémica).

**Tercera.** Desde un punto de vista diagnóstico, el cerebro es el principal órgano donde se detecta al parásito, independientemente del periodo de gestación y de las características epidemiológicas del mismo. Por lo tanto, el análisis del mismo se considera indispensable para realizar el diagnóstico de la infección. El corazón es el segundo órgano donde más frecuentemente se detectó al parásito seguido del hígado, siendo recomendable el análisis de estos órganos en fetos abortados en los primeros periodos de gestación y en aquellos procedentes de abortos epidémicos.

## **8.-Resumen**

*Neospora caninum* es un protozoo parásito intracelular, estrechamente relacionado con *Toxoplasma gondii*, considerado como uno de los principales agentes implicados en el aborto bovino. La infección por *N. caninum* en el bovino no gestante es generalmente persistente y asintomática; sin embargo, las principales consecuencias en vacas gestantes son el aborto y el nacimiento de terneros sanos pero congénitamente infectados. El desenlace de la enfermedad depende del momento de la gestación en el que se produce la infección: en las primeras fases de la gestación, la infección intrauterina es causa de aborto; sin embargo, en los últimos meses, tiene como consecuencia el nacimiento de terneros sanos pero congénitamente infectados. Otros factores que influyen en su desarrollo son: la virulencia del aislado, el modo de transmisión (vertical u horizontal) y el tipo de infección (primoinfección, recrudescencia o reinfección) y su relación con la respuesta inmune materna. Actualmente, todavía existen dificultades para reproducir experimentalmente la infección en el ganado bovino, debido al desconocimiento de los factores que pueden determinar el curso de la enfermedad. En este sentido, el ratón es un modelo valioso para la caracterización de los factores dependientes del hospedador y del parásito, así como para el estudio de la patogenia de la infección por *N. caninum*. Su utilización queda justificada en primer lugar, por la ausencia de un modelo definido de la infección en la especie bovina, y en segundo lugar por su facilidad de manejo y estudio: tamaño pequeño, coste económico, disponibilidad de reactivos, y principios de ética animal. Por otra parte, el estudio en el modelo natural de infección de la distribución y cargas parasitarias y de la gravedad de las lesiones en función del periodo de gestación y de las características epidemiológicas del aborto, puede contribuir a esclarecer algunos de los factores determinantes de la patogenia de la neosporosis. Para ello, es fundamental disponer de las herramientas necesarias que permitan investigar la influencia de los factores objeto de estudio en los hospedadores natural y experimentalmente infectados. Entre ellas, es particularmente importante el desarrollo de métodos que permitan la detección y cuantificación de los agentes patógenos en los diversos fluidos y tejidos del hospedador.

El primer objetivo consistió en el desarrollo de una PCR en tiempo real, sensible y específica, para la cuantificación y detección de *N. caninum* tejidos infectados del hospedador, empleando para ello el sistema SYBR Green I™ y las sondas TaqMan™. Un método similar fue desarrollado para la cuantificación del gen 28S ARNr del ADN del

hospedador con el fin de poder comparar la carga parasitaria en diferentes muestras, órganos y hospedadores y corregir la presencia de potenciales inhibidores de la PCR en las muestras. Cuando se realizó el ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real utilizando el sistema SYBR Green I, se obtuvo una curva estándar lineal de 6 logs con el ADN equivalente a  $10^{-1}$  hasta  $10^4$  taquizoítos ( $R^2 = 0,998$ ). Sin embargo con las sondas TaqMan sólo se logró detectar entre 1 y 10 parásitos por reacción. De acuerdo con los resultados obtenidos, se utilizó el SYBR Green I en los trabajos posteriores. La aplicabilidad de esta técnica fue probada con éxito en una batería de muestras de encéfalo procedentes de hospedadores natural y experimentalmente infectados, lográndose una elevada repetitividad y precisión. Todas las muestras fueron analizadas por histología y una PCR anidada del fragmento ITSI, obteniéndose una elevada concordancia entre las técnicas de PCR.

El segundo objetivo fue el desarrollo de un modelo murino experimental para el estudio de la patogenia de la infección por *N. caninum*. Para su cumplimiento se propusieron dos subobjetivos. El primer subobjetivo fue el estudio del efecto de los factores dependientes del hospedador y del parásito en el desarrollo de la infección crónica por *N. caninum* en el modelo murino. Para ello, se inocularon ratones no consanguíneos (ICR) y consanguíneos (BALB/c) con diferentes dosis de taquizoítos del aislado NC-1 ( $4 \times 10^5$ ,  $10^6$  and  $5 \times 10^6$ ), vías de inoculación (intraperitoneal y subcutánea) y tratamientos inmunodepresores (acetato de metilprednisolona-AMP-, ciclofosfamida -Cy- y vinblastina -VLB-). La gravedad de la lesión se investigó en el hígado, pulmón, corazón y cerebro; se estimó la carga parasitaria en el cerebro por la PCR en tiempo-real; y se midieron los títulos de anticuerpos por IFI. La correlación entre la carga parasitaria en el cerebro y la intensidad de la lesión fue también estudiada. Los resultados obtenidos sugieren que la infección crónica por *N. caninum* en el modelo murino estuvo influenciada por (i) la estirpe del ratón: BALB/c fue más apropiada para el desarrollo de la infección crónica que la estirpe ICR; (ii) tratamiento inmunodepresor: el acetato de metilprednisolona fue más efectivo que la ciclofosfamida o vinblastina y (iii) la dosis infectiva: la dosis más alta produjo una mayor gravedad de la infección. No se observaron diferencias en relación con las vías de inoculación. En los ratones de la estirpe BALB/c existió una asociación entre la gravedad de la lesión y la carga parasitaria en el cerebro.

En el segundo subobjetivo se caracterizó la distribución temporal y la cinética de la carga parasitaria en la sangre y en diversos órganos durante el curso de la infección de *N. caninum*. La diferencia en virulencia entre aislados también se estudió comparando el curso de la infección en ratones BALB/c infectados con  $10^6$  taquizoítos de los aislados NC-Liv o NC-1. Con este propósito, se estudió la carga parasitaria en sangre, hígado, pulmón, cerebro, bazo y ganglios linfáticos utilizando la PCR en tiempo-real y la respuesta inmune del hospedador (IgG1 y IgG2a) por ELISA. El curso de la infección por *N. caninum* se estudió durante 63 días y se pudieron diferenciar tres fases. La primera (desde el día 1 al 5-7 PI) caracterizada por una diseminación sistémica de los taquizoítos vía sanguínea o linfática y su multiplicación en diferentes órganos sin una localización preferente. El segundo periodo (desde el día 5-7 hasta el 11-13 PI) que coincide con el desarrollo de la respuesta inmune del hospedador y la desaparición del parásito de los órganos exceptuando el pulmón y cerebro. En la tercera fase (a partir del día 13 PI) la infección se cronificó y el parásito permaneció en cerebro hasta el final del experimento (día 63 PI), corroborándose que el SNC es el principal lugar de persistencia del parásito. Por otro lado, se observaron importantes diferencias en relación con la patogenicidad de los aislados NC-Liv y NC-1 en el modelo murino y se demostró una asociación entre la carga parasitaria en cerebro y la presencia de sintomatología, sugiriendo estos resultados que las diferencias en virulencia entre ambos aislados podría deberse a la diferente capacidad de replicación del parásito en el cerebro.

El último objetivo consistió en el estudio de la infección por *N. caninum* en fetos bovinos abortados, investigando la influencia de la edad fetal (primer, segundo y tercer periodo) y las características epidemiológicas del aborto (epidémico, endémico, esporádico) sobre la distribución-carga parasitaria y sobre la presencia y gravedad de las lesiones en los diferentes órganos. Con este propósito, se analizaron un total de 219 fetos y el diagnóstico de la infección por *N. caninum* se basó en la detección del ADN del parásito en cerebro, corazón e hígado por una PCR anidada del segmento ITS1. La presencia del parásito se detectó en 72 (37,5%) fetos bovinos. Cuando se compararon las diferentes edades se observó una mayor distribución y cargas parasitarias, así como lesiones más graves en los fetos correspondientes al primer y segundo periodo de gestación. En el último periodo de gestación, el feto fue capaz de controlar la infección, presuntamente por el desarrollo de una activa respuesta inmune. En estos fetos, la lesiones fueron de carácter

más leve y el parásito sólo pudo ser detectado en pequeña cantidad en el cerebro y, esporádicamente en el diafragma, el corazón y los ganglios linfáticos. Aunque no se encontraron marcadas diferencias en el tipo de lesiones cerebrales entre fetos de diferentes edades, en los fetos del primer periodo se observaron extensas áreas de necrosis y en los del segundo o tercer periodo un mayor número de fetos presentaron infiltración de células inflamatorias o nódulo glial, respectivamente. Por otra parte, los fetos procedentes de abortos epidémicos mostraron una mayor diseminación y cargas del parásito, principalmente, en corazón, así como lesiones más graves. El cuadro lesional en el SNC se caracterizó por una frecuencia más elevada y mayor gravedad de las lesiones consideradas especialmente, de la gliosis. Este estudio también demostró una relación entre la gravedad de la lesión y la carga parasitaria en el corazón y en el hígado. En el SNC no se encontró esta asociación y en algunos fetos se observaron lesiones moderadas o graves y bajas cargas parasitarias, principalmente, en los fetos del tercer periodo. Desde un punto de vista diagnóstico, el estudio del cerebro se considera indispensable para realizar el diagnóstico de la infección. El examen del corazón e hígado se recomienda especialmente en fetos abortados en los primeros periodos de gestación y en aquellos procedentes de abortos epidémicos.

## **9.- Summary**

*Neospora caninum* is an obligate intracellular protozoan closely related to *Toxoplasma gondii*, that is considered as one of main agents implicated in bovine abortion. *N. caninum* establishes a persistent infection in the host and is generally asymptomatic in non-pregnant cattle. However, the consequences of infection in pregnant cow can be abortion and birth of a clinically healthy but persistently infected calves. The outcome of the disease depends on the stage of gestation at which the dam is infected: the intrauterine *N. caninum* infection during early stages of pregnancy causes abortion; however, during the later periods it results in the birth of clinically healthy but persistently infected calves. On the other hand, other factors can influence on the outcome of infection: parasite virulence, routes of *Neospora* transmission (vertical or horizontal), type of infection (primary infection, recrudescence and reinfection) and the maternal immune response. To date, there are still some difficulties to reproduce the consequences of the infection in cattle experimentally, since it is unclear which specific factors play a major role in determining the outcome of the infection. Mice can be a potentially valuable model for the characterization of host and parasite factors and the study of the pathogenesis of *N. caninum* infection, which would be difficult to achieve using outbred cattle. Advantages of a murine model are small body size, availability of immunological reagents and easy handling. On the other hand, the influence of the age of aborted fetuses and abortion pattern on parasite distribution and loads and lesion severity can shed light on the pathogenesis of the neosporosis. Finally, the ability to quantify *N. caninum* in tissue samples can be a useful quantitative diagnostic tool for the study of the pathogenesis of *Neospora* infection in cattle and murine models. Besides, there is practical need for a fast and efficient method to quantify *N. caninum* in infected tissues.

The first objective was to develop a sensitive and specific real-time PCR assay for the quantitative detection of *N. caninum* in infected host tissues, employing the double-stranded DNA-binding (dsDNA) dye SYBR Green I™ and TaqMan™ probes. A similar method was developed to quantify the 28S rRNA host gene in order to compare the parasite load of different samples and to correct for the presence of potential PCR-inhibiting compounds in the DNA samples. A linear quantitative detection range of 6 logs with a calculated detection limit of 10<sup>-1</sup> tachyzoite per assay was observed with excellent linearity (R<sup>2</sup>=0.998) using SYBR Green I. However, when TaqMan probes was employed, only 1-10 tachyzoites per assay were detected. As a consequence of these results SYBR

Green I method was used for subsequent studies. The applicability of the technique was successfully tested in a battery of brain samples from naturally and experimentally infected hosts. All samples were also tested by histopathological analysis and ITS1 *Neospora* nested-PCR and a high degree of agreement was shown between both PCR techniques.

The second objective was to develop of a laboratory model for *N. caninum* infection and for this purpose two subobjectives were planned. The first subobjective was to investigate the effect of several host and parasite factors on the outcome of chronic neosporosis in mice. In order to achieve this, groups of outbred (ICR) and inbred (BALB/c) mice were inoculated using different NC-1 parasite doses ( $4 \times 10^5$ ,  $10^6$  and  $5 \times 10^6$ ), inoculation routes (intraperitoneally and subcutaneously) and immunosuppressive treatments (Methylprednisolone Acetate -MPA-, Cyclophosphamide -Cy- and Vinblastine -VLB-). Lesion severity was analyzed in liver, lung, heart, and brain tissues, parasite load was measured by real-time PCR in brain tissue and antibody titers by IFAT test. The correlation between brain parasite burden and lesion severity was also examined. The results suggest that severity of infection was influenced by (i) host strain: BALB/c was more appropriate in order to develop a chronic infection than immunosuppressed ICR mice; (ii) immunosuppressive treatment: MPA was more effective than Cy and VLB and (iii) infective dose: the higher inoculum size was associated with a higher infection intensity. No differences were observed with respect to inoculation route. The study also showed an association between brain parasite burden and severity of cerebral lesions in BALB/c mice.

