



Asociación Argentina de Veterinarios
de **Laboratorios de Diagnóstico**

**MANUAL DE REFERENCIA
ARGENTINA PARA EL DIAGNÓSTICO
DE NEOSPOROSIS BOVINA**

**Comisión Científica de
Enfermedades Venéreas y Neosporosis
2024**

MANUAL DE REFERENCIA ARGENTINA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA NEOSPOROSIS BOVINA

**ASOCIACIÓN ARGENTINA DE
VETERINARIOS DE LABORATORIO DE
DIAGNÓSTICO**

**COMISIÓN CIENTÍFICA DE
ENFERMEDADES VENÉREAS Y
NEOSPOROSIS**

Chile 1856 PB (1227), Ciudad Autónoma de
Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

Abril de 2024

AUTORES

Dadín Prando MOORE, Instituto de Innovación para la Producción Agropecuaria y el Desarrollo Sostenible (IPADS), INTA-CONICET, Balcarce, Argentina. Facultad de Ciencias Agrarias (FCA) Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMDP).

Ignacio ECHAIDE, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Rafaela.

Lucía María CAMPERO, Instituto de Innovación para la Producción Agropecuaria y el Desarrollo Sostenible (IPADS), INTA-CONICET, Balcarce, Argentina.

Yanina Paola HECKER, Instituto de Innovación para la Producción Agropecuaria y el Desarrollo Sostenible (IPADS), INTA-CONICET, Balcarce, Argentina. SALUVET, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

Karina Mariela CIRONE, Instituto de Innovación para la Producción Agropecuaria y el Desarrollo Sostenible (IPADS), INTA-CONICET, Balcarce, Argentina. Facultad de Ciencias Agrarias (FCA) Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMDP).

Franco FIORANI, Instituto de Innovación para la Producción Agropecuaria y el Desarrollo Sostenible (IPADS), INTA-CONICET, Balcarce, Argentina. Facultad de Ciencias Agrarias (FCA) Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMDP).

Contribuciones de los autores: todos los coautores contribuyeron por igual en las opiniones de este consenso.

EDITORES

Dadín Prando MOORE, Instituto de Innovación para la Producción Agropecuaria y el Desarrollo Sostenible (IPADS), INTA-CONICET, Balcarce, Argentina. Facultad de Ciencias Agrarias (FCA) Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMDP).

Lucía María CAMPERO, Instituto de Innovación para la Producción Agropecuaria y el Desarrollo Sostenible (IPADS), INTA-CONICET, Balcarce, Argentina.

Magdalena Rambeaud, Laboratorio de Inmunoparasitología, Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Nacional de La Plata.

Daniel Francisco Benitez, Estación Experimental Agropecuaria INTA Mercedes, Mercedes. Corrientes

DISEÑO DE TAPA

María Noel Benitez

INDICE

1. Prólogo
2. Introducción
3. Ciclo de vida del parásito
4. Pérdidas por aborto y muerte neonatal
5. Diagnóstico
6. Control
7. Serología
 - 7.1. Prueba de la Inmunofluorescencia indirecta (IFI)
 - 7.2. Inmunoensayo (ELISA)
8. Necropsia del feto y muestreo de tejidos/fluidos
9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
10. Pruebas complementarias
 - 10.1. Immunoblot (IB)
 - 10.2. Inmunohistoquímica (IHQ)
 - 10.3. *Real Time* PCR
11. Bibliografía

1. PRÓLOGO

La Comisión Científica de Enfermedades Venéreas y Neosporosis de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico, tiene como objetivo, entre otros, la actualización de las técnicas utilizadas en el diagnóstico de laboratorio. La misma, tiene como función brindar al profesional las herramientas para la obtención de un resultado confiable.

A nivel nacional las técnicas utilizadas para el diagnóstico de la neosporosis bovina son de reciente uso. Por lo tanto, no están ampliamente difundidas entre los laboratorios de diagnóstico veterinario.

Con este material queremos brindar al profesional de laboratorio veterinario, una guía de trabajo, de consulta cotidiana. Además de facilitar el desempeño de las técnicas, fortalecer conocimientos y promover la utilización de protocolos de diagnóstico estandarizados.

El conocimiento de las metodologías de diagnóstico favorece la implementación de estas técnicas en laboratorios de diagnóstico veterinario en el ámbito nacional e internacional.

Desde esta Comisión Científica queremos agradecer a la Dra. María Emilia Eirin por realizar la primera lectura crítica y a los integrantes de la CCEditorial por realizar la revisión editorial y la indexación de este manual.

2. Introducción

La neosporosis bovina, producida por el protozoo *Neospora caninum*, ocasiona abortos en ganado cárnico y lechero de nuestro país. Según la casuística del INTA EEA Balcarce, entre el 5 al 10 % de los casos de abortos serían causados por este parásito. Además, más del 90 % de los rodeos para leche y más del 50 % de los rodeos para carne en la Pampa Húmeda tendrían al menos un animal seropositivo a esta enfermedad.

3. Ciclo de vida parasitario

El ciclo de vida parasitario involucra a algunos cánidos que se comportan como hospedadores definitivos que pueden eliminar ooquistes, los cuales contienen 2 esporocistos con 4 esporozoítos cada uno. A su vez, los bovinos también están involucrados y se comportan como hospedadores intermediarios de bradizoítos (estadio de replicación lenta contenidos en quistes alojados en el sistema nervioso central y músculos) y/o taquizoítos (de replicación rápida). Otros hospedadores intermediarios son los ovinos, caprinos y equinos. Los cánidos pueden también comportarse como hospedadores intermediarios y presentar parálisis y paresia del tren posterior. En bovinos, la enfermedad tiene un comportamiento endémico asociado a infecciones verticales frecuentes y tasas de aborto que no superan el 10 %; o un comportamiento epidémico cuando la enfermedad ingresa por primera vez al rodeo, encontrando una alta proporción de animales que son expuestos a ooquistes de *N. caninum*, asociándose en este caso con tormentas de abortos que pueden superar el 30 %.

4. Pérdidas por abortos y muerte neonatal

Las pérdidas productivas y económicas asociadas se producen por los siguientes eventos:

1. Aborto: es el signo clínico más frecuente, y en hembras crónicamente infectadas ocurre generalmente en el segundo tercio de la gestación. La momificación fetal (**Figura 1**) es un hallazgo frecuente, aunque debe realizarse el diagnóstico diferencial con la Diarrea Viral Bovina.
2. Muerte fetal temprana: en hembras con infección aguda asociándose a repetición de celo.
3. Enfermedad neonatal: pueden presentarse casos esporádicos asociados a encefalomiелitis con signos de disfunción nerviosa y bajo peso al nacer.
4. Incremento en el descarte de vacas: las vacas seropositivas tienen mayor probabilidad de rechazo que las vacas seronegativas.
5. Reducido valor económico de las vaquillonas y/o vacas seropositivas. Los animales seropositivos no sólo tienen mayor riesgo de abortar, sino también de transmitir la infección en sucesivas generaciones.



Figura 1. La momificación fetal es un hallazgo frecuente en las infecciones por *N. caninum*.
Fuente: Laboratorio de Patología, EEA INTA Balcarce.

5. Diagnóstico

Para el diagnóstico de la neosporosis se dispone de técnicas serológicas como la inmunofluorescencia indirecta (IFI), inmunoensayo (ELISA), microaglutinación (MAT) e inmunoblot (IB) que detectan anticuerpos específicos en suero o en fluidos fetales. La histología permite la observación de las lesiones causadas por *N. caninum* en los fetos abortados o placenta, la inmunohistoquímica (IHQ) evidencia mediante el uso de sueros hiperinmunes formas parasitarias asociadas a las lesiones, y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) logra la amplificación del ADN parasitario en tejidos diana.

Al efectuar **estudios serológicos** para el diagnóstico de neosporosis bovina es importante tener en cuenta los siguientes conceptos:

- El diagnóstico serológico **individual** positivo de una hembra que abortó **no** necesariamente indica que *N. caninum* sea la causa del aborto, ya que un animal seropositivo puede parir una cría clínicamente normal, aunque congénitamente infectada.
- Debido a que existe fluctuación en el nivel de anticuerpos en vacas seropositivas que no abortaron, carece de validez determinar el **título final** de anticuerpos en suero/plasma.

- Teniendo en cuenta los conceptos anteriores se recomienda, tomar muestras de sangre de animales que abortaron y preñados del mismo lote donde se produjeron los abortos. De este modo, se podrá inferir si *N. caninum* estuvo involucrado en los abortos observados.

- A modo de ejemplo: se remiten 20 sueros de un rodeo, 10 pertenecen a vacas que abortaron (Grupo A) y 10 a vacas preñadas (grupo B) compañeras de las que experimentaron el aborto. La interpretación diagnóstica e implicancia de *N. caninum* como agente causal de aborto variará según los resultados serológicos hallados (**Tabla 1**).

Tabla 1: Interpretación de resultados serológicos considerando la proporción de animales con y sin anticuerpos específicos en los grupos que sufrieron abortos, y su control (preñadas) del mismo rodeo.

Resultados serológicos		Grupo A	Grupo B	Interpretación de resultados
		(n=10)	(n=10)	
Seropositivos/ muestras	total de	5/10	5/10	*Infección en el rodeo pero no es posible asociar <i>N. caninum</i> como agente causal de aborto
Seropositivos/ muestras	total de	8/10	2/10	* <i>Neospora caninum</i> está asociado al episodio de abortos

La identificación de anticuerpos en fluidos fetales (en gestaciones >4 meses) o ADN en los tejidos, demuestra la infección congénita pero no provee elementos suficientes para establecer que el aborto fue causado por *N. caninum*. Esto se sustenta en la notable eficiencia que tiene este protozoo para transmitirse de la madre al feto. Para la confirmación definitiva de los abortos por neosporosis, la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la IHQ y/o IB deberían complementarse con análisis histopatológicos para detectar lesiones incompatibles con la vida. Sin embargo, será dificultosa esta confirmación si el aborto hubiese ocurrido por lesiones de la placenta. El aislamiento *in vitro* de *N. caninum* a partir de fetos abortados es dificultoso, debido a la autólisis de la mayoría de fetos previa a su expulsión. Aun así, para intentar aislar *N. caninum* se deben remitir cerebros de fetos abortados refrigerados (entre 8°C a 10°C) a laboratorios especializados en esta enfermedad que dispongan de bioherio y/o posibilidad de realizar un aislamiento del protozoo en cultivo celular.

6. Control

Las medidas de manejo y profilaxis para limitar la difusión de *N. caninum* deberán adecuarse a cada situación en particular debiendo considerarse, tipo de explotación, posibilidad de controlar fuentes de infección postnatal, prevalencia de la enfermedad y el costo-beneficio de implementar medidas sanitarias de prevención y control. Cualquier

iniciativa de control de la enfermedad deberá estar fundamentada en un correcto diagnóstico inicial de neosporosis, y la existencia de asociación entre la ocurrencia de abortos y la enfermedad. Debido a la endemicidad en la mayoría de los establecimientos, es muy común encontrar animales seropositivos sin que ello esté necesariamente vinculado a la presentación de abortos o pérdidas reproductivas. Las medidas de control tendrán impacto siempre y cuando exista un diagnóstico diferencial acertado.

