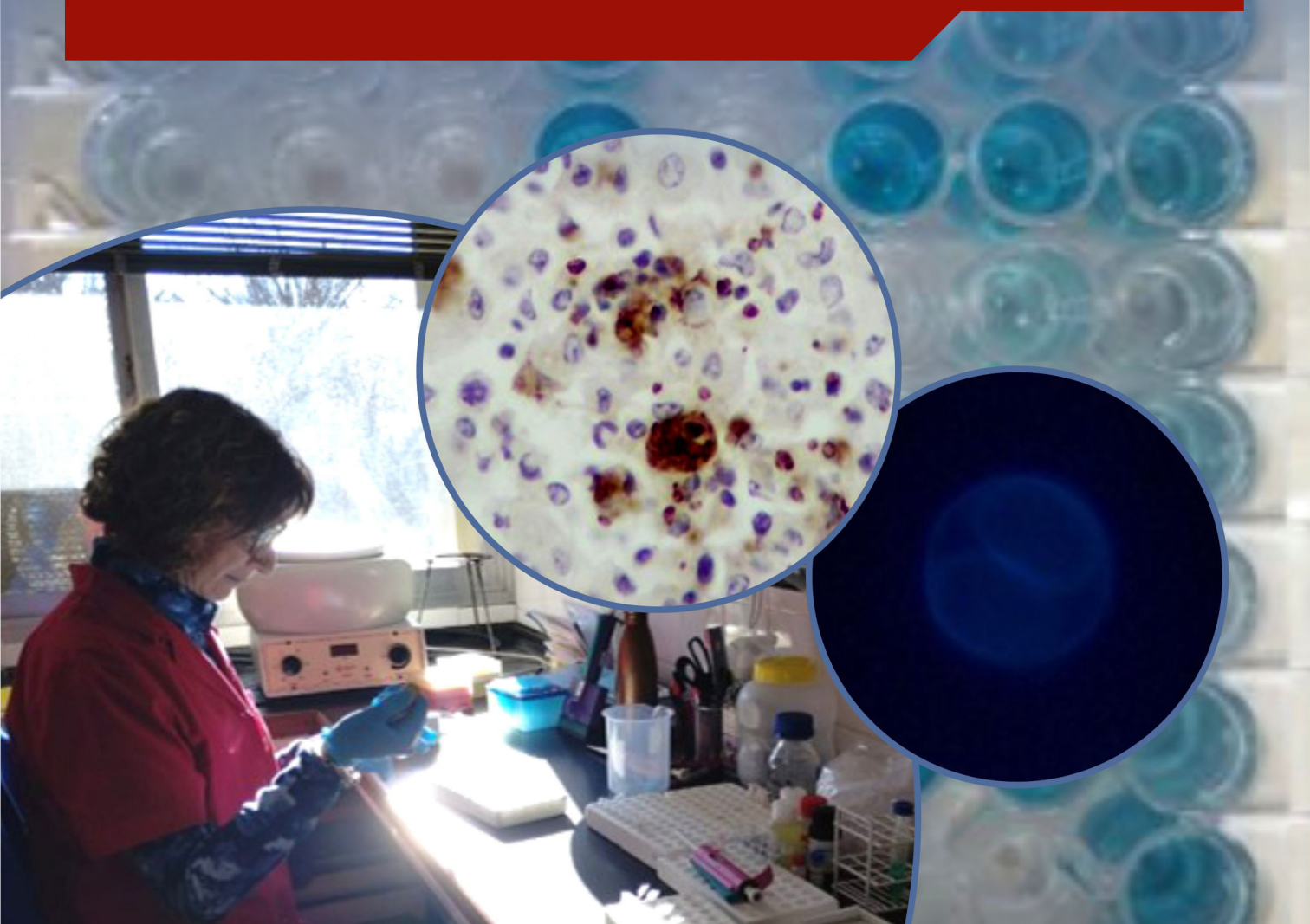


SANIDAD ANIMAL

Jornada nacional de protozoos apicomplejos 2025

Fernando Paolicchi, Lucía María Campero, Dadin Moore



Instituto Nacional de
Tecnología Agropecuaria
Argentina

Estación Experimental
Agropecuaria
Balcarce

CONICET



I P A D S



UNIVERSIDAD NACIONAL
de MAR DEL PLATA
FACULTAD de CIENCIAS AGRARIAS

INTA
Ediciones



SANIDAD ANIMAL

Jornada nacional de protozoos apicomplejos 2025

Fernando Paolicchi, Lucía María Campero, Dadin Moore



Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
Argentina

Estación Experimental Agropecuaria
Balcarce



UNIVERSIDAD NACIONAL
de MAR DEL PLATA
FACULTAD de CIENCIAS AGRARIAS

I P A D S

Índice

p. 01 > Prólogo

A) Caracterización epidemiológica de los protozoos Apicomplejos

p. 03 > Registros de infecciones por protozoos Apicomplejos en el Servicio Veterinario INTA, Argentina.

G. Cantón

p. 10 > Avances en el conocimiento de la sarcocistiosis de los camélidos sudamericanos.

M. Florin-Christensen, S. Giuliano, X. Barriga Marcapura, J. Reategui Ordoñez, L. Schnittger.

p. 17 > Evolución, taxonomía clásica y filogenia molecular de los Piroplasmida: ¡Ver o no ver, esa es la cuestión!

L. Schnittger, M. Florin-Christensen, S. Ganzinelli

p. 27 > ¿Qué sabemos sobre las especies de *Eimeria* aviaries en Argentina y en el mundo?

A. Rodríguez, M. Pisón-Martínez, L. Romero, J. Britez, M. Tomazic.

B) Diagnóstico de los protozoos Apicomplejos

p. 36 > Evolución de los métodos de diagnóstico para toxoplasmosis y neosporosis en animales. Su realidad en Argentina.

M. Venturini, L. Pardini, M. Rambeaud, L. Campero, A. Dellarupe, M. Gos, J. Unzaga.

p. 41 > ELISAs de competición para la detección de anticuerpos contra *Neospora caninum*.

B. Valentini, M. Novoa, S. Torioni de Echaide, I. Echaide, M. Primo.

p. 46 > El papel de RAD51 y su inhibición farmacológica en la replicación y diferenciación de *Toxoplasma gondii*.

A. Saldarriaga Cartagena, A. Arias, C. Cristaldi, A. Ganuza, M. González, M. Corvi, W. Sullivan, Jr., L. Vanagas, S. Angel.

p. 50 > Desarrollo de un nuevo kit de diagnóstico rápido para los hemoparásitos causantes de la Tristeza Bovina basado en LAMP.

M. Farber.

C) Vacunas, tecnologías avanzadas y control de los protozoos Apicomplejos

- p. 51 > Vacuna experimental tipo DIVA para la neosporosis bovina.**
L. Mendoza-Morales, F. Fiorani, K. Morán, Y. Hecker, E. Sánchez-López, V. Ramos Duarte, M. Corigliano, M. Bilbao, M. Clemente, D. Moore, V. Sander.
- p. 56 > Desarrollo y evaluación de herramientas que contribuyan a la prevención de la toxoplasmosis en ovinos.**
L. Campero, I. Gual, V. Sander, L. Mendoza Morales, V. Ramos Duarte, P. Formigo, E. Sosa, F. Lázaro, M. Scioli, A. Atela, A. Legarralde, F. Hozbor, G. Cantón, S. Angel, D. Moore, M. Clemente.
- p. 62 > Herramientas moleculares para contribuir al control de la babesiosis bovina.**
S. Wilkosvky.
- p. 63 > Control de neosporosis bovina y rol del perro en la enfermedad.**
M. McAllister, D. Moore.
- p. 67 > Análisis estructurales de proteínas basados en IA y su aplicación para el desarrollo de nuevas vacunas contra parásitos apicompleja.**
C. Suárez.
- p. 72 > Vacunas frente al fallo reproductivo de origen protozoario en rumiantes. Evolución de los métodos de diagnóstico para neosporosis y toxoplasmosis en animales. Su realidad en Argentina**
Luis Mora Ortega-Mora, G. Alvarez-García, E. Collantes-Fernández, I. Ferre-Pérez, J. Regidor-Cerrillo.
- p. 73 > Tratamiento y control de criptosporidiosis en terneros.**
Calderón, G. A.

Prólogo

Los protozoos apicomplejos constituyen un grupo diverso de parásitos intracelulares obligados que han adquirido un notable protagonismo en la salud animal debido a su capacidad de afectar tanto a especies domésticas de producción como a poblaciones de animales silvestres. Su complejo ciclo de vida, caracterizado por fases sexuales y asexuales que transcurren en diferentes hospedadores, les confiere una notable plasticidad biológica, evolutiva y adaptativa.

En el ámbito de la producción animal, agentes apicomplejos como *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis* spp, *Eimeria* spp., *Babesia* spp. y *Cryptosporidium* spp. generan importantes pérdidas económicas por mortalidad, disminución de la productividad y costos asociados a medidas de control y prevención. Esta problemática adquiere especial relevancia en Argentina, país que cuenta con uno de los stocks ganaderos más grandes del mundo y una producción avícola en constante expansión. Tanto el ganado bovino, base de la economía agropecuaria nacional, como las aves de corral, pilares de la seguridad alimentaria, son susceptibles a infecciones por apicomplejos que comprometen la eficiencia productiva, el bienestar animal y la calidad sanitaria de los alimentos.

Asimismo, en la fauna silvestre estos protozoos no solo impactan en la conservación de especies amenazadas, sino que también actúan como reservorios y amplificadores, contribuyendo a la complejidad epidemiológica de su transmisión. La relevancia de estos parásitos trasciende el campo veterinario, ya que varios de ellos son considerados zoonóticos y representan un riesgo para la salud pública.

En este contexto, el concepto de **Una Salud** adquiere centralidad al reconocer la interdependencia entre la salud humana, animal y ambiental. El **bienestar animal**, a su vez, se convierte en un componente esencial, no solo desde una perspectiva ética, sino también como factor determinante en la resistencia a enfermedades y en la sostenibilidad de los sistemas productivos agroganaderos. Por último, el **cambio climático** emerge como una variable crítica, capaz de modificar la distribución geográfica de los hospedadores y vectores, alterar la epidemiología de los apicomplejos y generar nuevos desafíos para su diagnóstico y control.

Este texto busca ofrecer una aproximación al conocimiento actual de los apicomplejos que afectan a los animales de producción y silvestres, resaltando su importancia biológica, epidemiológica y sanitaria. Asimismo, pretende motivar la reflexión sobre la necesidad de desarrollar estrategias de vigilancia epidemiológica, diagnóstico y control que integren ciencia básica y aplicada, en un marco que contemple la sostenibilidad, el bienestar animal y los principios de **Una Salud**, contribuyendo así a mitigar el impacto de estas infecciones en la salud animal, la biodiversidad y la producción agropecuaria.

Este material reúne las disertaciones de científicos expertos que brindaron sus conferencias en el marco de las "**Jornadas Nacionales de Protozoos Apicomplejos**", realizadas los días **12 y 13**

de junio de 2025 en el **Edificio Américo Mendiburu** de la **EEA INTA Balcarce**, con la participación del **Instituto de Innovación para la Producción Agropecuaria y el Desarrollo Sostenible** (IPADS, INTA-CONICET) y la **Facultad de Ciencias Agrarias** de la Universidad Nacional de Mar del Plata (FCA, UNMDP), con el propósito de difundir y actualizar el conocimiento sobre estos parásitos de gran impacto sanitario, productivo y ambiental.

Fernando Paolicchi
Coordinador
Programa Nacional de Salud Animal, INTA
Profesor FCA UNMDP

Lucia María Campero
Investigadora CONICET IPADS

Dadin Moore
Investigador CONICET IPADS
Profesor FCA UNMDP



Caracterización epidemiológica de los protozoos Apicomplejos

Infecciones por protozoos Apicomplejos en rumiantes según los registros del SDVE de INTA Balcarce

Germán Cantón.

Instituto de Innovación para la Producción Agropecuaria y el Desarrollo Sostenible (IPADS, INTA Balcarce-CONICET), Balcarce, Argentina.
canton.german@inta.gob.ar

Los sistemas de producción de rumiantes en Sudamérica han experimentado fluctuaciones en los últimos años, especialmente en lo que respecta al *stock* ganadero (FAO, 2023). Aunque la población bovina ha crecido en la región, en Argentina se ha mantenido relativamente estable. En contraste, el *stock* ovino ha disminuido tanto a nivel regional como nacional (FAO, 2023) (Figura 1).

Estas producciones poseen una relevancia socioeconómica significativa en Argentina, donde se registran aproximadamente 50 millones de cabezas de ganado bovino, 14 millones de ovinos y 4 millones de caprinos (SENASA, 2025). El consumo anual *per capita* de carne bovina ronda los 50 kg, y en 2020 las exportaciones de carne generaron ingresos superiores a USD 2.718 millones (Bolsa de Comercio de Rosario, 2021).

En cuanto a la industria láctea, Argentina produce más de 11 mil millones de litros de leche líquida por año, con un consumo per cápita cercano a 185 litros anuales. Además, las exportaciones de productos lácteos superan los USD 1.400 millones (OCLA, 2025). Geográficamente, el 45 % del rodeo bovino nacional y el 91 % del ganado lechero se concentran en la ecorregión de la Pampa Húmeda (SENASA, 2021).

Uno de los principales desafíos para los sistemas de producción bovina, tanto de carne como de leche, es mejorar la eficiencia reproductiva. Históricamente, las tasas nacionales de destete se han mantenido cercanas al 65 %, un valor similar al promedio regional, pero inferior al de otras áreas del mundo (USDA, 2019). En un mercado cada vez más competitivo, será necesario optimizar estos indicadores para satisfacer a consumidores que demandan menores huellas ambientales y mayor bienestar animal.

La producción ovina, por su parte, se concentra en la región Patagónica, y en menor proporción en la región Pampeana, Mesopotamia y el noroeste argentino (SENASA, 2022).

El 45 % y el 91 % del *stock* de bovinos para carne y leche, respectivamente, se concentran en la Pampa Húmeda. Si bien el objetivo principal de estos sistemas es maximizar la producción de carne y leche, las pérdidas reproductivas representan un desafío relevante en un contexto de creciente demanda internacional por sistemas sustentables, que incluyen indicadores ambientales y de bienestar animal. Las características de los sistemas extensivos dificultan la identificación de las causas de estas mermas, que suelen permanecer subdiagnosticadas (Cantón *et al.*, 2022a, 2022b; Dorsch *et al.*, 2022).

Entre las etiologías asociadas a fallas reproductivas, los protozoos Apicomplejos son frecuentemente implicados, según la casuística del Servicio de Diagnóstico Veterinario Especializado del INTA Balcarce en la Región Central de Argentina, tanto en bovinos (Campero *et al.*, 2003; Cantón *et al.*, 2022b; Morrell *et al.*, 2019) (Tabla 1, Figura 2), pequeños rumiantes (Della Rosa *et al.*, 2021) y cérvidos (Soler *et al.*, 2021, 2022).

Neospora caninum se reconoce actualmente como una de las principales causas de abortos y mortalidad perinatal en bovinos de carne y leche, confirmándose en el 13,5 % de los fetos analizados, con mayor frecuencia en rodeos lecheros (27,3 %) que en rodeos de carne (10,6 %) ($p < 0,01$).

(Pachiani *et al.*, 2024). Además, se detectó infección en el 27,9 % del total de los fetos, con prevalencias superiores en rodeos lecheros (41,6 %) frente a los de carne (25,2 %) ($p < 0,01$). El riesgo de aborto en fetos infectados por *N. caninum* fue del 48,4 %, siendo mayor en rodeos lecheros (65,8 %) que en los de carne (42,2 %) ($p < 0,01$) (Pachiani *et al.*, 2024). Aunque la incidencia de neosporosis es más alta en rodeos lecheros, se observa una tendencia creciente en sistemas de carne ($p < 0,05$), posiblemente asociada a una mayor intensificación del manejo (Cantón *et al.*, 2022b) (Figura 3).

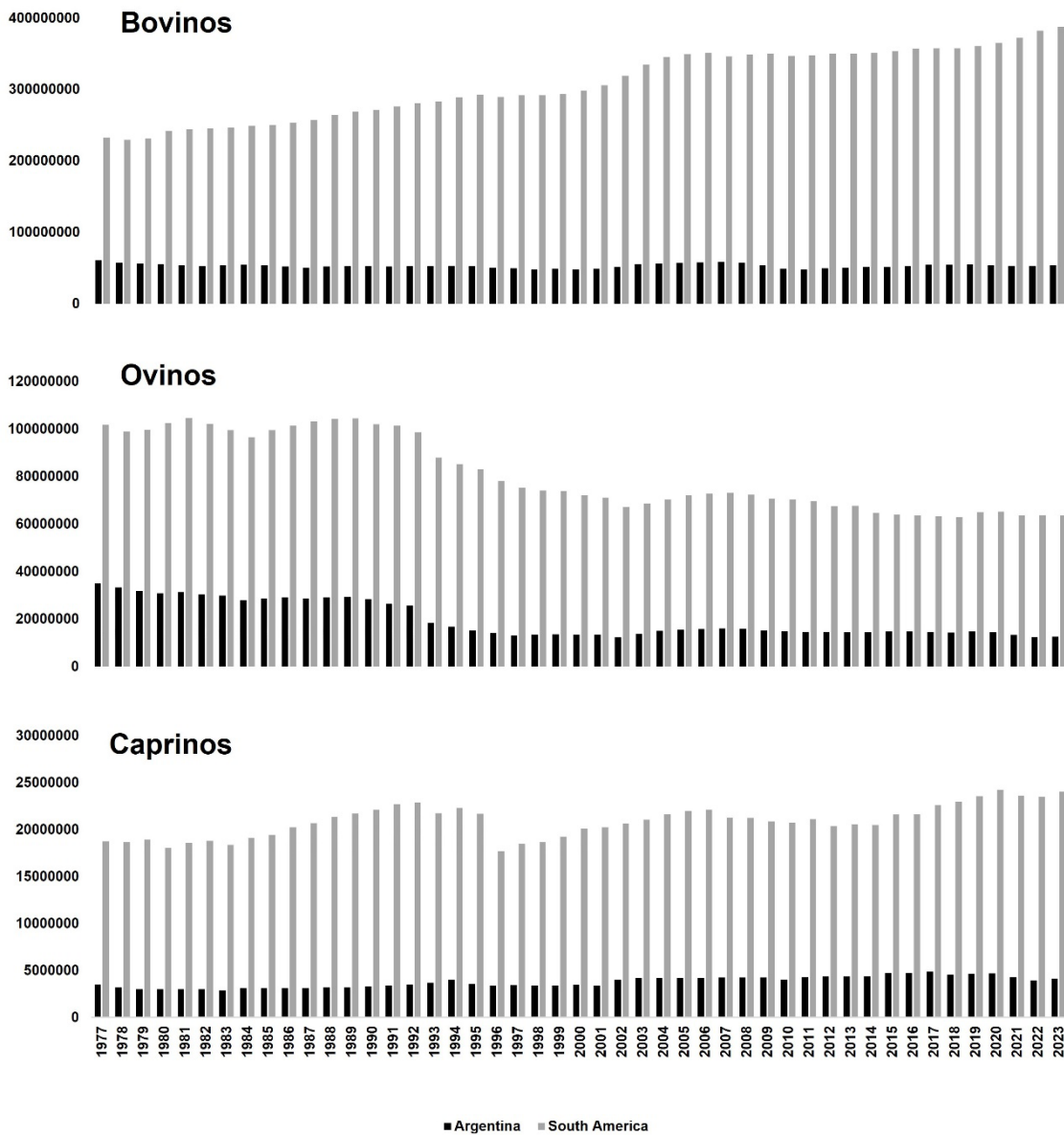


Figura 1. Stock de rumiantes domésticos en Sudamérica y Argentina, en los últimos años (FAO, 2023).

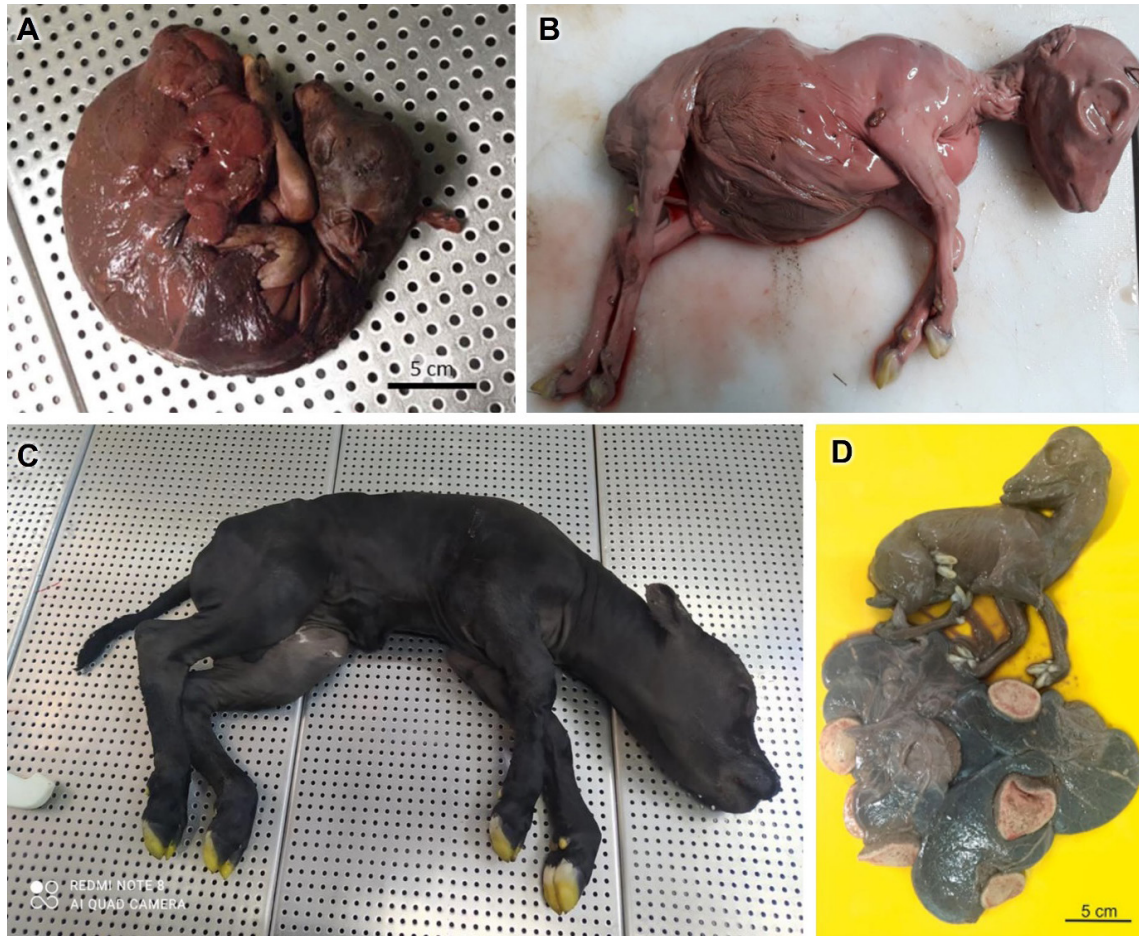


Figura 2. Fetos de rumiantes domésticos abortados por parásitos apicomplejos. (A) Feto ovino momificado y placenta, abortado por *T. gondii* en una majada para carne, de la provincia de Buenos Aires (reproducido de Gual *et al.*, 2018). (B). Feto ovino parcialmente momificado, abortado por *N. caninum* en una majada para carne, de la provincia de Buenos Aires (reproducido de Hecker *et al.* 2019). (C) Feto bovino abortado por *N. caninum* en un rodeo para carne de la provincia de Buenos Aires (Servicio de Diagnóstico Veterinario Especializado, INTA Balcarce). (D) Feto caprino momificado, y placenta, abortado por *N. caninum* en una granja comercial de la provincia de Buenos Aires (reproducido de Soler *et al.*, 2022).

Tabla 1. Principales etiologías diagnosticadas como causal de abortos bovinos en el Servicio de Diagnóstico Veterinario Especializado del INTA Balcarce (reproducido de Cantón *et al.*, 2022b).

Causes	Beef (%)	Dairy (%)	OR (95% IC)	Total (%)
Determined	397 (41.8)	84 (39.2)		481 (41.4)
Infectious agents	327 (34.5)	74 (34.6)		401 (34.5)
Bacterial	221 (23.3)	30 (14.0)		251 (21.6)
<i>Campylobacter fetus</i>	99 (10.4) ^a	5 (2.3) ^b	4.8 (1.9–12.1)	104 (8.9)
<i>Leptospira</i> spp.	46 (4.8) ^a	12 (5.6) ^a	0.8 (0.4–1.6)	58 (5.0)
<i>Brucella abortus</i>	55 (5.8) ^a	2 (0.9) ^b	6.5 (1.5–26.9)	57 (4.9)
Other	21 (2.2)	11 (5.1)		32 (2.8)
Viral	27 (2.8)	6 (2.8)		33 (2.8)
BVDV	22 (2.3) ^a	5 (2.3) ^a	0.9 (0.3–2.6)	27 (2.3)
BHV	5 (0.5)	1 (0.5)		6 (0.5)
Fungal	4 (0.4)	-		4 (0.3)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	3 (0.3)	-		3 (0.2)
<i>Penicillium</i> spp.	1 (0.1)	-		1 (0.08)
Protozoal	71 (7.5)	37 (17.3)		108 (9.3)
<i>Neospora caninum</i>	66 (7.0) ^a	37 (17.3) ^a	0.3 (0.2–0.5)	103 (8.9)
<i>Trichostrongylus axei</i>	5 (0.5)	-		5 (0.4)
Multiple agents	4 (0.4)	1 (0.5)		5 (0.4)
<i>C. fetus</i> + <i>N. caninum</i>	1 (0.1)	-		1 (0.08)
<i>C. fetus</i> + BHV	1 (0.1)	-		1 (0.08)
<i>Leptospira</i> spp. + <i>Salmonella</i> spp.	-	1 (0.5)		1 (0.08)
<i>N. caninum</i> + <i>T. foetus</i>	2 (0.2)	-		2 (0.2)
Non-infectious agents	70 (7.3)	10 (4.7)		80 (6.8)
Congenital defect	21 (2.2)	4 (1.9)		25 (2.1)
Dystocia	38 (4.0)	4 (1.9)		42 (3.6)
Mummifications	3 (0.3)	1 (0.5)		4 (0.3)
<i>Sorghum</i> spp.	7 (7.3)	-		7 (0.6)
<i>Stenocarpella maydis</i>	1 (0.1)	-		1 (0.08)
Twin	-	1 (0.5)		1 (0.08)
Undetermined	552 (58.2)	130 (60.7)		682 (58.6)
With histological lesions	375 (39.5)	87 (40.6)		462 (39.7)
No histological lesions	177 (18.7)	43 (20.1)		220 (18.9)
Total	949 (81.6)	214 (18.4)		1163 (100.00)

^{a,b}Different superscript letters indicate statistical significance difference between beef and dairy systems

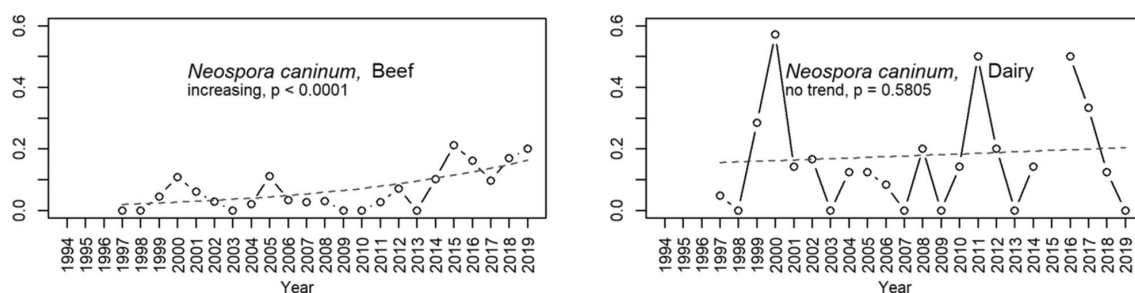


Figura 3. Tendencia temporal de abortos por *Neospora caninum* en bovinos para carne y leche, de la región central de Argentina (reproducido de Cantón et al., 2022b).

Si bien se ha documentado la presencia de *Toxoplasma gondii* (Moré et al., 2008) y *Sarcocystis* spp. (Gjerde 2016, Moré et al., 2008, 2009) en bovinos de la región central de Argentina, no existen confirmaciones de pérdidas reproductivas asociadas a estos agentes.

En pequeños rumiantes, *T. gondii* constituye una causa frecuente de abortos y mortalidad perinatal a nivel mundial y también ha sido detectada en sistemas de carne y tambos en esta región (Apóstolo et al., 2025; Della Rosa et al., 2022; Gual et al., 2018; Urtizbiria et al., 2022). Asimismo, *N. caninum* se ha identificado como causa de abortos y mortalidad perinatal ovina en la región (Della Rosa et al., 2022; Hecker et al., 2019). Aunque hay evidencia de infecciones por *Sarcocystis* spp. en ovinos y caprinos (Hecker et al., 2018, Steffen et al., 2025), hasta el momento no se han confirmado mermas reproductivas vinculadas a esta infección. Recientemente, se confirmó que *N. caninum* causó un brote de abortos en ciervos colorados (*Cervus elaphus*) en un establecimiento de la provincia de Buenos Aires (Soler et al., 2022).

Si bien hay altas seroprevalencias de *N. caninum*, *T. gondii* and *Sarcocystis* spp., en la población de búfalos de agua del noroeste argentino (Campero et al., 2007; Konrad et al., 2013; Moore et al., 2014), no se han detectado a la fecha pérdidas reproductivas asociadas a infecciones por apicomplejos en esta especie.

Si bien se han constatado abortos por *N. caninum* y *T. gondii* en rumiantes de la región central, su impacto en la salud animal, la salud pública y la economía del sector ganadero probablemente esté subestimado. Esto se debe a limitaciones en la identificación de las causas de aborto, dificultades para obtener muestras de calidad, falta de acceso a laboratorios en áreas remotas y restricciones financieras que limitan la implementación de programas de vigilancia de estas enfermedades.

El diagnóstico de las pérdidas reproductivas en animales de producción bajo sistemas extensivos presenta una alta complejidad. Históricamente, la mayoría de los estudios se ha enfocado en causas infecciosas o parasitarias. Sin embargo, el diagnóstico diferencial debería considerar también etiologías no infecciosas, así como factores asociados al manejo y condiciones ambientales. La incorporación de estos aspectos permitiría implementar estrategias de manejo orientadas a mejorar la eficiencia reproductiva de los sistemas ganaderos de Argentina.

Referencias

- Apóstolo R, Miselli E, Scioli MV, Moore DP, García JA, Campero L, Cantón G. 2025. Brote de aborto ovino asociado a infección con *Toxoplasma gondii* en una majada de producción semiintensiva de carne en Chubut. Congreso Argentino de Producción Animal. Catamarca, Argentina.
- Bolsa de Comercio de Rosario. 2021. <https://www.bcr.com.ar/es/mercados/investigacion-y-desarrollo/informativo-semanal/noticias-informativo-semanal/exportacion-1> (Acceso: 11 Junio 2025).