Second subobjective concerned the characterization of the temporal distribution and parasite load kinetics in blood and organs during *N. caninum* infection in mice. The relationship between parasite isolate and virulence was also explored by comparing the course of the infection in BALB/c mice inoculated with  $10^6$  tachyzoites from NC-Liv or NC-1 isolates. Parasite load was measured by real-time PCR in blood, liver, lung, brain, spleen and lymph nodes and serum *Neospora*-specific isotype antibodies (IgG1 and IgG2a) were determined using an ELISA test. The course of *Neospora* infection in mice was followed for 63 days and could be separated into three phases. The first phase, following infection (from day 1 to 5-7 PI) was characterized by systemically dissemination of

tachyzoites via peripheral blood or lymph and its multiplication in different organs without any preferential site. The second period (from day 5-7 to 11-13 PI) coincided with development of host immunity, the tachyzoites were cleared from host tissues and were only detected in lung and brain. In the third phase (day 13 onward) the infection became chronic, the parasite remained in brain tissue at low loads until the end of experiment (day 63 PI), corroborating that CNS is the major site of persistence. The most important finding attributable to isolate and related to the virulence observed was the presence of symptoms and a higher parasite burden in brain. Nevertheless, this report demonstrated an association between brain parasite load and the presence of symptoms. These results demonstrated that Nc-Liv was more pathogenic than Nc-1 isolate, surely due to a higher capacity of replication of the Nc-Liv isolate.

The final objective was to the study of *N. caninum* infection in bovine aborted fetuses. We studied the influence of the age of aborted fetuses (first, second and third gestational periods) and abortion pattern (sporadic, endemic and epidemic) on the distribution and levels of parasites, in addition to the presence and nature of lesions in the different tissues. For this purpose a total of 219 fetuses were analyzed and diagnosis of the *N. caninum* infection was based on the detection of parasite-specific DNA by an ITS1 nested-PCR in brain, heart and liver. The presence of the parasite was detected in 72 (37,5%) bovine fetuses. When we compared the different age classes, a higher parasite distribution, parasite loads, and severity lesion were observed in the fetuses corresponding to the first and second pregnancy period. In the last trimester of pregnancy the fetuses were able to eliminate the infection presumably by an active immune response. The parasite could only be detected at low levels in the brain and sporadically in the diaphragm, heart and lymph nodes and lesions were mild. Although we did not find marked differences in histologic lesions in brain among different age classes, we observed large necrotic foci in the foetuses from the first period, a higher number of animals with inflammation cells or glial nodules in the second or third period, respectively. On the other hand, the present study shows a higher *N. caninum* dissemination and parasite loads in tissues from fetuses aborted during epidemic abortion outbreaks, particularly in heart. The *Neospora*-associated lesions in the organs analyzed were also more severe in epidemic abortions. The histologic picture in CNS was characterized by a higher frequency and severity of the lesions considered with special

reference to gliosis. Our study also demonstrated an association between lesion severity and parasite burden in heart and liver. This correlation was not found for the CNS where severe brain pathology and low parasite loads was sometimes observed, mainly in foetuses from the last period of pregnancy. These findings suggest that the nascent immune response appears to modulate the development of lesions in brain. With regard to the diagnosis and according to the results obtained, we recommend the analyses of the brain as the best option to detect infection in aborted bovine foetuses. However, the examination of the heart and liver can be very helpful in foetuses aborted during the first and second periods of pregnancy and those aborted during epidemic abortion outbreaks.

## **10.-Bibliografía**

- Aduriz, G., R. Atxaerandio, and B. Moreno.** 1999. Diagnóstico de abortos en ganado vacuno lechero: aspectos prácticos. *Albéitar* 4-5.
- Aduriz, G., R. Atxaerandio, B. Moreno.** 2001. El diagnóstico laboratorial del aborto bovino. *Albeitar*. 50, 4-5.
- Ahn, H. J., S. Kim, D. Y. Kim, and H. W. Nam.** 2003. ELISA detection of IgG antibody against a recombinant major surface antigen (Nc-p43) fragment of *Neospora caninum* in bovine sera. *Korean J.Parasitol.* **41**:175-177.
- Allende, R., W. W. Laegreid, G. F. Kutish, J. A. Galeota, R. W. Wills, and F. A. Osorio.** 2000. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: description of persistence in individual pigs upon experimental infection. *J.Virol.* **74**:10834-10837.
- Almería, S., D. Ferrer, M. Pabon, J. Castella, and S. Manas.** 2002. Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. *Vet.Parasitol.* **107**:287-294.
- Almería, S., T. De Marez, H. Dawson, R. Araujo, J. P. Dubey, and L. C. Gasbarre.** 2003. Cytokine gene expression in dams and fetuses after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. *Parasite Immunol.* **25**:383-392.
- Álvarez-García, G.** 2003. Identificación y caracterización de antígenos de *Neospora caninum* con interés inmunodiagnóstico en bovinos. Tesis doctoral.
- Álvarez-García, G., E. Collantes-Fernández, E. Costas, X. Rebordosa, and L. M. Ortega-Mora.** 2003. Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods in bovine neosporosis. *Vet.Res.* **34**:341-352.
- Anderson, M. L., A. G. Andrianarivo, and P. A. Conrad.** 2000. Neosporosis in cattle. *Anim Reprod.Sci.* **60-61**:417-431.
- Anderson, M. L., C. W. Palmer, M. C. Thurmond, J. P. Picanso, P. C. Blanchard, R. E. Breitmeyer, A. W. Layton, M. McAllister, B. Daft, and H. Kinde.** 1995. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **207**:1206-1210.
- Anderson, M. L., J. P. Reynolds, J. D. Rowe, K. W. Sverlow, A. E. Packham, B. C. Barr, and P. A. Conrad.** 1997. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp infection in dairy cattle. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **210**:1169-1172.
- Anderson, M. L., P. C. Blanchard, B. C. Barr, and R. L. Hoffman.** 1990. A survey of causes of bovine abortion occurring in the San Joaquin Valley, California. *J.Vet.Diagn.Invest* **2**:283-287.
- Anderson, M. L., P. C. Blanchard, B. C. Barr, J. P. Dubey, R. L. Hoffman, and P. A. Conrad.** 1991. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **198**:241-244.
- Andrianarivo, A. G., B. C. Barr, M. L. Anderson, J. D. Rowe, A. E. Packham, K. W. Sverlow, and P. A. Conrad.** 2001. Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum*. *Parasitol.Res.* **87** :817-825.
- Andrianarivo, A. G., J. D. Rowe, B. C. Barr, M. L. Anderson, A. E. Packham, K. W. Sverlow, L. Choromanski, C. Loui, A. Grace, and P. A. Conrad.** 2000. A POLYGEN-adjuvanted killed *Neospora caninum* tachyzoite preparation failed to prevent foetal infection in pregnant cattle following i.v./i.m. experimental tachyzoite challenge. *Int.J.Parasitol.* **30**:985-990.
- Andrianarivo, A. G., L. Choromanski, S. P. McDonough, A. E. Packham, and P. A. Conrad.** 1999. Immunogenicity of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite preparation formulated with different adjuvants. *Int.J.Parasitol.* **29**:1613-1625.
- Asai, T., D. K. Howe, K. Nakajima, T. Nozaki, T. Takeuchi, and L. D. Sibley.** 1998. *Neospora caninum*: tachyzoites express a potent type-I nucleoside triphosphate hydrolase. *Exp.Parasitol.* **90**:277-285.

- Atkinson, R. A., R. W. Cook, L. A. Reddacliff, J. Rothwell, K. W. Broady, P. Harper, and J. T. Ellis. 2000a. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection following an abortion outbreak in a dairy cattle herd. *Aust.Vet.J.* **78**:262-266.
- Atkinson, R., P. A. Harper, C. Ryce, D. A. Morrison, and J. T. Ellis. 1999. Comparison of the biological characteristics of two isolates of *Neospora caninum*. *Parasitology* **118 ( Pt 4)**:363-370.
- Atkinson, R., P. A. Harper, M. P. Reichel, and J. T. Ellis. 2000b. Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. *Parasitol.Today* **16**:110-114.
- Ávarez-García, G., J. Pereira-Bueno, M. Gómez-Bautista, and L. M. Ortega-Mora. 2002. Pattern of recognition of *Neospora caninum* tachyzoite antigens by naturally infected pregnant cattle and aborted fetuses. *Vet.Parasitol.* **107**:15-27.
- Bae, J. S., D. Y. Kim, W. S. Hwang, J. H. Kim, N. S. Lee, and H. W. Nam. 2000b. Detection of IgG antibody against *Neospora caninum* in cattle in Korea. *Korean J.Parasitol.* **38**:245-249.
- Baillargeon, P., G. Fecteau, J. Pare, P. Lamothe, and R. Sauve. 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., T. Y. Morishita, D. L. Brooks, S. K. Shen, D. S. Lindsay, and J. P. Dubey. 1995. Experimental oral inoculations in birds to evaluate potential definitive hosts of *Neospora caninum*. *J.Parasitol.* **81**:783-785.
- Barber, J. S., L. van Ham, I. Polis, and A. J. Trees. 1997. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in Belgian dogs. *J.Small Anim Pract.* **38**:15-16.
- Barber, J., A. J. Trees, M. Owen, and B. Tennant. 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, 29 Abril-3 Mayo, pp: 203-204.
- Barling, K. S., D. K. Lunt, K. F. Snowden, and J. A. Thompson. 2001. Association of serologic status for *Neospora caninum* and postweaning feed efficiency in beef steers. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **219**:1259-1262.
- Barling, K. S., J. W. McNeill, J. A. Thompson, J. C. Paschal, F. T. McCollum, III, T. M. Craig, and L. G. Adams. 2000a. Association of serologic status for *Neospora caninum* with postweaning weight gain and carcass measurements in beef calves. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **217**:1356-1360.
- Barling, K. S., M. Sherman, M. J. Peterson, J. A. Thompson, J. W. McNeill, T. M. Craig, and L. G. Adams. 2000b. 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., J. D. Rowe, K. W. Sverlow, R. H. BonDurant, A. A. Ardans, M. N. Oliver, and P. A. Conrad. 1994a. Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. *J.Vet.Diagn.Invest* **6**:207-215.
- Barr, B. C., M. L. Anderson, J. P. Dubey, and P. A. Conrad. 1991a. *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. *Vet.Pathol.* **28**:110-116.
- Barr, B. C., M. L. Anderson, K. W. Sverlow, and P. A. Conrad. 1995. Diagnosis of bovine fetal *Neospora* infection with an indirect fluorescent antibody test. *Vet.Rec.* **137**:611-613.
- Barr, B. C., M. L. Anderson, L. W. Woods, J. P. Dubey, and P. A. Conrad. 1992. *Neospora*-like protozoal infections associated with abortion in goats. *J.Vet.Diagn.Invest* **4**:365-367.
- Barr, B. C., M. L. Anderson, P. C. Blanchard, B. M. Daft, H. Kinde, and P. A. Conrad. 1990. Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. *Vet. Pathol.* **27**: 354-61.

- Barr, B. C., P. A. Conrad, J. P. Dubey, and M. L. Anderson.** 1991b. *Neospora*-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. *J.Vet.Diagn.Invest* **3**:39-46.
- Barr, B. C., P. A. Conrad, K. W. Sverlow, A. F. Tarantal, and A. G. Hendrickx.** 1994b. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. *Lab.Invest.* **71**:236-242.
- Barr, B. C., P. A. Conrad, R. Breitmeyer, K. Sverlow, M. L. Anderson, J. Reynolds, A. E. Chauvet, J. P. Dubey, and A. A. Ardans.** 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.
- Barragan, A. and L. D. Sibley.** 2003. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends Microbiol.* **11**:426-430.
- Barta, J. R. and J. P. Dubey.** 1992. Characterization of anti-*Neospora caninum* hyperimmune rabbit serum by western blot analysis and immunoelectron microscopy. *Parasitol.Res.* **78**:689-694.
- Bartels, C. J., W. Wouda, and Y. H. Schukken.** 1999. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology* **52**:247-257.
- Barthold, S. W. and M. de Souza.** 1995. Exacerbation of Lyme arthritis in beige mice. *J.Infect.Dis.* **172**:778-784.
- Basso, W., L. Venturini, M. C. Venturini, D. E. Hill, O. C. Kwok, S. K. Shen, and J. P. Dubey.** 2001. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *J.Parasitol.* **87**:612-618.
- Baszler, T. V., D. P. Knowles, J. P. Dubey, J. M. Gay, B. A. Mathison, and T. F. McElwain.** 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., L. J. Gay, M. T. Long, and B. A. Mathison.** 1999a. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. *J.Clin.Microbiol.* **37**:4059-4064.
- Baszler, T. V., M. T. Long, T. F. McElwain, and B. A. Mathison.** 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., T. F. McElwain, and B. A. Mathison.** 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.
- Beckers, C. J., T. Wakefield, and K. A. Joiner.** 1997. The expression of *Toxoplasma* proteins in *Neospora caninum* and the identification of a gene encoding a novel rhoptry protein. *Mol.Biochem.Parasitol.* **89**:209-223.
- Bell, A. and L. Ranford-Cartwright.** 2002. Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends Parasitol.* **18**:338.
- Bergeron, N., C. Girard, J. Pare, G. Fecteau, J. Robinson, and P. Baillargeon.** 2001a. Rare detection of *Neospora caninum* in placentas from seropositive dams giving birth to full-term calves. *J.Vet.Diagn.Invest* **13**:173-175.
- Bergeron, N., G. Fecteau, A. Villeneuve, C. Girard, and J. Pare.** 2001b. Failure of dogs to shed oocysts after being fed bovine fetuses naturally infected by *Neospora caninum*. *Vet.Parasitol.* **97**:145-152.
- Bergeron, N., G. Fecteau, J. Pare, R. Martineau, and A. Villeneuve.** 2000. Vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* in dairy herds in Quebec. *Can.Vet.J.* **41**:464-467.
- Bielanski, A., J. Robinson, and B. Phipps-Todd.** 2002. Effect of *Neospora caninum* on in vitro development of preimplantation stage bovine embryos and adherence to the zona pellucida. *Vet.Rec.* **150**:316-318.
- Bjerkas, I. and J. P. Dubey.** 1991. Evidence that *Neospora caninum* is identical to the *Toxoplasma*-like parasite of Norwegian dogs. *Acta Vet.Scand.* **32**:407-410.

