

Premio *Fundación Pérez Companc*, versión 2013

Buenos Aires, 11 de diciembre de 2013

Apertura del Acto de entrega del Premio Fundación Pérez Companc

por **el Presidente de la Academia Nacional de
Agronomía y Veterinaria, Dr. Carlos O. Scoppa**

Señores Académicos

Señores Representantes de la Fundación Pérez Companc

Autoridades Nacionales y Universitarias

Señores Recipiendarios del Premio Pérez Companc, versión 2013

Familiares, amigos y colegas de los Recipiendarios

Señoras y Señores

Abrimos esta nueva Sesión Pública Extraordinaria de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria que efectuamos conjuntamente con la Fundación Pérez Companc para hacer entrega de la versión 2013, la undécima edición, del Premio que con ese nombre otorga esa entidad de bien público y discierne nuestra corporación, lo cual como siempre, constituye, una ceremonia enfatizada, uno de los acontecimientos más gratos y significativos de la vida académica.

En estas ceremonias carentes de falsas solemnidades, sólo privan la sonrisa amable y el gesto complaciente de familiares, compañeros y amigos, regocijados por las circunstancias. Sin embargo, obligatoriamente son verdaderas liturgias por la dignidad que encierran y por permitir acceder a la afirmación que necesi-

riamente se debe manifestar ante el talento creador, la inteligencia y la fajina, virtudes que generalmente pasan desapercibidas para las muchedumbres.

Venimos a reconocer públicamente los frutos de la inteligencia, del trabajo abnegado, del afán de progreso, del querer saber más. A brindar el justo reconocimiento de pares ante los aportes de la mente y de una faena sin claudicaciones.

En una sociedad donde la ética languidece, la moral vacila y el humanismo se apaga estando inmersa desde hace décadas en el transitar por el facilismo, la falta de adegudo y la anomia, galas como estas revisten especial significado para la República. Son eslabones de excelencia que tejen la cadena del progreso engrandecida por la acción virtual de los principios, por el aliento que respiran.

Hoy premiamos a una mujer joven, la Dra. Yanina Paola Hecker y a un equipo de investigación de similares características por su trabajo *Nuevos desarrollos tecnológicos para la prevención y control de enfermedades parasitarias en especies animales de interés pecuario*, obra que fuera seleccionada por el Jurado Académico como el mejor trabajo científico de investigación básica o aplicada realizado en el país, motivo del premio para el período considerado. Dictamen que fuera aprobado por unanimidad por el Plenario de la corporación, y corresponderá precisamente, al Presidente de ese tribunal, el Académico, Dr Jorge Errecalde, expresarnos las consideraciones y méritos que aconsejaron su otorgamiento.

Sin duda, ellos no buscaron ni buscan las distinciones, los lauros, los reconocimientos. Ellos no producen, ni gestan para la presea porque saben que los premios no se rastrean, se obtienen.

Muy estimados recompensados de hoy: Mantengan esa fuerte entidad que necesitaron para llegar hasta aquí y sean mezquinos

en conservar vuestra juventud con todos sus excites, con todas sus fallas de apariencia, que son en realidad sus cualidades. Sois la de la nave la impulsión motriz, no pretendáis convertirlos desde ahora en su timón; ya les llegara el tiempo para ejercer ese comando. Continudad siendo alegres ya que la seriedad reside en la conducta, no en su apariencia. Sed naturales, y sobre todo, no seáis solemnes, que la solemnidad no es más que la túnica de las insignificancias.

Sin duda, el éxito no dependerá siempre exclusivamente de vosotros, median múltiples factores que lo alejan. Sin embargo no dejéis de ser perseverantes, no os desaniméis por una corta espera, ni creáis que ello es la derrota definitiva. Pero no esperéis porque en la inactividad se agotan las energías y se marchitan los ideales.

No sigáis la senda del interés estrecho, seguid como hasta ahora la amplia ruta del interés de todos ya que es la que siguen los hombres hacia un noble fin. No olvidéis que la nacionalidad no es un territorio poblado de hombres y cosas, es algo más, es el poderoso vínculo de un sentimiento colectivo, movido a impulsos de un común ideal.

La obra de nuestras distinguidas de hoy no se obtuvo de manera fortuita o momentánea, es consecuencia de preservar en un esfuerzo, extendiendo aun en soledad, la canción esperanzada del trabajo, reverdeciendo intentos, estimulando y embelleciendo ideas, y serenando los espíritus que conducen a la verdad.

Ellas conviven con esa partícula de ensueño que se nos regaló para no anquilosarnos y nuestras vidas no sean estériles, para que seamos creadores de verdad, de conocimiento, y finalmente podamos cuidar la vida, lo cual es, en última instancia, para lo que hemos sido llamados.

Que se les permita continuar poniendo sus proas visionarias hacia ese puerto de perfección y permanencia, dos condiciones humanas a las que el hombre jamás renunciara.

En nombre de la Academia, de la Fundación Pérez Compañy y en el mío propio, reciban las más calurosas felicitaciones por el merecido galardón al que tan justamente se han hecho acreedoras.