Las medidas de prevención y control se sustentan en la interrupción del ciclo de vida parasitario, considerando las dirigidas al perro y al bovino por separado.

En el caso de los **perros**:

1. Evitar que los perros ingieran material abortado (feto, fluidos o placenta) y alimentarlos con carne cocida o alimentos balanceados.
2. Impedir que los perros entren en contacto con el ganado para evitar que las heces de los perros contaminen las fuentes de agua y comida (pasturas, depósitos de granos, galpones, silos) de los bovinos.

En el caso de los **bovinos**:

1. Identificar portadores mediante serología y mantener registro de eventos reproductivos anómalos.
2. Efectuar la reposición con terneras seronegativas. Lo ideal es realizar el sangrado después de la desaparición/descenso de los anticuerpos calostrales a los 4-6 meses de edad. Las terneras seropositivas deberán destinarse a engorde y posterior faena.
3. Realizar serología a todo bovino que ingrese al establecimiento.
4. Utilizar hembras receptoras seronegativas en los establecimientos que realicen transferencia embrionaria.
5. Recuperar fetos abortados, momificados y placenta, para enviarlos a laboratorios públicos o privados con capacidad analítica para efectuar la necropsia y análisis correspondientes.

Las perspectivas de la disponibilidad de una vacuna contra la neosporosis en nuestro país son promisorias siendo necesario que los entes nacionales regularicen los métodos de diagnóstico y establezcan una política sanitaria para el control de esta enfermedad. Por otro lado, aún no existen pruebas serológicas capaces de diferenciar anticuerpos generados por vacunas de los generados por infecciones naturales, lo que dificulta las medidas de control sustentadas en la identificación y eliminación de animales seropositivos.

7. Serología

7.1 Prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Fundamento

La inmunofluorescencia indirecta (IFI) es una prueba serológica primaria basada en la detección de anticuerpos específicos anti-*N. caninum* en muestras de suero, mediante el uso

de un conjugado anti-inmunoglobulina específico de especie, unidas a un fluorocromo. La eficiencia de la prueba varía según el punto de corte y las condiciones propias de cada laboratorio. La IFI permite evaluar las fluctuaciones de la respuesta inmune humoral mediante la titulación. Tiene las desventajas de ser parcialmente subjetiva en la interpretación de los resultados y una capacidad limitada de procesamiento de muestras por día. Otros factores como el tipo de lámpara y la calidad del microscopio, tipo y dilución del conjugado elegido, influyen en el rendimiento real de la prueba (Campero *et al.*, 2018).

La metodología que a continuación se describe fue adaptada del protocolo utilizado en el Laboratorio de Inmunoparasitología (LAINPA) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (FCV, UNLP) para el diagnóstico serológico de neosporosis (Dellarupe, 2014).

Reactivos, materiales utilizados y sugerencias

- Portaobjetos de 15 áreas (MP Biomedicals, Santa Ana, EE.UU.) con antígeno proveniente de la cepa de referencia NC-1 (Dubey *et al.*, 1988) de *N. caninum*. Los portaobjetos se conservan a -20°C hasta su utilización. Durante el desarrollo de la prueba se debe evitar que el antígeno sea arrastrado por el contacto con superficies o elementos de trabajo (ej. *tips* de micropipetas).

- Solución *buffer* fosfato salino (PBSS). Se aconseja preparar una solución madre (10X) y mantenerla a 4°C para evitar posibles contaminaciones. La solución de trabajo (1X) debe prepararse al momento de su utilización.

Solución madre 10X:

Cloruro de sodio (NaCl)	40,00 g
Cloruro de potasio (KCl)	1,00 g
Fosfato disódico (Na ₂ HPO ₄)	5,75 g
Fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	1,00 g
Agua destilada c.s.p.	500 ml

Solución de trabajo. Utilizar la solución madre homogeneizada y luego preparar el volumen necesario diluyendo 1:10 en agua destilada. El pH final esperado será de 7,2.

- Solución *buffer* de carbonatos. Se aconseja preparar una solución madre (4X) y mantenerla a 4°C para evitar posibles contaminaciones. La solución de trabajo (1X) debe prepararse al momento de su utilización.

Solución madre 4X:

Carbonato de sodio (Na ₂ CO ₃)	11,4 g
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	33,6 g
Cloruro de sodio (NaCl)	8,5 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Solución de trabajo. Diluir la solución madre homogeneizada en agua destilada en proporción de 1:4. El pH final esperado será de 9.

- Conjugado para el diagnóstico en bovinos: conjugado anti-IgG de bovino (Nº código: F7887, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.). Se sugiere fraccionar el stock en alícuotas de pequeño volumen (aprox. 30 µL) en viales Eppendorf o similar de 100 µL cubiertos con papel de aluminio (ya que el fluorocromo es muy sensible a la luz) y almacenar a -20°C. El objetivo del fraccionamiento es evitar que los sucesivos descongelamientos afecten la integridad de las inmunoglobulinas. ***Nota: cada laboratorio deberá determinar la dilución de uso del conjugado respecto a un control positivo de título conocido.***

- Suero control positivo. Se fraccionará en alícuotas de pequeño volumen para evitar que se produzcan alteraciones por procesos de congelación y descongelación que pudieran afectar la integridad de las inmunoglobulinas.

- Suero control negativo. Se tratará de manera similar al suero control positivo.

- Microscopio de fluorescencia. Es conveniente que se encuentre ubicado en una habitación donde la oscuridad esté garantizada al momento de la lectura para facilitar la observación de la reacción fluorescente.

Procedimiento

1- Diluir las muestras del suero problema, suero control positivo y suero control negativo en PBSS en una placa de 96 pocillos con fondo en U. Se pueden realizar diluciones individuales o seriadas en base 2. Para una dilución inicial de 1:25 en un volumen final de 200 µL, se deben descargar 192 µL de PBSS y 8 µL de suero.

2- Colocar los portaobjetos sobre una superficie plana y definir las áreas que se destinarán para el control positivo y el control negativo. Estos controles deberían colocarse en áreas alejadas físicamente en forma sistemática, ej.: primera y última posición en una misma fila, respectivamente. Destinar un área del portaobjetos para el control de conjugado donde se descargará solo PBSS en lugar de suero. Generar una planilla donde se grafique la réplica de la distribución de cada suero problema y los controles en cada portaobjetos.

3- Con una micropipeta adecuada colocar 10-15 µL de la dilución deseada en cada área del portaobjeto correspondiente. Por cada nueva muestra, se debe cambiar el *tip* de la micropipeta.

4- Incubar el antígeno con la dilución deseada del suero en una estufa a 37°C en cámara húmeda durante 30 min.. Es importante asegurarse de que haya humedad para evitar la evaporación de la gota de suero.

5- Realizar 3 lavados de 10, 5 y 3 min., con solución buffer de carbonatos, en agitador. Por cada lavado, renovar la solución buffer de carbonatos. Secar el portaobjeto con un papel absorbente (o con hisopo) con cuidado de no tocar el interior de las áreas del portaobjeto para evitar el desprendimiento del antígeno.

6- Agregar 10-15 µL de la dilución de conjugado correspondiente a cada una de las áreas del portaobjeto. Incubar en estufa a 37°C, en cámara húmeda durante 30 min.

7- Repetir los lavados como se indicó previamente.

8- Montar con glicerina al 50% en buffer de carbonatos y agregar el cubreobjetos. Limpiar cuidadosamente con papel absorbente el excedente de la solución de montaje para evitar la adherencia del portaobjetos a la platina del microscopio y ensuciar el objetivo.

9- Se sugiere comenzar la lectura con el menor aumento del microscopio a fin de apreciar la distribución de la fluorescencia en toda el área, y hacer la lectura definitiva con objetivos de mayor aumento.

Interpretación de la reacción: Los resultados serán válidos si los controles positivos y negativos muestran la reacción esperada. El área que recibió solo PBSS (control de conjugado), debe ser negativa. Se considera que un suero es **positivo** cuando se observa fluorescencia periférica continua en toda la superficie del taquizoíto incluida la región apical (**Figura 2**). Si la fluorescencia sólo se observa en la región apical y el resto de la superficie del taquizoíto no presenta fluorescencia, dicha muestra debe considerarse **negativa**. La detección de fluorescencia apical puede darse por reacciones cruzadas con otros protozoarios apicomplexa que comparten epitopes presentes en el conoide (Paré *et al.*, 1995). La intensidad de la reacción depende de la cantidad de anticuerpos presentes en el suero, siendo mayor la intensidad de fluorescencia cuando mayor es la concentración de anticuerpos.

Cada laboratorio debe determinar su propio punto de corte, dependiendo de la situación epidemiológica (Dubey *et al.*, 2017; Campero *et al.*, 2018). Por ejemplo, en la EEA INTA Balcarce, se utiliza un punto de corte de 1:100 para la selección de hembras bovinas para reposición y 1:200 para estudios epidemiológicos. En el caso de la serología fetal se utiliza un punto de corte de 1:10.

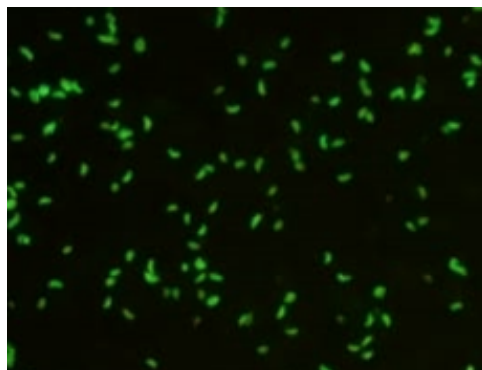


Figura 2. Microfotografía obtenida al realizar la técnica de IFI en un suero control positivo bovino, dilución 1:200 (Nikon, 20X), donde se observan taquizoítos fluorescentes en todo su contorno con igual intensidad. Fuente: Laboratorio de Patología, EEA INTA Balcarce.

7.2. ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

Estas pruebas serológicas permiten cuantificar la reacción antígeno-anticuerpo a través de una enzima conjugada a un anticuerpo secundario que en presencia del sustrato-cromógeno desarrolla color. Diferentes tipos de ELISA han sido evaluados para el diagnóstico de neosporosis bovina (Campero *et al.*, 2018). Pueden estar basadas en antígenos crudos o recombinantes y se realizan en placas de poliestireno de 96 celdas de

fondo plano. Se describen un ELISA indirecto (ELISA-i) y un ELISA de competición (ELISA-c) basados en antígenos nativos solubles purificados y un ELISA-c basado en la proteína recombinante SAG-1 de *N. caninum* (*in-house*).