- Bjerkas, I. and J. Presthus.** 1989. The neuropathology in toxoplasmosis-like infection caused by a newly recognized cyst-forming sporozoan in dogs. *APMIS* **97**:459-468.
- Bjerkas, I., M. C. Jenkins, and J. P. Dubey.** 1994. Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* **1**:214-221.
- Bjerkas, I., S. F. Mohn, and J. Presthus.** 1984. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z.Parasitenkd.* **70**:271-274.
- Björkman, C. and A. Hemphill.** 1998. Characterization of *Neospora caninum* iscom antigens using monoclonal antibodies. *Parasite Immunol.* **20**:73-80.
- Björkman, C. and A. Uggla.** 1999. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Int.J.Parasitol.* **29**:1497-1507.
- Björkman, C., A. Lundén, J. Holmdahl, J. Barber, A. J. Trees, and A. Uggla.** 1994. *Neospora caninum* in dogs: detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. *Parasite Immunol.* **16**:643-648.
- Björkman, C., K. Naslund, S. Stenlund, S. W. Maley, D. Buxton, and A. Uggla.** 1999. An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. *J.Vet.Diagn.Invest* **11**:41-44.
- Björkman, C., O. J. Holmdahl, and A. Uggla.** 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., O. Johansson, S. Stenlund, O. J. Holmdahl, and A. Uggla.** 1996. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **208**:1441-1444.
- Björkman, C., S. Alenius, U. Manuelsson, and A. Uggla.** 2000. *Neospora caninum* and bovine virus diarrhoea virus infections in Swedish dairy cows in relation to abortion. *Vet.J.* **159**:201-206.
- Boger, L. A. and A. L. Hattel.** 2003. Additional evaluation of undiagnosed bovine abortion cases may reveal fetal neosporosis. *Vet.Parasitol.* **113**:1-6.
- Boulton, J. G., P. A. Gill, R. W. Cook, G. C. Fraser, P. A. Harper, and J. P. Dubey.** 1995. Bovine *Neospora* abortion in north-eastern New South Wales. *Aust.Vet.J.* **72**:119-120.
- Bradley, E. and R.Tibshirani.** 1993. An Introduction to the "Bootstrap". *In: Monographs on Statistics and Applied Probability* 57. New York, Chapman & Hall (Ed.)
- Braun, R. K., B. I. Osburn, and J. W. Kendrick.** 1973. Immunologic response of bovine fetus to bovine viral diarrhoea virus. *Am.J.Vet.Res.* **34**:1127-1132.
- Brindley, P. J., R. T. Gazzinelli, E. Y. Denkers, S. W. Davis, J. P. Dubey, R. Belfort, Jr., M. C. Martins, C. Silveira, L. Jamra, A. P. Waters, and .** 1993. Differentiation of *Toxoplasma gondii* from closely related coccidia by riboprint analysis and a surface antigen gene polymerase chain reaction. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **48**:447-456.
- Bryan, L. A., A. A. Gajadhar, J. P. Dubey, and D. M. Haines.** 1994. Bovine neonatal encephalomyelitis associated with a *Neospora* sp. protozoan. *Can.Vet.J.* **35**:111-113.
- 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., J. S. Gilmour, K. W. Angus, D. A. Blewett, and J. K. Miller.** 1982. Perinatal changes in lambs infected with *Toxoplasma gondii*. *Res.Vet.Sci.* **32**:170-176.
- Buxton, D., M. M. McAllister, and J. P. Dubey.** 2002. The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends Parasitol.* **18**:546-552.

- Buxton, D., S. W. Maley, S. Wright, K. M. Thomson, A. G. Rae, and E. A. Innes.** 1998. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. *J.Comp Pathol.* **118**:267-279.
- Buxton, D., S. Wright, S. W. Maley, A. G. Rae, A. Lundén, and E. A. Innes.** 2001. Immunity to experimental neosporosis in pregnant sheep. *Parasite Immunol.* **23**:85-91.
- Cabaj, W., L. Choromanski, S. Rogers, B. Moskwa, and A. Malczewski.** 2000. *Neospora caninum* infections in aborting dairy cows in Poland. *Acta Parasitol.* **45**:113-114.
- Caldow, G. L., D. Buxton, J. A. Spence, and J. Holisz.** 1996. Diagnoses of bovine abortion in Scotland. Proceedings of XIX world buiatrics congress. Edinburgh 8-12 July 1996. British Cattle Veterinary Association **volume 1**:191-194.
- Campero, C. M., D. P. Moore, A. C. Odeon, A. L. Cipolla, and E. Odriozola.** 2003. Aetiology of bovine abortion in Argentina. *Vet.Res.Comm.* **27**:359-369.
- Campero, C. M., M. L. Anderson, G. Conosciuto, H. Odriozola, G. Bretschneider, and M. A. Poso.** 1998. *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in Argentina. *Vet.Rec.* **143**:228-229.
- Canada, N., C. S. Meireles, A. Rocha, S. Sousa, G. Thompson, J. P. Dubey, S. Romand, P. Thulliez, and J. M. Correia da Costa.** 2002. First Portuguese isolate of *Neospora caninum* from an aborted fetus from a dairy herd with endemic neosporosis. *Vet.Parasitol.* **110**:11-15.
- Cannas, A., A. Naguleswaran, N. Müller, B. Gottstein, and A. Hemphill.** 2003a. Reduced cerebral infection of *Neospora caninum*-infected mice after vaccination with recombinant microneme protein NcMIC3 and ribi adjuvant. *J.Parasitol.* **89**:44-50.
- Cannas, A., A. Naguleswaran, N. Müller, S. Eperon, B. Gottstein, and A. Hemphill.** 2003b. Vaccination of mice against experimental *Neospora caninum* infection using NcSAG1- and NcSRS2-based recombinant antigens and DNA vaccines. *Parasitology* **126**:303-312.
- Casaro, A. P., J. W. Kendrick, and P. C. Kennedy.** 1971. Response of the bovine fetus to bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus. *Am.J.Vet.Res.* **32**:1543-1562.
- Cebrián, L. M., J. V. Senent, J. M. Blasco, y M. Barberán.** 1999. Detección de animales infectados por *Neospora caninum* mediante inmunofluorescencia indirecta y su aplicación al control de la enfermedad. *Producción Animal* **148**:46-50.
- Chanlun, A., K. Naslund, S. Aiumlamai, and C. Björkman.** 2002. Use of bulk milk for detection of *Neospora caninum* infection in dairy herds in Thailand. *Vet.Parasitol.* **110**:35-44.
- Channon, J. Y., R. M. Seguin, and L. H. Kasper.** 2000. Differential infectivity and division of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood leukocytes. *Infect.Immun.* **68**:4822-4826.
- Cheadle, M. A., J. A. Spencer, and B. L. Blagburn.** 1999. Seroprevalences of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in nondomestic felids from southern Africa. *J.Zoo.Wildl.Med.* **30**:248-251.
- Cheah, T. S., R. A. Sani and P. Chandrawathani.** 2001. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in a dairy cattle farm in Malaysia. WAAVP, Stresa, Italia, 19.
- Chi, J., J. A. VanLeeuwen, A. Weersink, and G. P. Keefe.** 2002. Management factors related to seroprevalences to bovine viral diarrhoea virus, bovine-leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* in dairy herds in the Canadian Maritimes. *Prev.Vet.Med.* **55**:57-68.
- Cole, R. A., D. S. Lindsay, B. L. Blagburn, and J. P. Dubey.** 1995. Vertical transmission of *Neospora caninum* in mice. *J.Parasitol.* **81**:730-732.
- Cole, R. A., D. S. Lindsay, J. P. Dubey, M. A. Toivio-Kinnucan, and B. L. Blagburn.** 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.

- Conrad, P. A., B. C. Barr, K. W. Sverlow, M. Anderson, B. Daft, H. Kinde, J. P. Dubey, L. Munson, and A. Ardans. 1993a. In vitro isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine fetuses. *Parasitology* **106** ( Pt 3):239-249.
- Conrad, P. A., K. Sverlow, M. Anderson, J. Rowe, R. BonDurant, G. Tuter, R. Breitmeyer, C. Palmer, M. Thurmond, and A. Ardans. 1993b. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *J.Vet.Diagn.Invest* **5**:572-578.
- Conraths, F. J., G. Schares, G. Tschernychova, and O. A. S. Bessnov. 2000. Seroepidemiological evidence for bovine neosporosis and *N. caninum*-associated abortions in the Russian Federation, in: Hemphill, A., Gottstein, B. A European perspective on *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* **30**: 890-891.
- Corbellini, L. G., D. Driemeier, C. F. Cruz, L. F. Gondim, and V. Wald. 2002. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Vet.Parasitol.* **103**:195-202.
- Costa, J. M., P. Ernault, E. Gautier, and S. Bretagne. 2001. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis by duplex real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *Prenat.Diagn.* **21**:85-88.
- Cramer, G., D. Kelton, T. F. Duffield, J. C. Hobson, K. Lissemore, S. K. Hietala, and A. S. Peregrine. 2002. *Neospora caninum* serostatus and culling of Holstein cattle. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **221**:1165-1168.
- Crawshaw, W. M. and S. Brocklehurst. 2003. Abortion epidemic in a dairy herd associated with horizontally transmitted *Neospora caninum* infection. *Vet.Rec.* **152**:201-206.
- Cuddon, P., D. S. Lin, D. D. Bowman, D. S. Lindsay, T. K. Miller, I. D. Duncan, A. deLahunta, J. Cummings, M. Suter, and B. Cooper. 1992. *Neospora caninum* infection in English Springer Spaniel littermates. Diagnostic evaluation and organism isolation. *J.Vet.Intern.Med.* **6**:325-332.
- Dannatt, L., F. Guy, and A. J. Trees. 1995. Abortion due to *Neospora* species in a dairy herd. *Vet.Rec.* **137**:566-567.
- Davison, H. C., A. Otter, and A. J. Trees. 1999a. Significance of *Neospora caninum* in British dairy cattle determined by estimation of seroprevalence in normally calving cattle and aborting cattle. *Int.J.Parasitol.* **29**:1189-1194
- Davison, H. C., A. Otter, and A. J. Trees. 1999b. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *Int.J.Parasitol.* **29**:1683-1689.
- Davison, H. C., C. S. Guy, J. W. McGarry, F. Guy, D. J. Williams, D. F. Kelly, and A. J. Trees. 2001. Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. *Res.Vet.Sci.* **70**:163-168.
- Davison, H. C., F. Guy, A. J. Trees, C. Ryce, J. T. Ellis, A. Otter, M. Jeffrey, V. R. Simpson, and J. J. Holt . 1999c. In vitro isolation of *Neospora caninum* from a stillborn calf in the UK. *Res.Vet.Sci.* **67**:103-105.
- Davison, H. C., N. P. French, and A. J. Trees. 1999d. Herd-specific and age-specific seroprevalence of *Neospora caninum* in 14 British dairy herds. *Vet.Rec.* **144**:547-550.
- De Marez, T., S. Liddell, J. P. Dubey, M. C. Jenkins, and L. Gasbarre. 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., C. Focant, R. Boreux, T. Leclipteux, and B. Losson. 2000. Cattle neosporosis in Belgium: A case control in dairy and beef cattle, in: Hemphill, A., Gottstein, B. A European perspective on *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* **30**: 887-890.
- De Meerschman, F., N. Speybroeck, D. Berkvens, C. Rettignera, C. Focant, T. Leclipteux, D. Cassart, and B. Losson. 2002. Fetal infection with *Neospora caninum* in dairy and beef cattle in Belgium. *Theriogenology* **58**:933-945.