- Campero CM, Moore DP, Odeón AC, Cipolla AL, Odriozola E. 2003. Aetiology of bovine abortion in Argentina. *Veterinary Research Communications* 27(5):359-69. <https://doi.org/10.1023/a:1024754003432>
- Campero C, Pérez A, Moore DP, Crudeli G, Benitez D, Draghi MG, Cano D, Konrad J, Odeón A. 2007. Occurrence of antibodies against *Neospora caninum* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) on four ranches in Corrientes province, Argentina. *Veterinary Parasitology* 150(1-2):155-8. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.09.002>
- Cantón G, Louge Uriarte E, Moore DP. 2022a. Editorial: Diseases Affecting Reproduction and the Neonatal Period in Ruminants Volume II. *Front. Vet. Sci. Sec. Veterinary Infectious Diseases*. <http://dx.doi.org/10.3389/fvets.2022.1025209>
- Cantón G, Moreno F, Fiorentino A, Monterrubianessi G, Hecker Y, Spetter M, Fiorani F, García J, González Altamiranda E, Cirone K, Louge Uriarte L, Verna A, Malena R, Morsella M, Paolicchi F, Morrell E, Moore P. 2022b. Spatial-temporal trends and economic losses associated with bovine abortifacients in central Argentina. *Tropical Animal Health and Production* 54(4):242. <http://dx.doi.org/10.1007/s11250-022-03237-0>
- Della Rosa P, Fiorentino MA, Morrell E, Scioli V, Paolicchi F, Moore P, Cantón G, Hecker Y. 2021. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* as causes of reproductive losses in commercial sheep flocks from Argentina. *Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases*, 100057. <https://doi.org/10.1016/j.crvbd.2021.100057>
- Dorsch M, Cantón G, Driemeier D, Anderson M, Moeller R, Giannitti F. 2021. Bacterial, protozoal and viral abortions in sheep and goats in South America: a review. *Small Ruminant Research* 205, 106547. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2021.106547>
- Gjerde B. 2016. Molecular characterisation of *Sarcocystis bovifelis*, *Sarcocystis bovini* n. sp., *Sarcocystis hirsuta* and *Sarcocystis cruzi* from cattle (*Bos taurus*) and *Sarcocystis sinensis* from water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Parasitology Research* 115(4):1473-92. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4881-5>
- Gual I, Giannitti F, Hecker Y, Shivers J, Morrell E, Pardini L, Fiorentino M, Rodríguez Fermepin M, Unzaga J, Cantón G, Venturini C, Moore P. 2018. First case report of *Toxoplasma gondii*-induced abortions and stillbirths in sheep in Argentina. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 12, 39-42. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.01.001>
- Hecker Y, Mogaburu Masson F, Armendano J, Cora J, Flores Olivares C, Gual I, Pardini L, Moore DP, Moré G, Cantón G. 2018. Evaluation of frequency of antibodies against *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp. and transmission routes in sheep from Humid Pampa, Argentina. *Acta Parasitologica* 63; 2:416-421. <https://doi.org/10.1515/ap-2018-0048>
- Hecker Y, Morrell E, Fiorentino A, Gual I, Rivera E, Fiorani F, Dorsch M, Gos L, Pardini L, Scioli V, Magariños S, Paolicchi F, Cantón G, Moore P. 2019. Ovine abortion by *Neospora caninum*: first case reported in Argentina. *Acta Parasitologica* 64, 950-955. <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00106-z>
- Konrad J, Campero L, Caspe G, Brihuega B, Draghi G, Moore DP, Crudeli G, Venturini MC, Campero C. 2013. Detection of antibodies against *Brucella abortus*, *Leptospira* spp., and Apicomplexa protozoa in water buffaloes in the Northeast of Argentina. *Tropical Animal Health and Production* 45(8):1751-6. <https://doi.org/10.1007/s11250-013-0427-y>
- Moore DP, Konrad J, San Martino S, Reichel M, Cano D, Méndez S, Späth E, Odeón A, Crudeli G, Campero C. 2014. *Neospora caninum* serostatus is affected by age and species variables in cohabiting water buffaloes and beef cattle. *Veterinary Parasitology* 203(3-4), 259-263. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.04.011>
- Moré G, Bacigalupe D, Basso W, Rambeaud M, Beltrame F, Ramirez B, Venturini MC, Venturini L. 2009. Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* in dairy cattle. *Veterinary Parasitology* 160 (1-2), 51-54. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.081>
- Moré G, Basso W, Bacigalupe D, Venturini MC, Venturini L. 2008. Diagnosis of *Sarcocystis cruzi*, *Neospora caninum*, and *Toxoplasma gondii* infections in cattle. *Parasitology Research*. 102(4):671-5. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0810-6>
- Morrell E, Moreira A, Cantón G, Odriozola E, Paolicchi F, Odeón A, Marín M, González Altamiranda E, Moore D, Campero C. 2019. Current trends in bovine abortion. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 39: 12-19. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5668>

- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), Argentina. 2025. <https://www.argentina.gob.ar/senasa/mercados-y-estadisticas/estadisticas/animal-estadisticas> Acceso: 11 Junio 2025.
- Observatorio de la Cadena Láctea Argentina (OCLA), 2025. <https://www.ocla.org.ar/> Acceded 11 Junio 2025.
- Pachiani M, Sosa E, Miqueo E, Campero L, Morrell E, Moore DP, Cantón G. 2024. *Neospora caninum* congenital transmission and abortion rates in dairy and beef cattle of central Argentina (1998-2024). VII International Meeting ApiCOWplexa in farm animals. La Plata, Argentina.
- Soler J, Dellarupe A, Moré G. 2021. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections and their relationship with reproductive losses in farmed red deer (*Cervus elaphus*). *Parásitology Research* 3, 1-10. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07104-z>
- Soler J, Moré G, Urtizbiría F, Hecker Y, Cirone K, Scioli V, Paolicchi F, Fiorentino A, Louge Uriarte E, Cantón G, Verna A, Morrell E, Moore P. 2022. Epidemic abortions due to *Neospora caninum* infection in farmed red deer (*Cervus elaphus*). *Parásitology Research*. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07488-6>
- Steffen K, Gos L, Helman E, Unzaga J, Arias R, Moré G. 2025. Identifying *Sarcocystis* spp. infection in goats: a combined morphological, serological, and molecular approach. *Parásitology Research* 124(6):71. <https://doi.org/10.1007/s00436-025-08519-8>
- Urtizbiria F, Pardini L, Morrell E, Bernstein M, Dellarupe A, Fiorentino A, Aranciaga C, Moore P, Cantón G, Grasa O, Hecker Y. 2022. *Toxoplasma gondii*-abortion outbreak in dairy sheep from Argentina. *Apicowplexa* 2022. Berna, Suiza.

A

Caracterización epidemiológica de los protozoos Apicomplejos

Sarcocistiosis en camélidos sudamericanos: una visión integral

Monica Florin-Christensen^{1,2,*}, Susana Giuliano³, Ximena Barriga Marcapura⁴, Juan Reategui Ordoñez⁴, Leonhard Schnittger^{1,2}

¹Instituto de Patobiología Veterinaria (IP-IPVET), Centro de Investigaciones Veterinarias y Agronómicas (CICVyA), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), (1686) Hurlingham, Argentina

²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), (C1425FQB) Buenos Aires, Argentina

³Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, (C1427CWN) Buenos Aires, Argentina

⁴Laboratorio de Biotecnología Animal, Vicerrectorado de Investigación, Universidad Católica Santa María, (04000) Arequipa, Perú *Correspondencia a: jacobsen.monica@inta.gob.ar

Resumen

La sarcocistiosis es una parasitosis ampliamente distribuida que afecta a los camélidos sudamericanos domésticos y silvestres, con alta prevalencia. Las especies *Sarcocystis aucheniae* y *Sarcocystis masoni* generan sarcoquistes macroscópicos en músculo esquelético y microscópicos en músculo cardíaco y esquelético, respectivamente. En general las infecciones son subclínicas, pero las producidas por *S. aucheniae* representan un obstáculo para la comercialización formal de carne, debido a que la detección de quistes macroscópicos lleva al decomiso de las reses, con implicancias económicas y sanitarias. La falta de herramientas diagnósticas en animales vivos dificulta su control. Recientes avances en biología molecular abren nuevas perspectivas para el desarrollo de pruebas diagnósticas, vacunas y estrategias de prevención.

La sarcocistiosis es una enfermedad parasitaria causada por protozoos del género *Sarcocystis*, ampliamente distribuido en el mundo y capaz de infectar una gran variedad de animales, incluidos mamíferos, aves y reptiles. *Sarcocystis* posee un ciclo de vida heteroxeno de tipo predador-presa, que requiere dos hospedadores: un hospedador definitivo (carnívoro) y uno intermediario (herbívoro u omnívoro). En el hospedador definitivo ocurren las etapas sexuales del parásito, mientras que en el hospedador intermediario se desarrollan los sarcoquistes, estructuras tisulares donde ocurre la multiplicación asexual. La infección comienza cuando el hospedador definitivo consume tejidos u órganos infectados con sarcoquistes. En su intestino, los bradizoítos liberados invaden células intestinales y dan origen a esporoquistes, que son eliminados con las heces. Estos esporoquistes contienen esporozoítos, la forma infectante para el hospedador intermediario, los cuales se infectan al ingerir agua o pastos contaminados. Los esporozoítos atraviesan la mucosa intestinal y alcanzan la circulación sanguínea, desde donde se diseminan a distintos órganos, en general fibras musculares. Allí se forman los sarcoquistes, cápsulas delimitadas por una pared membranosa que protege al parásito durante su desarrollo, y que pueden ser micro o macroscópicos según la especie (Decker-Franco *et al.*, 2018a).

En los camélidos sudamericanos (CS), se han identificado dos especies de *Sarcocystis*: *S. aucheniae* y *S. masoni*. La primera genera sarcoquistes macroscópicos, visibles a simple vista en el músculo esquelético, mientras que la segunda produce microquistes en músculo cardíaco y esquelético, los que son detectables solo mediante técnicas histológicas o moleculares (Wieser *et al.*, 2024a).

El primer reporte de sarcoquistes macroscópicos en CS data de 1913, en una llama en Australia (Brumpt, 1913). Con el tiempo, estudios morfológicos y moleculares confirmaron que *S. aucheniae* es responsable de estos macroquistes en llamas, alpacas, guanacos y vicuñas (Carletti *et al.*, 2013; More *et al.*, 2016; Regensburger *et al.*, 2015; Wieser *et al.*, 2024b). En cuanto a *S. masoni*, previamente conocido como *S. lamacanis*, su identificación se consolidó recientemente a partir de

estudios de microscopía electrónica y análisis de ADN y fue descrito hasta el momento en llamas y alpacas (Moré *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2022).

Los sarcoquistes de *S. aucheniae* son globulares a alargados, pueden alcanzar varios milímetros de longitud y contener hasta 20 millones de bradizoítos, encerrados en compartimentos separados por tabiques internos (Carletti *et al.*, 2013). Su pared presenta proyecciones ramificadas, semejantes a coliflor, visibles por microscopía electrónica (Figura 1). En contraste, los sarcoquistes de *S. masoni* son fusiformes, miden cerca de $800 \times 95 \mu\text{m}$ y su pared muestra proyecciones digitiformes más simples (Moré *et al.*, 2016).

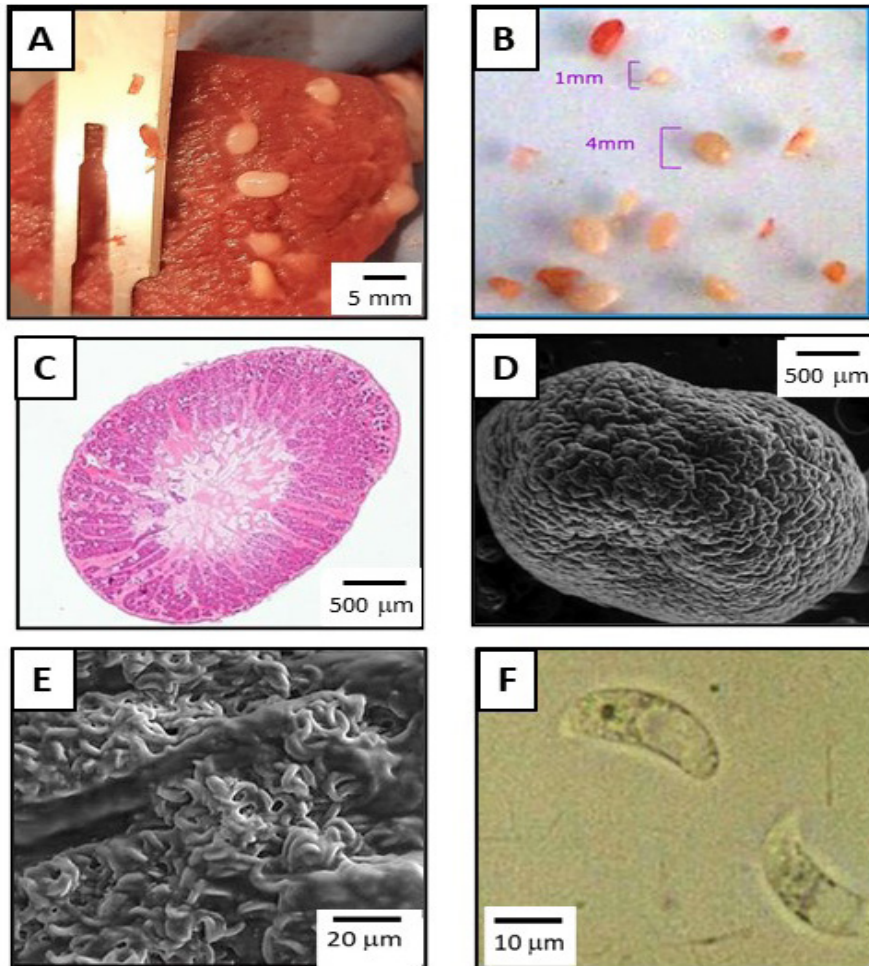


Figura 3. Sarcocistas y bradizoítos de *Sarcocystis aucheniae*. (A) Trozo de carne de llama con sarcocistas macroscópicos; (B) Sarcocistas de diferentes tamaños aislados de carne de llama; (C) Sección longitudinal de sarcociste teñido con hematoxilina-eosina, donde se observan compartimentos periféricos conteniendo bradizoítos; (D) Micrografía electrónica de barrido de sarcociste donde se observa el aspecto de cerebro de la pared; (E) Micrografía electrónica de barrido de bradizoítos contenidos en un sarcociste; (F) Bradizoítos observados con microscopio óptico (1000X). (Carletti *et al.*, 2013; Decker-Franco, 2018)

Tanto para *S. aucheniae* como para *S. masoni*, el perro doméstico (*Canis lupus familiaris*) fue corroborado como hospedador definitivo en experimentos de infecciones experimentales (Zacarias *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2022). Asimismo, recientemente, se comprobó en el caso de *S. aucheniae*, el rol del perro doméstico como hospedador definitivo en condiciones naturales (Vargas Tacuri *et al.*, 2024). Sin embargo, dada la larga data de la relación parásito-hospedador entre estos parásitos con los cánidos, es razonable asumir, que cánidos silvestres, como el zorro andino (*Lycalopex culpaeus*) o el zorro gris (*Lycalopex gymnocercus*), podrían ser también hospedadores definitivos de *S. aucheniae* y *S. masoni* (Wieser *et al.*, 2024a). Esta hipótesis no se ha testeado experimentalmente hasta el presente.

Aunque la mayoría de los casos de sarcocistiosis en CS son subclínicos, se han documentado unos pocos episodios clínicos severos, especialmente en alpacas. En Estados Unidos, una alpaca preñada presentó letargo, temblores musculares y dificultad respiratoria, y falleció poco después. La necropsia reveló abundantes macroquistes en los músculos esqueléticos y una miositis eosinofílica severa, probablemente asociada a la degeneración de sarcoquistes de *S. aucheniae* (LaPerle *et al.*, 1999). Otro caso en Australia involucró a una alpaca con abscesos subcutáneos y lesiones musculares extensas. Se observaron microquistes en músculo esquelético posiblemente de *S. masoni*, pero no se identificó la especie de *Sarcocystis* involucrada (Gabor *et al.*, 2010). Infecciones experimentales con altas cargas de esporoquistes de *S. masoni* han inducido sarcocistiosis aguda con anorexia, letargia, anemia y, en algunos casos, la muerte (Chavez *et al.*, 2008). Estos estudios indican que el parásito puede ser altamente patógeno bajo ciertas condiciones, aunque en la naturaleza las infecciones parecen mantenerse bajo un umbral clínico.

El diagnóstico de sarcocistiosis en CS representa un desafío. Actualmente, no existen pruebas comerciales ni validadas para animales vivos, por lo que la detección se realiza principalmente en faena. La inspección visual permite identificar los macroquistes de *S. aucheniae* en músculos intercostales, cervicales o maseteros, pero no es útil para detectar microquistes. Para estos últimos, pueden emplearse técnicas como digestión enzimática, análisis histopatológico, o microscopía electrónica, todas ellas reservadas para estudios científicos. La aplicación rutinaria en frigoríficos es inviable por su complejidad (Wieser *et al.*, 2024a).

En el ámbito molecular, se han desarrollado 2 protocolos de PCRs semianidadas específicas para *S. aucheniae*, basadas en el gen 18S rRNA, que permitieron detectar ADN parasitario en sangre de llamas vivas (Martin *et al.*, 2016; Decker-Franco *et al.*, 2018b). La segunda PCR desarrollada es 100 veces más sensible que la primera y tiene un formato dúplex, dado que se amplifica simultáneamente un fragmento de ADN mitocondrial del CS hospedador, lo que sirve como control interno. No se observó correlación entre la positividad a esta PCR y la presencia de sarcoquistes macroscópicos al momento del sacrificio (Decker-Franco *et al.*, 2018b). Consistente con esta observación, un estudio longitudinal donde se analizó con esta PCR la sangre de 38 alpacas a lo largo de 10 meses, mostró que, en los animales positivos, la parasitemia fue detectable sólo durante 1 o, a lo sumo, 2 meses, para luego volverse indetectable durante el resto del ensayo (Neyra *et al.*, 2025). Estos resultados hacen suponer que la parasitemia sería más baja que el límite de detección del ensayo utilizado durante la mayor parte de la infección o bien que el parásito sólo circula en etapas tempranas de la infección y que luego de enquistarse en los músculos no hay recirculación en el torrente sanguíneo.

Además, se ha reportado la detección serológica del parásito mediante IFAT (inmunofluorescencia indirecta). En estudios realizados en Jujuy, Argentina, el 77 % de las llamas analizadas mostraron seropositividad frente a bradizoitos de *S. aucheniae*, y un 92,5 % frente a bradizoitos de *S. cruzi*, probablemente por reactividad cruzada con *S. masoni* (Moré *et al.*, 2008). Por otra parte, se desa-

rolló un ELISA indirecto, basado en una fracción proteica de 23 kDa de *S. aucheniae* que mostró seroprevalencias del 23 al 50 % según el tipo de manejo (Romero *et al.*, 2017). La falta de un gold standard complica la validación de estas técnicas. Además, el uso de antígenos derivados de sarcoquistes plantea desafíos de reproducibilidad. Por eso, se está explorando el uso para diagnóstico de antígenos recombinantes basados en proteínas inmunodominantes identificadas en estudios transcriptómicos de *S. aucheniae* (Decker-Franco *et al.*, 2020).

La sarcocistiosis de CS está ampliamente distribuida, con alta prevalencia, en CS de Argentina, Bolivia, Perú y Chile, así como también se ha detectado en países donde estos animales han sido introducidos (Saeed *et al.*, 2018).

El tipo de manejo es un factor determinante para la prevalencia de la infección. Llamas criadas en sistemas controlados, sin contacto con perros, presentaron menores tasas de infección. En cambio, animales criados por pastores trashumantes, sin control sanitario y en presencia de perros pastores, mostraron alta seropositividad (Romero *et al.*, 2017).

La edad también es un factor relevante. Se ha observado que animales más viejos acumulan más sarcoquistes, probablemente debido a su exposición prolongada al parásito (Rooney *et al.*, 2014). Esta observación sugiere que habría una continua ingestión de esporozoítos y reinfección por la vía sanguínea así aumentando la carga de sarcoquistes en las llamas (Decker-Franco, 2018).

El interés por la carne de camélidos está creciendo, impulsado por su excelente perfil nutricional, caracterizado por un bajo contenido en colesterol y un alto contenido en proteínas (Popova *et al.*, 2021). Como resultado, la demanda de carne de llama y alpaca ha ido en aumento. El desarrollo sostenible de la ganadería de camélidos presenta importantes oportunidades y beneficios, especialmente para las comunidades del altiplano andino. También se ajusta a los intereses del mercado internacional, donde existe una creciente demanda de carnes magras procedentes de animales que tienen un menor impacto ambiental en comparación con el ganado tradicional (Zarrin *et al.*, 2020). Además, experiencias de consumo y comercialización de carne de guanaco en el sur de Argentina y Chile se presentan como alternativas de aprovechamiento de la especie (Carmanchahi *et al.*, 2022). Sin embargo, la presencia de macroquistes en carne destinada al consumo humano puede llevar a la condena total o parcial de la res, reduciendo el valor comercial del producto. Se han estimado pérdidas de 300.000 USD en Perú debido a reses infectadas por *S. aucheniae* (Leguía, 1991). Esta situación ha llevado a muchos productores a evitar los mataderos y faenar en sus domicilios, vendiendo la carne de manera informal. Esto dificulta el control sanitario, afecta la inocuidad alimentaria, y reduce las posibilidades de comercialización formal, incluso en mercados internacionales (Giuliano *et al.*, 2023).

En regiones andinas, es común la elaboración de charqui (carne seca y salada) como método ancestral de conservación. Aunque este proceso puede inactivar la capacidad infectiva del parásito, no elimina completamente sus toxinas, en particular la sarcocistina, una endotoxina peptídica termo-sensible presente en *S. aucheniae*. Estudios experimentales demostraron que esta toxina puede inducir gastroenteritis en animales de laboratorio si la carne no es cocida adecuadamente (Godoy *et al.*, 2007). Si bien no hay reportes en humanos de intoxicación por consumo de carne de CS infectada, la posibilidad de toxicidad alimentaria no puede descartarse por completo, especialmente si se consume carne cruda o insuficientemente cocida.

El estudio del transcriptoma de los estadíos de *S. aucheniae* dentro del sarcoquiste ha revelado información clave sobre la biología del parásito. Se identificaron 24 proteínas predichas como ancladas por puentes glicosilfosfatidilinositol a la membrana celular, con potencial uso como marcadores diagnósticos y candidatos vacunales (Decker-Franco *et al.*, 2020). Otras proteínas

identificadas están relacionadas con la división celular, secreción de organelas especializadas (roptrias, micronemas y gránulos densos) y movilidad del parásito. También se detectaron proteasas, enzimas respiratorias, y superóxido dismutasa. La presencia de esta última enzima en los estadios del sarcociste indica que el parásito realiza respiración aeróbica en este microambiente, lo cual requiere difusión de oxígeno desde los capilares del hospedador (Wieser *et al.*, 2023).

Estos blancos moleculares identificados y parcialmente caracterizados ofrecen nuevas oportunidades para desarrollar pruebas diagnósticas sensibles, vacunas o terapias dirigidas, y mejorar el entendimiento de la interacción parásito-hospedador.

En conclusión, la sarcocistiosis en camélidos sudamericanos es una enfermedad ampliamente extendida y aún poco controlada. Su impacto se manifiesta en múltiples niveles: sanitario, productivo, económico y comercial. Si bien la mayoría de las infecciones cursan sin síntomas, su presencia limita el aprovechamiento de una carne de alto valor nutricional y bajo impacto ambiental, clave para el desarrollo sostenible de regiones altoandinas. Romper el ciclo del parásito implica controlar el acceso de perros a carne cruda y mejorar las prácticas de manejo. Al mismo tiempo, el desarrollo de herramientas diagnósticas aplicables en animales vivos y estrategias de control, como vacunas, requiere el apoyo a la investigación básica y aplicada. De vital importancia es comprender la biología de *S. aucheniae* y *S. masoni*, y su interacción con los CS, lo cual permitirá diseñar medidas más eficaces para mitigar el impacto de esta enfermedad en los sistemas de producción y favorecer el desarrollo económico y sanitario de las poblaciones que dependen de estos animales únicos.

Agradecimientos: Se agradece el financiamiento del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina (PDi114), el Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (CONCyTEC), Perú (PE501079385-2022) y el Vicerrectorado de Investigación, Universidad Católica de Santa María – Arequipa, Perú (Res. 30956-R-2024).

Referencias

- Brumpt, E. *Precis de Parasitologie*, 2nd ed.; Masson et Cie: Paris, France, 1913.
- Carletti, T.; Martin, M.; Romero, S.; Morrison, D.A.; Marcoppido, G.; Florin-Christensen, M.; Schnittger, L. Molecular identification of *Sarcocystis aucheniae* as the macrocyst-forming parasite of llamas. *Vet. Parasitol.* 2013, 198, 396–400. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.09.007.
- Carmanchahi, P.; Lichtenstein, G., 2022. *Guanacos and People in Patagonia*, 1st ed. Springer International Publishing, Cham, Switzerland.
- Chávez, A.; Leyva, V.; Panez, S.; Ticona, D.; García, W.; Pezo, D. Sarcocistiosis y la eficiencia productiva de la alpaca. *Rev. Inv. Vet. Perú* 2008, 19, 160–167.
- Decker-Franco, C. *Avances En El Conocimiento de La Sarcocistiosis de Camélidos Sudamericanos y Desarrollo de Herramientas-352 tas Para Su Control*. Trabajo de tesis para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires, Argentina, 2018.
- Decker-Franco, C.; Schnittger, L.; Florin-Christensen, M. *Sarcocystis*. In *Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets*; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2018a; pp. 103–124, ISBN 9783319701325.
- Decker-Franco, C.; Romero, S.; Ferrari, A.; Schnittger, L.; Florin-Christensen, M. Detection of *Sarcocystis aucheniae* in blood of llama using a duplex semi-nested PCR assay and its association with cyst infestation. *Heliyon* 2018b, 4, e00928. doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e00928.

- Decker Franco, C.; Wieser, S.N.; Soria, M.; de Alba, P.; Florin-Christensen, M.; Schnittger, L. *In silico* identification of immunotherapeutic and diagnostic targets in the glycosylphosphatidylinositol metabolism of the coccidian *Sarcocystis aucheniae*. *Transbound. Emerg. Dis.* 2020, 67, 165–174. doi: 10.1111/tbed.13438.
- Gabor, M.; Gabor, L.J.; Srivastava, M.; Booth, M.; Reece, R. Chronic myositis in an Australian alpaca (*Lama pacos*) associated with *Sarcocystis* spp. *J. Vet. Diagn. Investig.* 2010, 22, 966–969. doi: 10.1177/104063871002200620.
- Giuliano, S.M.; Reategui Ordonez, J.; Barriga Marcopuda, X.; Florin-Christensen, M. Situación actual de la calidad de carne de camélidos sudamericanos (llama y alpaca) en Argentina y Perú y su relación con infestación con *Sarcocystis aucheniae*. Reunión Nacional de la Asociación Boliviana de Producción Animal—ABOPA, Oruro, Bolivia, 26–28 Octubre 2023 <https://www.cifumss.agro.bo/abopa/index.html>
- Godoy, R.; Vilca, M.; Gonzáles, A.; Leyva, V.; Sam, R. Saneamiento y detoxificación de carne de llama (*Lama glama*) infectada con *Sarcocystis aucheniae* mediante cocción, horneado, fritura y congelado. *Rev. Inv. Vet. Perú* 2007, 18, 51–56.
- LaPerle, K.M.D.D.; Silveria, F.; Anderson, D.E.; Blomme, E.A.G.G. Dalmeny disease in an alpaca (*Lama pacos*): *Sarcocystosis*, eosinophilic myositis and abortion. *J. Comp. Pathol.* 1999, 121, 287–293. doi: 10.1053/jcpa.1999.0321
- Leguía, G. The epidemiology and economic impact of llama parasites. *Parásitol. Today* 1991, 7, 54–56.
- Moré, G.; Pardini, L.; Basso, W.; Marín, R.; Bacigalupe, D.; Auad, G.; Venturini, L.; Venturini, M.C. Seroprevalence of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis* sp. in llamas (*Lama glama*) from Jujuy, Argentina. *Vet. Parasitol.* 2008, 155, 158–160. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.04.003.
- Moré, G.; Regensburger, C.; Gos, M.L.; Pardini, L.; Verma, S.K.; Ctibor, J.; Serrano-Martínez, M.E.; Dubey, J.P.; Venturini, M.C. *Sarcocystis masoni*, n. sp. (Apicomplexa: *Sarcocystidae*), and redescription of *Sarcocystis aucheniae* from llama (*Lama glama*), guanaco (*Lama guanicoe*) and alpaca (*Vicugna pacos*). *Parasitology* 2016, 143, 617–626. doi: 10.1017/S003118201600007X.
- Neyra, L.; Malaga, J.L.; Giuliano, S.; Barriga Marcapura, X.; Aguilar, M.; Chavez Fumagalli, M.A.; Florin-Christensen, M.; Reategui Ordoñez, J. Longitudinal detection of *Sarcocystis aucheniae* DNA in blood samples of naturally infected alpacas in the Andean highlands of Peru. *Vet Parasitol.* 2025, 338:110555. doi: 10.1016/j.vetpar.2025.110555.
- Popova, T.; Tejeda, L.; Peñarrieta, J.M.; Smith, M.A.; Bush, R.D.; Hopkins, D.L. Meat of South American camelids – Sensory quality and nutritional composition. *Meat Sci.* 2021, 171:108. doi: 10.1016/j.meatsci.2020.108285.
- Regensburger, C.; Gos, M.L.; Ctibor, J.; Moré, G. Morphological and molecular characteristics of *Sarcocystis aucheniae* isolated from meat of guanaco (*Lama guanicoe*). *J. Food Qual. Hazards Cont.* 2015, 2, 118–121.
- Romero, S.; Carletti, T.; Decker Franco, C.; Moré, G.; Schnittger, L.; Florin-Christensen, M. Seropositivity to *Sarcocystis* infection of llamas correlates with breeding practices. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.* 2017, 10, 65–70. doi: 10.1016/j.vprsr.2017.08.006.
- Rooney, A.L.; Limon, G.; Vides, H.; Cortez, A.; Guitian, J. *Sarcocystis* spp. in llamas (*Lama glama*) in southern Bolivia: A cross sectional study of the prevalence, risk factors and loss in income caused by carcass downgrades. *Prev. Vet. Med.* 2014, 116, 296–304. doi: 10.1016/j.prevetmed.2013.11.014.
- Saeed, M.A.; Rashid, M.H.; Vaughan, J.; Jabbar, A. *Sarcocystosis* in South American camelids: The state of play revisited. *Parasites Vectors* 2018, 11, 146. doi: 10.1186/s13071-018-2748-1.
- Vargas Tacuri, C.; Guliano, S.; Malaga, J.L.; Chavez-Fumagalli, M.; Florin-Christensen, M.; Reategui Ordoñez, J. Confirmation of dogs as definitive hosts of *Sarcocystis aucheniae* under natural conditions by microscopy and molecular studies. VII International Meeting on Apicomplexans in Farm Animals, La Plata, Argentina, 23-25 de octubre, 2024.
- Wieser, S.N.; Cafrune, M.M.; Romero, S.R.; Schnittger, L.; Florin-Christensen, M. Molecular identification of *Sarcocystis aucheniae* in the wild South American camelid *Vicugna vicugna*. *Vet Res Commun.* 2024b, 48(5):3429-3435. doi: 10.1007/s11259-024-10491-0.

- Wieser, S.N.; Giuliano, S.M.; Reategui Ordoñez, J.; Barriga Marcapura, X.; Olivera, L.V.M.; Chavez Fumagalli, M.A.; Schnittger, L.; Florin-Christensen, M. *Sarcocystis* spp. of New and Old World Camelids: Ancient Origin, Present Challenges. *Pathogens*. 2024a,13(3):196. doi: 10.3390/pathogens13030196.
- Wieser, S.N.; Decker-Franco, C.; de Alba, P.; Romero, S.; Ferrari, A.; Schnittger, L.; Florin-Christensen, M. Discovery of antigens and cellular mechanisms in the protozoan parasite *Sarcocystis aucheniae* using immunoproteomics. *Parásitología* 2023, 3, 349–363. doi: 10.3390/parásitologia3040034
- Wu, Z.; Sun, J.; Hu, J.; Song, J.; Deng, S.; Zhu, N.; Yang, Y.; Tao, J. Morphological and molecular characterization, and demonstration of a definitive host for *Sarcocystis masoni* from an alpaca (*Vicugna pacos*) in China. *Biology* 2022, 11, 1016. doi: 10.3390/biology11071016.
- Zacarías, F.S.; Sam, R.T.; Ramos, D.D.; Lucas, O.A.; Lucas, J.L. Techniques for the isolation and purification of *Sarcocystis aucheniae* oocysts from small intestine of experimentally infected dogs. *Rev. Inv. Vet. Perú* 2013, 24, 396–403.
- Zarrin, M., Riveros, J.L., Ahmadpour, A., De Almeida, A.M., Konuspayeva, G., Vargas-Bello-Pérez, E., Faye, B., Hernández-Castellano, L.E., 2020. Camelids: New players in the international animal production context. *Trop. Anim. Health Prod.* 52(3), 903-913. doi: 10.1007/s11250-019-02197-2.

A

Caracterización epidemiológica de los protozoos Apicomplejos

Evolución, taxonomía clásica y filogenia molecular de los Piroplasmida: ¿Ver o no ver, eso es la cuestión!

Leonhard Schnittger^{1,2,*}, Monica Florin-Christensen^{1,2}, Sabrina Ganzinelli^{1,2}

¹Instituto de Patobiología Veterinaria, UEDD INTA-CONICET, Centro de Investigaciones Veterinarias y Agronómicas (CICVyA), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina

²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

*schnittger.leonhard@inta.gob.ar

"Ver o no ver, esa es la cuestión" es una adaptación de la célebre frase de Hamlet. Mientras Hamlet duda entre enfrentar la vida o rendirse ante la muerte, esta versión plantea si elegimos ignorar o asumir activamente la filogenia y la evolución como parte del conocimiento científico.

El orden Piroplasmida, que agrupa a los géneros *Babesia*, *Cytauxzoon* y *Theileria*, está formado por hemoprotozoos transmitidos por garrapatas que afectan a mamíferos y aves. Estos parásitos, conocidos como piroplásmidos, representan una seria amenaza para los animales domésticos y de granja, ya que sus infecciones suelen ser graves o incluso mortales. En el ámbito ganadero, los piroplásmidos causan enfermedades de gran impacto económico, como la babesiosis bovina y theileriosis tropical en rumiantes mayores, y babesiosis ovina y theileriosis maligna en rumiantes menores. Además, limitan el comercio internacional de caballos debido a la piroplasmosis equina, y afectan la salud de mascotas, causando babesiosis canina en perros y cytauxzoonosis felina en gatos. Asimismo, un aspecto que preocupa cada vez más es el aumento de casos de babesiosis en humanos, hecho que resalta la importancia de estos parásitos no solo en el campo veterinario, sino también en la salud pública. Mediante análisis moleculares, se han compilado un total de 57 especies de piroplásmidos que infectan a animales domésticos y de granja (Schnittger *et al.*, 2022). En esta revisión abordaremos: (i) los hitos más importantes en la historia evolutiva de los piroplásmidos incluyendo una estimación del marco temporal de su evolución, el origen de las estructuras celulares características de los apicomplejos y su importancia como blancos terapéuticos, así como la evolución de su estilo de vida intracelular; (ii) los criterios taxonómicos clásicos que originalmente definieron a los géneros *Babesia*, *Cytauxzoon* y *Theileria*, y su relación con los linajes recientemente establecidos mediante filogenia molecular; (iii) dos estudios de caso que ilustran cómo la evolución ha moldeado linajes y especies de *Babesia* y *Theileria* de relevancia para la veterinaria actual.