Obtención de antígenos

Para la obtención de antígeno crudo se siguió la técnica de Baszler *et al.* (1996) y para la obtención del antígeno recombinante la técnica de Novoa *et al.* (2020), ambas técnicas con ligeras modificaciones.

Antígenos nativos

Este antígeno nativo purificado está constituido por una mezcla de proteínas aisladas, unidas a polisacáridos y lípidos de *N. caninum* no sedimentados a altas revoluciones. Algunas de estas proteínas son inmunodominantes y se ubican con frecuencia en la superficie de los taquizoitos. Los anticuerpos policlonales generados después de la infección identifican epitopes de estas proteínas y carbohidratos. A continuación, se enuncian los pasos mediante los cuales se obtienen dichos antígenos.

1. Multiplicar *N. caninum* en cultivos *in vitro* de células Vero, con *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) enriquecido con suero fetal bovino (SFB), en una atmósfera con 5 % CO₂ a 37°C.
2. Despegar en forma mecánica (escobillas) las células Vero cuando el 80 % de la monocapa esté parasitada. Centrifugar a 2000 g 20 min.
3. Liberar los taquizoítos a través de pasajes de la suspensión por agujas hipodérmicas (25G).
4. Purificar y concentrar los taquizoítos en un gradiente densidad de Percoll 60 % mediante centrifugación a 26000 g.
5. Lavar tres veces los taquizoítos con PBSS y centrifugar a 2500 g durante 25 min.
6. Solubilizar los antígenos en PBSS usando un sonicador o un disruptor celular de alta presión.
7. Centrifugar 14000 g 45 min a 4°C.
8. Filtrar el sobrenadante (0,22 µm) y ajustar a una concentración de 0,7-1,2 mg/mL de proteína determinada a 280 nm mediante espectrofotometría. Conservar el antígeno en alícuotas a -80°C.

Antígeno recombinante

Este antígeno está basado en un fragmento truncado de la proteína SAG1 de *N. caninum* obtenida por recombinación genética (tSAG1). A continuación, se describe el protocolo para su obtención.

1. Obtener ADN genómico purificado de los taquizoitos de *N. caninum*.
2. Amplificar la secuencia que codifica el residuo 22-303 de la proteína SAG1 con *primers* que incluyen los sitios de restricción 5'-CATATG-3' y G/GATCC, agregados para facilitar el

clonado utilizando las endonucleasas NdeI y BamHI (Promega, Corp., Madison, WI), respectivamente. Incubar a 37°C durante 10 min.

3. Clonar la secuencia truncada (tSAG1) en el plásmido pGEM-T-easy (Promega Corp., Madison, WI).

4. Escindir el fragmento tSAG1 con las enzimas de restricción NdeI y BamHI y subclonar el producto en plásmido de expresión pET-9b (Novagen; MilliporeSigma), de 4340 pares de bases. Confirmar la identidad de la nueva construcción mediante secuenciación.

5. Expresar la proteína de fusión usando el vector de expresión en células competentes *Escherichia coli* BL21 RIL (DE3) pLysS (Novagen; MilliporeSigma).

6. Cultivar las bacterias en medio específico Luria-Bertani (Ej. LB *broth*, Gibco, USA) suplementado con 50 µg/mL de kanamicina y 34 µg/mL de cloranfenicol, en un agitador orbital a 150 rpm y 37°C hasta obtener una densidad óptica a 660 nm ($DO_{600\text{nm}}$) =1,0. Inducir la expresión de la proteína con 1% de lactosa mediante incubación en el agitador orbital durante 3 h. Sedimentar las células mediante centrifugación a 4000 *xg* y 4°C, durante 10 min.

7. Resuspender las bacterias en un *buffer* de lisis (50 mM PO_4HNa_2 , 300 mM ClNa, 10 mM imidazol, pH 8,0) enriquecido con un coctel de inhibidores de las proteasas, grupo III (Calbiochem; MilliporeSigma) y lisarlas mediante un disruptor de células (Emulsiflex B15, Avestin, Canadá) a 20.000 *psi*. Centrifugar a 12.000 *xg*, a 4°C durante 30 min.

8. Purificar el sobrenadante por cromatografía en 2 ml de Ni-NTA Agarosa (Qiagen, Hilden, Germany), previamente equilibrada con lisis *buffer*. Incubar a 4°C durante 60 min, descargar en una columna de 1,5 x 5,0 cm y lavar con *buffer* de lisis con 30 mM imidazol. Eluir la rtSAG1 con 5 volúmenes de una solución de *buffer* de lisis con 200 mM imidazol (pH 8,0). Dializar con PBSS (10,0 mM PO_4HNa_2 , 1,8 mM PO_4H_2K , 137,0 mM ClNa, 2,7 mM ClK, pH 7,4). Determinar la concentración de la rtSAG1 mediante absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de extinción molar ($\epsilon_{280\text{nm}}$) equivalente a 27220/M/cm.

9. Evaluar la pureza de la proteína recombinante rtSAG1 mediante *Western blot*. Conservar el antígeno en alícuotas a -80°C.

ELISA-i basado en antígeno nativo

El antígeno nativo adsorbido a la placa de ELISA, reacciona con los anticuerpos específicos primarios presentes en el suero. La unión antígeno-anticuerpo es detectada por una anti-IgG bovina conjugada con peroxidasa, que en presencia del sustrato (H_2O_2) y del cromógeno 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzothiazolin-6-ácido sulfónico, ABTS) desarrolla color. Una reacción positiva se manifiesta por un color verde producto de la oxidación del ABTS por la peroxidasa en presencia del H_2O_2 . La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de anticuerpos específicos y es medida en densidad óptica (DO) en un

espectrofotómetro a 405 nm. Los resultados se expresan en porcentaje de positividad (% P) respecto de un suero de referencia positivo (100 % P), Echaide *et al.*, (2002).

Adsorción del antígeno nativo a las placas

El antígeno se diluye en un buffer carbonato/bicarbonato 0,06 M pH 9,6 para ajustarlo a una concentración de 1µg/celda, la cual fue previamente establecida respecto de un suero de referencia positivo fuerte para lograr una DO=1 en 15 minutos (\pm 20 %). Preparar una solución de 0,01 µg/µL y dispensar 100 µL del antígeno diluido en cada pocillo de placas de ELISA (Nunc, 269620) no tratadas sin tocar las paredes. Se agita ligeramente la placa para asegurar que el antígeno se distribuya en el fondo de cada celda y se mantienen en reposo a 25°C durante 16 h. Si las placas no se utilizan inmediatamente, se cubren con plástico adherente y se almacenan a -20°C, hasta su uso.

Controles

En cada placa se debe incluir un suero control positivo fuerte (C++), un suero control positivo débil (C+), un suero control negativo (C-) y un control de conjugado (Cc) que no lleva suero y se reemplaza por el mismo volumen de PBSS. Los controles se evalúan por duplicado y se sugiere colocarlos en la primera columna de cada placa. Almacenar grandes volúmenes en alícuotas de 0,5 mL a -20°C.

Procedimiento

Importante: permitir que todos los reactivos estén entre 25°C y 28°C antes de comenzar la prueba.

1. Quitar la cobertura de las placas congeladas después de 40 min. de incubación a 37°C.
2. Distribuir los sueros problema y controles diluidos 1/100 en PBSS 0,01 M, pH 7,2 (*buffer* dilución, BD) 1X. Se recomienda realizar una pre-dilución 1/10 en BD en una placa fondo en U y luego 1/10 en BD + 4 % leche descremada (BDL) en la placa de fondo plano e incubar 60 min., en agitación.
3. Hacer 3 lavados con PBSS 0,01 M, pH 7,2 + 0,05 Tween-20 (*buffer* lavado, BLT) 1X moviendo la placa lateralmente entre lavados e invertirlas para eliminar el líquido, evitando burbujas. No deben quedar restos de leche.
4. Preparar el conjugado 5 min. antes de finalizar la incubación de los sueros. Diluirlo 1/2500 en BDL. Agregar 100 µL /pocillo e incubar 60 min., en agitación.
5. Lavar las placas 3 veces como en el punto 3.
6. Preparación del sustrato-cromógeno. Se realiza inmediatamente antes de finalizar la incubación del conjugado y se recomienda prepararlo por separado para cada placa, según se detalla a continuación.

12 mL de citrato de sodio/ácido cítrico 0,05M, pH 4,5. (*Buffer* sustrato; BS)
300 µL de ABTS
60 µL de H₂O₂ al 3 %

7. Agregar 100 µL del sustrato-cromógeno a cada celda de la placa de prueba y también a las celdas de la primera columna de una placa limpia, la que se utilizará como blanco. Frenar la reacción a los 10-15 min con 100 µL de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 4 % (solución de frenado). El resultado de la reacción enzimática se obtiene mediante un lector de ELISA con filtros de 405 nm. La DO promedio de la columna (8 pocillos) utilizada como blanco debe restarse de la DO de cada uno de las 96 muestras de la placa (DO corregida).

Interpretación de los resultados

Los resultados se expresan en porcentaje de positividad (% P). La DO promedio obtenida para el C++, se considera el 100 % de positividad y se toma como referencia para obtener los % P de los sueros problema y controles, aplicando la siguiente fórmula.

$$\% P = \text{DO muestra corregida} \times 100 / \text{DO C++}$$

Control de calidad.

Se considera que los resultados son válidos cuando los valores obtenidos para los controles resultan dentro de los límites de aceptación según la siguiente descripción:

La DO₄₀₅ promedio del C++ (100% P), debe resultar > 0,7 y < 2,0.

C++	95-105 %P
C+	21 - 60%P
C-	-5 y 18%P
Cc	-5 y 12%P

El punto de corte establecido a través del análisis de una curva ROC (característica receptor /operador) fue ≥ 25 %P, la sensibilidad diagnóstica (Sen-D) 90,4 % (CI 83,4-97,3) y la especificidad diagnóstica (Esp-D) 93,3% (CI 86,2-100).

ELISA-c

El antígeno nativo o recombinante adsorbido a las placas de ELISA reacciona con el anticuerpo primario que compite por un epítopo con un anticuerpo monoclonal (AcM) anti-SAG-1. La unión de los anticuerpos primarios específicos inhibe la unión de una proporción o de todo el AcM y la peroxidasa (conjugada con el AcM o con un suero anti-ratón) se elimina con los lavados. La ausencia de la enzima mantiene al sustrato intacto lo que se manifiesta por la falta de color, característico de los sueros positivos. Los resultados se expresan en porcentaje de inhibición (%I) respecto del Cc que genera el 100% de color (0%I) y es el valor referente para obtener los valores de %I de todos los sueros analizados, incluyendo los controles. La prueba puede ser también estandarizada utilizando como valor de referencia para cada placa, el C- en reemplazo del Cc, en este caso este control también debe ser incluido.