- Dijkstra, T., H. W. Barkema, C. Björkman, and W. Wouda. 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., H. W. Barkema, J. W. Hesselink, and W. Wouda. 2002b. 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., H. W. Barkema, M. Eysker, and W. Wouda. 2001a. Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. *Int.J.Parasitol.* **31**:209-215.
- Dijkstra, T., H. W. Barkema, M. Eysker, J. W. Hesselink, and W. Wouda. 2002c. Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. *Vet.Parasitol.* **105**:99-104.
- Dijkstra, T., H. W. Barkema, M. Eysker, M. L. Beiboer, and W. Wouda. 2003. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. *Vet.Parasitol.* **110**:161-169.
- Dijkstra, T., M. Eysker, G. Schares, F. J. Conraths, W. Wouda, and H. W. Barkema. 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., L. W. Stewarter, R. L. Kerlin, D. M. Ritter, and D. A. Brake. 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. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Vet.Parasitol.* **84**:349-367.
- Dubey, J. P. 2003. Neosporosis in cattle. *J.Parasitol.* **89** (Suppl):S42-S56.
- Dubey, J. P. and A. d. Lahunta. 1993. Neosporosis associated congenital limb deformities in a calf. *Appl.Parasitol.* **34**:229-233.
- Dubey, J. P. and D. S. Lindsay . 1989a. Fatal *Neospora caninum* infection in kittens. *J.Parasitol.* **75**:148-151.
- Dubey, J. P. and D. S. Lindsay . 1989b. Transplacental *Neospora caninum* infection in cats. *J.Parasitol.* **75**:765-771.
- Dubey, J. P. and D. S. Lindsay. 1989c. Transplacental *Neospora caninum* infection in dogs. *Am.J.Vet.Res.* **50**:1578-1579.
- Dubey, J. P. and D. S. Lindsay. 1990. *Neospora caninum* induced abortion in sheep. *J.Vet.Diagn.Invest* **2**:230-233.
- Dubey, J. P. and D. S. Lindsay. 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet.Parasitol.* **67**:1-59.
- Dubey, J. P. and D. S. Lindsay. 2000. Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocysts. *Parasitol.Res.* **86**:165-168.
- Dubey, J. P. and S. P. Sharma. 1980. Parasitemia and tissue infection in sheep fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *J.Parasitol.* **66**:111-114.
- Dubey, J. P., A. L. Hattel, D. S. Lindsay, and M. J. Topper. 1988a. 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., B. C. Barr, J. R. Barta, I. Bjerkas, C. Björkman, B. L. Blagburn, D. D. Bowman, D. Buxton, J. T. Ellis, B. Gottstein, A. Hemphill, D. E. Hill, D. K. Howe, M. C. Jenkins, Y. Kobayashi, B. Koudela, A. E. Marsh, J. G. Mattsson, M. M. McAllister, D. Modry, Y. Omata, L. D. Sibley, C. A. Speer, A. J. Trees, A. Uggla, S. J. Upton, D. J. Williams, and D. S. Lindsay. 2002a. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *Int.J.Parasitol.* **32**:929-946.

- Dubey, J. P., D. E. Hill, D. S. Lindsay, M. C. Jenkins, A. Uggla, and C. A. Speer. 2002b. *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* are separate species/organisms. *Trends Parasitol.* **18**:66-69.
- Dubey, J. P., D. S. Lindsay, M. L. Anderson, S. W. Davis, and S. K. Shen. 1992. Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **201**:709-713.
- Dubey, J. P., J. A. Morales, P. Villalobos, D. S. Lindsay, B. L. Blagburn, and M. J. Topper. 1996. Neosporosis-associated abortion in a dairy goat. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **208**:263-265.
- Dubey, J. P., J. L. Carpenter, C. A. Speer, M. J. Topper, and A. Uggla. 1988b. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **192**:1269-1285.
- Dubey, J. P., K. R. Dorrough, M. C. Jenkins, S. Liddell, C. A. Speer, O. C. Kwok, and S. K. Shen. 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., M. C. Jenkins, D. S. Adams, M. M. McAllister, R. Anderson-Sprecher, T. V. Baszler, O. C. Kwok, N. C. Lally, C. Björkman, and A. Uggla. 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., S. Liddell, D. Mattson, C. A. Speert, D. K. Howe, and M. C. Jenkins. 2001. Characterization of the Oregon isolate of *Neospora hughesi* from a horse. *J.Parasitol.* **87**:345-353.
- Dubey, J. P., S. Miller, D. S. Lindsay, and M. J. Topper. 1990a. *Neospora caninum*-associated myocarditis and encephalitis in an aborted calf. *J.Vet.Diagn.Invest* **2**:66-69.
- Dubey, J. P., S. Romand, M. Hilali, O. C. Kwok, and P. Thulliez. 1998b. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Egypt. *Int.J.Parasitol.* **28**:527-529.
- Dubey, J. P., W. J. Hartley, and D. S. Lindsay. 1990b. Congenital *Neospora caninum* infection in a calf with spinal cord anomaly. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **197**:1043-1044.
- Duncanson, P., R. S. Terry, J. E. Smith, and G. Hide. 2001. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. *Int.J.Parasitol.* **31**:1699-1703.
- Dyer, R. M., M. C. Jenkins, O. C. Kwok, L. W. Douglas, and J. P. Dubey. 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.
- Egyed, L., A. Ballagi-Pordany, A. Bartha, and S. Belak. 1996. Studies of in vivo distribution of bovine herpesvirus type 4 in the natural host. *J.Clin.Microbiol.* **34**:1091-1095.
- Ellis, J. T. 1998. Polymerase chain reaction approaches for the detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Int.J.Parasitol.* **28**:1053-1060.
- Ellis, J. T., C. Ryce, R. Atkinson, S. Balu, P. Jones, and P. A. Harper. 2000. Isolation, characterization and expression of a GRA2 homologue from *Neospora caninum*. *Parasitology* **120** (Pt 4):383-390.
- Ellis, J. T., D. A. Morrison, S. Liddell, M. C. Jenkins, O. B. Mohammed, C. Ryce, and J. P. Dubey. 1999a. The genus *Hammondia* is paraphyletic. *Parasitology* **118** (Pt 4):357-362.
- Ellis, J. T., D. McMillan, C. Ryce, S. Payne, R. Atkinson, and P. A. Harper. 1999b. 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., K. Luton, P. R. Baverstock, P. J. Brindley, K. A. Nimmo, and A. M. Johnson. 1994. The phylogeny of *Neospora caninum*. *Mol.Biochem.Parasitol.* **64**:303-311.

- Eperon, S., K. Bronnimann, A. Hemphill, and B. Gottstein. 1999. Susceptibility of B-cell deficient C57BL/6 (microMT) mice to *Neospora caninum* infection. *Parasite Immunol.* **21**:225-236.
- Esteban-Redondo, I. and E. A. Innes. 1998. Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of sheep orally challenged with different doses of oocysts. *Int.J.Parasitol.* **28**:1459-1466.
- Estes, D. M., A. Hirano, V. T. Heussler, D. A. Dobbelaere, and W. C. Brown. 1995. Expression and biological activities of bovine interleukin 4: effects of recombinant bovine interleukin 4 on T cell proliferation and B cell differentiation and proliferation in vitro. *Cell Immunol.* **163**:268-279.
- Ezio, F. and T. Anna. 2003. Antibodies to *Neospora caninum* in European brown hare (*Lepus europaeus*). *Vet.Parasitol.* **115**:75-78.
- Ferre, I., G. Álvarez-García, E. Collantes-Fernández, F.J. Pérez-Zaballos, L.M. Ortega-Mora. 2003. Diagnóstico de la infección y del aborto causado por *Neospora caninum* en los bovinos. *Producción Animal.* **190**: 52-63.
- Forar, A. L., J. M. Gay, D. D. Hancock, and C. C. Gay. 1995. Fetal loss frequency in ten Holstein dairy herds. *Theriogenology* **45**:1505-1513.
- French, N. P., D. Clancy, H. C. Davison, and A. J. Trees. 1999. Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control. *Int.J.Parasitol.* **29**:1691-1704.
- Fuchs, N., S. Sonda, B. Gottstein, and A. Hemphill. 1998. Differential expression of cell surface- and dense granule-associated *Neospora caninum* proteins in tachyzoites and bradyzoites. *J.Parasitol.* **84**:753-758.
- García-Vazquez, Z., C. Cruz-Vázquez, L. Medina-Espinoza, D. García-Tapia, and B. Chavarria-Martínez. 2002. Serological survey of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Aguascalientes, Mexico. *Vet.Parasitol.* **106**:115-120.
- Gazzinelli, R. T., M. Wysocka, S. Hieny, T. Scharton-Kersten, A. Cheever, R. Kuhn, W. Müller, G. Trinchieri, and A. Sher. 1996. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J.Immunol.* **157**:798-805.
- Gjesdal, F. 1969. Age determination of bovine foetuses. *Acta vet. Scand.* **10**: 197-218.
- Gondim, L. F. P., L. Gao, and M. M. McAllister. 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., A. M. Pinheiro, P. O. Santos, E. E. Jesus, M. B. Ribeiro, H. S. Fernandes, M. A. Almeida, S. M. Freire, R. Meyer, and M. M. McAllister. 2001. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. *Vet.Parasitol.* **101**:1-7.
- Gondim, L. F., I. F. Sartor, M. Hasegawa, and I. Yamane. 1999. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. *Vet.Parasitol.* **86**:71-75.
- González, L., D. Buxton, R. Atxaerandio, G. Aduriz, S. Maley, J. C. Marco, and L. A. Cuervo. 1999. Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain. *Vet.Rec.* **144**:145-150.
- Gottstein, B., B. Hentrich, R. Wyss, B. Thur, A. Busato, K. D. Stark, and N. Müller. 1998. Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. *Int.J.Parasitol.* **28**:679-691.
- Gottstein, B., S. Eperon, W. J. Dai, A. Cannas, A. Hemphill, and G. Greif. 2001. Efficacy of toltrazuril and ponazuril against experimental *Neospora caninum* infection in mice. *Parasitol.Res.* **87**:43-48.
- Guarino, A., G. Fusco, G. Savini, G. Di Francesco, and G. Cringoli. 2000. Neosporosis in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Southern Italy. *Vet.Parasitol.* **91**:15-21.

- Guo, Z. G. and A. M. Johnson.** 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., D. J. L. Williams, D. F. Kelly, J. W. McGarry, F. Guy, C. Björkman, R. F. Smith, and A. J. Trees.** 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.
- Harling-Berg, C. J., T. J. Park, and P. M. Knopf.** 1999. Role of the cervical lymphatics in the Th2-type hierarchy of CNS immune regulation. *J.Neuroimmunol.* **101**:111-127.
- Hassig, M. and B. Gottstein.** 2002. Epidemiological investigations of abortions due to *Neospora caninum* on Swiss dairy farms. *Vet.Rec.* **150**:538-542.
- Hattel, A. L., M. D. Castro, J. D. Gummo, D. Weinstock, J. A. Reed, and J. P. Dubey.** 1998. Neosporosis-associated bovine abortion in Pennsylvania. *Vet.Parasitol.* **74**:307-313.
- Hay, W. H., L. G. Shell, D. S. Lindsay, and J. P. Dubey.** 1990. Diagnosis and treatment of *Neospora caninum* infection in a dog. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **197**:87-89.
- Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak, and P. M. Williams.** 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **6**:986-994.
- Hemphill, A.** 1999. The host-parasite relationship in neosporosis. *Adv.Parasitol.* **43**:47-104.
- Hemphill, A. and B. Gottstein .** 1996. Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. *Parasitol.Res.* **82**:497-504.
- Hemphill, A., B. Gottstein, and H. Kaufmann.** 1996. Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. *Parasitology* **112 ( Pt 2)**:183-197.
- Hemphill, A., N. Fuchs, S. Sonda, and A. Hehl.** 1999. The antigenic composition of *Neospora caninum*. *Int.J.Parasitol.* **29**:1175-1188.
- Hemphill, A., N. Fuchs, S. Sonda, B. Gottstein, and B. Hentrich.** 1997a. Identification and partial characterization of a 36 kDa surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. *Parasitology* **115 ( Pt 4)**:371-380.
- Hemphill, A., N. Gajendran, S. Sonda, N. Fuchs, B. Gottstein, B. Hentrich, and M. Jenkins.** 1998. Identification and characterisation of a dense granule-associated protein in *Neospora caninum* tachyzoites. *Int.J.Parasitol.* **28**:429-438.
- Hemphill, A., R. Felleisen, B. Connolly, B. Gottstein, B. Hentrich, and N. Müller.** 1997b. Characterization of a cDNA-clone encoding Nc-p43, a major *Neospora caninum* tachyzoite surface protein. *Parasitology* **115 ( Pt 6)**:581-590.
- Hermesen, C. C., D. S. Telgt, E. H. Linders, L. A. van de Locht, W. M. Eling, E. J. Mensink, and R. W. Sauerwein.** 2001. Detection of *Plasmodium falciparum* malaria parasites in vivo by real-time quantitative PCR. *Mol.Biochem.Parasitol.* **118**:247-251.
- Hernández, J., C. Risco, and A. Donovan.** 2001. Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **219**:632-635.
- Heydorn, A. O. and H. Mehlhorn.** 2002a. A re-evaluation of *Neospora* and *Hammondia* spp. *Trends Parasitol.* **18** :246.
- Heydorn, A. O. and H. Mehlhorn.** 2002b. *Neospora caninum* is an invalid species name: an evaluation of facts and statements. *Parasitol.Res.* **88**:175-184.
- Hietala, S. K. and M. C. Thurmond.** 1999. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. *Int.J.Parasitol.* **29**:1669-1676.

