

Caracterización biológica y genética de la cepa de *Neospora caninum* NC-6 Argentina y aplicación práctica de la tipificación de microsatélites en infecciones experimentales en bovinos

Bacigalupe, D.^{1*}, Basso, W.^{1,4}, Caspe, S.G.², Moré, G.^{1,4}, Lischinsky, L.³, Campero, L.¹, Leunda, M.³, Moore, D.P.^{3,4}, Schares, G.⁵, Campero, C.M.³ y Venturini, M.C.¹

1. Laboratorio de Inmunoparasitología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. 60 y 118 (1900) La Plata. Argentina.

2. INTA Mercedes, Argentina.

3. INTA Balcarce, Argentina.

4. CONICET, Argentina.

5. Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Institute of Epidemiology, Seestrasse 55, 16868 Wusterhausen, Alemania.

* Correo electrónico: dianab@fcv.unlp.edu.ar

El presente trabajo ha sido galardonado con el Premio Mayor AAPAVET (Asociación Argentina de Parasitología Veterinaria) - Premio Anual Rioplatense 2010/2011 "Congreso Mundial de Parasitología Veterinaria" en la categoría Mejor trabajo original de investigación. Esta es una reproducción fiel, tal los requisitos de la presentación original. Su publicación en esta revista en la presente forma cuenta con el consentimiento de sus autores.

RESUMEN

La infección por *Neospora caninum* es una de las principales causas de abortos bovinos. Los objetivos de este trabajo fueron caracterizar genéticamente el aislamiento de *N. caninum* NC-6 Argentina utilizando el análisis de microsatélites y estudiar su comportamiento biológico mediante inoculaciones experimentales en bovinos preñados, evaluando la respuesta inmune producida y la ocurrencia de transmisión transplacentaria. Se inocularon vacas preñadas de 65 días de gestación, seropositivas y seronegativas a *N. caninum*, con 5×10^7 taquizoítos de la cepa NC-6 y se sacrificaron a los 108 +/- 2 días de gestación. Se tomaron muestras de sueros periódicamente y se les realizó inmunofluorescencia indirecta para anticuerpos. Se obtuvieron muestras de sangre los días 30 y 37, se estimularon *in vitro* con *N. caninum* y se analizó la producción de interferón gamma (IFN γ). Se tomaron muestras de órganos de las madres, las placentas y los fetos que fueron procesadas por histopatología, inmunohistoquímica y PCR para ADN de *N. caninum*. Las muestras positivas se analizaron para la tipificación de los microsatélites. Los animales inoculados incrementaron significativamente los títulos de anticuerpos anti-*N. caninum* y la producción de IFN γ respecto a los controles. Una vaca seropositiva inoculada abortó, un feto del grupo seronegativo no fue viable y el resto de los fetos fueron viables pero presentaron lesiones. La PCR fue positiva en los fetos de las vacas seronegativas y en 2/3 fetos de las seropositivas. El análisis de microsatélites demostró que el ADN presente tenía un patrón idéntico a NC-6 Argentina. Éste es el primer reporte de una infección experimental de bovinos con la cepa de *N. caninum* aislada en Argentina. Esta cepa demostró su patogenicidad en animales seropositivos y seronegativos, fue capaz de atravesar la placenta y fue patógena para los fetos, el análisis de microsatélites demostró que la cepa hallada en las placentas era NC-6 Argentina.

Introducción

Neospora caninum, protozoo apicomplexa, es una de las principales causas de abortos en bovinos de todo el mundo y produce enfermedad neuromuscular y muerte en perros. Hay numerosos estudios que confirman la asociación entre neosporosis en bovinos y la presencia de abortos, principalmente en ganado lechero (Thilsted y Dubey, 1989; Anderson y col., 1991; Venturini y col., 1999; Dubey, 2003; Barr y col., 1994; Gottstein y col., 1998).

Los bovinos pueden adquirir la infección por vía horizontal, a través de la ingestión de ooquistes eliminados en las heces de los cánidos, hospedadores definitivos del parásito (Mc Allister y col., 1998; Basso y col., 2001; Gondim y col., 2004), o por vía vertical mediante la transmisión transplacentaria

de la madre al feto (Dubey, 2003; Pare y col., 1996; Hall y col., 2005; Davison y col., 1999; Moré y col., 2009). La transmisión vertical es altamente eficiente, con una tasa de infección prenatal de entre el 75 y el 90 % de los terneros nacidos de madres infectadas (Pare y col., 1996; Davison y col., 1999). Las consecuencias de la transmisión transplacentaria incluyen la presencia de abortos, terneros débiles al nacimiento que mueren en poco tiempo, o terneros clínicamente sanos pero infectados que pueden transmitir el parásito a su descendencia durante preñeces consecutivas. De esta manera, la infección puede permanecer en un rodeo por años sin la necesidad del ingreso de un hospedador definitivo (Innes y col., 2002). Las pérdidas económicas ocasionadas por la neosporosis bovina incluyen los costos causados por fallas

reproductivas, el descarte prematuro de los animales seropositivos del rodeo y la disminución en la producción láctea, además del costo por el pago a los profesionales y el diagnóstico de la enfermedad (Hall y col., 2005; Dubey, 1999; Anderson y col., 2000; Thurmond y Hietala, 1996 y 1997).