Premio *Fundación Pérez Companc*, versión 2013

Buenos Aires, 11 de diciembre de 2013

Desarrollo de una vacuna experimental para la prevención de la neosporosis bovina

por **Hecker YP, Moore DP, Venturini MC, Verna A, Morrell E, Leunda MR, Cano D & Lischinsky L**

GENERALIDADES

La neosporosis es una enfermedad que ocasiona abortos en bovinos y encefalomiелitis severa en caninos causada por un protozoo intracelular obligado denominado *Neospora caninum* (Bjerkås *et al.*, 1984; Dubey *et al.*, 2007). *N. caninum* pertenece al *phylum Apicomplexa* y a la familia *Sarcocystidae*. El ciclo de vida es heteroxeno involucrando tres estadios parasitarios reconocidos: taquizoítos, bradizoítos y esporozoítos (Dubey *et al.*, 2007). Los taquizoítos y bradizoítos se encuentran en hospedadores intermediarios (bovinos, ovinos, caprinos, búfalos, ciervos, equinos y otras especies de sangre caliente), mientras que los esporozoítos contenidos en esporocistos se eliminan dentro de ooquistes en las heces de los hospedadores definitivos (perros, dingos, coyotes y lobos) (McAllister *et al.*, 1998; Basso *et al.*, 2001; Gondim *et al.*, 2004a; King *et al.*, 2010; Dubey *et al.*, 2011a).

El ganado bovino se puede infectar de forma horizontal, por ingestión de ooquistes eliminados por el hospedador definitivo, y vertical o transplacentar, cuando la madre infectada transmite a su cría la infección durante la gestación (Dubey *et al.*, 2007).

Trees & Williams (2005) propusieron el uso del término transmisión transplacental endógena para definir la infección fetal a partir de la reactivación de una infección crónica latente y así diferenciarlo de la transmisión transplacental exógena, que alude a la infección fetal que ocurre como resultado de la infección de la madre por ingestión de ooquistes durante la preñez. Cualquiera de estas vías de transmisión conduce a la infección del feto y, ocasionalmente, al aborto (Dubey *et al.*, 2007).

Diagnóstico

La infección por *N. caninum* puede demostrarse mediante la utilización de pruebas directas o indirectas. El diagnóstico indirecto de la infección se realiza a través de la identificación de anticuerpos específicos mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), ELISA indirecto, western blot (WB), microaglutinación y APIA (del inglés *antigen printing immunoassay*) (Dubey & Schares, 2011b; Wilkowsky *et al.*, 2011). El diagnóstico directo se hace mediante la detección del parásito por inmunohistoquímica (IHQ) o por reacción de la polimerasa en cadena (PCR). Para el diagnóstico de aborto causado por *N. caninum* se consideran de utilidad los hallazgos histopatológicos que evidencian las lesiones causadas por un desequilibrio en la relación hospedador- parásito (Innes *et al.*, 2002). Por otra parte, el aislamiento del parásito no es un método de diagnóstico de rutina por ser poco sensible y muy costoso por la necesidad de utilizar animales de laboratorio. La dificultad para el aislamiento queda de manifiesto en el escaso número de cepas existentes en el mundo. Solo se han mencionado 67 aislamientos de *N. caninum* a partir de tejidos infectados o materia fecal de bovinos y caninos, respectivamente (Dubey *et al.*, 2007). Pese a

ello, este método de diagnóstico resulta de gran interés para la caracterización de cepas y estudios epidemiológicos.

Medidas de control

Las medidas actuales de lucha contra la neosporosis bovina se sustentan en limitar el ciclo parasitario, utilización de quimioterapéutica y utilización de vacunas. Para limitar el ciclo parasitario se debe controlar el ingreso de perros a las fuentes de agua y de alimento de los bovinos, eliminar fetos y placenta producto de un aborto para impedir que sean ingeridos por los caninos y realizar el control de roedores (Dubey *et al.*, 2007). La eliminación de todos los animales infectados, el empleo de la transferencia embrionaria, la reposición selectiva con animales seronegativos y la inseminación artificial con semen sexado o semen de animales para carne son otras medidas disponibles para el control de la enfermedad (Dubey *et al.*, 2007).

En lo que respecta a quimioterapéutica, se han realizado diferentes trabajos evaluando drogas *in vitro* (Lindsay & Dubey, 1989, 1990; Lindsay *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2002; Kwon *et al.*, 2003; Youn *et al.*, 2003) o *in vivo* en bovinos (Lindsay & Dubey, 1990; Mehlhorn *et al.*, 1984; Greif, 2000, 2001; Campero *et al.*, 2004); sin embargo hasta la fecha, no se han identificado fármacos que puedan actuar contra los estadios quísticos de *N. caninum* (Innes & Vermeulen, 2006).

Los avances que se han producido para la obtención de una vacuna contra la neosporosis bovina involucran la utilización de inmunógenos inactivos, antígenos recombinantes y taquizoítos vivos.

Las vacunas inactivadas son seguras aunque de baja eficacia (25 a 60%) y no previenen la transmisión vertical (Romero *et al.*,

2004; Weston *et al.*, 2012). No obstante, podrían ser una herramienta económicamente viable en rebaños donde la seroprevalencia es superior al 21% (Reichel & Ellis, 2006). Por otra parte, el empleo de vacunas con proteínas recombinantes para el control de la neosporosis en bovinos es aún limitada (Baszler *et al.*, 2008; Nishimura *et al.*, 2013).