Historia evolutiva de los piroplásmidos en el contexto evolutivo de los Apicomplexa

Los piroplásmidos pertenecen al Phylum Apicomplexa y de acuerdo con las estimaciones del reloj molecular, cuyo origen se infiere alrededor de 1100 Ma (millones de años) atrás, representan un linaje de protozoos muy ancestral (Parfrey *et al.*, 2011; Schnittger *et al.*, 2012). Además de las típicas organelas de las células eucarióticas, los apicomplejos tienen una estructura celular denominada complejo apical, el cual da nombre al grupo, situado en el extremo anterior de la célula y compuesto por anillos polares, conoides, roptrias, micronemas y microtúbulos subpelicales. El complejo apical juega un papel crucial en la adhesión, invasión, y supervivencia del parásito dentro de la célula hospedadora. Por ello, las moléculas involucradas en estos procesos representan candidatos inmunoterapéuticos. El análisis filogenético indica que los miembros del

género *Colpodella* comparten un ancestro común con los apicomplejos (Kuvardina *et al.*, 2002). Los colpodélidos son protozoos depredadores flagelados de vida libre (¡no parasitaria!) que se alimentan de algas unicelulares adhiriéndose a la célula presa y extrayendo su citoplasma a través de estructuras especializadas, en un proceso denominado mizocitosis. Estas estructuras se consideran homóloga al complejo apical, que permitió a los apicomplejos llevar un estilo de vida parasitario mediante la invasión de la célula hospedadora. Por lo tanto, es probable que los Apicomplexa se desarrollaran a partir de esta depredación mizocítica hasta llegar al parasitismo de localización epicelular, como aún muestran las gregarinas y *Cryptosporidium*, y finalmente al parasitismo intracelular, como muestran los piroplásmidos, *Plasmodium* y los coccidios (Bartošová-Sojková *et al.*, 2015).

Otra estructura característica de este grupo es el apicoplasto, remanente de un plástido que posee genoma circular. El descubrimiento de *Chromera vela*, un alga fotosintética con apicoplasto, que representa el "eslabón perdido" en la evolución de los apicomplejos, permitió entender cómo los apicomplejos habrían podido incorporar su apicoplasto (Moore *et al.*, 2008). Las evidencias muestran que el apicoplasto se originó de un proceso endosimbiótico secundario con un alga roja (Janouskovec *et al.*, 2010). Algunos pocos linajes de Apicomplexa, como por ejemplo *Cryptosporidium*, han perdido esta organela, pero en los piroplásmidos, coccidios (p. ej. *Toxoplasma*) y *Plasmodium*, ésta tiene una función esencial. El genoma del apicoplasto codifica enzimas para la síntesis de ácidos grasos, isoprenoides, grupos hemo y hierro-azufre. Estas vías biosintéticas representan blancos para el desarrollo de fármacos antiparasitarios.

Los microorganismos del Phylum Apicomplexa conforman un subgrupo de los Alveolata, esto es porque poseen un complejo interno de membranas formado por alvéolos corticales, que son sacos aplanados ubicados justo debajo de la membrana plasmática. Este complejo proporciona la estructura y el soporte necesario para que las proteínas motoras de actina-miosina generen la fuerza que impulsa el movimiento, un proceso esencial para la invasión de las células hospedadoras (Rangachari *et al.*, 1986; Gonzalez *et al.*, 2009). La inhibición de este movimiento, que requiere energía en forma de ATP, también bloquea la capacidad de invasión (Wetzel *et al.*, 2005). Por lo tanto, las moléculas involucradas en el mecanismo de movimiento y, en consecuencia, en la invasión, representan también posibles blancos terapéuticos.

Taxonomía clásica y filogenia molecular de los piroplásmidos

Históricamente la clasificación taxonómica de los piroplásmidos ha estado basada en una combinación de indicadores morfológicos, biológicos y evolutivos. Uno de los principales criterios ha sido la morfología intraeritrocitaria, que considera la forma del parásito (piriforme, redonda o anular), el tamaño relativo de sus estadios dentro del eritrocito y el número de piroplásmidos por célula. Estas características, tradicionalmente observadas mediante microscopía, han sido útiles para diferenciar especies de los géneros *Babesia*, *Cytauxzoon* y *Theileria* (Mehlhorn & Schein, 1984; Schnittger *et al.*, 2012). Sin embargo, estudios han demostrado que la forma y el tamaño de los piroplásmidos pueden variar significativamente dentro de una misma especie, especialmente en función del nivel de parasitemia (Homer *et al.*, 2000). Aunque se considera típico encontrar dos piroplásmidos por eritrocito en *Babesia*, uno o dos en *Theileria*, y uno solo en *Cytauxzoon*, estos valores no son absolutos y presentan variabilidad (Jalovecka *et al.*, 2018).

Por ello, aunque estas características morfológicas siguen siendo útiles como orientación diagnóstica inicial, no son suficientes para una clasificación taxonómica precisa. La identificación definitiva de género o especie requiere el uso de herramientas moleculares, como la reacción de PCR específica y/o secuenciación de genes marcadores.

El segundo criterio clave en la clasificación ha sido la presencia o ausencia de una fase tisular esquizogónica, es decir, la multiplicación del parásito en células nucleadas del hospedador, como leucocitos. Esta fase está presente en *Theileria* sensu stricto (s.s.) y *Cytauxzoon*, pero está completamente ausente en *Babesia* (Meinkoth & Kocan, 2005; Mans *et al.*, 2015). En el caso de *Theileria* s.s., los esquizontes se desarrollan típicamente en linfocitos T o B, o en monocitos/macrófagos, dependiendo de la especie. *Cytauxzoon*, por su parte, infecta principalmente macrófagos mononucleares derivados del sistema fagocítico mononuclear (también conocido como sistema retículo-endotelial), que se encuentran en tejidos como pulmones, hígado, bazo, ganglios linfáticos y médula ósea (Snider *et al.*, 2010).

Desde una perspectiva evolutiva, se ha observado una tendencia clara: a medida que la esquizogonia se vuelve más marcada y permite una mayor multiplicación tisular del parásito (como ocurre en *Theileria* y especialmente en *Cytauxzoon*), el número de piroplásmidos presentes en eritrocitos disminuye en comparación con *Babesia* s.s., que ha perdido esta fase tisular por completo. Esta pérdida puede estar relacionada con una mayor multiplicación intraeritrocitaria, aunque es más probable que se deba a una innovación clave en el ciclo biológico de *Babesia* s.s.: la capacidad de transmisión vertical.

Este último criterio taxonómico se basa en la forma de transmisión en el vector —la garrapata—, y en particular, en la transmisión transovárica. Este proceso, exclusivamente presente en *Babesia* s.s., permite que el parásito infecte los ovarios de la garrapata y se transmita directamente a su descendencia a través de los huevos, permitiendo su diseminación a la siguiente generación de garrapatas sin depender de un hospedador vertebrado (Uilenberg, 2006; Ravindran *et al.*, 2023). Es ésta una estrategia única entre los hemoprotozoos, aunque también ha sido descrita en virus (virus de La Crosse y de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo) y en bacterias del género *Rickettsia*.

Por el contrario, *Theileria* y *Cytauxzoon* carecen de esta capacidad y dependen exclusivamente de la transmisión transtadial, en la cual el parásito sobrevive en la garrapata a lo largo de sus mudas (de larva a ninfa, o de ninfa a adulto), pero no se transmite a través de los huevos. Si bien existen especies de *Babesia* que utilizan únicamente la transmisión transtadial, éstas se agrupan dentro de *Babesia* sensu lato (s.l.), diferenciándose así de las especies con transmisión transovárica (*Babesia* s.s.).

En conjunto, estos tres criterios —morfología intraeritrocitaria, presencia de esquizogonia tisular y modo de transmisión en el vector— han sido fundamentales para establecer los límites entre los géneros de piroplásmidos. No obstante, los avances en biología molecular y filogenia están desafiando y puliendo constantemente esta clasificación, revelando una diversidad evolutiva mucho más compleja de lo que se creía anteriormente.

Estudios de filogenia molecular basados en secuencias del gen ARN ribosomal 18S han permitido identificar seis clados distintos de los piroplásmidos (Schnittger *et al.*, 2012). Estos clados están compuestos por al menos 57 especies de piroplásmidos que infectan animales domésticos y de producción (Schnittger *et al.*, 2022). Estos resultados han sido confirmados y refinados mediante otros enfoques, como el análisis genómico comparativo y la filogenia de genes y genomas mitocondriales (Schreeg *et al.*, 2016; Muñoz-Gómez *et al.*, 2019).

Los árboles filogenéticos resultantes revelan patrones taxonómicos sorprendentes: las *Babesia* s.l. de los Clados I y II infectan principalmente a perros y gatos, respectivamente. Por su parte, *Cytauxzoon* spp., parásitos que infectan gatos, se agrupan en un clado independiente (Clado III). *Theileria equi*, que infecta a équidos, se ubica en el Clado IV y ha sido clasificada como *Theileria* s.l. para distinguirla de *Theileria* s.s., representada por especies como *T. parva* y *T. annulata* (Clado V),

que infectan rumiantes. En el Clado VI se agrupan las *Babesia* s.s., las cuales presentan un rango de hospedadores mucho más amplio, incluyendo bovinos, ovinos, equinos, felinos y caninos. Aun, se han descrito al menos cuatro clados adicionales, ellos integran exclusivamente piroplásmidos que infectan animales silvestres como rinocerontes, marsupiales, monotremados y aves, y, por lo tanto, no se abordarán en este estudio (Jalovecka *et al.*, 2018).

Uno de los grandes aportes de la filogenia molecular ha sido la confirmación de los cuatro grupos principales de piroplásmidos, tradicionalmente definidos por criterios morfológicos y biológicos: *Babesia* s.s., *Theileria*, *Cytauxzoon*, y *Babesia* s.l. Además, esta herramienta ha permitido distinguir entre linajes estrechamente relacionados que no pueden separarse mediante taxonomía clásica, como los *Babesia* s.l. de los Clados I y II (Kjemtrup *et al.*, 2006; Conrad *et al.*, 2006; Schnittger *et al.*, 2012, 2022).

Un avance particularmente relevante ha sido la diferenciación inequívoca entre *Theileria* s.s., ubicados en Clado V —que comprende especies que infectan a los rumiantes— y *Theileria* s.l., que se coloca en Clado IV, representada por *T. equi* en équidos (Schnittger *et al.*, 2012, 2022). Mientras que en la taxonomía tradicional ambas eran consideradas parte del mismo género *Theileria*, los análisis filogenéticos han demostrado que estos linajes tienen una evolución separada (Mehlhorn & Schein, 1998; Kappmeyer *et al.*, 2012;).

Además, estudios bioinformáticos han evidenciado que los genomas y proteomas de *Babesia* s.s. (p. ej., *B. bovis* y *B. bigemina*) del Clado VI son más similares a los de *Theileria* s.s. (Clado V) que a los de otras especies clasificadas como *Babesia* s.l., como *B. microti* (Clado I), lo que refuerza la necesidad de una reevaluación taxonómica (Cornillot *et al.*, 2012; Ascencio *et al.*, 2018; Gallenti *et al.*, 2021; Poklepovich *et al.*, 2023). Sin embargo, la filogenia molecular actual muestra que los tres clados de *Babesia* (Clado I, II y VI) no comparten un ancestro común inmediato, lo que convierte al género *Babesia* en un grupo parafilético. En cambio, Clados IV y V de *Theileria* forman grupos hermanos que son filogenéticamente diferenciables y, por lo tanto, deben denominarse géneros distintos. Estas observaciones respaldan la necesidad de una revisión integral de la taxonomía de los piroplásmidos, que permita alinear la clasificación formal con la evidencia evolutiva y molecular disponible. En este contexto, la taxonomía debe aspirar a reflejar con precisión las relaciones evolutivas reales, lo que no solo mejora la clasificación en sí misma, sino que también facilita predicciones biológicas y la comunicación científica.

Evolución adaptativa en linajes de *Babesia* y *Theileria* de importancia veterinaria

Un hallazgo especialmente notable es que las especies del grupo *Babesia* s.s. del Clado VI son los únicos piroplásmidos que han logrado infectar con éxito todas las principales especies de animales de granja y de compañía. Eso se debe a la innovación evolutiva de la transmisión transovárica anteriormente mencionada, que ha transformado radicalmente la estrategia de supervivencia de este grupo. Esta nueva característica ha facilitado el cambio de hospedador a otras especies de vertebrados, permitiendo así la diversificación de este linaje filogenético de piroplásmidos. En consecuencia, las especies de *Babesia* s.s. muestran una radiación evolutiva junto con los diversos grupos de mamíferos y aves alrededor del mundo, mientras que los piroplásmidos de los Clados I a V están confinados a un cierto grupo de mamíferos y distribución geográfica (Fig. 1).

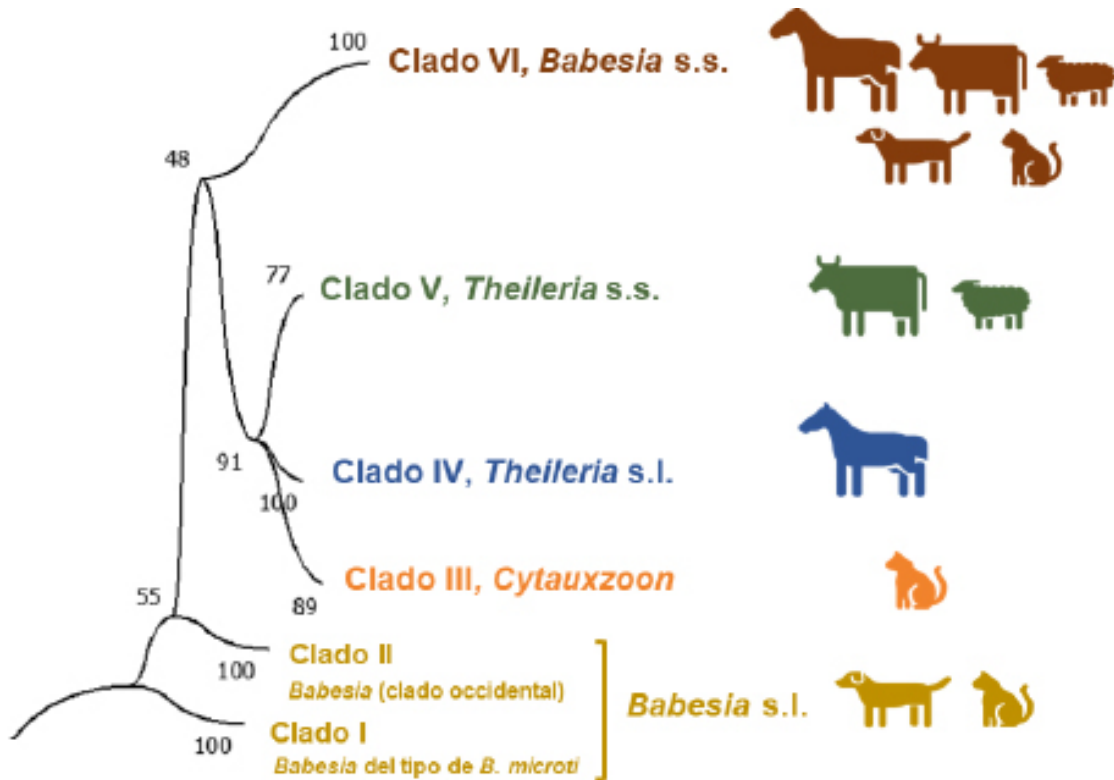


Figura 1. Filogenia molecular de los piroplásmidos que infectan animales de granja y de compañía. Se muestran los piroplásmidos agrupados en los Clado I a VI y los grupos de animales infectados por cada clado. Los números indican el valor *bootstrap*. s.s., sensu stricto, s.l., sensu lato; modificado según Schnittger *et al.*, (2022)

Un caso ilustrativo lo encontramos en los piroplásmidos que infectan a los caballos: *Theileria equi* (*Theileria s.s.*, Clado V), que se transmite de manera transestadial, y *Babesia caballi*, (*Babesia s.s.*, Clado VI) que se transmite de forma transovárica. En el ciclo de *T. equi*, las larvas de garrapata deben alimentarse previamente de un caballo infectado para adquirir el parásito y poder transmitirlo en estadios posteriores, lo que implica que la persistencia del parásito depende de la estabilización de un estado de portador crónico en el hospedador equino como reservorio del parásito. Por el contrario, *B. caballi*, al transmitirse de forma transovárica, se perpetúa directamente en la descendencia de la garrapata una vez que ésta se infecta, sin necesidad de alimentarse nuevamente de un hospedador infectado. En este caso, la garrapata actúa como reservorio.

Además, una garrapata puede poner entre 3.000 y 7.000 huevos dependiendo de la especie y las condiciones ambientales. La transmisión transovárica permite infectar estos huevos, lo cual representa una fase de proliferación adicional de las especies que pertenecen a las *Babesia s.s.* Notablemente, estas especies presentan una división secundaria de los kinetos, ausente en *Theileria s.s.*, lo cual es una adaptación evolutiva para asegurar una alta eficiencia de infección de los huevos. En conjunto, estas adaptaciones sugieren que la transmisión transovárica facilita considerablemente el cambio de hospedador, lo que explicaría su frecuente aparición en piroplásmidos del Clado VI, y su ausencia en los Clados III, IV y V, así como su escasa ocurrencia en los Clados I y II (Schnittger *et al.*, 2022).

Un análisis minucioso del árbol filogenético inferido revela información sorprendente sobre otros patrones evolutivos que presentan los diferentes linajes de piroplásmidos. Contrariamente a lo esperado, la diversificación de las especies de parásitos parece estar dominada por la coespeciación hospedador-parásito (regla de Fahrenholz) en la mayoría de los linajes (Clado I a V) y sólo en el linaje de *Babesia* s.s. (Clado VI), se observan frecuentes cambios del hospedador vertebrado como se ha demostrado anteriormente. Siguiendo la diversificación de los grupos de piroplásmidos con sus hospedadores vertebrados en el árbol, se plantea la hipótesis de que los carnívoros (Clado I, II y III) podrían haber sido los primeros hospedadores vertebrados de los piroplásmidos, antes que los rumiantes (Clado V) y équidos (Clado IV). Esta propuesta se alinea con los tiempos de divergencia evolutiva de sus respectivas familias: los Cánidos surgieron hace aproximadamente 40 Ma y los Félidos hace unos 25 Ma, mientras que los Bóvidos (incluidos los bovinos) aparecieron más tarde, hace alrededor de 20 Ma (los bovinos modernos \approx 13 Ma); los caprinos (ovejas y cabras), hace \approx 9 Ma; y el caballo moderno (*Equus*), hace tan solo \approx 5 Ma (Hassanin *et al.*, 2012; Jalovecka *et al.*, 2019; Schnittger *et al.*, 2022).

Dentro del grupo de parásitos del género *Theileria*, hay un conjunto de especies que ha desarrollado una capacidad verdaderamente singular: transformar células inmunitarias de los animales que infectan. Especies como *T. annulata*, *T. lestoquardi*, *T. parva* y *T. taurotragi* —todas pertenecientes al llamado Clado V— pueden invadir leucocitos, desarrollarse como esquizontes dentro de ellos, y sincronizar su división con la de las células del hospedador. El resultado es una proliferación descontrolada de estas células transformadas, que se diseminan por el cuerpo del animal de forma muy similar a las células cancerígenas. Este comportamiento no sólo es inusual, sino que también está estrechamente asociado a una alta patogenicidad y tasas elevadas de mortalidad en el ganado infectado, lo que convierte a estas *Theileria* en patógenos de gran relevancia veterinaria (Mans *et al.*, 2011; Tajeri *et al.*, 2021). En contraste, otras especies del mismo género, como *T. orientalis*, *T. mutans* y *T. velifera*, no poseen esta capacidad transformadora y generan enfermedades de menor relevancia.

Desde un punto de vista evolutivo, los estudios filogenéticos han revelado que esta habilidad para transformar células no ha evolucionado múltiples veces, sino que surgió una sola vez en el ancestro común más reciente de este grupo monofilético de *Theileria*, aproximadamente entre 14 y 16 Ma atrás (Fig. 2; Hassanin *et al.*, 2012; Pienaar *et al.*, 2018; Jalovecka *et al.*, 2019). Este hallazgo permite establecer una conexión directa entre la evolución del parásito y la de sus hospedadores vertebrados. Por ejemplo, *T. taurotragi* infecta a grandes antílopes africanos como el eland, kudu y nyala, que aparecieron en África hace unos 15 Ma. Posteriormente, *T. parva* se especializó en el búfalo africano, cuyo linaje también evolucionó en África hace unos 8 Ma. Con el tiempo, ancestros de los búfalos migraron hacia Asia, donde dieron origen al búfalo de agua, hospedador actual de *T. annulata*. Más recientemente aún, una población ancestral de *T. annulata* dio el salto hacia las ovejas, presentes en el Cercano Oriente y Asia, dando lugar a la especie *T. lestoquardi*. Este cambio de hospedador, del búfalo a la oveja, se ve reforzado por el hecho de que ambas especies (*T. annulata* y *T. lestoquardi*) comparten el mismo vector, la garrapata *Hyalomma anatolicum*.

La capacidad de transformar células del hospedador vertebrado es una innovación evolutiva única entre los parásitos eucariotas —solo comparable con ciertos virus y bacterias— y refuerza de manera inequívoca la idea de una coevolución entre las *Theileria* transformadoras y sus hospedadores. Este fenómeno evidencia de qué manera actúa la evolución coespecífica parásito-hospedador dentro de este fascinante grupo de organismos.

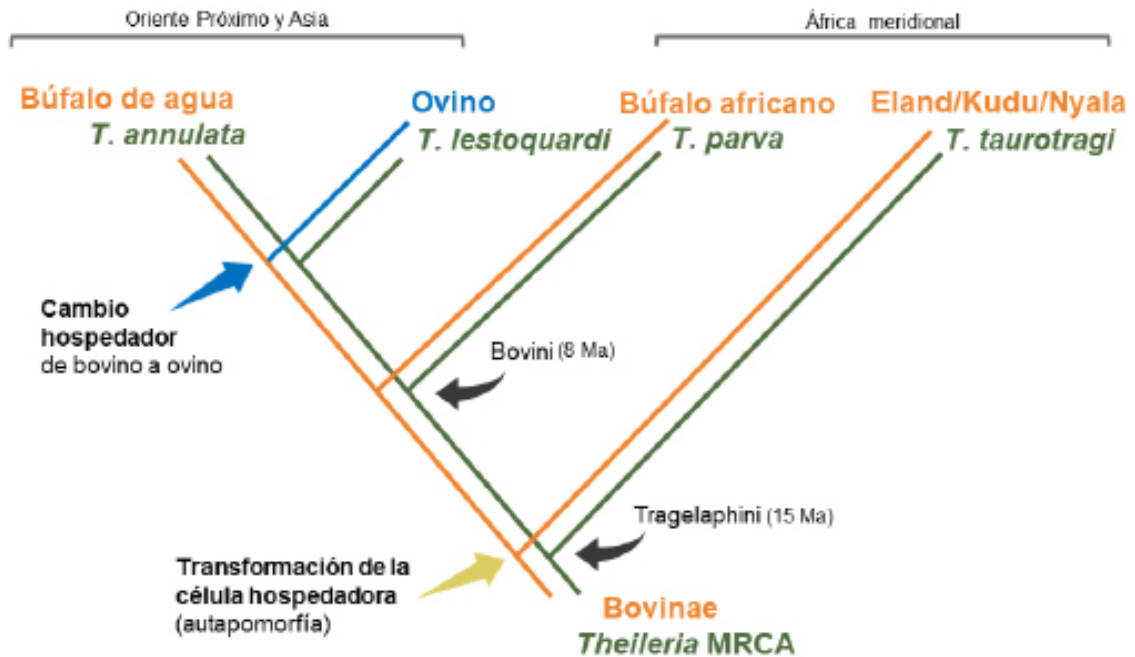


Figura 2. Comparación de la filogenia molecular de los piroplásmidos transformantes y sus hospedadores vertebrados. Coespeciación entre *Theileria* y sus hospedadores de la familia Bovinae, con indicación de su distribución geográfica. Las flechas indican los hitos evolutivos con la distancia en millones de años (Ma).

Agradecimientos: al financiamiento de INTA, Argentina (2023-PE-L01-I044).

Referencias

- Ascencio, M. E., Florin-Christensen, M., Mamoun, C. B., Weir, W., Shiels, B., & Schnittger, L. (2018). Cysteine proteinase C1A paralog profiles correspond with phylogenetic lineages of pathogenic piroplasmids. *Veterinary Sciences*, 5(2), 41. <https://doi.org/10.3390/vetsci5020041>
- Bartošová-Sojková, P., Oppenheim, R. D., Soldati-Favre, D., & Lukeš, J. (2015). Epicellular apicomplexans: Parasites "on the way in." *PLoS Pathogens*, 11(9), e1005080. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005080>
- Conrad, P. A., Kjemtrup, A. M., Carreno, R. A., Thoford, J., Wainwright, K., Eberhard, M., Quick, R., Telford, S. R., III, & Herwaldt, B. L. (2006). Description of *Babesia duncani* n. sp. (Apicomplexa: Babesiidae) from humans and its differentiation from other piroplasms. *International Journal for Parasitology*, 36(7), 779–789. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.03.008>
- Cornillot, E., Hadj-Kaddour, K., Dassouli, A., Noel, B., Ranwez, V., ... & Vivarès, C. P. (2012). Sequencing of the smallest apicomplexan genome from the human pathogen *Babesia microti*. *Nucleic Acids Research*, 40(18), 9102–9114. <https://doi.org/10.1093/nar/gks700>
- Gallenti, R., Poklepovich, T., Florin-Christensen, M., & Schnittger, L. (2021). The repertoire of serine rhomboid proteases of piroplasmids of importance to animal and human health. *International Journal for Parasitology*, 51(5), 455–462. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.10.010>
- Gonzalez, V., Combe, A., David, V., Malmquist, N. A., Delorme, V., Leroy, C., Blazquez, S., Ménard, R., & Tardieux, I. (2009). Host cell entry by apicomplexa parasites requires actin polymerization in the host cell. *Cell Host & Microbe*, 5(3), 259–272. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.01.011>

- Hassanin, A., Delsuc, F., Ropiquet, A., Hammer, C., Jansen van Vuuren, B., Matthee, C., Ruiz-Garcia, M., Catzeflis, F., Areskoug, V., Nguyen, T. T., & Couloux, A. (2012). Pattern and timing of diversification of Cetartiodactyla (Mammalia, Laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes. *Comptes Rendus Biologies*, 335(1), 32–50. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2011.11.002>
- Homer, M. J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S. R., III, Krause, P. J., & Persing, D. H. (2000). Babesiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(3), 451–469. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.3.451>
- Jalovecka, M., Hajdusek, O., Sojka, D., Kopacek, P., & Malandrín, L. (2018). The complexity of piroplasms life cycles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 248. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00248>
- Jalovecka, M., Sojka, D., Ascencio, M., & Schnittger, L. (2019). *Babesia* life cycle—When phylogeny meets biology. *Trends in Parasitology*, 35(5), 356–368. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.01.007>
- Janouskovec, J., Horák, A., Oborník, M., Lukes, J., & Keeling, P. J. (2010). A common red algal origin of the apicomplexan, dinoflagellate, and heterokont plastids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(24), 10949–10954. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003335107>
- Kappmeyer, L. S., Thiagarajan, M., Herndon, D. R., Ramsay, J. D., Caler, E., ... & Ueti, M. W. (2012). Comparative genomic analysis and phylogenetic position of *Theileria equi*. *BMC Genomics*, 13, 603. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-603>
- Kjemtrup, A. M., Wainwright, K., Miller, M., Penzhorn, B. L., & Carreno, R. A. (2006). *Babesia conradae*, sp. nov., a small *Babesia* identified in California. *Veterinary Parasitology*, 138(1–2), 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.044>
- Kuvardina, O. N., Leander, B. S., Aleshin, V. V., Myl'nikov, A. P., Keeling, P. J., & Simdyanov, T. G. (2002). The phylogeny of colpodellids (Alveolata) using small subunit rRNA gene sequences suggests they are the free-living sister group to apicomplexans. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 49(6), 498–504. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2002.tb00235.x>
- Mans, B. J., Pienaar, R., & Latif, A. A. (2015). A review of *Theileria* diagnostics and epidemiology. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4(1), 104–118. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.12.006>
- Mans, B. J., Pienaar, R., Latif, A. A., & Potgieter, F. T. (2011). Diversity in the 18S SSU rRNA V4 hyper-variable region of *Theileria* spp. in Cape buffalo (*Syncerus caffer*) and cattle from southern Africa. *Parasitology*, 138(6), 766–779. <https://doi.org/10.1017/S0031182011000187>
- Mehlhorn, H., & Schein, E. (1984). The piroplasms: Life cycle and sexual stages. *Advances in Parasitology*, 23, 37–103. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60330-5](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60330-5)
- Mehlhorn, H., & Schein, E. (1998). Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn & Schein, 1998. *Parasitology Research*, 84(6), 467–475. <https://doi.org/10.1007/s004360050415>
- Meinkoth, J. H., & Kocan, A. A. (2005). Cytauxzoonosis in cats: Clinical and pathologic features, and recent advances in prevention and treatment. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 35(1), 89–101. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2004.08.003>
- Moore, R. B., Oborník, M., Janouskovec, J., Chrudimský, T., Vancová, M., ... & McFadden, G. I. (2008). A photosynthetic alveolate closely related to apicomplexan parasites. *Nature*, 451(7181), 959–963. <https://doi.org/10.1038/nature06635>
- Muñoz-Gómez, S. A., Durnin, K., Eme, L., Paight, C., Lane, C. E., Saffo, M. B., & Slamovits, C. H. (2019). Nephromyces represents a diverse and novel lineage of the Apicomplexa that has retained apicoplasts. *Genome Biology and Evolution*, 11(9), 2727–2740. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz155>
- Parfrey, L. W., Lahr, D. J. G., Knoll, A. H., & Katz, L. A. (2011). Estimating the timing of early eukaryotic diversification with multigene molecular clocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(33), 13624–13629. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110633108>
- Pienaar, R., Latif, A. A., & Mans, B. J. (2018). Investigations into the host specificity of *Theileria taurotragi*. *Veterinary Parasitology*, 254, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.03.003>

- Poklepovich, T. J., Mesplet, M., Gallenti, R., Florin-Christensen, M., & Schnittger, L. (2023). Comparative degradome analysis of the bovine piroplasmid pathogens *Babesia bovis* and *Theileria annulata*. *Pathogens*, 12(2), 237. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020237>
- Rangachari, K., Dluzewski, A., Wilson, R., ... & Gratzer, W. (1986). Control of malarial invasion by phosphorylation of the host cell membrane cytoskeleton. *Nature*, 324(6093), 364–365. <https://doi.org/10.1038/324364a0>
- Ravindran, R., Hembram, P. K., Kumar, G. S., Kumar, K. G. A., Deepa, C. K., & Varghese, A. (2023). Transovarial transmission of pathogenic protozoa and rickettsial organisms in ticks. *Parásitology Research*, 122(3), 691–704. <https://doi.org/10.1007/s00436-023-07792-9>
- Schreeg, M. E., Marr, H. S., Tarigo, J. L., Cohn, L. A., Bird, D. M., Scholl, E. H., Levy, M. G., Wiegmann, B. M., & Birkenheuer, A. J. (2016). Mitochondrial genome sequences and structures aid in the resolution of Piroplasmida phylogeny. *PLoS ONE*, 11(11), e0165702. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165702>
- Schnittger, L., Ganzinelli, S., Bhoora, R., Omondi, D., Nijhof, A. M., & Florin-Christensen, M. (2022). The Piroplasmida *Babesia*, *Cytauxzoon*, and *Theileria* in farm and companion animals: Species compilation, molecular phylogeny, and evolutionary insights. *Parásitology Research*, 121(5), 1207–1245. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07424-8>
- Schnittger, L., Rodriguez, A. E., Florin-Christensen, M., & Morrison, D. A. (2012). *Babesia*: A world emerging. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(8), 1788–1809. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.07.004>
- Snider, T. A., Confer, A. W., & Payton, M. E. (2010). Pulmonary histopathology of *Cytauxzoon felis* infections in the cat. *Veterinary Pathology*, 47(2), 195–203. <https://doi.org/10.1177/0300985809353165>
- Tajeri, S., Haidar, M., Sakura, T., & Langsley, G. (2021). Interaction between transforming *Theileria* parasites and their host bovine leukocytes. *Molecular Microbiology*, 115(5), 860–869. <https://doi.org/10.1111/mmi.14642>
- Uilenberg, G. (2006). *Babesia*—A historical overview. *Veterinary Parasitology*, 138(1–2), 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.035>
- Wetzel, D. M., Schmidt, J., Kuhlenschmidt, M. S., Dubey, J. P., & Sibley, L. D. (2005). Gliding motility leads to active cellular invasion by *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *Infection and Immunity*, 73(9), 5379–5387. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.9.5379-5387.2005>

Tabla 1. Características de la taxonomía clásica y su relación con la filogenia molecular

Género	Número en el eritrocito	Tamaño y forma	Comentario	Esquizogonia	Transmisión transovárica	Filogenia molecular (Schnittger et al., 2022)
<i>Babesia</i> s.s.	2 (frecuente), múltiples en algunos casos	Anular, piriforme, pares en V, más grandes que <i>Babesia</i> s.l.	Piroplasmidos múltiples en infecciones graves y en algunas especies	No	Si	Clado VI
<i>Theileria</i>	1-2	Anular, coma, bastón	Difícil de distinguir de <i>Babesia</i> solo con morfología	Si, y en algunas especies transforman leucocitos	No	Clado V y IV
<i>Cytauxzoon</i>	1	Redondo, ovalado, anular	Piroplasmidos únicos y pequeños, esquizontes grandes en macrófagos	Si, con grandes esquizontes	No	Clado III
<i>Babesia</i> s.l.	1-2, ocasional forma de Maltés	Anillo, más pequeño que <i>Babesia</i> s.s.		No	No	Clado I y II

A

Caracterización epidemiológica de los protozoos Apicomplejos

¿Qué sabemos sobre las especies *Eimeria* aviares en Argentina y en el mundo?