La detección de anticuerpos anti-*N. caninum* indica la exposición al parásito o la presencia de anticuerpos maternos en terneros que ingirieron calostro. La primera prueba utilizada para la detección de anticuerpos anti-*N. caninum* fue la inmunofluorescencia indirecta (IFI), que ha sido usada como prueba de referencia para el desarrollo de otras técnicas serológicas (Björkman y Ugglá, 1999; Jenkins y col., 2002; Dubey y Schares, 2006). Sin embargo, la efectividad de la respuesta inmune mediada por anticuerpos se

limita sólo a las formas extracelulares del parásito (taquizoítos), mientras que la respuesta celular tiene un rol principal en la protección contra este parásito intracelular obligado. (Innes y col., 2002 y 2005; Williams y col., 2007). Se considera que un buen indicador para determinar el desarrollo de la inmunidad celular es la detección de interferón gamma (IFN γ) en muestras de los animales infectados. Para el diagnóstico de neosporosis como causa de aborto en fetos se requiere además del análisis histopatológico e inmunohistoquímico de los órganos (Dubey 2003 b; Campero y col., 1998).

El aislamiento de *Neospora caninum* es difícil debido a que las muestras de los tejidos animales a menudo se encuentran autolisadas o contaminadas. En Argentina, la presencia de *N. caninum* fue descrita por primera vez por Venturini y col. (1995), a través de la detección de anticuerpos en vacas que habían abortado. El primer aislamiento en el país lo realizaron Venturini y col. (2001), a partir de material obtenido de una ternera que había nacido prematuramente, pero la cepa no pudo ser mantenida. Basso y col. (2001) realizaron en Argentina el primer aislamiento a nivel mundial de *N. caninum* a partir de oquistes provenientes de material fecal de un perro naturalmente infectado, esta cepa fue llamada NC-6 Argentina. Hasta el momento, es muy escaso el conocimiento que se tiene sobre las características genéticas y biológicas de esta cepa, además de sobre la respuesta inmune que la misma puede generar en los bovinos. Es de fundamental importancia conocer las características biológicas de los diferentes aislamientos, tales como su virulencia, su habilidad para atravesar la placenta y el efecto que causan sobre la respuesta inmune del hospedador, para poder diseñar vacunas efectivas. Estudios recientes demostraron que los aislamientos de *N. caninum* poseen una amplia diversidad genética, lo que sugiere que podría haber también diferencias en el comportamiento biológico. El análisis de secuencias de ADN de microsatélites es una herramienta de gran valor para estudiar la diversidad genética de diferentes cepas (Al-Qassab y col., 2009; Basso y col. 2009a y b, 2010; Beck y col., 2009; Pedraza-Díaz y col., 2009; Regidor-Cerrillo y col., 2006 y 2008). Los microsatélites, o repeticiones de secuencias simples (SSRs) son loci con alta variabilidad que consisten en unidades de 1 a 6 pares de bases de largo repetidas en tandem presentes en el genoma de organismos procariontes y eucariontes. El polimorfismo en estas secuencias proviene de la ganancia y pérdida de unidades repetidas simples.

La tipificación de los microsatélites puede ser llevada a cabo mediante secuenciación o por medición del largo de los fragmentos contenidos en el microsatélite amplificado, por electroforesis capilar, utilizando cebadores marcados con fluorocromos. La amplificación de microsatélites de *N. caninum* por PCR anidada (nested-PCR) ha demostrado poseer una alta sensibilidad, superior a la PCR convencional (Basso y col., 2009b; Pedraza-Díaz y col., 2009). Los objetivos del presente trabajo fueron caracterizar genéticamente la cepa de *N. caninum* NC-6 Argentina mediante la utilización del análisis de los microsatélites y estudiar su comportamiento biológico en bovinos preñados infectados experimentalmente, evaluando la respuesta inmune celular y humoral producida y la presencia de transmisión transplacentaria del parásito. Otro objetivo fue evaluar la practicidad del uso del análisis de los microsatélites en infecciones experimentales en bovinos, para distinguir entre diferentes aislamientos de *N. caninum*.

Materiales y métodos

Animales y diseño experimental

Se utilizaron dieciocho vacas preñadas de la raza Aberdeen Angus. Los sueros de los bovinos fueron analizados para detectar anticuerpos específicos anti-*N. caninum* mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) comenzando con una dilución de 1:25. Las vacas fueron divididas en cuatro grupos:

1. Animales seronegativos (título a IFI <1:25), control sin inocular (SNC): vacas N° 608 y 2071.
2. Animales seronegativos (IFI <1:25) inoculados con la cepa NC-6 (SN-NC6): vacas N° 257, 603, 989 y 2005.
3. Animales seropositivos (IFI \geq 1:100), control sin inocular, infectados naturalmente con *N. caninum* (SPC): vacas N° 220, 229, 241 y 299.
4. Animales seropositivos (IFI \geq 1:100), infectados naturalmente con *N. caninum*, inoculados con la cepa NC-6 (SP-NC6): vacas N° 265, 269, 242 y 298.

Los bovinos de los grupos SN-NC6 y SP-NC6 fueron inoculados por vía intravenosa (iv) a los 65 días de gestación con 5 x 10⁷ taquizoítos de la cepa NC-6 Argentina. Las vacas de los grupos controles se inocularon iv con solución salina tamponada de fosfatos (PBS).

Para determinar los niveles de anticuerpos se recogieron muestras de suero en los días 0 (preinoculación), 5,

11, 18, 24, 32, 39 y 42 post-inoculación (p.i). La respuesta inmune celular se analizó mediante la detección de la producción de interferón gamma (IFN γ) en células sanguíneas obtenidas de muestras recogidas en los días 30 y 37 dpi, utilizando una prueba de ELISA de captura comercial.

Los bovinos fueron sacrificados a los días 108 +/- 2 de gestación y se tomaron muestras de órganos de las vacas y los fetos para realizar las pruebas de inmunohistoquímica y PCR.