- Hilali, M., S. Romand, P. Thulliez, O. C. Kwok, and J. P. Dubey.** 1998. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in sera from camels from Egypt. *Vet.Parasitol.* **75**:269-271.
- Ho, M. S., B. C. Barr, A. E. Marsh, M. L. Anderson, J. D. Rowe, A. F. Tarantal, A. G. Hendrickx, K. Sverlow, J. P. Dubey, and P. A. Conrad.** 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., B. C. Barr, A. F. Tarantal, L. T. Lai, A. G. Hendrickx, A. E. Marsh, K. W. Sverlow, A. E. Packham, and P. A. Conrad.** 1997a. Detection of *Neospora* from tissues of experimentally infected rhesus macaques by PCR and specific DNA probe hybridization. *J.Clin.Microbiol.* **35**:1740-1745.
- Ho, M. S., B. C. Barr, J. D. Rowe, M. L. Anderson, K. W. Sverlow, A. Packham, A. E. Marsh, and P. A. Conrad.** 1997b. Detection of *Neospora* sp. from infected bovine tissues by PCR and probe hybridization. *J.Parasitol.* **83** :508-514.
- Hobson, J. C., T. F. Duffield, D. Kelton, K. Lissemore, S. K. Hietala, K. E. Leslie, B. McEwen, G. Cramer, and A. S. Peregrine.** 2002. *Neospora caninum* serostatus and milk production of Holstein cattle. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **221**:1160-1164.
- Holland, P. M., R. D. Abramson, R. Watson, and D. H. Gelfand.** 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**:7276-7280.
- Holmdahl, O. J. and J. G. Mattsson.** 1996. Rapid and sensitive identification of *Neospora caninum* by in vitro amplification of the internal transcribed spacer 1. *Parasitology* **112 ( Pt 2)**:177-182.
- Holmdahl, O. J., J. G. Mattsson, A. Uggla, and K. E. Johansson.** 1994. The phylogeny of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* based on ribosomal RNA sequences. *FEMS Microbiol.Lett.* **119**:187-192.
- Hondowicz, B. and P. Scott.** 2002. Influence of parasite load on the ability of type 1 T cells to control *Leishmania major* infection. *Infect.Immun.* **70**:498-503.
- Howe, D. K. and L. D. Sibley.** 1997a. Development of molecular genetics for *Neospora caninum*: A complementary system to *Toxoplasma gondii*. *Methods* **13**:123-133.
- Howe, D. K., A. C. Crawford, D. Lindsay, and L. D. Sibley.** 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., C. Mercier, M. Messina, and L. D. Sibley.** 1997b. Expression of *Toxoplasma gondii* genes in the closely-related apicomplexan parasite *Neospora caninum*. *Mol.Biochem.Parasitol.* **86**:29-36.
- Howe, D. K., K. Tang, P. A. Conrad, K. Sverlow, J. P. Dubey, and L. D. Sibley.** 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., B. L. Ljungstrom, A. Uggla, and C. Björkman.** 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., A. G. Andrianarivo, C. Björkman, D. J. Williams, and P. A. Conrad.** 2002. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends Parasitol.* **18**:497-504.
- Innes, E. A., Buxton, D., Eperon, S., Gottstein, B.** 2000. 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., S. E. Wright, S. Maley, A. Rae, A. Schock, E. Kirvar, P. Bartley, C. Hamilton, I. M. Carey, and D. Buxton.** 2001. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int.J.Parasitol.* **31**:1523-1534.

- Innes, E. A., W. R. Panton, J. Marks, A. J. Trees, J. Holmdahl, and D. Buxton. 1995. Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of 3H uracil. *J.Comp Pathol.* **113**:95-100.
- Jakubek, E. B., C. Brojer, C. Regnersen, A. Uggla, G. Schares, and C. Björkman. 2001. Seroprevalences of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Swedish red foxes (*Vulpes vulpes*). *Vet.Parasitol.* **102**:167-172.
- Jardine, J. E. 1996. The ultrastructure of bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum* in dogs: absence of distinguishing morphological features between parasites of canine and bovine origin. *Vet.Parasitol.* **62**:231-240.
- Jardine, J. E. and B. H. Wells. 1995. Bovine neosporosis in Zimbabwe. *Vet.Rec.* **137**:223.
- Jauregui, L. H., J. Higgins, D. Zarlenga, J. P. Dubey, and J. K. Lunney. 2001. Development of a real-time PCR assay for detection of *Toxoplasma gondii* in pig and mouse tissues. *J.Clin.Microbiol.* **39**:2065-2071.
- Jenkins, M. C., J. A. Caver, C. Björkman, T. C. Anderson, S. Romand, B. Vinyard, A. Uggla, P. Thulliez, and J. P. Dubey. 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., W. Wouda, and J. P. Dubey. 1997. Serological response over time to recombinant *Neospora caninum* antigens in cattle after a neosporosis-induced abortion. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* **4**:270-274.
- Jenkins, M., T. Baszler, C. Björkman, G. Schares, and D. Williams. 2002. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Int.J.Parasitol.* **32**:631-636.
- Jensen, A. M., C. Björkman, A. M. Kjeldsen, A. Wedderkopp, C. Willadsen, A. Uggla, and P. Lind. 1999. Associations of *Neospora caninum* seropositivity with gestation number and pregnancy outcome in Danish dairy herds. *Prev.Vet.Med.* **40**:151-163.
- Jensen, L., T. K. Jensen, P. Lind, S. A. Henriksen, A. Uggla, and V. Bille-Hansen. 1998. Experimental porcine neosporosis. *APMIS* **106**:475-482.
- Joly, E., L. Mucke, and M. B. Oldstone. 1991. Viral persistence in neurons explained by lack of major histocompatibility class I expression. *Science* **253**:1283-1285.
- Kasper, L. H. and I. A. Khan. 1998. Antigen-specific CD8+ T cells protect against lethal toxoplasmosis in mice infected with *Neospora caninum*. *Infect.Immun.* **66**:1554-1560.
- Kaufmann, H., M. Yamage, I. Roditi, D. Dobbelaere, J. P. Dubey, O. J. Holmdahl, A. Trees, and B. Gottstein. 1996. Discrimination of *Neospora caninum* from *Toxoplasma gondii* and other apicomplexan parasites by hybridization and PCR. *Mol.Cell Probes* **10**:289-297.
- Keller, N., A. Naguleswaran, A. Cannas, N. Vonlaufen, M. Bienz, C. Björkman, W. Böhne, and A. Hemphill. 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., J. D. Schwartzman, S. Fonseka, and L. H. Kasper. 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., H. J. Sohn, W. S. Hwang, E. K. Hwang, Y. H. Jean, I. Yamane, and D. Y. Kim. 2000. In vitro isolation and characterization of bovine *Neospora caninum* in Korea. *Vet.Parasitol.* **90**:147-154.
- Kim, J. H., J. K. Lee, B. C. Lee, B. K. Park, H. S. Yoo, W. S. Hwang, N. R. Shin, M. S. Kang, Y. H. Jean, H. J. Yoon, S. K. Kang, and D. Y. Kim. 2002a. Diagnostic Survey of Bovine Abortion in Korea: With Special Emphasis on *Neospora caninum*. *J.Vet.Med.Sci.* **64**:1123-1127.

- Kim, J. H., J. K. Lee, E. K. Hwang, and D. Y. Kim.** 2002b. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in Korean native beef cattle. *J.Vet.Med.Sci.* **64**:941-943.
- Kim, J. T., J. Y. Park, H. S. Seo, H. G. Oh, J. W. Noh, J. H. Kim, D. Y. Kim, and H. J. Youn.** 2002. In vitro antiprotozoal effects of artemisinin on *Neospora caninum*. *Vet.Parasitol.* **103**:53-63.
- Klein, F., S. K. Hietala, H. Berthet, P. Very, and D. Gradinaru.** 1997. *Neospora caninum*: enquête sérologique sur les avortements des bovins normands et charolais. *Le point Vétérinaire* **28**:65-68.
- Kobayashi, A., S. Katagiri, T. Kimura, K. Ochiai, and T. Umemura.** 2002. Steroid hormones do not reactivate *Neospora caninum* in ovariectomized mice. *J.Vet.Med.Sci.* **64**:773-777.
- Kobayashi, Y., M. Yamada, Y. Omata, T. Koyama, A. Saito, T. Matsuda, K. Okuyama, S. Fujimoto, H. Furuoka, and T. Matsui.** 2001. Naturally-occurring *Neospora caninum* infection in an adult sheep and her twin fetuses. *J.Parasitol.* **87**:434-436.
- Koyama, T., Y. Kobayashi, Y. Omata, M. Yamada, H. Furuoka, R. Maeda, T. Matsui, A. Saito, and T. Mikami.** 2001. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a pregnant sheep. *J.Parasitol.* **87**:1486-1488.
- Kritzner, S., H. Sager, J. Blum, R. Krebber, G. Greif, and B. Gottstein.** 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.
- Kupferschmidt, O., D. Kruger, T. K. Held, H. Ellerbrok, W. Siegert, and K. Janitschke.** 2001. Quantitative detection of *Toxoplasma gondii* DNA in human body fluids by TaqMan polymerase chain reaction. *Clin.Microbiol.Infect.* **7**:120-124.
- Kwon, H. J., J. H. Kim, M. Kim, J. K. Lee, W. S. Hwang, and D. Y. Kim.** 2003. Anti-parasitic activity of depudecin on *Neospora caninum* via the inhibition of histone deacetylase. *Vet.Parasitol.* **112**:269-276.
- Lally, N. C., M. C. Jenkins, and J. P. Dubey.** 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., M. C. Jenkins, and J. P. Dubey.** 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.
- Landmann, J. K., D. Jillella, P. J. O'Donoghue, and M. R. McGowan.** 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.
- Liew, F.Y.** 2001. Th1 and Th2 cells: a historical perspective. *Nature reviews Immunology.* **2**: 55-60.
- Liddell, S., M. C. Jenkins, and J. P. Dubey.** 1999a. A competitive PCR assay for quantitative detection of *Neospora caninum*. *Int.J.Parasitol.* **29**:1583-1587.
- Liddell, S., M. C. Jenkins, and J. P. Dubey.** 1999b. Vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice determined by polymerase chain reaction detection. *J.Parasitol.* **85**:550-555.
- Liddell, S., M. C. Jenkins, C. M. Collica, and J. P. Dubey.** 1999c. Prevention of vertical transfer of *Neospora caninum* in BALB/c mice by vaccination. *J.Parasitol.* **85**:1072-1075.
- Lin, M. H., T. C. Chen, T. T. Kuo, C. C. Tseng, and C. P. Tseng.** 2000. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *J.Clin.Microbiol.* **38**:4121-4125.
- Lindsay, D. S. and J. P. Dubey.** 1989a. Evaluation of anti-coccidial drugs' inhibition of *Neospora caninum* development in cell cultures. *J.Parasitol.* **75**:990-992.
- Lindsay, D. S. and J. P. Dubey.** 1989b. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *Am.J.Vet.Res.* **50**:1981-1983.

- Lindsay, D. S. and J. P. Dubey. 1989c. In vitro development of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) from dogs. *J.Parasitol.* **75**:163-165.
- Lindsay, D. S. and J. P. Dubey. 1989d. *Neospora caninum* (Protozoa: apicomplexa) infections in mice. *J.Parasitol.* **75**:772-779.
- Lindsay, D. S. and J. P. Dubey. 1990a. Effects of sulfadiazine and amprolium on *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) infections in mice. *J.Parasitol.* **76**:177-179.
- Lindsay, D. S. and J. P. Dubey. 1990b. Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa). *J.Parasitol.* **76**:410-413.
- Lindsay, D. S. and J. P. Dubey. 1990c. *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) infections in rats. *Can.J.Zool.* **68**:1595-1599.
- Lindsay, D. S., B. L. Blagburn, and J. P. Dubey. 1992. Factors affecting the survival of *Neospora caninum* bradyzoites in murine tissues. *J.Parasitol.* **78**:70-72.
- Lindsay, D. S., C. A. Speer, M. A. Toivio-Kinnucan, J. P. Dubey, and B. L. Blagburn. 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., D. M. Ritter, and D. Brake. 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., E. J. Kelly, R. D. McKown, F. J. Stein, J. Plozer, J. Herman, B. L. Blagburn, and J. P. Dubey . 1996a. 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., H. Steinberg, R. R. Dubielzig, S. D. Semrad, D. M. Konkle, P. E. Miller, and B. L. Blagburn. 1996b. Central nervous system neosporosis in a foal. *J.Vet.Diagn.Invest* **8**:507-510.
- Lindsay, D. S., J. M. Butler, and B. L. Blagburn. 1997. Efficacy of decoquinate against *Neospora caninum* tachyzoites in cell cultures. *Vet.Parasitol.* **68**:35-40.
- Lindsay, D. S., J. M. Butler, N. S. Rippey, and B. L. Blagburn. 1996c. 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., J. P. Dubey, and R. B. Duncan. 1999a. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Vet.Parasitol.* **82**:327-333.
- Lindsay, D. S., J. P. Dubey, and T. J. Kennedy. 2000. Determination of the activity of ponazuril against *Sarcocystis neurona* in cell cultures. *Vet.Parasitol.* **92**:165-169.
- Lindsay, D. S., J. Spencer, C. Rupprecht, and B. L. Blagburn. 2001b. Prevalence of agglutinating antibodies to *Neospora caninum* in raccoons, *Procyon lotor*. *J.Parasitol.* **87**:1197-1198.
- Lindsay, D. S., N. S. Rippey, R. A. Cole, L. C. Parsons, J. P. Dubey, R. R. Tidwell, and B. L. Blagburn. 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., N. S. Rippey, T. A. Powe, E. A. Sartin, J. P. Dubey, and B. L. Blagburn. 1995a. 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., S. D. Lenz, B. L. Blagburn, and D. A. Brake. 1999b. Characterization of temperature-sensitive strains of *Neospora caninum* in mice. *J.Parasitol.* **85**:64-67.