La vacunación pre-servicio con protozoos vivos en la hembra bovina genera protección no solo contra el aborto sino también hacia la transmisión vertical (Innes *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2007; Weber *et al.*, 2013). Para prevenir las infecciones por *N. caninum* debería considerarse los logros alcanzados para el control de otras enfermedades causadas por protozoos Apicomplexa. Para prevenir infecciones por *Toxoplasma gondii* existe una vacuna comercial elaborada a partir de taquizoítos vivos de la cepa S48, los cuales lograron atenuarse luego de más de 3000 pasajes en ratón (Buxton *et al.*, 1993, 2007). Esta vacuna presenta una elevada eficacia y adecuado nivel de protección contra el aborto ovino durante 18 meses (Buxton *et al.*, 1993). Teniendo en cuenta que la resistencia a protozoos Apicomplexa está asociada a una respuesta inmune Th1 (del inglés *T helper*) mediada por linfocitos T citotóxicos, con producción de interferon gamma (IFN- γ), interleuquina-12 (IL-12), factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α) e inmunoglobulina (Ig) G2 (Innes *et al.*, 2001, 2005; Staska *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2007), el objetivo que debería cumplir una vacuna contra la neosporosis sería prevenir el aborto y la transmisión transplacental generando una respuesta inmune semejante a la que provoca el parásito naturalmente en el huésped. Además, dicha formulación debería ser segura y evitar la persistencia de la infección. A pesar de los avances producidos en el campo

de los inmunógenos experimentales contra la neosporosis bovina en los últimos años, estos objetivos aún no han sido cumplidos.

Empleo de inmunógenos experimentales en Argentina

Moore *et al.* (2005) vacunaron vaquillonas con lisado de taquizoítos en adyuvante oleoso (13% Arlacel, 85% Marcol 52 y 2% Tween 80) en el segundo trimestre de gestación comparando la respuesta inmune a *N. caninum* con vaquillonas naturalmente infectadas, sin vacunar, que no abortaron. Los títulos de IgG1 e IgG2 fueron semejantes en animales inmunizados, pero difirieron cuando se los comparó con aquellos de los animales naturalmente infectados. Los niveles de IFN- γ fueron semejantes en ambos grupos; sin embargo, no se observó respuesta celular en el grupo vacunado.

En el país se han evaluado los complejos inmunoestimulantes (ISCOMs) como adyuvantes. Los ISCOMs son micropartículas esféricas huecas de 40 nm de diámetro constituidas por saponinas, lípidos y antígenos (Morein *et al.*, 2004). Este tipo de adyuvante facilita el transporte rápido de la molécula antigénica desde el sitio de inoculación hasta el linfonódulo adyacente lo que determina escasa reacción inflamatoria local. Los ISCOMs interactúan con las células dendríticas aumentando la presentación de antígenos y estimulando la expresión de moléculas del CMH II con eficiente inducción de respuesta de linfocitos T CD4+ y CD8+ (Maraskovsky *et al.*, 2009) induciendo una respuesta inmune Th1/Th2 balanceada (Lovgren Bengtsson *et al.*, 2011). Utilizando antígenos de *N. caninum* formulados con ISCOM se vacunaron terneros y comparó la respuesta inmune obtenida con respecto a terneros inoculados con taquizoítos vivos (Moore *et al.*, 2011). En la segun-

da semana post inoculación, los terneros vacunados desarrollaron anticuerpos específicos (predominio IgG1) hacia *N. caninum* aunque en niveles similares a aquellos terneros del grupo inoculado con taquizoítos vivos en quienes predominó la IgG2 siendo los niveles de IFN- γ semejantes en ambos grupos de terneros.

Recientemente, Mansilla *et al.* (2013) vacunaron vaquillonas con diferentes dosis de extracto soluble de taquizoítos de *N. caninum* formulados en adyuvante de lecitina de soja y β -glucanos. Aquellos animales inmunizados con 50 μ g de antígeno fueron los que generaron títulos de IgG y células CD4+ productoras de IFN- γ a niveles comparables con aquellos obtenidos en CMSP estimuladas inespecíficamente.

Considerando los hallazgos promisorios reportados previamente (Moore *et al.*, 2011) en el presente trabajo de investigación se planteó:

HIPÓTESIS

La inoculación de un inmunógeno experimental conteniendo antígenos de *N. caninum* incorporados en ISCOMs genera una respuesta inmune de igual magnitud a la provocada por la inoculación de taquizoítos vivos en hembras bovinas gestantes y protege de la transmisión vertical causada por la inoculación de una cepa patógena de *N. caninum*.

Objetivo general

Desarrollar una vacuna experimental inactivada que genere una respuesta inmune y protección contra la transmisión vertical de *N. caninum* similares a la provocada por la inoculación de taquizoítos vivos en hembras bovinas gestantes.

Objetivos específicos

- Caracterizar la respuesta inmune generada luego de la inmunización con taquizoítos vivos o antígenos nativos utilizando la cepa NC-6 Argentina en vaquillonas preñadas.
- Evaluar el grado de protección de la transmisión vertical en las vaquillonas inmunizadas que fueron desafiadas experimentalmente al día 70 de gestación con la cepa patógena NC-1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y diseño experimental

Se utilizaron hembras bovinas Aberdeen Angus con adecuado desarrollo corporal, genitalmente aptas, vírgenes, nacidas en julio-agosto del año 2007, seronegativas a *N. caninum* provenientes de un rodeo libre de brucelosis, tuberculosis, campylobacteriosis y tricomonosis de las Reservas Ganaderas del INTA Balcarce. Se seleccionaron 31 vaquillonas seronegativas a *N. caninum* a IFI (dilución $\leq 1:25$) las cuales se dividieron en forma aleatoria en 4 grupos:

Grupo A: 9 vaquillonas inoculadas EV con $6,25 \times 10^7$ taquizoítos de la cepa NC-6 Argentina el día que inicio el ensayo (semana 0: inicio del ensayo). La elección de esta vía se determinó para simular la distribución natural hematológica del parásito, como fue previamente sugerido (Williams *et al.*, 2000).