Obtención de los taquizoítos de *Neospora caninum*

Los taquizoítos de las cepas NC-1 y NC-6 Argentina de *Neospora caninum* fueron cultivados in vitro en células Vero mantenidas con medio RPMI suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 1% de penicilina y estreptomina, y a 37°C con una atmósfera de 5 % de CO₂. Cuando aproximadamente el 50 % de la monocapa se observó rota, se obtuvieron las células y la suspensión fue pasada a través de agujas de 20, 22 y 25G y lavada dos veces en PBS por centrifugación a 800 Xg. Los taquizoítos de las cepas NC-6 Argentina y NC-1 se utilizaron en la elaboración de antígeno para IFI, y sólo la cepa NC-6 Argentina fue utilizada para las inoculaciones de los animales. Los parásitos fueron contados en una cámara de Neubauer y resuspendidos en PBS según requerimiento.

Análisis serológico por IFI para *N. caninum*

La prueba de IFI fue realizada usando taquizoítos de las cepas NC-1 o NC-6 Argentina como antígeno, según lo descrito por Dubey y col. (1988). Brevemente, los taquizoítos fueron concentrados a 1 x 10⁷ /ml y fueron colocados en portaobjetos, fijados con metanol y conservados a -20 °C. Los sueros de los bovinos fueron analizados hasta obtención del título final, comenzando con la dilución 1:25 y como conjugado se utilizó anti-IgG bovina marcada con isotiocianato de fluoresceína (-FICT-, SIGMA, Saint Louis, USA). Los sueros con título \geq 1:25 se consideraron positivos. Se obtuvieron los títulos geométricos medios (TGM) y se analizaron con ANOVA.

Detección de la producción de IFN γ

Se recogieron muestras de sangre entera con EDTA de todos los bovinos los días 30 y 37 post-inoculación para la determinación de IFN γ . Un ml de cada muestra de sangre fue cultivado por duplicado en una placa de 24 pocillos y estimulado con lisado de taquizoítos de la cepa NC-1 a una concentración final de 50 μ g de proteína/ml o con PBS como control negativo. Las placas

se cultivaron durante 24 horas a 37°C y con una atmósfera de 5 % de CO₂. Los sobrenadantes de los cultivos fueron recogidos y analizados para la detección de la producción de IFN γ mediante la utilización de una prueba de ELISA comercial (BOVIGAM, CSL, Victoria, Australia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las densidades ópticas (OD) se leyeron en un espectrofotómetro (Labsystems Multiskan MS, Finlandia) y la OD final para cada muestra fue obtenida sustrayendo el promedio de OD del control negativo al promedio de cada muestra estimulada. Una muestra fue considerada positiva cuando su OD final era igual o mayor de 0,1.

Análisis histopatológico e inmunohistoquímico

En la necropsia se tomaron muestras de sistema nervioso central (SNC) de las vacas y de los fetos, corazón, lengua, músculo estriado, hígado, riñón, cordón umbilical y pulmón de los fetos y cotiledones placentarios. Las muestras se recogieron en formol al 10 % y fueron incluidas en parafina para el procesamiento de rutina en histopatología. Se realizaron cortes de 5 μ m de espesor que se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E), y se procesaron por inmunohistoquímica para *N. caninum* mediante la técnica de Avidita-Biotina utilizando un kit comercial (Vectastain®, Peroxidasa Elite ABC PK-601, Vector laboratories, Burlingame, USA), según protocolos descritos previamente (Campero y col., 1998). Como anticuerpo primario se utilizó un suero hiperinmune anti- *N. caninum* hecho en conejo (gentilmente provisto por

el Dr. M. Anderson, UC Davis, Davis, USA) a una dilución de 1:300, y como anticuerpo secundario se utilizó un suero anti-IgG de conejo producido en cabra.

PCR para ADN de *N. caninum* y análisis de microsatélites

A partir de taquizoítos de cultivos in vitro de la cepa NC6-Argentina y de las muestras de cerebro y corazón de los fetos, placentas, y SNC de las vacas, fue extraído ADN con la utilización de un kit comercial (QIAGEN Hilden, Germany, DNeasy tissue and blood kit) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Todas las muestras de ADN se procesaron inicialmente por una PCR específica para *N. caninum* utilizando el par de cebadores Np6 /Np21 (Müller y col., 1996), y usando ADN de la cepa NC-1 como control positivo y master mix sin ADN como control negativo. Las muestras que resultaron positivas fueron analizadas posteriormente para la tipificación de los microsatélites MS1B, MS2, MS3, MS4, MS5, MS6A, MS6B, MS7, MS10, MS12 y MS21 de *N. caninum* (Regidor-Cerrillo y col., 2006). Los microsatélites MS1B, 2, 3, 4 y MS10 de la cepa NC6-Argentina fueron amplificados utilizando cebadores y protocolos descritos previamente (Basso y col., 2009b). Los microsatélites MS5, MS6A, MS6B, MS12 y MS21, fueron amplificados por PCR anidada y se realizó el análisis del largo de los fragmentos mediante electroforesis capilar (Basso y col., 2010). El análisis de microsatélites del ADN de *N. caninum*