Rodríguez, A. E.^{1,2}; Pisón-Martínez, M. L.^{1,2}; Romero, L. S.^{1,2}; Britez, J. D.^{1,2,4}; Tomazic, M. L.^{1,2,3,*}

¹Instituto de Patobiología (IP). CICVyA. INTA-Castelar.

²Instituto de Patobiología Veterinaria (IPVET). INTA-CONICET.

³Cátedra de Biotecnología, Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA.

⁴Cátedra de Parasitología, Facultad de Ciencias Veterinarias. UBA.

*Correspondencia: tomazic.mariela@inta.gob.ar

Resumen

La coccidiosis es una enfermedad causada por parásitos apicomplejos de la subclase Coccidia, entre los que se encuentran protozoarios del género *Eimeria*. Es de relevancia para los distintos sistemas productivos, y en particular para la avicultura. Si bien es una enfermedad controlada, suele ser una amenaza y generar brotes cuando fallan las medidas de control. Estas incluyen el adecuado manejo de los animales y establecimientos, el tratamiento farmacológico y la vacunación; esta última solo disponible para la producción avícola industrial. Las drogas anticoccidiales se usan muy ampliamente y tienen como principal desventaja que, de no ser aplicadas correctamente, generan resistencia, disminuyendo su efectividad e impactando tanto en el ambiente como en la inocuidad de los alimentos. Además, su uso está siendo limitado en distintas partes del mundo e incluso prohibido.

Los métodos de diagnóstico tradicionales, si bien son fundamentales, son técnicas laboriosas que no diferencian la totalidad de las especies de *Eimeria*. En particular, la identificación de las especies que causan coccidiosis aviar es importante dado que poseen distinta patogenicidad y, por lo tanto, el impacto productivo y mortandad asociada varía según la especie involucrada, así como también la susceptibilidad a los distintos anticoccidiales. Además, son inmuno específicas. El surgimiento de nuevas variantes genéticas, subdiagnosticadas, vuelve ineficiente los tratamientos inmunoprolácticos.

Con el objetivo de abordar algunos de estos desafíos para las especies de *Eimeria* infectantes de *Gallus gallus*, proponemos un abordaje integral que incluye en primera medida la utilización de técnicas moleculares para un diagnóstico más específico, el relevamiento epidemiológico y el estado del arte de la coccidiosis aviar en distintos sistemas de producción para poder desarrollar estrategias de control adecuadas. En segunda medida proponemos el desarrollo de nuevas herramientas de control como la búsqueda de alternativas naturales innovadoras y de candidatos vacunales para el desarrollo de vacunas recombinantes en el contexto de la transición hacia modelos más sustentables y que se enmarquen en el concepto de Una Salud.

Palabras clave: Coccidiosis, pollos, gallinas, diagnóstico, biología molecular, Una Salud, proteínas superficiales, GPI, vacunas recombinantes, compuestos naturales

Introducción

La coccidiosis es una enfermedad causada por parásitos apicomplejos de la subclase Coccidia, entre los que se encuentran protozoarios del género *Eimeria*. Es de relevancia para los distintos sistemas productivos, y en particular para la avicultura. El impacto económico global fue recalculado en el año 2021 siendo aproximadamente de €12 billones o US \$14,5 billones⁽¹⁾. Si bien es una enfermedad controlada, suele ser una amenaza y generar brotes cuando fallan las medidas de control.

El ciclo de vida de *Eimeria* sp. es monoxénico. Al igual que otros apicomplejos su ciclo es complejo. Se transmite por vía fecal- oral a través de los ooquistes que se excretan y diseminan de forma no esporulada (no infectiva), pero en el ambiente se produce la esporulación, y se desarrollan en su interior 4 esporocistos que contienen 2 esporozoitos cada uno. Cuando los ooquistes esporulados son ingeridos por las aves a través del alimento y/o agua contaminada, los esporozoitos se liberan (exquistación). Se inicia así el ciclo asexual (esquizogonia), que continúa con la reproducción sexual (gametogonia) y finaliza con la formación de ooquistes no esporulados. Estos son excretados con las heces reiniciando el ciclo (Figura 1,⁽²⁾). Los ooquistes persisten en el ambiente por largos períodos⁽³⁾.

Se conocen siete especies de *Eimeria* que infectan a la especie *Gallus gallus*, cada una de las cuales coloniza distintos sitios del intestino. Dependiendo de la patogenicidad de la especie involucrada, la carga parasitaria y el estado inmunológico de las aves, las infecciones pueden ser subclínicas o clínicas. Recientemente, se han identificado tres nuevas variantes genéticas, subdiagnosticadas, y que escapan a la inmunoprofilaxis⁽⁴⁾.

Los métodos de diagnóstico tradicionales, si bien son fundamentales, son técnicas laboriosas que no diferencian la totalidad de las especies de *Eimeria*. En particular, su identificación certera es importante ya que el impacto productivo, la mortandad asociada y la susceptibilidad a los distintos anticoccidiales varía según la especie involucrada.

Esta enfermedad, al igual que otras, es controlada con buenas medidas de manejo de las aves y granjas, con anticoccidiales de síntesis química o antibióticos (como por ejemplo de la familia de los ionóforos, las sulfonamidas y triacinas), y/o vacunación viva⁽⁵⁾. La aplicación de medicamentos anticoccidiales conlleva a la aparición de cepas resistentes de *Eimeria* spp., disminuyendo su efectividad⁽⁶⁾ e impactando tanto en el ambiente como en la inocuidad de los alimentos^(7,8). Además, están bajo presión a nivel mundial, dada la influencia social por el consumo de alimentos libres de químicos y más saludables. En Argentina, la regulación (N°1119/2018) emitida por el SENASA ha restringido el uso de anticoccidiales químicos. Por su parte, las vacunas vivas con cepas salvajes pueden tener problemas de seguridad para las aves, lo que afecta la productividad⁽⁹⁾. Dado que para adquirir una protección completa las aves deben inmunizarse con todas las especies su fabricación es exigente, estricta y costosa⁽¹⁾. Las vacunas atenuadas poseen un índice reproductivo más bajo, lo que aumenta los costos de su producción. Además, en distintas partes de mundo se está cuestionando el uso de animales para la producción de vacunas⁽¹⁰⁾.

Hasta el momento no hay en el mercado una vacuna de nueva generación⁽²⁾. Las vacunas recombinantes ofrecen una alternativa atractiva y rentable. El primer paso hacia este objetivo se basa en la identificación de antígenos inmunoprotectores y conservados. Las proteínas de superficie ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) son particularmente prometedoras como candidatas vacunales, y se ha demostrado su inmunogenicidad en parásitos apicomplejos relacionados como *Babesia bovis*⁽¹¹⁾ y *Cryptosporidium parvum*⁽¹²⁾ así como también en *Eimeria* sp.^(13,14).

Con el objetivo de generar soluciones en el contexto de la transición hacia modelos más sostenibles, que mejoren la productividad y que se enmarquen en el concepto de Una Salud la línea de investigación en coccidiosis del IP-IPVET propone un abordaje integral que incluye: la utilización de técnicas moleculares para un diagnóstico más específico y el desarrollo de herramientas para la identificación de las nuevas especies; el relevamiento epidemiológico y el estado del arte de la coccidiosis aviar en distintos sistemas de producción; y el desarrollo de nuevas estrategias de control como la búsqueda de alternativas naturales innovadoras y de candidatos vacunales para la generación de vacunas recombinantes.

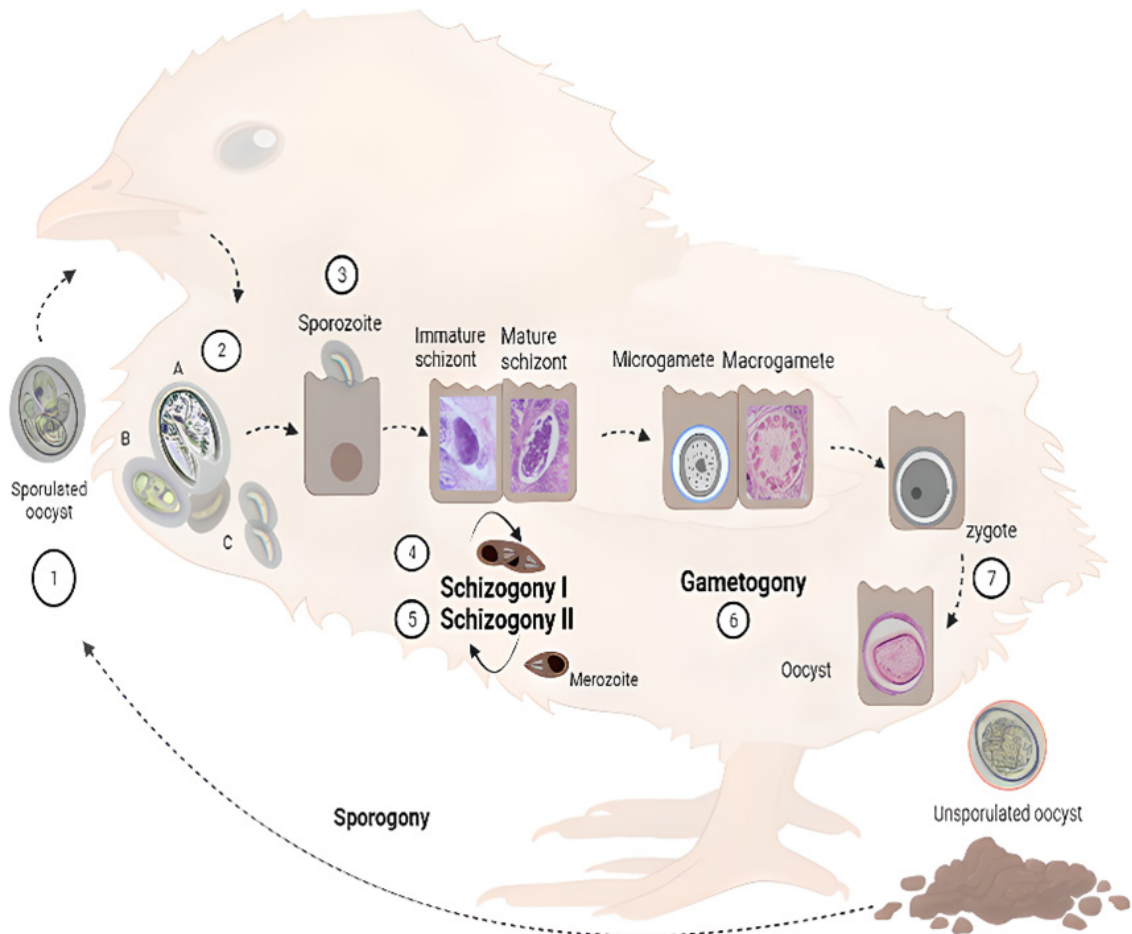


Figura 1. Esquema del ciclo de vida de *Eimeria* spp. en aves⁽²⁾. Los ooquistes esporulados son ingeridos a través del alimento o agua contaminada con (paso 1) y se liberan los esporozoítos contenidos en los 4 esporocistos de los ooquistes en el tracto gastrointestinal (paso 2). Estos invaden las células epiteliales intestinales en diferentes localizaciones según la especie (paso 3), y se desarrollan en la vacuola parasitófora donde experimentan esquizogonia (paso 4), formando trofozoítos que se transforman en esquizontes inmaduros y maduros. Tras dos a cuatro ciclos de esquizogonia (paso 5), los merozoítos invaden nuevas células y ocurre la gametogonia (paso 6) que da lugar a macro y microgametos, los que luego de la fecundación forma el cigoto que origina al ooquistes no esporulado (paso 7) y se excreta con las heces. En el ambiente se produce la esporogonia y se reinicia el ciclo vital. A, B y C son micrografías de parásitos exquistados (ooquistes, esporocistos y esporozoítos, respectivamente). Aumento de 400 X. Los esquizontes, macrogametos y ooquistes inmaduros y maduros son micrografías de secciones histológicas de intestinos de aves infectadas experimentalmente, teñidas con hematoxilina y eosina. Aumento de 1000 X.

Metodología

Diagnóstico de coccidiosis aviar tradicional y molecular

Se realizó el recuento de ooquistes por gramo de materia fecal (OPG) en cámara de McMaster, se realizaron los raspajes seriados de la mucosa intestinal con observación microscópica y se asignaron los puntajes de las lesiones según la escala de Johnson & Reid.

Se implementaron dos PCR-múltiples la identificación certera y en simultáneo de 7 especies⁽¹⁵⁾, previamente se hizo la puesta a punto de la ruptura de ooquistes⁽¹⁶⁾ para la extracción de ADN usando el kit de Wizard (Promega), se estableció el límite de detección analítico y especificidad y se generaron controles positivos por medio del clonado en pGEM®-T (Promega) de las 7 regiones SCAR específicas de cada especie⁽¹⁷⁾. Los productos de PCR se visualizaron bajo luz UV en geles de agarosa teñidos con Sybr Safe (ThermoFisher Scientific) en un Gel Doc Go Gel Imaging System (Biorad).

Infección in vivo

Se utilizó la línea de pollos de engorde Campero-INTA para establecer el modelo de infección⁽¹⁸⁾, que incluyó la evaluación de distintas dosis infectivas de *Eimeria* sp. de un aislamiento local. Se evaluaron los parámetros de infección y productivos, y se calculó el índice de productividad (IP).

Por último, se ensayó un enfoque sustentable, alternativo a los anticoccidiales, utilizando el modelo de infección desarrollado y se evaluaron parámetros de infección y productivos, y se calculó el índice anticoccidial (ACI). Se realizó un análisis de metagenómica mediante secuenciación masiva de última generación (NGT) mediante la plataforma Illumina (kit COVIDseq adaptado 2 × 150 bp lecturas en NovaSeq 6000) a partir del ADN extraído con el kit ADN PuriPrep-Suelo (INBIO HIGHWAY) del biopreparado y cuantificado en nanofotómetro P-Class P330 (Implen). Todos los experimentos con animales fueron aprobados por el CICUAE (27/2023 y 21/2024)⁽¹⁸⁾.

Propagación de *Eimeria* sp.

El grupo de Coccidiosis del IP-IPVET mantiene tanto cepas de referencia como aislamientos locales en pollos de engorde mediante protocolos establecidos y aprobado por el CICUAE (POE AV1).

Bioensayos in vitro

Se desarrollaron ensayos en placas para la fase exógena (Fex) donde se mide el % de disminución de la esporulación y los ooquistes locales de *E. tenella* y *E. acervulina* remanentes luego de incubarlos con compuestos naturales y con extractos metanólicos y etanólicos nativos. Se evaluaron 5 concentraciones tanto de los compuestos como de los diluyentes. Todos los ensayos se realizaron por triplicado biológicos.

Identificación de candidatos vacunales

Se aplicó una estrategia de vacunología reversa utilizando herramientas bioinformáticas aplicadas anteriormente a otros patógenos relacionados^(11,12) combinadas con herramientas de inteligencia artificial (NetPanMHC y NetGPI) para la predicción de atributos inmunológicos y de anclaje a GPI, respectivamente. Para la validación experimental se realizó un análisis de polimorfismo mediante PCR de los genes candidatos a partir de aislamientos de ADN de *Eimeria* sp. locales extraídos con Wizard (Promega) seguidos de NGT y análisis de secuencias. La transcripción génica de estadios infectivos de dos de las especies de *Eimeria* más frecuentes se hizo mediante RT-PCR, a partir de ARN extraído con Trizol® de ooquistes esporulados y esporozoitos exquistados *in vitro* de *E. tenella* y *E. acervulina*. Para el análisis de las secuencias se usaron las herramientas nucleotide-BLAST del NCBI, Clustal omega del EBI, y el programa MEGA 11.

Resultados y discusión

Prevalencia y frecuencia de *Eimeria* sp.

Se realizó un relevamiento de 88 granjas avícolas de pequeña escala con acceso a mercados locales en las regiones periurbanas del Área Metropolitana de Buenos Aires; la Provincia de Buenos Aires; la Región Metropolitana de Santiago de Chile; y la Región del Libertador General Bernardo O'Higgins, Chile, regiones ubicadas geográficamente entre las mismas latitudes en ambos países (Fig. 2A). Mediante el diagnóstico tradicional se observaron ooquistes de *Eimeria* sp. (Fig. 2B) y se estableció una elevada prevalencia del 85,1%, reafirmando el carácter endémico de la enfermedad. Se halló un 50% de casos asintomáticos. Mediante biología molecular se lograron identificar las siete especies de *Eimeria* infectes de pollos y gallinas. Las más prevalentes fueron: *E. mitis* (70,3%), *E. acervulina* (62,2%), *E. tenella* (59,5%), y *E. maxima* (43,2%) seguida de *E. praecox* (32,4%), *E. necatrix* (18,9%), and *E. brunetti* (5,4%) (Fig. 2C). En el 80% de los casos se hallaron mezclas de 2, 3 y 4 especies y en el 20% una sola especie, especialmente en gallinas ponedoras de avanzada edad. Estos resultados, ponen de manifiesto la importancia de la implementación de las herramientas moleculares como complemento del diagnóstico tradicional para identificar las especies de *Eimeria*, especialmente en casos asintomáticos.

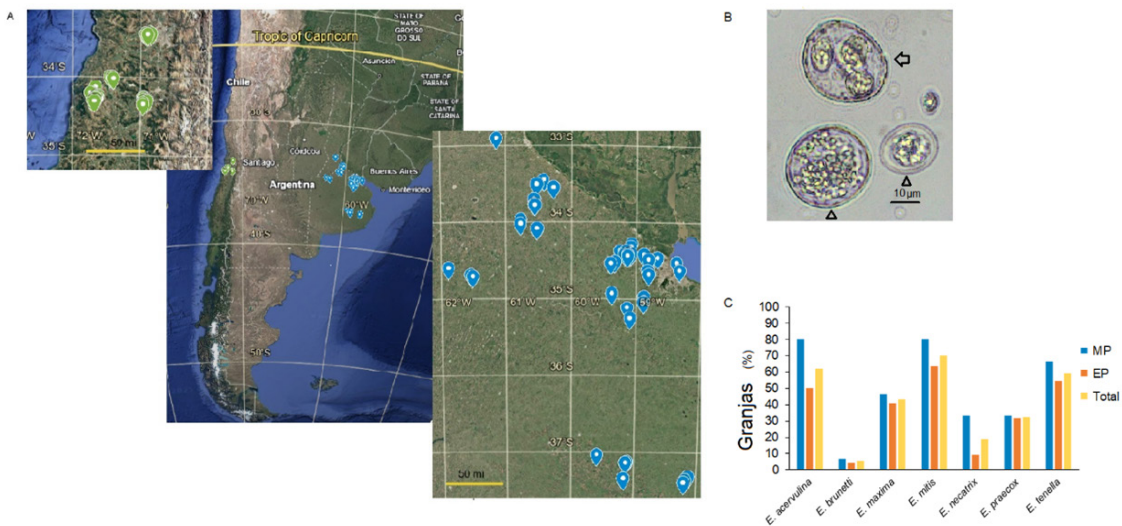


Figura 2. Granjas relevadas y diagnóstico de coccidiosis aviar⁽¹⁷⁾. A. Geolocalización de granjas periurbanas de Argentina y Chile. B. Ooquistes esporulados (flecha) y no esporulados (punta de flecha) de *Eimeria* sp. Aumento total 400 X. C. Distribución de *Eimeria* sp. identificadas por biología molecular en granjas de carne (MP) y de huevos (EP).

Modelo de infección experimental

Se indujo un coccidiosis moderada con lesiones de bajo puntaje, observándose acortamiento de vellosidades intestinales en el duodeno en todos los grupos, y disminución de la relación largo de vellosidades y profundidad de las criptas (VL/CD) conforme aumenta la dosis. Se observó un detrimento de los parámetros productivos como ganancia de peso (GP) y conversión alimenticia (CA), y en consecuencia una disminución en el IP, siendo peor para el grupo experimental de alta dosis (7,99) y menor para el de baja dosis (16,83). De esta manera se estableció como óptima la

dosis intermedia para la evaluación de un modelo alternativo a los anticoccidiales que utilizó una combinación de prácticas de bienestar animal y un biopreparado agregado a la alimentación. Este grupo experimental mostró un ACI alto (180,6) que es considerado de eficacia alta. Se observó recuperación de las vellosidades intestinales, y una disminución marcada de la excreción de ooquistes que se mantuvo hasta el final del ensayo. Los parámetros productivos de todo el ciclo experimental piloto mostraron una mejora del 15% de la CA y un 24% en el IP. En el biopreparado se identificaron bacterias ácido lácticas, probióticas, que explicarían la mejora de los parámetros de infección y productivos (18).

Actividad anticoccidial *in vitro* de extractos vegetales nativos y compuestos naturales

De un total de 6 extractos metanólicos y etanólicos nativos, y 6 compuestos naturales ensayados en 5 concentraciones cada uno se halló 1 extracto nativo y dos compuestos naturales con alto grado de inhibición de los aislamientos locales de *E. tenella* y *E. acervulina* en la Fex. También se observó que un compuesto disminuye significativamente la cantidad de ooquistes remanentes luego del tratamiento. Estos resultados constituyen los primeros indicios de la factibilidad de las técnicas *in vitro* para el screening de compuestos con actividad anticoccidial para su futura comprobación en el modelo de infección *in vivo*, disminuyendo el número de animales experimentales necesarios para la validación como anticoccidiales.

Identificación de candidatos vacunales

Se predijeron un total de 15 genes que codifican posibles proteínas con anclaje GPI en la especie *E. acervulina* y 89 en *E. tenella* a partir de los proteomas de ambas especies depositados en la base de datos del NCBI. De estas, se seleccionaron tres y cinco, respectivamente, para el análisis de polimorfismo. En ellos se halló una alta conservación génica, donde *etsag4* y *ethyp* mostraron una identidad del 100% entre las secuencias argentinas y las de referencia. En contraposición, el gen *etsag1* presentó dos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en los aislamientos argentinos. El análisis de filogenia reveló que podrían ser mutaciones locales dado que esta secuencia agrupa en una rama aparte del resto de las secuencias argentinas, las que a su vez agrupan en una rama separada del resto de las secuencias de India, Corea y China⁽¹⁹⁾.

Luego se analizó la expresión de estos genes en etapas clave del parásito por RT-PCR y se halló transcripción tanto en ooquistes esporulados como en esporozoitos de *E. tenella* y *E. acervulina*, con la excepción de un gen que solo se expresó en ooquistes esporulados de *E. acervulina*. En la actualidad se está realizando la expresión de las proteínas recombinantes, se expresó y purificó con éxito una forma soluble de la proteína *EtSAG1* en la bacteria *Escherichia coli*. Este es un paso inicial crucial para evaluar su potencial de reconocimiento inmune. La relevancia de estos hallazgos radica en que la alta conservación de los candidatos *etsag4* y *ethyp* sugiere que podrían ser componentes de vacunas universales, mientras que la presencia de SNPs en *etsag1* abre la posibilidad de diseñar vacunas para nuestra región.

Conclusión

El trabajo multidisciplinario realizado hasta el momento condujo a resultados valiosos sobre la coccidiosis aviar, aportando las primeras aproximaciones sobre la caracterización de las granjas de pequeña escala en Argentina y Chile y proporcionando información sobre prevalencia y diversi-

dad de especies de *Eimeria* circulantes en dos países sudamericanos. El conocimiento adquirido es útil para introducir mejoras de higiene y manejo que no solo reducirán la propagación ambiental del parásito, sino que también disminuirán el uso de las drogas anticoccidiales que impactan en el ambiente, en los animales y en la salud humana. Asimismo, se está trabajando en el desarrollo de nuevas herramientas que permitan identificar las 3 nuevas especies, lo cual contribuirá al conocimiento epidemiológico global.

En relación al segundo objetivo que engloba la generación de nuevas herramientas de control se logró establecer el modelo de infección in vivo en donde demostramos que la inducción de una infección leve a moderada con las especies de *Eimeria* locales causa una disminución en los parámetros productivos en una línea de producción propia de pollos de crecimiento lento, Campeño-INTA, lo que se reflejó en un menor IP en comparación con el grupo control no desafiado. Este primer paso permitió evaluar un biopreparado agregado a la alimentación en un ensayo piloto que podría ser altamente efectivo para controlar esta enfermedad parasitaria prevalente y mejorar los parámetros productivos y, en consecuencia, disminuir el impacto económico de la coccidiosis en las granjas. Este enfoque también podría ofrecer ventajas ambientales, mejorar el confort animal y minimizar el impacto ambiental de los medicamentos anticoccidiales actualmente utilizados. El análisis metagenómico realizado en el biopreparado demostró que los principales microorganismos son bacterias probióticas ácido-lácticas, sentando una base sólida para futuros estudios sobre aplicaciones probióticas.

Por otra parte, si bien la confirmación de la actividad anticoccidial de un compuesto requiere la validación in vivo, el desarrollo de un bioensayo ofrece la posibilidad de evaluar distintos componentes *in vitro*, evitando el uso innecesario de animales de experimentación.

Por último, el enfoque de vacunología reversa demuestra el valor de combinar la bioinformática con ensayos experimentales para identificar antígenos que permitan el desarrollo de vacunas aviares de nueva generación. El siguiente paso a corto plazo es evaluar el reconocimiento inmunológico de la proteína *EtSAG1* con sueros de pollos infectados. A más largo plazo se espera caracterizar los candidatos hipotéticos hallados, así como también explorar nuevas plataformas de expresión y desarrollar una vacuna costo-efectiva contra la coccidiosis aviar.

En conclusión, la línea de Coccidiosis del IP-IPVET logró alcanzar el objetivo general de abordar esta enfermedad de manera integral para generar información sobre la coccidiosis a nivel local con implicancias en la región y en el mundo, logrando establecer vinculaciones con el medio productivo y colaboraciones tanto con investigadores/as de la Argentina como del extranjero, sentando una base sólida para su continuidad y fortalecimiento. Este enfoque multidisciplinario y colaborativo no solo ha generado valiosos conocimientos científicos, sino que también ha sentado las bases para el desarrollo de nuevas tecnologías que contribuirán a la sustentabilidad de la producción avícola y a la salud global, en el marco del concepto de Una Salud.

Agradecimientos y financiamiento: Queremos agradecer a los/as investigadores/as, técnicos/as y personal de apoyo que mantienen una colaboración activa y fructífera con el grupo de Coccidiosis y que contribuyeron significativamente: a los equipos del Dr. Delgado, del Dr. Schapiro, a la Dra. Diciaccio, y al/la M.V. Barbano y Berardo (ex EEA-AMBA) del IP-IPVET; a la Dra. Canet de la EEA-Pergamino; al Dr. Gramaglia de la AER-Villa Dolores; al Dr. Poklepovich del Instituto Malbrán; al equipo de la Dra. Ramirez-Tolosa de la Universidad de Chile y al Dr. Alegría-Morán de la Universidad de Santo Tomás de Sgo. de Chile; y a la Dra. Marugán-Hernandez de Royal Veterinary College de Londres, Reino Unido.

Los trabajos fueron financiados por FONTAGRO ATN RF-18136-RG, PICT GRF-TI-00656, y 5 proyectos de INTA: PD-L01-I1113-P27-A26, PD-L06-I1116-P02-A12, PE-I078-P04-A005, PD-L06-I1114 y RIST-E5-I1111-001.

Bibliografía

- (1) Blake DP, Marugan-Hernandez V, Tomley FM. Spotlight on avian pathology: *Eimeria* and the disease coccidiosis. *Avian Pathology*. 2021;50(3):209-13.
- (2) Britez JD, Rodriguez AE, Di Ciaccio L, Marugán-Hernandez V, Tomazic ML. What Do We Know about Surface Proteins of Chicken Parasites *Eimeria*? *Life*. 31 de mayo de 2023;13(6):1295.
- (3) Bangoura B, Dausgschies A. *Eimeria*. En: Florin-Christensen M, Schittger L, editores. *Parasitic protozoa of farm animals and pet*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing; 2018. p. 55-102.
- (4) Blake DP. *Eimeria* of chickens: the changing face of an old foe. *Avian Pathology*. 4 de mayo de 2025;54(3):267-78.
- (5) Mesa C, Gómez-Osorio LM, López-Osorio S, Williams SM, Chaparro-Gutiérrez JJ. Survey of coccidia on commercial broiler farms in Colombia: frequency of *Eimeria* species, anticoccidial sensitivity, and histopathology. *Poultry Science*. agosto de 2021;100(8).
- (6) Zhang H, Zhang L, Ren G, Si H, Song X, Liu X, et al. Forward genetic analysis of monensin and diclazuril resistance in *Eimeria tenella*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. agosto de 2023;22:44-51.
- (7) Siddiki AZ, Karim MJ, Chowdhury EH. Sulfonamide Resistance in Chicken Coccidiosis: A Clinico-Pathological Study. *Bangladesh J Microbiol*. 2008;25(1):60-4.
- (8) Scicutella F, Mannelli F, Daghighi M, Viti C, Buccioni A. Polyphenols and Organic Acids as Alternatives to Antimicrobials in Poultry Rearing: A Review. *Antibiotics*. 20 de agosto de 2021;10(8):1010.
- (9) Lehman R, Moran ET, Hess JB. Response of coccidiostat- versus vaccination-protected broilers to gelatin inclusion in high and low crude protein diets. *Poultry Science*. mayo de 2009;88(5):984-93.
- (10) Soutter F, Werling D, Nolan M, Küster T, Attree E, Marugán-Hernández V, et al. A Novel Whole Yeast-Based Subunit Oral Vaccine Against *Eimeria tenella* in Chickens. *Front Immunol*. 2 de febrero de 2022;13:809711.
- (11) Flores DA, Rodriguez AE, Tomazic ML, Torioni de Echaide S, Echaide I, Zamorano P, et al. Characterization of GASA-1, a new vaccine candidate antigen of *Babesia bovis*. *Veterinary Parasitology*. 2020;287.
- (12) Tomazic ML, Rodriguez AE, Lombardelli J, Poklepovich T, Garro C, Galarza R, et al. Identification of novel vaccine candidates against cryptosporidiosis of neonatal bovines by reverse vaccinology. *Veterinary Parasitology*. 2018;264(November):74-8.
- (13) Tabarés E, Ferguson D, Clark J, Soon PE, Wan KL, Tomley F. *Eimeria tenella* sporozoites and merozoites differentially express glycosylphosphatidylinositol-anchored variant surface proteins. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2004;135(1):123-32.
- (14) Song X, Gao Y, Xu L, Yan R, Li X. Partial protection against four species of chicken coccidia induced by multivalent subunit vaccine. *Veterinary Parasitology*. 2015;212(3-4):80-5.
- (15) Fernandez S, Pagotto A, Furtado M, Katsuyama Â, Madeira AB, Gruber A. A multiplex PCR assay for the simultaneous detection and discrimination of the seven *Eimeria* species that infect domestic fowl. *Parasitology*. 2003;127(4):S0031182003003883.
- (16) Pisón Martínez ML; Britez JD; Rodriguez AE; Tomazic ML. Efecto de la ruptura de ooquistes de *Eimeria* spp. en la identificación de especies mediante PCR múltiple. En: XII Jornadas Jóvenes investigadores, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. 2023.
- (17) Tomazic ML, Britez JD, Pisón-Martínez ML, Barbano P, Canet Z, Trangoni MD, et al. Chicken Coccidiosis in Peri-Urban Family Farming in Two South American Countries: Prevalence and Circulating *Eimeria* spp. *Animals*. 29 de marzo de 2025;15(7):982.

- ⁽¹⁸⁾Rodriguez AE, Britez JD, Pisón-Martínez ML, Delgado FO, Balbiani F, Berardo CC, *et al.* Evaluating Good Husbandry Practices and Organic Fermented Additives for Coccidiosis Control in a Pilot Study Using Slow-Growing Broilers. *Animals*. 13 de junio de 2025;15(12):1752.
- ⁽¹⁹⁾Britez, JD; Pisón-Martínez, ML; Cuba, FG, Poklepovich, TJ; Marugan-Hernandez, V; Rodriguez AE Tomazic, ML. Identification of conserved putative surface antigens expressed in infective stages of *Eimeria tenella* and *E. acervulina* through reverse vaccinology. En La Palta; 2024.

B Diagnóstico de los protozoos Apicomplejos

Evolución de los métodos de diagnóstico para neosporosis y toxoplasmosis en animales. Su realidad en Argentina

Venturini M. C.¹; Pardini L.^{1,2}; Rambeaud M.¹; Campero L. M.²; Dellarupe A.^{1,2}; Gos M. L.¹; Unzaga J. M.¹.

Laboratorio de Inmunoparasitología, LAINPA

¹Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP.

²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

Neospora caninum y *Toxoplasma gondii* son protozoos intracelulares del Phylum Apicomplexa, familia *Sarcocystidae* importantes en la salud animal y en la salud pública.

Toxoplasma gondii afecta a mamíferos y aves, y se encuentra distribuido mundialmente. Tiene un ciclo evolutivo indirecto facultativo; los félidos son los hospedadores definitivos y numerosas especies de mamíferos y aves son los hospedadores intermediarios. En los pequeños rumiantes puede ser causa de aborto o muerte perinatal, causando pérdidas económicas. En los cerdos puede ocasionar natimortos y en caninos puede generar signos neuromusculares, debiendo diferenciarse de neosporosis. La toxoplasmosis es una importante zoonosis, pudiendo causar lesiones oculares de intensidad variable y alteraciones cerebrales graves en neonatos cuando la infección ocurre durante el embarazo, y toxoplasmosis ocular o encefalitis especialmente en individuos inmunocomprometidos (Dubey, 2022).