Adsorción de los antígenos

El antígeno nativo se diluye en un buffer carbonato/bicarbonato 0,06 M pH 9,6 para llevarlo a una concentración de 1µg/pocillo. Para ello, se prepara una solución de 0,02 µg/µL para

dispensar 50 µL del antígeno diluido en cada pocillo de placas *Polysorp Nunc* (Thermo Fisher). Incubar las placas en reposo 16 hs a 25 °C.

El antígeno recombinante se diluye en PBSS para obtener una concentración de 0,01 µg/µL y dispensar 100 µL de la tSAG1 en placas *Polysorp Nunc* (Thermo Fisher). Incubar las placas en reposo a 4°C durante 16 hs. Si las placas no se utilizan inmediatamente, se cubren con plástico adherente y se almacenan a -20°C, hasta su uso.

Controles

En cada placa se deben incluir los sueros de referencia C++, C+, C- y el Cc, como se detalla para ELISA-i. Los controles se evalúan por duplicado y se sugiere colocarlos en la primera columna de cada placa.

Procedimiento

ELISA-c con antígeno nativo fue estandarizado para usar un volumen final de 50 µL (antígeno, suero, AcM, conjugado y sustrato), mientras que para ELISA-c con antígeno recombinante se estandarizó para usar un volumen final de 100 µL. Todos los reactivos deben estar entre 25 y 28°C antes de comenzar la prueba.

1. Descongelar las placas con antígeno en reposo a 37°C durante 40 min. y luego quitar la cobertura.
2. Volcar el contenido y lavar la placa de ELISA 2 veces con 190 µL de PBSS y eliminar el líquido restante invirtiendo y golpeando las placas sobre varias capas de papel absorbente.
3. Bloquear las placas con 200 µL de PBSS-4 % o 10 % de leche en polvo descremada (PBSS-L), para ELISA-c con antígeno nativo o recombinante, respectivamente. Incubar en reposo durante 60 min.
4. Volcar el contenido y lavar 3-4 veces con BLT.

Como diluyente de los sueros, AcM y conjugado se recomienda utilizar PBSS-L para ELISA-c con antígeno nativo y PBSS-L + 0,05 % Tween-20 (PBSS-LT) para ELISA-c con antígeno recombinante.

5. Sembrar los sueros problema y controles (C++, C+, C- y el Cc) sin diluir para ELISA-c con antígeno nativo y diluidos 1:4 para ELISA-c con antígeno recombinante. Descargar los sueros en el fondo de cada celda (sin tocar los bordes). Incubar 40 min. en agitación.

6. Volcar el contenido y lavar la placa de ELISA 3-4 veces con BLT.

7. Dispensar el anticuerpo monoclonal RafNeo5 (INTA EEA Rafaela).

A continuación, se describen 2 alternativas, según se trabaje con el AcM conjugado con peroxidasa o sin conjugar.

- 7.1 Prueba con AcM RafNeo5 conjugado con peroxidasa (AcM RafNeo5-HRPO, INTA EEA Rafaela). Se aconseja preparar la solución en volumen según el número de placas, 5 min

antes de finalizar la incubación de los sueros. Preparar una dilución 1/100 en el diluyente apropiado, homogeneizar y mantener en oscuridad. Agregar en cada celda el volumen correspondiente e incubar 60 min. en agitación.

7.2 Prueba con AcM RafNeo5 no-conjugado. Preparar una dilución 1/2000 en el diluyente apropiado e incubar 60 min en agitación. Hacer 3-4 Lavados con BLT. Preparar el anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa en volumen según el número de placas, diluido 1/2000 a 1/4000. Agregar el volumen correspondiente e incubar 60 min. en agitación.

8. Volcar el contenido y lavar la placa de ELISA 3-4 veces con BLT.

9. Inmediatamente antes de finalizar la incubación del conjugado se prepara el sustrato para cada placa según se detalla a continuación:

12 mL de BS
300 µL de ABTS
60 µL de H₂O₂ al 3 %

Agregar el volumen correspondiente del sustrato-cromógeno en la placa de prueba y también en la primera columna de una placa limpia que se utilizará como blanco. Frenar la reacción a los 15-20 min con un volumen según corresponda, de SDS al 4 % por celda, homogeneizar y leer a 405 nm.

Interpretación de los resultados.

Los resultados se expresan en porcentaje de inhibición (%I). El Cc, sin suero, desarrolla un color verde intenso. La DO promedio obtenida para el Cc se considera el 100 % de color y el 0 %I y se toma como referencia para obtener los %I de las muestras de suero y de los otros controles.

$$\%I = 100 - (DO \text{ muestra} \times 100 / DO \text{ Cc}).$$

Control de Calidad.

La DO₄₀₅ del Cc (100 %I), debe resultar > 0,7 y < 2,0.

C++	80-113 %I
C+	25 y 75%I
C-	-5 y 18%I
Cc	-15 y 9%P

El punto de corte establecido mediante el análisis ROC para ELISA-c con antígeno nativo fue ≥ 25 %I, La Sen-D 96,7 % (CI 95 %= 93,3-98,7) y la Esp-D 98,9 % (CI 95 %=96,2-99,9).

El punto de corte para ELISA-c con antígeno recombinante fue ≥ 29 %I, La Sen-D 98,7 % (CI 95 %= 96,8-99,7) y la Esp-D 97,9% (CI 95 %=96,8-99,7).

Materiales

Agitador orbital

Lavador automático para placas (optativo)
Lector de ELISA
Incubadoras
Placas de ELISA
Micropipetas mono y multicanales
Plásticos fungibles

Reactivos y Soluciones

Anticuerpo monoclonal anti- SAG1 de *N. caninum* (AcM RafNeo5) (INTA EEA Rafaela).
Anticuerpo monoclonal anti- SAG1 de *N. caninum* conjugado con HRPO (AcM RafNeo5F8-HRPO). (INTA EEA Rafaela).

Anticuerpo policlonal de conejo anti-IgG bovina, conjugado con HRPO (SIGMA).

Anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón, conjugado con HRPO (Jackson Immuno Research)

Sustrato. H₂O₂ 3 % (SIGMA).

Cromógeno. 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzothiazolin-6- ácido sulfónico), ABTS (SIGMA).

Bloqueante. Leche en polvo descremada Svelty (Nestlé).

Buffer para adsorción de antígeno

Buffer carbonato/ bicarbonato,	0,06M pH 9,6
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	3,80 g
Carbonato de sodio (NaCO ₃)	1,93 g
H ₂ O destilada c.s.p.	1000 mL

Buffer diluyente 5X

PBSS 0,01 M pH 7,2	
Cloruro de sodio (NaCl)	42,50 g
Fosfato de sodio monobásico (PO ₄ H ₂ Na.H ₂ O)	1,60 g
Fosfato de sodio dibásico (PO ₄ HNa ₂)	5,50 g
H ₂ O destilada c.s.p.	1000 mL
Solución de trabajo diluir 1/5	

Buffer lavado 1X

PBSS 0,01 M pH 7,2	1000 mL
Tween-20 (0,05%)	0,5 mL

Buffer sustrato

Citrato de sodio/ácido cítrico 0,05M, pH 4,5	
Citrato trisódico (Na ₃ CH ₅ O ₇ . 2H ₂ O)	3,82 g
Ácido cítrico (H ₃ C ₆ H ₅ O ₇)	2,30 g
Agua destilada c.s.p.	500 mL

Solución de frenado

Dodecil sulfato de sodio (SDS) 4%.

Mantener a 37°C para evitar que precipite.

Las soluciones de trabajo (1X) pueden mantenerse refrigeradas a 8°C o congeladas a -20°C.

Consideraciones generales

La estandarización de la técnica de ELISA requiere de la evaluación de la sensibilidad y especificidad analítica. La sensibilidad analítica de la prueba corresponde a la mayor dilución que permite detectar el anticuerpo específico a determinar y es de utilidad para seleccionar sueros de referencia positivos (fuertes y débiles). La especificidad analítica evalúa la ausencia de reacciones serológicas cruzadas y se establece mediante el uso de un panel de sueros derivados de animales que han experimentado infecciones con organismos relacionados. Ambos parámetros son relevantes, porque si la prueba no detectara en forma eficiente anticuerpos en diluciones limitantes de suero, o si hubiera reactividad cruzada frecuente, los reactivos deberían recalibrarse o reemplazarse, o el ensayo no debería considerarse.

Los principales parámetros a obtener durante la validación de ELISA son la Sen-D y la Esp-D que permiten construir el punto de corte óptimo de la prueba para diferenciar muestras positivas de negativas. Estos parámetros resultan del análisis de muestras de referencia provenientes de animales con estado de infección conocido en relación a la enfermedad objetivo. La Sen-D establece la proporción de animales de referencia infectados conocidos que dan positivo en el ensayo, mientras que los animales infectados que dan negativo se consideran falsos negativos. La Esp-D es la proporción de animales de referencia no infectados que resultan negativos en el ensayo, mientras que aquellos que resultan positivos, se consideran falsos positivos. El número y el origen de las muestras de referencia utilizadas para obtener la Sen-D y la Esp-D son de suma importancia, ya que el ensayo debe estar debidamente validado para ser aplicado en una población objetivo. Debido a las diferentes variables que deben ser analizadas, se considera que al menos 300 muestras de referencia obtenidas de animales infectados y no menos de 1.000 muestras obtenidas de animales no infectados deberían incluirse para establecer estimaciones iniciales de Sen-D y Esp-D, respectivamente. Sin embargo, se puede utilizar un punto de corte obtenido con menor número de muestras, el que posteriormente podrá consolidarse a medida que se incorporen datos de animales con *estatus* de infección conocida. Si este última fuera el caso, el número de muestras de animales infectados debería ampliarse a aproximadamente a 1.000 y el de animales no infectados a 5.000, para establecer estimaciones precisas de Sen-D y Esp-D, particularmente cuando la prueba se quiere implementar a nivel nacional.

Puntos de corte

Existen diferentes métodos para calcular el punto de corte asociado a una técnica de ELISA, según la disponibilidad de sueros de referencia. La distribución de la frecuencia de los resultados expresados en % P (ELISA-i) o % I (ELISA-c), correspondiente a los animales de referencia con *estatus* de infección conocido respecto a una enfermedad, genera una curva bimodal característica donde la población no infectada se distribuye a la izquierda de la abscisa formando una curva de Gauss imperfecta y los infectados se dispersan hacia la derecha de la misma (**Figura 3**). A través del análisis de una curva ROC (Características

Receptor-Operador) se pueden determinar los parámetros de rendimiento de la prueba. La curva ROC es una representación gráfica de la Sen-D y la Esp-D para cada punto de los intervalos de frecuencia de los % P (ELISA-i) o % I (ELISA-c) representados en la abscisa. El punto de corte óptimo en la abscisa se corresponde con el valor máximo resultante de la suma de la Sen-D y la Esp-D. Estos métodos proporcionan un medio estadísticamente sólido para determinar un punto de corte para un ensayo.