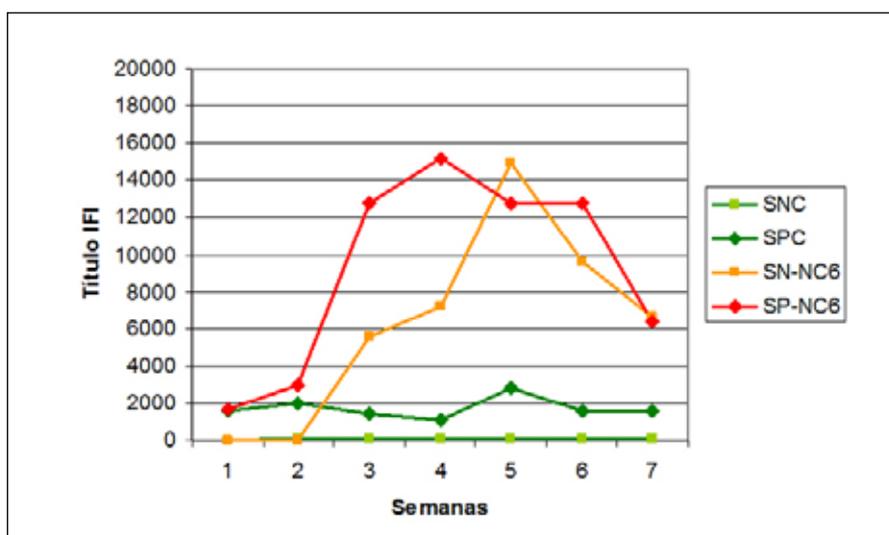
obtenido de los tejidos bovinos fue realizado mediante amplificación con PCR anidada y secuenciación (MS2 y MS10) o determinación del largo de los fragmentos por electroforesis capilar (MS1B, 3, 5, 6A, 6B, 12 y 21) (Basso y col., 2009 y 2010). En todos los análisis como controles de referencia fueron incluidas muestras de ADN de taquizoítos provenientes de cultivos in vitro de las cepas de *N. caninum* NC-1 y NC-GER6, con secuencias de microsatélites conocidas (Basso y col., 2009 y 2010).

Resultados

Respuesta inmune humoral

Tanto las vacas seropositivas como las seronegativas inoculadas con la cepa NC-6 incrementaron significativamente los títulos de anticuerpos IgG a *N. caninum*. Las vacas seronegativas (grupo SN-NC6) presentaron títulos de entre 1:1.600 y 1:12.800 dos semanas post-inoculación (p.i.), y llegaron a su máximo título a las cuatro semanas p.i. El grupo SP-NC6 demostró un título de anticuerpos promedio más alto y con un pico que apareció más temprano que el grupo SN-NC6. En un bovino del grupo SP-NC6 (N° 265) se detectó un título de 1:102.400, pero esta muestra no se tomó en cuenta para el análisis estadístico por considerarla un dato outlier. Los grupos controles no inoculados, tanto el seronegativo como el seropositivo, no mostraron variaciones significativas de los títulos de anticuerpos durante todo el ensayo (Figura 1).

Figura 1. Evolución de los títulos de anticuerpos por IFI para cada grupo de bovinos inoculados con la cepa NC-6 y los controles.



El título geométrico medio (TGM) del grupo control seronegativo fue significativamente diferente del TGM de los otros grupos, y lo mismo ocurrió con el grupo infectado que era previamente seropositivo (SP-NC6). Los TGM de los grupos SPC y SN-NC6 fueron similares (Figura 2).

No se hallaron diferencias entre los títulos de anticuerpos detectados en el suero de los bovinos utilizando el antígeno elaborado con la cepa NC-1 de los detectados con el antígeno preparado con la cepa NC-6.

Respuesta inmune celular

En tres de cuatro bovinos del grupo SN-NC6 (vacas N° 257, 603 y 2005)

se detectó producción de IFN γ post-inoculación, y lo mismo sucedió en 2 de los cuatro animales del grupo SP-NC6 (N° 269 y 298). Un bovino del grupo control seropositivo (N° 220) presentó niveles detectables de IFN γ (> 0.1) durante el desarrollo de todo el estudio, desde la primera muestra en el día 0. No se detectó producción de IFN γ en las muestras del grupo control seronegativo.

Análisis histopatológico e inmunohistoquímico

Una vaca del grupo SN-NC6 (N° 257) presentó un feto no viable a la necropsia, con severa autólisis. Un animal del grupo SP-NC6 (N° 242) tuvo

un aborto pero no se dispuso del feto para su examen. El resto de los fetos de los grupos SN-NC6 y SP-NC6 eran viables al momento del sacrificio y todos presentaron lesiones histopatológicas. Las lesiones más halladas fueron meningoencefalitis multifocal, neumonitis mononuclear, miositis multifocal necrotizante, placentitis multifocal con mineralización, miocarditis, pericarditis, hepatitis periportal y bronquiolitis (Figuras 3 y 4). Por medio de la prueba de inmunohistoquímica se demostró la presencia de *N. caninum* en muestras de todos los fetos del grupo SN-NC6 (Figura 5). Las muestras de los animales de los otros grupos fueron negativas.

Figura 2.
Títulos geométricos medios (TGM) totales para cada grupo de bovinos inoculados y los controles.

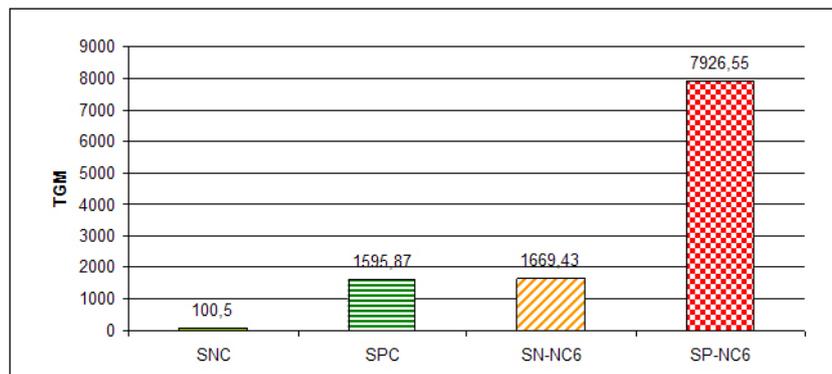


Figura 3.
Encefalitis focal necrotizante en feto bovino. 10X, tinción H&E.