- Lindsay, D. S., S. D. Lenz, R. A. Cole, J. P. Dubey, and B. L. Blagburn. 1995b. Mouse model for central nervous system *Neospora caninum* infections. *J.Parasitol.* **81**:313-315.
- Lindsay, D. S., S. J. Upton, and J. P. Dubey. 1999c. A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. *Int.J.Parasitol.* **29**:1521-1523.
- Locatelli-Dittrich, R., R. R. Richartz, M. E. Joineau, R. D. Pinckney, R. S. de Sousa, L. C. Leite, and V. Thomaz-Soccol. 2003. Isolation of *Neospora caninum* from a blind calf in Parana, southern Brazil. *Vet.Rec.* **153**:366-367.
- Locatelli-Dittrich, R., V. T. Soccol, R. R. Richartz, M. E. Gasino-Joineau, R. Vinne, and R. D. Pinckney. 2001. Serological diagnosis of neosporosis in a herd of dairy cattle in southern Brazil. *J.Parasitol.* **87**:1493-1494.
- Long, M. T. and T. V. Baszler. 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. and T. V. Baszler. 1996. Fetal loss in BALB/C mice infected with *Neospora caninum*. *J.Parasitol.* **82**:608-611.
- Long, M. T., T. V. Baszler, and B. A. Mathison. 1998. Comparison of intracerebral parasite load, lesion development, and systemic cytokines in mouse strains infected with *Neospora caninum*. *J.Parasitol.* **84**:316-320.
- Longo, M. C., M. S. Berninger, and J. L. Hartley. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* **93**:125-128.
- Louie, K., K. W. Sverlow, B. C. Barr, M. L. Anderson, and P. A. Conrad. 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.
- Louie, K., R. Nordhausen, T. W. Robinson, B. C. Barr, and P. A. Conrad. 2002. Characterization of *Neospora caninum* protease, NcSUB1 (NC-P65), with rabbit anti-N54. *J.Parasitol.* **88**:1113-1119.
- Lovett, J. L., D. K. Howe, and L. D. Sibley. 2000. Molecular characterization of a thrombospondin-related anonymous protein homologue in *Neospora caninum*. *Mol.Biochem.Parasitol.* **107**:33-43.
- Lundén, A., J. Marks, S. W. Maley, and E. A. Innes. 1998. Cellular immune responses in cattle experimentally infected with *Neospora caninum*. *Parasite Immunol.* **20**:519-526.
- Lundén, A., S. Wright, J. E. Allen, and D. Buxton. 2002. Immunisation of mice against neosporosis. *Int.J.Parasitol.* **32**:867-876.
- Luo, W., F. Aosai, M. Ueda, K. Yamashita, K. Shimizu, S. Sekiya, and A. Yano. 1997. Kinetics in parasite abundance in susceptible and resistant mice infected with an avirulent strain of *Toxoplasma gondii* by using quantitative competitive PCR. *J.Parasitol.* **83**:1070-1074.
- Macaldowie, C., S. W. Maley, S. Wright, P. Bartley, I. Esteban-Redondo, D. Buxton, E. A. 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., P. G. Vigo, M. Fabbi, M. Colombo, C. Bandi, and C. Genchi. 1999. Isolation of a bovine *Neospora* from a newborn calf in Italy. *Vet.Rec.* **144**:456.
- Mainar-Jaime, R. C., B. Berzal-Herranz, P. Arias, and F. A. Rojo-Vazquez. 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., M. C. Thurmond, B. Berzal-Herranz, and S. K. Hietala. 1999. Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain. *Vet.Rec.* **145**:72-75.

- Maley, S. W., D. Buxton, A. G. Rae, S. E. Wright, A. Schock, P. M. Bartley, I. Esteban-Redondo, C. Swales, C. M. Hamilton, J. Sales, and E. A. Innes. 2003. The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at mid-gestation. *J.Comp Pathol.* **129**:186-195.
- Maley, S. W., D. Buxton, K. M. Thomson, C. E. Schriefer, and E. A. Innes. 2001. Serological analysis of calves experimentally infected with *Neospora caninum*: a 1-year study. *Vet.Parasitol.* **96**:1-9.
- Marks, J., A. Lundén, D. Harkins, and E. Innes. 1998. Identification of *Neospora* antigens recognized by CD4+ T cells and immune sera from experimentally infected cattle. *Parasite Immunol.* **20**:303-309.
- Marsh, A. E., B. C. Barr, A. E. Packham, and P. A. Conrad. 1998. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). *J.Parasitol.* **84**:983-991.
- Marsh, A. E., B. C. Barr, J. Madigan, J. Lakritz, R. Nordhausen, and P. A. Conrad. 1996. Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **209**:1907-1913.
- Matyszak, M. K. 1998. Inflammation in the CNS: balance between immunological privilege and immune responses. *Prog.Neurobiol.* **56**:19-35.
- McAllister, M. M., A. M. McGuire, W. R. Jolley, D. S. Lindsay, A. J. Trees, and R. H. Stobart. 1996a. Experimental neosporosis in pregnant ewes and their offspring. *Vet.Pathol.* **33**:647-655.
- McAllister, M. M., C. Björkman, R. Anderson-Sprecher, and D. G. Rogers. 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., E. M. Huffman, S. K. Hietala, P. A. Conrad, M. L. Anderson, and M. D. Salman. 1996b. 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., J. P. Dubey, D. S. Lindsay, W. R. Jolley, R. A. Wills, and A. M. McGuire. 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int.J.Parasitol.* **28**:1473-1478.
- McGarry, J. W., C. M. Stockton, D. J. Williams, and A. J. Trees. 2003. Protracted shedding of oocysts of *Neospora caninum* by a naturally infected foxhound. *J.Parasitol.* **89**:628-630.
- McGuire, A. M., M. M. McAllister, and W. R. Jolley. 1997a. Separation and cryopreservation of *Neospora caninum* tissue cysts from murine brain. *J.Parasitol.* **83**:319-321.
- McGuire, A. M., M. M. McAllister, W. R. Jolley, and R. C. Anderson-Sprecher. 1997b. A protocol for the production of *Neospora caninum* tissue cysts in mice. *J.Parasitol.* **83**:647-651.
- McLeod, R., D. Mack, and C. Brown. 1991. *Toxoplasma gondii*--new advances in cellular and molecular biology. *Exp.Parasitol.* **72**:109-121.
- McNamee, P. T., A. J. Trees, F. Guy, D. Moffett, and D. Kilpatrick. 1996. Diagnosis and prevalence of neosporosis in cattle in Northern Ireland. *Vet.Rec.* **138**:419-420.
- Mehlhorn, H. and A. O. Heydorn. 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.
- Miller, C. M., H. E. Quinn, P. A. Windsor, and J. T. Ellis. 2002. Characterisation of the first Australian isolate of *Neospora caninum* from cattle. *Aust.Vet.J.* **80**:620-625.
- Modry, D., P. Vaclavek, B. Koudela, and J. R. Slapeta. 2001. Placentophagia--an alternative way for horizontal transmission of *Neospora caninum* in cattle? *Trends Parasitol.* **17**:573-575.
- Moen, A. R., W. Wouda, M. F. Mul, E. A. Graat, and T. van Werven. 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., C. M. Campero, A. C. Odeon, M. A. Posso, D. Cano, M. R. Leunda, W. Basso, M. C. Venturini, and E. Spath. 2002. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. *Vet.Parasitol.* **107**:303-316.
- Moore, D. P., M. G. Draghi, C. M. Campero, B. Cetra, A. C. Odeon, E. Alcaraz, and E. A. Spath. 2003. Serological evidence of *Neospora caninum* infections in beef bulls in six counties of the Corrientes province, Argentina. *Vet.Parasitol.* **114**:247-252.
- Morales, E., F. J. Trigo, F. Ibarra, E. Puente, and M. Santacruz. 2001a. Neosporosis in Mexican dairy herds: lesions and immunohistochemical detection of *Neospora caninum* in fetuses. *J.Comp Pathol.* **125**:58-63.
- Morales, E., F. J. Trigo, F. Ibarra, E. Puente, and M. Santacruz. 2001b. Seroprevalence study of bovine neosporosis in Mexico. *J.Vet.Diagn.Invest* **13**:413-415.
- Morrison, D. A. 2002. How to improve statistical analysis in parasitology research publications. *Int.J.Parasitol.* **32**:1065-1070.
- Mugridge, N. B., D. A. Morrison, A. R. Heckerroth, A. M. Johnson, and A. M. Tenter. 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., D. A. Morrison, T. Jakel, A. R. Heckerroth, A. M. Tenter, and A. M. Johnson. 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., N. Vonlaufen, C. Gianinazzi, S. L. Leib, and A. Hemphill. 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.
- Müller, N., V. Zimmermann, B. Hentrich, and B. Gottstein. 1996. Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassay. *J.Clin.Microbiol.* **34**:2850-2852.
- Naguleswaran, A., A. Cannas, N. Keller, N. Vonlaufen, C. Björkman, and A. Hemphill. 2002. Vero cell surface proteoglycan interaction with the microneme protein NcMIC(3) mediates adhesion of *Neospora caninum* tachyzoites to host cells unlike that in *Toxoplasma gondii*. *Int.J.Parasitol.* **32**:695-704.
- Naguleswaran, A., A. Cannas, N. Keller, N. Vonlaufen, G. Schares, F. J. Conraths, C. Björkman, and A. Hemphill. 2001. *Neospora caninum* microneme protein NcMIC3: secretion, subcellular localization, and functional involvement in host cell interaction. *Infect.Immun.* **69**:6483-6494.
- Naguleswaran, A., N. Müller, and A. Hemphill. 2003. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*: a novel adhesion/invasion assay reveals distinct differences in tachyzoite-host cell interactions. *Exp.Parasitol.* **104**:149-158.
- Nietfeld, J. C., J. P. Dubey, M. L. Anderson, M. C. Libal, M. J. Yaeger, and R. D. Neiger. 1992. *Neospora*-like protozoan infection as a cause of abortion in dairy cattle. *J.Vet.Diagn.Invest* **4**:223-226.
- Nishikawa, Y., A. Iwata, H. Nagasawa, K. Fujisaki, H. Otsuka, and T. Mikami. 2001a. 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., H. Ikeda, S. Fukumoto, X. Xuan, H. Nagasawa, H. Otsuka, and T. Mikami. 2000a. Immunization of dogs with a canine herpesvirus vector expressing *Neospora caninum* surface protein, NcSRS2. *Int.J.Parasitol.* **30**:1167-1171.
- Nishikawa, Y., K. Tragoolpua, N. Inoue, L. Makala, H. Nagasawa, H. Otsuka, and T. Mikami. 2001b. 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., M. Mishima, H. Nagasawa, I. Igarashi, K. Fujisaki, H. Otsuka, and T. Mikami. 2001c. Interferon-gamma-induced apoptosis in host cells infected with *Neospora caninum*. *Parasitology* **123**:25-31.
- Nishikawa, Y., N. Inoue, L. Makala, and H. Nagasawa. 2003. A role for balance of interferon-gamma and interleukin-4 production in protective immunity against *Neospora caninum* infection. *Vet.Parasitol.* **116**:175-184.
- Nishikawa, Y., N. Inoue, X. Xuan, H. Nagasawa, I. Igarashi, K. Fujisaki, H. Otsuka, and T. Mikami. 2001d. Protective efficacy of vaccination by recombinant vaccinia virus against *Neospora caninum* infection. *Vaccine* **19**:1381-1390.
- Nishikawa, Y., T. Mikami, and H. Nagasawa. 2002. Vaccine development against *Neospora caninum* infection. *J.Vet.Med.Sci.* **64**:1-5.
- Nishikawa, Y., X. Xuan, H. Nagasawa, I. Igarashi, K. Fujisaki, H. Otsuka, and T. Mikami. 2000b. Monoclonal antibody inhibition of *Neospora caninum* tachyzoite invasion into host cells. *Int.J.Parasitol.* **30**:51-58.
- Nishikawa, Y., X. Xuan, H. Nagasawa, I. Igarashi, K. Fujisaki, H. Otsuka, and T. Mikami. 2001e. Prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice by recombinant vaccinia virus carrying NcSRS2 gene. *Vaccine* **19**:1710-1716.
- Nishikawa, Y., Y. Kousaka, K. Tragoolpua, X. Xuan, L. Makala, K. Fujisaki, T. Mikami, and H. Nagasawa. 2001f. 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.
- Ogino, H., E. Watanabe, S. Watanabe, H. Agawa, M. Narita, M. Haritani, and K. Kawashima. 1992. Neosporosis in the aborted fetus and newborn calf. *J.Comp Pathol.* **107**:231-237.
- O'Handley, R., S. Liddell, C. Parker, M. C. Jenkins, and J. P. Dubey. 2002. Experimental infection of sheep with *Neospora caninum* oocysts. *J.Parasitol.* **88**:1120-1123.
- Ooi, H. K., C. C. Huang, C. H. Yang, and S. H. Lee. 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.
- Ortega-Mora, L. M., I. Ferre, I. del Pozo, A. Caetano-da-Silva, E. Collantes-Fernández, J. Regidor-Cerrillo, C. Ugarte-Garagalza, and G. Aduriz. 2003. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. *Vet.Parasitol.* **117**:301-308.
- Osawa, T., J. Wastling, L. Acosta, C. Ortellado, J. Ibarra, and E. A. Innes. 2002. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Paraguay. *Vet.Parasitol.* **110**:17-23.
- 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.
- Osorio, F. A. and D. E. Reed. 1983. Experimental inoculation of cattle with bovine herpesvirus-4: evidence for a lymphoid-associated persistent infection. *Am.J.Vet.Res.* **44**:975-980.
- Osorio, F. A., D. E. Reed, and D. L. Rock. 1982. Experimental infection of rabbits with bovine herpesvirus-4: acute and persistent infection. *Vet.Microbiol.* **7**:503-513.
- Otter, A., M. Jeffrey, I. B. Griffiths, and J. P. Dubey. 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., F. Klein, C. Osdoit, H. O. Mohammed, A. Touratier, M. Sanaa, and J. P. Mialot. 1999. Estimation of *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle from Normandy, France. *Vet.Res.* **30**:531-538.
- Paré, J., G. Fecteau, M. Fortin, and G. Marsolais. 1998. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **213**:1595-1598.