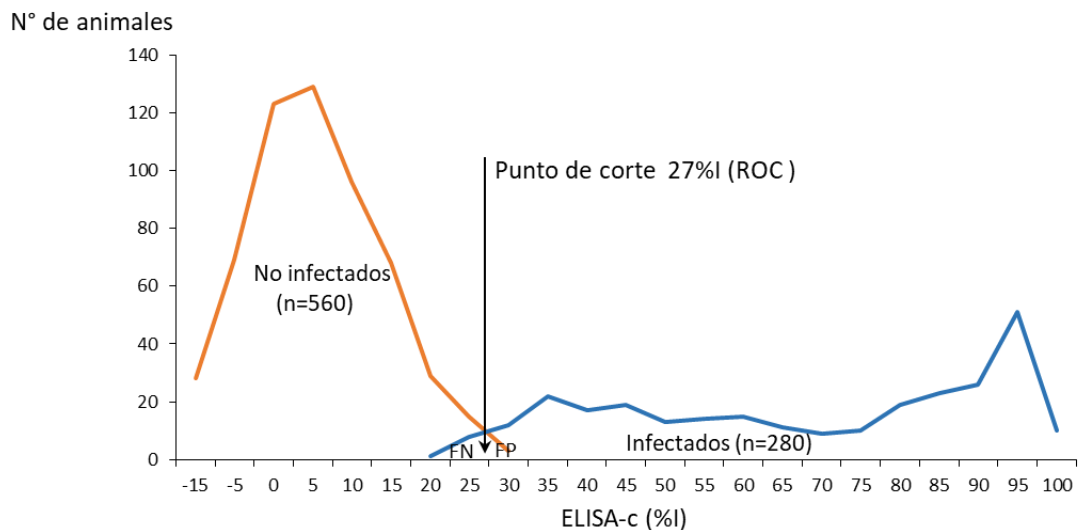


Figura 3. Distribución de frecuencia de los % de inhibición (% I) obtenidos mediante ELISA-c de sueros de animales cuya condición respecto a la infección se conoce. En la intersección entre ambas distribuciones de frecuencias se sitúa el punto de corte obtenido por análisis ROC. FN: falsos negativos. FP: falsos positivos.

Cuando sólo se dispone de sueros de referencia de animales no infectados, se puede utilizar como punto de corte el promedio de los valores de ELISA obtenidos, más 2 a 3 desviaciones estándar (**Tabla 2**). Se observó que el promedio del valor negativo + 2,5 DS muestra mayor similitud con el punto de corte obtenido por análisis ROC.

Tabla 2: Puntos de corte basados en el promedio de los valores de ELISA-c (%I) + 2 a 3 desviaciones estándar (DS) para bovinos no infectados respecto a neosporosis (n= 560).

Promedio (%I)	DS	2 DS	2,5 DS	3 DS
7,375	8,420	16,84	21,05	25,26
Puntos de corte (%I)		24	28	33

Puntos de corte entre 24 % I y 33 % I obtenidos por este método podrían ser seleccionados y utilizarse para diferentes situaciones epidemiológicas. En contraste, el análisis ROC de toda la población analizada (560 sueros provenientes de animales no infectados y 280 de animales infectados), mostró un punto de corte de 27 % I (**Figura 3**). Si bien el método del análisis de la población no infectada carece de validez estadística, se espera que el 95 % - 99 % de los animales no infectados de la población se agrupen con la población negativa. El uso exclusivo de animales no infectados **no** permite calcular la Sen-D. Por tal motivo, este sistema se recomienda únicamente para pruebas en las que la estimación de la Esp-D es crucial y la Sen-D, tenga escaso valor. Por ejemplo, cuando se use una prueba confirmatoria diseñada para descartar falsos resultados positivos (**Figura 4**).

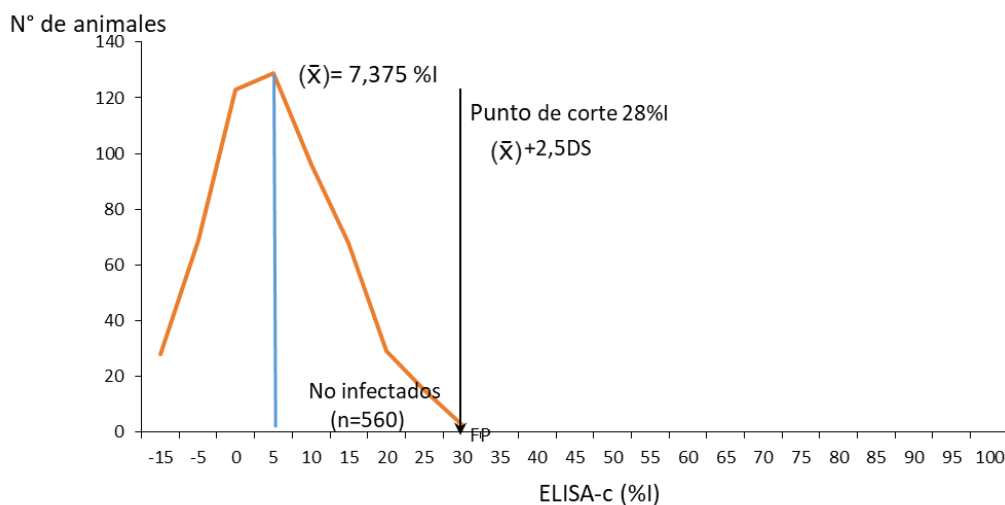


Figura 4. Distribución de frecuencia de los % de inhibición (% I) obtenidos mediante ELISA-c empleando sueros de animales no infectados. El valor de % I promedio más 2 DS, 2,5 DS, 3 DS generan puntos de corte de 24 % I, 28 % I y 33 % I, respectivamente. Solo se graficó el punto de corte de 28 % I.

En algunas ocasiones, resulta imposible obtener muestras de bovinos infectados o no infectados para establecer un punto de corte mediante los métodos descritos anteriormente. Una estrategia basada en el análisis de sueros extraídos aleatoriamente de una población objetivo sin conocimiento previo de la ausencia o presencia de la infección en los animales donantes (mezcla), ofrece la posibilidad de elegir un punto de corte intrínseco. En estos casos, se realiza una curva de distribución de los valores obtenidos de % P (ELISA-i) o % I (ELISA-c) de animales analizados en esa población. Un simple examen visual de los datos trazados ofrece la posibilidad de seleccionar uno o más puntos de corte en el rango donde finaliza la curva de Gauss imperfecta, característica de los no infectados (**Figura 5**).

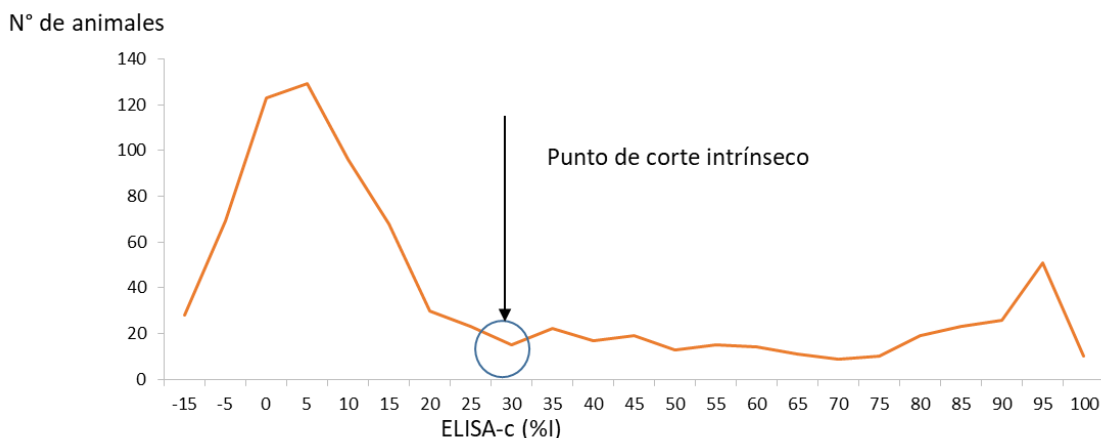


Figura 5. Distribución de la frecuencia de los % de inhibición (% I) obtenidos por ELISA-c en mezclas de muestras de animales sin conocimiento previo del *estatus* de infección respecto de una enfermedad. Al final de la curva de Gauss imperfecta, característica de la población no infectada, se puede seleccionar el punto de corte intrínseco en el rango de 25 a 30 % I.

El análisis de las distribuciones de los % P o % I en una población mezcla, es una potente herramienta para realizar estimaciones no sesgadas de seroprevalencia, ya que evita el sesgo en el que puede incurrirse al admitir que los sueros de una población de referencia son representativos de la población objetivo. El inconveniente de este procedimiento es que no permite calcular la Sen-D ni la Esp-D. Sin embargo, se pueden establecer estos dos parámetros para el ensayo, confirmando posteriormente la presencia o ausencia de infección, a través de la comparación con técnicas serológicas alternativas, histopatológicas y/o moleculares.

Es posible trabajar con diferentes puntos de corte de acuerdo al objetivo del trabajo. A medida que el punto de corte se desplaza hacia la izquierda, la Sen-D aumenta y la Esp-D disminuye y a medida que el punto de corte se desplaza hacia la derecha la Sen-D disminuye y la Esp-D aumenta. Un análisis ROC dará un punto de corte óptimo, pero en la práctica se lo puede disminuir para alcanzar el 100 % de Sen-D cuando, por ejemplo, se quieren seleccionar animales libres de una enfermedad para incorporar a un rodeo, sin importar que algunos falsos positivos sean condenados. Alternativamente, para enfermedades de baja morbilidad/mortalidad, el sacrificio de animales no infectados no es aceptable, por lo que se puede elevar el punto de corte para asegurar que los animales no infectados no se clasifiquen erróneamente como positivos (Jacobson, 1998).

8. Necropsia del feto y muestreo de tejidos/fluidos

Las lesiones macroscópicas en fetos abortados por *N. caninum* pueden ser edema y congestión subcutánea, deformidades óseas y presencia de estrías blanquecinas en el epicardio. Un hallazgo más comúnmente observado es la momificación fetal (**Figura 1**) pero deberá considerarse la realización del diagnóstico diferencial con el virus de la Diarrea Viral Bovina. El estudio histopatológico del feto es relevante en el diagnóstico de la neosporosis bovina ya que la identificación de lesiones microscópicas demuestra un desequilibrio en la

relación parásito-hospedador. Es decir, considerando que el protozoo se transmite tan eficientemente desde la madre a su progenie existe una alta probabilidad de encontrar infecciones congénitas no necesariamente asociadas a la presentación de abortos. Más aún, en presencia de pruebas diagnósticas directas (presencia de ADN por PCR) o indirectas (presencia de anticuerpos por IFI) que resulten positivas el diagnóstico de aborto por *N. caninum* deberá fundamentarse por la presencia de lesiones histopatológicas.

