

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

**Trabajo realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**RESPUESTA INMUNE A NEOSPORA CANINUM EN VAQUILLONAS
INFECTADAS NATURALMENTE Y VAQUILLONAS INOCULADAS CON ANTIGENO
INACTIVADO DURANTE EL 2º TERCIO DE LA GESTACION**

MOORE, Dadín Prando

DIRECTOR:

CAMPERO, Carlos M.

CO-DIRECTORA:

VENTURINI, María C.

**LUGAR DE TRABAJO: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria,
Estación Experimental Balcarce, Argentina**

MIEMBROS DEL JURADO:

ECHAIDE, Ignacio

MORTOLA, Eduardo

NAVONE, Graciela

2004

DEDICATORIA

A Laura

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a:

-Carlos; su total entrega como persona y como director. También su sinceridad y el espíritu de trabajo inculcado.

-Anselmo; por compartir sus mejores ideas y amistad.

-María Rosa; su voluntad, curiosidad y optimismo.

-Susana; por el cariño con que preparó el material de laboratorio.

-Sergio Garbaccio y familia; por su hospitalidad y amistad.

-Dorita y Quiquí; por su maternidad.

-Eduardo; por su compañerismo.

-Bernardino; por brindar una alternativa confiable.

-Residentes y ex-residentes; por el espíritu de trabajo.

-Patricia Zamorano y Alejandra Romera; por sus consejos y colaboración en las técnicas de laboratorio aplicadas en inmunología.

-Verónica, Alejandra, Roxana y Claudia; por la predisposición a colaborar.

-Cecilia Venturini, Walter Basso y Diana Bacigalupe; por enseñarme inicialmente el manejo de la cepa de *Neospora caninum* y por la serología de *Toxoplasma gondii*.

-Personal de las Reservas, por la colaboración en el trabajo de campo.

-A los técnicos del Grupo de Sanidad Animal y en particular a Jorge Manaza porque siempre abren sus puertas ante una consulta o por la disposición para ayudar.

-Doctor Cordeviola; por ceder gentilmente insumos de laboratorio.

-Doctor Aller; por el diagnóstico ecográfico de preñez.

-Doctor Suárez, por facilitar la compra y envío de insumos desde EE.UU.

I. INDICE GENERAL

| | |
|---|-----|
| I. INDICE GENERAL | iv |
| II. INDICE DE CUADROS | vi |
| III. INDICE DE FIGURAS..... | vii |
| IV. ABREVIATURAS Y SIMBOLOS | ix |
| V. RESUMEN | 1 |
| VI. ABSTRACT..... | 3 |
| 1. INTRODUCCION | 5 |
| 1.1. Antecedentes de la neosporosis | 5 |
| 1.2. El agente etiológico..... | 6 |
| 1.2.1. Taxonomía | 7 |
| 1.2.2. Ciclo de vida..... | 8 |
| 1.3. Patogenia de la neosporosis | 12 |
| 1.4. Signos Clínicos | 13 |
| 1.5. Epidemiología | 15 |
| 1.5.1. La situación en el mundo..... | 16 |
| 1.5.2. La enfermedad en Argentina | 17 |
| 1.6. Impacto económico de la infección por <i>N. caninum</i> | 19 |
| 1.7. Diagnóstico..... | 19 |
| 1.8. Tratamiento y prevención..... | 26 |
| 1.9. Respuesta inmune y vacunas contra la neosporosis..... | 27 |
| 1.9.1 Conceptos generales sobre inmunidad..... | 27 |
| 1.9.2. Aspectos de la respuesta inmune observados durante la gestación..... | 31 |
| 1.9.3. Aspectos inmunes en las infecciones por <i>N. caninum</i> | 33 |
| 1.9.3.1. Inmunidad mediada por anticuerpos | 35 |
| 1.9.3.2. Inmunidad mediada por células | 37 |
| 1.9.3.3. Inmunidad, gestación e infección por <i>N. caninum</i> | 40 |
| 1.9.4. Perspectivas para la vacunación en la neosporosis bovina | 47 |
| 2. MATERIALES Y METODOS | 53 |
| 2.1. Origen de los animales | 53 |
| 2.10. Análisis estadístico | 68 |
| 2.2. Animales y diseño experimental | 53 |
| 2.3. Cepa de <i>N. caninum</i> e inmunógeno | 55 |
| 2.4. Adyuvante | 57 |
| 2.5. Inmunomodulador | 58 |
| 2.6. Dosis y metodología de aplicación | 58 |
| 2.7. Muestreos..... | 59 |
| 2.7.1. Obtención de muestras para serología, prueba de linfoproliferación y producción de IFN- γ | 59 |
| 2.7.2. Obtención de muestras de suero de los terneros nacidos de las vaquillonas involucradas en el ensayo | 60 |
| 2.8. Evaluación de la respuesta humoral..... | 60 |
| 2.8.1. Obtención del antígeno de <i>N. caninum</i> para las pruebas de IFI y ELISA indirecto anti-isotipos | 60 |

| | |
|--|-----|
| 2.8.2. Prueba de IFI | 61 |
| 2.8.3. Prueba de ELISA..... | 62 |
| 2.9. Evaluación de la inmunidad mediada por células | 64 |
| 2.9.1. Preparación del antígeno para las pruebas de linfoproliferación y determinación de IFN | 64 |
| 2.9.2. Prueba de linfoproliferación | 65 |
| 2.9.3. Prueba de ELISA para la determinación de IFN- γ | 66 |
| 3. RESULTADOS..... | 69 |
| 3.1. Respuesta inmune mediada por anticuerpos..... | 69 |
| 3.1.1. Serología títulos de anticuerpos específicos anti- <i>N. caninum</i> | 69 |
| 3.1.2. Isotipos de inmunoglobulinas | 70 |
| 3.2. Respuesta inmune mediada por células..... | 72 |
| 3.2.1. Proliferación de las células mononucleares de sangre periférica | 72 |
| 3.2.2. Producción de IFN- γ | 72 |
| 3.2.2.1. Niveles de IFN- γ en CMSP estimuladas con lisado de <i>N. caninum</i> | 72 |
| 3.2.2.2. Niveles de IFN- γ en CMSP estimuladas con lisado de MB | 74 |
| 3.2.2.3. Niveles de IFN- γ en CMSP estimuladas con Concanavalina A | 74 |
| 3.3. Reacciones granulomatosas post-inoculación..... | 74 |
| 3.4. Viabilidad fetal al culminar el experimento..... | 75 |
| 3.5. Nacimiento de los terneros y serología por IFI..... | 75 |
| 4. DISCUSION..... | 76 |
| 5. CONCLUSIONES..... | 90 |
| 6. BIBLIOGRAFIA..... | 112 |
| APENDICE 1 | 146 |
| APENDICE 2..... | 147 |
| APENDICE 3..... | 148 |
| APENDICE 4..... | 149 |
| APENDICE 5..... | 150 |

II. INDICE DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 1: Antígenos de taquizoítos de <i>N. caninum</i> | 91 |
| Cuadro 2: Interleuquinas: origen y lugar de acción..... | 92 |
| Cuadro 3: Identificación, fecha de nacimiento y serología de las vaquillonas y sus madres (Título serológico $\geq 1:200$ por IFI). La asociación del estado serológico de las madres y sus hijas, y la presencia de anticuerpos específicos fueron considerados como evidencia de infección a <i>N. caninum</i> | 93 |
| Cuadro 4: Títulos de anticuerpos específicos anti- <i>N. caninum</i> (expresados como inversa de la dilución) durante las semanas 13 ^o a 25 ^o de la gestación en vaquillonas infectadas naturalmente y vaquillonas inoculadas con taquizoítos inactivados..... | 94 |
| Cuadro 5: Índice de IgG ₁ /IgG ₂ durante las semanas 13 ^o a 25 ^o de la gestación en vaquillonas infectadas naturalmente y vaquillonas inoculadas con taquizoítos inactivados. | 95 |
| Cuadro 6: Reacciones granulomatosas observadas y palpadas a las 2 semanas post-inoculación en vaquillonas de los grupos experimentales 2 y 3. | 96 |

III. INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|-----|
| Figura 1: Ciclo de vida del parásito..... | 97 |
| Figura 2: La respuesta inmune materna Th1 durante la preñez es capaz de controlar el parásito pero puede ser negativa para la vida fetal. En cambio, una adecuada respuesta inmune materna Th2 durante la preñez favorece la vida fetal pero es ineficiente en el control de la infección parasitaria..... | 98 |
| Figura 3: Esquema de la inmunidad materna y fetal durante la gestación bovina: En la neosporosis bovina la dinámica sérica es un buen indicador de la parasitemia: se ilustran dos situaciones "a" y "b": la parasitemia ocurre durante el 2° y 3° tercio de la gestación, respectivamente. Se ilustra además la depresión de la IMC producida por el ambiente hormonal y las linfoquinas de origen fetal. Finalmente, se muestra la maduración del sistema inmune fetal..... | 99 |
| Figura 4: Cronograma de toma de muestras y momento de la aplicación del inmunógeno durante la gestación de las vaquillonas..... | 100 |
| Figura 5: Títulos de anticuerpos específicos anti- <i>N. caninum</i> por IFI en vaquillonas infectadas naturalmente, vaquillonas inoculadas con taquizoítos inactivados y vaquillonas controles durante la 13° a 25° semana de gestación. La 1°, 2° y 3° aplicación del inmunógeno son indicadas por flechas..... | 101 |
| Figura 6: Títulos de anticuerpos específicos anti- <i>N. caninum</i> por IFI en vaquillonas infectadas naturalmente durante las semanas 13° a 25° de la gestación..... | 102 |
| Figura 7: Títulos de anticuerpos específicos anti- <i>N. caninum</i> por IFI durante la 13° a 25° semana de gestación en vaquillonas inoculadas con taquizoítos inactivados. La 1°, 2° y 3° aplicación del inmunógeno son indicadas por flechas..... | 103 |
| Figura 8, 9 y 10: Dinámica sérica de IgG ₁ e IgG ₂ durante las 13° a 25° semanas de gestación en animales infectados naturalmente..... | 104 |
| Figura 9 11, 12, 13 y 14: Dinámica sérica de IgG ₁ e IgG ₂ durante la 13° a 25° semanas de gestación en animales inoculados con taquizoítos inactivados..... | 105 |
| Figura 1015: Respuesta proliferativa de las CMSP de vaquillonas infectadas naturalmente, vaquillonas inoculadas con taquizoítos inactivados y vaquillonas del grupo control negativo expresada como Índice de estimulación (promedio de las c. p. m. del cultivo de leucocitos estimulado con lisado de taquizoítos de <i>N. caninum</i> /promedio de las c. p. m del cultivo de leucocitos estimulado con lisado de MB) durante las semanas 13° a 25° de la gestación. La 1°, 2° y 3° aplicación del inmunógeno son indicadas por flechas..... | 106 |
| Figura 1116: Producción de IFN- γ por CMSP estimuladas con lisado de <i>N. caninum</i> en vaquillonas infectadas naturalmente, vaquillonas inoculadas con taquizoítos inactivados y vaquillonas controles durante la 13° a 25° | |

| | |
|---|-----|
| semana de gestación. Los valores representan el promedio de producción IFN- γ expresados en ng/ml \pm 1 DE. La 1 ^o , 2 ^o y 3 ^o aplicación del inmunógeno son indicadas por flechas. | 107 |
| Figura 1217: Producción de IFN- γ por CMSP estimuladas con lisado de <i>N. caninum</i> en vaquillonas infectadas naturalmente durante la 13 ^o a 25 ^o semana de gestación. | 108 |
| Figura 1318: Producción de IFN- γ por CMSP estimuladas con lisado de <i>N. caninum</i> en vaquillonas inoculadas con taquizoítos inactivados durante la 13 ^o a 25 ^o semana de gestación. La 1 ^o , 2 ^o y 3 ^o aplicación del inmunógeno son indicadas por flechas. | 109 |
| Figuras 1419 y 20: Producción de IFN- γ por CMSP estimuladas con lisado de MB y concanavalina A, respectivamente, en vaquillonas infectadas naturalmente, vaquillonas inoculadas con taquizoítos inactivados de <i>N. caninum</i> y vaquillonas controles durante la 13 ^o a 25 ^o semana de gestación. Los valores representan el promedio de producción IFN- γ expresados en ng/ml \pm 1 DE. | 110 |
| Figura 1521: Título de anticuerpos específicos anti- <i>N. caninum</i> en terneros desde el nacimiento hasta los 6 meses de edad. Los valores representan el logaritmo en base 10 de la inversa de la dilución..... | 111 |

IV. ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

‰: porcentaje

<: menor

>: mayor

≤: menor o igual

≥: mayor o igual

ABTS: 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin sulfonato)

Ac-Mo: anticuerpo monoclonal

ASB: albúmina sérica bovina

BEI: bromoetilenamina binaria

CD: cluster differentiation

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad

CMSP: células mononucleares de sangre periférica

CO₂: dióxido de carbono

cpm: cuentas por minuto

csp: cantidad suficiente para

DE: desvío estándar

DO: densidad óptica

ELISA: enzyme-linked immunoassay

EV: endovenosa

FNT: factor de necrosis tumoral

FSA: fracción soluble en agua

g: gramo

H₂O: agua

H₂O₂: agua oxigenada

HEPES: N-2-hidroxiethylpiperazina-N '2 sulfonato de etanol

Hs: horas

HVB: herpesvirus bovino

H³: tritio

IE: índice de estimulación

IFI: inmunofluorescencia indirecta

IFN- γ : interferón gamma

Ig: inmunoglobulina

IHQ: inmunohistoquímica

IL: interleuquina

IM: intramuscular

IMA: inmunidad mediada por anticuerpos

IMC: inmunidad mediada por células

kDa: kilodaltons

Kg: kilogramo

log₁₀: logaritmo en base 10

LPS: lipopolisacáridos

M: molar

MB: monocitos bovinos

MENM: meningoencefalitis necrotizante multifocal

mg: miligramo

ml: mililitro

mm: milímetro

N: normal

NcGRA7: antígeno de los gránulos densos de *N. caninum*

NcSAG: antígeno de superficie de *N. caninum*

NcSRS: antígeno de superficie relacionados de *N. caninum*

ng: nanogramo

NK: natural killer

nm: nanómetro

NTP3/NTPasa: nucleósido trifosfato hidroxilasa

°C: grados centígrados

ON: óxido nítrico

PCR: reacción de la polimerasa en cadena

® : marca registrada

SC: subcutánea

SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes con duodecil sulfato de sodio

SFB: suero fetal bovino

SNC: sistema nervioso central

SNCo: suero normal de conejo

TA: temperatura ambiente

TE: transferencia embrionaria

Th1-Th2: respuesta de linfocitos T cooperadora tipo 1 y 2

vDVB: virus de la diarrea viral bovina

VERO: células de riñón de mono verde

μl: microlitro

μm: microgramo

RESPUESTA INMUNE A NEOSPORA CANINUM EN VAQUILLONAS INFECTADAS NATURALMENTE Y VAQUILLONAS INOCULADAS CON ANTIGENO INACTIVADO DURANTE EL 2º TERCIO DE LA GESTACION

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue comparar la respuesta inmune a *Neospora caninum* de vaquillonas naturalmente infectadas y de vaquillonas inoculadas con taquizoítos inactivados durante el 2º tercio de la gestación. Para ello se utilizaron 9 vaquillonas de raza Holando Argentino, 3 animales naturalmente infectados provenían de madres seropositivas, y las 6 restantes eran seronegativas de madres seronegativas. Cuatro de las 6 vaquillonas seronegativas fueron inoculadas por vía subcutánea con un antígeno de *N. caninum* inactivado aplicado a las 13º, 15º y 17º semanas de la gestación. El inmunógeno formulado con taquizoítos inactivados contenía 45 miligramos de proteína/5 mililitros de dosis en un adyuvante oleoso al 70% (13% de Arlacel C, 85% de Marcol 52% y 2% de Tween 80). Similarmente, las 2 restantes vaquillonas seronegativas (controles negativos) fueron inoculadas con lisado de monocitos bovinos no infectados en adyuvante oleoso. Simultáneamente, se administró un inmunomodulador compuesto por lipopolisacáridos de *Eschericia coli* (Ribozím RN-205) por vía intramuscular a todas las vaquillonas inoculadas incluyendo las controles negativos. La respuesta inmune mediada por anticuerpos fue evaluada mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y una prueba inmunoenzimática para detección de isotipos 1 y 2 de inmunoglobulinas G. La respuesta inmune mediada por células fue caracterizada por la prueba de blastogénesis linfocitaria y una prueba

inmunoenzimática para determinación de IFN- γ . Los títulos de anticuerpos determinados por inmunofluorescencia directa (IFI), aumentaron durante la semana 15^o de gestación en los animales inoculados con taquizoítos inactivados (inversa del título de anticuerpos promedio: 450 ± 252). Dichos títulos séricos alcanzaron su máximo valor durante la semana 23^o (promedio: 16000 ± 6400). Las vaquillonas infectadas naturalmente tuvieron un título máximo de anticuerpos (promedio: 3467 ± 2.810) durante la semana 19^o de gestación. Durante las semanas 17^o a 25^o, los títulos séricos resultaron más elevados en las vaquillonas inoculadas con taquizoítos inactivados que en las vaquillonas naturalmente infectadas ($P < 0,05$). En las vaquillonas inoculadas con taquizoítos inactivados se detectaron similares cantidades de inmunoglobulinas G por ELISA. En 2 vaquillonas naturalmente infectadas, el isotipo de inmunoglobulinas predominante fue IgG₂; sin embargo, en la restante vaquillona se observó una respuesta humoral con IgG₁. Las vaquillonas controles permanecieron seronegativas en ambas pruebas serológicas. Se observó linfoproliferación sólo en las vaquillonas naturalmente infectadas durante la semana 19^o de la gestación ($P < 0,05$). Las concentraciones de IFN- γ fueron similares en animales naturalmente infectados y en animales inoculados con taquizoítos inactivados ($P > 0,05$). El inmunógeno inactivado estimuló una respuesta inmune similar a la observada en animales crónicamente infectados; sin embargo, queda el interrogante si la presencia de respuesta humoral con predominio de IgG₁ y

producción de IFN- γ en las vaquillonas inoculadas con taquizoítos inactivados fue mediada por una respuesta inmune Th1 o Th2.

Palabras clave: Bovinos, inmunología, *Neospora caninum*, inmunógeno.

IMMUNE RESPONSE TO NEOSPORA CANINUM IN NATURALLY INFECTED HEIFERS AND HEIFERS VACCINATED WITH INACTIVATED ANTIGEN DURING THE SECOND THIRD OF THE GESTATION

ABSTRACT

The objective of this study was to compare the immune response to *N. caninum* in naturally infected heifers and heifers immunized with inactivated *N. caninum* during the second third of gestation. Nine Holstein heifers were used in this study, 3 naturally infected heifers were born from seropositive dams, and 6 seronegative heifers were born from seronegative dams. Four seronegative heifers were subcutaneously vaccinated with an inactivated *N. caninum* tachyzoite preparation at week 13th, 15th and 17th of gestation. A killed whole *N. caninum* tachyzoite preparation containing 45mg of protein/5ml of dose was formulated with 70% of mineral oil adjuvant (13% of Arlacel C, 85% of Marcol 52 and 2% of Tween 80). Similarly, 2 seronegative heifers (negative controls) were inoculated with mock infected bovine monocytes in oil adjuvant. All vaccinated heifers, including 2 negative control heifers were simultaneously injected with an immunomodulator containing lipopolysaccharides from *Eschericia coli* by intramuscular route (RiboZím RN-205). The humoral immune response was investigated by using indirect fluorescent antibody test (IFAT) and indirect ELISA for detecting isotype

specific antibodies. Cellular immune response was determined by specific lymphocyte proliferation and IFN- γ assays. *N. caninum*-specific antibody response increased in immunized cattle by week 15th of the gestation (mean reciprocal antibody titres 450 ± 252), peaked at week 23th (mean 16000 ± 6400). Maximum antibody response in naturally infected heifers was observed at 19th week of gestation (mean: 3467 ± 2810). The overall mean serum IFAT titres were significantly higher in immunized heifers compared with that in naturally infected heifers from week 17th to week 25th ($P < 0.05$). Similar amounts of IgG₁ and IgG₂ were found in immunized heifers. Analysis of isotype specific antibodies revealed a predominant IgG₂ response in 2 infected heifers and IgG₁ response in the other one. Control heifers remained seronegative through the study by IFAT and ELISA. *N. caninum*-specific cell-mediated immune response was only increased in natural infected cattle by week 19th of gestation ($P < 0.05$). Peripheral blood mononuclear cells from immunized animals produced IFN- γ similar concentrations of infected animals ($P > 0.05$). Killed immunogen induced a similar immune response to that found in chronically infected cattle; however, remains to be determined if the humoral immune response with predominant IgG₁ and IFN- γ production in vaccinated heifers was type Th1 or Th2 mediated.

Keywords: Bovine, immunology, *Neospora caninum*, immunogen.

1. INTRODUCCION

La presente revisión bibliográfica tiene como objetivos: discutir diferentes aspectos de la neosporosis bovina, recordar conceptos generales de inmunidad y actualizar el conocimiento de la respuesta inmune generada por la infección por *Neospora caninum* en el ganado bovino.

1.1. Antecedentes de la neosporosis

La neosporosis fue descrita por primera vez en caninos como un síndrome neuromuscular (Bjerkas y col., 1984) causado por un protozoo intracelular denominado *N. caninum* (Dubey y col., 1988). Posteriormente se la relacionó con la producción de abortos en bovinos (Thilsted y Dubey, 1989). Experimentalmente se demostró que el perro puede actuar como hospedador definitivo de la enfermedad (McAllister y col., 1998; Lindsay y col., 1999a). El primer aislamiento de *N. caninum* a partir de ooquistes eliminados en la materia fecal de un perro naturalmente infectado (Basso y col., 2001a) confirmó el rol espontáneo de esta especie en la naturaleza. Otras especies animales se comportan como hospedadores intermediarios entre ellas equinos, caprinos, ovinos y ciervos (Dubey, 1999b). Asimismo, la exposición a *N. caninum* ha sido demostrada, en búfalos, camellos, felinos y otros cánidos salvajes (Dubey, 2003).

Actualmente la neosporosis es definida como una enfermedad parasitaria que afecta caninos, bovinos, ovinos, caprinos, búfalos, ciervos y equinos, causada por *N. caninum* (Dubey y Lindsay, 1996; Guarino y col.,

2000; Dubey, 2003). En bovinos, dicha enfermedad no sólo se comporta como una entidad abortigénica (Dubey, 1999b) sino también como un síndrome que disminuye la producción de leche y carne (Thurmond y Hietala, 1997; Barling y col., 2000; Hernández y col., 2001). La asociación entre infección y disminución de la producción de leche es motivo de controversia debido a que otros estudios no encontraron similares resultados (Hobson y col., 2002) o incluso la producción fue mayor en animales seropositivos (Pfeiffer y col., 2000). En equinos, se describió otra especie causante de meningoencefalitis denominada *Neospora hughesi* (Marsh y col., 1996).

Aunque la enfermedad es causante de pérdidas reproductivas, productivas y económicas en áreas ganaderas de todo el mundo (Dubey, 1999a), hasta el presente no existe tratamiento o inmunógeno capaz de prevenir el aborto o la infección en los bovinos (Dubey, 1999b; Anderson y col., 2000; Reichel y Ellis, 2002; Dubey, 2003).

1.2. El agente etiológico

N. caninum es un protozoo intracelular obligado, morfológicamente similar a *Toxoplasma gondii*, y relacionado taxonómicamente a otros protozoos formadores de quistes como *Hammondia heydorni* e *Isoospora bigemina* (Dubey y Lindsay, 1996; Dubey y col., 2002). Los estadios parasitarios reconocidos en su ciclo son: taquizoíto, bradizoíto y esporozoíto. Los taquizoítos y bradizoítos se encuentran en hospedadores intermediarios,

mientras que los esporozoítos se eliminan en las heces del perro (Dubey y Lindsay, 1996; McAllister y col., 1998).

Los taquizoítos tienen forma de media luna o globular, miden 3 a 7 μm de largo por 1 a 5 μm de ancho. Los bradizoítos tiene una replicación más lenta que los taquizoítos y están contenidos en quistes tisulares de forma redonda u oval. Asimismo, los bradizoítos miden hasta 107 μm y tienen una pared de 4 μm . Los taquizoítos y quistes tisulares son intracelulares. Los taquizoítos han sido detectados en neuronas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, miositos, células renales y hepatocitos.

Mediante microscopía electrónica se reconocen organelas comunes a otros protozoos pertenecientes al *phylum Apicomplexa*, tales como micronemas, roptrias y gránulos densos (Dubey y Lindsay, 1996). Los antígenos asociados a proteínas de superficie y gránulos densos de taquizoítos han sido caracterizados designándose su nomenclatura (Howe y Sibley, 1999) (Cuadro 1). Los quistes tisulares, han sido observados en el tejido nervioso y muscular (Dubey y Lindsay, 1996; Peters y col., 2001). Por último, los ooquistes eliminados en las heces del hospedador definitivo son esféricos o subesféricos, miden 10 a 11 μm , no tienen color y contienen dos esporocistos con cuatro esporozoítos cada uno (McAllister y col., 1998). Los estados entero-epiteliales en el perro no han sido descritos hasta el presente (Dubey y col., 2002).

1.2.1. Taxonomía

N. caninum es un protozoo perteneciente al *phylum* Apicomplexa y a la familia *Sarcocystidae* (Dubey y Lindsay, 1996; Dubey y col., 2002). Su diferenciación con otros coccidios ha sido claramente establecida (Dubey y col., 2002).

1.2.2. Ciclo de vida

El ciclo de vida es heteroxeno teniendo como hospedadores intermediarios a los rumiantes y probablemente a otros animales de sangre caliente (Dubey y col., 2002; Dubey, 2003). El hospedador definitivo es el perro (McAllister y col., 1998; Lindsay y col., 1999a; Basso y col., 2001a; McGarry y col., 2003) aunque esta especie puede comportarse también como hospedador intermediario (Dubey y Lindsay, 1996). Si bien existen evidencias de exposición natural y experimental a *N. caninum* en otros cánidos salvajes y aves (Lindsay y col., 1996; Buxton y col., 1997a; McGuire y col., 1999; Lindsay y col., 2001; Schares y col., 2001), el riesgo epidemiológico de estas especies es aún desconocido. Un esquema resumido del ciclo parasitario de *N. caninum* es presentado en la figura 1.

La frecuencia con la cual los perros pueden adquirir la infección en la naturaleza es motivo de debate. En un trabajo experimental 9 perros de 2 a 4 años de edad fueron alimentados con tejidos fetales bovinos naturalmente infectados con *N. caninum*; pero sin embargo, los cánidos no eliminaron ooquistes en la materia fecal ni mostraron evidencias clínicas, serológicas, o histopatológicas de infección por *N. caninum* (Bergeron y col., 2001a). En

contraste con estos hallazgos, perros alimentados experimentalmente con placentas de vacas infectadas naturalmente, eliminaron ooquistes de *N. caninum* aunque mantuvieron su condición de seronegativos y no se encontró ADN en sus tejidos (Dijkstra y col., 2001a). Reciente información demostró que perros que ingieren tejidos bovinos infectados eliminan ooquistes en forma más eficiente que perros que ingieren tejidos infectados de ratón (Gondim y col., 2002). Por otro lado, la adición de taquizoítos al calostro bovino administrado a caninos no provocó seroconversión ni eliminación de ooquistes o infección (Dijkstra y col., 2001a). Independientemente de la presencia o ausencia de anticuerpos séricos, todo perro debe considerarse como potencial fuente de infección para los bovinos (Reichel y Ellis, 2002).

La infección en perros por ingestión de placentas de vacas naturalmente infectadas podría ser baja dado que la detección de *N. caninum* por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) demostró que sólo 2 de 16 especímenes resultaron positivos (Bergeron y col., 2001b). Como contraparte, la exposición postnatal de los caninos está demostrada por el incremento de la seroprevalencia en perros de mayor edad (Basso y col., 2001b). Asimismo, la seroprevalencia a *N. caninum* en caninos pertenecientes a zonas rurales es mayor que aquella descrita para perros de áreas urbanas (Barber y col., 1997; Sawada y col., 1998; Basso y col., 2001b) probablemente debido a la estrecha relación existente entre esta especie y los bovinos (Paré y col., 1998; Wouda, y col., 1999). Por otro

lado, la transmisión vertical es probable en los caninos ocasionando infecciones congénitas con manifestaciones clínicas de parálisis severas (Barber y Trees, 1998).

Aunque el ciclo de vida es indirecto, en los bovinos la principal vía de transmisión es la congénita (Anderson y col., 1997; Paré y col., 1996; Hietala y Thurmond, 1999). Experimentalmente esta vía ha sido demostrada en ovinos (Dubey y Lindsay, 1990), caprinos (Lindsay y col., 1995), ratones (Cole y col., 1995), caninos (Dubey y Lindsay, 1989a), felinos (Dubey y Lindsay, 1989b), porcinos (Jensen y col., 1998) y primates (Barr y col., 1994a).

Si bien la transmisión vertical de la infección en bovinos es importante, ello no explicaría debidamente el elevado número de hatos infectados. El hecho de haberse determinado que los bovinos pueden tener seroconversión por una exposición postnatal (Paré y col., 1997; Hietala y Thurmond, 1999; Dijkstra y col., 2001b) avalan la importancia de la transmisión horizontal (Thurmond y col., 1997), motivando intensa investigación, el descubrimiento de otras vías de infección postnatal. Por otra parte, French y col., (1999) demostraron mediante modelos matemáticos, que la transmisión vertical no es suficiente para mantener la infección en una población bovina debido a que su eficiencia no es del 100%.

Aunque Uggla y col. (1998) describieron la infección experimental en terneros adicionando taquizoítos a la leche, la eliminación de estas formas parasitarias a través de la glándula mamaria bovina no se ha comprobado aún. En el posparto o tras el aborto, la placenta con presencia de taquizoítos

(Shivaprasad y col., 1989) podría servir como fuente de infección para otra vaca que la ingiera. Recientemente se demostró a través de un ensayo experimental que dos terneros y dos vacas libres de *N. caninum* mantuvieron dicha condición luego de consumir placentas naturalmente infectadas (Davison y col., 2001).

Aunque los ooquistes presentes en las heces de perros infectados experimentalmente pueden ser infectivos a las 24 horas de ser eliminados (Lindsay y col., 1999a), la infección oral en terneros y vacas preñadas sólo se ha descrito en forma experimental (De Marez y col., 1999; Gondim y col., 2002; Trees y col., 2002). Los ooquistes pueden contaminar el agua y comida de los hospedadores intermediarios (Paré y col., 1998; Dubey, 1999b). También se ha demostrado que la proporción de bovinos seropositivos aumenta cuando existen perros en los establecimientos (Wouda y col., 1999). En contraste, se ha estimado que la frecuencia de la transmisión horizontal sería baja teniendo un rango de 0,9% (Hietala y Thurmond, 1999) a 1,9% (Davison y col., 1999). También han sido mencionadas altas tasas de seroconversión (47%), sin embargo no fueron asociadas a la presentación de abortos (Dijkstra y col., 2002). Luego de inocular experimentalmente ooquistes por vía oral se logró la infección de vacas preñadas pero no fue posible inducir el aborto (Trees y col., 2002). En contraste, recientemente Gondim y col., (en prensa) han descrito no sólo la transmisión vertical mediante la inculación experimental por la vía oral en bovinos sino también la inducción del aborto. Aunque diversos estudios asocian las tormentas de abortos con la

infección postnatal (Wouda y col., 1998; McAllister y col., 2000) la frecuencia o probabilidad para que las infecciones horizontales ocasionen abortos epidémicos han sido cuestionadas (Dijkstra y col., 2002; Trees y col., 2002).

Aunque los toros se comportan como hospedadores intermediarios y existe información acerca de infecciones naturales; se desconocen el rol epidemiológico o los efectos fisiopatológicos de *N. caninum* en los machos bovinos (Moore y col., 2003a). Es poco probable que un toro transmita la enfermedad horizontalmente a una vaca, sin embargo esta posibilidad aún no ha sido investigada. La inoculación experimental por vía endovenosa (EV) de taquizoítos vivos de *N. caninum* a tres toros ocasionó el desarrollo de títulos serológicos sin signos clínicos ni lesiones genitales a la palpación luego de dos meses de observación (Campero y col., 2002).

1.3. Patogenia de la neosporosis

Aunque la patogenia de *N. caninum* en el bovino es parcialmente conocida, se cree que luego de la ingestión de ooquistes, los esporozoítos liberados en la luz intestinal son capaces de atravesar la mucosa intestinal y acceder a los distintos tejidos a través de los sistemas linfático y sanguíneo. En las células hospedadoras infectadas, se inician procesos de multiplicación mediante endodiogenia que ocasionan daño celular con necrosis e inflamación, o se forman quistes tisulares capaces de persistir durante toda la vida del animal. Los bradizoítos alojados en los quistes tisulares del SNC en una hembra bovina gestante pueden reactivarse bajo ciertas influencias

hormonales e inmunológicas originando parasitemia (Sawada y col., 2000; Stenlund y col., 1999; Innes y col., 2002; Quinn y col., 2002). Luego de la difusión hematológica, los taquizoítos atraviesan la placenta ocasionando, de acuerdo a la edad de gestación, la infección y muerte del feto o el nacimiento de un ternero congénitamente infectado (Williams y col., 2000). Aunque se ha estimado que transcurren 3–4 semanas entre la infección fetal y el aborto (Barr y col., 1991; Dubey y col., 1992), la gestación puede concluir con el nacimiento de un ternero infectado, que en caso de ser hembra, transmitirá la enfermedad a su descendencia, teniendo también alto riesgo de abortar (Thurmond y col., 1997; Wouda y col., 1998).