Grupo B: 9 vaquillonas inmunizadas en la región del cuello por vía SC con 2 dosis (semana 0 y 3 del ensayo) de una vacuna en base a extracto de antígenos nativos de la cepa NC-6 Argentina formulados en ISCOMs (Abisco-300, ISCONOVA, Uppsala, Sweden).

Grupo C: 8 animales inoculados por vía SC con solución salina tamponada estéril (SSTE).

Grupo D: 5 animales inoculados por vía SC sólo con el adyuvante ISCOMs.

Todos los animales fueron evaluados diariamente durante una semana luego de cada inoculación para su observación clínica y detectar las eventuales reacciones inflamatorias en el sitio de inoculación.

Para la sincronización de las vaquillonas se utilizaron 2 dosis de una prostaglandina sintética (D cloprostenol; Tecnofarm®, Buenos Aires, Argentina) y posteriormente se realizó el servicio a corral durante 7 días con 4 toros de raza Aberdeen Angus, sanitaria y reproductivamente aptos. A los 35 días de iniciado el servicio (día 75 de comenzado el ensayo) se realizó el diagnóstico de preñez mediante ultrasonografía y finalmente cada grupo experimental fue integrado por 4 vaquillonas gestantes. Al día 70 de gestación (semana 14 de comenzado el ensayo) las vaquillonas de todos los grupos fueron desafiados por la vía EV con $4,7 \times 10^7$ taquizoítos de la cepa NC-1.

Cultivo de taquizoítos

En este trabajo se utilizaron 2 aislamientos diferentes de *N. caninum*: cepa NC-6 Argentina (Basso *et al.*, 2001) y la cepa NC-1 (Dubey *et al.*, 1988), ambas gentilmente cedidas por la Dra. M.C. Venturini.

La cepa NC-6 se utilizó al comienzo del ensayo para inocular las vaquillonas del grupo A y para la producción de antígenos nativos para producir la vacuna del grupo B. La cepa NC-1 fue utilizada para realizar el desafío de los animales de todos los grupos en el día 70 de gestación. Ambos aislamientos fueron mantenidos bajo las mismas condiciones en pasajes continuos en células Vero

y cosechados cuando la monocapa presentó un 80% de infección (Dubey *et al.*, 1988).

Producción del extracto de antígenos

El extracto de antígeno utilizado para los animales del grupo B, para las determinaciones serológicas y para la estimulación de sangre para determinación de producción de IFN- γ fue obtenido como describió previamente (Innes *et al.*, 1995). Brevemente, 1×10^9 taquizoítos de la cepa NC-6 Argentina fueron purificados usando columnas (SephadexTM G-25 Medium, GE Healthcare, Sweden) y peleteados mediante centrifugación a $1350 \times g$ por 15 minutos. Posteriormente, el pellet fue re-suspendido en 1 ml de solución de Tris base 10 mM (pH 7) con fluoruro de fenilmetilsulfonilo 2 mM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) y sonificado durante 5-6 ciclos de 15 segundos cada uno usando un sonicador (disruptor celular sónico Sonifier 450, Branson Ultrasonic Co., USA) refrigerando el pellet en hielo picado para evitar la desnaturalización proteica por el calor generado. Se realizó una centrifugación del producto y la fracción soluble fue separada. Finalmente, se determinó la concentración proteica del extracto soluble de antígenos mediante un kit comercial (Micro BCA[®] Protein Assay, PIERCE; EE.UU.) y se criopreservó a -80°C .

Determinaciones realizadas

Madres

- *Serología materna* (ELISA, Western blot)
- *Respuesta inmune celular* (IFN γ por ELISA, citometría de flujo)

Fetos

- *Serología fetal* (IFI, WB)
- *Respuesta inmune celular* (IFN γ por ELISA)
- *Histopatología*
- *Inmunohistoquímica*
- *PCR* (sobre órganos fetales y carúnculas)

RESULTADOS

Evaluación de la respuesta humoral materna

Detección anticuerpos específicos a *N. caninum*

Anticuerpos específicos fueron detectados en el grupo A y B a partir de la 3^o semana de iniciado el ensayo, siendo significativamente mayores los PP observados en el grupo A ($76,79 \pm 11,88$) respecto al grupo B ($31,58 \pm 5,85$), C ($22,72 \pm 2,33$) y D ($21,65 \pm 3,11$) ($p < 0,001$). A partir de la semana 5 hasta la semana 13 no existieron diferencias entre los grupo A y B, pero si las hubo entre estos y los grupos C y D ($p < 0,001$).

Posteriormente al desafío (semana 16), el grupo B mostró PP significativamente más altos ($150,06 \pm 19,74$) que el grupo A ($98,16 \pm 6,46$) ($p < 0,05$). Además si bien los animales de los grupos C y D seroconvirtieron después del desafío, los PP alcanzados fueron significativamente menores que aquellos observados en los grupo A y B ($p < 0,05$).

Sub-isotipos de IgG

En las vaquillonas del grupo A se observó predominio de la IgG2 sérica a partir de la segunda semana de inicio del ensayo.

El índice IgG1/IgG2 en el grupo A fue menor a 1 en la mayoría de los animales a partir de la semana 3 del ensayo y se mantuvo en el tiempo hasta el momento de la faena.