- Paré, J., M. C. Thurmond, and S. K. Hietala.** 1996. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhoo mortality. *Can.J.Vet.Res.* **60**:133-139.
- Paré, J., M. C. Thurmond, and S. K. Hietala.** 1997. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J.Parasitol.* **83**:82-87.
- Paré, J., S. K. Hietala, and M. C. Thurmond.** 1995. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora sp.* infection in cattle. *J.Vet.Diagn.Invest* **7**:352-359.
- Payne, S. and J. Ellis.** 1996. Detection of *Neospora caninum* DNA by the polymerase chain reaction. *Int.J.Parasitol.* **26**:347-351.
- Pereira-Bueno, J., A. Quintanilla-Gozal, V. Pérez-Pérez, A. Espí-Felgueroso, G. Álvarez-García, E. Collantes-Fernández, and L. M. Ortega-Mora.** 2003. Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. *Vet.Parasitol.* **111**:143-152.
- Pereira-Bueno, J., Quintanilla-Gozal, 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**: 906-909.
- Pérez-Zaballos, F. J, E. Collantes-Fernández, A. Rodríguez-Bertos, G. Álvarez-García, M. Gómez-Bautista, and L.M. Ortega-Mora.** 2002. Comparison of the pathogenic diversity among *Neospora caninum* isolates in a mouse model. Paris, France 23-27 Julio.
- Peters, M., E. Lutkefels, A. R. Heckeroth, and G. Schares.** 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., F. Wagner, and G. Schares.** 2000. Canine neosporosis: clinical and pathological findings and first isolation of *Neospora caninum* in Germany. *Parasitol.Res.* **86**:1-7.
- Peters, M., P. Wohlsein, A. Knieriem, and G. Schares.** 2001b. *Neospora caninum* infection associated with stillbirths in captive antelopes (*Tragelaphus imberbis*). *Vet.Parasitol.* **97**:153-157.
- Pfeiffer, D. U., N. B. Williamson, M. P. Reichel, J. J. Wichtel, and W. R. Teague.** 2002. A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on a dairy farm in New Zealand. *Prev.Vet.Med.* **54**:11-24.
- Pierrgili, F. D., L. Rosignoli, G. Ricci, A. Moretti, P. Pasquali, and G. A. Polidori.** 2000. *Neospora caninum* infection in a clinically healthy calf: parasitological study and serological follow-up. *J.Vet.Med.B Infect.Dis.Vet.Public Health* **47**:47-53.
- Pitel, P. H., S. Pronost, G. Chatagnon, D. Tainturier, G. Fortier, and J. J. Ballet.** 2001a. Neosporosis in bovine dairy herds from the west of France: detection of *Neospora caninum* DNA in aborted fetuses, seroepidemiology of *N. caninum* in cattle and dogs. *Vet.Parasitol.* **102**:269-277.
- Pitel, P. H., S. Pronost, S. Romand, P. Thulliez, G. Fortier, and J. J. Ballet.** 2001b. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in horses in France. *Equine Vet.J.* **33**:205-207.
- Pope, G. S., S. K. Gupta, and I. B. Munro.** 1969. Progesterone levels in the systemic plasma of pregnant, cycling and ovariectomized cows. *J.Reprod.Fertil.* **20**:369-381.
- Quinn, H. E., C. M. Miller, C. Ryce, P. A. Windsor, and J. T. Ellis.** 2002a. Characterization of an outbred pregnant mouse model of *Neospora caninum* infection. *J.Parasitol.* **88**:691-696.
- Quinn, H. E., J. T. Ellis, and N. C. Smith.** 2002b. *Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy? *Trends Parasitol.* **18** :391-394.

- Quintanilla-Gonzalo, A., J. Pereira-Bueno, E. Tabarés, E. A. Innes, R. Gonzalez-Paniello, and L. M. Ortega-Mora.** 1999. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Spain. *Int.J.Parasitol.* **29**:1201-1208.
- Quintanilla-Gozal, A., J. Pereira-Bueno, A. Seijas-Carballedo, E. Costas, and L. M. Ortega-Mora.** 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**: 900-906.
- Quintanilla-Gozal, A., J. Pereira-Bueno, A. Seijas-Carballedo, R. De La Fuente, y L. M. Ortega-Mora.** 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-Gozal, A., J. Pereira-Bueno, V. Pérez-Pérez, and L. M. Ortega-Mora.** 1997. *Neospora caninum* infection in dairy herds in NW Spain. Proc VIIth Internat Coccidiosis Conf and EU COST820 Annual Workshop, Oxford, UK, 1-5 September, 78-79.
- Rebordosa X., G. Álvarez-García, E. Collantes, L.M. Ortega y C. Artigas.** 2000. Desarrollo de un ELISA indirecto para la valoración de anticuerpos contra *Neospora caninum*. Laboratorio Veterinario, Avedila 17, 5-8.
- Reichel, M. P.** 1998. Prevalence of *Neospora* antibodies in New Zealand dairy cattle and dogs. *N.Z.Vet.J.* **46**:38.
- Reichel, M. P.** 2000. *Neospora caninum* infections in Australia and New Zealand. *Aust.Vet.J.* **78**:258-261.
- Reichel, M. P. and J. M. Drake.** 1996. The diagnosis of *Neospora* abortions in cattle. *N.Z.Vet.J.* **44**:151-154.
- Reichel, M. P. and J. T. Ellis.** 2002. control options for *Neospora caninum* infections in cattle-current state of knowledge. *N.Z.Vet.J.* **50**:86-92.
- Risco-Castillo, V., A. Fernández-García, L.M. Ortega-Mora.** Comparative analysis of stressing agents towards a suitable system of *Neospora caninum* bradyzoite production in vitro. (Enviado al J. Parasitol.).
- Ritter, D. M., R. Kerlin, G. Sibert, and D. Brake.** 2002. Immune factors influencing the course of infection with *Neospora caninum* in the murine host. *J.Parasitol.* **88**:271-280.
- Roeder, P. L., M. Jeffrey, and M. P. Cranwell.** 1986. Pestivirus fetopathogenicity in cattle: changing sequelae with fetal maturation. *Vet.Rec.* **118**:44-48.
- Romero, J. J., E. Pérez, G. Dolz, and K. Frankena.** 2002. Factors associated with *Neospora caninum* serostatus in cattle of 20 specialised Costa Rican dairy herds. *Prev.Vet.Med.* **53**:263-273.
- Rousseau, D., I. Suffia, B. Ferrua, P. Philip, Y. Le Fichoux, and J. L. Kubar.** 1998. Prolonged administration of dexamethasone induces limited reactivation of visceral leishmaniasis in chronically infected BALB/c mice. *Eur.Cytokine Netw.* **9**:655-661.
- Sager, H., I. Fischer, K. Furrer, M. Strasser, A. Waldvogel, P. Boerlin, L. Audige, and B. Gottstein.** 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., M. Gloor, C. Björkman, S. Kritzner, and B. Gottstein.** 2003. Assessment of antibody avidity in aborting cattle by a somatic *Neospora caninum* tachyzoite antigen IgG avidity ELISA. *Vet.Parasitol.* **251**:1-10.
- Sambrook, J., E. J. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning. A laboratory manual, 2<sup>nd</sup> edition. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbord, New York.
- Sánchez, G. F., S. E. Morales, M. J. Martínez, and J. F. Trigo.** 2003. Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico. *Can.J.Vet.Res.* **67**:142-145.

- Sanderson, M. W., J. M. Gay, and T. V. Baszler. 2000. *Neospora caninum* seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the northwestern United States. *Vet.Parasitol.* **90**:15-24.
- Sasai, K., H. S. Lillehoj, A. Hemphill, H. Matsuda, Y. Hanioka, T. Fukata, E. Baba, and A. Arakawa. 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., H. Kondo, Y. Tomioka, C. Park, T. Morita, A. Shimada, and T. Umemura. 2000. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected adult dairy cow. *Vet.Parasitol.* **90**:247-252.
- Schares, G., A. Barwald, C. Staubach, M. Ziller, D. Kloss, R. Wurm, M. Rauser, R. Labohm, K. Drager, W. Fasen, R. G. Hess, and F. J. Conraths. 2003. Regional distribution of bovine *Neospora caninum* infection in the German state of Rhineland-Palatinate modelled by Logistic regression. *Int.J.Parasitol.* **33**:1631-1640.
- Schares, G., A. Barwald, C. Staubach, P. Söndgen, M. Rauser, R. Schroder, M. Peters, R. Wurm, T. Selhorst, and F. J. Conraths. 2002a. p38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Vet.Parasitol.* **106**:293-305.
- Schares, G., A. O. Heydorn, A. Cuppers, H. Mehlhorn, L. Geue, M. Peters, and F. J. Conraths. 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., F. J. Conraths, and M. P. Reichel. 1999a. Bovine neosporosis: comparison of serological methods using outbreak sera from a dairy herd in New Zealand. *Int.J.Parasitol.* **29**:1659-1667.
- Schares, G., J. F. Dubremetz, J. P. Dubey, A. Barwald, A. Loyens, and F. J. Conraths. 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., M. Peters, R. Wurm, A. Barwald, and F. J. Conraths. 1998. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. *Vet.Parasitol.* **80**:87-98.
- Schares, G., M. Rauser, P. Söndgen, P. Rehberg, A. Barwald, J. P. Dubey, R. Edelhofer, and F. J. Conraths. 2000. Use of purified tachyzoite surface antigen p38 in an ELISA to diagnose bovine neosporosis. *Int.J.Parasitol.* **30**:1123-1130.
- Schares, G., U. Wenzel, T. Müller, and F. J. Conraths. 2001. Serological evidence for naturally occurring transmission of *Neospora caninum* among foxes (*Vulpes vulpes*). *Int.J.Parasitol.* **31**:418-423.
- Scherer, C. F., E. F. Flores, R. Weiblen, L. Caron, L. F. Irigoyen, J. P. Neves, and M. N. Maciel. 2001. Experimental infection of pregnant ewes with bovine viral diarrhoea virus type-2 (BVDV-2): effects on the pregnancy and fetus. *Vet.Microbiol.* **79**:285-299.
- Schock, A., D. Buxton, J. A. Spence, J. C. Low, and A. Baird. 2000. Histopathological survey of aborted bovine fetuses in Scotland with special reference to *Neospora caninum*. *Vet.Rec.* **147**:687-688.
- Schock, A., E. A. Innes, I. Yamane, S. M. Latham, and J. M. Wastling. 2001. Genetic and biological diversity among isolates of *Neospora caninum*. *Parasitology* **123**:13-23.
- Serrano Martínez, E., E. Collantes-Fernández, A. Rodríguez-Bertos, E. Casas-Astos, G. Álvarez García, A. Chávez-Velásquez and L.M. Ortega-Mora. *Neospora* sp. associated abortion in alpaca (*Vicugna pacos*) and llama (*Lama glama*). *Vet. Rec.* (Aceptado).
- Sheffy, B. E. and S. Rodman. 1973. Reactivation of latent infectious bovine rhinotracheitis virus infection. *Am. J. Vet. Res.* **163**:850-851.
- Shibahara, T., T. Kokuho, M. Eto, M. Haritani, T. Hamaoka, K. Shimura, K. Nakamura, Y. Yokomizo, and I. Yamane. 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.