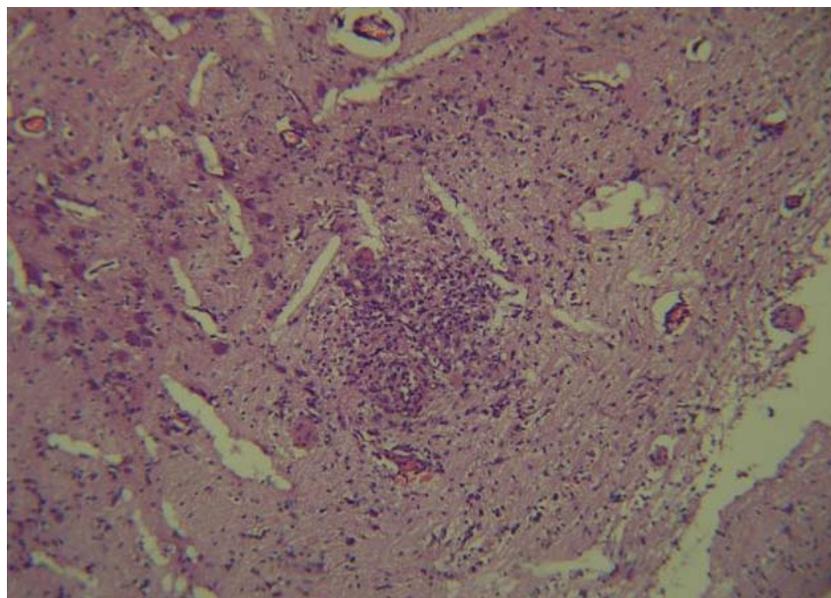


Figura 4.
Miositis intersticial en feto bovino. 40X, tinción H&E.

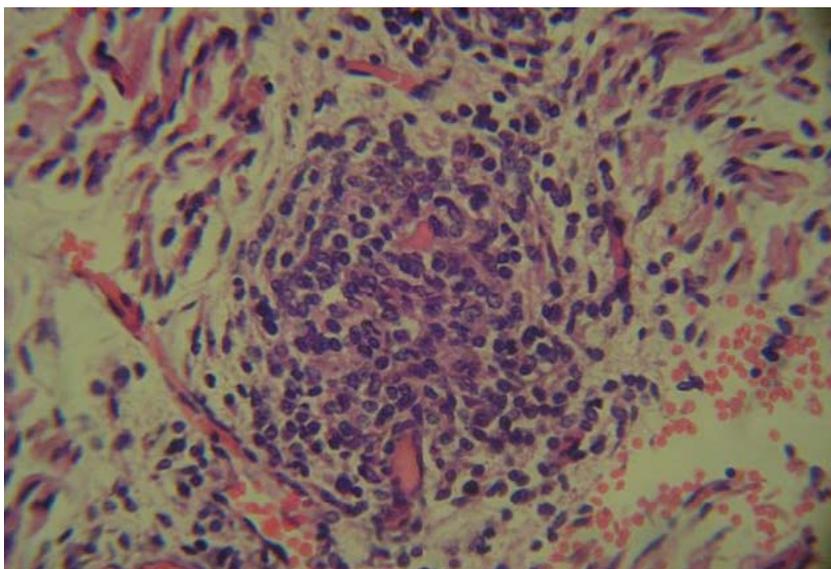
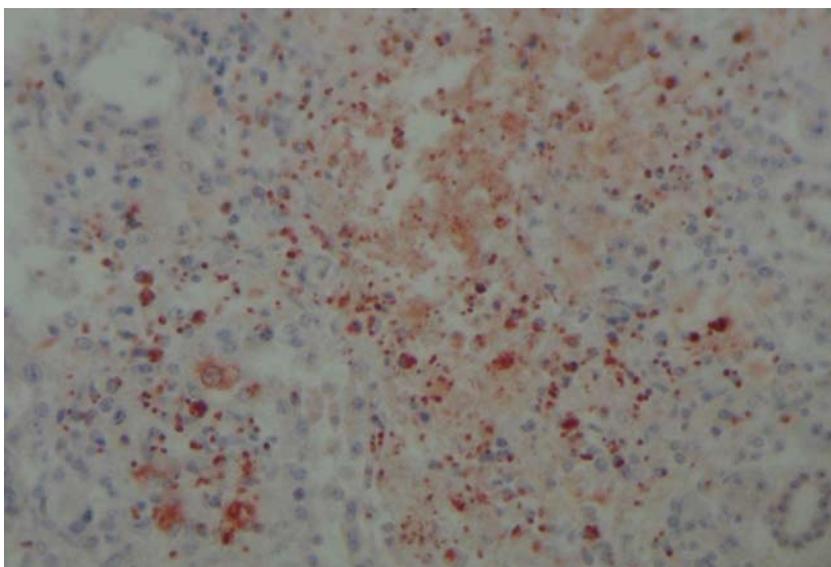


Figura 5.
Detección de taquizoítos de *N. caninum* en placenta por inmunohistoquímica. 40X, contraste con hematoxilina.



PCR y caracterización molecular

Se detectó ADN de *N. caninum* por PCR en muestras de los fetos del grupo SN-NC6 (corazón del N° 257, SNC y corazón del 603, y SNC del 2005), en el SNC de los fetos del grupo SP-NC6 números 269 y 298 y en las placentas de los bovinos N° 257, 603, 989 (SN-NC6) y 298 (SP-NC6). Las muestras de las placentas de los bovinos N° 257, 989

y 298 fueron posteriormente utilizadas para la caracterización molecular, siendo las únicas muestras que contenían la cantidad suficiente ADN de *N. caninum* para realizar ese análisis. No se detectó ADN de *N. caninum* en los SNC de las vacas.