Los animales del grupo B tuvieron una respuesta humoral predominante de tipo IgG1 durante todo el ensayo siendo la relación IgG1/IgG2 mayor a 1, previo al desafío. Post desafío (semana 17 del ensayo) dicho índice disminuyó a valores inferiores a 1.

Los animales del grupo C (SSTE) y D (ISCOMs) no tuvieron aumentos en la OD al evaluar los sueros mediante ELISA. Post desafío, los animales evidenciaron índices IgG1/IgG2 cercanos a 1.

Western blot sobre en maternos

Los sueros de las vaquillonas analizados 3 semanas luego de la primera inmunización mostraron un patrón antigénico similar de bandas entre los grupos A y B, aunque en general la intensidad de las bandas del grupo A fue mayor a la observada en el grupo B y no se observaron en el grupo B las bandas de 17-18 y 25-26 kDa.

Los animales del grupo B luego de la segunda dosis de vacuna (semana 5 del ensayo) presentaron un patrón de bandas e intensidad semejantes al observado en el grupo A. El aumento de intensidad en el grupo B de color fue más notable en las bandas de 17-18, 25-26, 29, 33 y 62 kDa.

Luego del desafío (semana 16 del ensayo) se observó un patrón de bandas semejantes entre los grupo A y B, tanto en cantidad como intensidad. Si bien los grupos C y D presentaron un patrón de bandas al momento post desafío, la intensidad de las mismas fue menor a la hallada en los grupos A y B en este momento.

Evaluación de la respuesta inmune celular materna Determinación de IFN- γ

Las concentraciones de IFN- γ producidas por sangre estimulada con antígeno nativo de *N. caninum* no fueron diferentes entre los distintos grupos experimentales al momento de iniciar el ensayo (semana 0) ($p > 0,05$). Cuando se analizaron las variaciones en las concentraciones de IFN- γ dentro de cada grupo, a través del tiempo, se hallaron diferencias significativas entre la semana 0 y la semana 13 y entre esta última y la semana 17.

Cuando se analizaron las diferencias entre tratamientos, en el momento previo al desafío (semana 13) existió un incremento en la producción de IFN- γ similar entre los grupos A y B ($p > 0,05$) pero significativamente mayor al observado en los grupos C y D ($p < 0,05$). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ($p > 0,05$) cuando se analizaron los niveles de IFN- γ post desafío en la semana 17.

Por otra parte, la producción de IFN- γ en sangre estimulada sólo con Con-A fue similar entre tratamientos y a través del tiempo ($p > 0,05$).

La producción de IFN- γ en sangre estimulada con SSTE no presentó diferencias significativas entre grupos ($p > 0,05$) aunque se observaron diferencias a través del tiempo. Ocasionalmente se observaron variaciones individuales encontrándose valores de IFN- γ incrementados en animales pertenecientes a los grupos A y B.

Análisis fenotípico de CMSP

Al momento de iniciar en ensayo, los animales no presentaron diferencias entre tratamientos ni en el porcentaje de células CD4+ (19,50% \pm 3,14) ni en el porcentaje de células CD8+ (5,15% \pm 0,82). Cuando se realizó el análisis a través del tiempo

se observó una caída en los porcentajes de células T CD4+ y CD8+ ($p < 0,05$) en todos los grupos experimentales.

El cambio más notable en las sub-poblaciones de CMSP fue la disminución significativa en los porcentajes de células CD4+ en vaquillonas de los grupos A ($14,40\% \pm 3,90$), B ($12,60\% \pm 4,50$) y D ($15,20\% \pm 2$) respecto al grupo C ($22\% \pm 8$) a la semana 13 del ensayo ($p < 0,05$). En el resto de los tiempos de muestreo, se observó una tendencia a la disminución en el porcentaje de las células CD4+ en todos los grupos aunque las mismas no fueron significativas entre tratamientos. En el grupo A, la disminución más evidente se produjo luego de que los animales recibieran el inóculo con taquizoítos vivos (semana 3). En los animales del grupo B, la disminución del porcentaje de células CD4+ se observó posteriormente a que los animales recibieran la segunda dosis de vacuna (semana 5).

Cuando se analizaron las células CD8+ se observó también una tendencia a la disminución de los porcentajes de las mismas a través del tiempo para los animales de los grupos A y B comparados con los grupos C y D aunque no fueron diferencias significativas entre tratamientos en ninguno de los tiempos de muestreo (datos no presentados). Los porcentajes de linfocitos T $\gamma\delta+$ y monocitos no mostraron cambios a través del tiempo cuando fueron analizados (datos no presentados).

Cuando se analizó el índice CD4+/CD8+ a través del tiempo de los animales de los grupos A y B, se observó que en el grupo A (índice CD4+/CD8+ la semana 0 = $3 \pm 0,73$) disminuyó hasta la semana 5 del ensayo ($1,98 \pm 0,75$) y luego se incrementó gradualmente hasta el momento del desafío ($3,17 \pm 0,4$) (semana 16). En dicha instancia el incremento fue más marcado alcanzando el valor observado al momento de inicio del ensayo.

Por otro lado en el grupo B (índice CD4+/CD8+ la semana 0= 2,75 ±0,30) luego de la primera dosis de vacuna, el índice CD4+/CD8+ comenzó a caer hasta el momento previo al desafío (semana 13) en donde tuvo su valor más bajo (1,47 ±0,39). Luego del desafío presentó un incremento breve (1,97 ±0,55) (semana 16), y disminuyó nuevamente a la semana 17 (1,58 ±0,43).