Neospora caninum ha sido reconocido como una importante causa de abortos en bovinos en distintos países del mundo y de signos neuromusculares en perros. Afecta a muchas especies de mamíferos, entre ellas perros, bovinos, caprinos, ovinos, así como a animales silvestres. En 1998 se comprobó en forma experimental, que el perro podía actuar como hospedador definitivo de *N. caninum* (McAllister y col., 1998). En 2001 se describió en Argentina el primer aislamiento de *N. caninum* a partir de ooquistes hallados en heces de un perro naturalmente infectado (Basso y col., 2001). Los hospedadores definitivos pueden ser también otros cánidos silvestres como coyotes, dingos y lobos grises. Si bien se han detectado anticuerpos en distintas especies de zorros, no se han identificado ooquistes en la materia fecal, por lo que su rol como hospedador definitivo en la epidemiología de la neosporosis aún no se conoce.

Las formas infectantes de *T. gondii* y *N. caninum* son los taquizoítos, los quistes (bradizoítos) presentes en los tejidos de los hospedadores intermediarios y los ooquistes maduros (esporozoítos) que se encuentran en la materia fecal de los félidos y cánidos respectivamente.

En 1989 se iniciaron estudios de toxoplasmosis en el Laboratorio de Inmunoparasitología (LAINPA) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP) a través de un convenio de Cooperación entre la FCV-UNLP y la Universidades de Tokyo y de Obihiro, auspiciado por la agencia Internacional de Cooperación de Japón (JICA). Inicialmente se orientaron a la detección de anticuerpos anti *T. gondii*. Posteriormente se obtuvieron los primeros aislamientos en el país de este protozoo, a partir de diafragma de cerdos de frigorífico, los que se conservan hasta la actualidad. Hasta ese momento solo había antecedentes de estudios serológicos en algunas provincias como Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe. Posteriormente entre 2005 al 2008, se realizaron aislamientos a partir de especies silvestres en cautiverio provenientes del Zoológico de la ciudad de La Plata que desarrollaron toxoplasmosis aguda, entre ellas, de mono Saimiri, canguro rojo, canguro gris, *wallaby* y suricata. En el periodo 2009-2010, como parte de un proyecto de cooperación bilateral con Alemania (DAAD-MiCyT), se realizaron muestreos a partir de gallinas de traspatio que son buenas centinelas de la contaminación ambiental por *T. gondii*. Además, se obtuvieron aislamientos de otras especies de producción como cabras (2000) y conejos (2011) y se

detectó ADN y genotipificó el parásito a partir de tejidos de un perro con signos neurológicos y de roedores sinantrópicos, como así también de ooquistes provenientes de gatos domésticos (2010-2013-2014). En el año 2012, en colaboración con el Hospital Alemán de Buenos Aires se realizó el primer aislamiento y caracterización molecular de un caso de toxoplasmosis congénita humana a partir de la placenta. Se continúa trabajando hasta la actualidad y se han obtenido hasta la fecha 11 aislamientos a partir de casos humanos (Bernstein y col., 2018).

En 1995 se realizó la primera determinación de la presencia de *N. caninum* en rodeos lecheros en el país, a través de la detección de anticuerpos mediante una prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando un kit comercial importado (Venturini y col., 1998) y en el año 1998 se detectó la presencia del parásito en un feto bovino mediante Inmunohistoquímica (Campero y col., 1998).

En un principio, para determinar la presencia de ambos protozoos, se utilizaron métodos de diagnóstico directos basados en la observación de muestras de tejidos en fresco, estudios histopatológicos y técnicas inmunohistoquímicas. Sin embargo, esta última, desde un punto de vista práctico, ha sido sustituida en la actualidad por el uso de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite un resultado preciso y menos laborioso.

La prueba de PCR para el diagnóstico de *T. gondii* se puede realizar amplificando segmentos de ADN utilizando el par de cebadores B22/B23 para el gen B1 y los pares TOX4-TOX5, TOX5-TOX8 (Howe y col., 1997). Mediante nPCR-RFLP en la actualidad se utilizan entre 9 y 11 marcadores para identificar los diferentes clonotipos utilizando como marcadores los loci SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, L358, PK1, c29-2 y Apico (Su y col., 2010), permitiendo diferenciar genotipos clonales y no clonales.

Los aislamientos de *T. gondii* descritos en Europa y USA son predominantemente clonales I, II o III, y en África, Asia, Centro y Sudamérica se describen mayormente genotipos no clonales o atípicos, siendo variable la virulencia de los mismos, situación que ha orientado varias líneas de investigación en el LAINPA, tendientes a determinar el comportamiento biológico de los aislamientos locales. En el año 2012 se realizó la primera caracterización molecular de *T. gondii* aislado de una placenta humana y posteriormente se obtuvieron aislamientos con genotipos atípicos (2014-actualidad). El método de aislamiento por bioensayo en modelo de ratón y la caracterización molecular por nPCR-RFLP con 11 marcadores, han permitido identificar en el LAINPA 20 aislamientos y 8 muestras de ADN de *T. gondii* obtenidos de muestras de animales domésticos (gallinas de traspatio, cabra, cerdos de frigorífico, gatos, perro, conejo), de zoológico (mono, canguros, suricata) y de roedores sinantrópicos. Además, se han obtenido, 11 aislamientos humanos provenientes de casos de toxoplasmosis congénita. Todas las muestras mencionadas, caracterizadas molecularmente, son coincidentes con 22 genotipos. El relevamiento serológico en las especies mencionadas, especialmente gallinas de traspatio, de diferentes regiones geográficas ha permitido determinar indirectamente el grado de contaminación ambiental y, como consecuencia, el riesgo de contaminación para los seres humanos. La diversidad de genotipos compartidos entre animales y humanos demuestra la circulación de los mismos entre especies (Bernstein y col., 2018).

La técnica de aislamiento no se incluye normalmente en la rutina del diagnóstico de *N. caninum* debido a su dificultad y poca probabilidad de éxito. El uso de animales de laboratorio inmunosuprimidos ya sea mediante el suministro de corticoides (i.e. meriones) o de cepas de ratones genéticamente modificadas, como los ratones *knockout* para INF gamma aumentan sustancialmente la probabilidad de replicación parasitaria y por ende, de aislamiento (Dubey y col., 2017).

Los aislamientos de *N. caninum* en el mundo son limitados. En Argentina hasta la fecha son 4: a partir de ooquistes detectados en materia fecal de un perro naturalmente infectado, denomi-

nada NC-6 Argentina (Basso y col., 2001), de órganos de un cervato NC- Axis proveniente de un zoológico y 2 de origen bovino. Estos últimos se obtuvieron a partir de tejido nervioso de un ternero asintomático congénitamente infectado con *N. caninum* de un tambo, que fue denominado NC-Argentina LP1 y de un feto de 6 meses de gestación, obtenido de una necropsia, proveniente de un rodeo de carne, denominado NC-Argentina LP2 (Campero y col., 2023).

Con respecto a la cepa NC-6 Argentina, en 2014 se realizó la comparación *in vitro* de la virulencia entre cuatro cepas obtenidas de ooquistes, como la NC-6 Argentina, y otras dos cepas obtenidas a partir de tejidos de perros con signos neurológicos. Las cepas obtenidas de ooquiste demostraron una moderada virulencia mientras que las obtenidas de tejidos fueron altamente virulentas demostrando la importancia de la capacidad de invasión y proliferación de las diferentes cepas de este protozoo en la virulencia de los aislamientos caninos. (Dellarupe y col., 2014).

En 2018, Campero y col., identificaron molecularmente *N. caninum* a partir de un feto proveniente de una cabra Anglo Nubian seropositiva, pudiendo determinar su perfil genético mediante el uso de microsatélites (Campero y col., 2023). En todos los casos la caracterización molecular de *N. caninum* fue realizada mediante microsatélites.

En cuanto a la detección de anticuerpos, para lo que se utilizan métodos indirectos, a lo largo de estos años, las distintas posibilidades de los laboratorios de diagnóstico han condicionado el uso de pruebas serológicas comerciales importadas y propiciado el desarrollo de pruebas *in-house*.

La sensibilidad y especificidad de estas pruebas varía entre otros factores, de acuerdo a las características del antígeno utilizado. En algunas de ellas el antígeno consiste en taquizoítos enteros, por lo que los epitopos superficiales son los que están expuestos; en otras pruebas se utilizan taquizoítos fragmentados por diferentes métodos, en los cuales están mayormente expuestos los epitopos citoplasmáticos. Para el diagnóstico en especies domésticas de compañía como perros y gatos se ha difundido el uso de la prueba de IFI, con taquizoítos completos fijados a un portaobjeto, como antígeno. Es importante tener en cuenta que como conjugado, se debe utilizar anti-inmunoglobulina anti-especie específica (anti- gato, anti-oveja, anti-cabra, anti-bovino, anti-perro, etc.). Las pruebas de ELISA también permiten la detección de IgG e IgM, siendo tan sensibles como la IFI. Las pruebas de ELISA indirecto sólo pueden utilizarse para la detección de anticuerpos en la especie indicada en las instrucciones del laboratorio productor, debido a que el conjugado es específico. Las pruebas de aglutinación directa, utilizadas en toxoplasmosis, se basan en el uso de taquizoítos completos inactivados generalmente con formol, que se enfrentan con el suero problema en distintas diluciones. En las de aglutinación indirecta, las fracciones antigénicas de los taquizoítos son adsorbidas a partículas utilizadas como soporte (glóbulos rojos, partículas de látex). Si bien pueden utilizarse para estudios de prevalencia serológica, no son aconsejables para el diagnóstico y seguimiento serológico ya que, por sus características, no detectan estados iniciales de la infección. Si bien existen en el mercado nacional pruebas que han sido desarrolladas para el diagnóstico en humanos, es importante enfatizar que las mismas no deberían usarse en animales sin una validación previa. En el diagnóstico de casos clínicos en caninos, la IFI sigue siendo la herramienta más utilizada para el diagnóstico de ambos protozoos (Venturini y col., 2024)

En 2015 se publicaron los resultados de la evaluación de un ELISA *in-house* para el diagnóstico serológico de la neosporosis bovina que utilizó como antígeno la proteína peso molecular relativo de 38 kDa de *N. caninum*. Para su validación se utilizó un panel de sueros negativos y positivos para 2 pruebas (*Immunoblot* e IFI) que constituyeron el estándar relativo de comparación, demostrando dicho ELISA una excelente concordancia (Campero y col., 2015). En 2018 se realizó un ensayo interlaboratorial que incluyó la participación de laboratorios de Argentina (4), Brasil (1), España (1), Méjico (1) y Perú (1). Este estudio permitió comparar las pruebas serológicas más comúnmente

utilizadas (IFI, ELISA comercial, ELISA *in house*) en bovinos para la serología de *N. caninum* (Campero y col., 2017).

Frente a la variabilidad de los costos de los kits importados, el desarrollo local de pruebas diagnósticas a partir de metodologías *in-house* que permitan ser producidas en escala en un esfuerzo conjunto público-privado, sigue siendo un desafío pendiente, que requiere evaluar costos y beneficios en función de la situación epidemiológica de estas enfermedades. Asimismo, es clave avanzar en la validación de pruebas entre laboratorios, con el fin de obtener resultados comparables en cuanto a diagnóstico y prevalencia, adaptándose a los recursos y capacidades disponibles

Referencias:

- Basso, W., Venturini, L., Venturini, M. C., Hill, D. E., Kwok, O., Shen, S., & Dubey, J. P. (2001). First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *Journal of Parasitology*, 87(3), 612–618. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0612:FIONCF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0612:FIONCF]2.0.CO;2)
- Bernstein, M., Pardini, L., Moré, G., Unzaga, J. M., Su, C., & Venturini, M. C. (2018). Population structure of *Toxoplasma gondii* in Argentina. *Infection, Genetics and Evolution*, 65, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.07.027>
- Campero, C. M., Anderson, M. L., Conosciuto, G., Odriozola, H., Bretschneider, G., & Poso, M. A. (1998). *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in Argentina. *Veterinary Record*, 143(8), 228–229. <https://doi.org/10.1136/vr.143.8.228>
- Campero, L. M., Basso, W., Moré, G., Fiorani, F., Hecker, Y. P., Echaide, I., Cantón, G. J., Cirone, K. M., Campero, C. M., Venturini, M. C., & Moore, D. P. (2023). Neosporosis in Argentina: Past, present and future perspectives. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 41, 100882. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2023.100882>
- Campero, L. M., Minke, L., Moré, G., Rambeaud, M., Bacigalupe, D., Moore, P., Hecker, Y., Campero, C., Schares, G., & Venturini, M. C. (2015). Evaluation and comparison of serological methods for detection of bovine neosporosis in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(4), 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.07.003>
- Campero, L. M., Moreno-Gonzalo, J., Venturini, M. C., Moré, G., Dellarupe, A., Rambeaud, M., Valentini, B., Echaide, I., Campero, C. M., Moore, D. P., Fort, M., Mota, R. A., Serrano-Martínez, M. E., Cruz-Vázquez, C., Ortega-Mora, L. M., & Álvarez-García, G. (2017). An Ibero-American inter-laboratory trial to evaluate serological tests for the detection of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle. *Tropical Animal Health and Production*, 49(8), 1645–1650. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1401-y>
- Dellarupe, A., Regidor-Cerrillo, J., Jiménez-Ruiz, E., Schares, G., Unzaga, J. M., Venturini, M. C., & Ortega-Mora, L. M. (2014). Comparison of host cell invasion and proliferation among *Neospora caninum* isolates obtained from oocysts and from clinical cases of naturally infected dogs. *Experimental Parasitology*, 145(1), 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.07.010>
- Dubey, J. P. (2022). *Toxoplasmosis of animals and humans* (3rd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003269185>
- Dubey, J. P., Hemphill, A., Calero-Bernal, R., & Schares, G. (2017). *Neosporosis in animals* (1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315152624>
- Howe, D. K., & Sibley, L. D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: Correlation of parasite genotype with human disease. *Journal of Infectious Diseases*, 172(6), 1561–1566. <https://doi.org/10.1093/infdis/172.6.1561>
- McAllister, M. M., Dubey, J. P., Lindsay, D. S., Jolley, W. R., Wills, R. A., & McGuire, A. M. (1998). Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, 28(9), 1473–1478. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00138-6](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00138-6)
- Su, C., Shwab, E. K., Zhou, P., Zhu, X. Q., & Dubey, J. P. (2010). Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*, 137(1), 1–11. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991065>

Venturini, L., Di Lorenzo, C., Venturini, M. C., & Romero, J. (1995). Anticuerpos anti-*Neospora* sp. en vacas que abortaron. *Veterinaria Argentina*, 12(117), 167–170.

Venturini, M. C., & Rambeaud, M. (2024). *Fundamentos de inmunología en los animales domésticos* (1.ª ed.). EDULP, Universidad Nacional de La Plata. <https://doi.org/10.35537/10915/177145>

B Diagnóstico de los protozoos Apicomplejos

ELISAs de competición para la detección de anticuerpos contra *Neospora caninum*

Beatriz S. Valentini, María B. Novoa, Susana Torioni de Echaide, Ignacio E. Echaide, María E. Primo

Instituto de Investigación de la Cadena Láctea (INTA-CONICET), Rafaela, Santa Fe, Argentina.
primo.maria@inta.gob.ar

La neosporosis es una enfermedad infecciosa causada por el protozoo apicompleja *Neospora caninum* que afecta a diferentes especies de animales domésticos y silvestres. En bovinos se manifiesta por la ocurrencia de abortos y esporádicamente por parálisis locomotriz en terneros recién nacidos (Dubey *et al.*, 2007). En pequeños rumiantes, la neosporosis también ha sido identificada como causa de abortos (Barr *et al.*, 1992; Dubey *et al.*, 2007). La enfermedad tiene un curso crónico y la infección puede persistir durante toda la vida del animal (Dubey & Lindsay, 1996).

Neospora caninum se distribuye a nivel mundial y la enfermedad causa graves pérdidas económicas a la industria ganadera (Reichel *et al.*, 2013). Actualmente no existe ningún tratamiento quimioterapéutico eficaz ni vacuna para su prevención. El conocimiento de la seroprevalencia permite diseñar estrategias de manejo para el control eficaz de la neosporosis (Rimayante *et al.*, 2025; Guido *et al.*, 2016).

Se han desarrollado diversas pruebas para la detección de anticuerpos contra *N. caninum*. La inmunofluorescencia indirecta (IFI) fue la primera prueba serológica estandarizada para el diagnóstico de la neosporosis y ha sido considerada durante muchos años la técnica de referencia, a pesar de ser laboriosa y la interpretación de sus resultados subjetiva. Actualmente se comercializan diversos enzoinmunoanálisis (ELISA) que permiten reemplazar a la IFI en estudios epidemiológicos a gran escala. La mayoría de ellos son indirectos y están basados en lisados de taquizoitos purificados (Álvarez-García *et al.*, 2013), lo que favorecería la sensibilidad de la prueba por la presentación simultánea de múltiples antígenos. Sin embargo, algunos de estos antígenos podrían ser reconocidos por anticuerpos inducidos por otros miembros de la familia *Sarcocystidae* (Gondim *et al.*, 2017), lo que afectaría la especificidad de la prueba. El uso de antígenos recombinantes permite el desarrollo de ELISAs más específicos, fáciles de producir y estandarizar.

En Argentina, los laboratorios de diagnóstico utilizan kits de ELISA comerciales importados, siguiendo las indicaciones de los fabricantes. Los resultados de estos kits podrían no reflejar la situación precisa de la enfermedad en esta región porque los puntos de corte sugeridos fueron obtenidos en otros contextos epidemiológicos (Campero *et al.*, 2021). Los trabajos que han comparado diferentes kits de diagnóstico comerciales concluyeron que se deberían realizar reajustes del punto de corte de las pruebas con el fin de maximizar los valores de sensibilidad y especificidad diagnósticas (SeD y EsD) para cada región (Björkman *et al.*, 2004; Álvarez-García *et al.*, 2013).

En el laboratorio de Inmunología y Parasitología Veterinaria de la EEA-Rafaela primero se desarrolló y validó un ELISA de competición (ELISAc) basado en el lisado de taquizoitos y el anticuerpo monoclonal (AcM) Neo5F8 (ELISAc_{taq}). Posteriormente, al identificarse que la proteína reconocida por el AcM Neo5F8 era el antígeno principal de superficie SAG1, se desarrolló y validó un ELISAc basado en el antígeno recombinante SAG1 y el mismo AcM Neo5F8 (ELISAc_{SAG1}).

ELISAc_{taq} y ELISAc_{SAG1}

Anticuerpo monoclonal Neo5F8. Este anticuerpo fue seleccionado de un panel de AcM generados por inoculación de ratones BALB/c con antígeno solubilizado de la cepa NC1 siguiendo un protocolo convencional (Valentini *et al.*, 2016). Para su producción, el hibridoma productor del AcM Neo5F8 fue cultivado en botellas F225 en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco, EE. UU.) suplementado con un 10 % (v/v) de suero fetal bovino (SFB, Gibco, EE. UU.), gentamicina 50 µg/mL y L-glutamato al 1 % en una incubadora humidificada con un 5 % de CO₂ a 37°C. Cuando se formó una monocapa, las células se recogieron en tubos de 50 mL, se lavaron dos veces con PBS y se cultivaron en botellas F225 con el mismo medio sin SFB. El AcM Neo5F8 se purificó del sobrenadante de cultivo obtenido luego de 7 días de incubación, en una columna de proteína *G-Sepharose* (General Electric, EE. UU.). El AcM purificado se conjugó con peroxidasa siguiendo el protocolo de Nakane y Kawaoi (1974), se fraccionó en alícuotas y se conservó a -20°C hasta su uso.

Antígeno basado en el lisado de taquizoitos. Los taquizoitos de la cepa NC1 de *N. caninum* se mantuvieron *in vitro* mediante pasajes continuos en cultivo de células VERO. Cuando el 80 % de las células estuvieron infectadas, se cosecharon y se pasaron dos veces por una aguja hipodérmica calibre G-25 para liberar los taquizoitos, los que finalmente se purificaron de los detritos celulares por un gradiente de Percoll (Rodríguez *et al.*, 1986). El antígeno solubilizado se obtuvo luego de la lisis de los taquizoitos mediante sonicación en frío, usando dos series de 3 ciclos de 20 s (Sonicador Virsonic 300, Virtis) y centrifugación a 20.000 xg. El antígeno fue titulado frente a un suero de referencia, fraccionado en alícuotas y mantenido a -20°C.

Antígeno basado en la proteína SAG1 recombinante. Una variante truncada de la proteína SAG1 (tSAG1, residuos 22-303) fue expresada y purificada de la fracción soluble de un lisado de *Escherichia coli*. Brevemente, las bacterias *E. coli* BL21(DE3) pLysS transformadas con el vector pET9b-tSAG1-H6 fueron cultivadas en 500 mL de medio de cultivo Luria-Bertani (LB) suplementado con 50 µg/mL kanamicina y 34 µg/mL cloranfenicol hasta alcanzar una DO_{600nm} = 1. La expresión de la proteína se indujo con 1 % de lactosa a 37°C durante 3 h, con agitación (200 rpm). Al cabo de ese tiempo las bacterias se colectaron por centrifugación (6.000 xg, 15 min, 4 °C) y luego de la lisis celular por presión (20.000 psi, Emulsiflex B15; Avestin, Canadá), la proteína tSAG1 se purificó por afinidad en una columna de NTA-Ni²⁺ (Novoa *et al.*, 2020a).

Validación de los ELISAc

La validación del ELISAc_{taq} y del ELISAc_{SAG1} en bovinos se realizó utilizando una seroteca de muestras proveniente de un estudio longitudinal realizado en un rodeo lechero de la provincia de Córdoba, con antecedentes de abortos por *N. caninum* y baja tasa de reposición (Echaide *et al.*, 2002). Las vacas fueron muestreadas durante 3 años y las muestras de los animales que resultaron consistentemente positivas o negativas por IFI en todos los muestreos fueron utilizadas para el ensayo de validación. Para pequeños rumiantes la validación del ELISAc_{SAG1} se realizó con muestras de suero de cabras y ovejas provenientes de las provincias de Santa Fe y Entre Ríos, clasificadas como infectadas o no infectadas por *N. caninum* cuando los resultados por IFI e *immunoblot* (IB) fueron concordantemente positivos o negativos. Los puntos de corte, SeD y EsD, obtenidos para los dos ELISAc, mediante el análisis de curvas ROC (MedCalc Statistical Software, Bélgica) para cada especie analizada se muestran en la tabla 1A. La concordancia entre pruebas para las diferentes especies fue evaluada y categorizada a través del índice *kappa* de Cohen mediante el programa MedCalc.

Tabla 1. Validación de los ELISAc. A) Punto de corte, sensibilidad diagnóstica (SeD) y especificidad diagnóstica (EsD) del ELISAc_{taq} en bovinos y del ELISAc_{SAG1} en bovinos y pequeños rumiantes. B) Evaluación a campo del ELISAc_{taq} en bovinos y del ELISAc_{SAG1} en bovinos, caprinos, ovinos y ciervos.

A) Ensayos de Validación						
		Muestras (n)		Punto de corte	SeD (%)	EsD (%)
	Animales	Positivas	Negativas	(% Inhibición)	(95% CI)	(95% CI)
¹ ELISAc _{Taq}	Bovinos	212	185	≥ 25	96,7 (93,4-98,7)	98,9 (96,2-99,9)
² ELISAc _{SAG1}	Bovinos	314	546	≥ 29	98,0 (96,8-99,7)	97,9 (96,4-99,0)
³ ELISAc _{SAG1}	Caprinos/ ovinos	80	142	≥ 36	100 (95,4-100)	98,6 (95,0-99,8)
B) Ensayos de evaluación a campo						
Concordancia % (Índice kappa)						
	Animales	Muestras	IFI	ELISAc _{VMRD}	ELISAc _{taq}	IB
¹ ELISAc _{Taq}	Bovinos	352	84,0 (0,66)	96,5 (0,927)	--	ND
² ELISAc _{SAG1}	Bovinos	352	95,1 (0,88)	90,6 (0,78)	93,7 (0,86)	ND
³ ELISAc _{SAG1}	Caprinos	1149	96,5(0,85)	ND	ND	ND
³ ELISAc _{SAG1}	Ovinos	385	97,4 (0,90)	ND	ND	ND
⁴ ELISAc _{SAG1}	Ciervos	115	87,8 (0,76) ^a	ND	ND	98,3 (0,97) ^a
			89.6 (0.79) ^b	ND	ND	100 (1.00) ^b

ND: no determinada

¹Valentini et al., 2016; ²Novoa et al., 2020a; ³Novoa et al., 2020b; ⁴Novoa et al., 2023. ^aPunto de corte ≥ 29 %; ^bPunto de corte ≥ 32 %.

Evaluación a campo

El rendimiento del ELISAc_{taq} y del ELISAc_{SAG1} en bovinos se evaluó mediante el análisis de 352 muestras de suero de vacas de cría provenientes de 16 rodeos ubicados en la provincia de Santa Fe. Los resultados se compararon con los obtenidos por IFI y un ELISA comercial (VMRD; ELISA_{VMRD}) (Valentini et al., 2016; Novoa et al., 2020a). El rendimiento del ELISAc_{SAG1} en ovinos y caprinos fue evaluado mediante el análisis de muestras de suero de 1149 cabras de 143 rebaños y de 385 ovejas de 40 rebaños ubicados en las provincias de Santa Fe y Entre Ríos, por ELISAc_{SAG1} e IFI (Novoa et al., 2020b). La evaluación del ELISAc_{SAG1} en muestras de ciervos rojos provenientes de una granja comercial ubicada en la provincia de Buenos Aires que había sufrido un brote de abortos por *N. caninum* dos años atrás, se realizó mediante la evaluación de 115 muestras de suero por ELISAc_{SAG1}, IFI e IB, utilizando como punto de corte el obtenido para bovinos (≥ 29 %) y

el calculado considerando al IB como técnica de referencia ($\geq 32\%$) (Novoa *et al.*, 2023). La concordancia y el índice *kappa* entre las distintas técnicas, calculadas mediante el programa MedCal, son mostrados en la tabla 1B.

El ELISAC_{taq} y el ELISAC_{SAG1} han sido validados en Argentina y sus rendimientos han sido evaluados para 4 especies animales de diferentes áreas geográficas y distintas condiciones epidemiológicas. La SeD y EsD obtenidas para los ELISAC en las distintas especies, fueron superiores al 96,5%, lo que refleja el alto rendimiento de ambas versiones para estudios epidemiológicos (Tabla 1A). La concordancia de los resultados entre ELISAC_{taq} y ELISAC_{SAG1} encontrada en la evaluación a campo (Tabla 1B), fue calificada como “muy buena” ($k = 0,86$), indicando que la utilización de una sola proteína como antígeno en el ELISAC_{SAG1} no iría en detrimento de la sensibilidad. El uso de SAG1 recombinante evitaría posibles reacciones cruzadas con parásitos apicomplexa relacionados como *Toxoplasma gondii* y *Sarcocystis cruzi* (Novoa *et al.*, 2020a). Una de las grandes ventajas de los ELISAC validados es que pueden ser usados para detectar anticuerpos contra *N. caninum* en diferentes hospedadores, dado que no se necesitan anticuerpos conjugados específicos para cada especie. Así, estos ELISAC son útiles para realizar estudios seroepidemiológicos integrales de la neosporosis a gran escala, permitiendo evaluar tanto a hospedadores intermediarios como definitivos. Además, el ELISAC_{SAG1} tiene el beneficio de que su producción no depende del mantenimiento de cultivos celulares, por lo que es más fácil escalar su producción y obtener lotes de antígeno homogéneos para la producción de kits de ELISA comercializables. Previo a su distribución sería primordial evaluar el rendimiento de la prueba en un estudio interlaboratorios.

Referencias

- Alvarez-García G, García-Culebras A, Gutiérrez-Expósito D, Navarro-Lozano V, Pastor- Fernández I, Ortega-Mora LM. 2013. Serological diagnosis of bovine neosporosis: a comparative study of commercially available ELISA tests. *Vet. Parasitol.* 198(1-2):85-95. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.07.033>
- Barr BC, Anderson ML, Woods LW, Dubey JP, Conrad PA. 1992. *Neospora*-like protozoal infections associated with abortion in goats. *J Vet Diagn Invest.* 4(3):365-7. doi: 10.1177/104063879200400331. PMID: 1515507.
- Björkman C, Álvarez-García G, Conraths FJ, Mattsson JG, Ortega-Mora LM, Sager H, Schares G. 2006. *Neospora caninum* IgG avidity tests: an interlaboratory comparison. *Vet. Parasitol.* 140(3-4):273-80. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.04.030. Epub 2006 Jun 5. PMID: 16750301.
- Campero LM, Moore DP, Echaide IE, Campero CM, Venturini MC. 2021. Neosporosis bovina en Argentina: a 25 años del primer reporte en el país. *Analecta Veterinaria.* 41(1), e056, ISSN: 1514-2590
- Dubey JP, Lindsay DS. 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet. Parasitol.* 2;67(1-2):1-59. doi: 10.1016/s0304-4017(96)01035-7. PMID: 9011014.
- Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. 2007. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin. Microbiol. Rev.* 20(2):323-67. <https://doi.org/10.1128/CMR.00031-06>
- Echaide IE, Valentini BS, Torioni de Echaide SM. 2002. Neosporosis bovina: análisis seroepidemiológico de un hato lechero mediante IFA y ELISA. In: Mem. XIV Reunión Científica Técnica AAVLD, 13–15 Noviembre, Villa General Belgrano, Córdoba, Argentina, Secc. Par-01
- Gondim LFP, Mineo JR, Schares G. 2017. Importance of serological cross-reactivity among *Toxoplasma gondii*, *Hammondia* spp., *Neospora* spp., *Sarcocystis* spp. and *Besnoitia besnoiti*. *Parasitology.* Jun;144(7):851-868. doi: 10.1017/S0031182017000063.
- Guido S, Katzer F, Nanjiani I, Milne E, Innes EA. 2016. Serology-based diagnostics for the control of bovine neosporosis. *Trends Parasitol.* 32(2):131-143. doi: 10.1016/j.pt.2015.11.014. Epub 2015 Dec 17. PMID: 26711188.
- Nakane PK, Kawaoi A, 1974. Peroxidase-labeled antibody a new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 22, 1084–1091. <https://doi.org/10.1177/22.12.1084>

- Novoa MB, Valentini BS, Sarli M, Torioni-de-Echaide SM, Primo ME, Echaide IE. 2020a. Evaluation of a competitive inhibition ELISA based on the recombinant protein tSAG1 to detect anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle. *J. Vet. Diag. Invest.* 32(3):401-8. <https://doi.org/10.1177/1040638720916711>
- Novoa MB, Aguirre NP, Ormaechea N, Palmero S, Rouzic L, Valentini BS, Sarli M, Orcellet VM, Marengo R, Vanzini VR, Primo ME. 2020b. Validation and field evaluation of a competitive inhibition ELISA based on the recombinant protein tSAG1 to detect anti- *Neospora caninum* antibodies in sheep and goats. *Vet. Parasitol.* 284:109201. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109201>
- Novoa MB, Soler JP, Cirone KM, Hecker YP, Valentini BS, Primo ME, Moore DP. 2023. Use and comparison of serologic assays to detect anti-*Neospora caninum* antibodies in farmed red deer (*Cervus elaphus*). *Vet. Parasitol.* 313:109839. doi: 10.1016/j.vetpar.2022.109839. Epub 2022 Nov 21. PMID: 36446219.
- Reichel MP, Alejandra Ayanegui-Alcérreca M, Gondim LF, Ellis JT. 2013. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the billion dollar question. *Int. J. Parasitol.* 43(2):133-42. doi: 10.1016/j.ijpara.2012.10.022. Epub 2012 Dec 12. PMID: 23246675.
- Rimayanti R, Khairullah AR, Utama S, Ahmad RZ, Mulyati S, Damayanti R, Lestari TD, Mustofa I, Hernawati T, Wasito W, Moses IB, Wardhani BWK, Kurniasih DAA, Kusumarini S, Wibowo S, Yanestria SM, Kusala MKJ, Lisnanti EF, Fauziah I. 2025. Review of neosporosis: Disease insights and control approaches. *Open. Vet. J.* 15(3):1078-1090. doi: 10.5455/OVJ.2025.v15.i3.2. Epub 2025 Mar 31. PMID: 40276172; PMCID: PMC12017711.
- Rodríguez,S.D.; Buening,G.M.; Vega,C.A.; Carson,C.A. (1986). *Babesia bovis*: purification and concentration of merozoites and infected bovine erythrocytes. *Exp.Parásitol.* 61:236-243.
- Valentini, BS, Primo, ME, Torioni, SM, Echaide, IE, 2016. Neosporosis bovina: Estatus de infección definido por IFI y cELISA en muestras de suero obtenidas periódicamente de vacas lecheras. In: Argentina Proceedings of the XXI Meeting of the Argentinian Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, San Salvador de Jujuy, E4.

B Diagnóstico de los protozoos Apicomplejos

El papel de RAD51 y su inhibición farmacológica en la replicación y diferenciación de *Toxoplasma gondii*

Ana M. Saldarriaga Cartagena^{1,2}, Ayelén Aparicio Arias^{1,2,3}, Constanza Cristaldi^{1,2}, Agustina Ganuza^{1,2,3}, M. Micaela González^{2,4}, María M. Corví^{2,3}, William J. Sullivan, Jr.⁵, Laura Vanagas^{1,2}, Sergio O. Angel^{1,2}

¹Laboratorio de Parasitología Molecular, Instituto Tecnológico de Chascomús (INTECH), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET)/Universidad Nacional General San Martín (UNSAM), Chascomús, Prov. Buenos Aires, Argentina

²Escuela de Bio y Nanotecnologías, CONICET/UNSAM, Chascomús. Prov. Buenos Aires, Argentina

³Laboratorio de Bioquímica y Biología Celular de Parásitos, INTECH, CONICET/UNSAM, Chascomús, Prov. Buenos Aires, Argentina

⁴Laboratorio de Fotoquímica y Fotobiología Molecular, INTECH, CONICET/UNSAM, Chascomús, Prov. Buenos Aires, Argentina.