La amplificación por PCR anidada y el análisis de las secuencias de los 10 microsatélites fueron llevados a cabo para

determinar la presencia de ADN de tachyzoítos de *N. caninum* de las cepas NC6-Argentina, NC-1 y NC-GER6. Las secuencias de microsatélites obtenidas son mostradas en la Tabla 1.

El ADN de *N. caninum* extraído de las tres placentas bovinas analizadas mostró un patrón de microsatélites idéntico al expresado por la cepa de *N. caninum* NC-6 Argentina.

Tabla 1.

Alelos de los microsatélites de *Neospora caninum* hallados en la cepa NC-6 Argentina, analizados por secuenciación o electroforesis capilar, comparados con los alelos de las cepas de *N. caninum* NC-1 y NC-GER6.

<i>N. caninum</i> secuencia de microsatélites y largo ^a (bp)											
Cepa	MS1B (AT) _n AC (AT) _n	MS2 ^b (AT) _n TTGTATC (AT) _n GT (AT) _n	MS3 (AT)	MS4 M (AT) ACATTT (AT)	S5 (TA)TGTA	MS6A (TA)	MS6B (AT)	MS10 ^d (ACT) _n (AGA) _n (TGA) _n	MS12 (GT)	MS21 (TACA)	Ref.
NC-6 Argentina	(AT) ₉ AC (AT) ₃ (26 bp)	(AT) ₈ TTGTATC (AT) ₁₀ GT (AT) ₂ (45 bp)	(AT) ₉ (18 bp)	(AT) ₁₀ ACAIIII (ΔT) ₋ (30 bp)	(22 bp)	(24 bp)	(22 bp)	(ACT) ₆ (AGA) ₁₄ (TGA) ₈ (84 bp)	(32 bp)	(40 bp)	Este estudio
NC-1 ^b	(AT) ₉ AC (AT) ₃ (26 bp)	(AT) ₇ TTGTATC (AT) ₁₀ GT (AT) ₂ (47 bp)	(AT) ₁₇ (34 bp) ^c	(AT) ₁₂ ACAIIII (ΔT) ₋ (34 bp)	(TA) ₁₂ TGTA (28 bp)	(24 bp)	(34 bp)	(ACT) ₇ (AGA) ₁₂ (TGA) ₉ (84 bp)	(32 bp)	(40 bp)	Basso y col., (2009, 2010)
NC-GER6 ^b	(AT) ₈ AC (AT) ₃ (24 bp)	(AT) ₆ TTGTATC (AT) ₁₀ GT (AT) ₂ (45 bp)	(AT) ₁₂ (24 bp)	(AT) ₁₁ ACAIIII (ΔT) ₋ (32 bp)	(TA) ₁₀ TGTA (24 bp)	(26 bp)	(22 bp)	(ACT) ₆ (AGA) ₁₇ (TGA) ₈ (93 bp)	(34 bp)	(40 bp)	Basso y col., (2009, 2010)

MS: microsatélite; bp: pares de bases; n: número de repeticiones de la secuencia; Ref.: referencia.

a. El largo de los marcadores de los microsatélites fue calculado en base a datos de secuencias producidos por el *Neospora caninum* Sequencing Group del Sanger Institute para la cepa Nc-Liv *N. caninum*, disponibles en <ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/Neospora/caninum/NEOS.configs.version1>, y en secuencias reportadas por by Regidor Cerrillo y col. (2006), y Basso y col. (2009b);

b. Secuencias de *N. caninum*- MS de NC-1 y NC-GER6 fueron previamente reportadas por Basso y col., (2009, 2010);

c. La secuencias de la cepa MS3-NC-1 fue corregida en la remisión original, N° acceso EU872366 (Basso y col., 2009).

Discusión

Los objetivos de este estudio fueron caracterizar el comportamiento biológico de un aislamiento de Argentina de *N. caninum* mediante la inoculación experimental de vacas preñadas y evaluar la habilidad de este aislado para producir la transmisión transplacentaria en animales seronegativos y seropositivos previamente y la respuesta inmune humoral y celular producida en los animales inoculados. También demostramos que el análisis de microsatélites fue una herramienta excepcional para caracterizar aislamientos de *N. caninum* siendo de gran utilidad en infecciones experimentales.

La cepa de *N. caninum* NC6-Argentina reveló un patrón de microsatélites único, el cual permitió su diferenciación de otros aislamientos mundiales de *Neospora*. Éste es el primer reporte de una infección experimental de bovinos con una cepa de *N. caninum* aislada en Argentina.

Se ha demostrado que el título de anticuerpos puede ser un buen indicador de la actividad parasitaria sobre el sistema inmune, por lo tanto el incremento del título debería asociarse con multiplicación del parásito en su hospedador, luego de una infección o de la reactivación de una infección preexistente (Innes y col., 2005). En el presente trabajo, los títulos de anti-

cuerpos anti-*N. caninum* se incrementaron significativamente en los grupos inoculados, tanto en los animales seronegativos como en los seropositivos previamente, debido a esto se considera que la infección y consecuente multiplicación de la cepa NC-6 fueron las causas de este incremento en los anticuerpos.