En los animales de los grupos C y D se observó un comportamiento semejante en el índice CD4+/CD8+ al observado en el grupo B. Luego de comenzado el ensayo (índice CD4+/CD8+ a la semana 0 para grupo C= 3±0,28 y D=2.9±0,28) el índice CD4+/CD8+ disminuyó de forma continua hasta el momento previo al desafío (índice CD4+/CD8+ a la semana 13 para grupo C= 1.33±0,89 y D=0.83±0,10). Posteriormente al desafío (semana 16) los índices CD4+/CD8+ de ambos grupos mostraron un leve incremento; este aumento fue más notorio en el grupo C (1.84±0.94) en relación al grupo D (1.21±0.46). Finalmente en la semana 17 los valores de los índices CD4+/CD8+ para ambos grupos volvieron a caer.

Examen de los fetos

Viabilidad fetal

Al momento del sacrificio la totalidad de los fetos estaban presentes siendo todos viables, no se observaron hallazgos macroscópicos en ninguno de los fetos a la necropsia.

Histopatología fetal y de la placenta

Las lesiones halladas en los fetos fueron clasificadas de acuerdo a su severidad siendo características de una infección con *N. caninum*.

Los fetos de las vaquillonas del grupo A tuvieron lesiones histopatológicas leves en 3/4 fetos analizados. Sólo un feto (feto N° 5) presentó hepatitis necrohemorrágica multifocal (grado 2) y pericarditis mononuclear (grado 2). No se observaron lesiones a nivel de placenta en las vaquillonas de este grupo.

En 3/4 fetos del grupo B se encontraron lesiones histopatológicas leves o moderadas caracterizadas por infiltrado inflamatorio mononuclear peribronquiolar (grado 2), miocarditis mononuclear leve (grado 1) y nefritis intersticial leve (grado 1), junto a escasos focos de infiltrados mononuclear en placenta (grado 1) con la excepción del feto N°9 que presentó lesiones severas. Las mismas fueron: meningoencefalitis multifocal mononuclear con gliosis moderada, pericarditis y miocarditis mononuclear severa necrotizante con pérdida de la estructura del órgano (grado 3), neumonía intersticial severa (grado 3), nefritis intersticial mononuclear multifocal (grado 3), hepatitis mononuclear (grado 2), glositis y miositis mononuclear (grado 2), placentitis necrotizante multifocal (grado 3).

Todos los fetos de los grupos C y D tuvieron lesiones severas en los órganos muestreados, a saber: neumonía intersticial peribronquiolar mononuclear multifocal (grado 3), epicarditis y miocarditis (grado 2), nefritis intersticial (grado 3) miositis mononuclear difusa (en semitendinoso y diafragma) (grado 2) y hepatitis necrótica periportal (grado 3). En placenta se observó una placentitis necrotizante multifocal con focos de mineralización (grado 3).

Al realizar el análisis estadístico de las lesiones se observó que los fetos del grupo A tuvieron el puntaje patológico más bajo (promedio= 2,75; error estándar \pm 2,90) al compararlos con los fetos de los grupos B (7,50; \pm 4,50), C (7,75; \pm 1.50) y D (7,50; \pm 1.30) ($p < 0.05$). Los fetos que tuvieron menor severidad de le-

siones histopatológicas tuvieron madres con índices CD4+/CD8+ mayores, independientemente del grupo.

Histopatología materna

Al examinar el SNC de las madres faenadas no se encontraron lesiones de significancia en ninguno de los animales con la excepción de focos aislados de hemorragia meníngea de las regiones frontal y occipital, presumiblemente ocasionados por el método de sacrificio utilizado en el frigorífico.

Inmunohistoquímica de fetos y placentas

Se analizaron 34 tejidos de los animales del grupo A (fetos y placentas), siendo todos negativos a IHQ. En caso de los animales del grupo B se analizaron 41 secciones de tejidos, siendo solo 1 positivo a IHQ una sección del SNC asociada a necrosis severa en la corteza cerebral.

Para los tejidos de los animales del grupo C se analizaron 55 cortes siendo 2 placentas positivas a IHQ (vaca N°11 en focos de necrosis en las vellosidades materno-fetales y vaca N°16 con placentitis no supurativa necrotizante en vellosidad coriónica).

En los tejidos de los fetos y placenta del grupo D se encontró 3/4 tejidos con IHQ positiva, (pulmón del feto N°1 y 2 cortes de placentas con asociadas a necrosis en la interfase materno fetal).

Evaluación de la respuesta inmune fetal

Anticuerpos en fluidos fetales

Mediante IFI se detectaron anticuerpos específicos a *N. caninum* en fluidos peritoneales de 1/4 fetos del grupo A, C y D y en 2/4 fetos del grupo B.

Al realizar el western blot se detectó el antígeno de 17-18 kDa en todos los fluidos fetales positivos a IFI y además en 2 fetos que fueron negativos a IFI (uno del grupo B y otro del D). No se detectaron inmunoreacciones positivas en ninguno de los fetos del grupo A.