La reactivación de una infección latente estaría asociada a un eficiente mecanismo de transmisión vertical más que a un proceso que desencadene el aborto, al menos en rodeos endémicamente infectados (Anderson y col., 1997; Paré y col., 1997; Dannatt, 1998; Stenlund y col., 1999). Como contraparte, la exposición a ooquistes desencadenaría tormentas de abortos en animales no infectados previamente (McAllister y col., 2000).

1.4. Signos Clínicos

En vacas adultas, *N. caninum* ocasiona abortos entre el 3° y 9° mes de la gestación, con mayor frecuencia en el tercio medio (Anderson y col., 1991). Se desconoce si *N. caninum* ocasiona mortalidad embrionaria; sin embargo, se ha descrito que vacas seronegativas y seropositivas a la *N. caninum* recibieron 1,7 y 2,2 dosis inseminantes para quedar preñadas,

respectivamente (Stenlund y col., 1999). Asimismo, existen antecedentes de vacas seropositivas que fueron descartadas precozmente por presentar un bajo desempeño reproductivo (Thurmond y Hietala, 1996). Recientemente se describió que tras la presentación de abortos a *N. caninum* en un rodeo de cría, el 20% de las vacas y el 14% de sus hijas no se preñaron en el servicio natural siguiente (Waldner y col., 2001). Estos hallazgos sugieren que vacas seropositivas a *N. caninum* podrían ser subfértiles. En contraste McAllister y col., (2000) mencionaron que vacas seropositivas, crónicamente infectadas, fueron menos propensas a sufrir pérdidas reproductivas durante un brote de abortos cuando se las comparó con vacas infectadas recientemente.

El aborto puede producirse en un reducido número de vacas o involucrar hasta el 30% de los animales en un hato (Dubey, 1999b). El feto muerto en el útero puede ser reabsorbido, momificado, o expulsado con avanzado grado de autólisis. Más comúnmente ocurre el nacimiento de terneros clínicamente normales pero crónicamente infectados. Aunque no es patognomónico, la momificación es un hallazgo frecuente habiéndose descrito en casos naturales (Wouda y col., 1998) y experimentales (Barr y col., 1994b). Los terneros infectados en el útero pueden tener signos neurológicos y bajo peso al nacimiento (Barr y col., 1993; Dubey y Lindsay, 1996). El examen clínico puede revelar ataxia, disminución del reflejo patelar o falta de sensibilidad propioceptiva (Dubey, 1999a); sin embargo, son escasos los trabajos que describan esta forma de la enfermedad en

neonatos. Eventualmente pueden presentarse anomalías congénitas como exoftalmia o asimetría ocular (Campero y col., 1998).

1.5. Epidemiología

La enfermedad ha sido diagnosticada en Europa, África, Australia, Nueva Zelanda y América (Dubey, 1999a). Aunque la neosporosis afecta tanto a razas de bovinos para leche como para carne, pudiendo resultar expuestos el 100% de los rodeos (Dubey y Lindsay, 1996; Dubey, 1999a) son escasos los informes de abortos por *N. caninum* en rodeos para carne (Waldner y col., 1999; McAllister y col., 2000; Moore y col., 2003b). No obstante, en 55 rodeos de cría pertenecientes a 5 estados ubicados al noroeste de EE.UU. se reveló una seroprevalencia del 24% en los 2585 sueros analizados presentando todos los rodeos animales seropositivos (Sanderson y col., 2000). Waldner y col., (1998) describieron en Canadá una seroprevalencia a *N. caninum* que varió del 16 al 27 % en 8 rodeos para carne. Quintanilla-Gozaolo y col., (1999) en España, hallaron una seroprevalencia a *N. caninum* del 18% en los 1712 bovinos evaluados resultando positivos 119 de los 216 (55,1%) rodeos para carne.

El comportamiento epizootico o enzootico que tiene la enfermedad podría reflejar la transmisión postnatal en bovinos de un rodeo libre (Thornton y col., 1994; Yaeger y col., 1994; Thurmond y col., 1997; Moen y col., 1998; Patitucci y col., 1999) o la infección congénita de *N. caninum* a través de sucesivas generaciones, respectivamente (Wouda y col., 1998). La

manifestación epizootica de la enfermedad está asociada a la presentación de "tormentas" de abortos (McAllister y col., 1996a; Moen y col., 1998; Patitucci y col., 1999). Sin embargo, se ha sugerido que la infección simultánea con el virus de la diarrea viral bovina (vDVB) o la inmunosupresión por la ingestión prolongada de micotoxinas, podrían actuar como factores desencadenantes del aborto a *N. caninum* en un hato enzoóticamente infectado (Murray, 1991; Agerholm y col., 1997; Wouda y col., 1998; Björkman y col., 2000).

El potencial de *N. caninum* como zoonosis no ha sido fehacientemente descartada. Existe evidencia serológica de exposición de seres humanos (Tranas y col., 1999) pero se desconocen sus implicancias clínicas. En primates, la enfermedad fue reproducida experimentalmente ocasionando abortos en hembras gestantes (Barr y col., 1994a).

1.5.1. La situación en el mundo

Aunque la neosporosis fue descrita hace sólo dos décadas atrás, los avances en el conocimiento han sido satisfactorios, quedando por investigarse aspectos relacionados a la prevención y control (Dubey, 2003). También es motivo de investigación la frecuencia natural de la transmisión postnatal en el bovino o existencia de otras especies de hábitos carnívoros que pudiesen comportarse como hospedadores definitivos de la enfermedad (McGuire y col., 1999; Lindsay y col., 2001; McAllister y col., 2000; Schares y col., 2001; Dijkstra y col., 2001b).

Su amplia difusión e importancia como agente causal de numerosas pérdidas reproductivas, productivas y económicas (Dubey, 1999b; Trees y col., 1999) ha motivado intensas investigaciones tendientes a prevenir y controlar la enfermedad. Los aspectos inmunitarios involucrados en casos naturales y experimentales de la neosporosis bovina han sido recientemente recopilados (Hemphill y col., 2000; Nishikawa y col., 2002; Dubey, 2003). Sin embargo, resulta de interés mejorar el conocimiento de la respuesta inmune a *N. caninum* en los bovinos a los fines de desarrollar o evaluar un inmunógeno que prevenga la manifestación y difusión de la enfermedad.

1.5.2. La enfermedad en Argentina

Los primeros trabajos en el país referidos a esta enfermedad abortigénica permitieron identificar vacas con pérdidas reproductivas serorreactoras a *N. caninum* (Venturini y col., 1995). Posteriormente, se confirmó su presencia mediante inmunohistoquímica (IHQ) en tejidos fetales, (Campero y col., 1998) y por inoculación en ratones (Bacigalupe y col., 1998). Otros relevamientos seroepidemiológicos en las provincias de Santa Fe y Córdoba detectaron una prevalencia del 15 al 27,5% en 320 bovinos lecheros, siendo positivos los 8 rodeos en estudio (Echaide y col., 1998). En fetos provenientes de frigoríficos, se encontró que 20 de 82 (24%) y 1 de 22 (4,5%) especímenes de rodeos para leche y para carne, respectivamente, tenían anticuerpos a *N. caninum* (Venturini y col., 1999). La distribución de la enfermedad ha sido parcialmente caracterizada estableciéndose que 52,9%

de 17 rodeos para carne y 92,3% de 52 rodeos para leche tuvieron al menos 1 animal seropositivo (Moore y col., 2002). En dicho trabajo se postuló que la diferente situación epidemiológica podía tener su explicación en los sistemas de producción existentes. Aunque puede existir asociación entre la prevalencia de *N. caninum* y el tipo de explotación considerado; el potencial de dicho agente como etiología de importantes pérdidas reproductivas ha sido destacado en rodeos bovinos para carne (Moore y col., 2003b). Investigando las causas de aborto en Argentina se involucró a *N. caninum* en 7,3% de 354 casos (Campero y col., 2003a).

Para una mejor caracterización de la situación epidemiológica regional otras técnicas serológicas deberían ser aplicadas. Trabajos realizados por Echaide y col., (2002) compararon los resultados de un enzimo inmuno ensayo indirecto (ELISA, del término sajón enzyme-linked immunoassay) con la inmunofluorescencia indirecta (IFI), obteniéndose una buena concordancia entre ambas técnicas.

Trabajos tendientes a lograr el aislamiento de *N. caninum* a partir de homogeneizados de SNC de fetos bovinos abortados han permitido identificar quistes de *N. caninum* en el SNC de ratones (*Mus musculus*) y meriones (*Meriones unguiculatus*) inoculados con tejido cerebral de fetos bovinos y terneros prematuros infectados (Venturini y col., 2000, 2001). *N. caninum* ha sido aislada desde la materia fecal de un canino infectado naturalmente demostrando el rol espontáneo de esta especie como hospedador definitivo (Basso y col., 2001a).

1.6. Impacto económico de la infección por *N. caninum*

N. caninum es reconocida como agente causal de importantes pérdidas económicas en la industria de la carne y de la leche (Anderson y col.1995; Dubey, 1999a; Trees y col., 1999; McAllister y col., 2000). Los eventos que pueden originar tales pérdidas son: 1), aborto, 2) muerte perinatal, 3) incremento en el descarte de vacas con pobre desempeño reproductivo, 4) reducida producción de leche y carne.

En Inglaterra se considera que se producen 6000 abortos anuales debido a *N. caninum* y, asignándole una pérdida de 800 dólares americanos por cada aborto, se pierden aproximadamente 4,8 millones de dólares (Brittain, 2000). En California, EE.UU., las pérdidas anuales serían de 35 millones de dólares y en Australia 85 millones de dólares en la industria lechera y 25 millones de dólares para la producción de carne (Brittain, 2000). En rodeos para leche de nuestro país se han estimado las pérdidas en unos 80 millones de dólares por año considerando el costo por abortos, la reposición por eliminación de vientres seropositivos, el intervalo parto concepción y la menor producción láctea de la vaquillona en su primera lactancia (Campero y Odeón, datos no publicados).

1.7. Diagnóstico

La infección por *N. caninum* puede demostrarse mediante la utilización de pruebas inmunodiagnósticas, por técnicas histopatológicas, moleculares

y de aislamiento (Dubey, 1999b). Dentro de las pruebas inmunodiagnósticas están: IFI, ELISA, aglutinación directa, IHQ y electroforesis combinada con inmunodetección (*Western Immunoblot*).

La IFI preserva la morfología del parásito y detecta antígenos de membrana no existiendo reacción cruzada con otros protozoos *Apicomplexa* (Dubey y col., 1996). Para diluciones séricas de 1:25 a 1:640, la sensibilidad y especificidad de la prueba varía de 82,4 a 97% y 85,7 a 90% respectivamente (Atkinson y col., 2000). Sin embargo, se ha sugerido utilizar una dilución de 1:200 para maximizar la sensibilidad (Reichel y Drake, 1996). Venturini y col. (1999) describieron la dificultad de encontrar sueros verdaderamente negativos mediante pruebas serológicas de IFI, aglutinación directa y ELISA, proponiéndose una dilución sérica de 1:25 para demostrar la exposición a *N. caninum*.

La prueba de ELISA ha sido ampliamente utilizada en el serodiagnóstico de la neosporosis. Entre los numerosos protocolos para ELISA que se han desarrollado cabe mencionar aquellos que emplean extractos de proteínas obtenidos a partir de taquizoítos que fueron incluidas en complejos inmunoestimuladores (Björkman y Lundén, 1998); ELISA de competición con antígenos inmunodominantes de 65 kDa (Baszler y col., 1996); la utilización de taquizoítos formolados que preservan los antígenos de membrana (Williams y col., 1997), o ELISA de avidéz con inmunoestimuladores e incubación con urea que permite identificar animales con infecciones recientes o crónicas (Björkman y col., 1999). También se ha desarrollado ELISA en leche,

lográndose un 95% de correlación al compararla con las muestras de suero (Björkman y col., 1997).

La aglutinación directa es una prueba serológica relevante en el diagnóstico de la neosporosis (Romand y col., 1998). Aunque la técnica descrita por estos autores incluye la inactivación de la inmunoglobulina (Ig) M mediante 2-mercaptoetanol, la temprana aparición de la IgG en la neosporosis bovina (Dubey y col., 1996) permite la utilización de esta prueba para el diagnóstico serológico. Sobre 67 sueros con títulos menores a 1:25 por IFI, 56 fueron negativos y 11 resultaron positivos a la aglutinación directa utilizando una dilución de 1:40 (Venturini y col., 1999). Comparándose la técnica de aglutinación directa e IFI, la sensibilidad y la especificidad que se obtuvo fue 100% vs. 98% y 97% vs. 99%, respectivamente (Packham y col., 1998).

La utilización de electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) ha permitido caracterizar los antígenos de *N. caninum*. Esta técnica resulta de interés para el mejoramiento de los métodos diagnósticos y para seleccionar los antígenos más inmunogénicos. Marks y col., (1998) describen que antígenos de 30 kDa obtenidos a partir de taquizoítos de *N. caninum* separados mediante SDS-PAGE estimularon la proliferación "in vitro" de linfocitos T CD4⁺ (CD: por el término en inglés cluster differentiation, grupo de linfocitos identificados por anticuerpos monoclonales que reconocen una sola proteína en la membrana celular) pertenecientes a 4 terneros infectados

experimentalmente con *N. caninum*. Por otro lado, la prueba de electroforesis e inmunodetección aplicada en fluidos fetales resultó más sensible y específica que la IFI, obteniéndose además, una buena concordancia con los resultados obtenidos por técnicas histopatológicas e inmunohistoquímicas (Söndgen y col., 2001). Utilizando PAGE se ha descrito como varía el reconocimiento antigénico en diferentes estadios de infección de ratones inoculados experimentalmente (Tomioka y col., 2003). Dichos autores demostraron que un antígeno de 36-38 kDa fue reconocido por el suero de ratones en los estadios tempranos post-inoculación o durante el recrudescimiento de una infección latente. Por otro lado, un antígeno de 43 kDa fue consistentemente reconocido durante todos los estadios de infección excepto el período temprano post-inoculación. Finalmente un antígeno de 65 kDa se reconoció durante todos los estadios de infección aunque existió alta variabilidad entre animales. El antígeno de 43 kDa también fue reconocido por anticuerpos séricos de 8 vacas naturalmente infectadas proponiéndose que este último antígeno debería ser utilizado en reacciones serológicas (Tomioka y col., 2003). Este hallazgo contrasta con dos trabajos (Baszler y col., 1996; Alvarez-García y col., 2002). Mientras Baszler y col., (1996) postularon al antígeno de 65 kDa en el reconocimiento de bovinos infectados con *N. caninum*, Alvarez-García y col., (2002) enfatizan que antígenos de 17-18 kDa podrían resultar de interés en el diagnóstico de las infecciones por *N. caninum*.

La histopatología de tejidos bovinos fetales resulta una técnica diagnóstica relevante en las infecciones de *N. caninum* (Dubey, 1999a). El diagnóstico presuntivo de aborto por *N. caninum* puede emitirse ante la presencia de lesiones como meningoencefalitis necrotizante multifocal (MENM), miocarditis, miositis, nefritis, hepatitis, neumonía y adrenalitis focales no supurativas (Anderson y col., 2000).

La IHQ realizada sobre tejidos fetales formolados con lesiones histopatológicas compatibles, permite la identificación de *N. caninum* con alta especificidad, adquiriendo valor diagnóstico relevante (Dubey, 1999b; Anderson y col., 2000). Aunque su sensibilidad es baja, probablemente debido a los escasos parásitos presentes en tejidos autolizados, resulta una técnica diagnóstica vigente (Anderson y col., 2000). Algunos investigadores han cuestionado el valor diagnóstico de la técnica IHQ describiéndose resultados positivos en fetos no abortados y terneros nacidos (O'Toole y Jeffrey, 1987; Barr y col., 1991; 1993; Bryan y col., 1994). Thurmond y col. (1999) proponen que el valor diagnóstico de la IHQ para la neosporosis es mayor en rodeos con brotes de abortos por disminuir la proporción de falsos positivos. La información precedente sugiere la necesidad de ubicar a la IHQ en el contexto adecuado, considerando otras variables (anamnesis, clínica, serología, etc.) que contribuyen al diagnóstico.

En el diagnóstico de la neosporosis bovina, el impacto de la técnica de PCR ha sido notable permitiendo esclarecer ciertos aspectos epidemiológicos. En un estudio realizado sobre 83 fetos bovinos abortados, se

encontraron 24 (29%) cerebros positivos a *N. caninum* por PCR (Gottstein y col., 1998). El examen histopatológico de estos casos positivos a *N. caninum* por PCR reveló que 18 de los fetos presentaron lesiones compatibles con infección por protozoo. Sólo 6 de 24 (25%) casos positivos por PCR tuvieron anticuerpos demostrados por IFI y ELISA (Gottstein y col., 1998). En otro estudio donde se correlacionaron diferentes pruebas diagnósticas, se encontró que en 6 de 8 fetos bovinos con lesiones histopatológicas compatibles a *N. caninum* y negativos a la IHQ, fueron positivos por PCR (Baszler y col., 1999a). Debido a la alta eficiencia que tiene *N. caninum* para transmitirse en forma vertical, los resultados positivos por PCR deberán estar siempre asociados a problemas reproductivos y utilización de otras técnicas diagnósticas no sólo para identificar dicho protozoo sino también para descartar otras causas de aborto.

El primer aislamiento de *N. caninum* fue logrado a partir de material del SNC obtenido de un perro infectado (Dubey y col., 1988) y el primer aislamiento a partir de un feto bovino abortado fue comunicado por Conrad y col., en California (1993). Posteriormente, se lograron otros aislamientos en regiones ganaderas de todo el mundo (Dubey, 2003). Asimismo, se ha aislado *N. caninum* del SNC perteneciente a una vaca adulta infectada naturalmente que abortó por dicho protozoo (Sawada y col., 2000). El aislamiento en cultivos celulares a partir de fetos bovinos es dificultoso debido a la severa autólisis de las células del hospedador, el bajo número de parásitos presentes y a la alta probabilidad de contaminación (Conrad y

col., 1993). Se propone inicialmente, inocular tejido cerebral de feto bovino a ratones, con la finalidad de multiplicar y concentrar los taquizoítos aumentando las probabilidades de aislamiento (Yamane y col., 1998). Taquizoítos de *N. caninum* han sido cultivados "*in vitro*" con monocitos bovinos, células endoteliales de arteria cardiopulmonar bovina, células de riñón bovino, fibroblastos humanos, células VERO (células renales de mono verde africano) y otras líneas celulares. En esta etapa de su crecimiento "*in vitro*", el parásito mantiene la infectividad para los animales. Se han mantenido taquizoítos activos en cultivos celulares durante 8 años sin perder infectividad para ratones. La criopreservación de taquizoítos en nitrógeno líquido es una alternativa válida sin pérdida de la infectividad para los cultivos celulares (Dubey y Lindsay, 1996). El cultivo "*in vitro*" de bradizoítos se ha logrado con menos eficacia aunque mediante la adición de óxido nítrico (ON) a cultivos de queratinocitos murinos se indujo la transformación de taquizoítos a bradizoítos (Vonlaufen y col., 2002).

El protozoo puede mantenerse "*in vivo*" mediante inculación de meriones los cuales son altamente susceptibles. Los taquizoítos pueden multiplicarse en las células peritoneales de los meriones y así ser transferidos mediante inóculos sucesivos (Gondim y col., 1999). Aunque los quistes tisulares pueden ser generados por inculación parenteral de ratones inmunodeprimidos (McGuire y col., 1997), utilizando meriones se ha logrado una mayor eficiencia (Gondim y col., 2001).

1.8. Tratamiento y prevención

Existe información acerca de la sensibilidad "*in vitro*" de *N. caninum* a ciertos antimicrobianos (Lindsay y col., 1994). Utilizando sustancias efectivas contra la malaria derivadas de una hierba llamada *Artemisia annua* se logró disminuir la multiplicación *in vitro* de taquizoítos de *N. caninum* (Kim y col., 2002). Similares resultados se lograron a partir de un producto purificado desde *Altermaria brassiciicola* denominado depudecin (Kwon y col., 2003). Sin embargo, es escasa la información acerca de tratamientos "*in vivo*" para bovinos. Se ha informado que utilizando toltrazuril y ponazuril, los cuales son derivados de una droga llamada triazinona utilizada en el tratamiento de las coccidiosis en mamíferos, se logró disminuir las lesiones cerebrales de terneros inoculados experimentalmente (Gottstein y col., 2001). Actualmente no existe tratamiento en los bovinos que los libere de la enfermedad (Anderson y col., 2000).

La prevención de la enfermedad en los bovinos mediante el uso de vacunas es motivo de investigación. La información existente será presentada más adelante en esta revisión bibliográfica.

La transferencia embrionaria (TE) es una técnica adecuada para evitar la transmisión vertical de la enfermedad (Thurmond y Hietala, 1995; Baillargeon y col., 2001). Permite obtener terneros libres de infección a partir de embriones originados de donantes seropositivas a *N. caninum* con alto valor genético, cuando sean transferidos a receptoras seronegativas (Baillargeon y col., 2001). El desempeño reproductivo de vaquillonas

obtenidas mediante TE, las cuales eran hijas de madres positivas, fue mejor que aquel de vaquillonas nacidas naturalmente de las mismas madres (Campero y col., 2003b). Por otro lado, existe riesgo de aborto y transmisión congénita al realizar dicha técnica en receptoras seropositivas (Baillargeon y col., 2001).

A los fines de evitar la infección postnatal de los bovinos se ha recomendado impedir el acceso de los perros a las fuentes de agua, pasturas, galpones y silos donde se almacene alimento (Dubey, 1999b; Anderson y col., 2000). Es importante también recolectar y eliminar fetos abortados y placentas para evitar la infección de los caninos (Thurmond y Hietala, 1995).

Dada la amplia distribución de esta enfermedad en los bovinos se han sugerido además diferentes medidas de manejo, a saber: 1) reponer animales seronegativos eliminando convenientemente los animales seropositivos a la enfermedad, 2) evaluar serológicamente todo animal que ingrese al establecimiento, 3) controlar el desempeño reproductivo del rodeo a los fines de detectar pérdidas de preñez y/o fetos momificados, 4) en establecimientos donde se realice TE deberán utilizarse receptoras seronegativas a la enfermedad.

1.9. Respuesta inmune y vacunas contra la neosporosis

1.9.1 Conceptos generales sobre inmunidad

El procesamiento de antígenos ocurre a través de dos rutas diferentes:

1) la vía exógena: el antígeno se origina en el exterior de la célula y es incorporado mediante endocitosis; 2) la vía endógena: el antígeno es sintetizado en el interior de la célula (Tizard, 1996; Carrol y col., 2001; Paulnock y col., 2001).

Las células presentadoras de antígeno tienen en su superficie moléculas de naturaleza proteica llamados antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH). Este CMH constituye un conjunto de genes que codifican para proteínas de superficie celular propias de cada individuo. Estas proteínas del CMH han sido clasificadas como proteínas clase I o II (Tizard, 1996).

Los antígenos endógenos después de la fragmentación se unen a proteínas clase I del CMH. Las proteínas clase I se encuentran en la superficie de las células nucleadas y participan en la destrucción de células infectadas y células tumorales (Ezekowitz y col., 2001). Los antígenos unidos a proteínas clase I activan principalmente a las células T citotóxicas llamadas células CD8⁺ (Paulnock y col., 2001).

Por otro lado las proteínas clase II del CMH se encuentran en células B, macrófagos y células dendríticas facilitando la cooperación mediada por células CD4⁺. Estas células T (CD4⁺) que reconocen al antígeno que se asocia con una molécula clase II del CMH tienen la función de desarrollar una actividad cooperadora con secreción de linfoquinas (Carrol y col., 2001; Paulnock y col., 2001). De esta manera, las células T se dividen en dos

subpoblaciones unas que son CD4⁺ CD8⁻ llamadas células cooperadoras que promuevan la respuesta inmunitaria, y las CD4⁻ CD8⁺ con actividad citotóxica.

Las interleuquinas (IL) son mediadores solubles de naturaleza proteica y bajo peso molecular que permitan la interacción o regulación de las células involucradas en la respuesta inmune (Tizard, 1996). En general, no se unen al antígeno ni tampoco son específicas del antígeno. Las células que las producen y sus principales blancos se resumen en el Cuadro 2.

Aunque se han reconocido por lo menos 90 diferentes actividades mediadas por interleuquinas, aquí sólo se mencionarán aquellas que han sido involucradas con aspectos inmunes en la neosporosis bovina: la IL-1 es un factor de iniciación esencial para la respuesta inmunitaria y para la inflamación, activa células T y promueve la liberación de otras interleuquinas. La IL-2 induce la proliferación de células T y B activadas, promueve la síntesis de inmunoglobulinas por las células B y estimula la proliferación y citotoxicidad de células T y células NK (del término en inglés: natural killer); también induce la producción de interferón gamma (IFN- γ). La IL-12 tiene efectos biológicos múltiples en células T y células NK intensificando su actividad citotóxica e induciendo la producción de IFN- γ . Los interferones son glucoproteínas que se producen en respuesta a una estimulación inmunitaria. Se reconocen tres clases de IFN: α , β , y γ producidos principalmente por macrófagos, fibroblastos y células T, respectivamente;

aunque el IFN- γ es también producido por células NK (Tizard, 1996; Murtaugh y col., 1996).

Para inducir una respuesta inmune óptima, además del antígeno y del CMH, se requieren una firme unión entre la célula T y la célula presentadora. Esta unión requiere moléculas de adhesión como las integrinas o CD2⁺ y CD58⁺, y otro conjunto de señales derivadas de la IL-1. Por otro lado, la IL-1 es la molécula estimuladora más importante y es liberada por las células presentadoras de antígeno. La respuesta de una célula T cooperadora (CD4⁺) al estímulo realizado por la IL-1 y por un antígeno, es la expresión de receptores de IL-2. Los receptores a su vez, responderán a la IL-2 secretada por la misma célula, y como consecuencia inducirán la mitosis de la célula T cooperadora (Tizard, 1996).

Existen dos poblaciones de células T cooperadoras que se distinguen a través de las interleuquinas que secretan en respuesta a un antígeno. Estas se denominan células T cooperadoras 1 (Th1) (h: del término inglés helper) y células T cooperadoras 2 (Th2). Estas subpoblaciones responden de manera preferencial al antígeno presentado por diferentes células presentadoras de antígeno. Las células Th2 responden de manera óptima al antígeno presentado por células B, mientras que las células Th1, en contraste, responden de manera óptima al antígeno presentado por macrófagos. Así, la respuesta Th1 se relaciona con la inmunidad mediada por células (IMC) y la respuesta Th2 con la inmunidad mediada por anticuerpos (IMA). El tipo de antígeno, su procesamiento y presentación determinan la naturaleza de la

respuesta de células T cooperadoras (Tizard, 1996; Carrol y col., 2001; Paulnock y col., 2001).

Las células Th1 producen IL-2, IL-3, IL-12, IFN- γ , linfoxina y promueven la proliferación celular. Aunque no estimulan de manera específica la formación de anticuerpos, la producción de IgG₂ (la IgG en los bovinos se divide en dos isotipos IgG₁ e IgG₂) está asociada con este tipo de respuesta. En algunas circunstancias, las células Th1 pueden ser citotóxicas y suprimir la secreción de anticuerpos (Tizard, 1996; Carrol y col., 2001; Paulnock y col., 2001).

Las células Th2 secretan IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Las células Th2 también estimulan la proliferación de células B y la secreción de inmunoglobulina policlonal, pero no son citotóxicas. Por otro lado, la IgG₁ está asociada a la respuesta Th2 (Tizard, 1996; Carrol y col., 2001; Paulnock y col., 2001).

1.9.2. Aspectos de la respuesta inmune observados durante la gestación

La madre gestante adapta su metabolismo y sistema inmune proporcionando un medio homeostático y nutrientes al "concepto" (placenta, feto y fluidos). Asimismo, la preñez está condicionada por mecanismos de tolerancia o rechazo. Factores ambientales externos (infecciones o estrés) pueden desequilibrar el balance madre-concepto ocasionando el aborto. Los mencionados mecanismos de tolerancia (locales y sistémicos) y los mecanismos de rechazo durante la preñez fueron recientemente revisados (Thellin y Heinen, 2003).

Los efectos sistémicos son logrados por dos tipos de interacciones: 1) entre el sistema inmune y ciertas hormonas; y 2) entre antígenos fetales y células circulantes maternas (Thellin y Heinen, 2003). Por ejemplo: la progesterona originada en la placenta tiene efectos inmunosupresores (Siiteri y Stites, 1982). A su vez, la hormona de crecimiento de origen placentario modula la respuesta inmune (Thellin y col., 2000). Por otro lado, los antígenos fetales son capaces de inducir cierto grado de anergia en células maternas circulantes (Thellin y Heinen, 2003).

Localmente, los antígenos del CMH clase I son reducidos a su mínima expresión en el sincicio-trofoblasto (Thellin y col., 2000). En humanos, otros antígenos bloquean la actividad citolítica de las células NK (Moreau y col., 1998). El sincicio-trofoblasto produce una enzima que cataboliza el triptófano, aminoácido que es requerido para la activación de linfocitos (Munn y col., 1998). La placenta produce una sustancia, llamada anexina 2, la cual inhibiría la linfoproliferación y la producción de anticuerpos (Aarli y Matre, 1998). La respuesta inmune Th2 favorecida por los altos niveles de progesterona mantiene la preñez mediante la producción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-10 y reducción de la producción de moléculas pro-inflamatorias como IL-12 e IFN- γ , las cuales son perjudiciales para la vida fetal (Raghupathy, 1997; Clark y col., 1999).

Uno de los mecanismos más importantes de rechazo del feto involucra un desbalance entre la respuesta Th1/Th2 a favor de la respuesta Th1 y producción de IFN- γ y otras citocinas asociadas a este tipo de respuesta (Hill

y col., 1995; Raghupathy, 1997). La IL-2, IL-3, y IL-12 promueven actividades citolíticas en macrófagos y NK, activan la protrombina facilitando la coagulación y la trombosis y estimulan la producción de inmunoglobulinas que activan la cascada del complemento.

Este desbalance entre Th1/ Th2 puede producirse por infección o estrés. Las infecciones que promueven una respuesta Th1 alteran el sincicio-trofoblasto. Más aún el IFN- γ es capaz de actuar directamente sobre este tejido induciendo abortos espontáneos (Clark y Croitoru, 2001).

1.9.3. Aspectos inmunes en las infecciones por *N. caninum*

La respuesta inmune generada en las infecciones parasitarias varía según el tipo de parásito. Los parásitos multicelulares que viven en el espacio extracelular inducen una respuesta Th2 con producción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IgG₁ e IgE (Tizard, 1996). Como contraparte, los protozoos intracelulares estimulan una respuesta inmune Th1 dominada por la producción de IL-12, IFN- γ , FNT e IgG₂. Estas últimas citocinas activan vías que generan radicales libres y ON los cuales son letales para dichos parásitos (Hunter y Reiner, 2000).

En la neosporosis bovina, se desconoce si el tipo de respuesta inmune generada por la ingestión de ooquistes es similar a la lograda por inoculación de taquizoítos ya sean, inactivados (Andrianarivo y col., 1999; 2000) o vivos (Andrianarivo y col., 2001; Innes y col., 2001a; Williams y col., 2003). Más aún, existirían diferencias entre las respuesta inmunes generadas por infección

prenatal y postnatal (Williams y col., 2003). El conocimiento de estas diferencias resulta de importancia para el desarrollo de las medidas de control (McAllister, 2001; Williams y col., 2003).

Existen evidencias acerca de la variación de antígenos existente entre los estadios de taquizoítos o bradizoítos. Estos dos estadios pueden ser identificados por IHQ utilizando anticuerpos dirigidos contra un antígeno inmunodominante propio de los taquizoítos denominado NcSAG1 (Fuchs y col., 1998), o anticuerpos contra un antígeno de los bradizoítos llamado BAG5, el cual tiene reacción cruzada con bradizoítos de *T. gondii* (McAllister y col., 1996b). Asimismo, los antígenos pueden variar según el origen de los taquizoítos. Taquizoítos procedentes de cultivos "*in vitro*" tuvieron antígenos de superficie de 40, 38 y 19 kDa; sin embargo, en taquizoítos presentes en tejidos infectados evidenciados mediante IHQ, sólo estaba presente el antígeno de 38 kDa (Schaes y col., 1999). Asimismo antígenos de 36-38 kDa encontrados en la superficie de los taquizoítos no han sido detectados en los bradizoítos (Fuchs y col., 1998; Schaes y col., 1999). Por otro lado, antígenos de 43 kDa asociados a proteínas de superficie con función de adhesión e invasión, están presentes en ambos estadios (Fuchs y col., 1998).