- Shibata, H., S. K. Rai, M. Satoh, K. Murakoso, K. Sumi, S. Uga, T. Matsumura, and A. Matsuoka.** 1995. The use of PCR in detecting *Toxoplasma* parasites in the blood and brains of mice experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *Kansenshogaku Zasshi* **69**:158-163.
- Shivaprasad, H. L., R. Ely, and J. P. Dubey.** 1989. A *Neospora*-like protozoon found in an aborted bovine placenta. *Vet.Parasitol.* **34**:145-148.
- Slapeta, J. R., D. Modry, I. Kyselova, R. Horejs, J. Lukes, and B. Koudela.** 2002. Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. *Vet.Parasitol.* **109**:157-167.
- Slotved, H. C., L. Jensen, and P. Lind.** 1999. Comparison of the IFAT and ISCOM-ELISA response in bovine foetuses 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., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenj, D. C.** 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Ana. Biochem.* **150**: 76-85.
- Sonda, S., N. Fuchs, B. Gottstein, and A. Hemphill.** 2000. Molecular characterization of a novel microneme antigen in *Neospora caninum*. *Mol.Biochem.Parasitol.* **108**:39-51.
- Söndgen, P., M. Peters, A. Barwald, R. Wurm, F. Holling, F. J. Conraths, and G. Schares.** 2001. Bovine neosporosis: immunoblot improves foetal serology. *Vet.Parasitol.* **102**:279-290.
- Speer, C. A. and J. P. Dubey.** 1989. Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum*. *J.Protozool.* **36**:458-463.
- Speer, C. A., J. P. Dubey, M. M. McAllister, and J. A. Blixt.** 1999. Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Int.J.Parasitol.* **29**:1509-1519.
- Stenlund, S., C. Björkman, O. J. Holmdahl, H. Kindahl, and A. Uggla.** 1997. Characterization of a Swedish bovine isolate of *Neospora caninum*. *Parasitol.Res.* **83**:214-219.
- Stenlund, S., H. Kindahl, U. Magnusson, A. Uggla, and C. Björkman.** 1999. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet.Parasitol.* **85**:227-234.
- Stoll, G. and S. Jander.** 1999. The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog.Neurobiol.* **58**:233-247.
- Sundermann, C. A. and B. H. Estridge.** 1999. Growth of and competition between *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in vitro. *Int.J.Parasitol.* **29**:1725-1732.
- Sundermann, C. A., B. H. Estridge, M. S. Branton, C. R. Bridgman, and D. S. Lindsay.** 1997. Immunohistochemical diagnosis of *Toxoplasma gondii*: potential for cross-reactivity with *Neospora caninum*. *J.Parasitol.* **83**:440-443.
- Sur, J. H., V. L. Cooper, J. A. Galeota, R. A. Hesse, A. R. Doster, and F. A. Osorio.** 1996. In vivo detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA by in situ hybridization at different times postinfection. *J.Clin.Microbiol.* **34**:2280-2286.
- Suteeraparp, P., S. Pholpark, M. Pholpark, A. Charoenchai, T. Chompoochan, I. Yamane, and Y. Kashiwazaki.** 1999. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* and associated abortion in dairy cattle from central Thailand. *Vet.Parasitol.* **86**:49-57.
- Swift, B. L. and P. C. Kennedy.** 1972. Experimentally induced infection of in utero bovine fetuses with bovine parainfluenza 3 virus. *Am.J.Vet.Res.* **33**:57-63.
- Tanaka, T., H. Nagasawa, K. Fujisaki, N. Suzuki, and T. Mikami.** 2000a. Growth-inhibitory effects of interferon-gamma on *Neospora caninum* in murine macrophages by a nitric oxide mechanism. *Parasitol.Res.* **86**:768-771.

- Tanaka, T., T. Hamada, N. Inoue, H. Nagasawa, K. Fujisaki, N. Suzuki, and T. Mikami.** 2000b. 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.
- Thilsted, J. P. and J. P. Dubey.** 1989. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *J.Vet.Diagn.Invest* **1**:205-209.
- Thompson, G., N. Canada, T. M. do Carmo, E. Silva, F. Vaz, and A. Rocha.** 2001. First confirmed case of *Neospora caninum*-associated abortion outbreak in Portugal. *Reprod.Domest.Anim.* **36**:309-312.
- Thornton, R.N., A. Gajadhar, and J. Evans.** 1994. *Neospora* abortion epidemic in a dairy herd. *New Zealand Vet. J.* **42**: 190-191.
- Thornton, R.N., E. J. Thompson, and J. P. Dubey.** 1991. *Neospora* abortion in New Zealand cattle. *New Zealand Vet. J.* **39**: 129-133.
- Thrusfield, M.** 1995. Diagnostic testing, p. 266-285. In M. Thrusfield (ed.), *Veterinary epidemiology*, second edition. Blackwell Science Ltd., Oxford.
- Thurmond, M. and S. Hietala.** 1995a. Strategies to control *Neospora* infection in cattle. *The bovine practitioner* **4**:29-32.
- Thurmond, M. C. and S. K. Hietala.** 1996. Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. *Am.J.Vet.Res.* **57**:1559-1562.
- Thurmond, M. C. and S. K. Hietala.** 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. and S. K. Hietala.** 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., M. L. Anderson, and P. C. Blanchard.** 1995b. Secular and seasonal trends of *Neospora* abortion in California dairy cows. *J.Parasitol.* **81**:364-367.
- Trees, A. J., and D. J. Williams.** 2000. Neosporosis in the United Kingdom. in: Hemphill, A., Gottstein, B. A European perspective on *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* **30**: 891-893.
- Trees, A. J., F. Guy, B. J. Tennant, A. H. Balfour, and J. P. Dubey.** 1993. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in a population of urban dogs in England. *Vet.Rec.* **132**:125-126.
- Trees, A. J., F. Guy, J. C. Low, L. Roberts, D. Buxton, and J. P. Dubey.** 1994. Serological evidence implicating *Neospora* species as a cause of abortion in British cattle. *Vet.Rec.* **134**:405-407.
- Trees, A. J., H. C. Davison, E. A. Innes, and J. M. Wastling.** 1999. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. *Int.J.Parasitol.* **29**:1195-1200.
- Trees, A. J., M. M. McAllister, C. S. Guy, J. W. McGarry, R. F. Smith, and D. J. Williams.** 2002. *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. *Vet.Parasitol.* **109**:147-154.
- Tunev, S. S., M. M. McAlilster, R. C. Anderson-Sprecher, and L. M. Weiss.** 2002. *Neospora caninum* in vitro: evidence that the destiny of a parasitophorous vacuole depends on the phenotype of the progenitor zoite. *J.Parasitol.* **88**:1095-1099.
- Uggla, A., S. Stenlund, O. J. Holmdahl, E. B. Jakubek, P. Thebo, H. Kindahl, and C. Björkman.** 1998. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. *Int.J.Parasitol.* **28**:1467-1472.
- Vaclavek, P., B. Koudela, D. Modry, and K. Sedlak.** 2003. Seroprevalence of *Neospora caninum* in aborting dairy cattle in the Czech Republic. *Vet.Parasitol.* **115**:239-245.

- Venturini, M. C., L. Venturini, D. Bacigalupe, M. Machuca, I. Echaide, W. Basso, J. M. Unzaga, C. Di Lorenzo, A. Guglielmone, M. C. Jenkins, and J. P. Dubey. 1999. *Neospora caninum* infections in bovine fetuses and dairy cows with abortions in Argentina. *Int.J.Parasitol.* **29**:1705-1708.
- 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.
- Vonlaufen, N., C. Gianinazzi, N. Müller, F. Simon, C. Björkman, T. W. Jungi, S. L. Leib, and A. Hemphill. 2002a. Infection of organotypic slice cultures from rat central nervous tissue with *Neospora caninum*: an alternative approach to study host-parasite interactions. *Int.J.Parasitol.* **32**:533-542.
- Vonlaufen, N., N. Müller, N. Keller, A. Naguleswaran, W. Bohne, M. M. McAllister, C. Björkman, E. Müller, R. Caldelari, and A. Hemphill. 2002b. Exogenous nitric oxide triggers *Neospora caninum* tachyzoite-to-bradyzoite stage conversion in murine epidermal keratinocyte cell cultures. *Int.J.Parasitol.* **32**:1253-1265.
- Waldner, C. L., E. D. Janzen, J. Henderson, and D. M. Haines. 1999. Outbreak of abortion associated with *Neospora caninum* infection in a beef herd. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **215**:1485-1489.
- Walsh, C. P., R. Vemulapalli, N. Sriranganathan, A. M. Zajac, M. C. Jenkins, and D. S. Lindsay. 2001. Molecular comparison of the dense granule proteins GRA6 and GRA7 of *Neospora hughesi* and *Neospora caninum*. *Int.J.Parasitol.* **31**:253-258.
- Walsh, P. S., D. A. Metzger, and R. Higuchi. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* **10**:506-513.
- Walter, S., and D. Duncan. 1967. Estimation of the probability of an event as a function of several variables. *Biometrika* **54**:167-79.
- Weber, v. A., K. Zetmann, and Th. Ewringmann. 2000. Vorkommen von Antikörpern gegen *Neospora caninum* bei Kühen in nordbayerischen Beständen mit Abortproblemen. *Tierärztl.Umschau.* **55**:28-29.
- Weiss, L. M., Y. F. Ma, S. Halonen, M. M. McAllister, and Y. W. Zhang. 1999. The in vitro development of *Neospora caninum* bradyzoites. *Int.J.Parasitol.* **29**:1713-1723.
- Williams, D. J., C. S. Guy, J. W. McGarry, F. Guy, L. Tasker, R. F. Smith, K. MacEachern, P. J. Cripps, D. F. Kelly, and A. J. Trees. 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., C. S. Guy, R. F. Smith, F. Guy, J. W. McGarry, J. S. McKay, and A. J. Trees. 2003. First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. *Int.J.Parasitol.* **33**:1059-1065.
- Williams, D. J., J. McGarry, F. Guy, J. Barber, and A. J. Trees. 1997. Novel ELISA for detection of *Neospora*-specific antibodies in cattle. *Vet.Rec.* **140**:328-331.
- Williams, J. H., I. Espie, E. van Wilpe, and A. Matthee. 2002. Neosporosis in a white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) calf. *J.S.Afr.Vet.Assoc.* **73**:38-43.
- Wills, R. W., A. R. Doster, J. A. Galeota, J. H. Sur, and F. A. Osorio. 2003. Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J.Clin.Microbiol.* **41**:58-62.
- Woods, L. W., M. L. Anderson, P. K. Swift, and K. W. Sverlow. 1994. Systemic neosporosis in a California black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*). *J.Vet.Diagn.Invest* **6**:508-510.
- Wouda, W., A. R. Moen, and Y. H. Schukken. 1998a. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. *Theriogenology* **49**:1311-1316.

- Wouda, W., A. R. Moen, I. J. Visser, and F. van Knapen. 1997a. 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., C. J. Bartels, and A. R. Moen. 1999a. Characteristics of *Neospora caninum* -associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology* **52**:233-245.
- Wouda, W., J. Brinkhof, C. van Maanen, A. L. de Gee, and A. R. Moen. 1998b. 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., J. P. Dubey, and M. C. Jenkins. 1997b. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. *J.Parasitol.* **83**:545-547.
- Wouda, W., T. Dijkstra, A. M. Kramer, C. van Maanen, and J. M. Brinkhof. 1999b. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *Int.J.Parasitol.* **29**:1677-1682.
- Xiao, B. G. and H. Link. 1998. Immune regulation within the central nervous system. *J.Neurol.Sci.* **157**:1-12.
- Yaeger, M. J., S. Shawd-Wessels, and P. Leslie-Steen. 1994. *Neospora* abortion storm in a midwestern dairy. *J.Vet.Diagn.Invest* **6**:506-508.
- Yamaga, M., O. Flechtner, and B. Gottstein. 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., H. Kitani, T. Kokuho, T. Shibahara, M. Haritani, T. Hamaoka, S. Shimizu, M. Koiwai, K. Shimura, and Y. Yokomizo. 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., T. Kokuho, K. Shimura, M. Eto, M. Haritani, Y. Ouchi, K. W. Sverlow, and P. A. Conrad. 1996. In vitro isolation of a bovine *Neospora* in Japan. *Vet.Rec.* **138**:652.
- Yamane, I., T. Shibahara, T. Kokuho, K. Shimura, T. Hamaoka, M. Haritani, P. A. Conrad, C. H. Park, M. Sawada, and T. Umemura. 1998. An improved isolation technique for bovine *Neospora* species. *J.Vet.Diagn.Invest* **10**:364-368.
- Youn, H. J., J. Lakritz, D. Y. Kim, G. E. Rottinghaus, and A. E. Marsh. 2003. Anti-protozoal efficacy of medicinal herb extracts against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. *Vet.Parasitol.* **116**:7-14.
- Zenner, L., A. Foulet, Y. Caudrelier, F. Darcy, B. Gosselin, A. Capron, and M. F. Cesbron-Delauw. 1999. Infection with *Toxoplasma gondii* RH and Prugniaud strains in mice, rats and nude rats: kinetics of infection in blood and tissues related to pathology in acute and chronic infection. *Pathol.Res.Pract.* **195**:475-485.
- Zenner, L., F. Darcy, A. Capron, and M. F. Cesbron-Delauw. 1998. *Toxoplasma gondii*: kinetics of the dissemination in the host tissues during the acute phase of infection of mice and rats. *Exp.Parasitol.* **90**:86-94.