IFN- γ sobre fluidos fetales

No se detectó IFN- γ en ninguno de los fluidos fetales de los fetos de los animales del grupo A. Por otra parte, se observó IFN- γ en los fluidos fetales de 2/4, 4/4 y 3/4 fetos de los grupos B, C y D, respectivamente. Al analizar las concentraciones de IFN- γ halladas en los fluidos fetales por grupo se observó que en el grupo B sólo el feto N°9 presentó una concentración apreciable de IFN- γ (24150 ng/ml); el feto N°10 tuvo niveles escasamente detectables (150 ng/ml). En el caso del grupo C, tres fetos presentaron concentraciones elevadas de IFN- γ (>3000 ng/ml), el feto N°16 produjo IFN- γ baja concentración (400 ng/ml). Por último, en el grupo D los 3 fetos produjeron IFN- γ en cantidades apreciables (>3000 ng/ml).

Reacción de la polimerasa en cadena

Los tejidos en los que más frecuentemente se detectó ADN de *N. caninum* fueron SNC y pulmón fetal y carúncula materna. El ADN de *N. caninum* fue amplificado en 1/4 fetos del grupo A, 3/4 del grupo B y en 4/4 del grupo C y D.

Para realizar un análisis de frecuencias de detección, se realizaron más extracciones de aquellos tejidos en los que más frecuentemente se detectó el ADN del protozoo (SNC, pulmón y carúncula). De cada grupo se colectaron en total 16 muestras

de SNC y el ADN de *N. caninum* fue detectado en 1, 5, 3 y 6 muestras del grupo A, B, C y D, respectivamente, hallándose diferencias significativas sólo en los tejidos del grupo A respecto al resto de los grupos ($p < 0.001$). De forma similar, cuando se procesaron las 16 muestras de pulmón fetal, el ADN parasitario fue amplificado en 1 y 2 muestras de 16 extracciones analizadas de los grupos A y B comparado con 12 y 9 muestras positivas de 16 analizadas de los grupos C y D, siendo estos resultados significativamente diferentes entre el grupo A y B respecto al C y D ($p < 0,0001$).

Cuando se realizó el análisis estadístico de las frecuencias de detección en carúncula se encontraron diferencias significativas del grupo A que presentó de 16 extracciones de tejido caruncular sólo 1 positivo respecto al grupo B (8/16), C (12/16) y D (8/16) ($p < 0,0032$).

CONCLUSIONES

- Se rechaza la hipótesis planteada.
- La prevención de la transmisión vertical se logró utilizando un inmunógeno vivo (cepa NC-6 Argentina).
- Vacuna inactivada como parte de un sistema de control integrado para protección del aborto.
- Se realizarán estudios en la interfaz materno-fetal de los animales vacunados.

AGRADECIMIENTOS

- Al laboratorio de Patología (GSA, INTA Balcarce)
- Al laboratorio de Virología (GSA, INTA Balcarce).
- Al Dr. Carlos Campero, Dr. Anselmo Odeón y al Dr. Ernesto Späth.
- Al laboratorio de Bacteriología (GSA, INTA Balcarce).
- Al laboratorio de Biotecnología de la Reproducción (INTA Balcarce).
- Al personal de las reservas ganaderas de INTA Balcarce.
- Al laboratorio del Instituto de Virología de INTA Castelar (Dra. Patricia Zamorano, Dra. Valeria Quattrocci, Dra. María J. Gravisaco).
- Al Dr. Luis Ortega Mora, Dr. Javier Regidor Cerrillo (SALU-VET, UCM).
- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).
- Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (FONCyT).
- Ministerio de Ciencia y Tecnología (MINCYT).

BIBLIOGRAFÍA

Basso W, Venturini L, Venturini MC, Hill DE, Kwok OCH, Shen SK & Dubey JP. 2001a. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *J. Parasitol.*, 87: 612-618

Baszler TV, Shkap V, Mwangi W, Davies CJ, Mathison BA, Mazuz M, Resnikov D, Fish L, Leibovitch B, Staska LM & Savitsky I. 2008. Bovine immune response to inoculation with *Neospora caninum* surface antigen SRS2 lipopeptides mimics immune response to infection with live parasites. *Clin. Vaccine Immunol.*, 15: 659-667

Bjerkås I, Mohn SF & Presthus J. 1984. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z. Parasitenkd.*, 70: 271-274

Buxton D. 1993. Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. *Parasitol. Today*, 1148: 335-337

Buxton D, Maley SW, Wright SE, Rodger S, Bartley P & Innes EA. 2007. Toxoplasma gondii and ovine toxoplasmosis: new aspects of an old story. *Vet. Parasitol.*, 149: 25–28

Campero C, Merlo R, Mc Cargo R, de Yaniz G, Cano D, Moore D, Leunda M & Cantón. 2004. Tratamiento con trimetropin-sulfá en vacas lecheras preñadas seropositivas a *Neospora caninum* y cinética de los anticuerpos humorales. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina : 107

Dubey JP, Hattel AL, Lindsay DS & Topper MJ. 1988. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 193: 1259-1263

Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. 2007. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 20: 323-367

Dubey JP, Jenkins MC, Rajendran C, Miska K, Ferreira LR, Martins J, Kwok OCH & Choudhary S. 2011a. Gray wolf (*Canis*

lupus) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.*, 181: 382-387

Dubey JP & Schares G. 2011b. Neosporosis in animals—The last five years. *Vet. Parasitol.* 180: 90-108

Gondim LFP, McAllister MM, Pitt WC & Zemlicka DE. 2004a. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.*, 34: 159-161

Greif G. 2000. Immunity to coccidiosis after treatment with toltrazuril. *Parasitol. Res.*; 86: 787-790