Tratando de evitar todo tipo de contaminación se debe obtener al menos 0,5 mL de fluido de las cavidades (abdominal, torácica y/o pericárdica) con jeringa de 5 mL y aguja hipodérmica tamaño 18×12G, el cual se colocará en tubo plástico para realizar diagnóstico serológico. Si no hubiera líquido en el momento del muestreo, se sugiere colocar solución fisiológica estéril en la cavidad e intentar su recuperación con el mismo objetivo. Para el examen del cráneo se sugiere desarticular la articulación occipito-atloidea. Con sierra se deben realizar tres cortes, uno mediante una línea virtual transversal a nivel parietal que una los ángulos internos de las dos cavidades orbitales (ocular). Desde allí hacer dos cortes laterales hacia el foramen magno del hueso occipital. Luego se debe levantar la parte ósea del cráneo que se cortó con ayuda de cuchillo o hacha de mano haciendo “palanca”; con tijera cortar la duramadre y retirar el encéfalo de su cavidad cortando los bulbos olfatorios hacia craneal y nervios craneales. Si fuera necesario se puede obtener una muestra de tejido encefálico flameando la superficie del cerebro a la altura de cerebelo y base (**Figura 6**). En esta muestra puede intentarse la identificación de *N. caninum* mediante PCR. Luego cortar un hemiencéfalo y colocarlo en formol al 10 % (una parte de formaldehído comercial y 9 partes de agua destilada) en un recipiente de boca ancha para su futuro análisis histopatológico e inmunohistoquímico. Se deben incluir muestras de pulmón, corazón, timo, hígado, bazo, riñón, glándula adrenal, lengua, linfonodos mesentéricos y preescapular, intestino delgado, músculos periorbitales, músculo esquelético del miembro posterior y diafragma, entre otros. Colocar los trozos de órganos preferentemente en forma individual y en recipientes adecuados. Si se encontrara la placenta, se recomienda recolectar una muestra de un placentoma.

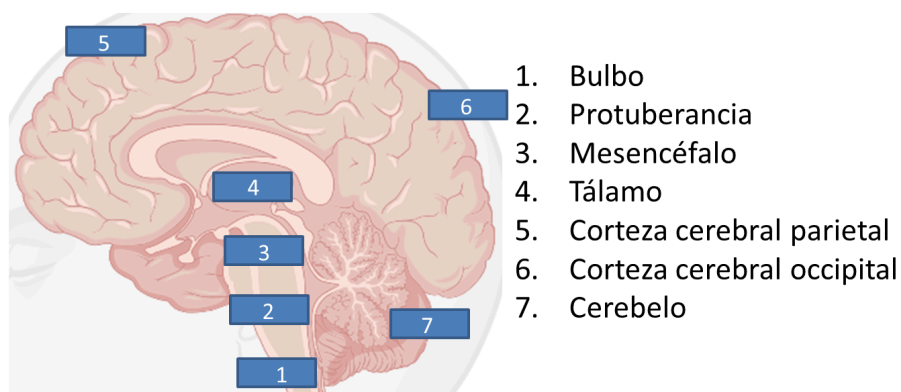


Figura 6. Obtención de muestras de SNC de diferentes regiones anatómicas. Fuente: Laboratorio de Patología, EEA INTA Balcarce

9. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Fundamento

El objetivo de esta técnica de diagnóstico es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN, partiendo de una copia de ese fragmento original o molde. El fragmento de ADN original se puede obtener a partir de cultivos de microorganismos o directamente de muestras clínicas. El procedimiento puede ser realizado por PCR convencional o qPCR (en tiempo real), que usan como secuencia blanco regiones conservadas de genes que codifican el rRNA y regiones espaciadoras (ITS).

El diagnóstico por PCR ofrece ventajas como:

- Mayor sensibilidad
- Menor tiempo de diagnóstico
- No requiere que los microorganismos estén viables

La sensibilidad de la técnica dependerá de diversos factores, como:

- Calidad de la muestra clínica
- Tiempo de transporte al laboratorio
- Temperatura durante el transporte
- Método de extracción del ADN (casero, *kit* comercial)

Para el diagnóstico de *N. caninum* la extracción de ADN se realiza preferentemente a partir de muestras de sistema nervioso central (corteza y base encefálica). En el caso de que este tejido no esté disponible, otra alternativa sería realizar la extracción desde otros dos tejidos como corazón y pulmón.

Extracción de ADN

La extracción y purificación de ADN en el INTA Balcarce se realiza por columnas mediante el kit "*High Pure PCR Template Preparation Kit*" (Roche, N° catálogo: 11796828001), siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante.

PCR anidada

Para la detección de ADN de *N. caninum* se utiliza una PCR anidada (*nested* PCR o nPCR) para la región ITS1 adaptada a un tubo, descrita previamente por Regidor-Cerrillo *et al.* (2014).

Para la realización de esta PCR se utilizan los siguientes pares de *primers*:

Nombre	Secuencia
TgNN1	5'-CCTTTGAATCCCAAGCAAAACATGAG-3'
TgNN2	5'-GCGAGCCAAGACATCCATTGCTGA-3'
NP1	5'-TACTACTCCCTGTGAGTTG-3'
NP2	5'-TCTCTCCCTCAAACGCT-3'

Los reactivos a utilizar con sus respectivas concentraciones se describen a continuación:

- Enzima Taq polimerasa 1 u/μl (N° catálogo M7841 GoTaq® G2 DNA Polymerase, Promega, EE.UU.)
- Buffer de reacción 5X (5X Green GoTaq® Reaction buffer)
- Cloruro de magnesio 50 mM
- dNTP 10 mM (N° catálogo IK0102, Set de dNTPs 100mM 4 x 25ul, Embiotec, Argentina)
- La solución de trabajo de los *primers* TgNN1-TgNN2 y NP1-NP2 será 2 μM.
- Agua grado biología molecular, libre de DNAsa y RNAsa c.s.p.

Detalle de las cantidades usada para una reacción con un volumen final de **25 μL**:

REACTIVO	Concentración inicial	Concentración final	Volúmenes de reactivos (μL)/1 reacción
Agua	-	-	3,885
Buffer (5X Green GoTaq® Reaction Buffer)	5 x	1x	5
MgCl ₂	50 mM	0,5 mM	0,25
dNTP	10 mM	0,25 mM	0,5
<i>Primers</i>	TGNN1, TGNN2	2 μM (c/u)	0,12 (c/u)
	NP1, NP2	2 μM (c/u)	5 (c/u)
GoTaq®G2 DNA Polymerase	5 u/ μL	1,25 u	0,125
ADN	-	60 ng/μL	5

Condiciones de ciclado para la reacción:

1 ciclo: 94°C; 3 min.

15 ciclos: 94°C; 30 seg.

65°C; 45 seg.

72°C; 1 min.

35 ciclos: 94°C; 30 seg

54°C; 1,30 min.

72°C; 3 min.

1 ciclo: 72°C; 5 min.

Final: 15°C; ∞.

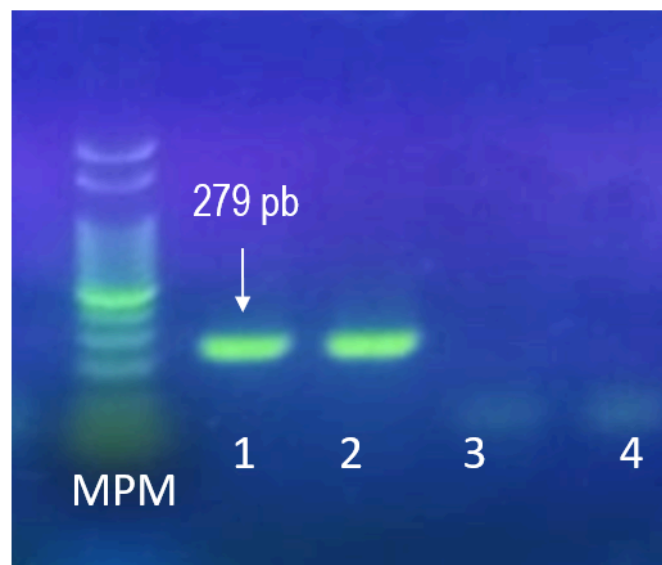


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1.6 % para visualización del producto de PCR para *N. caninum* de 279 pb. MPM: marcador de peso molecular, cada banda marca 100 pb, notar: banda gruesa corresponde a 500 pb. Calle 1: control positivo (ADN de taquizoítos de cepa de referencia NC-1), calle 4: control negativo (agua libre de DNAsas), calle 2: ADN obtenido a partir de SNC de feto bovino positivo por HP, IFI e IHQ, calle 3: ADN obtenido de SNC de feto bovino negativo. Fuente: Laboratorio de Patología, EEA INTA Balcarce.

10. Pruebas complementarias

10.1. Immunoblot (IB)

Fundamento

La técnica de IB para *N. caninum* es una prueba serológica que permite tanto la caracterización de proteínas (antígenos) de distintas cepas de *N. caninum*, como la detección de anticuerpos en muestras problema (sueros, líquidos fetales, leche). En este último caso, las proteínas conocidas permiten identificar los anticuerpos generados frente a antígenos inmunodominantes (IDAs). Las proteínas de un lisado de taquizoítos de *N. caninum* son separadas mediante electroforesis en geles SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) en condiciones desnaturizante/no desnaturizante, formando bandas que luego son transferidas a una membrana (nitrocelulosa o de fluoruro de polifluoruro de vinilideno [PVDF]), conservando el mismo patrón de bandas logrado en el gel. Para identificar la unión antígeno-anticuerpo se utiliza un anticuerpo anti-inmunoglobulina específica de especie conjugada a una enzima (i.e. peroxidasa). La adición de sustrato-cromógeno incoloro sobre el que actuará la enzima, adquiere coloración tiñendo las bandas de la membrana y marcando los IDAs.

La técnica de IB combina la alta resolución de la electroforesis y la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo. Es útil para confirmar muestras consideradas "dudosas" por otras pruebas. Para el caso de líquidos fetales su uso aumenta la sensibilidad en la detección de anticuerpos.

Las desventajas radican principalmente en la neurotoxicidad de la poliacrilamida, su desarrollo laborioso y prolongado, y el requerimiento de equipamiento especial manejado por personal entrenado.

El patrón reconocido de bandas generado por la electroforesis, es utilizado como criterio para clasificar una muestra como positiva o negativa.

La metodología que a continuación se describe fue adaptada del protocolo utilizado en el LAINPA, FCV-UNLP, para el diagnóstico serológico de neosporosis (Campero, 2014) y fue modificado del protocolo de Schares *et al.* (1998).

Reactivos, materiales utilizados y sugerencias

- Buffer de muestra (5X, en condiciones No desnaturizantes)

Tris (hydroxymethyl) aminoethanol	3,75 g
SDS	10,00 g
Glicerina	35,00 mL
Azul bromofenol	25,00 mg
Agua destilada c.s.p.	100,00 mL

pH 6,8 ajustar con HCl. Conservar en alícuotas a -20°C. La alícuota en uso se conserva a temperatura ambiente.