⁵Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina de la Universidad de Indiana, Indianápolis, IN, Estados Unidos

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado que alterna entre una fase sexual, exclusiva de felinos, y una fase asexual que ocurre en hospedadores intermediarios, incluidos humanos, aves y mamíferos. La infección se produce principalmente por la ingestión de ooquistes contaminantes o quistes tisulares en carne cruda. Durante la infección aguda, los taquizoítos se multiplican rápidamente mediante endodiogenia, un proceso sincrónico que duplica el número de parásitos por vacuola parasitófora (PV) en intervalos de entre 5 y 9 horas (Radke y col., 2001). Esta tasa de replicación elevada estaría generando estrés replicativo en el ADN, que puede llevar al colapso de horquillas de replicación y la formación de roturas de doble cadena (DSB), desencadenando la activación de mecanismos de reparación como la recombinación homóloga (HRR) y la unión de extremos no homólogos (NHEJ).

El parásito conserva múltiples componentes de estas vías de reparación, pero aún no se comprenden completamente sus mecanismos. A diferencia de otros organismos, *T. gondii* parece carecer de proteínas que regulan la elección entre HRR y NHEJ (Fenoy y col. 2016). La HRR se limita a la fase S tardía del ciclo celular, lo que refleja la necesidad de secuencias homólogas como molde de reparación. RAD51 es una proteína clave en HRR que forma filamentos helicoidales sobre ADN de cadena simple, facilitando la búsqueda de la región homóloga. Además, participa en mecanismos de reparación no canónicos, como el cambio de molde durante la replicación y la formación de híbridos RNA:DNA (Thomas y col. 2023).

En este trabajo se caracterizó a TgRAD51 (RAD51 de *T. gondii*) y se evaluó su función en el ciclo lítico del parásito, combinando aproximaciones genéticas (*knockdown* inducible) y farmacológicas (inhibidor B02). Se generó una línea mutante (RAD51HA-AID) que permite inducir la degradación de TgRAD51 mediante auxina (Brown y col. 2018). Esta línea fue desarrollada en un fondo genético RHΔKU80, que carece de la vía NHEJ, permitiendo así estudiar HRR de forma aislada (Figura 1).

Se demostró que TgRAD51 forma focos nucleares incluso sin estímulo genotóxico, sugiriendo que la replicación per se genera suficiente estrés para activar HRR o protección genómica (Figura 1A). La supresión inducida de TgRAD51 no resultó letal, pero provocó alteraciones importantes en la replicación: pérdida de sincronía en la endodiogenia, arresto en fases G1 o S del ciclo celular, y vacuolas con números atípicos de taquizoítos (3, 5, 6 o 7). Estos hallazgos fueron confirmados mediante inmunofluorescencia con anticuerpos anti-acTubulin y anti-TgPCNA1, que marcan células hijas y la progresión del ciclo celular, respectivamente.

La observación de focos de RAD51 bajo condiciones de cultivo estándar en *T. gondii* coincide con lo observado en células tumorales humanas altamente replicativas. Esta evidencia sugiere que el alto ritmo de replicación de los taquizoítos genera estrés replicativo endógeno. Además, se destaca que la ausencia de focos en taquizoítos extracelulares no replicativos refuerza esta hipótesis. Se comparan los efectos de la pérdida de RAD51 en *T. gondii* con otros organismos, como *Leishmania major*, *Schizosaccharomyces pombe* y ratones, donde la deficiencia en RAD51

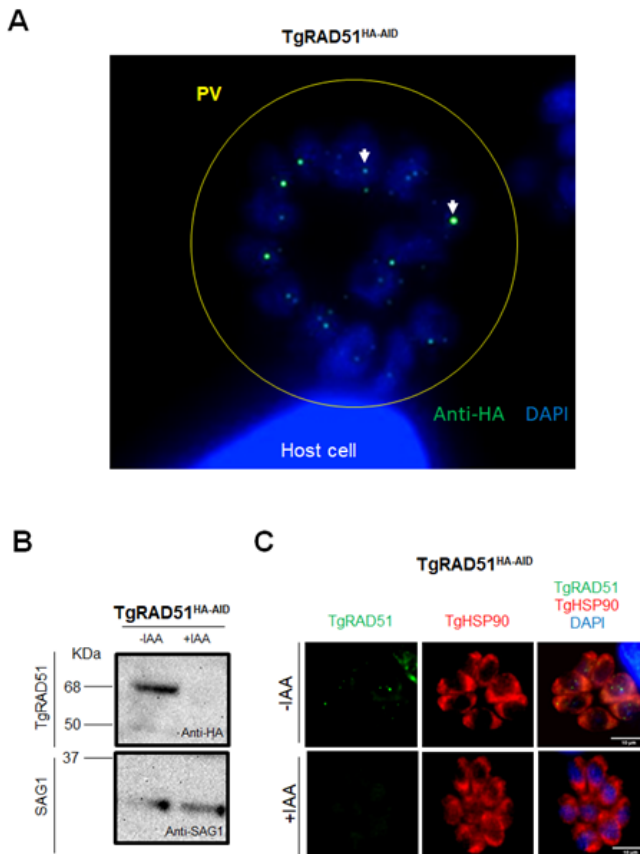


Figura 1. Generación de la línea celular de *T. gondii* RAD51HA-AID. La línea celular parental RH Δ ku80::Tir1 se utilizó para generar una línea celular de *T. gondii* que expresa TgRAD51 fusionada al dominio degron inducible por auxina (AID) más tres motivos de hemaglutinina (HA). La proteína expresada por la línea celular RAD51HA-AID se denominó TgRAD51. A. Monocapas de hTERT se infectaron con RAD51HA-AID y se analizaron mediante microscopía de epifluorescencia utilizando anticuerpos anti-HA (verde) y 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Los focos de TgRAD51 son claramente visibles en el núcleo de *T. gondii*. PV: vacuola parasitófora. Las flechas blancas muestran ejemplos de focos de TgRAD51. Host cell: célula hospedera. B. Western blot de taquizoitos extraídos de cultivos hTERT infectados con RAD51HA-AID en presencia de DMSO o ácido indol-3-acético (AIA [auxina]) 500 M durante 4 h. Se utilizó anticuerpo anti-HA para detectar TgRAD51. Se utilizó anticuerpo anti-SAG1 (antígeno de superficie 1) como control de carga. Se observa la desaparición de TgRAD51 en presencia de AIA después de 4 h. C. Análisis de microscopía de epifluorescencia de taquizoitos intracelulares tratados como en (B). Se utilizaron anticuerpos DAPI y anti-HA y anti-*T. gondii* Hsp90 (TgHSP90, citosólico). Se observa la desaparición de los focos de TgRAD51 después de 4 h en presencia de IAA.

afecta la proliferación pero no necesariamente la viabilidad inmediata, sugiriendo una función conservada en la evolución de los eucariotas.

Para complementar los ensayos genéticos, se utilizó el inhibidor B02, previamente identificado como un modulador de RAD51 en humanos y en *Plasmodium falciparum* (Vydyam y col. 2019). A través de análisis de homología, se confirmó que TgRAD51 y PfRAD51 comparten alta similitud, a diferencia de la versión humana, lo cual explica la selectividad del compuesto. B02 mostró un efecto dosis-dependiente sobre la replicación de *T. gondii*, con un IC₅₀ de 4.8 μ M, sin afectar significativamente a células humanas hTERT (CC₅₀ ~50 μ M). A concentraciones de 15 μ M, se logró inhibición total del crecimiento parasitario.

El tratamiento con B02 produjo efectos similares al *knockdown* de TgRAD51: vacuolas con números anómalos de parásitos, pérdida de sincronía y detención en la fase S-late, lo cual fue confirmado por citometría de flujo. En esta etapa del ciclo celular es donde se activa principalmente la HRR, lo que respalda el mecanismo de acción de B02. Curiosamente, B02 también promovió la formación de estructuras compatibles con quistes conteniendo bradizoitos en condiciones de cultivo estándar, sin necesidad de estímulos externos como el cambio de pH. Esta diferenciación fue evaluada mediante tinción con *Dolichos biflorus*-aglutinina (DBL) y análisis de la localización

subcelular de TgHsp90, así como pérdida de la marca de TgSag1. En particular, se observó que en presencia de 5 μM de B02, el 41,7% de las estructuras DBL+ eran DBL+/SAG1-, indicativas de quistes maduros. En concentraciones más altas, como 10 μM , la mayoría de los parásitos morían, pero se detectaron pequeños quistes con 1 o 2 células, lo que sugiere que B02 induce el inicio de la diferenciación pero que la detención en fase S impide su culminación adecuada. Estos hallazgos sugieren que el parásito es capaz de monitorear su ciclo celular y responder con diferenciación frente al estrés replicativo.

La combinación de B02 con el agente genotóxico camptotecina (CPT), que genera DSBs y activa HRR, mostró un efecto sinérgico sobre la inhibición del crecimiento parasitario. En cambio, la combinación con hidroxurea (HU) a bajas concentraciones (0.1 mM) no potenció el efecto de B02, posiblemente por no inducir suficiente daño replicativo en esas condiciones. HU es conocido por inducir arresto en G1 y generar especies reactivas de oxígeno a altas concentraciones, lo cual podría interferir con los mecanismos esperados. Es posible que una dosis mayor de HU hubiese sido más efectiva para activar la HRR y potenciar el efecto de B02.

Finalmente, se refuerza el valor de RAD51 como blanco terapéutico selectivo. La IC50 de B02 para RAD51 humano (27.4 μM) es considerablemente mayor que la observada para *T. gondii* y *P. falciparum*, lo que sugiere un margen terapéutico favorable. Dado que los tratamientos actuales no eliminan las formas crónicas ni previenen la formación de quistes, un fármaco que combine acción antiproliferativa con inducción de diferenciación, o que se complemente con genotóxicos como CPT, podría representar una nueva estrategia terapéutica contra la toxoplasmosis.

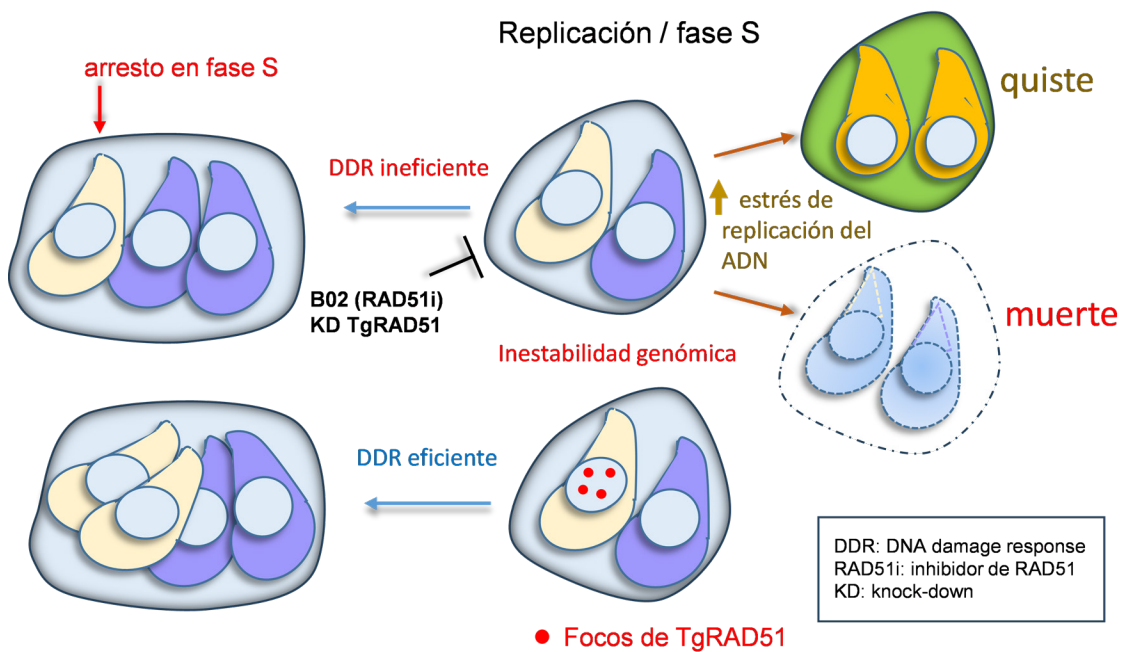


Figura 2. Resumen de los resultados obtenidos. La recombinasa TgRAD51 actuaría como una protectora de la inestabilidad genómica que se genera en el taquizoito replicativo. La eficiencia en la respuesta al daño de ADN (DDR por sus siglas en inglés) permite atravesar la fase replicativa de manera exitosa. Cualquier alteración de TgRAD51 que afecte sus niveles de expresión (KD) o su actividad (B02) no permite una correcta DDR llevando al arresto de los taquizoitos en fase S, pérdida de sincronización (VP con 3 taquizoitos) o incluso a la muerte o la diferenciación a quiste.

Las conclusiones de este trabajo se resumen en la Figura 2. Se pudo demostrar que TgRAD51 es crucial para la correcta replicación de taquizoítos en *T. gondii*, incluso en ausencia de agentes genotóxicos. La inhibición genética o farmacológica de esta proteína induce estrés replicativo, desincronización del ciclo celular y diferenciación parcial hacia bradizoítos. B02, como inhibidor selectivo de RAD51, muestra efectos potentes sobre el crecimiento del parásito y puede ser mejorado mediante combinación con agentes genotóxicos. Estos hallazgos posicionan a TgRAD51 como un blanco terapéutico prometedor para el desarrollo de nuevas terapias contra la toxoplasmosis, especialmente orientadas a formas resistentes o crónicas de la enfermedad.

Para más detalles ver (Saldarriaga Cartagena AM y col. 2025).

Agradecimientos: M.M. Gonzalez, M.M. Corvi, L.Vanagas y S.O. Angel investigadoras/or del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y Profesoras/or de la Universidad Nacional General San Martín (UNSAM). A.M. Saldarriaga Cartagena and C. Cristaldi son becarias de CONICET. A. Aparicio es becaria del Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCYT). A. Ganuza es Técnica del CONICET.

Este trabajo fue apoyado por el Ministerio Nacional de Ciencia y Tecnología (MINCyT): PICT 2021 0331 (S.O.A. y M.M.C.), PICT 2021 0169 (L.V.); CONICET: PIP 11220150100145CO y 11220210100572CO (S.O.A., L.V. y M.M.C.) y por el Instituto Nacional de Salud de EEUU: NIH-NIAID R01AI129807 (S.O.A. y W.J.S.).

Referencias

- Brown KM, Long S, Sibley LD. Conditional *Knockdown* of Proteins Using Auxin-inducible Degron (AID) Fusions in *Toxoplasma gondii*. *Bio Protoc.* 2018 Feb 20;8(4):e2728. doi: 10.21769/BioProtoc.2728
- Fenoy IM, Bogado SS, Contreras SM, Gottifredi V, Angel SO. The Knowns Unknowns: Exploring the Homologous Recombination Repair Pathway in *Toxoplasma gondii*. *Front Microbiol.* 2016 May 3;7:627. doi: 10.3389/fmicb.2016.00627
- Radke JR, Striepen B, Guerini MN, Jerome ME, Roos DS, White MW. Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol.* 2001 Jul;115(2):165-75. doi: 10.1016/s0166-6851(01)00284-5.
- Saldarriaga Cartagena AM, Arias AA, Cristaldi C, Ganuza A, Gonzalez MM, Corvi MM, Sullivan WJ, Vanagas L, Angel SO. *Toxoplasma gondii* RAD51 recombinase is required to overcome DNA replication stress and its inactivation leads to bradyzoite differentiation. *bioRxiv [Preprint].* 2025 Apr 8:2025.04.08.647840. doi: 10.1101/2025.04.08.647840 (DNA Repair, en prensa).
- Thomas M, Dubacq C, Rabut E, Lopez BS, Guirouilh-Barbat J. Noncanonical Roles of RAD51. *Cells.* 2023;12. doi: 10.3390/cells12081169
- Vydyam P, Dutta D, Sutram N, Bhattacharyya S, Bhattacharyya MK. A small-molecule inhibitor of the DNA recombinase Rad51 from *Plasmodium falciparum* synergizes with the antimalarial drugs artemisinin and chloroquine. *J Biol Chem.* 2019 May 17;294(20):8171-8183. doi: 10.1074/jbc.RA118.005009

B Diagnóstico de los protozoos Apicomplejos

Desarrollo de un nuevo kit de diagnóstico rápido para los hemoparásitos causantes de la Tristeza Bovina basado en LAMP

Valenzano M.¹, Montenegro V.¹, Guillemi E.¹, Zimmer P.², Sarmiento N.³, Pertile C.³, Carrillo C.⁴, Farber M.¹, Wilkowsky Silvina.^{1*}

¹IABIMO INTA-CONICET, Buenos Aires, Argentina.

²AER INTA Formosa, Formosa, Argentina.

³EAA INTA Corrientes, Mercedes, Argentina.

⁴ICT Milstein, CONICET y NEOKIT, Buenos Aires, Argentina.

*wilkowsky.silvina@inta.gob.ar

Los protozoarios *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, y la bacteria *Anaplasma marginale*, son patógenos transmitidos por garrapatas que infectan a los eritrocitos bovinos, causando el síndrome conocido como Complejo Tristeza Bovina (CTB), el cual es responsable de importantes pérdidas económicas en la región del NOA y NEA. El diagnóstico del CTB se realiza por frotis sanguíneo, el cual requiere la remisión de la muestra a laboratorios con profesionales especializados. Por estos motivos resulta importante contar con un *test* sencillo, rápido y con posibilidad de ser usado al pie del animal. Además, la prueba debe contar con una sensibilidad ajustada a los casos agudos ya que el *test* no debe detectar como positivos animales inmunizados con las cepas atenuadas usadas como vacuna, ni animales crónicos sin signología clínica. Nuestro laboratorio ha desarrollado el kit HEMO-LAMP, la cual permite la amplificación molecular isotérmica y específica del ADN de *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale*. El resultado del *test* se evidencia a simple vista con el cambio de color de la reacción y la misma puede ser realizada en un termobloque portátil que puede ser conectado a la batería de un vehículo. Además, ideamos un método simplificado de extracción de ADN genómico que permite procesar la muestra de sangre sin necesidad de equipamiento sofisticado. El desempeño del kit HEMO-LAMP se evaluó en muestras provenientes del NEA de casos agudos y crónicos para los 3 patógenos. Los resultados mostraron que cada reacción HEMO-LAMP es capaz de detectar entre el 94,5-100% de los casos agudos de *A. marginale*, *B. bovis*, y *B. bigemina* con una especificidad entre el 92,1-97,7%. La concordancia con la qPCR en los casos agudos fue excelente con un índice *Kappa* entre 0.91-0.93 según el patógeno lo que confirma que el kit HEMO-LAMP es apropiado para la detección de los casos agudos y su pronto tratamiento, confirmando asimismo la prestación para cuyo fin fueron diseñadas las 3 pruebas de detección molecular. De acuerdo a lo esperado, el *test* mostró bajos niveles de sensibilidad (7,5-52,8%) en muestras de animales crónicos, pero con buenos porcentajes de especificidad entre el 81,8-92%.

En conclusión, el kit HEMO-LAMP posee todas las características deseables para la detección de brotes del CTB con la ventaja de un equipamiento adaptado al uso en el campo. El método simple de extracción de ADN y la facilidad de lectura de la reacción molecular permitirá su implementación futura para innovar en el diagnóstico a campo del CTB.

C

Vacunas, tecnologías avanzadas y control de los protozoos Apicomplejos

Vacuna experimental tipo DIVA para la neosporosis bovina

Luisa Fernanda Mendoza-Morales^{1,2}, Franco Fiorani^{3,4}, Karen Daiana Morán^{5,6}, Yanina Paola Hecker⁴, Edwin Fernando Sánchez-López^{2,7}, Víctor Andrés Ramos Duarte^{2,7}, Mariana Georgina Corigliano^{1,2}, María Guillermina Bilbao^{5,6}, Marina Clemente^{2,7}, Dadín Prando Moore^{3,4}, Valeria Analía Sander^{1,2}.

¹Laboratorio de Biotecnologías en Bovinos y Ovinos, INTECH, CONICET-UNSAM, Chascomús, Buenos Aires, Argentina

²Escuela de Bio y Nanotecnologías (UNSAM), Chascomús, Buenos Aires, Argentina.

³Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, Balcarce, Buenos Aires, Argentina.

⁴Instituto de Innovación para la Producción Agropecuaria y el Desarrollo Sostenible (IPADS Balcarce), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Estación Experimental Agropecuaria Balcarce (CONICET-INTA), Balcarce, Buenos Aires, Argentina

⁵Laboratorio de Reproducción, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), General Pico, La Pampa, Argentina.

⁶Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa, General Pico, La Pampa, Argentina.

⁷Laboratorio de Molecular Farming y Vacunas, INTECH, CONICET-UNSAM, Chascomús, Argentina

La neosporosis es una patología infecciosa de prevalencia mundial causada por *Neospora caninum*, un parásito apicomplejo, cuyo ciclo de vida incluye como hospedadores definitivos a cánidos y como intermediarios a distintos mamíferos, tanto salvajes como domésticos, entre los que se encuentran los rumiantes^[1]. La transmisión de la enfermedad se da principalmente mediante la infección transplacentaria de madre a feto; sin embargo, la transmisión horizontal de *N. caninum* también ha sido documentada en numerosas oportunidades, y es considerada una vía imprescindible para el mantenimiento de la enfermedad^[2]. Aunque la neosporosis se presenta en rumiantes de manera subclínica cuando se ha establecido crónicamente, es en la preñez donde adquiere relevancia, puesto que sea por la primo-infección con *N. caninum* o la recrudescencia de la enfermedad (ambas consideradas fase aguda), la neosporosis es reconocida como la principal causa de origen infeccioso de abortos en el ganado bovino tanto en nuestro país^[3], como en el mundo^[4]. Asimismo, cada vez son más los estudios que demuestran su rol como agente etiológico de diversas fallas reproductivas también en ovinos y caprinos^[5,6]. En cuanto a su importancia económica, las pérdidas anuales asociadas a la neosporosis, solo en bovinos, representan alrededor de 2 billones de dólares a nivel mundial^[4], habiéndose estimado que en nuestro país cada aborto bovino genera una pérdida de alrededor de US\$ 1415 en explotaciones lecheras (tambos) y de US\$ 440 para los rodeos de cría (producción cárnica)^[7].

Se han sugerido varias estrategias para controlar la neosporosis; sin embargo, la vacunación parece ser la más recomendable. En este sentido, se han probado diferentes enfoques, como vacunas vivas atenuadas, vacunas inactivadas, vacunas a subunidades (nativas y recombinantes) y vacunas basadas en ácidos nucleicos, tanto en modelos murinos como en rumiantes^[8,9,10]. Además, se han evaluado como candidatos vacunales una plétora de moléculas antigénicas de *N. caninum* involucradas en la adhesión e invasión de la célula hospedadora, incluyendo antígenos de superficie celular (SAG, SRS), micronemas (MIC) y proteínas de gránulos densos (GRA), entre otras^[revisado en 10,11]. Entre ellas, NcSAG1 ha demostrado ser una proteína altamente inmunogénica en diferentes modelos animales^[12, 13, 14, 15]. Si bien se han logrado avances significativos, ninguna de las vacunas evaluadas hasta el momento ha demostrado prevenir completamente la transmisión vertical en el ganado. En este escenario, donde la infección y la enfermedad de los animales solo podrían evitarse parcialmente mediante la vacunación, una estrategia integrada basada en la combinación de tratamientos profilácticos y medidas de manejo podría resultar la mejor alternativa^[16,17]. De hecho, el diagnóstico serológico desempeña un rol crucial en el momento de la identificación de los animales infectados para aplicar las medidas apropiadas^[18]. Sin embargo, la vacunación puede complicar la vigilancia serológica si la respuesta de anticuerpos generada por la vacuna es indistinguible de la inducida por la infección. Esta desventaja puede superarse con el empleo de vacunas "DIVA" y sus tests acompañantes. En medicina veterinaria, la palabra "DIVA" es empleada como acrónimo de "*differentiation of infected from vaccinated animals*" (del inglés diferenciación

de animales infectados de vacunados)^[19]. Las vacunas DIVA se consideran positivas si poseen al menos un antígeno más que el patógeno *wild type*, mientras que son consideradas “negativas” si carecen al menos de un antígeno presente en el patógeno *wild type*. En ambos casos, los anticuerpos secretados por los animales vacunados serán diferentes de los de los animales infectados, lo que permitirá su distinción serológica. Este enfoque vacunal resulta muy prometedor para el diseño de estrategias integradas de control de enfermedades, como es el caso de la neosporosis bovina. Es así que, en una investigación previa de nuestro grupo de trabajo, desarrollamos un candidato vacunal recombinante de tipo DIVA dual (con características DIVA positiva y negativa), compuesto por el antígeno principal de superficie de *Neospora caninum* (rNcSAG1) y conteniendo como adyuvante/proteína marcadora a la proteína de choque térmico de 81 kDa de *Arabidopsis thaliana* (rAtHsp81.2). Esta vacuna fue capaz de otorgar protección parcial contra la neosporosis e incrementar el tiempo de supervivencia de las crías correspondientes a las madres vacunadas e infectadas en un modelo murino de neosporosis congénita^[12].

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos planteamos en primer término investigar en vaquillonas la seguridad, la inmunogenicidad y el carácter de tipo DIVA dual conferido por la administración de distintas dosis de la vacuna recombinante compuesta por rNcSAG1 y como adyuvante/proteína marcadora rAtHsp81.2. Para ello, vaquillonas Angus de 22 meses de edad, libres de neosporosis y toxoplasmosis y con una adecuada condición corporal, se distribuyeron en los grupos experimentales A-F y se inmunizaron por vía subcutánea en el cuello con 2 dosis de las formulaciones vacunales (30 días de diferencia entre ellas) de la siguiente manera: A (n = 4): 50 µg rNcSAG1 + 150 µg rAtHsp81.2; B (n = 4): 200 µg rNcSAG1 + 600 µg rAtHsp81.2; C (n = 4): 500 µg rNcSAG1 + 1500 µg rAtHsp81.2; D (n = 3): 150 µg rAtHsp81.2; E (n = 3): 1500 µg rAtHsp81.2 y F (n = 3) 2 ml de PBS estéril. Se tomaron muestras de sangre (10 ml) sin heparina de la vena yugular para las determinaciones serológicas a los 0, 30, 45, 60 y 90 días postinmunización (d.p.i.), a partir de las cuales se obtuvo suero. Asimismo, se obtuvieron muestras de sangre con heparina para determinar la respuesta celular en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) a los 60 d.p.i.

Mediante este primer ensayo experimental pudimos determinar que la inmunización de las hembras con las diferentes dosis de vacuna (grupos A-C) o adyuvante (grupos D-E) demostró ser segura y no modificó el valor de los biomarcadores séricos de función metabólica evaluados (GOT/ASP, GPT/ALT, UREA, glucosa y proteínas totales), ni a los 60 ni a los 90 d.p.i., al comparar dichos marcadores con los obtenidos de las vaquillonas control ($p > 0,05$ grupos A-E vs. grupo F, ambos días evaluados, ANOVA de dos vías seguido del *Test* de Tukey). La cinética y la magnitud de la respuesta inmune tanto humoral como celular resultaron dosis-dependientes. En este sentido, todos los animales que recibieron la vacuna (grupos A-C) mostraron títulos anti-rNcSAG1 desde los 30 d.p.i. (títulos > 200) y alcanzaron su valor máximo a los 60 d.p.i. (títulos > 1500). Sin embargo, el grupo que recibió la menor dosis vacunal (grupo A) mostró los menores títulos de anticuerpos en cada punto temporal, siendo indetectables a los 90 d.p.i., a diferencia de los animales que recibieron las dosis media (grupo B) y alta (grupos C), los cuales exhibieron IgG anti-rNcSAG1 hasta el final del experimento. El perfil de la respuesta de isotipos de anticuerpos fue evaluado mediante la determinación de IgG1 (asociada a una respuesta de tipo *T helper 2*) e IgG2 (asociada a una respuesta de tipo *T helper 1*, proinflamatoria) a lo largo del experimento. Coincidentemente con la respuesta de IgG, encontramos que el día 60 d.p.i. se obtuvieron los mayores títulos de ambos isotipos de anticuerpos. Sin embargo, si bien todas las vaquillonas que recibieron la vacuna secretaron IgG1 anti-rNcSAG1, solo aquellas que recibieron la mayor dosis de la formulación vacunal (grupo C) mostraron anticuerpos IgG2 anti-rNcSAG1.

Posteriormente se determinaron los niveles de IFN- γ en sobrenadantes de cultivos de CMSP obtenidos a partir de las muestras de sangre de los animales de los distintos grupos a los 60 d.p.i.,

luego de la estimulación con rNcSAG1. Aunque las muestras de todos los animales mostraron niveles detectables de esta citoquina, al analizar diferencias entre grupos, sólo aquellas CMSP provenientes de las vaquillonas que habían recibido la mayor dosis de la vacuna mostraron niveles de IFN- γ significativamente mayores que las del grupo control (grupo C estimulado con rNcSAG1 vs. grupo F estimulado con rNcSAG1; $p < 0.0001$ evaluada por ANOVA de dos vías seguido por *Test* de Tukey).

Por otro lado, todos los animales inmunizados mostraron secreción de anticuerpos IgGt anti-rAtHsp81.2 a lo largo del ensayo, lo que nos permitió evaluar la capacidad DIVA de la vacuna en bovinos. Para ello, se realizó la evaluación de los sueros de los animales inmunizados y de animales infectados con *N. caninum* por medio de dos enfoques de ELISA indirectos diferentes, uno basado en rAtHsp81.2 (*test* DIVA positivo) y otro basado en la proteína de granulo denso 7 recombinante (rNcGRA7), antígeno presente en *N. caninum* no incluido en la vacuna (*test* DIVA negativo). Ambos *tests* lograron distinguir muestras séricas provenientes de vaquillonas vacunadas de aquellas provenientes de vaquillonas infectadas.

Estos resultados nos permitieron concluir que la dosis más alta de la vacuna resultó la más adecuada (ver Resumen Gráfico A), y nos animaron a evaluar su eficacia protectora en vaquillonas gestantes infectadas. Para llevar a cabo esta segunda etapa del proyecto, 25 vaquillonas Angus provenientes de la reserva 8 del INTA Balcarce (libres de neosporosis y toxoplasmosis) fueron seleccionadas para realizar el ensayo de inmunización, preñez y desafío. Se definieron los siguientes grupos experimentales: VACUNA: 500 μ g de rNcSAG1 + 1500 μ g rAtHsp81.2 ($n=13$); CONTROL: 1500 μ g de rAtHsp81.2 ($n=12$). Se aplicaron 2 dosis de la vacuna de manera subcutánea en el cuello de los animales, previas al servicio en los días 0 y 30 postinmunización (d.p.i.). Aquellas hembras que resultaron preñadas ($n=5$ y $n=8$, respectivamente) continuaron en el ensayo y recibieron un refuerzo a los 90 días de preñez (150 d.p.i.). La infección de los animales de los grupos VACUNA y CONTROL se realizó 30 días después de la última inmunización (180 d.p.i.). Las vaquillonas preñadas e infectadas fueron sacrificadas el día 230 d.p.i. (150 días de preñez). Se colectaron placentas y fetos de cada hembra. Adicionalmente, se tomaron muestras de sueros de 8 hembras sanas, no vacunadas y preñadas (grupo Naïve-150 días de preñez) pertenecientes al rodeo para evaluar algunos marcadores bioquímicos y compararlos con los de las hembras a las que se les realizó el desafío.

Los resultados de este ensayo demostraron que la vacuna resultó segura en hembras preñadas, ya que los biomarcadores evaluados (GOT/ASP, GPT/ALT, UREA, glucosa y proteínas totales) no mostraron diferencias entre los grupos CONTROL y VACUNA, y tampoco al comparar los grupos al inicio y final del experimento (evaluado por ANOVA de dos vías seguido por el *test* de Tukey, $p > 0,05$). Por otro lado, las hembras del grupo VACUNA presentaron IgGt anti-rNcSAG1 crecientes a partir del día 30 d.p.i., los cuales disminuyeron a los 90 d.p.i. para volver a incrementarse luego del refuerzo (evaluado a los 170 d.p.i., 20 días luego del refuerzo), alcanzando su título máximo de manera posterior al desafío con el parásito. Por su parte, los animales del grupo CONTROL, como era de esperarse, solo presentaron IgGt anti-rNcSAG1 luego del desafío con el parásito; sin embargo, estos fueron significativamente menores que los obtenidos en el grupo VACUNA ($p < 0,05$; evaluado por ANOVA de dos vías seguido del *Test* de Bonferroni). En cuanto a los isotipos IgG1 e IgG2, a evaluarlos de manera previa al desafío, se observó que las hembras del grupo VACUNA presentaron anticuerpos anti-rNcSAG1 tanto IgG1 como IgG2 a partir de 30 d.p.i, pero mientras que los niveles de IgG2 se incrementaron significativamente luego del desafío con el parásito, los niveles de IgG1 disminuyeron, sugiriendo una respuesta de tipo Th1. En el caso de los animales CONTROL, solo presentaron IgG2 anti-rNcSAG1 luego del desafío, pero el título de los mismos fue significativamente menor que el encontrado en el grupo VACUNA ($p > 0,001$; evaluado por ANOVA

de dos vías seguido del Test de Bonferroni). Estos resultados nuevamente muestran que la formulación vacunal evoca un perfil predominantemente tipo Th1.