Diversos antígenos, tales como SAG1, SRS2, GRA2, GRA6 o GRA7, los cuales han sido asociados a los gránulos densos, micronemas y otras proteínas de superficie de los taquizoítos, serían capaces de inducir una respuesta inmune de protección (Jenkins, 2001). Diversos clones de ADN

pertenecientes a estos antígenos han sido descritos y permitirán el desarrollo de vacunas a sub-unidades (Jenkins, 2001).

1.9.3.1. Inmunidad mediada por anticuerpos

Las infecciones naturales y experimentales de animales logradas a partir de taquizoítos u ooquistes de *N. caninum* han permitido la caracterización de la IMA (Conrad y col., 1993; De Marez y col., 1999). Los niveles de IgG₁ e IgG₂ resultaron mayores en animales infectados que en los controles (De Marez y col., 1999). Por otro lado, la elevación de IgM fue sólo transitoria regresando a los niveles de preinfección. Finalmente, no se detectaron diferencias en las concentraciones séricas de IgA (De Marez y col., 1999). En animales experimental y naturalmente infectados, la avidéz de la IgG tiende a incrementarse con el curso de la infección, permitiendo la identificación de animales crónica o recientemente infectados (Björkman y col., 1999).

Se ha postulado que el desarrollo de anticuerpos específicos probablemente limita la parasitemia o facilita la lisis de los taquizoítos extracelulares (Hemphill, 1999). La disponibilidad de numerosas cepas de ratones con carencia de mecanismos inmunes específicos, las cuales han sido logradas por la presencia de defectos genéticos producto de cruzamientos dirigidos, ha permitido la comprensión de la respuesta inmune en la neosporosis. Ratones deficientes de células B y de anticuerpos, murieron presentando lesiones de encefalitis necrotizante multifocal cuando fueron inoculados con *N. caninum*, sin embargo el grupo de ratones control no

tuvieron lesiones histopatológicas ni manifestaron signos clínicos (Eperon y col., 1999). En otro estudio donde se investigó el rol de las células T utilizando ratones BALB/c, se concluyó que células CD4⁺ CD8⁻ promovieron la producción de anticuerpos específicos, los cuales resultaron de importancia en la protección durante estadios avanzados de la enfermedad (Tanaka y col., 2000).

Diferentes estudios realizados en ratones han descrito que luego de la infección por *N. caninum* los anticuerpos predominantes son del isotipo IgG₂ siendo bajos o nulos los niveles de IgG₁ (Long y col., 1998; Eperon y col., 1999). Se observó un aumento de mortalidad en ratones con elevada proporción IgG₁: IgG₂, los cuales habían sido tratados con anti-IFN- γ . Asimismo, los ratones tratados con IL-12 recombinante mostraron una disminución en las lesiones causadas por *N. caninum* y también en la relación de IgG₁ : IgG₂ (Baszler y col., 1999b). Estos hallazgos son coincidentes con lo informado en bovinos experimentalmente infectados, en los cuales existió una respuesta dependiente de células cooperadoras Th1 asociada a la producción de IgG₂ (Williams y col., 2000). Sin embargo, similares niveles de IgG₁ e IgG₂ fueron encontrados luego del desafío experimental con taquizoítos vivos (Andrianarivo y col., 2000). Más aún, mayores niveles de IgG₁ fueron inducidos luego de la inmunización con taquizoítos inactivados combinados con un copolímero no particulado como adyuvante (Andrianarivo y col., 2000).

1.9.3.2. Inmunidad mediada por células

Los mecanismos dependientes de la IMC son relevantes para controlar un parásito intracelular obligado como *N. caninum*, especialmente por su habilidad para evadir la respuesta inmune (Hemphill, 1999).

La IMC que involucra a los linfocitos T cooperadora con la producción de IFN- γ , IL-12 e IL-2 está asociada con la resistencia a *T. gondii* (Gazzinelli y col., 1994). Experiencias "in vitro" demostraron que el tratamiento de células con IFN- γ recombinante inhibió la multiplicación intracelular de *N. caninum* (Innes y col., 1995). Ante la estimulación con antígeno de *N. caninum* lisado, las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de bovinos infectados proliferaron y produjeron IFN- γ entre los 4 y 8 días post inoculación (Lundén y col., 1998). Aunque el cultivo primario de células de cerebro bovino es altamente susceptible a la infección por *N. caninum*, la infección puede ser inhibida por adición de IFN- γ y FNT (Yamane y col., 2000).

También ha sido informado que un grupo de antígenos de bajo peso molecular de taquizoítos de *N. caninum* (≤ 30 kDa) estimularon la proliferación "in vitro" de linfocitos T CD4⁺ obtenidos a partir de terneros experimentalmente infectados (Marks y col., 1998). En ese mismo trabajo la proliferación celular fue acompañada por incremento en la concentración de IFN- γ (Marks y col., 1998). Más aún, tratando células con el sobrenadante de células CD4⁺ que respondieron a antígenos de *N. caninum* se logró inhibir la multiplicación del parásito (Hemphill y col., 2000). Cuando se infectaron terneros por la vía oral, las CMSP cultivadas "in vitro" respondieron al

antígeno de *N. caninum* a los 7 días después del desafío. Este tipo de respuesta resultó evidente en CMSP, células de bazo y células de los ganglios mesentéricos, inguinales, y bronquiales hasta 2,5 meses después de la infección (De Marez y col, 1999). Recientemente, se ha postulado que los mecanismos dependientes de linfocitos citotóxicos serían posibles candidatos para impedir la transmisión vertical en bovinos (Staska y col., 2003).

Experimentos realizados con ratones han permitido caracterizar no sólo la IMC sino también la dinámica de las citocinas durante las infecciones por *N. caninum*. La susceptibilidad de estas especies puede ser aumentada mediante la neutralización de IL-12 e IFN- γ (Khan y col., 1997). La producción de IL-12 y luego IFN- γ , resulta un hallazgo constante luego de las infecciones experimentales (Eperon y col., 1999). Durante otro trabajo experimental en ratones, el IFN- γ limitó la infección por *N. caninum* (Lundén y col., 2002); sin embargo la IL-12 no fue capaz de impedir el progreso de la enfermedad (Baszler y col., 1999b). Por otro lado, se ha establecido que la susceptibilidad de ciertas cepas de ratones se asocia con altos niveles de IL-4 (Long y col., 1998; Baszler y col., 1999b). Posteriores trabajos han mencionado que la neutralización de la IL-4 no reduce la transmisión vertical en ratones inoculados experimentalmente. Sin embargo, la neutralización de la IL-4 sumado a la inoculación de una cepa no virulenta de *N. caninum* y posterior desafío con una cepa virulenta, logró reducir la transmisión vertical en ratones (Long y Baszler, 2000). Este evento se acompañó además por el

incremento en los niveles de IFN- γ y disminución en la producción de IgG₁. La IL-10, también involucrada en la respuesta Th2, a sido asociada a la depleción de IFN- γ presente en ratones susceptibles a *N. caninum* (Khan y col., 1997). Un interesante estudio que analizó el rol del IFN- γ , FNT, IL-10, β -2-microglobulina y la sintetasa de ON, avala que el IFN- γ es una citocina relevante que influencia el curso de la infección por *N. caninum* en ratones (Ritter y col., 2002).

La información acerca del rol de las citocinas en respuesta a las infecciones por *N. caninum* en bovinos es escasa. No obstante, algunos estudios (Williams y col., 2000; Andrianarivo y col., 1999; 2000; 2001; Trees y col., 2002) indican que los mecanismos asociados a la respuesta Th1 con producción de IFN- γ e IgG₂ sería la adecuada para controlar la infección. Es necesario establecer si este tipo de respuesta resulta negativa durante la preñez. La modulación de las citocinas podría ser un mecanismo estratégico para la prevención de la transmisión vertical y el aborto.

Finalmente, resulta de interés el rol del ON, metabolito originado a partir de nitrógeno y producido por macrófagos activados, tiene diversas funciones entre las cuales se mencionan la inmunosupresión y la destrucción de parásitos intracelulares (Tizard, 1996; Ezekowitz y col., 2001). La adición de un inhibidor del ON a células del bazo de ratones infectados estimuló la respuesta IMC específica e inespecífica (Khan y col., 1997). En contraste, ratones deficientes en oxido nítrico sintetasa, enzima que produce ON, son susceptibles a *N. caninum* (Tanaka y col., 2000).

1.9.3.3. Inmunidad, gestación e infección por *N. caninum*

Las infecciones por parásitos *Apicomplexa* tienen efectos nocivos para la preñez (Brabin y Brabin, 1992). Sin embargo, existen dos posturas controversiales que explican la fisiopatología de aborto causado por protozoos intracelulares. Primero, la preñez favorecida por una respuesta Th2 compromete la resistencia al parásito ocasionándose parasitemia e infección transplacentaria. Segundo, una eficiente respuesta Th1 hacia el parásito podría comprometer la preñez (Quinn y col., 2002). Estas hipótesis son ilustradas en la figura 2. No obstante, podría existir una tercera posibilidad donde ocurran los dos eventos siendo uno consecuencia del otro. Es decir, durante el 2º tercio de preñez habría un ambiente favorable para el parásito (respuesta Th2); el cual podría reactivarse; y luego, la resultante respuesta inmune materna (respuesta Th1) perjudicaría la unión placenta-feto.

Los posibles mecanismos por los cuales *Leishmania major* o *Plasmodium falciparum* causan abortos están sustentados en los desbalances entre la respuesta inmune Th1 y Th2 a favor de la primera (Quinn y col., 2002). *T. gondii* tiene un efecto adverso sobre la preñez, sin embargo la infección está relacionada al momento de la gestación. Este parásito no es transmitido congénitamente en mujeres y ovejas crónicamente infectadas (Roberts y col., 2001); sin embargo, especies de roedores como *Mus musculus* y *Apodemus sylvaticus* transmiten el protozoo en forma vertical cuando poseen quistes tisulares (Owen y Trees, 1998). Roberts y col., (2001) proponen

que la madre puede controlar la infección durante el 1º trimestre debido a que tiene una respuesta Th1 bien establecida siendo bajos los niveles de progesterona y la respuesta Th2. En contraste, la transmisión vertical ocurre durante el 3º trimestre cuando los altos niveles de progesterona asociada a la respuesta Th2 son incapaces de controlar el protozoo.

Los mecanismos inmunes generados en las infecciones por *N. caninum* parecen estar involucrados en la fisiopatología del aborto (Buxton y col., 2002; Innes y col., 2002; Quinn y col., 2002); sin embargo muchos interrogantes permanecen aún sin esclarecer. Es difícil distinguir los abortos ocasionados por infecciones primarias de aquellos resultantes de la reactivación del parásito en bovinos preñados crónicamente infectados (Sager y col., 2003).

Durante un brote de abortos ocasionado por *N. caninum*, las vacas crónicamente infectadas resultaron menos propensas a sufrir pérdidas reproductivas que vacas infectadas recientemente siendo baja la avidéz de la IgG en este último grupo (McAllister y col., 2000). En contraste, se ha mencionado que la baja avidéz de anticuerpos no necesariamente está asociada con una reciente infección por *N. caninum* aunque puede ser un indicador de riesgo de aborto. (Sager y col., 2003).

Investigando la dinámica de anticuerpos en vacas infectadas con *N. caninum* a lo largo de la gestación, Paré y col., (1997) describieron que aquellos animales con altos títulos séricos hacia el final del período de gravidez parían terneros clínicamente normales pero congénitamente infectados. Sin embargo, cuando los títulos séricos se incrementaban durante

la mitad de la gestación existían altas probabilidades que se produzca el aborto (Paré y col., 1997; Guy y col., 2001). Adicionalmente, en otros estudios se postuló que la respuesta inmune de vacas preñadas infectadas naturalmente es buen indicador de la parasitemia existiendo una elevación en la concentración de anticuerpos 4-5 meses antes de la parición (Stenlund y col., 1999; Guy y col., 2001).

La transmisión vertical de *N. caninum* en ratones fue parcialmente reducida (Long y Baszler, 1998). Un grupo de ratones infectados con una cepa atenuada de *N. caninum* y tratados con anticuerpos anti-IL-4 tuvieron una baja tasa de transmisión congénita al ser desafiados con *N. caninum* durante la preñez. La transmisión vertical pudo también ser reducida con una dosis de taquizoítos lisados aplicada antes de la infección experimental (Liddell y col., 1999). Otros estudios mostraron que la inoculación de diferentes cepas de *N. caninum* prevenía la muerte cuando las dosis letales eran posteriormente aplicadas en ratones no gestantes (Atkinson y col., 1999). Sin embargo, pocos ratones fueron pretejidos cuando se usó una cepa inactivada para prevenir la infección letal (Lindsay y col., 1999b). Inoculando dosis causantes de encefalitis en ratones se evaluó la protección desarrollada con diferentes preparados de inmunógenos de *N. caninum* (Lundén y col., 2002). En dicho estudio, el grupo de ratones con mayor tasa de mortalidad y con escaso infiltrado inflamatorio mononuclear en las severas lesiones cerebrales presentaron una respuesta Th2 (Lundén y col., 2002). Como contraparte, la vacunación con una proteína recombinante de

micronemas de *N. caninum*, la cual estuvo asociada a una respuesta humoral Th2 con IgG₁, logró reducir la infección cerebral en ratones (Cannas y col., 2003). Asimismo, se logró reducir la tasa de transmisión vertical en ratones inmunizados con vacunas recombinantes expresando la proteína NcGRA7 (Liddell y col., 2003). El desarrollo de vacunas recombinantes es promisorio en la neosporosis bovina, sin embargo el éxito de esta tecnología ha resultado condicionado en infecciones por parásitos *Apicomplexa* (Brake, 2002). No obstante, la estrategia de utilizar vacunas recombinantes heterólogas aumentaría la protección en otras enfermedades causadas por coccidios (Brake, 2002).

Se ha sugerido que los estrógenos placentarios incrementados durante la mitad de la gestación bovina tendrían efectos negativos sobre la IMC favoreciendo tanto la reactivación de bradizoítos como así también la parasitemia (Stenlund y col., 1999). Como contraparte, otros autores atribuyen un efecto inmunosupresor debido a los elevados niveles de progesterona existentes desde los primeros meses de la gestación hasta semanas antes del parto (Innes y col., 2001a).

La transmisión congénita de *N. caninum* en ratones está relacionada con el momento de la gestación en que la madre es infectada (Cole y col., 1995; Long y Baszler, 1996). Cuando los ratones son infectados antes de la preñez o en la preñez temprana, los taquizoítos de *N. caninum* no fueron detectados en placenta o en tejidos fetales (Long y Baszler, 1996). Sin embargo, *N. caninum* es detectada en placenta y en el tejido muscular y

nervioso cuando los ratones son infectados en la mitad de la gestación (Long y Baszler, 1996). Estos resultados coinciden parcialmente con lo descrito por Williams y col., (2000) en bovinos. En ese estudio, las vacas infectadas antes de la preñez no transmitieron la enfermedad a su descendencia. Las vacas infectadas en el 7º mes de gestación parieron terneros vivos congénitamente infectados. Por último en el grupo de vacas infectadas durante el 3º mes de gestación, murieron 5 de 6 fetos (Williams y col., 2000).

Cuando hembras bovinas gestantes fueron infectadas con *N. caninum* a los 70, 140 y 210 días de gestación, una sólida respuesta IMC se determinó en los animales desafiados a los 70 días (Hemphill y col., 2000). Todos los terneros nacidos de estas vacas resultaron seronegativos y no hubo evidencia de respuesta IMC. Sin embargo, los terneros nacidos de hembras desafiadas a los 140 y 210 días de gestación fueron seropositivos y existió una respuesta IMC positiva detectada en CMSP, células del bazo y células de ganglios hepáticos, mesentéricos y retro-faríngeos. Estos resultados sugieren que la IMC de vacas preñadas desafiadas durante el 1º tercio de la gestación protegen de la infección fetal. Como contraparte, la infección fetal tendría lugar durante el 2º y 3º tercio siendo factible el aborto y el nacimiento de terneros congénitamente infectados, respectivamente (Hemphill y col., 2000).

Como ya fue mencionado previamente, durante la preñez los niveles de IFN- γ son necesariamente bajos en la interfase madre-feto porque de otra manera pueden causar daño y aborto (Raghupathy y col 1997). La

alteración de este mecanismo debido a la infección por *N. caninum*, acompañada por incrementos en los niveles de IFN- γ ha sido postulada como mecanismo fisiopatológico del aborto (Williams y col., 2000; Innes y col., 2002). Otros autores sostienen que la limitada producción de IFN- γ en respuesta a la presencia de IL-10 secretada por las células del trofoblasto, impedirían el control de la multiplicación de *N. caninum* durante la preñez (Hemphill y col., 2000). Asimismo la reactivación de los bradizoítos desde los lugares de latencia podría deberse al descenso de los niveles de IFN- γ (Hemphill y col., 2000). Se deberían interpretar cuidadosamente los ensayos experimentales y los eventos naturales. La inoculación experimental de taquizoítos son la causa del incremento en los niveles de IFN- γ . En contraste; estos niveles de IFN- γ podrían ser bajos durante un determinado momento de la gestación de vacas naturalmente infectadas siendo el motivo de la parasitemia y el aborto.

La maduración del sistema inmune fetal es otra variable de consideración para comprender la patogénesis del aborto o de las infecciones congénitas. En los bovinos, el tipo de placenta sindesmocorial ocasiona que el feto permanezca libre de Igs maternas durante la gestación, situación que se revierte cuando el neonato recibe calostro (Brambell, 1958). Sin embargo, el feto bovino alcanza un estado de inmunocompetencia a partir de los 90-110 días de gestación siendo capaz de responder al estímulo de un antígeno (Schultz, 1973).

Estudios realizados en fetos bovinos infectados experimentalmente con *N. caninum* a los 159 y 169 días de gestación, evidenciaron que la IMC determinada por pruebas de linfoproliferación y producción de IFN- γ fue variable entre los fetos (Andrianarivo y col., 2001). En dicho trabajo, no existió correlación entre la respuesta celular y la severidad de las lesiones fetales (Andrianarivo y col., 2001). Se encontró que la producción de citocinas e IFN- γ estuvo asociada a una respuesta celular tipo 1 en 4 de los 5 fetos en estudio (Andrianarivo y col., 2001). Además, una respuesta predominantemente tipo 2 fue indicada por la presencia de IgG₁ específica a *N. caninum*. Se sugirió que un desbalance entre las respuestas celulares 1 y 2, a favor de la tipo 2, con producción de IL-4, ocurrió en los fetos que tuvieron limitada capacidad para resolver la infección (Andrianarivo y col., 2001).

Existe controversia con respecto a la función de los macrófagos placentarios, los cuales han sido involucrados en la resistencia a *N. caninum* (Hemphill y col., 2000). Aunque el número de macrófagos presentes en la interfase materno fetal se incrementa notablemente en el 3º tercio de la preñez (Schlafer y col., 2000), durante dicho período es común el nacimiento de terneros congénitamente infectados (Williams y col., 2000). La placenta y los procesos inflamatorios en la interfase materno-fetal constituyen importantes componentes que merecen ser estudiados en las infecciones por *N. caninum*. Estos procesos inmunes localizados explicarían la fisiopatología de la infección transplacentaria (Maley y col., 2003).

Resumiendo, luego que una hembra bovina ingiera ooquistes o sufra una reactivación de una infección latente, los factores que influyen la infección fetal serían: modo de infección de la madre, momento de la gestación, respuesta inmune materna, respuesta inmune del feto y los procesos inflamatorios en la interfase materno-fetal (Figura 3) (Williams y col., 2000).

1.9.4. Perspectivas para la vacunación en la neosporosis bovina

Si bien las pérdidas reproductivas pueden presentarse más de una vez en gestaciones subsiguientes, las tasas de repetición del aborto por neosporosis son relativamente bajas (< 5%) (Anderson y col., 1995; Wouda y col., 1998). Este hecho sugiere la existencia de mecanismos inmunes contra el aborto (McAllister y col., 2000) alentando, el desarrollo de inmunógenos que prevengan dichas pérdidas reproductivas.

La comprensión y conocimiento de la respuesta inmune a la infección por *N. caninum* ayudarían en el desarrollo de una vacuna contra la enfermedad. Asimismo deberían considerarse los objetivos de la vacunación ya que en la neosporosis bovina podría desearse prevenir tres eventos: 1) la infección; 2) la transmisión vertical; y 3) el aborto. Sin embargo, a la fecha, la correlación entre la respuesta inmune, resistencia a la infección, prevención de la transmisión congénita y el aborto en el bovino, no han sido completamente determinadas.

La existencia de una vacuna viva atenuada de *T. gondii* (Toxovax®) para controlar la toxoplasmosis ovina (Dubey, 1994; Buxton e Innes, 1995) alienta el desarrollo de inmunógenos con iguales características para la neosporosis bovina. La vacunación de ovejas preñadas con Toxovax® no protege del aborto ante el desafío con *N. caninum* (Innes y col., 2001b). Tampoco la vacunación con *N. caninum* protege a los ratones cuando el desafío es realizado con una cepa virulenta de *T. gondii* (Lindsay y col., 1998). Por otro lado, cuando se infectaron ovejas con *N. caninum* durante la mitad de la gestación, aquel grupo de animales que había sido desafiado antes de la preñez tuvo un 50% de fetos vivos (Buxton y col., 1997b). Asimismo, el aborto inducido experimentalmente con taquizoítos de *N. caninum* en bovinos fue evitado inoculando dicho protozoo antes de la preñez (Innes y col., 2001a).

Habría ventajas y desventajas al usar una vacuna viva o una vacuna inactivada en la neosporosis bovina. Al utilizar una vacuna viva, el protozoo replicaría dentro de las células ocasionando que el antígeno parasitario sea presentado con antígenos del CMH clase I quedando satisfecha la estimulación de linfocitos T CD8+, los cuales son importantes en los mecanismos de protección (Kaspar y Khan, 1998). Al aplicar una vacuna inactivada, por ejemplo taquizoítos de *N. caninum* se estaría estimulando el procesamiento de un antígeno exógeno. Por el contrario, en la enfermedad natural se generaría el procesamiento de antígenos endógenos por ser *N. caninum* un parásito intracelular obligado siendo de esta manera disímil la

respuesta celular generada. Sin embargo, queda por dilucidarse si una vacuna, aún siendo inactivada no protege contra el aborto en rodeos naturalmente expuestos. Más aún, existen graves desventajas al usar una vacuna viva existiendo posibilidad de ocasionar infección crónica y transmisión vertical persistente.

La seguridad e inocuidad de una vacuna inactivada debería compensarse con el desarrollo de un apropiado adyuvante con adecuado sistema de liberación que garantice una buena respuesta inmune. Choromanski y Block (2000) han descrito que un inmunógeno inactivado genera altos títulos de anticuerpos séricos siendo inocuo y seguro. Una vacuna inactivada con Havlogen como adyuvante (NeoGuard®) ha sido recientemente aprobada por el Departamento de Agricultura de los EE.UU. Un laboratorio privado (Intervet) describe en su boletín técnico que la vacuna es segura para su uso en bovinos preñados sanos. En uno de sus ensayos, vaquillonas preñadas vacunadas con 2 dosis a los 56 y 77 días de gestación en forma subcutánea (SC) fueron posteriormente desafiadas con un inóculo intramuscular a los 95 días de gestación. El grupo de 18 animales sin inmunizar tuvo una tasa de abortos del 22%. Las 18 vaquillonas inmunizadas tuvieron terneros vivos y sanos. Como contrapartida, otro trabajo demostró que aquel inmunógeno no previene la transmisión vertical de *N. caninum* en bovinos (L. Purtle y col., citado por Innes y col., 2002). Recientemente, los efectos de la vacunación fueron evaluados en novillos engordados en corrales. Después de la vacunación existió un aumento

transitorio del consumo y ganancia diaria de peso en el grupo tratado. Asimismo, no hubo diferencia en el rendimiento, peso vivo o peso y calidad de la res (Barling y col., 2003).

Los niveles inmunitarios alcanzados por la vacunación podrían comprometer la interfase materno fetal. El rol perjudicial del sistema inmune quedó parcialmente demostrado en un estudio donde ratones experimentalmente inoculados presentaron una alta tasa de abortos, aunque *N. caninum* no fue observada en los tejidos fetales (Long y Baszler, 1996). Altos niveles de IFN- γ fueron inducidos por la vacunación con taquizoítos inactivados y 2 de 7 vaquillonas perdieron la preñez antes del desafío experimental; sin embargo dichas pérdidas reproductivas no fueron asociadas al inmunógeno (Andrianarivo y col., 2000). En aquel estudio, los animales fueron vacunados a los 35 y 63 días de gestación cuando la respuesta Th2 está aún debilitada. Ante esta circunstancia, podría resultar apropiado inmunizar los animales cuando la respuesta Th2 se encuentra solidamente constituida. Por otro lado, la mayoría de los abortos por *N. caninum* en casos de campo ocurren durante el segundo tercio de la gestación siendo este un período crítico y de aparente susceptibilidad (Dubey, 1999a). Durante este período los animales seronegativos naturalmente expuestos tuvieron mayor riesgo de aborto que aquellos animales seropositivos (McAllister y col., 2000). La estimulación inmune durante el segundo tercio de la gestación en animales seronegativos podría

ser una medida de prevención a los fines de evitar brotes de abortos en animales sin previa exposición al protozoo.

Es necesario comprender los mecanismos inmunológicos capaces de controlar la infección por *N. caninum* sin comprometer el normal transcurso de la preñez. Estudios no sólo experimentales (Innes y col., 2001b) sino también de campo (McAllister y col., 2000) avalan la presencia de mecanismos inmunes que protegen contra el aborto en animales crónicamente infectados. Más aún y como ya fue mencionado en esta recopilación, se ha observado que la repetición de abortos es un raro evento (Anderson y col., 1995; Wouda y col., 1998). Si bien se ha logrado inducir el aborto cuando la inoculación experimental se realizó en vacas libres de infección (Williams y col., 2000; Innes y col., 2001a), dicho evento no fue observado cuando el desafío se realizó a las 10 semanas de gestación en vacas naturalmente infectadas (Williams y col., 2003). Un inmunógeno inactivado capaz de inducir una respuesta inmune comparable a la observada en animales crónicamente infectados podría resultar de interés para evitar el aborto sin tener los riesgos de las vacunas vivas.

Sobre la base de los antecedentes previamente expresados se propone la siguiente hipótesis y objetivos:

HIPOTESIS

*“La respuesta inmune celular y humoral generada por la inoculación de taquizoítos inactivados de *N. caninum* en vaquillonas durante el 2º tercio de*

la gestación es similar a la observada en vaquillonas naturalmente infectadas".

OBJETIVOS

- 1) Desarrollar un inmunógeno de *N. caninum*;
- 2) Comparar la IMC e IMA entre bovinos inoculados con taquizoítos de *N. caninum* inactivados y bovinos crónicamente infectados.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Origen de los animales

Se utilizaron vaquillonas vírgenes de un rodeo lechero de raza Holando Argentino, libre de brucelosis y tuberculosis, del INTA Balcarce. El promedio de producción anual de leche en dicho rodeo oscila entre 15 a 17 litros por animal. El servicio se realiza con toros aptos y de sanidad probada en los meses de abril-mayo-junio y septiembre-octubre-noviembre. Los intervalos parto-concepción y parto-parto son adecuados (promedio: 65 y 360 días, respectivamente) sin embargo, la tasa de abortos anual es 6-10%.

Estudios previos e información epidemiológica disponible permiten establecer que la neosporosis se comporta en el rodeo como una entidad endémica desde el año 2000. La prevalencia actual del hato discriminando entre vacas adultas, vaquillonas y terneras es del 24, 14 y 20%, respectivamente. Asimismo, se han identificado abortos esporádicos causadas por *N. caninum* mediante pruebas serológicas y técnicas histopatológicas aplicadas en fluidos y tejidos de fetos abortados.

2.2. Animales y diseño experimental

Un grupo de 26 vaquillonas nacidas entre septiembre del 2000 y septiembre 2001 fueron monitoreadas serologicamente mediante IFI cada 30 días durante 12 meses previos al servicio determinándose que 6 de ellas eran seropositivos con títulos \geq a 1:200 (Reichel y Drake, 1996). De igual forma, se

investigó la serología materna resultando seropositivas sólo las madres de las 6 vaquillonas mencionadas anteriormente.

Un mes preservicio, las vaquillonas fueron inmunizadas con una vacuna inactivada (Poligen base, BIOGENESIS®, Argentina) de herpesvirus bovino tipo 1 (HVB-1) y vDVB tipos 1 y 2 aplicada en 2 dosis con intervalo de 21 días en forma SC. Todas las vaquillonas resultaron seronegativas a *T. gondii* mediante la técnica de microaglutinación (Desmonts y Remington, 1980).

Considerando parámetros reproductivos para ganado lechero las 26 vaquillonas fueron sometidas a examen clínico, ginecológico y pelvimetría (Campero y col., 1995). Veintiuna de las 26 vaquillonas resultaron aptas para servicio. Finalmente, las vaquillonas fueron sincronizadas mediante una prostaglandina sintética (cloprostenol; Estrumate, COOPERS®, Alemania) aplicada en 2 dosis de 2ml por vía IM y 11 días de intervalo. Inmediatamente luego de la 2º dosis de prostaglandina se realizó el servicio a corral durante 7 días con 6 toros de raza Hereford reproductivamente aptos y libres de brucelosis, tuberculosis y enfermedades venéreas. Las vaquillonas y toros fueron alojados en 3 corrales formando grupos de 7 hembras y 2 machos cada uno.

Los animales permanecieron alojados en dichos corrales recibiendo agua a voluntad y una ración compuesta por silo de plata entera de maíz, pellets de girasol, urea y núcleo vitamínico mineral a razón de 11,4 kgs de materia seca administrados una vez por día.

A los 45 días de iniciado el servicio a corral, se evidenció mediante ecografía que 9 animales estaban preñados. Tres de las 9 vaquillonas eran seropositivas por IFI (Cuadro 3). Así, se formaron tres grupos experimentales:

Grupo 1: 3 animales infectados naturalmente (seropositivas por IFI e hijas de madres seropositivas);

Grupo 2: 4 animales inoculados con taquizoítos inactivados de *N. caninum*;

Grupo 3: 2 animales controles inoculados con un lisado de monocitos bovinos (MB).

El período de estudio se extendió desde la semana 13^o a la 25^o de gestación aproximadamente. La viabilidad fetal fue comprobada mediante ecografía y palpación transrectal cada 30 días hasta finalizar el ensayo. Asimismo, al finalizar la gestación se registró el nacimiento de los mismos.

2.3. Cepa de *N. caninum* e inmunógeno

Para elaborar el inmunógeno se utilizó una cepa patógena de *N. caninum* (NC-1) (Dubey y col., 1988) gentilmente cedida por la Dra. Cecilia Venturini, Laboratorio de Inmunoparasitología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.

Los taquizoítos de *N. caninum* se multiplicaron en cultivos celulares (MB) mantenidas en atmósfera con 5% de CO₂ y medio RPMI-1640 (SIGMA; St. Louis, EE.UU.) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), N-2-hidroxietilpiperazina-N´2 sulfonato de etanol (HEPES), L-glutamina (10µg/ml),

penicilina-estreptomicina (10 μ g/ml) y anfotericina B (20 μ g/ml). A partir de la inoculación con taquizoítos, la monocapa de células se mantuvo en medio suplementado conteniendo 2% de SFB. Veinticuatro a 48 horas antes de efectuarse la cosecha de taquizoítos, el medio de cultivo fue descartado cambiándose por medio sin suero. Los taquizoítos fueron cosechados durante su fase intracelular cuando un 80% de células de la monocapa estuvieron infectadas. El medio de cultivo fue descartado y una solución salina tampón estéril (SSTE) fue agregada (Apéndice 1). Las células fueron desprendidas mediante el uso de un raspador estéril. La suspensión de células conteniendo el antígeno fue recolectada en tubos para centrifuga efectuándose un lavado en SSTE (Andrianarivo y col., 1999).

El material recolectado fue pasado estérilmente a través de jeringas y agujas de 21 a 27 G de diámetro para liberar los taquizoítos intracelulares. Este material fue centrifugado a 2000g durante 10 minutos eliminándose el sobrenadante (SBN) y resuspendiéndose nuevamente en SSTE. Posteriormente, el antígeno fue parcialmente purificado de restos celulares utilizando filtros estériles de 5 μ m de porosidad (Millipore, MILLEX®; Bedford, MA 01730, EE.UU.). La purificación fue parcial debido a que los taquizoítos no fueron totalmente separados de los restos y proteínas con tamaño menor a 5 μ m pertenecientes a MB. Finalmente, se ajustó una concentración de 1.35×10^8 protozoos/ml de inmunógeno mediante el recuento en cámara de Neubauer.