La respuesta inmune celular fue activada por la infección con la cepa NC-6, tanto en vacas seropositivas como en seronegativas. Un animal del grupo control seropositivo mantuvo niveles detectables de IFN γ durante todo el estudio, probablemente debido a la respuesta natural provocada por una infección previa de *N. caninum*. La respuesta inmune celular producida en los bovinos infectados no fue efectiva en la prevención de la infección fetal, esto podría deberse al período de la preñez en la cual se realizó la infección. La edad gestacional en el momento en el cual ocurre la infección es un factor importante que determina el impacto potencial de la infección sobre el feto. Williams y col. (2000) demostraron mediante inoculación intravenosa de *N. caninum* durante la gestación temprana (10 semanas) que la transmisión al feto en ese momento poseía una eficiencia del 83%, pero si la infección ocurría a las 30 semanas la eficiencia alcanzaba el 100%. Este desafío temprano ha demostrado

acarrear más consecuencias severas para los fetos que un desafío más tardío. En este trabajo, las consecuencias en los fetos causadas por la inoculación intravenosa de la cepa NC-6 Argentina a los 65 días de gestación fueron severas, tanto en los fetos provenientes de madres seronegativas como de seropositivas al momento de la infección. Dos vacas, una SP y una SN, abortaron, y los demás fetos presentaron lesiones severas en la mayoría de los tejidos, con la presencia demostrable de parásitos en el grupo SN-NC6. En un estudio previo, con la cepa NC-1, Macaldowie y col. (2004) inocularon bovinos preñados por vía intravenosa a los 70 días de gestación y concluyeron que la inoculación temprana causa muerte fetal rápida y daño en la placenta y tejidos fetales asociado a la presencia de parásitos. Malley y col. (2006) en un estudio de inmunidad placentaria frente a la infección por *N. caninum* en las etapas tempranas de la gestación demostraron que la respuesta inmune celular producida en ese momento podría proteger a la madre pero esta misma respuesta incrementaría el daño producido en la placenta por el parásito, lo que causaría un detrimento en la supervivencia fetal. Aunque el feto abortado por la vaca del grupo SP-NC6 no pudo ser recuperado, es probable que el aborto se produjera por la acción patógena de la cepa NC-6 Argentina, ya

que esta cepa fue la única identificada en las placentas de las vacas experimentalmente infectadas. La cepa NC-6 Argentina demostró ser patógena tanto en animales seropositivos (IFI 1:400, 1:1.600 y 1:3.200) como seronegativos (IFI < 1:25). Esta cepa fue capaz de atravesar la placenta de las vacas preñadas y fue patógena para los fetos, causando las lesiones observadas en el análisis histopatológico e inmunohistoquímico.

El análisis de tipificación de los microsatélites permitió identificar claramente la cepa de *N. caninum* utilizada para las inoculaciones experimentales, y diferenciarla de las otras cepas de *Neospora* que podrían haber estado presentes en los bovinos (grupos seropositivos) o que potencialmente podrían haber infectado a los animales durante el experimento. Mediante esta técnica demostramos que la cepa de

parásitos utilizada en las inoculaciones experimentales fue la que infectó las placentas no sólo de los animales seronegativos sino también de los animales que eran infectados crónicos con *N. caninum* al comienzo del estudio (animales seropositivos), lo que sugiere que una infección previa no protegió de la transmisión transplacentaria de la nueva cepa de *N. caninum*.

Bibliografía

- Al-Qassab, S., Reichel, M.P., Ivens, A., Ellis, J.T.** 2009. Genetic diversity among isolates of *Neospora caninum*, and the development of a multiplex assay for the detection of distinct strains. *Mol. Cell. Probes* 23, 132-139.
- Anderson M.L., Andrianarivo A.G., Conrad P.A.** 2000. Neosporosis in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 60- 61: 417- 431.
- Anderson M.L., Blanchard P.C., Barr B.C., Dubey J.P., Hoffman R.L., Conrad P.A.** 1991. *Neospora* like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 198: 241-244.
- Barr B.C., Rowe J.D., Sverlow K.W., BonDurant R.H., Ardans A.A., Oliver M.N., Conrad P.A.** 1994. Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6: 207- 215.
- Basso W., Schares S., Minke L., Bärwald A., Maksimov A., Peters M., Schulze C., Müller M., Conraths F.J., Schares G.** 2010. Microsatellite typing and avidity analysis suggest a common source of infection in herds with epidemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Vet. Parasitol.* 173: 24–31
- Basso W., Venturini L., Venturini M.C., Hill D.E., Kwok O.C.H., Shen S.K., Dubey J.P.** 2001. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *J. Parasitol.* 87 (3): 612-618.
- Basso W., Herrmann, D.C., Conraths, F.J., Pantchev, N., Vrhovec, M.G., Schares, G.** 2009a. First isolation of *Neospora caninum* from the faeces of a dog from Portugal. *Vet. Parasitol.* 159, 162-166.
- Basso W., Schares, S., Bärwald, A., Herrmann, D.C., Conraths, F.J., Pantchev, N., Vrhovec, M.G., Schares, G.** 2009b. Molecular comparison of *Neospora caninum* oocyst isolates from naturally infected dogs with cell culture-derived tachyzoites of the same isolates using nested polymerase chain reaction to amplify microsatellite markers. *Vet. Parasitol.* 160, 43–50.
- Beck, H.P., Blake, D., Darde, M.L., Felger, I., Pedraza-Diaz, S., Regidor-Cerrillo, J., Gomez-Bautista, M., Ortega-Mora, L.M., Putignani, L., Shiels, B., Tait, A., Weir, W.** 2009. Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites. *Int. J. Parasitol.* 39, 175-189.
- Björkman C., Ugglå A.** 1999. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Int. J. Parasitol.* 29: 1497-1507.
- Campero C.M., Anderson M.L., Conosciuto G., Odriozola H., Bretschneider G., Poso M.A.** 1998. *Neospora caninum*- associated abortion in a dairy herd in Argentina. *Vet. Record* 143: 228- 229.
- Davison H.C., Otter A., Trees A.J.** 1999. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infection in dairy cattle. *Int. J. Parasitol.* 29: 1683- 1689.
- Dubey J.P.** 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J. Parasitol.* 60: 1-16.
- Dubey J.P., Schares G.** 2006. Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet. Parasitol.* 140: 1- 34.
- Dubey, J.P.** 1999. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 214: 1160-1163.
- Dubey, J.P.** 2003 Neosporosis in cattle. *J. Parasitol.* 89 (Suppl.): S42-S56.
- Dubey, J.P., Hattel, A.L., Lindsay, D.S., Topper, M.J.** 1988. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193, 1259–63.
- Gondim L.F., McAllister M.M., Pitt W.C., Zemlicka D.E.** 2004. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 34: 159- 161.
- Gottstein B., Hentrich R., Wyss B., Thür A., Busato A., Stärk K.D.C., Müller N.** 1998. Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. *Int. J. Parasitol.* 28: 679- 691.
- Hall, C.A., Reichel, M.P., Ellis, J.T.** 2005. *Neospora* abortion in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. *Vet. Parasitol.* 128: 231–241.
- Innes E.A., Andrianarivo A.G., Björkman C., Williams D.J.L., Conrad P.A.** 2002. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends Parasitol.* 18: 497- 504.
- Innes E.A., Wright S., Bartley P., Maley S., Macaldowie C., Esteban-Redondo I., Buxton D.** 2005. The host- parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108: 29- 36.
- Jenkins M., Baszler T., Bjorkman C., Schaes G., Williams D.** 2002. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Int. J. Parasitol.* 32: 631–636.
- Macaldowie C., Maley S.W., Wright S., Bartley P., Esteban-Redondo I., Buxton D., Innes E.A.** 2004. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. *J. Comp. Path.* 131: 142–156.
- Maley S.W., Buxton D., Macaldowie C.N., Anderson I.E., Wright S.E., Bartley P.M., Esteban-Redondo I., Hamilton C.M., Storsety A.K., Innes E.A.** 2006. Characterization of the immune response in the placenta of cattle experimentally infected with *Neospora caninum* in early gestation. *J. Comp. Path.* 135: 130-141.
- Mc Allister M., Dubey J.P., Lindsay D.S., Jolley W.R., Wills R.A., Mc Guire A.M.** 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *J. Parasitol.* 28: 1473- 1478.