- Buffer Tris-HCl 0,5M (Solución A, buffer para gel concentrador)

Tris (hydroxymethyl) aminomethane	6,06 g
SDS 10 % (w/v)	4,00 mL
Agua destilada c.s.p.	100 mL

pH 6,8 ajustarlo con HCl. Conservar en frasco protegido de la luz a 4 °C.

- Buffer Tris-HCl 1,5M (Solución B, buffer para gel separador)

Tris (hydroxymethyl)-aminomethane	18,17 g
10 % (w/v) SDS	4,00 mL
Agua destilada c.s.p.	100 mL

pH 8,8 ajustarlo con HCl. Conservar protegido de la luz a 4°C.

- Acrilamida (Solución **C**, solución stock de acrilamida):

Acrilamida	30,00 g
N,N'-metylen-bisacrilamida	0,80 g
Agua destilada csp	100 mL

Conservar en frasco protegido de la luz a 4°C.

- **Buffer de electroforesis (5X)**

Tris (hydroxymethyl) aminomethanol	15,20 g
Glicina	72,10 g
SDS	5,00 g
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

Conservar en frasco protegido de la luz a 4°C.

- Amonio persulfato (APS) 30 % (w/v): se prepara en agua destilada y se conserva a -20°C en alícuotas.

- N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED): se conserva a temperatura ambiente protegido de la luz.

- Marcador de peso molecular para proteínas: Se conserva a -20°C.

- Membrana PVDF (Millipore Immobilon-P Membrane, PVDF, 0,45µm, 26,5cm x3,75m rollo; Código: IPVH00010).

- Filtros Gel Blot Paper: Cortar 6 filtros por cada membrana de antígeno.

- Buffer Aniónico:

Tris (hydroxyl-methyl) amino methanol	3,03 g
20% metanol (V/V)	200 mL
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

- Tinción con tinta china:

Ácido acético (CH ₃ -COOH) (M= 60,05 g/ mol)	5,00 mL
Tinta china	0,50 mL
PBSS (1X)- 0,05% Tween-20	500 mL

Conservar a temperatura ambiente y agitar antes de usar.

- Solución de bloqueo:

PBSS (1X)- 0,05 % Tween-20

2 % de gelatina de pescado (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU. N ° de catálogo G7765)

- Solución de lavado:
PBSS (1X)- 0,05 % Tween-20.

- Conjugado:
Peroxidase-Conjugated Affinipure goat antibovine IgG (H+L) Anti-IgG bovina-peroxidasa (Jackson Immuno Res., EE.UU.) diluido 1:1000 en PBSS 1X.

- Sustrato:

4-chloro-1-naphthol (Sigma, Código: 6788)	30 mg
Metanol	10 mL
PBSS (PBSS 1X a 4°C)	30 mL
30% H ₂ O ₂	40 µL

Procedimiento

1- Elaboración del antígeno:

Por membrana se necesitan 4×10^7 taquizoítos de *N. caninum* resuspendidos en 150 µL de agua destilada, que al momento de realizar la electroforesis se debe sonicar a 50 ciclos de 1 minuto cada uno 3 veces. Luego se debe agregar 50 µL de buffer de muestra y calentar en termobloque a 94°C por 5 min. previo a sembrar en gel.

2- SDS-PAGE en condiciones no reducidas:

Gel de corrida (al 12,5 %):

Solución B:	2,5 mL
Solución C:	4,2 mL
Agua destilada:	3,3 mL
TEMED:	10 µL
APS al 30%:	50 µL

Gel de concentración:

Solución A:	1,5 mL
Solución C:	0,7 mL
Agua destilada:	3,6 mL
TEMED:	5 µL
APS al 30 %:	20 µL

3- Inmunotransferencia

Sumergir 6 filtros (para 1 membrana) en *buffer* aniónico. La membrana de PVDF debe primero ser activada sumergiéndola unos segundos en metanol puro y luego debe ser lavada en agua destilada. Luego sumergir la membrana en *buffer* aniónico. Luego sumergir el gel en *buffer* aniónico y armar el dispositivo para la transferencia de proteínas según el siguiente esquema:



Realizar la corrida electroforética. Se pueden cortar tiras de ambos extremos de la membrana para ser teñidas utilizando Tinta China para asegurarse una correcta corrida del antígeno. Bloquear la membrana con solución de bloqueo por 30 min. y dejar secar previo a ser conservadas a -20°C .

Inmunoblot

- 1- Cortar la membrana del antígeno en tiras de 3 a 4 mm de ancho. Cortar tantas tiras como muestras a probar e incluir una tira para el control positivo y una tira para el control negativo.
- 2- Incubar las tiras 30 min. con solución de bloqueo en agitación a temperatura ambiente.
- 3- Eliminar la solución de bloqueo e incubar cada tira con el suero problema respectivo diluido 1:100 (para sueros bovinos) en solución de bloqueo y los controles positivos y negativos por una hora.
- 4- Lavar 5 veces con solución de lavado, 2 min. cada lavado.
- 5- Incubar las tiras con el conjugado por una hora.
- 6- Realizar 3 lavados de las tiras con solución de lavado y 2 lavados con PBSS 1X.
- 7- Incubar las tiras con el sustrato por 20 min. (se necesitan 500–1000 μL de solución por tira).
- 8- Detener la reacción con agua destilada y dejar las tiras secar en papel adsorbente.

Interpretación de resultado

Para sueros bovinos se registran las reacciones hacia 5 IDAs con pesos moleculares de 17–19, 29, 30, 33 y 37 kDa. La interpretación de estos resultados es (**Figura 8**):

- reconocimiento de 2 o más IDAs: positivo
- reconocimiento de 1 IDA: inconcluso
- sin reconocimiento de IDA: negativo

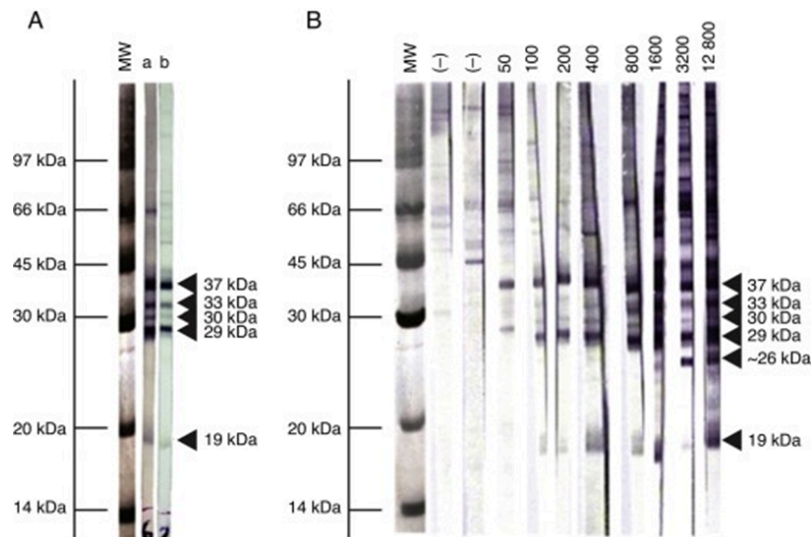


Figura 8. A. Muestras de vacas infectadas natural y experimentalmente a *N. caninum*. B. Muestras de vacas naturalmente expuestas a *N. caninum* con distintos títulos de IFI. MPM= marcador de peso molecular; a: suero de vaca naturalmente infectada; b: suero de vaca experimentalmente infectada; (-): Suero de vaca seronegativa; los títulos de IFI están expresados inversamente al título final. Fuente: extraído de Campero *et al.* (2015).

10.2 Inmunohistoquímica (IHQ)

Fundamento

Consiste en la inmunomarcación de antígenos, formas o estadios parasitarios facilitando la visualización en el microscopio óptico. Para el caso de IHQ aplicada a la neosporosis bovina es esencial elegir tejidos que hayan presentado lesiones microscópicas de encefalitis multifocal necrotizante, miocarditis, neumonía o miositis no supurativas.

Kit IHQ	ENVISION: DAKO (AGILENT) EnVision <i>Detection Systems</i> , peroxidase/DAB, Rabbit
Anticuerpo primario	NEOSPORA: Policlonal en conejo contra taquizoitos de <i>N. caninum</i> (BPA-1). Origen: CVDLS, EE.UU. Diluir 1/300
PBS	Sigma 1000-3 pH 7,4 a 25°C 12 pks. Preparar 10x y luego ir diluyendo.
PBS-T	1ml de Tween-20 en 1000ml de PBSS pH 7,4
Pepsina	Sigma P-7000 x 100g
Caseína	Sigma C-5890 x 500 g
Cromógeno AEC	AEC <i>Substrate-Chromogen</i> , Dako K3464, 1100 tests http://www.dako.com/dist/download.pdf?objectid=105417003

Procedimiento:

1- Colocar los portaobjetos con las secciones de tejidos la noche previa a 37°C.

2- Preparar el tratamiento enzimático (pepsina) para el **desenmascaramiento** (a usar más adelante):

- en 150 mL de agua destilada
- agregar 1,5 mL de HCl 1N
- agregar 0,6 g de pepsina

Disolver con agitador. Colocar la solución en un recipiente a baño maría a 37°C durante 30 min. antes de su uso.

3- Preparar la solución para **bloquear la peroxidasa endógena**:

- en 180 mL de metanol
- agregar 20 mL de peróxido de hidrógeno al 30 %

4- Preparar las diluciones de anticuerpos: usando guantes, hacerlo al menos 30 min. antes de su uso, una vez preparado protegerlo de la luz:

- Diluir el **anticuerpo primario** (*Neospora*, en **PBSS-Tween-0,1%**)
- Se usan 200 uL por placa

5- Desparafinar haciendo 3 lavados de 10 min. en xilol (enjuagar 15 veces durante la primera pasada).

6- Realizar 3 lavados durante 2 min. en alcohol absoluto.

7- Sumergir los portaobjetos en la solución de **bloqueo de la peroxidasa endógena** por 10 min. en lugar oscuro.

8- Realizar 2 lavados durante 2 min. en alcohol 95º, y un lavado durante 2 min en alcohol 70º.

9- Lavar 5 min. con agua destilada.

10- **Desenmascaramiento** usando tratamiento con pepsina: Incubar los portaobjetos durante 15 min. a 37°C a baño maría.

11- Lavar los portaobjetos durante 5 min. en agua destilada y colocar los portaobjetos en el **rack de capilaridad**. Luego lavar los portaobjetos en el rack durante 5 min. en PBSS 1X.

12- Escurrir y absorber por capilaridad la **solución de bloqueo (caseína)**. Incubar durante 10 min. a temperatura ambiente. Para preparar esta solución de bloqueo de caseína:

- en 1000 mL de PBSS 1X pH7,2
- agregar 5 g de caseína
- agregar 0,5 g de timerosal
- agregar 1 mL de Tween-20. Dejar una noche en agitador para que se disuelva la caseína. Ajustar a pH 7,4 luego de disolver. Guardar en heladera y sacar alícuotas al usarla.