Respecto de los niveles de IgGt anti-rAtHsp81.2, asociados a la capacidad DIVA positiva de la vacuna, mostraron un patrón similar a los de IgGt anti-rNcSAG1 en el grupo VACUNA, pero en este caso se observó para ambos grupos (CONTROL y VACUNA), tal como era de esperarse, ya que todos los animales recibieron el adyuvante. Es así que se observó un incremento de IgGt a partir de los 30 d.p.i., para disminuir de manera previa el refuerzo e incrementarse nuevamente hasta el final del ensayo (230 d.p.i. sin diferencias significativas entre los grupos).

Teniendo en cuenta que la progesterona es la hormona protagonista en el mantenimiento de la preñez y que sus niveles pueden verse afectados por la respuesta generada por vacunación y/o la infección con *N. caninum*, decidimos determinar sus niveles séricos al momento de la eutanasia de los animales (230 d.p.i) para compararlos con los obtenidos de muestras séricas de animales sanos de la misma etapa gestacional (vaquillonas Naïve). Las vaquillonas infectadas, hayan sido o no inmunizadas (grupos VACUNA y CONTROL, respectivamente), mostraron niveles significativamente menores de progesterona sérica que los obtenidos para las vaquillonas Naïve ($p < 0,01$; Test de ANOVA de una vía seguido de Test de Tukey). Sin embargo, ninguna de las hembras presentó abortos al momento de la eutanasia. También fueron evaluados los niveles séricos de haptoglobina (proteína asociada a procesos proinflamatorios), la cual mostró concentraciones significativamente mayores en vaquillonas del grupo VACUNA que en las de los grupos CONTROL o Naïve (VACUNA vs Naïve o CONTROL, $p < 0,05$; Test de ANOVA de una vía seguido de Test de Tukey). Con el fin de determinar si la vacuna evitaba, al menos parcialmente, la transmisión vertical del parásito, evaluamos la presencia de ADN genómico (ADNg) de *N. caninum* tanto en carúnculas como en cotiledones de los animales CONTROL y VACUNA mediante qPCR. Se detectó la presencia del parásito en el 100% de las carúnculas del grupo CONTROL, pero solo en el 20% de las de los animales del grupo VACUNA. En cuanto a los cotiledones, solo el 20% de los animales CONTROL presentaron ADNg de parásito, mientras que no se detectó su presencia en los provenientes de animales VACUNA. Por otro lado, mediante una evaluación preliminar de 2 secciones del SNC de fetos (corteza y cerebelo) mediante qPCR se demostró la presencia de ADNg del parásito en 66% de las muestras CONTROL y en el 50% de las muestras VACUNA, sin obtener diferencias que permitieran demostrar un efecto protector de la vacuna contra la infección, hasta el momento.

Por otro lado, la evaluación histopatológica de los fetos demostró que todos los tejidos evaluados poseían lesiones típicas de la patología. Sin embargo, la vacunación (grupo VACUNA) se encontró asociada a lesiones de menor severidad que en los animales CONTROL en el SNC. Actualmente nos encontramos evaluando cuantitativamente estos parámetros en SNC de los fetos.

En resumen, los resultados obtenidos en el ensayo de inmunización, preñez y desafío sugieren que la formulación vacunal propuesta es segura, incluso al ser aplicada durante la gestación, y es capaz de inducir una importante respuesta humoral predominantemente de tipo Th1, la cual se intensifica tras la infección. Asimismo, hemos corroborado el carácter DIVA dual de la vacuna, ya que mediante los tests de ELISA acompañantes basados en rAtHsp81.2 o en rNcGRA7, pudimos distinguir animales infectados de vacunados. A pesar de ser una respuesta de tipo proinflamatoria, acompañada de niveles elevados de haptoglobina y una significativa disminución en los niveles de progesterona sérica, ni la vacunación ni la infección experimental afectaron la viabilidad de los fetos, al menos hasta el momento de la eutanasia (ver Resumen Gráfico B). Sin embargo, la vacuna solo logró evitar parcialmente la transmisión vertical y los efectos deletéreos de la neosporosis congénita en bovinos, lo que nos invita una vez más a revisar nuestros criterios acerca de que efectividad estamos dispuestos a aceptar en una vacuna contra la neosporosis bovina, dada

la gran dificultad en lograr una vacuna que sea biológicamente segura, económicamente viable y completamente efectiva.

Bibliografía

- ^[1]Donahoe, S.L. y col. (2015) *Int J Parasitol Parasites Wildl* 4(2):216-38.
- ^[2]Dubey J.P.y col. (2017) *Neosporosis in Animals*.1° Ed. Boca Raton, CRC Press
- ^[3]Morrell, E.L. y col. (2019) *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 39(1):12-9.
- ^[4]Reichel, M.P. y col. (2013) *Int J Parasitol*.43(2):133-42.
- ^[5]Arranz-Solís, D. y col. (2016) *Vet Res*.6;47:2.
- ^[6]Della Rosa, P. y col. (2021) *Curr Res Parasitol Vector Borne Dis.*;1:100057.
- ^[7]Cantón, G.J. y col. (2022) *Trop Anim Health Prod*. 54(4):242.
- ^[8]Marugán-Hernández, V. (2017) *J Comp Pathol*, 157(2-3), 193-200.
- ^[9]McAllister, M.M. (2016) *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* 32 (2):443–463.
- ^[10]Monney, T., Hemphill, A. (2014) *Exp. Parasitol*. 140: 52–70.
- ^[11]Hemphill, A. y col. (2013) *Front. Biosci.* 5, 23–36.
- ^[12]Bengoia-Luoni, S.A. y col. (2019) *Acta Tropica*, 198, 105094.
- ^[13]Cannas, A. y col. (2003) *Parasitology*. 126 (4):303–312.
- ^[14]Hecker, Y.P. y col. (2014) *Vet Immunol Immunopathol* 162(3-4):142-53.
- ^[15]Yoshimoto, M. y col. (2015) *J Biosci. Bioeng.* 120 (6):715–719.
- ^[16]Dubey, J. y col. (2007) *Clin Microbiol Rev*. 2007 20(2):323-67.
- ^[17]Sánchez-Sánchez R. y col. (2018) *Trends. Curr Top Med Chem* 18(15):1304-23.
- ^[18]Guido, S. y col. (2016) *Trends in parasitology* 32(2), 131–787 143
- ^[19]Henderson, L.M. (2005). *Biologicals* 33(4):203–209.



Desarrollo y evaluación de herramientas que contribuyan a la prevención de la toxoplasmosis en ovinos

Lucía M. Campero¹, Ignacio Gual², Valeria A. Sander^{3,4}, Luisa F. Mendoza Morales^{3,4}, Víctor A. Ramos Duarte^{4,5}, Paula M. Formigo^{4,6}, Emiliano Sosa¹, Fermín Lázaro¹, María Valeria Scioli¹, Agustín Atela^{3,5}, Ariel Legarralde⁵, Federico A. Hozbor¹, Germán J. Cantón¹, Sergio O. Angel^{4,6}, Dadín P. Moore^{1,2}, Marina Clemente^{4,5}

¹Instituto de Innovación para la Producción Agropecuaria y el Desarrollo Sostenible (IPADS Balcarce), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Estación Experimental Agropecuaria Balcarce (CONICET-INTA), Balcarce, Buenos Aires, Argentina

²Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, Balcarce, Buenos Aires, Argentina

³Laboratorio de Biotecnologías en Bovinos y Ovinos, Instituto Tecnológico de Chascomús (INTECH), Chascomús, Buenos Aires, Argentina

⁴Escuela de Bio y Nanotecnologías (EByN), UNSAM, Chascomús, Buenos Aires, Argentina

⁵Laboratorio de Molecular Farming y Vacunas, INTECH, EByN, CONICET-UNSAM, Chascomús, Buenos Aires, Argentina

⁶Laboratorio de Parasitología Molecular, INTECH, EByN, CONICET-UNSAM, Chascomús, Buenos Aires, Argentina

Introducción

La toxoplasmosis es una zoonosis parasitaria causada por *Toxoplasma gondii*, un protozoario intracelular obligado con distribución mundial que afecta a todos los animales de sangre caliente, incluidos los seres humanos. En la mayoría de los individuos inmunocompetentes la infección cursa de manera asintomática, pero en pacientes inmunocomprometidos o en infecciones congénitas puede causar cuadros clínicos graves, que involucran el sistema nervioso central y la visión^{1,2}.

En la producción animal, particularmente en pequeños rumiantes, la infección con *T. gondii* constituye un problema sanitario de gran impacto económico. En ovinos y caprinos, la toxoplasmosis es una de las causas más frecuentes de abortos, mortinatos y nacimientos de corderos débiles, con pérdidas reproductivas que pueden oscilar entre 1 y 20 % según la prevalencia regional^{3,4}. Se ha estimado que la enfermedad es responsable de entre el 1 y el 2 % de las pérdidas neonatales ovinas en países europeos como el Reino Unido⁵, mientras que en Argentina la seroprevalencia en majadas ronda el 10 %⁶.

El impacto de *T. gondii* trasciende el ámbito productivo, ya que representa una amenaza a la salud pública. El consumo de carne cruda o insuficientemente cocida de ovinos y caprinos infectados constituye una de las principales vías de transmisión de toxoplasmosis humana⁷. Se calcula que el costo económico global asociado a la toxoplasmosis alimentaria asciende a más de 3400 millones de dólares anuales, principalmente por gastos de atención médica y pérdida de productividad⁸. En este contexto, controlar la infección en animales de producción tiene beneficios duales: reduce las pérdidas económicas y minimiza la transmisión zoonótica, en línea con el enfoque One Health (FAO/WHO, 2014).

Las herramientas disponibles para el control de la toxoplasmosis ovina son limitadas. A la fecha, la única vacuna licenciada para uso veterinario es una cepa atenuada de *T. gondii* (cepa S48), utilizada en algunos países europeos, pero con restricciones de bioseguridad y logística⁹. Las vacunas vivas, si bien eficaces, requieren sistemas costosos de producción, cadena de frío y manejo especializado, lo que dificulta su implementación a gran escala. Por otro lado, las vacunas recombinantes y de subunidades ofrecen ventajas en seguridad y estabilidad, aunque suelen inducir respuestas inmunes menos robustas. En paralelo, la mejora de métodos diagnósticos, particularmente basados en antígenos recombinantes, representa una estrategia esencial para el monitoreo de la infección en majadas y la identificación de animales en riesgo.

En este marco, dos líneas de investigación recientes se enfocan en: i) el desarrollo de vacunas basadas en antígenos de *T. gondii* fusionados a proteínas Hsp90 de plantas como adyuvantes, evaluadas en corderos¹⁰, y ii) la caracterización de la respuesta humoral ovina frente a antígenos

recombinantes específicos (Gra4-Gra7, Gra8, Rop2, CST9 y BCLA), con énfasis en su cinética y valor diagnóstico (manuscrito en preparación). Ambos enfoques complementarios aportan información relevante sobre inmunogenicidad, correlatos de protección y potencial de aplicación en programas de control.

Materiales y Métodos

Ensayo de vacunación con SAG1-Hsp90

Se utilizaron corderos Texel seronegativos de 3 meses, asignados a cuatro grupos: Control (PBS), Vehículo (hojas no infiltradas), Vacuna Recombinante (proteína SAG1HC fusionada a NbHsp90.3 producida en *E. coli*) y Vacuna Vegetal (extractos de *Nicotiana benthamiana* infiltradas con AtHsp81.2-SAG1_{HC}). Los animales recibieron tres dosis a intervalos de 15 días, por vía subcutánea (recombinante) u oral (vacuna vegetal) (Fig. 1A). A los 113 días postinmunización fueron desafiados con taquizoítos de la cepa RH. Se evaluaron respuestas humorales (IgG anti-SAG1), celulares (IFN- γ , IL-12, IL-4, IP-10), así como lesiones histopatológicas cerebrales y carga parasitaria (PCR, microscopía).

Ensayo de infección experimental y cinética humoral

En un segundo estudio, 18 corderos seronegativos fueron inoculados subcutáneamente con diferentes dosis (5×10^6 o 5×10^7) de dos cepas: RH (virulenta, poco quistogénica) y Me49 (menos virulenta, altamente quistogénica). Se monitorearon parámetros clínicos (temperatura), respuestas humorales frente a antígenos recombinantes (rGra4Gra7, rGra8, rRop2, rCST9, rBCLA) mediante ELISA, y se realizaron necropsias a los 60 días post-infección para evaluar lesiones cerebrales y presencia de quistes. Se incorporaron además sueros de campo de ovinos naturalmente infectados para validar la utilidad diagnóstica de los antígenos.

Resultados

Vacunación con SAG1HC-Hsp90 en corderos

Respuesta humoral:

- » La vacuna recombinante (NbHsp90.3-SAG1HC) generó un aumento significativo de IgG anti-SAG1 (~4 veces respecto a controles) (Fig. 1B).
- » La vacuna vegetal no indujo un aumento claro pre-desafío, aunque post-infección ambos grupos vacunados mostraron mayor reactividad que controles.

Respuesta celular:

- » Sólo la vacuna vegetal indujo un incremento significativo de IFN- γ tras el desafío (~3 veces más que controles).
- » También se observaron aumentos en IP-10, asociado a la activación de linfocitos T específicos.
- » No hubo diferencias significativas en IL-12 e IL-4.

Protección clínica e histopatológica:

- » Ambos esquemas vacunales redujeron ~80 % las lesiones cerebrales comparado con controles.
- » La presencia de quistes fue escasa y heterogénea; se detectaron en algunos animales, sin correlación clara con la vacunación.

Marcadores serológicos:

- » Se empleó la proteína quimérica rGra4-Gra7 como marcador de infección aguda.
- » Los títulos fueron más elevados en grupos control y vehículo que en los vacunados, indicando menor replicación parasitaria.

Cinética de la respuesta humoral frente a antígenos recombinantes**Cinética de anticuerpos:**

- » rGra4Gra7 y rGra8: reconocidos tempranamente (desde día 15 post-infección), actuando como marcadores de fase aguda (Fig. 1C).
- » rBCLA, rRop2 y rCST9: respuestas más tardías (desde día 30), asociadas a fase crónica y presencia de quistes (Fig. 1C).

Variabilidad cepa/dosis:

- » La cepa RH indujo respuestas más rápidas, pero con caída abrupta al día 60.
- » La cepa Me49 generó respuestas más sostenidas, con mayor presencia de quistes en cerebro.
- » El nivel de inoculación tuvo poca influencia en la cinética global.

Correlación con lesiones cerebrales:

- » Animales con lesiones más severas tendieron a mostrar menor reactividad a rGra4Gra7, sugiriendo un posible rol protector.
- » Anticuerpos frente a rBCLA y rCST9 se asociaron a mayor carga de quistes y daño tisular.

Sueros de campo:

- » En ovinos naturalmente infectados, rGra4Gra7 y rGra8 mostraron la mejor performance diagnóstica, superando a ELISAs basados en lisado total.
- » La combinación rGra4Gra7+rGra8 alcanzó una sensibilidad del 86 %.

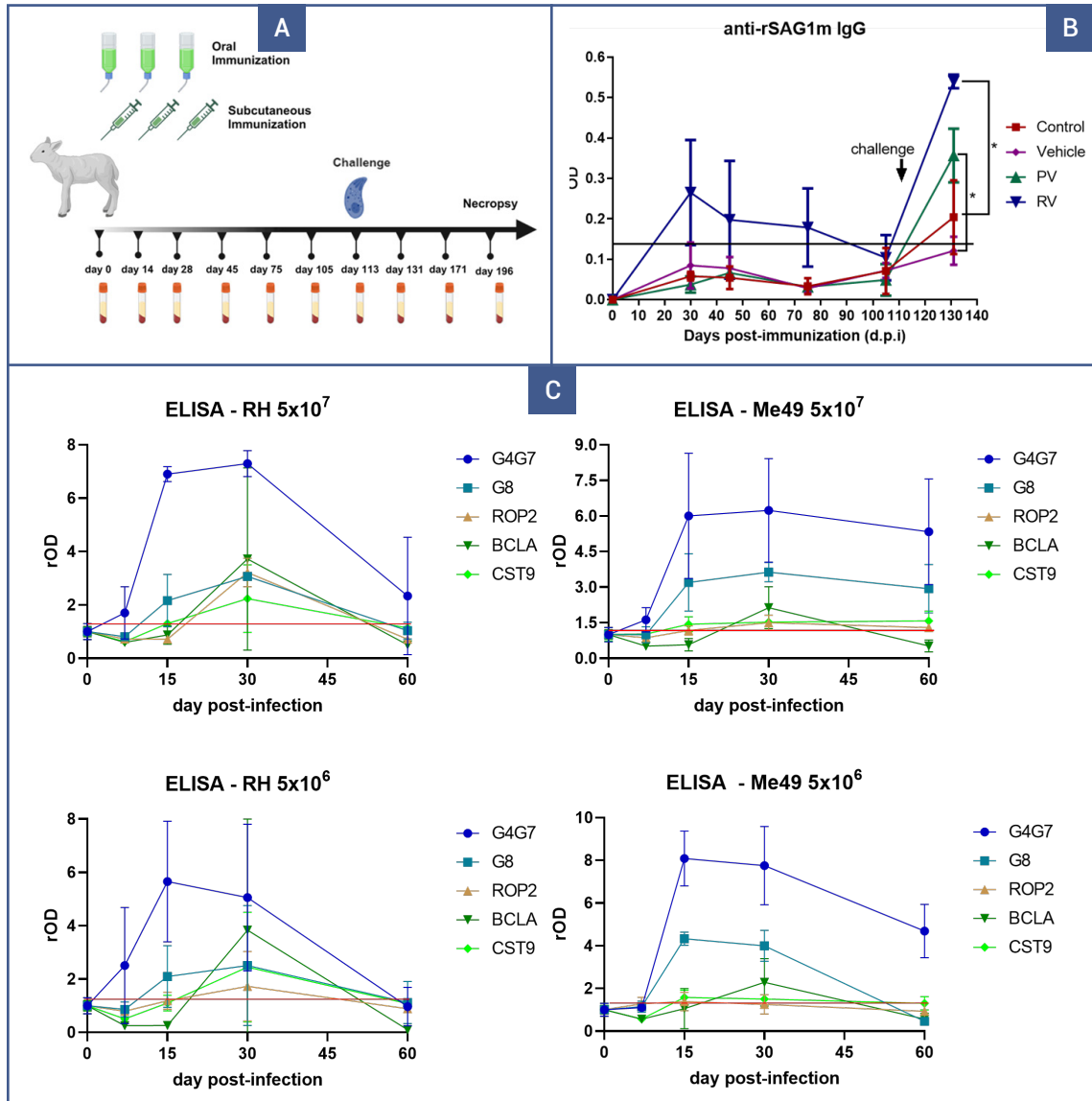


Figura 1. Respuesta inmunitaria en corderos frente a *Toxoplasma gondii*. **(A)** Plan de inmunización y protocolo de desafío. Vacuna Recombinante (RV): corderos inmunizados por vía subcutánea con la proteína recombinante NbHsp90-SAG1HC purificada de *E. coli*; Vacuna Vegetal (PV): corderos inmunizados por vía oral con hojas frescas infiltradas con AtHsp81.2-SAG1HC; Grupo Control: corderos inmunizados por vía oral con tampón PBS; Grupo Vehículo: corderos inmunizados por vía oral con hojas frescas no infiltradas. Todos los animales recibieron tres dosis separadas por 14 días. Se tomaron muestras de sangre para monitorear la cinética de anticuerpos específicos. A los 113 días post-inmunización, todos los corderos fueron desafiados por vía subcutánea con 5×10^6 taquizoitos de la cepa RH de *T. gondii*. En el día 196, los animales fueron sacrificados y se obtuvieron muestras de sangre y tejidos. **(B)** Cinética de anticuerpos IgG frente a rSAG1 purificado de *E. coli* en sueros de los grupos Control, Vehículo, Vacuna Recombinante (RV) y Vacuna Vegetal (PV). Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA de dos vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. * $p < 0,05$. La línea negra horizontal indica el valor de corte. El gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados similares. **(C)** Perfil de la respuesta humoral frente a antígenos individuales. La reactividad de IgG contra rGra4Gra7, rGra8, rROP2, rBCLA y rCST9 fue evaluada mediante ELISA a lo largo del curso de la infección. Los valores de densidad óptica (OD) se normalizaron respecto a las lecturas correspondientes al día 0 y se expresaron como OD relativa (rOD). La línea roja representa la media de OD más una desviación estándar.

Discusión

Ambos estudios aportan evidencia complementaria sobre la inmunidad ovina frente a *T. gondii*. Por un lado, el ensayo de vacunación demostró que tanto la plataforma recombinante como la vegetal, al fusionar el antígeno SAG1_{HC} con isoformas de Hsp90 de plantas, confieren inmunidad parcial protectora, reflejada en la reducción de lesiones cerebrales y en la modulación de marcadores serológicos. Un hallazgo notable es la capacidad del extracto vegetal de inducir una respuesta celular robusta (IFN- γ , IP-10), clave en el control del parásito, lo que resalta el valor de los adyuvantes derivados de plantas. Por otro lado, el estudio sobre cinética humoral mostró que distintos antígenos recombinantes tienen comportamientos diferenciados según la fase de infección: Gra4Gra7 y Gra8 se asocian con infección aguda, mientras que BCLA y CST9 se relacionan con cronicidad y lesiones. Esto aporta herramientas diagnósticas valiosas para la identificación de animales infectados en campo y para el monitoreo de eficacia vacunal.

La integración de resultados permite destacar varias conclusiones:

- » Los antígenos derivados de proteínas de superficie (SAG1) y de gránulos densos (Gra4/Gra7, Gra8) son altamente inmunogénicos y relevantes tanto en diagnóstico como en vacunación.
- » La utilización de chaperonas vegetales como Hsp90 no sólo mejora la expresión antigénica, sino que también potencia la inmunogenicidad, actuando como adyuvantes naturales.
- » La correlación entre títulos de anticuerpos y severidad de lesiones no siempre es lineal; sin embargo, ciertos perfiles (alta respuesta anti-Gra4Gra7) podrían asociarse a mejor control de la infección.
- » Las diferencias observadas entre cepas y modelos experimentales resaltan la necesidad de validar estos hallazgos en condiciones de campo, con infecciones por ooquistes y en diferentes razas de ovinos.
- » En conjunto, estos estudios abren la puerta a un abordaje integral de la toxoplasmosis ovina, combinando estrategias preventivas (vacunación) con herramientas diagnósticas precisas (antígenos recombinantes) para mejorar la sanidad animal y reducir la transmisión zoonótica.

Conclusiones

La toxoplasmosis ovina constituye un desafío sanitario, productivo y de salud pública que demanda soluciones innovadoras. La vacunación con SAG1_{HC}-Hsp90 en corderos confiere protección parcial, reduciendo significativamente las lesiones cerebrales tras el desafío experimental. Los antígenos recombinantes rGra4Gra7 y rGra8 se perfilan como marcadores sensibles de infección aguda, mientras que rBCLA y rCST9 se asocian a fases crónicas y a patología cerebral. La combinación de antígenos en ensayos serológicos mejora la capacidad diagnóstica, superando a pruebas convencionales basadas en lisados totales. La integración de plataformas vacunales seguras con herramientas diagnósticas específicas representa una estrategia prometedora para el control de la toxoplasmosis en ovinos, con beneficios directos sobre la producción y la salud pública.

Bibliografía

- ¹Hill, D. & Dubey, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clinical Microbiology and Infection* 8, 634–640 (2002).
- ²Luft, B. J. & Remington, J. S. Toxoplasmic Encephalitis in AIDS. *Clinical Infectious Diseases* 15, 211–222 (1992).
- ³Dubey, J. P. Toxoplasmosis in sheep—The last 20 years. *Vet Parasitol* 163, 1–14 (2009).
- ⁴Stelzer, S. *et al.* *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis in farm animals: Risk factors and economic impact. *Food Waterborne Parasitol* 15, e00037 (2019).
- ⁵Katzer, F. *et al.* Immunization of lambs with the S48 strain of *Toxoplasma gondii* reduces tissue cyst burden following oral challenge with a complete strain of the parasite. *Vet Parasitol* 205, 46–56 (2014).
- ⁶Hecker, Y. P. *et al.* Evaluation of frequency of antibodies against *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp. and transmission routes in sheep from Humid Pampa, Argentina. *Acta Parasitol* 63, 416–421 (2018).
- ⁷Tenter, A. M., Heckeroth, A. R. & Weiss, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 30, 1217–1258 (2000).
- ⁸Devleeschauwer, B. *et al.* Risk ranking of foodborne parasites: State of the art. *Food Waterborne Parasitol* 8–9, 1–13 (2017).
- ⁹Buxton, D. & Innes, E. A. A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. *Parasitology* 110, S11–S16 (1995).
- ¹⁰Campero, L. M. *et al.* Immunization with plant-based vaccine expressing *Toxoplasma gondii* SAG1 fused to plant HSP90 elicits protective immune response in lambs. *Acta Trop* 262, (2025).



Herramientas moleculares para contribuir al control de la babesiosis bovina

Paoletta, M.¹; Farber, Marisa¹

¹Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO), INTA-CONICET, Hurlingham, Buenos Aires, Argentina. *farber.marisa@inta.gob.ar

La babesiosis bovina es una enfermedad transmitida por garrapatas y causada por parásitos protozoarios intraeritrocíticos pertenecientes al género *Babesia*, y constituye un problema sanitario para la producción ganadera tanto en Argentina como a nivel global. Se estima que más de la mitad de los 1200 millones de bovinos del mundo corren riesgo de infección por habitar en regiones tropicales y subtropicales del mundo donde esta enfermedad es enzoótica. De las especies que pueden infectar bovinos, *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* son las más ampliamente distribuidas y son transmitidas por la garrapata común del ganado, *Rhipicephalus microplus*.

Nuestro grupo de trabajo, siempre en colaboración con los colegas de las EEA Mercedes (Corrientes) y Rafaela (Santa Fe), hemos desarrollado a lo largo de más de 20 años una amplia gama de herramientas moleculares que nos han permitido abordar la problemática de las enfermedades transmitidas por garrapata desde diferentes ángulos, con el objetivo de contribuir tanto a la generación de potenciales soluciones como a la formación de jóvenes investigadores en el área de la Parasitología Molecular.

En tal sentido, en esta presentación recorreremos los resultados y las perspectivas de tres líneas de trabajo. En primer lugar, discutiremos el rol de las Proteínas de Tipo Perforina (Perforin-like Proteins, PLPs) en el mecanismo de egreso de *Babesia bovis* desde el eritrocito y las estrategias disponibles para caracterizar funcionalidad y generar parásitos genéticamente modificados, como posibles alternativas de atenuación de cepas vacunales. Por otra parte, expondremos los resultados del estudio molecular de la cepa vacunal de *Babesia bigemina* de la EEA-Mercedes. Por último, discutiremos la potencialidad de los nanoanticuerpos para el diseño de ensayos de detección serológica para la evaluación del equilibrio enzoótico y la evaluación de la eficacia del uso de las vacunas actualmente en uso.



Control de la neosporosis bovina

Milton M. McAllister¹ and Dadín P Moore²

¹Adelaide University, Australia. milton.mcallister@adelaide.edu.au

²CONICET, Argentina

Después de 3 décadas de haberse identificado a *Neospora caninum* como agente causal de abortos en ganado bovino en Argentina (Venturini y col., 1995; Campero y col., 1998), se conocen algunos detalles sobre el parásito *Neospora caninum* y sus modos de transmisión, comúnmente conocidos como transmisión horizontal y transmisión vertical. Desafortunadamente, los detalles entre ambos suelen confundirse. La transmisión horizontal significa que el parásito se transmite entre cánidos y ganado. El término transmisión vertical indica que la infección se ha transmitido de la vaca a su descendencia por vía transplacentaria. Pero la transmisión transplacentaria puede ocurrir al menos de 2 maneras distintas: 1º) después de la recrudescencia de organismos latentes en una vaca infectada (transmisión vertical endógena); y, 2º) por ingesta de ooquistes que contaminan las fuentes de comida o agua (transmisión vertical exógena) (McAllister, 2016). Sin embargo, otros casos de transmisión vertical dependen de la incidencia histórica de transmisión horizontal que puede haber ocurrido en vacas por primera vez una o más generaciones atrás (vacas cero "0"). Desde esta perspectiva, resulta evidente que la transmisión vertical y la horizontal están inexorablemente vinculadas (Figura 1). Esta conexión dificulta el control de la neosporosis al intentar bloquear un método de transmisión e ignorar el otro. Por otro lado, los perros se infectan con *N. caninum* al ingerir tejidos de ganado infectado, incluyendo placentas. El ganado puede infectarse al ingerir los ooquistes microscópicos eliminados en las heces de los perros recién infectados. Los ooquistes pueden sobrevivir en el suelo y el agua durante largos períodos hasta ser ingeridos, mucho después de que las heces se hayan descompuesto y los ooquistes se hayan esparcido dentro del polvo y el agua (McAllister, 2016).

Frecuente se afirma que la neosporosis se puede controlar mediante el descarte de las vaquillonas infectadas. Si bien este método de control puede ser útil, es muy costoso y el veterinario debe comprender los riesgos de recomendarlo como única forma de control. También se ha recomendado que los tambos deben eliminar a los perros, pero podrían considerarse algunos matices importantes que ayudarían a desarrollar consejos razonablemente más prácticos. Finalmente, es posible reducir los riesgos la transmisión de *N. caninum* entre perros y ganado sin tener que recomendar la eliminación de todos los perros (McAllister, 2016).

Antes de la existencia de la agricultura, *N. caninum* circulaba entre ungulados y cánidos pero son escasos los informes de enfermedades debido a la neosporosis en animales silvestres en la naturaleza. Antes de la domesticación, el ganado y los cánidos solo interactuaban ocasionalmente siendo muy baja carga animal y nunca convivían como en los campos de cría y tambos actuales. Aunque el organismo ha desarrollado una relación más comensal en el entorno natural, la neosporosis doméstica es una de las causas más frecuentes de abortos bovinos a nivel mundial, incluyendo la Argentina (Campero y col., 2023). A veces también puede causar mortalidad neonatal o el nacimiento de un ternero debilitado con incapacidad de mamar o ponerse de pie (Micheloud y col., 2015).

La evidencia experimental disponible indica que las infecciones por *N. caninum* adquiridas por la ingestión de ooquistes por vacas durante la preñez no pueden atravesar la placenta durante el primer trimestre. A diferencia del primer trimestre, la mayoría de los fetos se infectan si la vaca se ex-

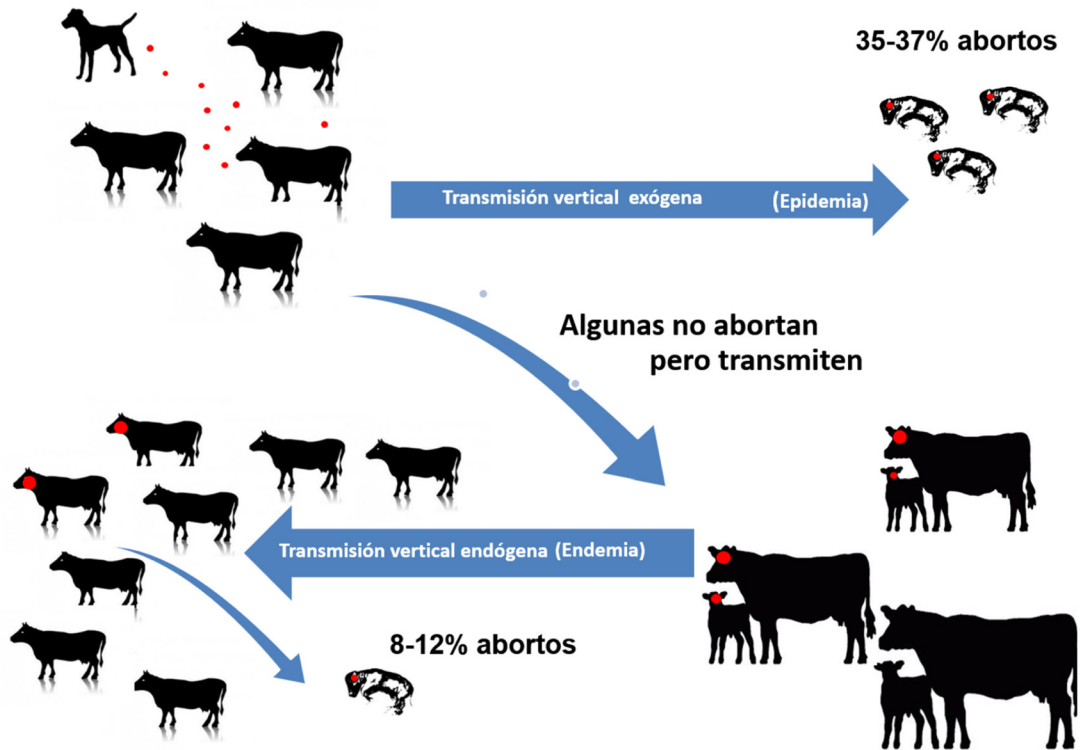


Figura 1. Neosporosis epidémica y endémica asociadas a transmisión vertical exógena y endógenas

pone a ooquistes en el tercer trimestre, pero generalmente sin dañar al feto, que ya cuenta con un sistema inmunitario bien desarrollado. En el segundo trimestre, parece haber un período durante el cual la exposición materna a ooquistes puede, en ocasiones, causar transmisión transplacentaria al feto, que, si se infecta, no puede defenderse adecuadamente y corre el riesgo de morir o resultar herido. Esto es muy similar a lo que ocurre con la toxoplasmosis en mujeres preñadas y ovejas.