Los taquizoítos fueron inactivados utilizando bromoetilenamina binaria (BEI) (SIGMA; St. Louis, EE.UU.) a una concentración final de 0,01M por un período de 96 hs a 4° C seguido por neutralización con 1M de tiosulfato de sodio. El BEI ha sido exitosamente utilizado para inactivar taquizoítos de *N. caninum* (Andrianarivo y col. 1999) y su mecanismo de acción sería, al igual que en los virus, un efecto negativo sobre los ácidos nucleicos y preservación la forma de las proteínas antigénicas (Bahnemann, 1990). En este trabajo, la inactivación de la suspensión de taquizoítos fue comprobada mediante la inoculación del material inactivado en cultivos celulares, los cuales fueron controlados durante un mes sin observarse infección o proliferación parasitaria.

Utilizando una alícuota de la suspensión inactivada de taquizoítos (y también del lisado de MB, el cual se preparó e inactivó en forma similar) se determinó la concentración protéica del antígeno mediante un kit comercial (Micro BCA® Protein Assay, PIERCE; EE.UU.) (Apéndice 2). La concentración de la suspensión inactivada de taquizoítos y del lisado de MB fue 30mg/ml y 23mg/ml, respectivamente.

2.4. Adyuvante

El adyuvante oleoso de INTA formulado con 13% de Arlacel C, 85% de Marcol 52 y 2% de Tween 80 fue utilizado en la preparación del inmunógeno constituyendo el 70% de la preparación final. Dicha emulsión fue utilizada para obtener una importante producción de anticuerpos contra el antígeno

de interés (Allison y Byars, 1986). Así, cada dosis de inmunógeno quedó constituido por 1,5 ml de la suspensión acuosa con taquizoítos inactivados y 3,5 ml de adyuvante, los cuales fueron posteriormente homogeneizados por agitación creándose una emulsión estable. El lisado de monocitos bovinos no infectados para el grupo control negativo fue preparado similarmente.

2.5. Inmunomodulador

Se utilizó un inmunoestimulante inespecífico formado por lipopolisacáridos (LPS) y fracciones ribosomales de cepas no patogénicas de *Escherichia coli* (Ribozím RN-205, NEOMAR®, Argentina). Los LPS aumentan la expresión de antígenos del CMH clase I y II sobre la superficie de células presentadoras de antígeno (Otsuka y col., 1991) ocasionando una eficiente respuesta inmune a determinados antígenos (Romera y col., 1999; Zamorano y col., 2002).

2.6. Dosis y metodología de aplicación

Los grupos experimentales 2 y 3 fueron inoculados con taquizoítos inactivados de *N. caninum* y un lisado de MB respectivamente, en tres dosis de 5 ml por vía SC en la tabla del cuello alternando los sitios de aplicación (1° dosis en la zona cervical alta, lado izquierdo; 2° dosis en la zona cervical alta, lado derecho; 3° dosis en la zona cervical baja, lado izquierdo) las cuales se aplicaron a las 13°, 15° y 17° semanas de gestación aproximadamente (Figura 4).

La respuesta granulomatosa causada por la inyección del inmunógeno o el lisado de MB fue observada y palpada a las 2 semanas post-inoculación clasificándose arbitrariamente como leve (hasta 2,5 cm de diámetro), moderada (entre 2,5 y 5 cm de diámetro) y severa (>5 cm de diámetro).

Los animales de los grupos experimentales 2 y 3 fueron además inoculados con el inmunomodulador por vía IM en la zona glútea a la dosis de 3 ml siguiendo las recomendaciones del laboratorio elaborador.

2.7. Muestras

2.7.1. Obtención de muestras para serología, prueba de linfoproliferación y producción de IFN- γ

Se obtuvieron muestras de sangre con y sin anticoagulante mediante punción yugular a intervalos regulares de 2 semanas durante el 2º tercio de la gestación. Los muestreos se realizaron a las 13º (tiempo 0); 15º (tiempo 1); 17º (tiempo 2); 19º (tiempo 3); 21º (tiempo 4); 23º (tiempo 5) y 25º (tiempo 6) semanas de gestación, aproximadamente (Figura 4).

Las muestras de sangre para serología se recolectaron en tubos de vidrio sin anticoagulante para posterior realización de pruebas de IFI (Dubey y col., 1988) y ELISA indirecto para determinación de isotipos de Ig (IgG₁ e IgG₂) (Williams y col., 1997, Andrianarivo y col., 2000).

Para la realización de la prueba de linfoproliferación y producción de IFN- γ se obtuvieron muestras de sangre entera con heparina estéril (PARSONS®, Argentina). El anticoagulante se diluyó en SSTE (1:5) utilizándose

10µl de heparina diluida por cada ml de sangre. Debido a que los animales se encontraban localizados aproximadamente a 400 kilómetros de distancia del lugar donde se realizó el cultivo de linfocitos (Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias, INTA, Castelar), el tiempo transcurrido entre la extracción de las muestras de sangre y el inicio de los mismos fue 8 horas aproximadamente.

2.7.2. Obtención de muestras de suero de los terneros nacidos de las vaquillonas involucradas en el ensayo

A los fines de obtener suero para realizar la prueba de IFI se recolectaron muestras de sangre de los terneros nacidos. Dichos muestreos, realizados una vez por mes, se iniciaron después de que los terneros tomaron calostro y se prolongaron hasta los 6 meses de edad.

2.8. Evaluación de la respuesta humoral

2.8.1. Obtención del antígeno de *N. caninum* para las pruebas de IFI y ELISA indirecto anti-isotipos

El cultivo y cosecha de taquizoítos para preparar el antígeno para IFI fueron realizados en forma similar a la obtención del inmunógeno (ver 2.3.). Sin embargo, luego de la cosecha se realizó el recuento de protozoos mediante cámara de Neubauer llevándose a la concentración de 10^7 taquizoítos/ml. Luego, se depositó 5µl de la suspensión con taquizoítos sobre los orificios de los portaobjetos (con 15 orificios de 3 mm de diámetro cada

uno) para inmunofluorescencia (ICN®; EE.UU.). Se recolectó la gota antigénica y se dejó una película húmeda para facilitar el secado a temperatura ambiente (TA). El antígeno fue fijado sumergiendo los portaobjetos en metanol durante 1 minuto y almacenado a -20°C hasta su utilización (Dubey y col., 1988).

El antígeno para la prueba de ELISA se obtuvo a partir de taquizoítos cultivados en células VERO (células renales de mono verde africano) crecidas en aerobiosis a 37°C en Minimum Essential Medium (MEM, Gibco BRL, EE.UU.), suplementado con 10% de SFB, L-glutamina ($10\mu\text{l/ml}$), penicilina-estreptomicina ($10\mu\text{l/ml}$) y anfotericina B ($20\mu\text{l/ml}$). A partir de la inoculación con taquizoítos, la monocapa de células se mantuvo con MEM suplementado con 3% de SFB. Después de 72 hs. post-inoculación se reemplazó por medio sin suero. La cosecha fue realizada cuando hubo un 50% de lisis en la monocapa celular. La purificación parcial del antígeno se logró como fue mencionado para el inmunógeno (ver 2.3.).

2.8.2. Prueba de IFI

Los sueros problema fueron diluidos en SSTE (pH 7,2) suplementada con 1% de albúmina sérica bovina (ASB) (Sigma, A3059) (Apéndice 3). Se efectuaron diluciones séricas al doble hasta título final comenzando con 1:25. Luego las muestras fueron expuestas al antígeno e incubadas en cámara húmeda durante 40 minutos. Posteriormente, los portaobjetos se lavaron con SSTE (pH 9,2) (Apéndice 4) en agitador magnético durante 10

minutos. Posteriormente, se agregó un conjugado de inmunoglobulina de conejo anti-IgG₁ -IgG₂ bovina marcado con fluoresceína (SIGMA; St. Louis, EE.UU.), se incubó por 40 minutos y se efectuó un último lavado con SSTE (pH 9,2). Los portaobjetos fueron montados en glicerol y examinados en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Fluophot, 40 X 1,3) (Dubey y col., 1988). En todos los casos se utilizaron controles positivos y negativos (VMRD, Inc.; Pullman, EE.UU.).

2.8.3. Prueba de ELISA

Se utilizó una técnica de ELISA indirecta para la determinación de isotipos de IgG (Williams y col., 1997; Andrianarivo y col., 2000) con modificaciones: se ajustó una concentración de 10^7 protozoos/ml y luego, 50 μ l de SSTE conteniendo 5×10^5 taquizoítos fueron depositados en cada pocillo de placas Immulon 1^B (DYNATECH, EE.UU.). Los pocillos A1, B1, fueron controles blancos sin antígeno. Los pocillos C1 a H1 fueron sensibilizados con una solución conteniendo fragmentos de células VERO libres de infección obtenidos según descripción previa (2.3.). Las placas se incubaron a 4° C durante toda la noche. Posteriormente se agregaron a cada pocillo 50 μ l de una SSTE con 4% de formol incubándose las placas durante 10 minutos a TA. Se lavó con SSTE adicionada con 0,05% de Tween 20 (SSTE/Tween) y se agregó a cada pocillo 100 μ l de SSTE/Tween conteniendo 1% de suero normal de conejo (SNC_o). Luego las placas fueron mantenidas a -20° C hasta su uso.

Para la prueba, las placas fueron descongeladas, lavadas y bloqueadas por 1 h. con SSTE/Tween conteniendo 5% de SNCo. Los sueros fueron diluidos en SSTE/Tween a títulos dobles desde 1:25 hasta título final. Los sueros diluidos fueron agregados en alícuotas de 100 µl utilizando un único pocillo para cada dilución. Las placas se incubaron durante 2 hs. a 22° C y luego fueron lavadas nuevamente con SSTE/Tween. Posteriormente a cada muestra problema se adicionaron 100 µl de un anticuerpo monoclonal (Ac-Mo) anti-IgG₁ o IgG₂ bovina (SEROTEC®; Oxford, Inglaterra) según el caso. Las placas se incubaron durante 1h. a 22° C y se lavaron nuevamente con SSTE/Tween. Luego se agregaron 100 µl de un anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa (SIGMA; St. Louis, EE.UU.) incubándose por 1h. a 22° C. Se realizó el último lavado con SSTE/Tween y se reveló la unión de antígeno-anticuerpo utilizando 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin sulfonato) (ABTS) (SIGMA; St. Louis, EE.UU.) diluido en solución de citrato (pH 5) con H₂O₂ como substrato (Apéndice 5). Las densidades ópticas (DO) obtenidas se registraron utilizando un lector de ELISA (LABSYSTEMS MULTISKAN®, Plus; Finlandia) a 405 nm.

El título serológico final de cada suero problema fue establecido considerando aquella DO que estuviese en el rango del promedio de los sueros controles negativos más 3 desvíos estándar. El título serológico final de cada suero para IgG₁ e IgG₂ fue transformado al log₁₀ de la inversa de la dilución. La relación entre IgG₁ : IgG₂ fue expresada como un índice entre el log₁₀ para IgG₁/log₁₀ para IgG₂ (Romera y col., 2001).

2.9. Evaluación de la inmunidad mediada por células

2.9.1. Preparación del antígeno para las pruebas de linfoproliferación y determinación de IFN

Se produjeron 1×10^9 taquizoítos en MB, los cuales fueron lavados en SSTE, parcialmente purificados mediante filtrado y concentrados por centrifugación como se mencionó anteriormente (ver 2.3.). Los protozoos se suspendieron luego en 2ml de H₂O bidestilada; la suspensión obtenida fue congelada y descongelada en tres oportunidades para lograr la fragmentación y ruptura de los taquizoítos. Además, esta solución fue sonicada durante 6 ciclos de 30 segundos cada uno a 4° C (Sonicador Modelo W-375; Heat Systems-Ultrasonics, INC, EE.UU.). A los fines de determinar la ruptura completa de los taquizoítos, dicha suspensión fue examinada al microscopio óptico a objetivos de 10x y 45x. El lisado fue clarificado centrifugando a 10000g por 30 minutos. Se obtuvo la fracción soluble en agua (FSA) y se determinó la concentración protéica utilizando la metodología anteriormente mencionada (ver 2.3.). El antígeno fue almacenado en alícuotas de 50 µl a -80° C hasta su uso (Innes y col., 1995). Similarmente se preparó una FSA a partir de cultivos de MB, la cual se utilizó como control negativo en las pruebas de linfoproliferación y determinación de IFN-γ.

2.9.2. Prueba de linfoproliferación

Se utilizó la técnica descrita por Williams y col., (2000) con menores modificaciones. Las muestras de sangre entera de los animales infectados naturalmente, inoculados con taquizoítos inactivados y controles se recolectaron en jeringas de 20ml con heparina estéril para luego volcarse en tubos de centrifuga de 50ml. Se centrifugaron a 1000g durante 20 minutos a 4° C, se recolectó la capa de leucocitos los cuales fueron resuspendidos en 3 ml de SSTE. La resuspensión se colocó sobre 4 ml de un gradiente de separación comercial (densidad 1,077 g/ml) (Linfoprep®, NYCOMED PHARMA AS; Oslo, Noruega) en tubos cónicos de 15 ml. Luego se centrifugo a 2100g durante 30 minutos a 20° C. Se recolectó la banda de leucocitos y se resuspendió en medio RPMI con 5% de SFB. Así, se realizaron 3 lavados, centrifugando a 1000g durante 10 minutos a 4° C. Finalmente las CMSP fueron resuspendidas en 1ml de RPMI conteniendo 10% de SFB y suplementado con L-glutamina, HEPES, 2-mercaptoetanol, piruvato y penicilina-estreptomicina. Las CMSP se colorearon con una solución de azul tripán al 5% en SSTE y se contaron en cámara de Neubauer. Luego se realizaron las diluciones correspondientes para ajustar una concentración de 2.5×10^5 células/100µl/pocillo. Los leucocitos se cultivaron en placas (Nuncion®, EE.UU.) de 96 pocillos formándose 4 grupos: a) no estimuladas, b) estimuladas con mitógeno Concanavalina A (SIGMA; St. Louis, EE.UU.), c) estimuladas con lisado de taquizoítos de *N. caninum*, d) lisado de MB. Se

utilizaron tres pocillos para cada uno de estos grupos y para cada animal. Las placas se incubaron por 5 días en estufa a 37° C y 5% de CO₂. Luego de 5 días de incubación se adicionaron 20 µl de timidina [H³] por pocillo. Las placas se incubaron por 18 hs. para luego cosechar (Cosechador, Skatron, UK) y leer en contador de centelleo (LKB, Wallac, 1219 Rackbeta). Los resultados se obtuvieron como cuentas por minuto (c. p. m.) considerando el promedio de los tres pocillos asignado a cada grupo (no estimuladas, estimuladas con Concanavalina A, con lisado de taquizoítos de *N. caninum*, o lisado de MB). Finalmente, los resultados se expresaron como índice de estimulación (IE: promedio de las c. p. m. del cultivo de leucocitos estimulado con lisado de taquizoítos de *N. caninum*/promedio de las c. p. m. del cultivo de leucocitos estimulado con lisado de MB).

Similarmente se extrajeron y cultivaron CMSP para medir la producción de IFN-γ en el SBN. Se ajustó la concentración de células (1,5 x 10⁶ células/100µl/pocillo) y se utilizó placas fondo en U (Nunclon®, EE.UU.). Además, 100µl de SBN fueron descartados transcurridas 24 horas agregándose medio de cultivo fresco. Las placas se incubaron durante 4 días más, y luego cada SBN se recolectó y congeló para posterior determinación de la producción de IFN-γ por ELISA (Williams y col., 2000).

2.9.3. Prueba de ELISA para la determinación de IFN-γ

Se utilizaron placas Immulon 1^B (DYNATECH, EE.UU.) sensibilizadas durante 12 hs. con un Ac-Mo anti-IFN-γ bovino (gentilmente cedido por la

Dra. Patricia Zamorano, Instituto de Virología, INTA, Castelar), el cual fue utilizado a la dilución de 1:2500. Las placas fueron posteriormente lavadas 5 veces con SSTE. Se realizó el "bloqueo" con 120 μ l de RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB durante 2 hs. a TA. Luego se adicionaron 100 μ l del SBN de los cultivos a probar utilizándose un pocillo por determinación. Después de ser incubadas durante 4 hs. a TA y 12 hs. más a 4° C, las placas fueron lavadas 6 y 4 veces con H₂O destilada y SSTE/Tween, respectivamente. Se agregó 100 μ l por pocillo de un anticuerpo de conejo anti-IFN- γ bovino diluido (1:200) (producido por la Dra. Patricia Zamorano) en ASB al 1%. Luego las placas se incubaron durante 1 h. a TA. Las mismas fueron lavadas 4 veces con SSTE/Tween. Entonces, se agregaron 100 μ l de un anticuerpo de cabra biotinilado anti-IgG de conejo (1:6000) (Kirkegaard Perry Laboratories, KPL 2mg; Gaithersburg, Maryland, EE.UU.) diluido en ASB al 1%. Las placas se incubaron durante 1 h. a TA. Nuevamente se lavó 5 veces con SSTE/Tween y se agregaron 100 μ l de estreptavidina- fosfatasa alcalina (1:1200) (Kirkegaard Perry Laboratories, KPL; Gaithersburg, Maryland, EE.UU.). Las placas fueron incubadas durante 1 h. a TA y los últimos 5 lavados fueron realizados con SSTE. Finalmente se agregaron 100 μ l de p-nitrofenil fosfato disódico (SIGMA; St. Louis Mo 63178; EE.UU.). Las placas se leyeron a 405 nm transcurridos los 5, 25 y 35 minutos.

Las concentraciones de IFN- γ fueron calculadas usando una curva estándar obtenida a partir de diluciones de IFN- γ recombinante (Novartis).

Las concentraciones de IFN- γ recombinante usado para establecer la curva estándar fueron 0,001; 0,01; 0,1; 1 ng/ml.

2.10. Análisis estadístico

Las respuestas séricas, IE y producción de IFN- γ fueron analizadas mediante análisis de la varianza para medidas repetidas en el tiempo utilizando el procedimiento MIXED del SAS® (Littell y col., 1998). Los datos fueron transformados a \log_{10} previo al análisis estadístico. Las diferencias se consideraron significativas para valores de $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Respuesta inmune mediada por anticuerpos

3.1.1. Serología: títulos de anticuerpos específicos anti-*N. caninum*

Los títulos de anticuerpos a *N. caninum* a través del 2º tercio de la gestación fueron variables en las vaquillonas infectadas naturalmente observándose un aumento significativo a la 19ª semana de gestación ($P < 0,05$) (Figura 5). Este aumento (promedio: 3467 ± 2810) se produjo por incrementos en el título de anticuerpos de los animales 27 y 116 los cuales pasaron de 1:800 a 1:3200 y 1:6400, respectivamente (Figura 6 y Cuadro 4). El título serológico permaneció estable durante la 19ª semana en el animal 120, sin embargo se incrementó en la 21ª semana de gestación (Figura 6 y Cuadro 4). La dinámica sérica continuó estable durante las semanas 21ª a 25ª sin observarse diferencias significativas ($P > 0,05$), sin embargo los títulos séricos fueron relativamente altos en los animales 27 y 116 y bajos en el animal 120. (Figura 6 y Cuadro 4).

Después de la inoculación con taquizoítos inactivados, las cuatro vaquillonas seronegativas desarrollaron una respuesta específica demostrable por la técnica de IFI. Los títulos de anticuerpos a *N. caninum* a través del 2º tercio de la gestación fueron variables en las vaquillonas inoculadas con taquizoítos inactivados existiendo interacción entre tratamiento y tiempo ($P < 0,05$) (Figura 5). Los títulos serológicos se incrementaron paulatinamente (promedio 450 ± 252) durante la 2ª semana posterior a la 1ª dosis de inmunógeno (15ª semana de gestación). Después

de la 2° dosis de inmunógeno (17° semana de gestación), los títulos serológicos siguieron en aumento (promedio 7200 ± 4027) con diferencias significativas respecto a los títulos serológicos alcanzados después de la 1° dosis ($P < 0,0001$). Aunque el nivel de anticuerpos siguió incrementándose después de la 3° dosis (promedio 14400 ± 8053) para alcanzar su máximo durante la semana 23° de la gestación (promedio 16000 ± 6400); los títulos serológicos no presentaron diferencias dentro del grupo inoculado con taquizóitos inactivados durante las semanas 17° a 25° ($P > 0,05$). Los niveles de anticuerpos descendieron (promedio 11200 ± 3200) hacia el final del experimento (semana 25° de la gestación) (Figuras 5 y 7).

Los títulos serológicos alcanzados (promedio 450 ± 252) durante la 2° semana posterior a la 1° dosis de inmunógeno (15° semana de gestación) no tuvieron diferencias significativas con aquellos encontrados en el grupo de vaquillonas infectadas naturalmente. A partir de la 19° semana de gestación, la respuesta inmune humoral de los animales infectados naturalmente y aquella de los animales inoculados con taquizos tuvieron diferencias significativas ($P < 0,01$) siendo más altos los títulos de anticuerpos anti-*N. caninum* en el último grupo de animales. Finalmente, las vaquillonas de grupo 3 permanecieron seronegativas a *N. caninum* durante todo el experimento.

3.1.2. Isotipos de inmunoglobulinas

En las vaquillonas infectadas naturalmente se observaron dos tipos de respuestas séricas caracterizadas por predominio de IgG₂ en los animales 27 y 120; y presencia de IgG₁ en el animal 116 (Cuadro 5 y Figuras 8, 9 y 10). Aunque el índice IgG₁ : IgG₂ fue inferior a 1 durante las semanas 13^o, 19^o, 21^o, 23^o y 25^o en los animales 27 y 120, hubo similares títulos de isotipos de IgG en las 15^o y 17^o semanas de la gestación (Cuadro 5 y Figuras 8 y 10). Una marcada respuesta humoral con presencia única de IgG₁ se encontró en el animal 116. Este constituyó un hallazgo constante durante todo el período experimental alcanzando un índice IgG₁ : IgG₂ máximo de 5 en la semana 21^o de la gestación (Cuadro 5 y Figura 9).

En los animales inoculados con taquizoítos inactivados existió una respuesta humoral mixta encontrándose ambos isotipos de IgG (Figuras 11, 12, 13 y 14). Los índices de IgG₁ : IgG₂ variaron desde 1,2 a 0,9 después de las 1^o, 2^o y 3^o dosis de inmunógeno (15^o, 17^o y 19^o semanas de la gestación, respectivamente) (Cuadro 5). Sin embargo, se observó una disminución de dicho índice durante las semanas 21^o, 23^o y 25^o en los animales 31, 55 y 72 (Cuadro 5). En el animal 42 la producción de IgG₁ e IgG₂ fue similar teniendo un índice igual a 1 en las semanas 21^o, 23^o y 25^o de la gestación (Cuadro 5).

Después de la inoculación con el lisado de MB, los animales controles negativos presentaron mínimos aumentos en las DO cuando los sueros eran depositados en hoyuelos sensibilizados con células VERO (datos no presentados). Por otro lado, los sueros de animales inoculados con antígeno

de *N. caninum* se comportaron como los sueros de animales inoculados con lisado de MB cuando fueron enfrentados con antígeno de células VERO.

3.2. Respuesta inmune mediada por células

3.2.1. Proliferación de las células mononucleares de sangre periférica

Previo a la inoculación no hubo diferencias en la respuesta de linfoproliferación específica a *N. caninum* entre animales infectados naturalmente y animales inoculados con taquizoítos inactivados ($P > 0,05$). Asimismo no hubo diferencias entre tratamientos durante el período experimental ($P = 0,068$). Sin embargo, se observaron interacción entre tratamiento y tiempo ($P = 0,01$), y diferencias significativas a través del tiempo ($P = 0,003$) debidas a una respuesta de proliferación específica a *N. caninum* durante la semana 19^o en el grupo de animales infectados naturalmente (Figura 15). Esta diferencia se debió a índices de estimulación de 4,2 y 9,1 en los animales 27 y 116, respectivamente (datos no presentados). Las variables tratamiento y tiempo no presentaron diferencias significativas para el grupo de animales inoculados con taquizoítos inactivados y animales controles negativos ($P > 0,05$) (Figura 15).

3.2.2. Producción de IFN- γ

3.2.2.1. Niveles de IFN- γ en CMSP estimuladas con lisado de *N. caninum*

Las concentraciones de IFN- γ producidas por las CMSP de vaquillonas infectadas naturalmente, inoculadas con taquizoítos inactivados y controles

negativo presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$) siendo bajos los niveles de IFN- γ en el grupo experimental 3 (Figura 16). Sin embargo, no hubo efecto del tratamiento a través del tiempo ($P > 0,05$), y los niveles de IFN- γ producidos en el grupo 2 previo a la inmunización no tuvieron diferencias con aquellos de animales infectados naturalmente ($P > 0,05$). Esta circunstancia se debió a la producción de 133,3 y 40,7 ng/ml de IFN- γ en los animales 42 y 72 durante la semana 13^o, respectivamente (Figura 18).

Los niveles promedio de IFN- γ producidos por las CMSP del grupo de vaquillonas infectadas naturalmente fueron constantes durante el período experimental ($P > 0,05$). Sin embargo, el promedio mayor de producción de IFN- γ se observó durante la semana 21 (promedio 325 ng/ml $\pm 99,8$) (Figura 16). Por otro lado los niveles individuales de producción de IFN- γ resultaron variables en las vaquillonas infectadas naturalmente (Figura 17). Durante las semanas 15^o y 19^o no se observó producción de IFN- γ en las CMSP del animal 120 (Figura 17).

En el grupo de vaquillonas inoculadas con taquizoítos de *N. caninum* inactivados existieron variaciones individuales en los niveles de producción de IFN- γ (Figura 18). Sin embargo, las 4 vaquillonas produjeron IFN- γ desde la 2^o dosis de inmunógeno (semana 17^o de gestación) hasta el final del ensayo en la semana 25^o de gestación. El nivel promedio máximo de producción de IFN- γ (567,3 ng/ml $\pm 107,5$) en vaquillonas del grupo 2 se alcanzó durante la semana 19^o de la gestación (Figura 18). La producción de IFN- γ disminuyó paulatinamente hacia la semana 25^o de la gestación en el grupo de

vaquillonas inoculadas con taquizoítos inactivados, sin embargo dichos niveles no presentaron diferencias significativas a través del tiempo ($P > 0,05$).

Se observó producción ocasional de IFN- γ ante la estimulación con lisado de *N. caninum* en las CMSP pertenecientes al grupo de vaquillonas control negativo durante las semanas 17^o, 21^o y 23^o (Figura 16). El animal 6 produjo 49,5 y 66,9 ng/ml de IFN- γ en las semanas 17^o y 23^o, respectivamente. El animal 21 produjo 14,5 y 9,2 ng/ml de IFN- γ en la semana 21^o y 23^o.

3.2.2.2. Niveles de IFN- γ en CMSP estimuladas con lisado de MB

La producción de IFN- γ en CMSP estimuladas con MB no presentó diferencias significativas entre grupos ($P > 0,05$). Sin embargo, se observaron diferencias a través del tiempo ($P < 0,05$) (Figura 19). Ocasionalmente se observaron variaciones individuales encontrándose valores de IFN- γ incrementados en animales pertenecientes a los grupos de vaquillonas infectadas naturales e inoculadas con taquizoítos inactivados (datos no presentados).

3.2.2.3. Niveles de IFN- γ en CMSP estimuladas con Concanavalina A

La producción de IFN- γ por las CMSP estimuladas con Con A no tuvo diferencias significativas entre los grupos experimentales o a través del tiempo ($P > 0,05$) (Figura 20).

3.3. Reacciones granulomatosas post-inoculación

Las reacciones granulomatosas post-inoculación son presentadas en el Cuadro 6. Aunque se observaron reacciones granulomatosas moderadas a severas en la mayoría de los casos, las mismas fueron siempre duras y firmes al tacto.

3.4. Viabilidad fetal al culminar el experimento.

Los fetos de todas las vaquillonas presentaron signos de viabilidad durante el 7º mes de gestación. Se apreciaron reflejo podal positivo, abundantes fluidos placentarios y buen desarrollo de cotiledones.

3.5. Nacimiento de los terneros y serología por IFI.

Ocho de nueve terneros nacieron clínicamente sanos. Un ternero, hijo de la vaquillona número 31 perteneciente al grupo 2, murió por distocia. Los títulos serológicos del resto de los terneros son presentados en la figura 21. Mientras que los terneros nacidos de la vaquillonas naturalmente infectados presentaron títulos $\geq 1:200$, los terneros hijos de las vaquillonas inoculadas con taquizoítos inactivados de *N. caninum* y los terneros hijos de las vaquillonas del grupo 3 no tuvieron anticuerpos específicos a la dilución sérica de 1:25.

4. DISCUSION

Para desarrollar o evaluar un inmunógeno que prevenga la manifestación y/o difusión de la neosporosis bovina es necesario mejorar el conocimiento de la respuesta inmune a *N. caninum* (Dubey 2003; Williams y col., 2003). En la actualidad existen evidencias acerca de la memoria inmunológica desarrollada después de una exposición natural (McAllister y col., 2000; Williams y col., 2003) o experimental a *N. caninum* (Innes y col., 2001a). McAllister y col. (2000) mencionaron que durante un brote de abortos debidos a *N. caninum*, todas las vacas expuestas previamente al protozoo tuvieron menor riesgo de abortar que vacas del mismo hato que sufrieron una infección postnatal reciente. Vacas inoculadas experimentalmente con taquizoítos viables de *N. caninum* previo a la concepción no transmitieron el protozoo en forma vertical al ser posteriormente desafiadas a los 140 días de gestación (Innes y col., 2001a). Recientemente, Williams y col., (2003) demostraron que 5 vacas crónicamente infectadas desarrollaron mecanismos inmunes contra el desafío experimental realizado con taquizoítos vivos inoculados por vía EV durante la 10ª semana de gestación pariendo terneros clínicamente normales aunque congénitamente infectados. En el presente estudio, la respuesta inmune generada por la inoculación con taquizoítos de *N. caninum* inactivados alcanzó niveles similares a la observada en vaquillonas gestantes infectadas naturalmente con *N. caninum*. El desarrollo de un inmunógeno que induzca un estado de protección similar al descrito en animales crónicamente infectados

(McAllister y col., 2000; Williams y col., 2003) podría resultar de interés para prevenir el aborto en hembras gestantes expuestas a *N. caninum* por primera vez.

Se ha investigado la respuesta inmune utilizando taquizoítos inactivados de *N. caninum* empleando diferentes adyuvantes (Andrianarivo y col., 1999). La formulación combinada con un adyuvante sintético llamado Polygen (copolímero no particulado) estimuló la producción de anticuerpos y IFN- γ , los cuales resultaron similares a los ocasionados por la infección experimental (Andrianarivo y col., 1999). Sin embargo, dicha preparación no evitó la muerte fetal ocasionada por inoculación EV de taquizoítos vivos de *N. caninum* en vaquillonas gestantes (Andrianarivo y col., 2000). Aunque las vaquillonas inoculadas con taquizoítos inactivados en el transcurso de esta investigación desarrollaron títulos de anticuerpos elevados y niveles de IFN- γ similares a los observados durante el 2º tercio de la gestación de animales naturalmente infectados, la eficiencia de los probables mecanismos de protección inmune generados no fueron evaluados en el presente trabajo.

La fisiopatología del aborto por *N. caninum* ha sido parcialmente explicada, sugiriéndose que la reactivación de parásitos en animales persistentemente infectados o la incapacidad para controlar al protozoo en animales con una infección reciente serían debidos a la inmunomodulación existente en el 2º tercio de la gestación, la cual está asociada a bajos niveles de IFN- γ (Innes y col., 2002; Quinn y col., 2002). Sin embargo, ante una 2º exposición natural (McAllister y col., 2000) o experimental (Innes y col., 2001a),

los animales previamente expuestos a *N. caninum* desarrollarían mecanismos inmunes que protegen del aborto aún durante el 2º tercio de la gestación. En el presente trabajo se evaluó la respuesta inmune en animales naturalmente infectados y animales inoculados con taquizoítos inactivados durante un período de la preñez donde normalmente existe una inmunomodulación fisiológica con una respuesta predominantemente Th2 (Raghupathy, 1997; Clark y col., 1999). En el presente experimento, la respuesta inmune específica a *N. caninum* en animales inoculados con taquizoítos inactivados no sólo ocasionó títulos de anticuerpos elevados sino también niveles de IFN- γ y similares a los observados durante el 2º tercio de la gestación en animales naturalmente infectados.

Los mecanismos de protección dependientes de la IMA han sido parcialmente estudiados en la neosporosis. Trabajos realizados en ratones deficientes de células B y de anticuerpos fueron susceptibles ante la inoculación con *N. caninum* demostrando la importancia de los anticuerpos específicos (Eperon y col., 1999). Asimismo, la protección durante estadios avanzados de la enfermedad en ratones se asoció a la función de células CD4⁺ CD8⁻ que promovieron la producción de anticuerpos (Tanaka y col. 2000). En los bovinos, el aumento del título de anticuerpos es un buen indicador de la reactivación parasitaria durante la gestación de animales crónicamente infectados aunque puede asociarse indistintamente al aborto o nacimiento de terneros infectados congénitamente (Stenlund y col., 1999; Guy y col., 2001; Williams y col., 2003). En este trabajo, dos de las vaquillonas

naturalmente infectadas (27 y 116) manifestaron un claro aumento del título de anticuerpos durante el 2º tercio de la gestación (Cuadro 4 y Figura 6), lo cual pudo estar asociado a una reactivación parasitaria. Por otro lado, el mantenimiento constante de los títulos serológicos durante la gestación, como fue observado en este estudio en la restante vaquillona naturalmente infectada (120) (Cuadro 4 y Figura 6), puede observarse en hembras seropositivas que paren terneros seronegativos (Guy y col., 2001).