Greif G, Harder A & Haberkorn A. 2001. Chemotherapeutic approaches to protozoa: Coccidia – current level of knowledge and outlook. *Parasitol. Res.*; 87: 973-975

Innes EA, Panton WR, Marks J, Trees AJ, Holmdahl J & Buxton D. 1995. Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of 3H Uracil. *J. Comp. Pathol.*, 113: 95-100

Innes EA, Wright SE, Maley S, Rae A, Schock A, Kirvar E, Bartley P, Hamilton C, Carey IM & Buxton D. 2001. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int. J. Parasitol.*, 31: 1523-1534

Innes EA, Andrianarivo AG, Björkman C, Williams DJL & Conrad PA. 2002. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends Parasitol.*, 18: 497-504

Innes EA, Wright SE, Bartley PM, Maley S, MacAldowie C, Esteban-Redondo I, & Buxton D. 2005. The host–parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 108: 29–36

Innes EA & Vermeulen AN. 2006. Vaccination as a control strategy against the coccidial parasites *Eimeria*, *Toxoplasma* and *Neospora*. *Parasitology*, 133: 145-168

King JS, Šlapeta J, Jenkins DJ, Al-Qassab SE, Ellis JT & Windsor PA. 2010. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.*, 40: 945-950

Lindsay DS & Dubey JP. 1990. Effects of sulfadiazine and amprolium on *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) infections in mice. *J. Parasitol.*, 76: 177-179

Lovgren Bengtsson K, Morein B & Osterhaus AD. 2011. ISCOM technology-based Matrix M adjuvant: success in future vaccines relies on formulation. *Expert Rev. Vaccines*, 10: 401-403

Mansilla FC, Czepluch W, Malacari DA, Hecker YP, Bucafusco D, Franco-Mahecha OL, Moore DP & Capozzo AV. 2013. Dose-dependent immunogenicity of a soluble *Neospora caninum* tachyzoite-extract vaccine formulated with a soy lecithin/ β -glucans adjuvant in cattle. *Vet. Parasitol.*, en prensa

Maraskovsky E, Schnurr M, Wilson NS, Robson NC, Boyle J & Drane D. 2009. Development of prophylactic and therapeutic vaccines using the ISCOMATRIX adjuvant. *Immunol. Cell Biol.*, 87: 371-376

McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA & McGuire AM. 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.*, 28: 1473- 1478

Mehlhorn H, Ortman-Falkenstein G & Haberkorn A. 1984. The effects of sym. Triazinones on developmental stages of *Eimeria tenella*, *Eimeria maxima* and *E. acervulina*: a light and electron microscopical study. *Z Parasitenkd*, 70: 173-182

Moore DP, Leunda MR, Zamorano PI, Odeón AC, Romera SA, Cano A, de Yaniz G, Venturini MC & Campero CM. 2005. Immune response to *Neospora caninum* in naturally infected heifers and heifers vaccinated with inactivated antigen during the second trimester of gestation. *Vet. Parasitol.*, 130: 29–39

Moore DP, Verna AE, Echaide I, Leunda MR, Cano A, Zamorano PI, Pereyra S, Odeón AC & Campero CM. 2011. Immune response to *Neospora caninum* native antigens formulated with immune stimulating complexes in calves. *Vet. Parasitol.* 175: 245-251

Morein B, Hu KF & Abusugra I. 2004. Current status and potential application of ISCOMs in veterinary medicine. *Adv. Drug Deliv. Reviews*, 56: 1367-1382

Nishimura M, Kohara J, Kuroda Y, Hiasa J, Tanaka S, Muroi Y, Kojima N, Furuoka H & Nishikawa Y. 2013. Oligomannose-coated liposome-entrapped dense granule protein 7 induces protective immune response to *Neospora caninum* in cattle. *Vaccine*, en prensa

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

Romero JJ, Perez E & Frankena K. 2004. Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rican dairy cows under field conditions. *Vet. Parasitol.* 123: 149-159

Staska LM, McGuire TC, Davies CJ, Lewin HA & Baszler TV. 2003. *Neospora caninum*-infected cattle develop parasite-specific CD4+ cytotoxic T lymphocytes. *Infect. Immun.*, 71: 3272-3279

Trees AJ & Williams DJL. 2005. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends Parasitol.*, 21: 558-561

Weber FH, Jackson JA, Sobiecki B, Choromansky L, Olsen M, Meinert T, Frank R, Reichel MP & Ellis JT. 2013. On the efficacy and safety of vaccination with live tachyzoites of *N. caninum* for prevention of *Neospora*-Associated fetal loss in cattle. *Clin. Vaccine Immunol.*, 20: 99-105

Weston JF, Heuer C & Williamson NB. 2012. Efficacy of a *Neospora caninum* killed tachyzoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle. *Prev. Vet. Med.*, 103: 136-144

Wilkowsky SE, Gimenez Bareiro G, Mon ML, Moore DP, Caspe G, Campero C, Fort M & Romano MI. 2011. An applied printing immunoassay with recombinant Nc-SAG1 for detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 23: 971-976

Williams DJ, Guy CS, McGarry JW, Guy F, Tasker L, Smith RF, MacEachern K, Cripps PJ, Kelly DF & Trees AJ. 2000. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experi-

mentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology*, 121: 347-358

Williams DJ, Guy CS, Smith RF, Ellis J, Bjorkman C, Reichel MP & Trees AJ. 2007. Immunization of cattle with live tachyzoites of *Neospora caninum* confers protection against fetal death. *Infect. Immun.*, 75: 1343-1348