Los datos experimentales específicos son los siguientes:

- » Vacas preñadas fueron expuestas a ooquistes experimentalmente en tres investigaciones realizadas en dos países.
- » Ninguno de los 10 fetos se infectó con la exposición a ooquistes de vacas en el día 70 de la preñez.
- » En vacas expuestas a ooquistes entre los días 120 y 130 de gestación, sólo 4 de 19 fetos se infectaron, pero cabe destacar que de los cuatro fetos infectados, dos fueron abortados y uno fue mortinato.
- » A diferencia de épocas anteriores, la exposición de las vacas a los ooquistes después del día 160 causó infecciones en 7 de 9 fetos, pero los 7 infectados se nacieron vivos y aparentemente sanos.

En el ganado criado en régimen extensivo, el riesgo de que un gran número de vacas se infecten simultáneamente con *N. caninum* es mínimo, ya que no pueden pastar todas en la misma peque-

ña parcela de pasto que podría estar contaminada con heces caninas infectadas. Generalmente, sólo un animal a la vez puede infectarse por el pastoreo. Además, cuando una hembra se infecta, puede que no esté adulta, o que no esté preñada en ese momento o que no se encuentre en una etapa de gestación susceptible a provocar un aborto. Por lo tanto, en estas condiciones, el riesgo de un brote de aborto a gran escala es bajo.

Comparemos eso con la alimentación del ganado lechero. Con las prácticas lecheras modernas, no hay suficiente espacio para que todas las vacas pasten, y sus necesidades nutricionales son tan grandes que no pueden obtener suficiente energía ni proteína solo del pasto. Por lo tanto, el pastoreo se ha reemplazado por el suministro de raciones mixtas. Debido a la necesidad de almacenar los alimentos y luego mezclar los ingredientes de la ración, la contaminación de cualquier pequeña porción de alimento puede ahora distribuirse fácilmente y contaminar un gran volumen de alimento que luego se administra a grupos de vacas. A menudo, las vacas en tambos se dividen en grupos según su etapa de lactancia, lo que significa que cualquier grupo de vacas puede estar aproximadamente en la misma etapa de gestación. En estas condiciones, existe un gran riesgo de infecciones a gran escala, y si las vacas se encuentran en una etapa de gestación susceptible, esto puede provocar brotes de aborto. Otro punto de vulnerabilidad, para ambos tipos vacas para carne y vacas para leche, es la contaminación de pequeños estanques de agua superficial, en los que los oocistos de las heces pueden ser arrastrados por la lluvia.

Si bien podemos recomendar sistemas de manejo para reducir la incidencia de neosporosis, se debe advertir a los ganaderos que actualmente no existen medidas de control que garanticen la no reaparición de un problema de neosporosis en ningún hato lechero o de carne. Incluso con un buen manejo del ganado lechero, el parásito puede infectar a los animales de diversas formas, a través de perros domésticos, la compra de alimentos que ya pueden estar contaminados, o el uso de agua contaminada, mientras que los animales de pastoreo siempre tendrán la posibilidad de infectarse individualmente al azar. Por lo tanto, no podemos afirmar con certeza que los niveles de infección se puedan eliminar o mantener bajos únicamente mediante el manejo.

Todo alimento "a granel" o embolsado está disponible para los roedores. Por lo tanto, también atrae a perros y otros depredadores. Además, en muchas granjas, a los perros les gusta dormir sobre el heno y otras pilas de alimento, y defecar sobre ellas, la cual se mezcla con las raciones del ganado. Se utiliza maquinaria pesada para cargar y mezclar el alimento y crear raciones mixtas, que pueden contener oocistos de *N. caninum* y otros patógenos (por ejemplo: *Leptospira* spp. o *Salmonella* spp.).

En los rebaños lecheros, así como en los bovinos para carne alimentados con piensos mixtos, los procedimientos de manejo deben apuntar a reducir el riesgo y la magnitud de la transmisión de neosporosis mediante la contaminación de los alimentos. El objetivo principal, entonces, es evitar la contaminación de los alimentos almacenados antes de incorporarlos a las raciones mixtas. En otras palabras, no se debe permitir el acceso de perros ni otros cánidos a los alimentos almacenados. Esto se puede lograr protegiendo los alimentos almacenados dentro de edificios, contenedores o cercas cerradas a las que no puedan acceder los perros.

Muchos tambos modernos son grandes empresas y, por lo tanto, necesitan realizar inversiones adecuadas para proteger sus alimentos y la salud de sus vacas. Se sugiere la utilización de buenas cercas y tranqueras automáticas que faciliten la entrega de alimentos mediante remolques de tractores y el uso diario de maquinaria pesada. Tambos pequeños pueden resguardar pilas de alimentos mediante cercas eléctricas portátiles, establos, tolvas para granos y silos verticales. A las vacas lecheras se les debe proporcionar agua en abrevaderos elevados para evitar la contaminación fecal y, siempre que sea posible, evitar el uso de pequeños estanques superficiales. En el

caso de rebaños para carne, evitar los estanques es menos viable, ya que pueden ser una fuente de contaminación.

En los tambos que ya presentan problemas de abortos endémicos debido a la neosporosis, el uso de estos métodos para prevenir la contaminación de las raciones mixtas y el agua debería resultar en una reducción gradual del nivel de infección. Sin embargo, si la mayoría de los abortos se deben a transmisión vertical endógena, se pueden añadir otros procedimientos de control más rápidos, como la identificación serológica de las vacas infectadas combinada con el uso de semen de carne (Lagomarsino y col., 2019) y semen sexado. De este modo, todas las crías de las vacas infectadas pueden utilizarse para la producción de carne y ninguna quedará como vaquillona de reemplazo. El uso de semen sexado en vacas seronegativas puede asegurar la producción de un número adecuado de vaquillonas sanas para mantener el tamaño del rebaño lechero en el futuro. Por lo tanto, en lugar de utilizar semen de carne de todas las vacas seropositivas, también se puede considerar la selección y retención de vaquillonas seronegativas, independientemente del estado serológico de las madres. Las terneras pueden someterse a pruebas serológicas a los 6 meses de edad, tras la pérdida de anticuerpos maternos.

Finalmente, los fetos y las placentas deberán ser recolectadas y eliminadas en un digestor o al menos, debería garantizarse que no sean ingeridos por los perros. Asimismo, los perros deberán ser alimentados con raciones balaceadas comerciales y deberán dormir lejos del heno u otros alimentos para vacas.

Bibliografía:

- Campero, C.M., Anderson, M.L., Conosciuto, G., Odriozola, H., Bretschneider, G., Poso, M.A., 1998. *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in Argentina. *Vet Rec.* 143, 228–229.
- Campero LM, Basso W, Moré G, Fiorani F, Hecker YP, Echaide I, Cantón GJ, Cirone KM, Campero CM, Venturini MC, Moore DP., 2023. Neosporosis in Argentina: Past, present and future perspectives. *Vet Parasitol Reg Stud Reports.* 41:100882. doi:10.1016/j.vprsr.2023.100882
- Lagomarsino, H., Scioli, A., Rodríguez, A., Armendano, J., Fiorani, F., Bence, A., García, J., Hecker, Y., Gual, I., Cantón, G., Odeón, A., Campero, C., Moore, D., 2019. Controlling endemic *Neospora caninum*-related abortions in a dairy herd from Argentina. *Front Vet Sci.* 6, 446.
- McAllister MM., 2016. Diagnosis and Control of Bovine Neosporosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*
- Micheloud, J.F., Moore, D.P., Canal, A.M., Lischinsky, L., Hecker, Y., Canton, G., Odriozola, E., Odeon, A., Campero, C.M., 2015. First report of congenital *Neospora caninum* encephalomyelitis in two newborn calves in the Argentinean pampas. *Journal of Veterinary Science and Technology.* 6, 251
- Venturini, L., Di Lorenzo, C., Venturini, M.C., Romero, J., 1995. Anticuerpos anti *Neospora* sp., en vacas que abortaron. *Vet. Argent.* 12, 167–170.



Análisis estructurales de proteínas basados en IA y su aplicación para el desarrollo de nuevas vacunas contra parásitos apicomplexa.

Carlos E. Suárez

Department of Veterinary Microbiology and Pathology, Washington State University.
E-mail: suarez@wsu.edu

Los parásitos del género Apicomplexa son causantes de enfermedades de alto impacto, en animales y humanos, incluyendo entre otras, malaria, toxoplasmosis, theileriosis, babesiosis, coccidiosis y cryptosporidiosis. Los parásitos pertenecientes al género apicomplexa tienen ciclos de vida complejos que incluyen mecanismos de reproducción sexuales y asexuales, que en algunos casos, transcurren en más de un huésped, vertebrado o invertebrado. Durante estas transiciones que además ocurren en distintas condiciones ambientales, los parásitos apicomplexa pueden experimentar importantes cambios fenotípicos, que pueden afectar su morfología y funciones⁽¹⁾.

Debido a las importantes pérdidas económicas que generan y a su potencial zoonótico estos parásitos requieren de ser controlados mediante el uso de drogas, vacunas y otras intervenciones, que en general no son consideradas altamente efectivas o prácticas⁽¹⁾. Para el desarrollo de métodos de control es importante conocer a fondo la biología de estos parásitos y encontrar sus vulnerabilidades. Este enfoque requiere de investigar la función y localización de proteínas y otras moléculas de importancia para el desarrollo del parásito. Estos objetivos pueden lograrse actualmente con mayor eficiencia y rapidez mediante el empleo de nuevas herramientas de investigación, incluyendo, por ejemplo, la genómica, proteómica, metabolómica, y más recientemente, el análisis estructural de proteínas *in silico* empleando tecnologías derivadas de la inteligencia artificial. Los nuevos métodos *in silico* para la comparación de proteínas basados en estructuras pueden agregar una nueva dimensión en la definición de superfamilias de proteínas, que hasta ahora solo podían ser organizadas empleando únicamente el análisis comparativo de secuencias lineales de aminoácidos. Nuevos enfoques usando comparaciones estructurales basados en algoritmos de inteligencia artificial tales como *AlphaFold 3*, pueden ahora emplearse para determinar y comparar estructuras de proteínas con un alto grado de confianza, lo cual permite la identificación de homólogos estructurales de proteínas entre parásitos relacionados y generar información acerca de sus posibles funciones y relevancia para el desarrollo de vacunas e intervenciones farmacológicas^(2, 3, 4, 5).

La babesiosis bovina, es una enfermedad transmitida por garrapatas de género *Rhipicephalus* causada por principalmente por *Babesia bovis* y *B. bigemina*. Esta enfermedad, es también conocida como tristeza bovina es un factor limitante para la producción ganadera en Argentina⁽⁶⁾.

Tanto la *Babesia bovis* como la *B. bigemina* son organismos de transmisión transovárica y dixerónicos, ya que requieren de dos huéspedes (uno artrópodo y el otro vertebrado) para completar su ciclo de vida, y solamente pueden invadir eritrocitos en los bovinos. De esta manera, estos parásitos completan su reproducción asexual en el huésped bovino, mientras que se reproducen sexualmente en el intestino del vector artrópodo, siendo la garrapata *Rhipicephalus microplus*, la más común en regiones endémicas en Argentina⁽¹⁾. Brevemente su ciclo en el bovino comienza, cuando las larvas, en el caso de *B. bovis*, o las ninfas, en el caso de *B. bigemina*, de la garrapata transmiten esporozoitos a través de su saliva al alimentarse de la sangre del huésped bovino. Los esporozoitos invaden rápidamente a los eritrocitos del bovino, donde se convierten en trofozoitos que se dividen asexualmente en dos merozoitos, que serán capaces de invadir otros eritrocitos. De esta manera, el incremento exponencial en el número de parásitos conlleva a una

destrucción masiva de eritrocitos, causando anemia hemolítica y otros trastornos relacionados (fiebre, esplenomegalia, anorexia, debilidad, agresividad, daño renal, abortos, etc.) en el huésped bovino⁽¹⁾. En el caso particular de *B. bovis*, el parásito es también capaz de modificar la superficie del eritrocito infectado de manera de aumentar su adhesividad a los capilares, lo cual conlleva al secuestro de eritrocitos infectados con parásitos en los epitelios capilares⁽¹⁾. Este fenómeno se hace evidente clínicamente en la forma de babesiosis cerebral cuando los eritrocitos infectados se secuestran masivamente en los capilares epiteliales del sistema nervioso central del bovino, generando cambios fisiológicos y en el comportamiento del animal infectado, tales como postración, respiración dificultosa, temblor muscular, y anorexia. Los bovinos jóvenes (menores de un año) son, en general, menos susceptibles que los adultos a la enfermedad^(1, 6). La reproducción sexual de las *Babesias* tiene lugar en el intestino de la garrapata hembra, resultando en la producción de oocinetos, o vermiculos, que invaden los ovarios de la garrapata, infectando a la próxima generación de larvas, resultando así en transmisión transovárica. El diagnóstico de babesiosis puede lograrse mediante la observación directa del parásito en frotis de sangre tenidos con colorante de Giemsa, o por métodos serológicos para la detección de anticuerpos, por ejemplo, mediante inmunofluorescencia indirecta y ELISA, y métodos moleculares generalmente basados en el PCR para detectar el ADN de los parásitos. La babesiosis bovina suele controlarse empleando distintos métodos, incluyendo el control de las garrapatas, el uso de vacunas vivas basadas en organismos atenuados, y tratamientos con drogas, tales como el dipropionato de imidocarbo. Las vacunas vivas están basadas en parásitos de virulencia atenuada^(1, 6), pero tienen muchas limitaciones. Con el advenimiento de técnicas de clonado de y expresión proteínas recombinantes, se buscó desarrollar vacunas basadas en subunidades basadas en proteínas recombinantes. Esto condujo a la identificación y caracterización molecular de varias proteínas expresadas por *Babesia* que fueron consideradas como candidatos para desarrollar tales vacunas a subunidades, basadas en antígenos recombinantes. En general, la elección de tales candidatos se funda en argumentos funcionales, conservación, y localización. Basado en estos criterios, la proteína RAP-1 surgió como un candidato óptimo, basado en su localización en las rhoptrias, una de la organelas del aparato apical de los de los parásitos apicomplexa que participa del mecanismo de invasión de los eritrocitos, su exposición superficial en los merozoitos, y su elevado grado de conservación entre distintas cepas y entre especies de *Babesia*^(7, 8). Asimismo, no se habían identificado nunca proteínas similares a RAP-1 fuera del grupo de piroplasmidos, que también incluye a *Theileria* y *Cytauxzoon*, además de *Babesia*⁽⁹⁾. Aunque su ubicación en las rhoptrias sugiere un papel en el mecanismo de invasión, la función exacta de RAP-1 permanece desconocida⁽⁹⁾.

Un aspecto esencial para comprender el rol funcional de las proteínas es la determinación de su estructura, ya que es sabido que la conformación espacial de las proteínas es determinante en su función. De esta manera, la identificación de homólogos estructurales con funciones previamente caracterizadas puede proveer las claves para el desarrollo de experimentos diseñados para definir funciones específicas de una determinada proteína de función desconocida (Figura 1). Los métodos experimentales clásicos de determinación de las estructuras son usualmente técnicamente dificultosos, y debido a esas limitaciones, solo se conocía hasta hace poco la estructura de un número relativamente limitado de proteínas. Recientemente, los métodos *in silico* basados en Inteligencia Artificial (IA) han sido empleados con éxito en la resolución de estructuras terciarias de proteínas, y han revolucionado esa área de investigación. Entre los sistemas más exitosos, se encuentra el algoritmo *AlphaFold*, desarrollado por el proyecto *DeepMind*, financiado por Google. Este algoritmo logró predecir *in silico* la estructura terciaria de más de 200 millones de proteínas empleando Inteligencia Artificial (IA)^(2,3,4). Además, es importante destacar que tales estructuras están accesibles, libres de cargo, a los investigadores^(2,3). Como referencia, con anterioridad a la implementación de este proyecto, se habían determinado experimentalmente las estructuras de

aproximadamente 170.000 proteínas empleando métodos tales como espectrometría de rayos X, o espectrometría NMR entre otros. La información generada en la determinación de estas estructuras se encuentra depositada en una base de datos conocida como "*Protein Data Bank*" (PDB), que contiene información detallada sobre la estructura tridimensional todas las proteínas determinadas experimentalmente. Los sistemas de predicción de estructuras basados en IA están entrenados con bases de datos que contienen información que se encuentran depositadas en el PDB. De esta manera, los algoritmos de "*Deep learning*", particular las redes neuronales, aprenden a predecir la distribución espacial de aminoácidos basados en los patrones adquiridos de su entrenamiento previo⁽³⁾. *AlphaFold*, así como otros y por otros similares simplemente requieren una secuencia de aminoácidos como entrada, ya que la secuencia primaria de una proteína determina su estructura terciaria.

El uso de la metodología de IA de *AlphaFold* permitió conocer con un elevado grado de confianza, la estructura terciaria de la proteína RAP-1, una proteína altamente conservada en *Babesias* y otros piroplasmidos⁽⁵⁾ (Fig 2). Este estudio reveló que esta proteína tiene al menos 3 dominios estructurales. Uno de ellos, el más conservado, tiene una estructura de 4 hélices alfa, que es significativamente similar a las de las globinas (por ejemplo hemoglobinas, aunque las RAPs carecen del grupo prostético hemo), mientras que también contiene un arreglo de otras 4 hélices alfa que se conecta con la región tipo globina por uniones tipo puente de hidrogeno, y una zona de estructura más amorfa adonde reside la parte no conservada entre especies de *Babesia*, conteniendo repeticiones que son altamente antigénicas⁽⁵⁾. El descubrimiento de esta estructura permitió además la identificación de otras proteínas en otros organismos relacionados (*Toxoplasma* y *Plasmodium*) con estructuras similares, que tienen muy escasa conservación a nivel de la estructura primaria (secuencia de aminoácidos)⁽⁶⁾. Basados en estos hallazgos, fue posible la identificación de una nueva superfamilia de proteínas con estructuras de globina similares, que están presentes en organismos eucariotas y también procariotas, como *Geobacter sulfurreducens*⁽⁶⁾. Esos descubrimientos permitirán crear nuevas hipótesis acerca de la función de RAP-1 y abriría las puertas para el probable diseño de moléculas que podrían bloquear la función de RAP-1 en el futuro. De esta manera, el uso de estructuras permitió la identificación de nuevas superfamilias de proteínas, lo cual no había sido posible anteriormente mediante el uso de enfoques basados únicamente en la comparación de la estructura primaria de proteínas, tales como el programa BLAST y similares (8). En otros estudios empleando estructuras terciarias definidas por IA mediante el programa DALI⁽¹⁰⁾, también se pudo determinar que las regiones más conservadas de las proteínas RAP-1 tenían estructuras comparables a otras proteínas que unen ATP, sugiriendo que las funciones de RAP-1 podrían requerir la unión a este ligando⁽⁹⁾. Esta estrategia para el desarrollo de vacunas o estudios funcionales puede ser trasladado a otras situaciones similares, y está representado en la Figura 1.

El uso de la IA en la determinación de estructuras de proteínas también ayudo a la definición de aspectos importantes de otro candidato vacunal de *Babesia*, como lo es la proteína HAP2^(11, 12). Esta proteína, también muy conservada en muchos protozoarios, virus, y plantas, es requerida como fusogeno en el mecanismo de reproducción sexual, y es un candidato probado para el desarrollo de vacunas capaces de bloquear la transmisión en *B. bovis*⁽¹¹⁾. La aplicación de *AlphaFold* permitió determinar la presencia de tres dominios externos conservados en esta proteína⁽¹²⁾. En base a esa información, se construyeron proteínas recombinantes representando a cada uno de los dominios y se estableció cuáles eran los dominios de mayor antigenicidad en sueros de vacunos vacunados con HAP2 que eran capaces de inhibir la reproducción sexual del parásito.

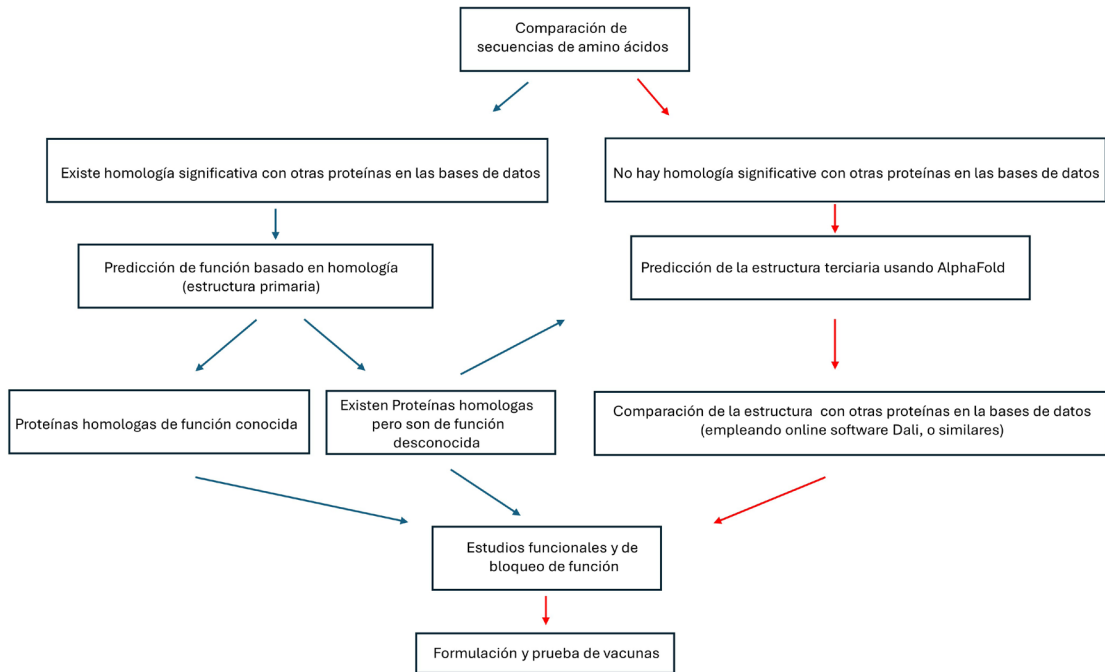


Figura 1. Diagrama de flujo para el uso de métodos de IA para determinar estructuras terciarias de proteínas a partir de su estructura primaria, para estudios funcionales y para el desarrollo de vacunas.

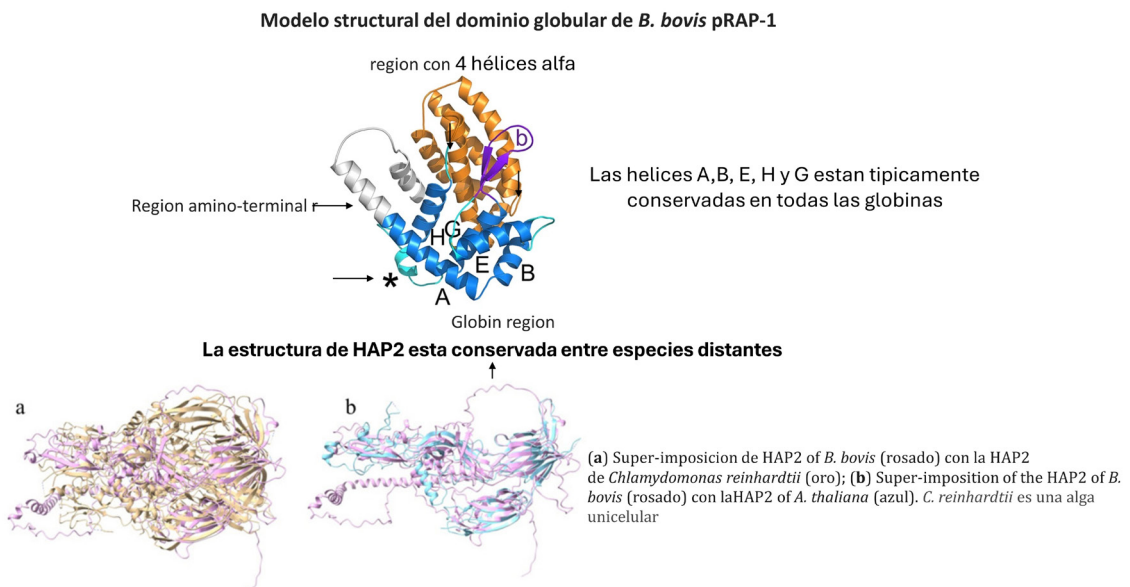


Figura 2. Modelos estructurales de las proteínas RAP-1 y HAP2 de *B. bovis*, determinadas por métodos de IA (*AlphaFold3*).

Conclusiones

La disponibilidad de métodos basados en la IA para determinar estructuras de proteínas con un alto grado de confiabilidad aumenta significativamente nuestras capacidades para desarrollar nuevas estrategias de intervención contra agentes infecciosos. Además, otros modelos basados en IA también permiten el diseño *in silico* de nuevas vacunas. Tomadas en conjunto, es de esperar que estas nuevas aplicaciones facilitarán el diseño de nuevas vacunas y drogas, ingeniería de proteínas, y nos conducirán a un mejor entendimiento de la biología de los organismos que son responsables de enfermedades de importancia que afectan a los animales y a los humanos.

Referencias

- ¹Rathinasamy V, Poole WA, Bastos RG, Suarez CE, Cooke BM. Babesiosis Vaccines: Lessons Learned, Challenges Ahead, and Future Glimpses. Trends Parasitol. 2019 Aug;35(8):622-635. doi: 10.1016/j.pt.2019.06.002. Epub 2019 Jul 4.PMID: 31281025
- ²Jumper, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with *alphafold*. Nature596 (7873), 583–589. 10.1038/s41586-021-03819-2 (2021)
- ³Varadi, M. *et al.* AlphaFold protein structure database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. Nucleic Acids Res.50 (D1), D439–D444. 10.1093/nar/gkab1061 (2022)
- ⁴Mirdita, M. *et al.* ColabFold: making protein folding accessible to all. Nat. Methods. 19 (6), 679–682. 10.1038/s41592-022-01488-1 (2022)
- ⁵Hötzel I, Suarez CE. Structural definition of *babesial* RAP-1 proteins identifies a novel protein superfamily across Apicomplexa. Sci Rep. 2023 Dec 15;13(1):22330. doi: 10.1038/s41598-023-49532-0.PMID: 38102310
- ⁶Ferreira GCM, Canozzi MEA, Peripolli V, Moura GP, Sánchez J, Martins CEN.Prevalence of bovine *Babesia* spp., *Anaplasma marginale*, and their co-infections in Latin America: Systematic review-meta-analysis. Ticks Tick Borne Dis. 2022 Jul;13(4):101967. doi: 10.1016/j.ttbdis.2022.101967. Epub 2022 May 14.
- ⁷Rojas MJ, Bastos RG, Navas JA, Alzan HF, Laughery JM, Lacy PA, Ueti MW, Suarez CE. Evaluation of the Use of Sub-Immunodominant Antigens of *Babesia bovis* with Flagellin C Adjuvant in Subunit Vaccine Development. Front Immunol. 2024 Apr 24;15:1380660. doi: 10.3389/fimmu.2024.1380660. eCollection 2024.
- ⁸Bastos RG, Thekkiniath J, Ben Mamoun C, Fuller L, Molestina RE, Florin-Christensen M, Schnittger L, Alzan HF, Suarez CE. *Babesia* microti Immunoreactive Rhoptry-Associated Protein-1 Paralogs Are Ancestral Members of the Piroplasmid-Confined RAP-1 Family. Pathogens. 2021 Oct 26;10(11):1384. doi: 10.3390/pathogens10111384.
- ⁹Rojas MJ, Bastos RG, Navas J, Laughery JM, Lacy PA, Suarez CE. A conserved motif in the immune-subdominant RAP-1 related antigen of *Babesia bovis* contains a B-cell epitope recognized by antibodies from protected cattle.
- ¹⁰Holm L, Laiho A, Toronen P, Salgado M (2023) DALI shines a light on remote homologs: one hundred discoveries. Protein Science 23, e4519
- ¹¹Silva, M. G. *et al.* Vaccination of cattle with the *Babesia Bovis* sexual-stage protein HAP2 abrogates parasite transmission by *Rhipicephalus microplus* ticks. NPJ Vaccines. 8 (1), 140. 10.1038/s41541-023-00741-8 (2023).
- ¹²Rahman SMR, Alzan HF, Laughery JM, Bastos RG, Ueti MW, Suarez CE. Structural and antigenic characterization of *Babesia Bovis* HAP2 domains. Sci Rep. 2025 Mar 5;15(1):7781. doi: 10.1038/s41598-025-91359-4.



Desarrollo de vacunas frente a protozoos causantes de fallo reproductivo en los rumiantes domésticos

Ortega-Mora, Luis Miguel^{1,2*}; Alvarez-García, G.^{1,2}; Collantes-Fernández, E.^{1,2}; Ferre-Pérez, I.^{1,2}; Regidor-Cerrillo, J.²

¹SALUVET, Animal Health Department, Faculty of Veterinary Sciences, Complutense University of Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain.

²SALUVET Innova, Complutense University of Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain.

*luis.ortega@ucm.es

Cada año, la producción mundial de las diferentes especies de rumiantes domésticos experimenta cuantiosas pérdidas económicas debidas al fallo reproductivo. Los dos principales agentes protozoarios responsables del aborto en estas especies son *Neospora caninum* en el ganado bovino y *Toxoplasma gondii* en la oveja y en la cabra. *Tritrichomonas foetus* es una causa relevante de fallo reproductivo temprano en bovinos criados en condiciones extensivas donde se utiliza la monta natural. A pesar del impacto de estas enfermedades reproductivas existe una notable falta de fármacos y vacunas eficaces que puedan utilizarse en los programas de control.

Entre los factores clave que han limitado el desarrollo de vacunas cabe mencionar como más relevantes los siguientes: i) se trata de microorganismos altamente evolucionados con una gran complejidad antigénica y redundancia en los grupos de genes que realizan una misma función por lo que la posibilidad de interrumpir el ciclo utilizando una única diana es muy improbable; ii) estos protozoos han coevolucionado con sus hospedadores rumiantes y existe una gran adaptación con los mismos; iii) su circulación y diseminación en las explotaciones ganaderas se produce mediante ciclos biológicos complejos con diferentes estadios en el mismo hospedador algunos de los cuáles permiten una clara evasión de la respuesta inmunitaria del rumiante; esto junto la existencia de fases de resistencia en el ambiente -los ooquistes- y la presencia de diferentes modos de transmisión hace extraordinariamente variado el panorama de las posibles implicaciones epidemiológicas y clínicas y dificulta, por tanto, su control; y iv) el desenlace final de la infección está influenciado por numerosos factores maternos y fetales y esta tiene lugar en un entorno biológico cambiante como la gestación.

Con estos antecedentes, en nuestra presentación se resumirán las estrategias adoptadas por nuestro grupo de investigación para abordar el desarrollo de vacunas frente a estas enfermedades: a) definición del perfil del producto vacunal adaptado al objetivo que se pretende; b) desarrollo de vacunas inactivadas altamente seguras y teniendo en cuenta su vida útil, mantenimiento y distribución; c) nuevos enfoques prácticos y económicos para la obtención de los antígenos vacunales y su formulación; d) vacunas rentables económicamente; y e) desarrollo de sistemas DIVA que hagan compatible su uso con las medidas habituales de control basadas en diagnóstico y manejo del rebaño. Para estos desarrollos siempre se han utilizado modelos de enfermedad robustos y representativos (cepas parasitarias, estado sanitario animal, metodologías analíticas, etc.) teniendo en consideración la dinámica de la enfermedad en condiciones naturales.

C

Vacunas, tecnologías avanzadas y control de los protozoos Apicomplejos

Tratamiento y control de criptosporidiosis en terneros

Calderón, Gabriel Alfredo ¹

¹Ganadería – MSD Salud Animal Argentina
Email: gabriel.alfredo.calderon@msd.com1

La criptosporidiosis neonatal, causada por *Cryptosporidium parvum*, constituye una de las principales causas de diarrea en terneros jóvenes, con impacto negativo sobre la salud, el bienestar animal y la productividad. Adicionalmente, las infecciones por éste parásito representan una zoonosis, con lo cual el impacto que tiene éste agente no solamente afectan a la salud animal, sino que representan un riesgo a la salud humana, especialmente a las personas dedicadas al cuidado y crianza de nuestros terneros. El presente trabajo describe las indicaciones de uso, esquema terapéutico y consideraciones de seguridad del lactato de halofuginona para el tratamiento y control de la criptosporidiosis en terneros. El fármaco está indicado para terneros neonatos y debe administrarse por vía oral a una dosis de 100 µg de halofuginona base/kg de peso corporal/día durante siete días consecutivos. Con el objetivo de facilitar su aplicación en condiciones de campo, se propone un esquema de dosificación simplificado según rangos de peso corporal. La administración debe iniciarse dentro de las primeras 24–48 horas de vida en establecimientos con antecedentes de la enfermedad, o dentro de las 24 horas posteriores al inicio de la diarrea asociada a *C. parvum*. El tratamiento sistemático de los terneros recién nacidos contribuye a la reducción de la intensidad y duración de la diarrea, como así también a la reducción de contaminación del ambiente con ooquistes de éste parásito. Se destacan como aspectos críticos la correcta dosificación, el respeto de las contraindicaciones y la prevención de sobredosificación, dado el estrecho margen de seguridad del principio activo. La halofuginona representa una herramienta eficaz dentro de un enfoque integral de manejo sanitario, que debe complementarse con adecuadas prácticas de calostrado, nutrición, higiene y manejo ambiental.

Keywords: Bovinos para leche; *Cryptosporidium parvum*; lactato de halofuginona lactato