Se ha postulado que el desarrollo de anticuerpos específicos probablemente limita la parasitemia o facilita la lisis de los taquizoítos extracelulares (Hemphill, 1999). Mas aún, considerando la brevedad del estado extracelular de *N. caninum* en los hospedadores intermediarios, se ha sugerido que el rol de los anticuerpos tendría relevancia como mecanismo de protección (Hemphill y col., 2000). El título de anticuerpos generado por la inmunización con antígeno de *N. caninum* inactivado utilizando una estrategia de inoculación con 3 dosis a intervalos de 4 semanas y detectado mediante IFI resultó relativamente bajo variando de 747 a 1813 (inversa de la dilución) (Andrianarivo y col., 1999). Mas aún, una de las formulaciones que ocasionó bajos títulos séricos falló ante el desafío experimental de hembras gestantes con taquizoítos inoculados por las vía EV e IM observándose fetopatía y muerte fetal (Andrianarivo y col., 2000). En este trabajo, los niveles de anticuerpos generados por la inmunización con 3 dosis a intervalos de 2 semanas fueron superiores a los observados en animales infectados naturalmente alcanzándose un título máximo promedio de 16000 (inversa de

la dilución). Como contraparte, Choromanski y Block (2000) utilizaron un plan de vacunación con 2 dosis a intervalo de 28 días alcanzando títulos máximos de anticuerpos de 1:40960 aún 28 días después de la 2ª dosis. Por otro lado es contradictorio el hecho de que Choromanski y Block (2000) usando adyuvantes similares (Havlogen y Bay R-1005) a los utilizados por Andrianarivo y col., (1999) hayan encontrado tales diferencias en los niveles de anticuerpos inducidos. En la neosporosis bovina, la protección asociada al desarrollo de altos títulos serológicos deberá ser motivo de investigación futura.

Diferentes estudios realizados en ratones han mencionado que el desarrollo de anticuerpos asociados a una disminución de las lesiones patológicas o mortalidad causadas por la inoculación de *N. caninum* son predominantemente del isotipo IgG₂ siendo bajos o nulos los niveles de IgG₁ (Long y col., 1998; Baszler y col., 1999b; Eperon y col., 1999). En inoculaciones experimentales realizadas con taquizoítos vivos de *N. caninum* en bovinos, la respuesta humoral se caracterizó por elevados niveles de IgG₂ (Williams y col., 2000). Aunque la producción "in vitro" de IgG₁ e IgG₂ en los bovinos está regulada por la producción de IL-4 e IFN- γ , respectivamente (Estes y col., 1994; 1995), se ha sugerido que la producción de IgG₂ en el bovino podría estar regulada por otros factores distintos del IFN- γ (Tuo y col., 2000). Mas aún, en otro desafío experimental con taquizoítos vivos de *N. caninum*, se observaron variadas respuestas inmunes con predominio de IgG₁, predominio de IgG₂ o incluso similares niveles de IgG₁ e IgG₂, las cuales no tuvieron

asociación con la producción de IFN- γ (Andrianarivo y col., 2001). En las infecciones naturales, la relación entre isotipos de IgG fue también variada. Vacas que parieron terneros sin infección, vacas vacías, y también una vaca que abortó, no tuvieron diferencias en los niveles de IgG₁ e IgG₂; sin embargo, vacas que parieron terneros congénitamente infectados presentaron altos títulos de IgG₂ (Guy y col., 2001). En el presente trabajo, 2 vaquillonas infectadas naturalmente (27 y 120), cuyos terneros resultaron seropositivos a los 6 meses de edad, manifestaron una respuesta con predominio de IgG₂ siendo inferiores a 1 los índices de IgG₁ : IgG₂ para la mayoría de las determinaciones; sin embargo la restante vaquillona naturalmente infectada (116), cuya progenie fue también seropositiva, tuvo un índice IgG₁ : IgG₂ igual a 5 con escasa a nula producción de IgG₂. Asimismo, ese animal (116) manifestó una marcada elevación de anticuerpos circulantes en la semana 19 de la gestación (Figura 6). Como contraparte, similares niveles de IgG₁ e IgG₂ fueron asociados a un aumento significativo en el título de anticuerpos en la vaca que abortó en la semana 17 de la gestación (Guy y col., 2001).

Permanece aún por investigarse si la respuesta humoral deseada para limitar las infecciones por *N. caninum* en los bovinos debe ser con predominio de un isotipo de IgG o mixta. La inmunización asociada a una respuesta Th2 no previene la encefalitis en ratones desafiados experimentalmente (Lundén y col., 2002). Por otro lado, se logró reducir la infección cerebral en ratones utilizando una vacuna recombinante, la cual estimuló una respuesta humoral

Th2 con producción de IgG₁, (Cannas y col., 2003). En el presente estudio y en coincidencia con Andrianarivo y col., (2000), las vaquillonas inoculadas con taquizoítos inactivados administrados por vía SC presentaron una respuesta mixta con tendencia a producir más IgG₁ que IgG₂. Sin considerar el efecto de los diferentes adyuvantes utilizados en ambos estudios, podría sugerirse que la naturaleza del inmunógeno (inactivado y producido fuera de hospedador) y la vía de inoculación (SC) utilizados en este experimento, condicionaría parcialmente la respuesta inmune con el isotipo de IgG acompañante. En contraste, durante una primo infección postnatal, la vía de infección natural es oral y los taquizoítos se multiplican en las células del hospedador (Dubey y Lindsay, 1996; Anderson y col., 2000). Tales diferencias podrían explicar los hallazgos asociados a la producción de IgG₁ e IgG₂ en animales infectados naturalmente y animales inoculados con taquizoítos inactivados. Por otro lado, es oportuno mencionar que la respuesta inmune generada por la inculación de taquizoítos inactivados y caracterizada por niveles niveles de IgG₁ no evitó la muerte fetal cuando las vaquillonas preñadas fueron desafiadas durante la 13^o semana de gestación (Andrianarivo y col., 2000).

Los mecanismos dependientes de la IMC que involucra a los linfocitos T con la producción de IFN- γ , IL-12 e IL-2 están asociados con la resistencia a *N. caninum* (Innes y col., 1995; Lundén y col., 1998; Marks y col., 1998; Yamane y col., 2000). En el presente estudio, la información obtenida a partir de la prueba de linfoproliferación fue limitada. Sólo se observó

linfoproliferación ante la estimulación con antígeno de *N. caninum* durante la semana 19^o de gestación en 2 de los animales naturalmente infectados. Este hallazgo contrasta con lo informado por Guy y col. (2001), quienes describen que la respuesta de la blastogénesis fue constante en animales infectados naturalmente sin observarse diferencias durante la gestación. Aunque las CMSP de animales inoculados con taquizoítos inactivados en el presente trabajo no tuvieron respuesta proliferativa ante la estimulación con antígeno de *N. caninum*, dicha respuesta fue observada en los cultivos estimulados con concanavalina A. En otro trabajo de investigación donde se analizó la respuesta de linfoproliferativa en hembras bovinas infectadas experimentalmente se menciona un marcado descenso de los IE durante las semanas 18^o a 22^o de la gestación, no sólo como respuesta específica ante el antígeno de *N. caninum* sino también ante la estimulación con un eficiente mitógeno como la concanavalina A (Innes y col. 2001b). Esta circunstancia podría estar asociada a la inmunomodulación dependiente de los mecanismos hormonales existente durante la mitad de la gestación (Innes y col., 2002) y explicarían parcialmente la falta de respuesta observada durante el período analizado en el presente estudio (desde la 13^o a 25^o semanas de gestación). Por otro lado, Andrianarivo y col., (1999) observaron que sólo uno de los cuatro adyuvantes utilizados desarrolló un IE similar al de los animales infectados experimentalmente. Mas aún, los mismos autores mencionaron que uno de los adyuvantes cuya composición era una emulsión de aceite mineral en agua, similar al adyuvante utilizado en este

estudio, tuvo índices de estimulación significativamente menores que los observados en animales experimentalmente infectados (Andrianarivo y col., 1999).

Experimentos realizados con ratones han permitido caracterizar que la producción de IFN- γ limita la infección por *N. caninum* (Khan y col., 1997; Baszler y col., 1999b; Eperon y col., 1999; Lundén y col., 2002; Ritter y col., 2002). También en los bovinos, los mecanismos asociados a la respuesta Th1 con producción de IFN- γ e IgG₂ serían los adecuados para controlar la infección por *N. caninum* (Williams y col., 2000; Andrianarivo y col., 1999; 2000; 2001; Trees y col., 2002). Niveles de producción de IFN- γ constantes han sido informados cuando CMSP obtenidas de animales infectados naturalmente fueron cultivados "*in vitro*" (Guy y col., 2001, Williams y col., 2003). Similar hallazgo fue observado en el presente estudio durante el 2º tercio de la gestación en animales infectados naturalmente pese a que no se detectó producción de IFN- γ en un animal sólo esporádicamente. Los niveles de IFN- γ producidos en hembras bovinas gestantes infectadas naturalmente que parieron terneros libres de infección o congénitamente infectados no presentaron diferencias significativas, sin embargo mayores niveles de IFN- γ fueron observados en aquellas que parieron terneros seronegativos (Guy y col., 2001). En este estudio y en coincidencia con lo informado por Guy y col., (2001), las vaquillonas infectadas naturalmente cuyas crías resultaron seropositivas a los 6 meses de edad, produjeron niveles

constantes de IFN- γ , los cuales pudieron ser insuficientes para evitar la infección transplacentaria.

En este trabajo, no existieron diferencias significativas en los niveles de producción de IFN- γ entre el grupo de animales infectados naturalmente y los animales del grupo 2 previo a la inoculación, dicha circunstancia pudo deberse a la producción inespecífica después de la estimulación con antígeno de *N. caninum*. Este hallazgo coincide con lo informado por Andrianarivo y col., (1999), quienes mencionaron respuestas inespecíficas dependientes de la IMC, las cuales podrían ser explicadas considerando que el antígeno utilizado y su forma de preparación podría contener epitopes compartidos con otros coccidios.

Andrianarivo y col., (1999) informaron que utilizando taquizoítos inactivados en un adyuvante sintético (Polygen) se logró estimular una producción de IFN- γ similar a la encontrada en animales infectados experimentalmente. En el presente trabajo se logró inducir cantidades de IFN- γ similares a las obtenidas por los mencionados autores con la utilización de Polygen. Asimismo, los niveles de IFN- γ producidos luego de la inmunización empleada en esta investigación no presentaron diferencias significativas con los niveles producidos por las CMSP extraídas de vaquillonas naturalmente infectadas, los cuales estarían asociados a los mecanismos de protección contra el aborto causado por una 2^o exposición a *N. caninum* (Williams y col., 2003).

Las infecciones asociadas a una respuesta Th1 pueden alterar la homeostasis del sincicio-trofoblasto ocasionando el aborto (Raghupathy, 1997; Clark y col., 1999). Más aún, el IFN- γ es capaz de actuar directamente a dicho nivel induciendo abortos espontáneos (Clark y Croitoru, 2001). Esta circunstancia fue claramente observada en ratones experimentalmente inoculados, los cuales presentaron una alta tasa de abortos, aunque *N. caninum* no fue detectada en los tejidos fetales (Long y Baszler, 1996). Al vacunar animales a los 35 y 63 días de gestación, 2 de 7 vaquillonas perdieron la preñez antes del desafío experimental y los análisis de laboratorio no revelaron la causa del aborto (Andrianarivo y col., 2000). En aquel experimento, altos niveles de IFN- γ fueron inducidos por la vacunación con taquizoítos inactivados cuando la respuesta Th2 está aún debilitada. Más aún, los altos niveles de IFN- γ explicarían el aborto causado por *N. caninum* durante el 1° tercio de la gestación en los bovinos (Innes y col., 2002). En el presente trabajo, los animales fueron inoculados con taquizoítos inactivados durante el 2° tercio de la gestación cuando la respuesta Th2 asociada a la preñez está solidamente constituida; no obstante los niveles de IFN- γ inducidos resultaron similares a los informados por Andrianarivo y col., (2000). Por otro lado, una vacuna comercial aplicada en vaquillonas preñadas inmunizadas con 2 dosis a los 56 y 77 días de gestación en forma SC resultó inócua y redujo la tasa de abortos; sin embargo se desconocen los niveles de IFN- γ ocasionados por la vacunación (L. Purtle y col., citado por Innes y col., 2002).

En el presente estudio resultó difícil caracterizar la respuesta inmune inducida por la inoculación de taquizoítos inactivados en términos del balance Th1/Th2. La presencia de IFN- γ indicaría una respuesta inmune Th1; sin embargo los bajos niveles de IgG₂ y predominio de IgG₁ estarían sugiriendo una respuesta Th2 (Tizard, 1996; Carrol y col., 2001; Paulnock y col., 2001). Andrianarivo y col., (2000) en coincidencia con lo encontrado en el presente trabajo, informaron que luego de la inmunización se indujo una respuesta inmune caracterizada por la presencia de IFN- γ e IgG₁. Además uno de los animales naturalmente infectado tuvo una respuesta humoral caracterizada por la sola presencia de IgG₁, aunque también produjo altos niveles de IFN- γ (Cuadro 5, Figuras 9 y 17). Las más diversas situaciones, entre ellas la presencia de IFN- γ e IgG₁ fueron encontradas luego de la inoculación experimental de taquizoítos vivos por Andrianarivo y col., (2001), quienes mencionaron la complejidad de la respuesta inmune en las infecciones por *N. caninum*.

En el presente trabajo, la formulación conteniendo taquizoítos de *N. caninum* más el adyuvante oleoso y el inmunoestimulante inespecífico con LPS de *E. coli* fueron simultáneamente inoculados en las vaquillonas previamente seronegativas. El inmunomodulador que genera la expresión de antígenos del CMH clase I y II sobre la superficie de células presentadoras de antígeno (Otsuka y col., 1991), fue utilizado con éxito contra el HVB-1 y estimuló el desarrollo de una sólida inmunidad mediada por células y por anticuerpos (Romera y col., 1999; Zamorano y col., 2002). Sin embargo, los

beneficios de la utilización de Ribozím RN-205 en el presente trabajo no fueron esclarecidos debido al bajo número de animales utilizados, lo cual impidió formar un grupo experimental inmunizado con taquizoítos de *N. caninum* formulados con adyuvante oleoso pero sin la utilización simultánea del mencionado inmunoestimulante inespecífico. Por otro lado, en este ensayo no fue determinado si la utilización del adyuvante oleoso ocasionó altos títulos de anticuerpos y niveles de IFN- γ . Sin embargo, escaso desarrollo de anticuerpos, pobre estimulación de la IMC y bajos niveles de IFN- γ fueron obtenidos al utilizar una vacuna formulada con un aceite mineral metabolizable (Montanide) (Andrianarivo y col., (1999). Los efectos individuales o combinados del adyuvante oleoso y el Ribozím-205 en la formulación de vacunas contra *N. caninum* deberían ser motivo de futuros trabajos experimentales.

Las reacciones post-inoculación derivadas de la utilización de antígenos inactivados de *N. caninum* formulados con el mencionado adyuvante oleoso y aplicadas en dosis de 5 ml por la vía SC resultaron moderadas a severas en las vaquillonas del presente estudio. Este hallazgo difiere de lo informado por Andrianarivo y col., (1999), quienes utilizando similares volúmenes en la formulación de las dosis y la misma vía de aplicación, mencionan la falta de reacciones adversas en el sitio de inoculación. Esporádicamente, leves reacciones postvacunales fueron observadas por Choromanski y Block (2000) luego de utilizar Havlogen como adyuvante. Las reacciones adversas resultantes del adyuvante utilizado en este experimento

deberían ser consideradas en futuros trabajos sugiriéndose el empleo de otros adyuvantes que no afecten la respuesta inmune y no tengan los mencionados efectos secundarios.

Finalmente, es necesaria la comprensión de los mecanismos de protección en la neosporosis bovina para el desarrollo de inmunógenos que prevengan la manifestación de aborto, la transmisión vertical y/o la infección. La complejidad del ciclo parasitario, la excelente adaptación del parásito al huésped y las variadas formas de infección posibles limitan la correcta evaluación de los inmunógenos de *N. caninum* en bovinos. En este trabajo de tesis, pudo observarse que los niveles de anticuerpos específicos totales y la producción de IFN- γ en animales inoculados con taquizoítos inactivados y animales infectados naturalmente fueron similares durante el 2º tercio de la gestación. Sin embargo, los mecanismos inmunes inducidos por la inoculación de taquizoítos inactivados podrían ser distintos de aquellos desarrollados en infecciones naturales siendo variable el grado de protección lograda.

5. CONCLUSIONES

En el presente trabajo de tesis se desarrolló un inmunógeno con taquizoítos inactivados de *N. caninum* que inoculados en animales seronegativos ocasionó una respuesta inmune permitiendo comparar la IMA e IMC desarrolladas con aquellas observadas en bovinos crónicamente infectados.

La respuesta inmune humoral y celular generada por la inoculación de taquizoítos inactivados en vaquillonas Holando Argentino durante el 2º tercio de la gestación resultó igual o superior en términos de la generación de anticuerpos específicos y producción de IFN- γ a la observada en animales similares crónicamente infectados. Sin embargo, la ausencia de una respuesta de blastogénesis positiva y el diferente perfil de IgG ocasionados por la inmunización con taquizoítos inactivados de *N. caninum* sugerirían que los mecanismos inmunes desencadenados son diferentes de aquellos observados en animales infectados naturalmente.

Cuadro 1: Antígenos de taquizoítos de *N. caninum*

| Designación recomendada | Peso molecular (kDa) | | Localización celular |
|------------------------------------|-----------------------------|--------------------|---------------------------------|
| | Estimado | Aparente | |
| SAG1 | 28,2 ^a | 29/36 ^b | Membrana ext. |
| SRS2 | 34,1 | 35/43 | Membrana ext. |
| GRA7 | 23,0 | 33 | Gránulo denso |
| GRA6 | 19,0 | 37 | Gránulo denso |
| NTP3/NTPasa-1 | 66,3 | 67 | Gránulo denso |

^a Masa molecular de la proteína basada en la secuencia de amino-ácidos.

^b Masa molecular de la proteína basada en la migración sobre SDS-PAGE; condiciones de no reducción / reducción.

Adaptado de Howe y Sibley, 1999.

Cuadro 2: Interleuquinas: origen y lugar de acción.

| Tipo | Origen: | Principales blancos |
|---------------|---------------------------|-------------------------------|
| IL-1- | Macrófagos | Células T, B |
| IL-1- β | Macrófagos | Células T, B |
| IL-2 | Células T, células NK | Células T, B |
| IL-3 | Células T | Células hematopoyét. y madres |
| IL-4 | Células T | Células T, B, mastocitos |
| IL-5 | Células T | Células B, T |
| IL-6 | Fibroblastos, células T | Células B |
| IL-7 | Células estromales | Linfocitos inmaduros |
| IL-8 | Macrófagos | Células T, neutrófilos |
| IL-9 | Células T | Células T, mastocitos |
| IL-10 | Células Th2, células B | Células Th1, macrófagos |
| IL-11 | Células estromales | Células B |
| IL-12 | Células B linfoblastoides | Células T, células NK |

Adaptado de Tizard, 1996

Cuadro 3: Identificación, fecha de nacimiento y serología de las vaquillonas y sus madres (Título serológico $\geq 1:200$ por IFI). La asociación del estado serológico de las madres y sus hijas, y la presencia de anticuerpos específicos fueron considerados como evidencia de infección a *N. caninum*.

| Grupo experimental | Vaquillonas | | | Madres | |
|--------------------|----------------|------------------------------------|-------------------------|----------------|-----------|
| | Identificación | Fecha de nacimiento (mes y año) | IFI ($\geq 1:200$) | Identificación | IFI |
| 1 | 27 | Sep-00 | Positiva | 58 | Positiva |
| 1 | 116 | Sep-01 | Positiva | 247 | Positiva |
| 1 | 120 | Oct-00 | Positiva | 75 | Positiva |
| 2 | 31 | Mar-01 | Negativa | 117 | Negativa |
| 2 | 42 | Mar-01 | Negativa | 207 | Negativa |
| 2 | 55 | Sep-00 | Negativa | 10 | Negativa |
| 2 | 72 | Sep-00 | Negativa | 1 | Sin dato* |
| 3 | 6 | Feb-01 | Negativa | 108 | Negativa |
| 3 | 21 | Mar-01 | Negativa | 118 | Negativa |

* Animal ausente en el hato al momento de la evaluación.

Cuadro 4: Títulos de anticuerpos específicos anti-*N. caninum* (expresados como inversa de la dilución) durante las semanas 13° a 25° de la gestación en vaquillonas infectadas naturalmente y vaquillonas inoculadas con taquizoítos inactivados.

| | N° de animal | Semanas de gestación | | | | | | |
|------------------|--------------|----------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 13° | 15° | 17° | 19° | 21° | 23° | 25° |
| | 27 | 800 | 1600 | 800 | 3200 | 1600 | 1600 | 3200 |
| Grupo 1* | 116 | 400 | 400 | 800 | 6400 | 3200 | 3200 | 3200 |
| | 120 | 400 | 800 | 800 | 800 | 1600 | 800 | 800 |
| | 31 | 0 | 400 | 12800 | 25600 | 12800 | 12800 | 6400 |
| Grupo 2** | 42 | 0 | 200 | 6400 | 6400 | 12800 | 25600 | 12800 |
| | 55 | 0 | 400 | 6400 | 12800 | 12800 | 12800 | 12800 |
| | 72 | 0 | 800 | 3200 | 12800 | 12800 | 12800 | 12800 |

*Grupo 1: vaquillonas infectadas naturalmente.

**Grupo 2: vaquillonas inoculadas con taquizoítos inactivados de *N. caninum*.

Cuadro 5: Índice de IgG₁/IgG₂ durante las semanas 13° a 25° de la gestación en vaquillonas infectadas naturalmente y vaquillonas inoculadas con taquizoítos inactivados.

| | N° de animal | Semanas de gestación | | | | | | |
|------------------|--------------|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 13° | 15° | 17° | 19° | 21° | 23° | 25° |
| | 27 | 0,8*** | 1,0 | 0,9 | 0,7 | 0,8 | 0,7 | 0,6 |
| Grupo 1* | 116 | 2,3 | 3,5 | 4,4 | 4,7 | 5,0 | 4,4 | 4,4 |
| | 120 | 0,6 | 1,0 | 1,0 | 0,8 | 0,8 | 0,7 | 0,8 |
| | 31 | 0 | 1,0 | 1,0 | 0,9 | 0,9 | 0,9 | 0,7 |
| | 42 | 0 | 1,2 | 0,9 | 1,1 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Grupo 2** | 55 | 0 | 1,2 | 1,2 | 1,1 | 1,0 | 0,9 | 0,8 |
| | 72 | 0 | 1,2 | 1,1 | 1,1 | 1,0 | 0,9 | 0,8 |

*Grupo 1: vaquillonas infectadas naturalmente.

**Grupo 2: vaquillonas inoculadas con taquizoítos inactivados de *N. caninum*.

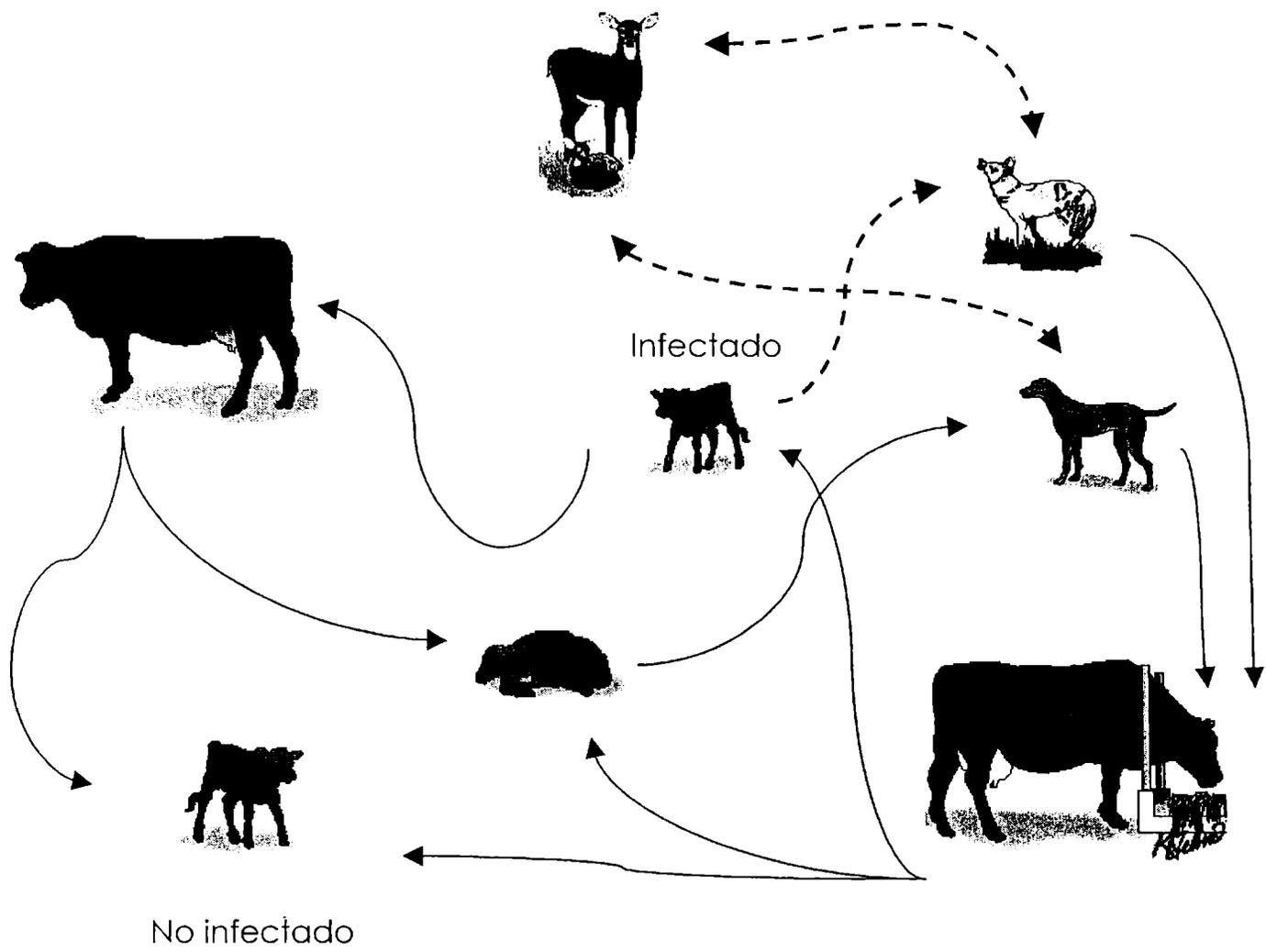
*** Índice de IgG₁/IgG₂ obtenido a partir de la transformación a log₁₀ de la inversa de la dilución cuya DO era mayor a aquella de los controles negativos \pm 3DE.

Cuadro 6: Reacciones granulomatosas observadas y palpadas a las 2 semanas post-inoculación en vaquillonas de los grupos experimentales 2 y 3.

| | Nº de animal | Reacción post 1º dosis | Reacción post 2º dosis | Reacción post 3º dosis |
|-------------------|--------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Grupo 2** | 31 | Severa | Moderada | Leve |
| | 42 | Severa | Moderada | Moderada |
| | 55 | Severa | Leve | Severa |
| | 72 | Severa | Severa | Severa |
| Grupo 3*** | 6 | Severa | Moderada | Severa |
| | 21 | Leve | Leve | Moderada |

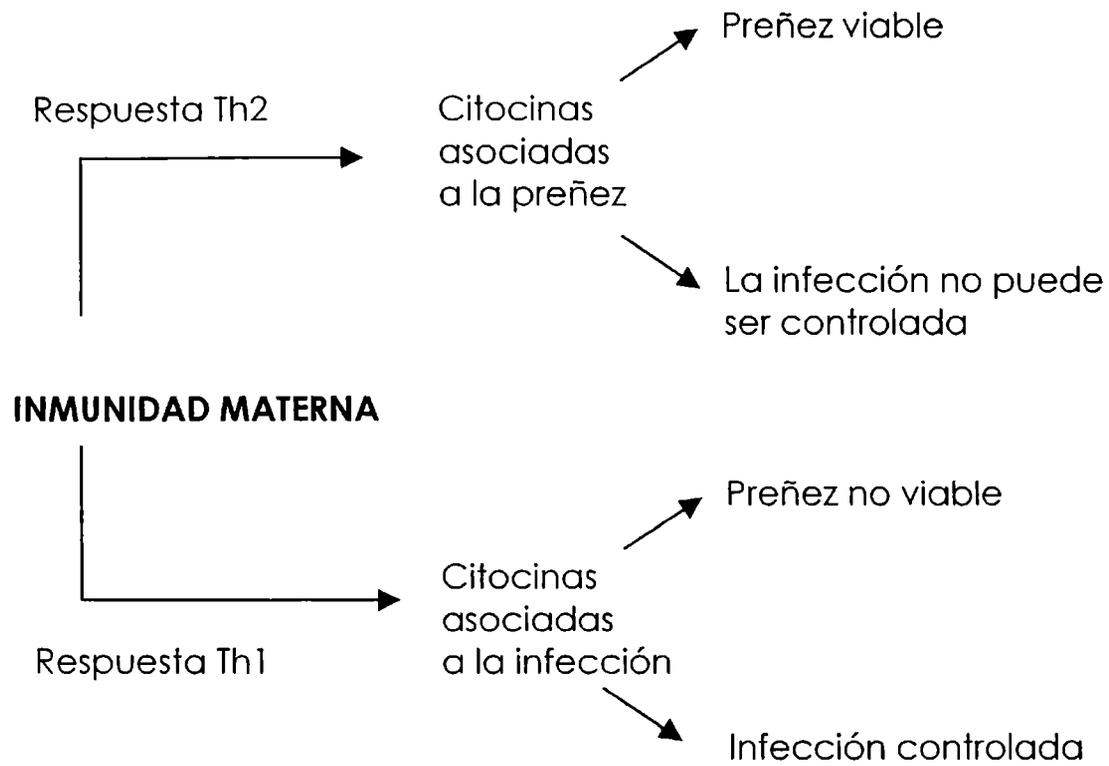
**Grupo 2: vaquillonas inoculadas con taquizoítos inactivados de *N. caninum*.

***Grupo 3: vaquillonas inoculadas con adyuvante oleoso más lisado de MB.



Adaptado de McAllister, 2004

Figura 1: Ciclo de vida del parásito



Adaptado de Quinn y col., 2002

Figura 2: La respuesta inmune materna Th1 durante la preñez es capaz de controlar el parásito pero puede ser negativa para la vida fetal. En cambio, una adecuada respuesta inmune materna Th2 durante la preñez favorece la vida fetal pero es ineficiente en el control de la infección parasitaria.

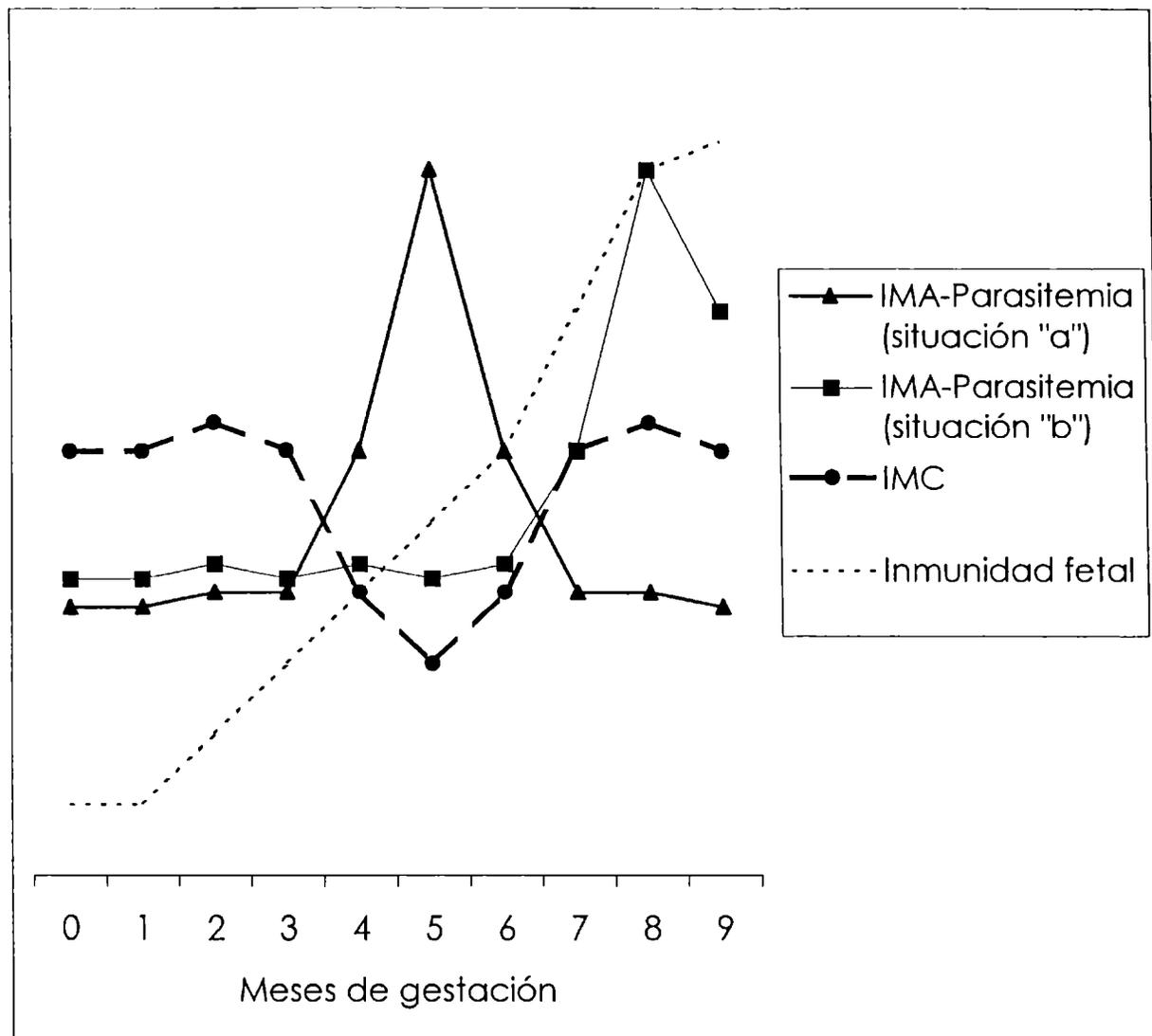


Figura 3: Esquema de la inmunidad materna y fetal durante la gestación bovina: En la neosporosis bovina la dinámica sérica es un buen indicador de la parasitemia: se ilustran dos situaciones "a" y "b": la parasitemia ocurre durante el 2º y 3º tercio de la gestación, respectivamente. Se ilustra además la depresión de la IMC producida por el ambiente hormonal y las linfoquinas de origen fetal. Finalmente, se muestra la maduración del sistema inmune fetal.