- Moré G., Bacigalupe D., Basso W., Rambeaud M., Beltrame F., Ramirez B., Venturini M.C., Venturini L.** 2009. Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* in dairy cattle. *Vet. Parasitol.* 160: 51-54.
- Müller, N., Zimmermann, V., Hentrich, B., Gottstein, B.** 1996. Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2850-2852.
- Pare J., Thurmond M.C., Hietala S.K.** 1996. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calthood mortality. *Can. J. Vet. Res.* 60: 133- 139.
- Pedraza-Diaz, S., Marugan-Hernandez, V., Collantes-Fernandez, E., Regidor-Cerrillo, J., Rojo-Montejo, S., Gomez-Bautista, M., Ortega-Mora, L.M.** 2009. Microsatellite markers for the molecular characterization of *Neospora caninum*: application to clinical samples. *Vet. Parasitol.* 166: 38-46.
- Regidor-Cerrillo J., Pedraza-Diaz S., Gomez-Bautista M., Ortega-Mora L.M.** 2006. Multilocus microsatellite analysis reveals extensive genetic diversity in *Neospora caninum*. *J. Parasitol.* 92: 517-524.
- Regidor-Cerrillo, J., Gomez-Bautista, M., Pereira-Bueno, J., Aduriz, G., Navarro-Lozano, V., Risco-Castillo, V., Fernandez-Garcia, A., Pedraza-Diaz, S., Ortega-Mora, L.M.** 2008. Isolation and genetic characterization of *Neospora caninum* from asymptomatic calves in Spain. *Parasitology* 135: 1651-1659.
- Thilsted J.P., Dubey J.P.** 1989. Neosporosis-like abortion in a herd of dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1: 205-209.
- Thurmond M.C., Hietala S.K.** 1997. Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first- lactation dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 210: 672- 674.
- Thurmond M.C., Hietala S.K.** 1996. Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 57: 1559-1562.
- Venturini L., Di Lorenzo C., Venturini C., Romero J.** 1995. Anticuerpos anti *Neospora sp.* en vacas que abortaron. *Vet. Arg.* XII; 113: 167- 170.
- Venturini M.C., Bacigalupe D., Venturini L., Basso W., Moore P., Unzaga J.M., Machuca M., Campero C.** 2001. Isolation of *Neospora sp.* from the brain of a dairy calf in Argentina. 18th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, WAAVP. Stresa, Italia. p. 20.
- Venturini M.C., Venturini L., Bacigalupe D., Machuca M., Echaide I., Basso W., Unzaga J. M., Di Lorenzo C., Guglielmone A, Jenkins M.C., Dubey J.P.** 1999. *Neospora caninum* infections in bovine fetuses and dairy cows with abortions in Argentina. *Int. J. Parasitol.* 29: 1705-1708.
- Williams D.J.L., Guy C.S., Smith R.F., Ellis J., Björkman C., Reichel M.P., Trees A.J.** 2007. Immunization of cattle with live tachyzoites of *Neospora caninum* confers protection against fetal death. *Infect. Immun.* 75: 1343-1348.
- Williams, D.J.L., Guy, C.S., McGarry, J.M., Guy, F., Tasker, L., Smith, R.F., MacEachern, K., Cripps, P.J., Kelly, D.F. and Trees, A.J.** 2000. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology* 121: 347-358.