13- Escurrir y absorber por capilaridad el **Ac primario**. Incubar 45 min. a 37°C en cámara

húmeda.

14- Lavar 3 veces en PBSS-T

15- Escurrir y absorber por capilaridad el **Ac secundario**, provisto ya preparado en el kit. Incubar durante 30 min. a 37°C en cámara húmeda.

16- Preparar el **cromógeno DAB** (provisto en el kit Dako): por cada 1mL de substrato (frasco grande del kit), 1 gota de cromógeno (frasco chico del kit)

17- Lavar los portaobjetos 5 min. en PBS-T.

18- Escurrir y absorber por capilaridad el **cromógeno DAB**, incubar durante 5 min. a temperatura ambiente.

19- Lavar 5 min. en PBS-T.

20- Lavar durante 5 min. en PBS-T y luego con agua destilada, donde se sacan los portaobjetos del *rack* de capilaridad y se pasan a un *rack* común.

21- Colorear (contraste) con hematoxilina, durante 5 min.

22- Lavar con agua de canilla por 2 min.

23- Alcohol ácido – agua amoniacal por 1 min 30 seg.

24- Agua corriente

25- Agua destilada

26- Alcohol 96° (2 baños)

27- Alcohol 100 (2 baños)

28- Xilol (2 baños)

29- Lavar con agua destilada

30- Montaje y observación a mayor y menor aumento con un microscopio óptico (MO).

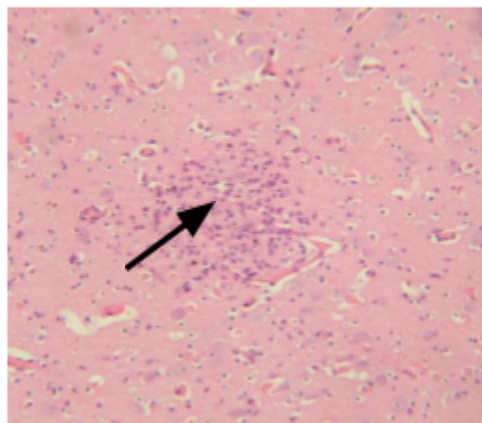


Figura 9. Lesión característica de encefalitis necrotizante multifocal no supurativa (flecha) causada por *N. caninum* en un feto bovino (40x MO). Fuente: Laboratorio de Patología EEA INTA Balcarce.

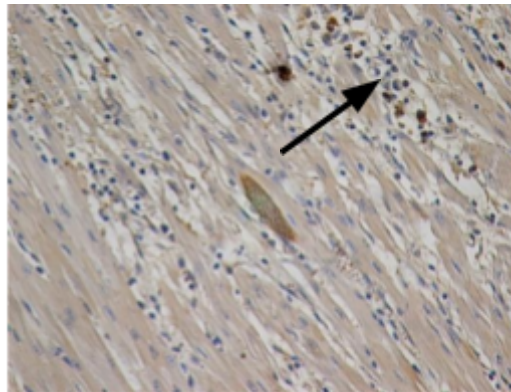


Figura 10. Presencia de antígenos parasitarios y formas parasitarias (flecha) compatibles con taquizoítos en el miocardio de un feto bovino evidenciados por IHQ. Fuente: Laboratorio de Patología EEA INTA Balcarce.

10.3. Real time PCR

La técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) utiliza el sistema SYBR Green para la cuantificación de ADN de *N. caninum* como así también para la cuantificación del ADN genómico del hospedador (Collantes Fernández *et al.*, 2002). Para ello se utilizan *primers* diseñados para amplificar las regiones NC5 del genoma de *N. caninum* (GenBank N° X84238) y el gen 28S ARNr (GenBank N° X00525). Esta prueba está diseñada para la cuantificación del ADN de *N. caninum* en muestras biológicas.

Fundamentos y consideraciones

La detección del producto de PCR que se va sintetizando en el curso de la reacción es cuantificada mediante el uso de sistemas de marcado con fluorescencia. La cantidad de fluorescencia emitida procedente del producto que se está sintetizando durante la reacción de PCR incrementa con cada ciclo de amplificación y esta reacción es captada a medida que transcurre la reacción, por ello se denomina reacción en tiempo real. La cuantificación se realiza durante la fase exponencial de amplificación, es decir, cuando la cantidad de fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad del ADN molde inicial presente en la muestra. Cuando hay suficiente producto de doble cadena sintetizado, se incrementa la fluorescencia y ese punto es lo que se define como ciclo umbral o Ct (*Cycle threshold*). Cuando una muestra supera este umbral, es considerada positiva.

A partir de una curva estándar con cantidades conocidas de ADN de parásitos se puede cuantificar una muestra problema. El número de parásitos y los miligramos de ADN del hospedador en las muestras son calculados por interpolación en la curva estándar correspondiente, donde los valores de Ct son representados frente al logaritmo de una concentración conocida de un estándar para ADN de *N. caninum* o del hospedador.

Es aconsejable realizar la cuantificación del ADN del hospedador con el fin de poder comparar la carga parasitaria en diferentes muestras, órganos, hospedadores y evaluar la presencia de potenciales inhibidores de la PCR en las muestras. También es recomendable evaluar las curvas de disociación de los productos amplificados, con el fin de corroborar la presencia de un único producto de PCR a la temperatura de melting indicada en aquellas muestras que contienen DNA de *N. caninum*.

Materiales

Reactivos:

- FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche, N° código: FSUSGMMRO)

- Primers:

Nombre	Secuencia
28S Forward	5'-TGC CAT GGT AAT CCT GCT CA-3'
28S Reverse	5'- CCT CAG CCA AGC ACA TAC ACC-3'
NC5 Forward	5'-ACT GGA GGC ACG CTG AAC AC-3'
NC5 Reverse	5'-AAC AAT GCT TCG CAA GAG GAA-3'

Preparación de la mezcla para la reacción de PCR

Detalle de las cantidades usada para una reacción con un volumen final de **50 µL**:

REACTIVO	Concentración inicial	Concentración final	Volúmenes de reactivos (µL)/1 reacción	
Agua	-	-	19	
FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)	2x	1x	25	
Primers	Primer Forward*	30 µM	300 nM	0,5
	Primer Reverse*	30 µM	300 nM	0,5
ADN	-	hasta 250 ng totales	5	

* Se debe preparar una mix por cada par de *primers*: una mix para amplificar *N. caninum* (NC5) y otra mix para amplificar el ADN del hospedador (28S).

Interpretación y expresión de resultados

Con relación a la especificidad de la técnica, en las curvas de disociación se debe detectar un único producto (pico) en las muestras con ADN del parásito. En caso que se

detecte más de un producto en la curva de disociación se recomienda verificar el tamaño de los productos amplificados por electroforesis. El tamaño esperado del producto de amplificación para *N. caninum* es de 76 pb. El número de taquizoítos y la cantidad de ADN genómico del tejido presente en la muestra se calculan interpolando en la correspondiente curva estándar. El resultado final se expresa como el número de taquizoítos por miligramo de ADN de tejido del hospedador.

Comentarios relevantes

El empleo de la qPCR para detectar y cuantificar la carga parasitaria tiene varias ventajas sobre la PCR convencional, ya que tanto la amplificación del producto, como su detección y cuantificación tienen lugar en el mismo tubo, evitando así la manipulación tras la reacción y reduciendo el riesgo de contaminación. Además, el uso del detector SYBR Green no requiere el empleo de sondas de hibridación específicas.

11. Bibliografía

- Baszler, TV, Knowles, DP, Dubey, JP, Gay, JM, Mathison, BA, McElwain, TF. 1996. Serological diagnosis of bovine neosporosis by *Neospora caninum* monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol. 34:1423-1428. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.6.1423-1428.1996>
- Campero LM. 2014. PNT N°2. Asunto: Diagnóstico serológico para neosporosis, Técnica: Immunoblot. LAINPA-FCV-UNLP.
- Campero LM, Minke L, Moré G, Rambeaud M, Bacigalupe D, Moore DP, Hecker Y, Campero CM, Schares G, Venturini MC. 2015. Evaluation and comparison of serological methods for the detection of bovine neosporosis in Argentina. Rev Argent Microbiol. 47:295-301. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.07.002>
- Campero LM, Moreno-Gonzalo J, Venturini MC, More G, Dellarupe A, Rambeaud M, Echaide IE, Valentini B, Campero CM, Moore DP, Cano DB, Fort M, Mota RA, Serrano-Martinez ME, Cruz-Vazquez C, Ortega-Mora LM, Alvarez-Garcia G. 2018. An Ibero-American inter-laboratory trial to evaluate serological tests for the detection of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle. Trop Anim Health Prod. 50:75-84. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1401-x>
- Collantes-Fernández E, Zaballos A, Álvarez-García G and Ortega-Mora LM. 2002. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. J Clin Microbiol. 40:1194-1198. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.4.1194-1198.2002>
- Dellarupe A. 2014. PNT N°4. Asunto: Diagnóstico serológico para neosporosis, Técnica: Inmunofluorescencia indirecta. LAINPA-FCV-UNLP.
- 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, Hemphill A, Calero-Bernal R, Schares G. 2017. Neosporosis in Animals. Boca Raton, CRC Press.
- Echaide, IE, Valentini, BS, Torioni de Echaide, S. 2002. Neosporosis bovina: análisis seroepidemiológico de un hato lechero mediante IFA y ELISA. In: Mem. XIV Reunión Científica Técnica de la AAVLD. 13.15/11/2002. Villa General Belgrano, Córdoba, Argentina. Sección Par-01.
- Jacobson, RH. 1998. Validation of serological assays for diagnosis infectious diseases. Rev.Sci.Tech.Off.Int. Epiz. 17:469-486. <https://doi.org/10.20506/rst.17.2.1119>
- Novoa, MB, Valentini, BS, Sarli, M, Torioni de Echaide, S, Primo, ME, Echaide, IE. 2020. Evaluation of a competitive inhibition ELISA based on the recombinant protein tSAG1 to detect anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle. J Vet Diagn Invest. 32:401-408. <https://doi.org/10.1177/1040638720916711>
- Paré J, Hietala SK, Thurmond MC. 1995. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. J Vet Diag Investigation. 7: 273-275. <https://doi.org/10.1177/104063879500700222>
- Regidor-Cerrillo, J, Arranz-Solís, D, Benavides, J, Gómez-Bautista, M, Castro-Hermida, JA, Mezo, M, Pérez, V, Ortega-Mora, LM, González-Warleta, M. 2014. *Neospora caninum* infection during early pregnancy in cattle: how the isolate influences

infection dynamics, clinical outcome and peripheral and local immune responses. Vet Res. 45, 10. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-10>

- Schares, G, Peters, M, Wurm, R, Bärwald, A, Conraths, FJ. 1998 The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. Vet Parasitol. 80: 87-98. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(98\)00195-2](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(98)00195-2)