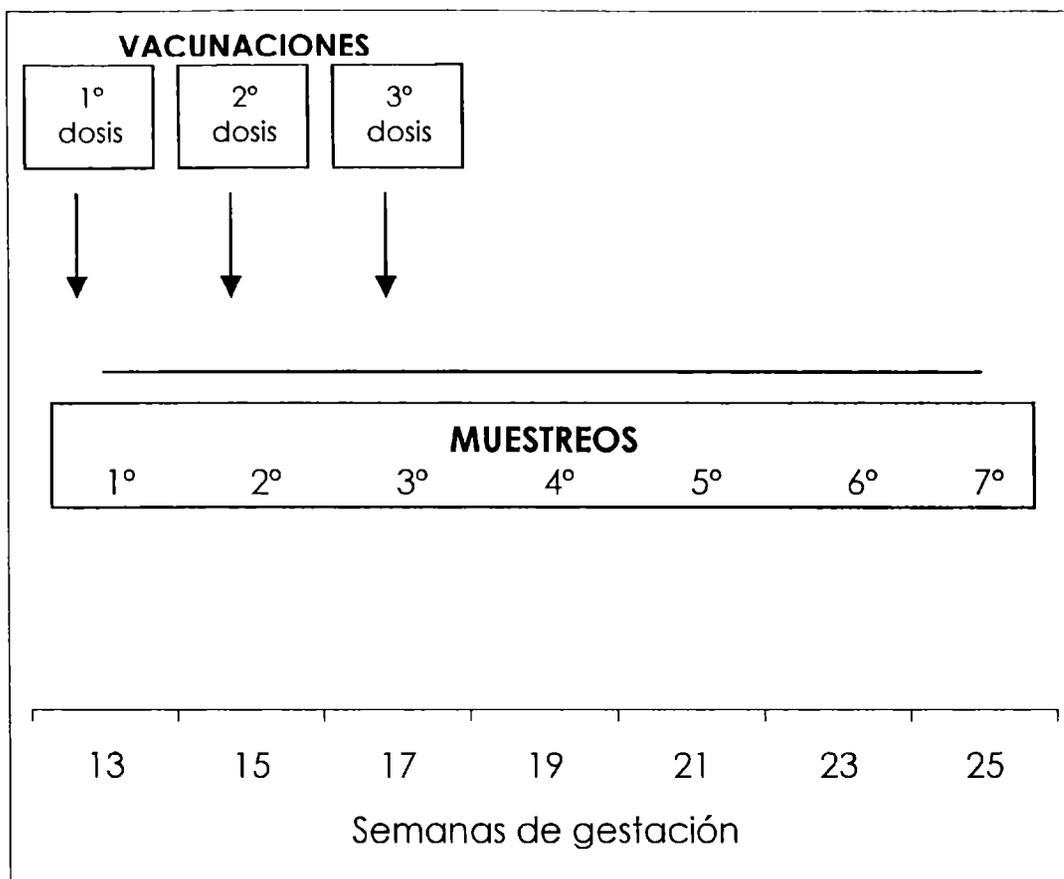


Figura 4: Cronograma de toma de muestras y momento de la aplicación del inmunógeno durante la gestación de las vaquillonas.

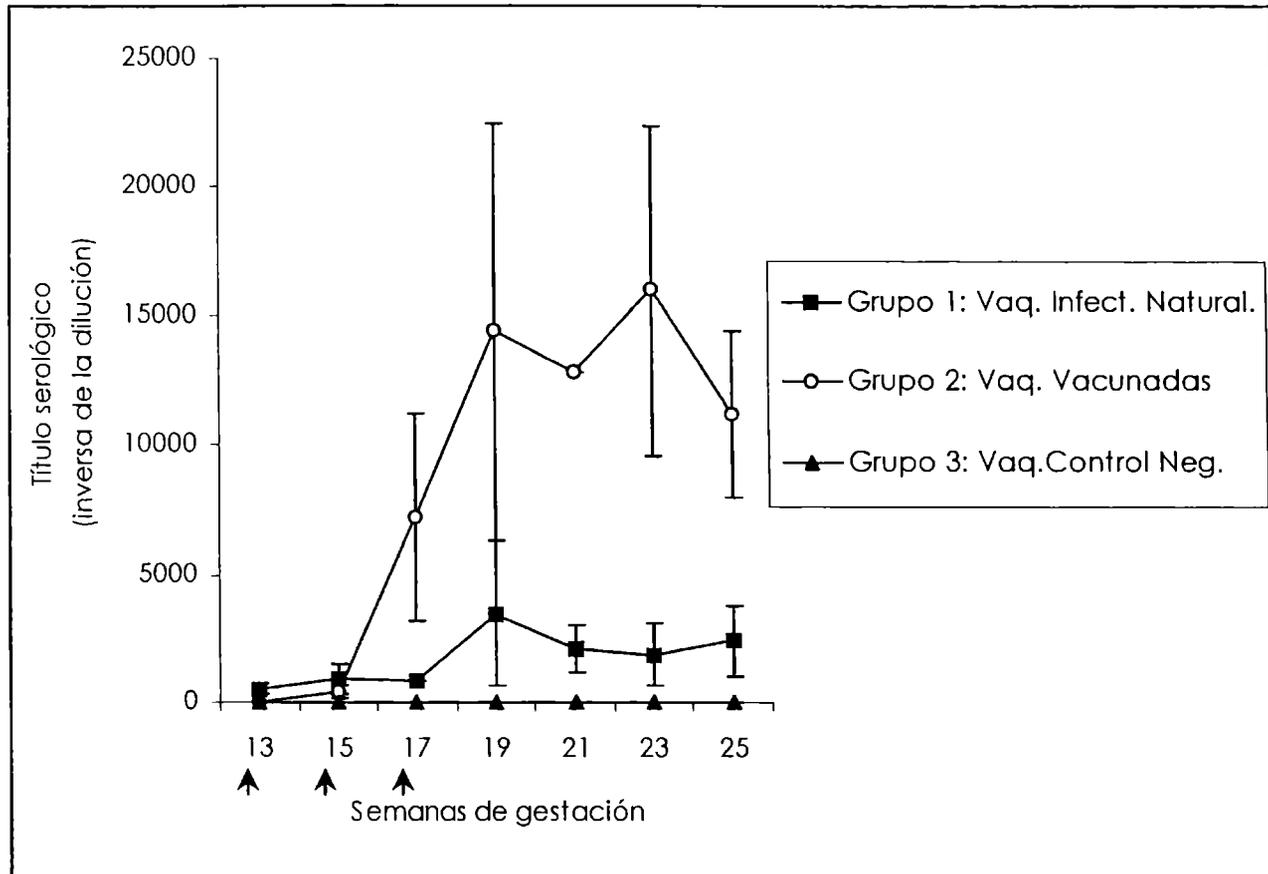


Figura 5: Títulos de anticuerpos específicos anti-*N. caninum* por IFI en vaquillonas infectadas naturalmente, vaquillonas inoculadas con taquizoítos inactivados y vaquillonas controles durante la 13^o a 25^o semana de gestación. La 1^o, 2^o y 3^o aplicación del inmunógeno son indicadas por flechas.

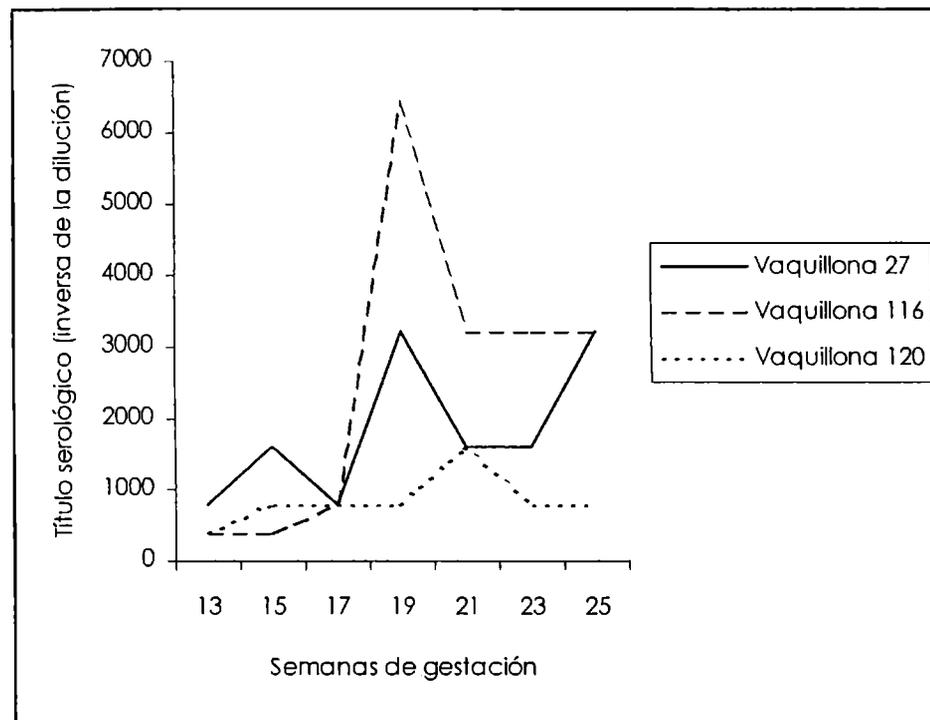


Figura 6: Títulos de anticuerpos específicos anti-*N. caninum* por IFI en vaquillonas infectadas naturalmente durante las semanas 13^o a 25^o de la gestación.

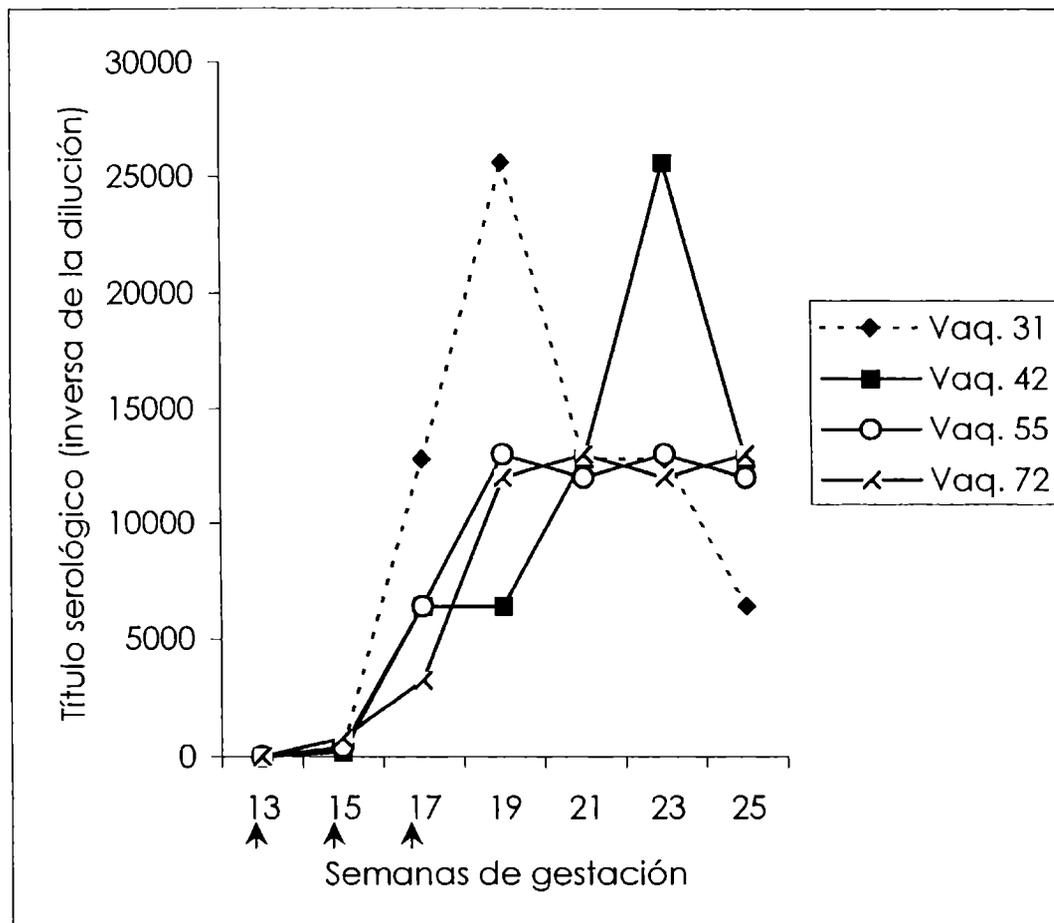


Figura 7: Títulos de anticuerpos específicos anti-*N. caninum* por IFI durante la 13^o a 25^o semana de gestación en vaquillonas inoculadas con taquizoítos inactivados. La 1^o, 2^o y 3^o aplicación del inmunógeno son indicadas por flechas.

Figura 8:

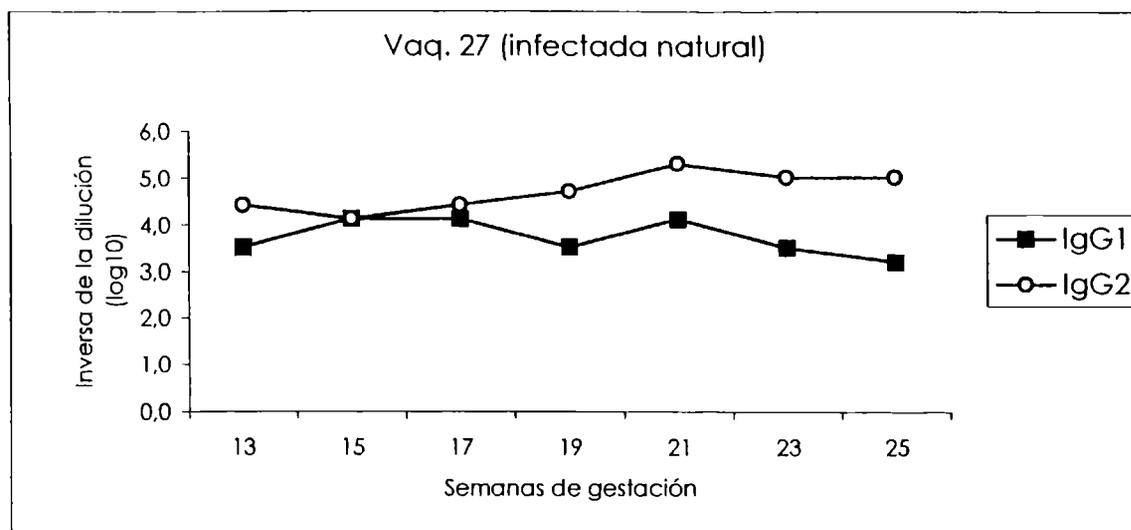


Figura 9:

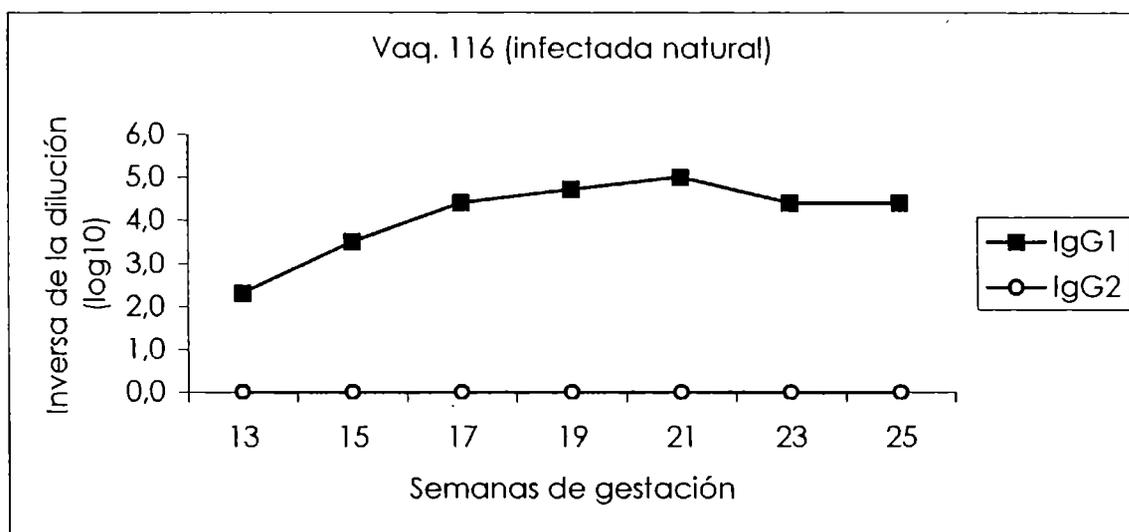


Figura 10:

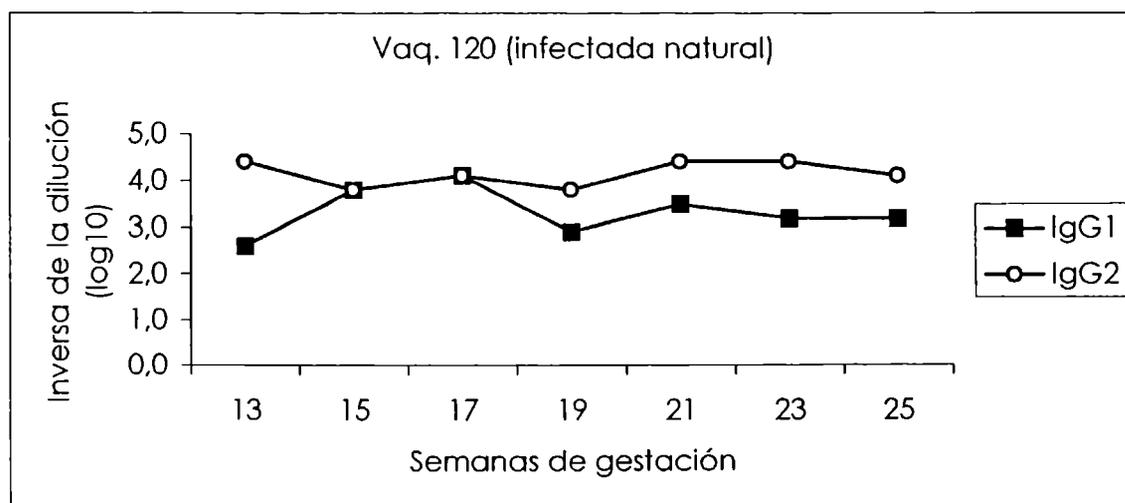


Figura 8, 9 y 10: Dinámica sérica de IgG₁ e IgG₂ durante las 13^o a 25^o semanas de gestación en animales infectados naturalmente.

Figura 11:

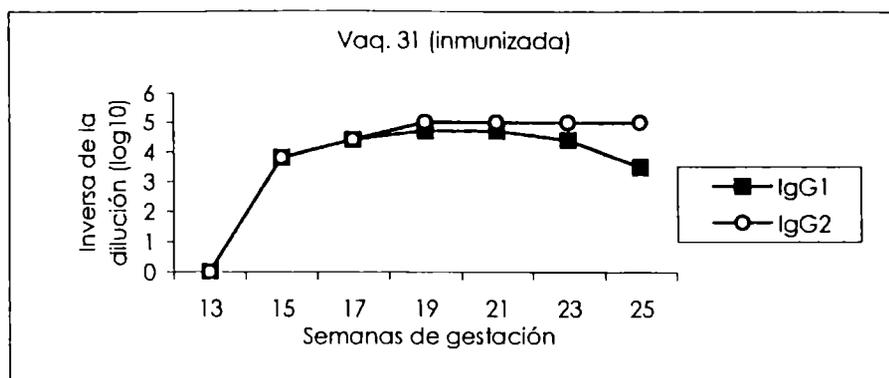


Figura 12:

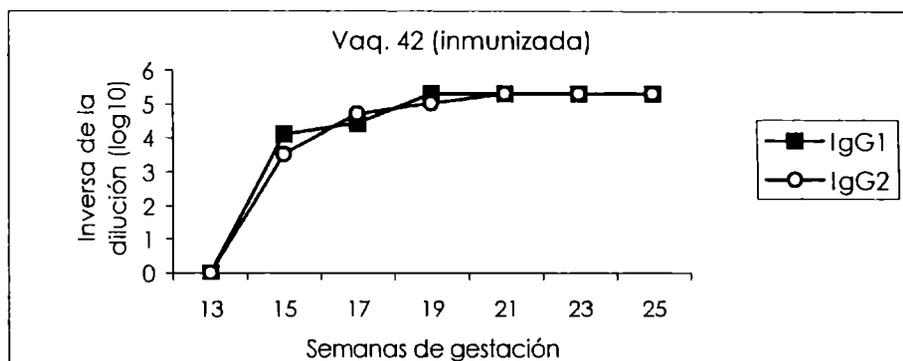


Figura 13:

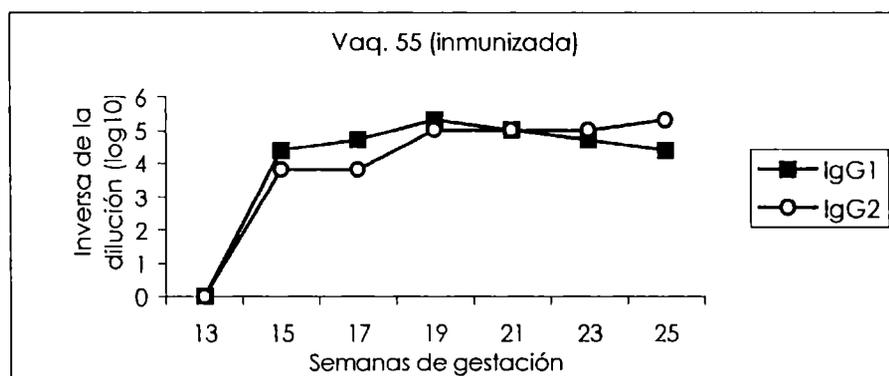


Figura 14:

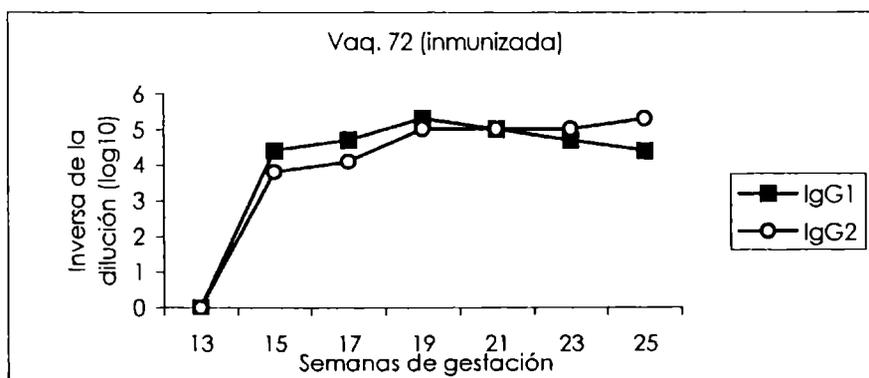


Figura 11, 12, 13 y 14: Dinámica sérica de IgG₁ e IgG₂ durante la 13^o a 25^o semanas de gestación en animales inoculados con taquizoítos inactivados.

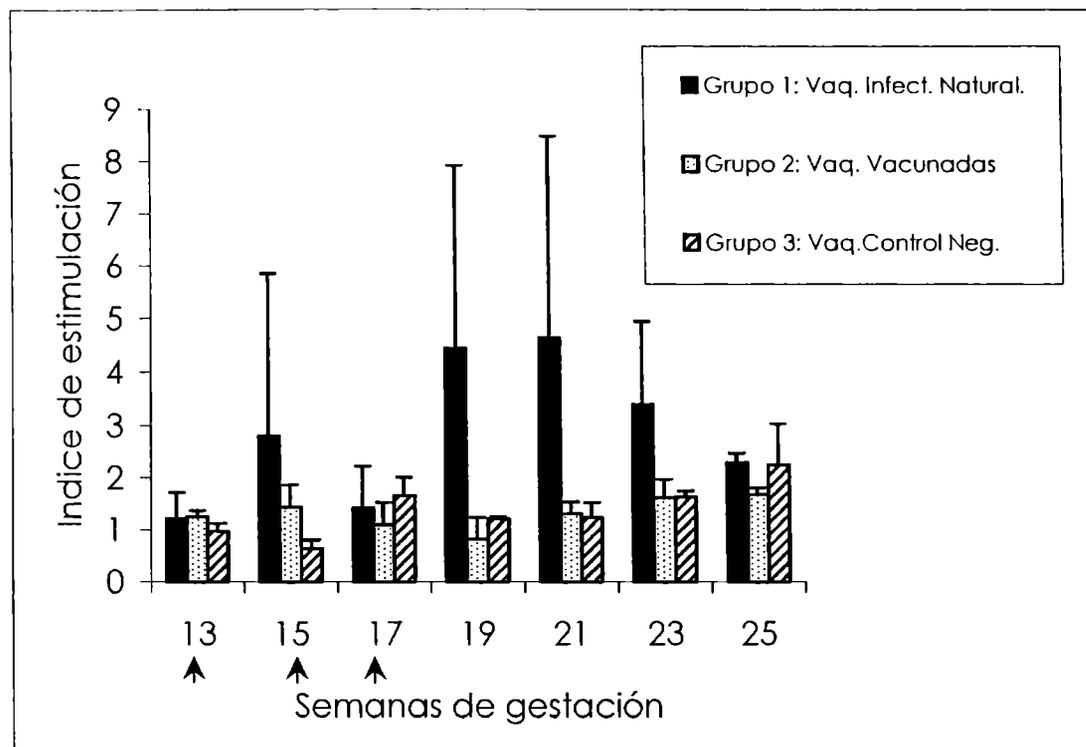


Figura 15: Respuesta proliferativa de las CMSP de vaquillonas infectadas naturalmente, vaquillonas inoculadas con taquizóitos inactivados y vaquillonas del grupo control negativo expresada como Índice de estimulación (promedio de las c. p. m. del cultivo de leucocitos estimulado con lisado de taquizóitos de *N. caninum*/promedio de las c. p. m del cultivo de leucocitos estimulado con lisado de MB) durante las semanas 13^o a 25^o de la gestación. La 1^o, 2^o y 3^o aplicación del inmunógeno son indicadas por flechas.

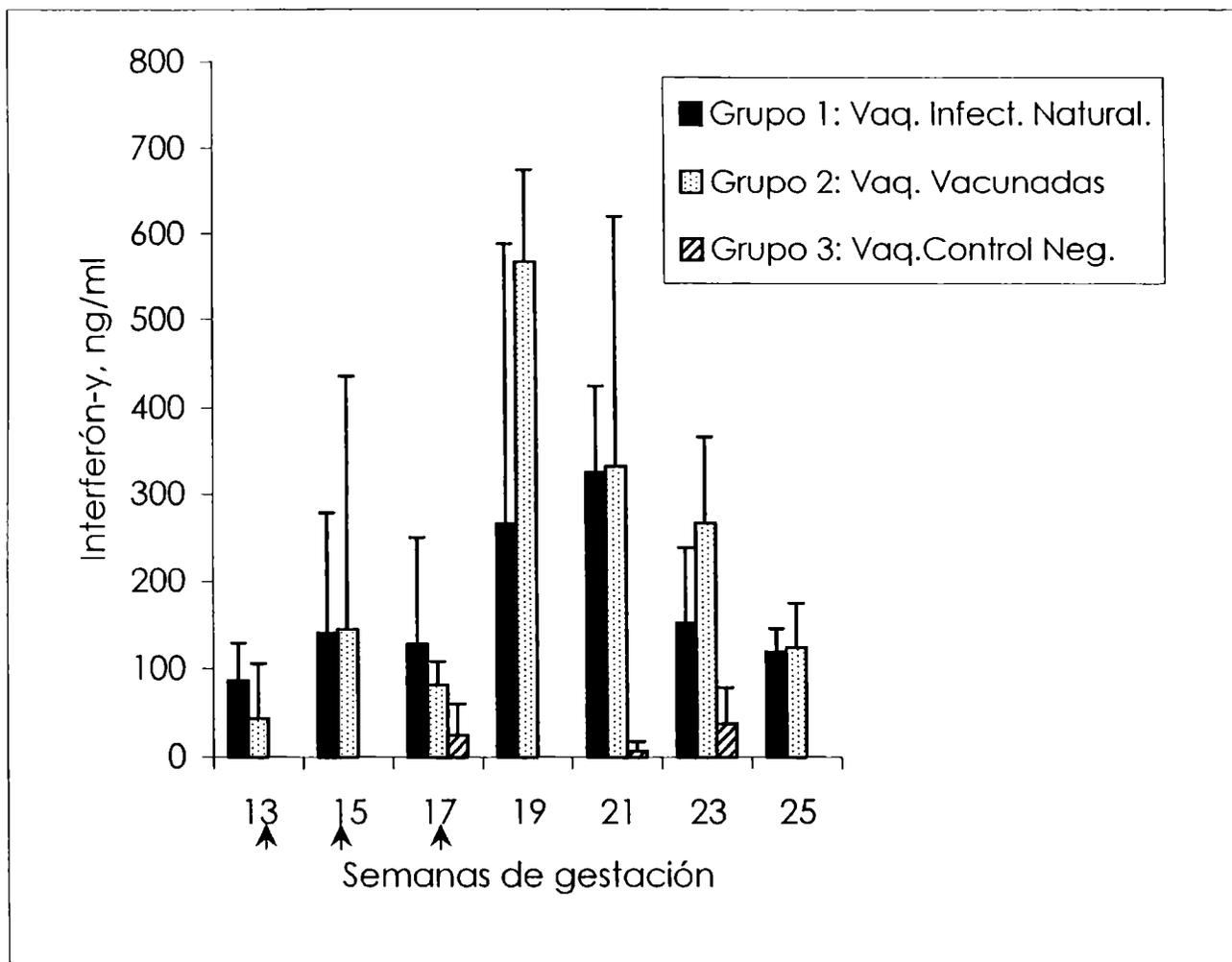


Figura 16: Producción de IFN- γ por CMSP estimuladas con lisado de *N. caninum* en vaquillonas infectadas naturalmente, vaquillonas inoculadas con taquizoítos inactivados y vaquillonas controles durante la 13^o a 25^o semana de gestación. Los valores representan el promedio de producción IFN- γ expresados en ng/ml \pm 1 DE. La 1^o, 2^o y 3^o aplicación del inmunógeno son indicadas por flechas.

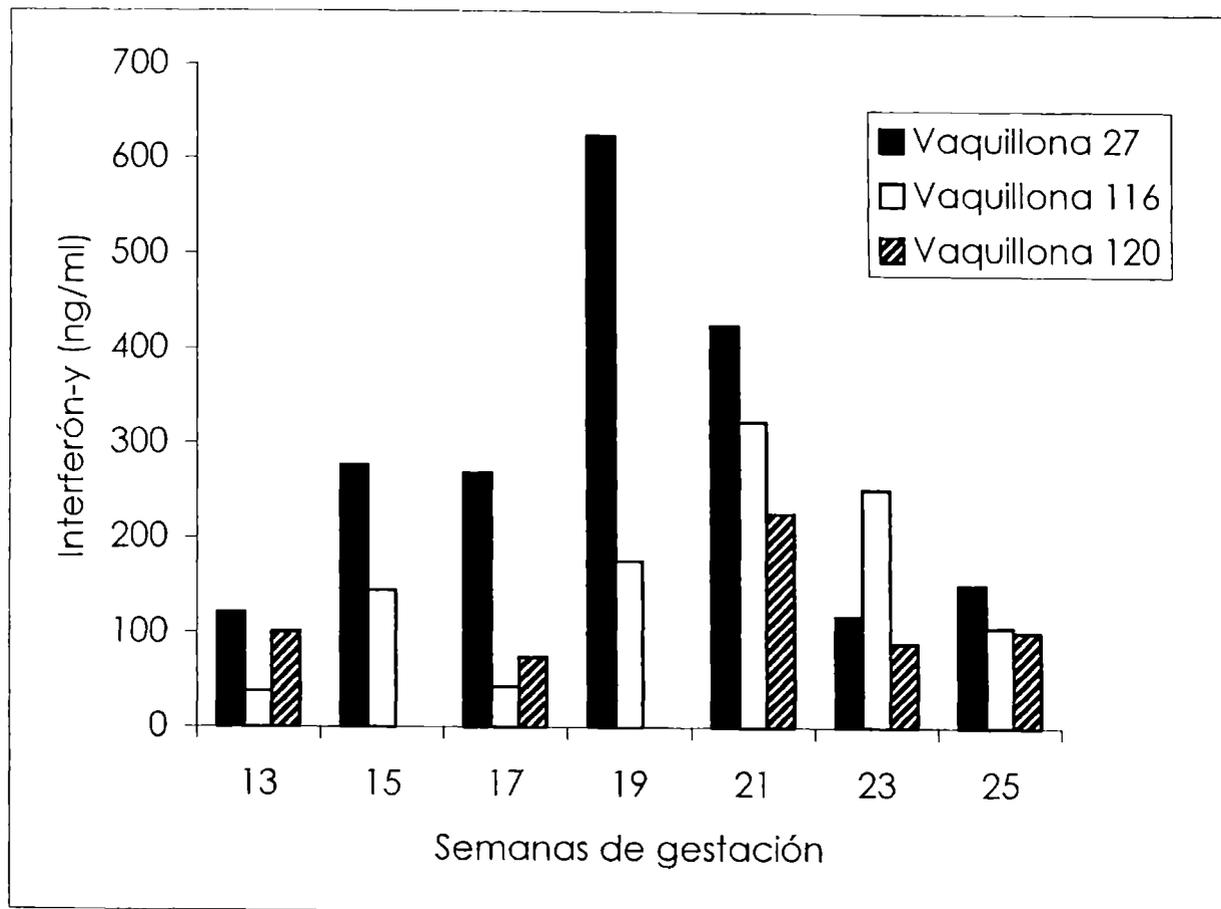


Figura 17: Producción de IFN- γ por CMSP estimuladas con lisado de *N. caninum* en vaquillonas infectadas naturalmente durante la 13^o a 25^o semana de gestación.

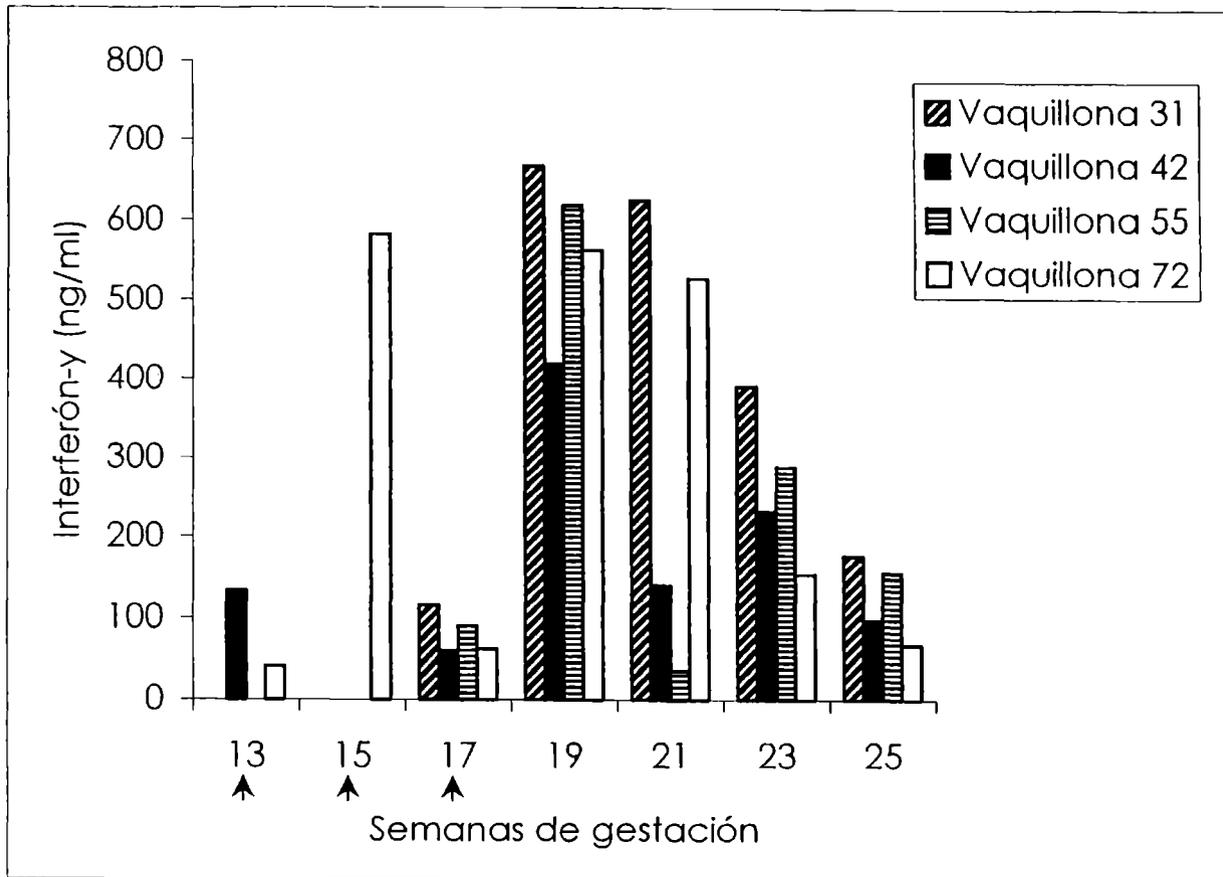


Figura 18: Producción de IFN- γ por CMSP estimuladas con lisado de *N. caninum* en vaquillonas inoculadas con taquizoítos inactivados durante la 13^o a 25^o semana de gestación. La 1^o, 2^o y 3^o aplicación del inmunógeno son indicadas por flechas.

Figura 19:

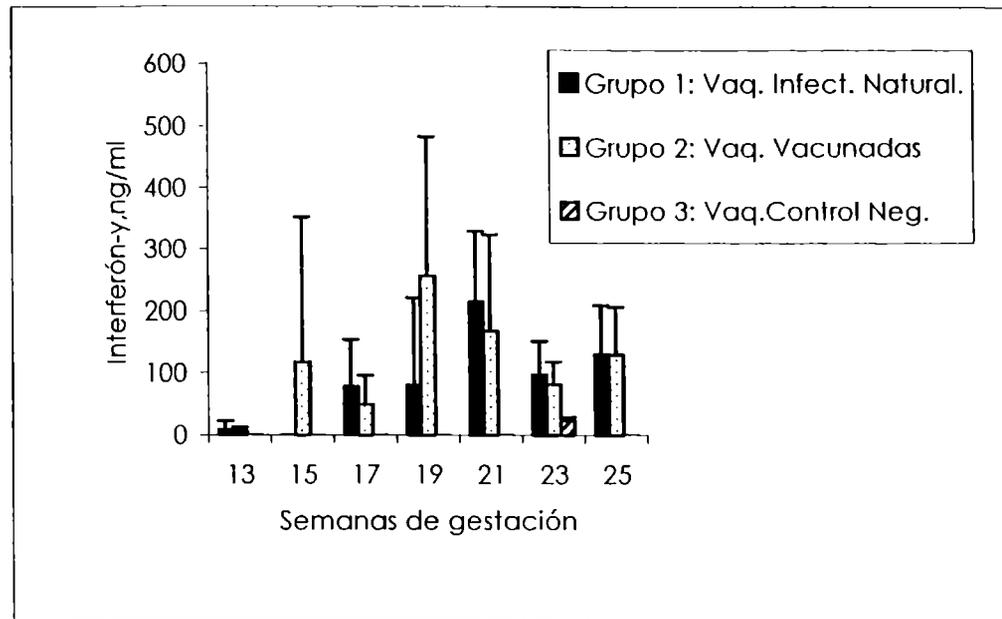
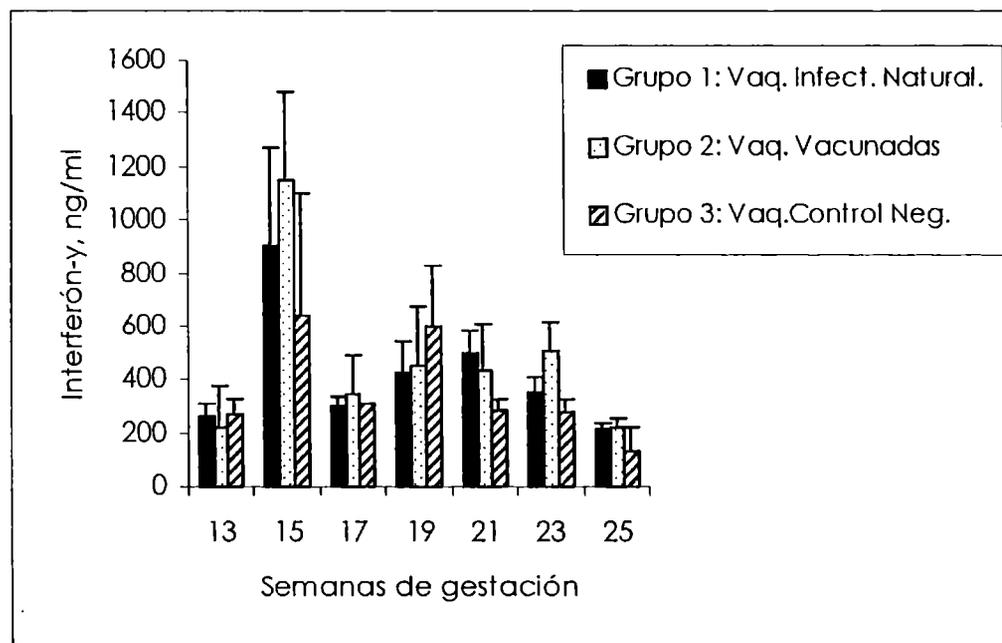


Figura 20:



Figuras 19 y 20: Producción de IFN- γ por CMSP estimuladas con lisado de MB y concanavalina A, respectivamente, en vaquillonas infectadas naturalmente, vaquillonas inoculadas con taquizoítos inactivados de *N. caninum* y vaquillonas controles durante la 13^o a 25^o semana de gestación. Los valores representan el promedio de producción IFN- γ expresados en ng/ml \pm 1 DE.

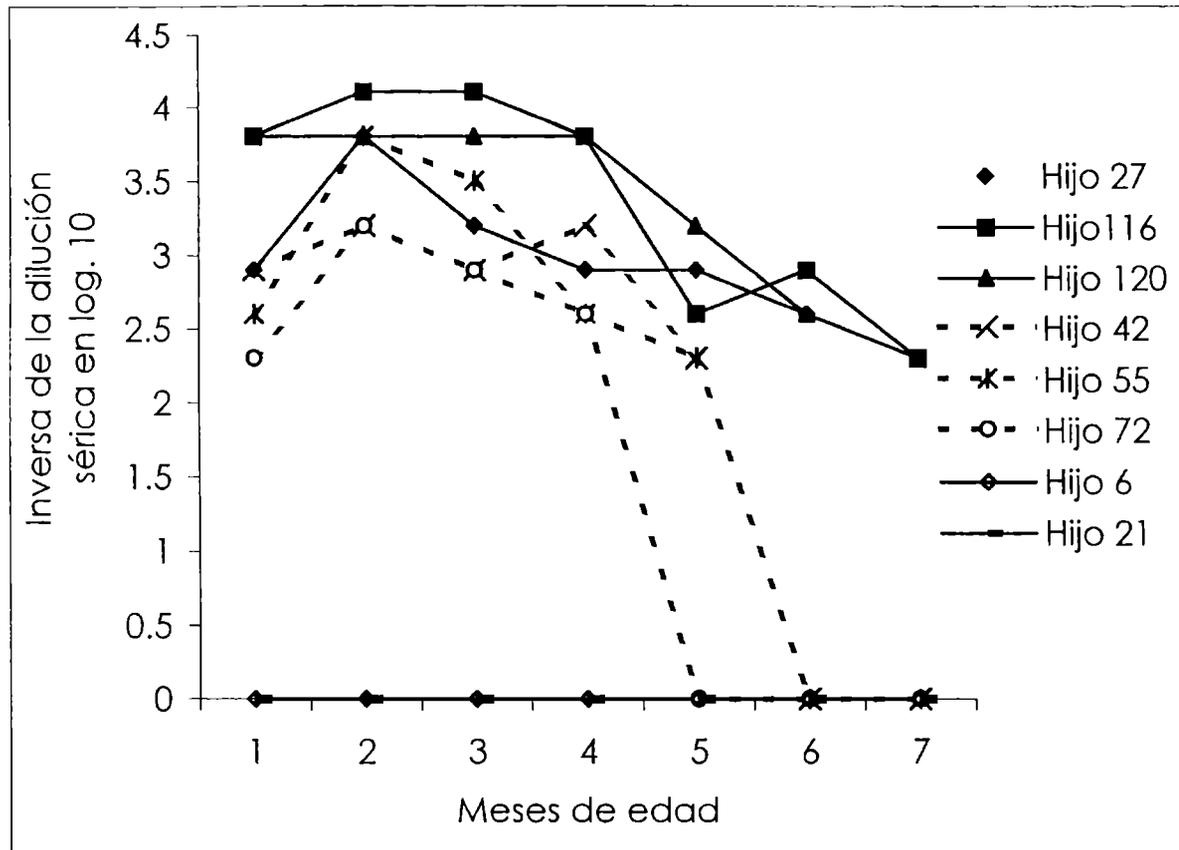


Figura 1521: Título de anticuerpos específicos anti-*N. caninum* en terneros desde el nacimiento hasta los 6 meses de edad. Los valores representan el logaritmo en base 10 de la inversa de la dilución.

6. BIBLIOGRAFIA

- AARLI, A. and MATRE, R. (1998) Suppression of immunoglobulin secretion by soluble annexin II. *Scand. J. Immunol.* 48: 522-526.
- AGERHOLM, J.S.; WILLADSEN, C.M.; NIELSEN, T.K.; GIESE, S.B.; HOLM, E.; JENSEN, E. and AGGER, J.F. (1997) Diagnostic studies of abortion in Danish dairy herds. *J. Vet. Med. A.* 44: 551-558.
- ALLISON, A.C. and BYARS, N.E. (1986) An adjuvant formulation that selectively elicits the formation of antibodies of protective isotypes and of cell-mediated immunity. *J. Immunol. Methods.* 95: 157-168.
- ALVAREZ-GARCIA, G.; PEREIRA-BUENO, J.; GOMEZ-BAUTISTA, M. and ORTEGA-MORA, L.M. (2002) Pattern of recognition of *Neospora caninum* tachyzoite antigens by naturally infected pregnant cattle and aborted fetuses. *Vet. Parasitol.* 107: 15-27.
- ANDERSON, M.L.; BLANCHARD, P.C.; BARR, B.C.; DUBEY, J.P.; HOFFMAN, R.L.; and CONRAD, P.A. (1991) *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *J. Am. Vet. Assoc.* 198 : 241-244.
- ANDERSON, M.L.; PALMER, C.W.; and THURMOND, M.C. (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.; REYNOLDS, J.P.; ROWE, J.D.; PACKHAM, A.E.; BARR, B.C. and CONRAD, P.A. (1997) Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp. infection in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 210: 1169-1172.
- ANDERSON, M.L.; ANDRIANARIVO, A.G. and CONRAD, P.A. (2000) Neosporosis in cattle. *An. Reprod. Sci.* 60-61: 417-431.
- ANDRIANARIVO, A.G.; CHOROMANSKI, L.; MCDONOUGH, S.P.; PACKHAM, A.E. and CONRAD, P.A. (1999) Immunogenicity of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite preparation formulated with different adjuvants. *Int. J. for Parasitol.* 29: 1613-1625.
- ANDRIANARIVO, A.G.; ROWE, J.D.; BARR, B.C.; ANDERSON, M.L.; PACKHAM, A.E.; SVERLOW, K.W.; CHOROMANSKI, L.; LOUI, C.; GRACE, A. and CONRAD, P.A. (2000) A POLYGEN[™] - adjuvanted killed *Neospora caninum* tachyzoite preparation failed to prevent foetal infection in pregnant cattle following i.v./i.m. experimental tachyzoite challenge. *Inter. J. for Parasitol.* 30: 985-990.
- ANDRIANARIVO, A.G.; BARR, B.C.; ANDERSON, M.L.; ROWE, J.D.; PACKHAM, A.E.; SVERLOW, K.W. and CONRAD, P.A. (2001) Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum*. *Parasitol. Res.* 87: 817-825.
- ATKINSON, R.; HARPER, P.A.W.; RYCE, C.; MORRISON, D.A. and ELLIS, J.T. (1999) Comparison of the biological characteristics of two isolates of *Neospora caninum*. *Parasitol.* 118: 363-370.

- ATKINSON, R.; HARPER, P.A.W.; REICHEL, M.P. and ELLIS, J.T. (2000) Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. *Parasitol. Today*. 16: 110-114.
- BACIGALUPE, D.; VENTURINI, M.C.; UNZAGA, J.M.; MACHUCA, M.; ALVAREZ, M.L.; DI LORENZO, C.; ABDALA, A.; GUGLIELMONE, A.; BASSO, W. and VENTURINI, L. (1998) Infecciones transplacentarias por *Neospora caninum* en bovinos. Memorias XVI Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. 9-13 Nov. Santa Cruz de la Sierra. Bolivia. p. 143.
- BAHNEMANN, H.G. (1990) Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine. *Vaccine*. 8: 299-303.
- BAILLARGEON, P.; FECTEAU, G.; PARE, J.; LAMOTHE, P. and SAUVE, R. (2001) Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218: 1803-1806.
- BARBER, J.S. and TREES, A.J. (1998) Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *Int. J. Parasitol.* 28: 57-64.
- BARBER, J.S.; GASSER, R.B.; ELLIS, J.; REICHEL, M.P.; MCMILLAN, D. and TREES A.J. (1997) Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. *J. Parasitol.* 83: 1056-1058.

- BARLING, K.S.; MCNEILL, J.W.; THOMPSON, J.A.; PASCHAL, J.C.; MCCOLLUM, T.; CRAIG, T.M. and GARRY ADAMS, L. (2000) Association of serologic status for *Neospora caninum* with post-weaning weight gain and carcass measurements in beef calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 217 : 1356–1360.
- BARLING, K.S.; LUNT, D.K.; GRAHAM, S.L. and CHOROMANSKI, L.J. (2003) Evaluation of an inactivated *Neospora caninum* vaccine in beef feedlot steers. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 222: 624-627.
- BARR, B.C.; ANDERSON, M.L.; DUBEY, J.P. and CONRAD, P.A. (1991) *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. *Vet. Pathol.* 28: 110-116.
- BARR, B.C.; CONRAD, P.A.; BREITMEYER, R.; SVERLOW, K.; ANDERSON, M.L.; REYNOLDS, J.; CHAUVET, A.E.; DUBEY, J.P. and ARDANS, A.A. (1993) Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora* – infected fetuses: four cases 1990 – 1992. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 202: 113–117.
- BARR, B.C.; CONRAD, P.C.; SVERLOW, K.; TARANTAL, A.F. and HENDRICKX, A.G. (1994a) Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. *Lab. Invest.* 71: 236-242.
- BARR, B.C.; ROWE, J.D.; SVERLOW, K.W.; BONDURANT, R.H.; ARDANS, A.A.; OLIVER, M.N. and CONRAD, P.C. (1994b) Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6: 207-215.

- BASSO, W.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M.C.; HILL, D.E.; KWOK O.C.; SHEN, S.K. and DUBEY, J.P. (2001a) First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *J. Parasitol.* 87: 612-618.
- BASSO, W.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M.C.; MOORE, D.P.; RAMBEAU, M.; UNZAGA, J.M.; CAMPERO, C.M., BACIGALUPE and D., DUBEY, J.P. (2001b) Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef – cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. *J. Parasitol.* 87: 906-907.
- BAZLER, T.V.; KNOWLES, D.P.; DUBEY, J.P.; GAY, J.M.; MATHISON, B.A. and MCELWAIN, T.F. (1996) Serological diagnosis of bovine neosporosis by *Neospora caninum* monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1423-1428.
- BASZLER, T.V.; GAY, L.J.C.; LONG, M.T. and MATHISON, B.A. (1999a) Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. *J. Clin. Microbiol.* 37: 4059-4064.
- BASZLER, T.V.; LONG, M.T.; MCELWAIN, T.F. and MATHISON, B. A.. (1999b) Interferon- γ and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. *Int. J. Parasitol.* 29 : 1635-1646.
- BERGERON, N.; FECTEAU, G.; VILLENUEVE, A.; GIRARD, C. and PARE, J. (2001a) Failure of dogs to shed oocysts after being fed bovine fetuses naturally infected by *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 97: 145-152.

- BERGERON, N.; GIRARD, C.; PARE, J.; FECTEAU, G.; ROBINSON, J. and BAILLARGEON, P. (2001b) Rare detection of *Neospora caninum* in placentas from seropositive dams giving birth to full-term calves. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13: 173-175.
- BJERKAS, I.; MOHN, S.F. and PRESTHUS, J. (1984) Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z. Parasitenkd.* 70: 271-274.
- BJÖRKMAN, C. and LUNDEN, A. (1998) Application of iscom antigen preparations in ELISAs for diagnosis of *Neospora* and *Toxoplasma* infections. *Int. J. Parasitol.* 28: 187-193.
- BJÖRKMAN, C.; HOLMDAHL, J. and UGGLA, A. (1997) An enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. *Vet. Parasitol.* 68: 251-260.
- BJÖRKMAN, C.; NÄSLUND, K.; STENLUND, S.; MALEY, S.W.; BUXTON, D. and UGGLA A. (1999) An Ig. G avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11: 41-44.
- BJÖRKMAN, C.; ALENIUS, S.; EMANUELSSON, U. and UGGLA, A. (2000) *Neospora caninum* and bovine virus diarrhoea virus infections in Swedish dairy cows in relation to abortion. *Vet. J.* 159: 201-206.
- BRABIN, L. and BRABIN, B.J. (1992) Parasitic infections in women and their consequences. *Adv. Parasitol.* 31: 1-81.

- BRAKE, D.A. (2002) Vaccinology for control of apicomplexan parasites: a simplified language of immune programming and its use in vaccine design. *Int. J. Parasitol.* 32: 509-515.
- BRAMBELL, F.W.R. (1958) The passive immunity to the young mammal. *Biol. Rev.* 33: 488-531.
- BRITAIN, R. (2000) A review of current reports on bovine neosporosis. *Association Europeenne Transfert Embryonnaire. Newsletter.* 11: 8-10.
- BRYAN, L.A.; GAJADHAR, A.A.; DUBEY, J.P. and HAINES, D.M. (1994) Bovine neonatal encephalomyelitis associated with a *Neospora* sp. Protozoan. *Can. Vet. J.* 35: 111-113.
- BUXTON, D. and INNES, E.A. (1995) A commercial vaccine for toxoplasmosis. *Parasitol.* 110: 11-16.
- BUXTON, D.; MALEY, S.W.; PASTORET, P.P.; BROCHIER, B. and INNES, E.A. (1997a) Examination of red foxes (*Vulpes vulpes*) from Belgium for antibody to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Vet. Rec.* 141: 308-309.
- BUXTON, D.; MALEY, S.W.; THOMPSON, K.M.; TREES, A.J. and INNES, E.A. (1997b) Experimental infection of non-pregnant and pregnant sheep with *Neospora caninum*. *J. Comp. Path.* 117: 1-16.
- BUXTON, D.; MCALLISTER, M.M. and DUBEY, J.P. (2002) The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends Parasitol.* 18: 546-552.

- CAMPERO, C.M.; SCIOTTI, A.; MELUCII, L.M. and CARRILLO, J. (1995) Pelvimetría en ganado para carne y su asociación con el tipo de parto. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 15: 756-759.
- CAMPERO, C.M.; ANDERSON, M.L.; CONOSCIUTO, G.; ODRIOZOLA, H.; BRETSCHNEIDER, G.; POSO, M.A. (1998) *Neospora caninum* associated abortion in dairy herd in Argentina. *Vet. Rec.* 143: 228-229.
- CAMPERO, C.M.; MOORE, D.P.; CANO, D.; LEUNDA, M.R. and ODEON, A.C. (2002) Inoculación experimental con *Neospora caninum* en toros. Congreso de la Asociación Argentina de Veterinarios de Diagnóstico. Córdoba, Noviembre. PAR-13.
- CAMPERO, C.M.; MOORE, D.P.; ODEON, A.C.; CIPOLLA, A.L. and ODRIOZOLA, E. (2003a) Aetiology of bovine abortion in Argentina. *Vet. Res. Com.* 27: 359-369.
- CAMPERO, C.M.; MOORE, D.P.; LAGOMARSINO, H.; ODEON, A.C.; CASTRO M. and VISCA H. (2003b) Serological status and abortion rate in progeny obtained by natural service or embryo transfer from *Neospora caninum*-seropositive cows. *J. Vet. Med. Series B.* 50: 458-460.
- CANNAS, A.; NAGULESWARAN, A.; MÜLLER, N.; GOTTSTEIN, B. and HEMPHILL, A. (2003) Reduced cerebral infection of *Neospora caninum*-infected mice after vaccination with recombinant protein NcMIC3 and RIBI adjuvant. *J. Parasitol.* 89: 44-50.
- CARROL, M.C.; WARD, E.S.; RAVETCH, J.; KELSOE, G. and FEARON, D. (2001)

The humoral immune response. En: Janeway, C.A.; Travers, P.; Walport, M.; Shlomchik, M.J. Immunobiology: the immune systems in health and disease. 5^o Ed. Published by Garland Publishing, New York, USA. 341-381.

CHOROMANSKI, L. and BLOCK (2000) Humoral immune responses and safety of experimental formulations of inactivated *Neospora*-vaccines. Parasitol. Res. 86: 851-853.

CLARK, D.A. and CROITORU, K. (2001) Th1/Th2,3 imbalance due to cytokine-producing NK, gamma delta T and NK-gamma-delta T cells in murine pregnancy decidua in success or failure of pregnancy. Am. J. Reprod. Immunol. 45, 257-265.

CLARK, D.A.; ARCK, P.C. and CHAOUAT, G. (1999) Why did your mother reject you? Immunogenetic determinants of the response to environmental selective pressure expressed at the uterine level. Am. J. Reprod. Immunol. 41: 5-22.

COLE, R.A.; LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L. and DUBEY, J.P. (1995) Vertical transmission of *Neospora caninum* in mice. J. Parasitol. 81: 730-732.

CONRAD, P.A.; BARR, B.C.; SVERLOW, K.W.; ANDERSON, M.; DAFT, M.; KINDE, H.; DUBEY, J.P.; MUNSON, L. and ARDANS, A. (1993) *In vitro* isolation and characterization of a *Neospora* sp from aborted bovine fetuses. Parasitol. 106: 239-249.

DANNATT, L.C. (1998) *Neospora caninum* antibody levels in an endemically-infected dairy herd. Irish Vet. J. 52: 200-201.

- DAVISON, H.C.; OTTER, A. and TREES, A.J. (1999) Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *Int. J. Parasitol.* 29: 1683-1689.
- DAVISON, H.C.; GUY, C.S.; MCGARRY, J.W.; GUY, F.; WILLIAMS, D.J.; KELLY, D.F. and TREES, A.J. (2001) Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. *Res. Vet. Sci.* 70: 163-168.
- DE MAREZ, T.; LIDDELL, S.; DUBEY, J.P.; JENKINS, M.C. and GASBARRE L. (1999) Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. *Int. J. Parasitol.* 29: 1647-1657.
- DESMONTS, G. and REMINGTON, J.S. (1980) Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *J. Clin. Microbiol.* 11: 652-568.
- DIJKSTRA, T.; EYSKER, M.; SHARES, G.; CONRATHS, F.J.; WOUDA, W. and BARKEMA, H.W. (2001a) Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *Inter. J. for Parasitology.* 31: 747 – 752.
- DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H.W.; EYSKER, M. and WOUDA, W. (2001b) Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. *Inter. J. for Parasitology.* 31: 209-215.

- DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H.W.; BJÖRKMAN, C. and WOUDA, W. (2002) A high rate of seroconversion for *Neospora caninum* in a dairy herd without an obvious increased incidence of abortions. *Vet. Parasitol.* 109: 203–211.
- DUBEY, J.P. (1994) Toxoplasmosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 205: 1593-1598.
- 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.* 42–56.
- DUBEY, J.P. and LINDSAY D.J. (1989a) Transplacental *Neospora caninum* infection in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 50: 1578–1579.
- DUBEY, J.P. and LINDSAY, D.J. (1989b) Transplacental *Neospora caninum* infection in cats. *J. Parasitol.* 75: 765-771.
- DUBEY, J.P. and LINDSAY, D.J. (1990) *Neospora caninum* induced abortion in sheep. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2: 230-233.
- DUBEY, J.P. and LINDSAY, D.S. (1996) A review of *Neospora caninum* and Neosporosis. *Vet. Parasitol.* 67: 1-59.
- DUBEY, J.P.; HATTEL, A.L.; LINDSAY, D.S. and TOPPER, M.J. (1988) Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193: 1259–1263.

- DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; ANDERSON, M.L.; DAVIS S.W. and SHEN S.K. (1992) Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 201: 709-713.
- DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; ADAMS, D.S.; GAY, J.M.; BASZLER, T.V.; BLAGBURN, B.L. and THULLIEZ, P. (1996) Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. Am. J. of Vet. Res. 57: 329-336.
- DUBEY, J.P.; BARR, B.C.; BARTA, J.R.; BJERKAS, I.; BJÖRKMAN, C.; BLAGBURN, B.L.; BOWMAN, D.D.; BUXTON, D.; ELLIS, J.T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D.E.; HOWE, D.K.; JENKINS, M.C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A.E.; MATTSSON, J.G.; MCALLISTER, M.M.; MODRY, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L.D.; SPEER, C.A.; TREES, A.J.; UGGLA, A.; UPTON, S.J.; WILLIAMS, D.J.L. and LINDSAY, D.S. (2002) Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidian. Int. J. Parasitol. 32: 929-946.
- ECHAIDE, I.E.; VALENTINI, B. and BASZLER, T.V. (1998) Detección de anticuerpos contra *Neospora caninum* en bovinos de la cuenca lechera de Santa Fe y Córdoba. Resultados preliminares. XII Reunión Científico Técnica, Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico, Mar del Plata. p. 71.
- ECHAIDE, I.; VALENTINI, B.; MONDINO, D. and TORIONI, S. (2002) Neosporosis bovina: análisis seroepidemiológico de un hato lechero mediante IFA y ELISA. XIV Reunión Científico Técnica, Asociación Argentina de

Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. Villa General Belgrano, Córdoba. PAR-01.

- EPERON, S.; BRONNIMANN, K.; HEMPHILL, A. and GOTTSTEIN, B. (1999) Susceptibility of B-cell deficient C57BL/6 (MT) mice to *Neospora caninum* infection. *Parasite Immunol.* 21: 225-236.
- ESTES, D.M.; CLOSSER, N.M. and ALLEN, G.K. (1994) Interferon-gamma stimulates IgG2 production from bovine B cells co-stimulated with anti-mu and mitogen. *Cell. Immunol.* 154: 287-295.
- ESTES, D.M.; HIRANO, A.; HEUSSLER, V.T.; DOBBELAERE, D.A.E. and BROWN, W.C. (1995) Expression and biological activities of bovine interleukin 4: effects of recombinant interleukin 4 on T cell proliferation and B cell differentiation and proliferation in vitro. *Cell. Immunol.* 163: 268-279.
- EZEKOWITZ, A.; PAMER, E. and HAYDAY, A.C. (2001) Adaptive immunity to infection. En: Janeway, C.A.; Travers, P.; Walport, M.; Shlomchik, M.J. *Immunobiology: the immune systems in health and disease.* 5° Ed. Published by Garland Publishing, New York, USA. 381-425.
- FRENCH, N.P.; CLANCY, D.; DAVISON, H.C. and TREES, A.J. (1999) Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control. *Int. J. Parasitol.* 29: 1691-1704.
- FUCHS, N.; SONDA, S.; GOTTSTEIN, B. and HEMPHILL, A. (1998) Differential expression of cell surface and dense granule associated *Neospora caninum* proteins in tachyzoites and bradyzoites. *J. Parasitol.* 84: 753-758.

- GAZZINELLI, R. T.; WYSOCKA, M.; HAYASHI, S.; DENKERS, E. Y.; HIENY, S.; CASPAR, P.; TRINCHIERI, G., and SHER, A. (1994) Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J. of Immunol.* 153: 2533–2543.
- GONDIM, L.F.; SAEKI, H.; ONAGA, H.; HIRITANI, M. and YAMANE, I. (1999) Maintenance of *Neospora caninum* tachyzoites using Mongolian gerbils *Meriones unguiculatus*. *N. Z. Vet. J.* 47: 36.
- GONDIM, L.F.; PINHEIRO, A.M.; SANTOS, P.O.; JESUS, E.E.; RIBEIRO, M.B.; FERNANDES, H.S.; ALMEIDA, M.A.; FREIRE, S.M.; MEYER, R. and MCALLISTER, M.M. (2001) Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a natural infected dog, and production of encysted bradyzoite in gerbils. *Vet. Parasitol.* 101: 1-7.
- GONDIM, L.F.; GAO, L. and MCALLISTER, M.M. (2002) Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. *J. Parasitol.* 88: 1159-1163.
- GONDIM, L.F.P.; MCALLISTER, M.M.; ANDERSON-SPRECHER, R.C.; BJÖRKMAN, C.; LOCK, T.F.; FIRKINS, L.D.; GAO, L. and FISCHER, W. (2004) Transplacental transmission and abortion in cows administered *Neospora caninum* oocysts. *J. Parasitol. In press.*
- GOTTSTEIN, B.; HENTRICH, B.; WYSS, R.; THÜR, B.; BUSATO, A.; STÄRK, K.D.C. and MÜLLER N. (1998) Molecular and immunodiagnostic investigation on bovine neosporosis in Switzerland. *Int. J. Parasitol.* 28: 679-691.

- GOTTSTEIN, B.; KRITSNER, S.; CANNAS, A.; SAGER, H. and GREIF, G. (2001) Toltrazuril and ponazuril for treatment of experimental murine and bovine neosporosis. Proceedings of the 18th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, Stresa-Italy. B9.
- GUARINO, A.; FUSCO, G.; SAVINI, G.; DI FRANCESCO, G. and CRINGOLI, G. (2000) Neosporosis in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Southern Italy. *Vet. Parasitol.* 91: 15-21.
- GUY, C.S.; WILLIAMS, D.J.L.; KELLY, D.F.; MCGARRY, J.W.; GUY, F.; BJÖRKMAN, C.; SMITH, R.F. and TREES, A.J. (2001) *Neospora caninum* in persistently infected pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. *Vet. Rec.* 149: 443-449.
- HEMPHILL, A. (1999) The host-parasite relationship in neosporosis. *Adv. Parasitol.* 43: 47-104.
- HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B.; CONRATHS, F.J.; DE MEERSCHMAN, F.; ELLIS, J.T.; INNES, E.A.; MCALLISTER, M.M.; ORTEGA-MORA, L.-M.; TENTER, A.M.; TREES, A.J.; UGGLA, A.; WILLIAMS, D.J.L. and WOUDA W. (2000) A European perspective on *Neospora caninum*. *Inter. J. Parasitol.* 30: 877-924.
- HERNANDEZ, J.; RISCO, C. and DONOVAN, A. (2001) Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 219: 632-635.

- HIETALA, S.K. and THURMOND, M.C. (1999) Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. *Int. J. Parasitol.* 29: 1669-1676.
- HILL, J.A.; POLGAR, K. and ANDERSON, D.J. (1995) T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. *J. Am. Med. Assoc.* 273, 1933-1936.
- HOBSON, J.C.; DUFFIELD, T.F.; KELTON, D.; LISSEMORE, K.; HIETALA, S.K.; LESLIE, K.E.; MCEWEN, B.; CRAMER, G. and PEREGRINE, A.S. (2002) *Neospora caninum* serostatus and milk production of Holstein cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 221: 1160-1164.
- HOWE, D.K. and SIBLEY, L.D. (1999) Comparison of the major antigens of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 29: 1489-1496.
- HUNTER, C.A. and REINER, S.L. (2000) Cytokines and T cells in host defense. *Curr. Opin. Immunol.* 12: 413-418.
- INNES, E.A.; PANTON, W.R.; MARKS, J.; TREES, A.J.; HOLMDAHL, J. and BUXTON, D. (1995) Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of 3H Uracil. *J. Comp. Path.* 113: 95-100.
- INNES, E.A.; WRIGHT, S.E.; MALEY, S.; RAE, A.; SCHOCK, A.; KIRVAR, E.; BARTLEY, P.; HAMILTON, C.; CAREY, I.M. and BUXTON, D. (2001a) Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int. J. Parasitol.* 31: 1523-1534.

- INNES, E.A.; LUNDEN, A.; ESTEBAN, I.; MARKS, J.; MALEY, S.; WRIGHT, S.; RAE, A.; HARKINS, D.; VERMEULEN, A.; MCKENDRICK, I.J. and BUXTON, D. (2001b) A previous infection with *Toxoplasma gondii* does not protect against a challenge with *Neospora caninum* in pregnant sheep. *Parasite Immunol.* 23: 121-132.
- INNES, E.A.; ANDRIANARIVO, A.G.; BJÖRKMAN, C.; WILLIAMS, D.J.L. and CONRAD P.A. (2002) Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends Parasitol.* 18: 497-504.
- JENKINS, M.C. (2001) Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 101: 291-310.
- JENSEN, L.; JENSEN, T.K.; LIND, P.; HENRIKSEN, S.A.; UGGLA, A. and BILLEHANSEN, V. (1998) Experimental porcine neosporosis. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 106: 475 – 482.
- KASPAR, L.H. and KHAN, L.H. (1998) Antigen-specific CD8⁺ T-cells protect against lethal toxoplasmosis in mice infected with *Neospora caninum*. *Infect. Immun.* 66: 1554-1560.
- KHAN, I. A.; SCHWARTZMAN, J. D.; FONSEKA, S. and KASPER, L. H. (1997) *Neospora caninum*: role for immune cytokines in host immunity. *Exp. Parasitol.* 85: 24–34.
- KIM, J.T.; PARK, J.Y.; SEO, H.S.; OH, H.G.; NOH, J.W.; KIM, J.H.; KIM, D.Y.; YOUN, H.J. (2002) In vitro antiprotozoal effects of artemisinin on *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 103: 53–63.

- KWON, H. J.; KIM, J.H.; KIM, M.; LEE, J.K.; HWANG, W.S.; KIM D.Y. (2003) Anti-parasitic activity of depudecin on *Neospora caninum* via the inhibition of histone deacetylase Vet. Parasitol. 112: 269–276.
- LIDDELL, S., JENKINS, M. C.; COLLICA, C.M. and DUBEY J. P.(1999) Prevention of vertical transfer of *Neospora caninum* in BALB/c mice by vaccination. J. Parasitol. 85: 1072–1075.
- LIDDELL, S.; PARKER, C.; VINYARD, B.; JENKINSM.; and DUBEY J. P. (2003) Immunization of mice with plasmid DNA coding for NCGRA7 or NCSHSP33 confers partial protection against vertical transmission of *Neospora caninum* J. Parasitol. 89: 496–500.
- LITTELL, R.C.; HENRY, P.R. and AMMERMAN C.B. (1998) Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. J. Anim. Sci. 76: 1216-1231.
- LINDSAY, D.S. and DUBEY, J.P. (1989) Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. Am. J. Vet. Res. 50: 1981-1983.
- LINDSAY, D.S.; RIPPEY, N.S.; COLE, R.A.; PARSONS, L.C.; DUBEY, J.P.; TIDWELL, R.R. and BLAGBURN, B.L. (1994) Examination of the activities of 43 chemotherapeutic agents against *Neospora caninum* tachyzoites in cultured cells. Am. J. Vet. Res. 55: 976–981.
- LINDSAY, D.S.; RIPPEY, N.S.; POWE, T.A.; SARTIN, E.A.; DUBEY, J.P. and BLAGBURN, B.L. (1995) 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.; KELLY, E.J.; MCKOWN, R.D.; STEIN, F.J.; PLOZER, J.; HERMAN, J.; BLAGBURN, B.L. and DUBEY, J.P. (1996) Prevalence *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in coyotes (*Canis latrans*) and experimental infections of coyotes with *Neospora caninum*. J. Parasitol. 82: 657-659.
- LINDSAY, D.S.; LENZ, S.D.; DYKSTRA, C.C.; BLAGBURN, B.L. and DUBEY J.P. (1998) Vaccination of mice with *Neospora caninum*: response to oral challenge with *Toxoplasma gondii* oocysts. J. Parasitol. 84: 311-315.
- LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P. and DUNCAN, R.B. (1999a) Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. Vet. Parasitol. 82: 327-333.
- LINDSAY, D.S.; LENZ, S.D. and BLAGBURN, B.L. (1999b) Characterization of temperature-sensitive strains of *Neospora caninum* in mice. J. Parasitol. 85: 64-67.
- LINDSAY, D.S.; WESTON, J.L. and LITTLE, S.E. (2001) Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in gray foxes *Urocyon cinereoargenteus* from South Carolina. Vet. Parasitol. 97: 159-164.
- LONG, M.L. and BASZLER, T.V. (1996) Foetal loss in BALB/c mice infected with *Neospora caninum*. J. Parasitol. 82: 608-611.
- LONG, M.L. and BASZLER, T.V. (1998) Modulation of congenital *Neospora caninum* transmission by in vivo priming with avirulent challenge and

neutralization of interleukin-4. 73rd Annual meeting of the American Society of Parasitologists, Hawai.

LONG, M.T. and BAZLER, T.V. (2000) Neutralisation of maternal IL-4 modulates congenital protozoal transmission: comparison of innate versus acquired immune responses. *J. Immunol.* 164: 4768-4774.

LONG, M.L.; BASZLER, T.V. and MATHISON, B.A. (1998) Comparison of intracerebral parasite load, lesion development and systemic cytokines in mouse strains infected with *Neospora caninum*. *J. Parasitol.* 84: 316-320.

LUNDEN, A.; MARKS, J.; MALEY, S. and INNES, E.A. (1998) Cellular immune responses in cattle experimentally infected with *Neospora caninum*. *Parasite Immunol.* 20: 519-526.

LUNDEN, A.; WRIGHT, S.; ALLEN, J.E. and BUXTON, D. (2002) Immunisation of mice against neosporosis. *Inter. J. Parasitol.* 32: 867-876.

MALEY, S. W.; BUXTON, D.; RAE, A. G.; WRIGHT, S. E.; SCHOCK, A.; BARTLEY, P. M.; ESTEBAN-REDONDO, I.; SWALES, C.; HAMILTON, C. M.; SALES J. and Innes E. A. (2003) The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at mid-gestation. *J. Comp. Path.* 129: 186–195.

MARKS, J.; LUNDEN, A.; HARKINS, D. and INNES, E.A. (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.; BARR, B.C.; MADIGAN, J.; LAKRITZ, J.; NORDHAUSEN, R. and

- CONRAD, P.A. (1996) Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209: 1907-1913.
- MCALLISTER, M.M.; HUFFMAN, E.M.; HIETALA, S.K.; CONRAD, P.A.; ANDERSON, M.L. and SALMAN, M.D. (1996a) Evidence suggesting a point source exposure in an outbreak of bovine abortion due to neosporosis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8: 355-357.
- MCALLISTER, M.M.; PARMLEY, S.F.; WEISS, L.M.; WELCH, V.J. and MCGUIRE, A.M. (1996b) An immunohistochemical method for detecting bradyzoite antigen (BAG5) in *Toxoplasma gondii*-infected tissues cross-reacts with a *Neospora caninum*-bradyzoite antigen. *J. Parasitol.* 82: 354-355.
- MCALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; JOLLEY, W.R.; WILLS, R.A. and MCGUIRE, A.M. (1998) Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 28: 1473-1478.
- MCALLISTER, M.M.; BJÖRMAN, C.; ANDERSON-SPRECHER, R. and ROGERS, D.G. (2000) Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 217: 881-887.
- MCALLISTER, M.M. (2001) Do cows protect fetuses from *Neospora caninum* transmission? *Trends Parasitol.* 17: 6.
- MCGARRY, J.W.; STOCKTON, C.M.; WILLIAMS, D.J.L. and TREES, A.J. (2003) Protracted Shedding of Oocysts of *Neospora caninum* by a Naturally Infected Foxhound *J. Parasitol.* 89: 628-630.

- MCGUIRE, A.M.; MCALLISTER, M.M. and JOLLEY, W.R. (1997) A protocol for the production of *Neospora caninum* tissue cysts in mice. *J. Parasitol.* 83: 647-651.
- MCGUIRE, A.M.; MCALLISTER, M.; WILLS, R.A. and TRANAS, J.D. (1999) Experimental inoculation of domestic pigeons (*Columbia livia*) and zebra finches (*Poephilia guttata*) with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int. J. Parasitol.* 29: 1525-1529.
- MOEN, A.R.; WOUUDA, W.; MUL, M.F.; GRAAT, E.A.M. and VAN WERVEN, T. (1998) Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks: a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. *Theriogenology.* 49: 1301-1309.
- MOORE, D.P.; CAMPERO, C.M.; ODEON, A.C.; POSO, M.A.; CANO, D.; LEUNDA, M.R.; BASSO, W.; VENTURINI, M.C. and SPÄTH, E.A.J. (2002) Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. *Vet. Parasitol.* 107: 303-316.
- MOORE, D.P.; DRAGHI, M.G.; CAMPERO, C.M.; CETRA, B.; ODEON, A.C.; ALCARAZ, E. and SPÄTH, E.A.J. (2003a) Serological evidence of *Neospora caninum* infections in beef bulls in six counties of the Corrientes province, Argentina. *Vet. Parasitol.* 114: 247-252.
- MOORE, D.P.; CAMPERO, C.M.; ODEON, A.C.; CHAYER R. and BIANCO M.A. (2003b) Reproductive losses due to *Neospora caninum* in a beef herd in Argentina. *J. Vet. Med. B.* 50: 304-308.

- MOREAU, P.; PAUL, P.; ROUAS-FREISS, N.; KIRSZENBAUM, M.; DAUSSET, J. and CAROSELLA, E.D. (1998) Molecular and immunologic aspects of the nonclassical HLA class I antigen HLA-G: evidence for an important role in the maternal tolerance of the fetal allo graft. *Am. J. Reprod. Immunol.* 40: 136-144.
- MUNN, D.H.; ZHOU, M.; ATTWOOD, J.T.; BONDAREV, I.; CONWAY, S.J.; MARSHALL, B.; BROWN, C. and MELLOR, A.L. (1998) Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281: 1191-1193.
- MURRAY, R.D. (1991) Lesions in aborted bovine fetuses and placenta associated with bovine viral diarrhoea virus infection. *Arch. of Virol.* 3: 217-224.
- MURTAUGH, M.P.; BAARSCH, M.J.; ZHOU, Y.; SCAMURRA, R.W. and LIN, G. (1996) Inflammatory cytokines in animal health and disease. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 54: 45-55.
- NISHIKAWA, Y.; MIKAMI, T. and NAGASAWA, H. (2002) Vaccine development against *Neospora caninum* infection. *J. Vet. Med. Sci.* 64:1-5.
- O' TOOLE, D. and JEFFREY, M. (1987) Congenital sporozoan encephalomyelitis in a calf. *Vet. Rec.* 121: 563-566.
- OTSUKA, A.; HANAFUSA, T.; KONO, N. and TARUI, S. (1991). Lipopolysaccharide augments HLA-A.B.C. molecule expression but inhibits interferon-gamma-

induced HLA-DR molecule expression on cultured human endothelial cells. *Immunology* 73: 428-432.

OWEN, M.R. and TREES, A.J. (1998) Vertical transmission of *Toxoplasma gondii* from chronically infected house (*Mus musculus*) and field (*Apodemus sylvaticus*) mice determined by polymerase chain reaction. *Parasitology* 116: 299-304.

PACKHAM, A.E.; SVERLOW, K.W.; CONRAD, P.A.; LOOMIS, E.F.; ROWE, J.D.; ANDERSON, M.L.; MARSH, A.E.; CRAY, C. and BARR, B.C. (1998) A modified agglutination test for *Neospora caninum*: development, optimization, and comparison to the indirect fluorescent-antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5: 467 - 473.

PARE, J.; THURMOND, M.C. and HIETALA, S.K. (1996) Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhoo mortality. *Can. J. Vet. Res.* 60: 133-139.

PARE, J.; THURMOND, M.C. and HIETALA, S.K. (1997) *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J. Parasitol.* 83: 82-87.

PARE, J.; FECTEAU, G.; FORTIN, M. and MARSOLAIS, G. (1998) Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213: 1595-1598.

- PATITUCCI, A.N.; CHARLESTON, W.A.G.; ALLEY, M.R.; O'CONNOR, R.J. and POMROY, W.E. (1999) Serological study of a dairy herd with a recent history of *Neospora* abortion. *N. Z. Vet. J.* 47: 28-30.
- PAULNOCK, D.; SPRINGER, T.; JENKINS, M.K.; TSCHOPP, J. and STEINMAN R. (2001) T cell mediated immunity. En: Janeway, C.A.; Travers, P.; Walport, M.; Shlomchik, M.J. *Immunobiology: the immune systems in health and disease*. 5^o Ed. Published by Garland Publishing, New York, USA. 295-341.
- PETERS, M.; LÜTKEFELS, E.; HECKEROTH, A.R. and SHARES, G. (2001) Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. *Inter. J. for Parasitology*. 31: 1144 – 1148.
- PFEIFFER, D.U.; WILLIAMSON, N.B. and REICHEL, M.P. (2000) Long-term serological monitoring as a tool for epidemiological investigation of *Neospora caninum* infection in a New Zealand dairy herd. *In: Proceedings of the Ninth International Symposium of Veterinary Epidemiologist and Economics*. P. 616-618.
- QUINN, H.E.; ELLIS, J.T. and SMITH N.C. (2002) *Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy? *Trends in Parasitol.* 18: 391-394
- QUINTANILLA-GOZALO, A.; PEREIRA-BUENO, J.; TABARES, E.; INNES, E.A.; GONZALEZ-PANIELLO, R. and ORTEGA-MORA, L.M. (1999) Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Spain. *Int. J. Parasitol.* 29: 1201-1208.

- RAGHUPATHY, R. (1997) Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol. Today*. 18: 478-482.
- REICHEL, M.P. and DRAKE, J.M. (1996) The diagnosis of *Neospora* abortions in cattle. *N. Z. Vet. J.* 44: 151-154.
- REICHEL, M.P. and ELLIS, J.T. (2002) Control options for *Neospora caninum* infections in cattle-current state of knowledge. *N. Z. Vet. J.* 50: 86-92.
- RITTER, D.M.; KERLIN, R.; SIBERT, G. and BRAKE, D. (2002) Immune factors influencing the course of infection with *Neospora caninum* in murine host. *J. Parasitol.* 88: 271-280.
- ROBERTS, C.W.; WALKER, W. and ALEXANDER, W. (2001) Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 476-788.
- ROMAND, S.; THULLIEZ, P. and DUBEY, J.P. (1998) Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Parasitol. Res.* 60: 50-53.
- ROMERA, S.A.; ZAMORANO, P.I.; ALCON, V.L.; PUNTEL, M.; FERRARI, P.N.; BORCA, M.V. and SADIR A.M. (1999) Estrategia de inmunización en bovinos: empleo de RN-205 para incrementar la respuesta humoral y celular contra herpesvirus bovino-1. *Therios* 28: 216-225.
- ROMERA, S.A.; TH HILGERS, L.A.; PUNTEL, M.; ZAMORANO, P.I.; ALCON, V.L.; DUS SANTOS, M.J.; BLANCO VIERA, J. BORCA, M.V. and SADIR A.M. (2001) Adjuvant effects of sulfolipo-cyclodextrin in a squalene-in-water and

water-in-mineral oil emulsions for BHV-1 vaccines in cattle. *Vaccine* 19: 132-141.

SAGER, H.; GLOOR, M.; BÖRKMAN, C.; KRITZNER, S. and B. GOTTSTEIN, B. (2003) Assessment of antibody avidity in aborting cattle by a somatic *Neospora caninum* tachyzoite antigen IgG avidity ELISA. *Vet. Parasitol.* 112: 1-10.

SANDERSON, M.W.; GAY, J.M. and BASZLER, T.V. (2000) *Neospora caninum* seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the Northwestern United States. *Vet. Parasitol.* 90: 15-24.

SAWADA, M.; PARK, C.; KONDO, H.; MORITA, T.; SHIMADA, A.; YAMANE, I. and UMEMURA, T. (1998) Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese Dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 60: 853-854.

SAWADA, M.; KONDO, H.; TOMIOKA, Y.; PARK, C.; MORITA, T.; SHIMADA, A. and UMEMURA, T. (2000) Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected adult dairy cow. *Vet. Parasitol.* 90: 247-252.

SCHARES, G.; DUBREMETZ, J.F.; DUBEY, J.P.; BÄRWALD, A.; LOYENS, A. and CONRATHS, J.F. (1999) *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.; WENZEL, U.; MULLER, T. and CONRATHS, F.J. (2001) Serological evidence for naturally occurring transmission of *Neospora caninum* among foxes (*Vulpes vulpes*). *Int. J. Parasitol.* 31: 418-423.

- SCHLAFER, D.H.; FISHER, P.J. and DAVIES, C.J. (2000) The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. *An. Reprod. Sci.* 60-61: 145-160
- SCHULTZ, R.D. (1973) Developmental aspects of the fetal bovine immune response: a review. *Cornell Vet.* 63: 507-535.
- SHIVAPRASSAD, H.L.; ELY, R. and DUBEY, J.P. (1989) A *Neospora* – like protozoon found in an aborted bovine placenta. *Vet. Parasitol.* 34: 145-148.
- SIITERI, P.K. and STITES, D.P. (1982) Immunologic and endocrine interrelationships in pregnancy. *Biol. Reprod.* 26: 1-14.
- SÖNDGEN, P.; PETERS, M.; BÄRWALD, A.; WURM, R.; HOLLING, F.; CONRATHS, F.J. and SCHARES, G. (2001) Bovine neosporosis: immunoblot foetal serology. *Vet. Parasitol.* 102: 279-290.
- STASKA, L.M.; MCGUIRE, T.C.; DAVIES, C.J.; LEWIN, H.A. and BASZLER, T.V. (2003) *Neospora caninum*-infected cattle develop parasite-specific CD4⁺ Cytotoxic T Lymphocytes. *Infection and Immunity* 71: 3272–3279.
- STENLUND, S.; KINDAHL, H.; MAGNUSSON, U.; UGGLA, A. and BJÖRKMAN, C. (1999) Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 85: 227-234.
- TANAKA, T.; HAMADA, T.; INOUE, N.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K.; SU-ZUKI, N. and MIKAMI, T. (2000) The role of CD4⁺ or CD8⁺T cells in the protective

- immune response of BALB/c mice to *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 90: 183–191.
- THILSTED, J.P. and DUBEY, J.P. (1989) Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1: 205-209.
- THELLIN, O. and HEINEN, E. (2003) Pregnancy and the immune system: between tolerance and rejection. *Toxicology* 185: 179-184
- THELLIN, O.; COUMANS, B.; ZORZI, W.; IGOUT, A. and HEINEN, E. (2000) Tolerance to the foeto-placental "graft": ten ways to support a child for nine months. *Curr. Opin. Immunol.* 12: 731-737.
- THORNTON, R.N.; GAJADHAR, A. and EVANS, J. (1994) *Neospora* abortion epidemic in a dairy herd. *N.Z. Vet. J.* 42: 190-191.
- THURMOND, M.C. and HIETALA, S. (1995) Strategies to control *Neospora* infection in cattle. *The Bovine Practitioner* 29: 60-63.
- THURMOND, M.C. and HIETALA, S. (1996) Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 57: 1559-1562.
- THURMOND, M.C. and HIETALA, S. (1997) Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first-lactation dairy. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 210: 672-674.
- THURMOND, M., HIETALA, S. and BLANCHARD, P.C. (1997) Herd-based diagnosis of *Neospora caninum*-induced endemic and epidemic

abortion in cows and evidence for congenital and postnatal transmission. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9: 44-49.

THURMOND, M., HIETALA, S. and BLANCHARD, P.C. (1999) Predictive values of fetal histopathology and immunoperoxidase staining in diagnosing bovine abortion caused by *Neospora caninum* in a dairy herd. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11: 90-94.

TIZARD, J. (1996) *Immunology Veterinary: an introduction*. 5^o Ed. Saunders Company, USA. 55-330.

TOMIOKA, Y; SAWADA, M; OCHIAI, K; UMEMURA, T. (2003) *Neospora caninum* antigens recognized by mouse Ig.G at different stages of infection including recrudescence. *J. Vet. Med. Sci.* 65: 745-747.

TRANAS, J.; HEINZEN, R.A.; WEISS, L.M. and MCALLISTER, M.M. (1999) Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6: 765-767.

TREES, A.J.; DAVISON, H.C.; INNES, E.A. and WASTLING, J.M. (1999) Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. *Int. J. Parasitol.* 29: 1195-1200.

TREES, A.J.; MCALLISTER, M.M.; GUY, C.S.; MCGARRY J.W.; , SMITH R.F. and WILLIAMS D.J.L. (2002) *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. *Vet. Parasitol.* 109: 147–154.

TUO, W.; PALMER, G.H.; MCGUIRE, T.C.; ZHU, D. and BROWN, W. (2000) Interleukin-12 as an adjuvant promotes immunoglobulin G and type 1

cytokine recall responses to major surface protein 2 of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Infect. Immun.* 68: 270-280.

UGGLA, A.; STENLUND, S.; HOLMDAHL, O.J.M.; JAKUBEK, E.B.; THEBO, P.; KINDAHL, H. and BJÖRKMAN, C. (1998) Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. *Int. J. Parasitol.* 28: 1467-1472.

VENTURINI, L.; DILORENZO, C.; VENTURINI, C. y ROMERO, J. (1995) Anticuerpos anti-*Neospora* sp. en vacas que abortaron. *Vet. Arg.* 12: 167-170.

VENTURINI, M.C.; VENTURINI, L.; BACIGALUPE, D.; MACHUCA, M.; ECHAIDE, I.; BASSO, W.; UNZAGA, J.M.; DI LORENZO, C.; GUGLIELMONE, A.; JENKINS, M.C. and DUBEY, J.P. (1999) *Neospora caninum* infections in bovine fetuses and dairy cows with abortions in Argentina. *Int. J. Parasitol.* 29: 1705-1708.

VENTURINI, M.C.; BACIGALUPE, D.; VENTURINI, L.; RAMBEAUD, M.; CAMPERO, C.M.; MOORE, D.P.; UNZAGA, J.M.; BASSO, W. y MACHUCA, M. (2000) Detección de *Neospora caninum* en ratones inoculados con cerebros de fetos bovinos abortados. XXI Congreso Mundial de Buiatría, Punta del Este, Uruguay, 4- 8 diciembre. Resúmenes p. 95.

VENTURINI, M.C.; BACIGALUPE, D.; VENTURINI, L.; BASSO, W.; MOORE, D.P.; UNZAGA, J.M.; MACHUCA, M. and CAMPERO, C.M. (2001) Isolation of *Neospora* sp. from the brain of a dairy calf in Argentina. The 18th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, Stresa, Italy. B9.

- VONLAUFEN, N.; MÜLLER, N.; KELLER, N.; NAGULESWARAN, A.; BOHNE, W.; MCALLISTER, M.; BJÖRKMAN, C.; MÜLLER, E.; CALDELARI, R. and HEMPHILL, A. (2002) 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.; JANZEN, E.D. and RIBBLE, C.S. (1998) Determination of the association between *Neospora caninum* infection and reproductive performance in beef herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213: 685-690.
- WALDNER, C.L.; JANZEN, E.D.; HENDERSON, J. and HAINES, D.M. (1999) Outbreak of abortion associated with *Neospora caninum* infection in a beef herd. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 215: 1485-1490.
- WALDNER, C.L.; HENDERSON, J.; WU, J.T.; BREKER, K. and CHOW, E.Y.W. (2001) Reproductive performance of a cow-calf herd following a *Neospora caninum*-associated abortion epidemic. *Can. Vet. J.* 42: 355–360.
- WESTERMANN, J. and PABST, R. (1990) Lymphocyte subsets in the blood: a diagnostic window on the lymphoid system? *Immunol Today.* 11: 406-410.
- WILLIAMS, D.J.L.; MCGARRY, J.W.; GUY, F.; BARBER, J. and TREES, A.J. (1997) Novel ELISA for detection of *Neospora*-specific antibodies in cattle. *Vet. Rec.* 140: 328-331.
- WILLIAMS, D.J.L.; GUY, C.S.; MCGARRY, J.W.; GUY, F.; TASKER, L.; SMITH, R.F.; MACEACHENR, 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. *Parasitol.* 121: 347-358.

WILLIAMS, D.J.L.; GUY, C.S.; SMITH, R.F.; GUY, F.; MCGARRY, J.W.; MACAY, J.S. and TREES, A.J. (2003) First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. *Inter. J. Parasitol.* 33: 1059-1065.

WOUDA, W., MOEN, A.R. and SCHUKKEN, Y.H. (1998) Abortion risk in progeny of cows that experienced a *Neospora caninum* epidemic. *Theriogenology.* 49: 1311-1316.

WOUDA, W.; DIJKSTRA, T.H.; KRAMER, A.M.H.; VAN MANEN, C. and BRINKHOF, J.M.A. (1999) Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *Int. J. Parasitol.* 29: 1677-1682.

YAEGER, M.J.; SHAWD-WESSELS, S. and LESLIE-STEEN, P. (1994) *Neospora* abortion storm in a midwestern dairy. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6: 506-508.

YAMANE, I.; SHIBAHARA, T.; KOKUHO, T.; SHIMURA, K.; HAMAOKA, T.; HARITANI, M.; CONRAD, P.A.; PARK, C.; SAWADA, M.; and UMEMURA, T. (1998) An improved isolation technique for bovine *Neospora* species. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10: 364-368.

YAMANE, I.; KITANI, H.; KOKUHO, T.; SHIBAHARA, T.; HARITANI, M.; HAMAOKA, T.; SHIMIZU, S.; KOIWAI, M.; SHIMURA, K. and YOKOMIZO, Y. (2000) The inhibitory effect of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha on

intracellular multiplication of *Neospora caninum* in primary bovine brain cells. J. Vet. Med. Sci. 62:347–351.

ZAMORANO, P.; TABOGA, O.; DOMINGUEZ, M.; ROMERA, A.; PUNTEL, M.; TAMI, C.; MONGINI, C.; WALDNER, C.; PALMA, E. and SADIR, A. (2002) BHV-1 DNA vaccination: effect of the adjuvant RN-205 on the modulation of the immune response in mice. Vaccine 20: 2656-2664.

APENDICE 1***Solución salina tampón (pH 7,2) 10x***

| | |
|--|------------------|
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 12\text{H}_2\text{O}$ | 28,9 g |
| KH_2PO_4 | 2 g |
| NaCl | 80 g |
| KCl | 2 g |
| Agua bidestilada | c. s. p. 1 litro |

APENDICE 2

Para la determinación de la concentración de proteínas se siguieron las instrucciones recomendadas por la empresa elaboradora (Micro BCA® Protein Assay, PIERCE; EE.UU.). Brevemente,

1. Se mezclaron los reactivos A, B y C.
2. Se adicionaron partes iguales de la mezcla de reactivos y muestras a determinar (diluídas 1:10, 1:100, 1:1000 en SSTE) en los pocillos de una placa de ELISA fondo plano,
3. Se incubó la placa durante 30 minutos a 37°C, y luego se dejó enfriar.
4. Se leyó la placa a 562 nm.
5. Las concentraciones proteicas de las muestras fueron estimadas mediante una curva obtenida a partir de las DO de diluciones seriadas de ASB.

APENDICE 3***Inmunofluorescencia indirecta (IFI)******Buffer para dilución de suero (pH 7,2)***

| | |
|----------------------------------|------------------|
| Na ₂ HPO ₄ | 1,19 g |
| NaH ₂ PO ₄ | 0,22 g |
| NaCl | 8,55 g |
| Albúmina sérica bovina | 10,0 g |
| Agua bidestilada | c. s. p. 1 litro |

APENDICE 4***Inmunofluorescencia indirecta (IFI)******Buffer para lavado (9,0) solución stock 4x****

| | |
|---------------------------------|------------------|
| Na ₂ CO ₃ | 11,4 g |
| NaHCO ₃ | 33,6 g |
| NaCl | 8,5 g |
| Agua bidestilada | c. s. p. 1 litro |

*Diluir al usar 1 parte de tampón pH 9,0 en 3 de agua bidestilada.

APENDICE 5**ELISA indirecto anti-isotipos IgG₁-IgG₂****Solución de ácido cítrico (pH 5)***

| | |
|------------------|-----------------|
| Acido cítrico | 0,96g |
| Agua bidestilada | c. s. p. 100 ml |

* Ajustar el pH con NaOH 1N y mantener 4° C.

ABTS solución madre*

| | |
|---|-------|
| ABTS 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin sulfonato) | 0,22g |
| Solución de ácido cítrico | 10ml |

*Almacenar a 4° C en envase oscuro

Solución de uso

| | |
|--|-------|
| Solución madre de ABTS | 300µl |
| Solución de ácido cítrico (pH 5) | 10ml |
| H ₂ O ₂ (30 volúmenes) | 10 µl |

29207

Desarrollado

Nov. 2004