

DESARROLLO DE INMUNOCROMATOGRAFÍAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSIS Y NEOSPOROSIS BOVINA

DEVELOPMENT OF AN IMMUNOCROMATHOGRAPHY FOR BOVINE LEPTOSPIROSIS AND NEOSPOROSIS DIAGNOSIS

Valeria Montenegro, Vanina Varni, Ariel Nagel, José Manuel Jaramillo Ortiz, Martina Paoletta, Sofia de la Fourniere, Christian Leandro Macoretta, Dadin Prando Moore, Bibiana Brihuega, Karina Caimi, Silvina Wilkowsky (Laboratorio de Hemoparásitos, Instituto de Biotecnología, INTA Castelar – Argentina)

Resumen

Los abortos en el ganado bovino implican pérdidas económicas en la industria pecuaria; los agentes infecciosos son una de las principales causas asociadas. Entre las diversas enfermedades identificadas en nuestro país como responsables de abortos en bovinos, la neosporosis y la leptospirosis adquieren suma importancia no solo debido a las pérdidas económicas aparejadas, sino, también, en el caso de esta última, al riesgo que implica para la salud pública.

El diagnóstico de ambas enfermedades se basa en métodos serológicos que requieren de la producción de antígenos a partir de cultivos bacterianos y parasitarios, respectivamente, y, a su vez, de sistemas de detección o revelado solamente presentes en laboratorios de referencia.

En este proyecto, se propone el desarrollo de dos pruebas de inmunocromatografía lateral para el diagnóstico de *Leptospira* sp. y *Neospora caninum*. Ambos test estarán basados en antígenos recombinantes y podrán ser utilizados a campo sin requerir de ningún equipamiento sofisticado para su lectura. Además de contar con el nuevo desarrollo diagnóstico, este proyecto permitirá obtener información sobre la prevalencia de estas infecciones veterinarias y establecer la situación epidemiológica de la leptospirosis y la neosporosis bovinas en diferentes áreas geográficas de nuestro país.

Palabras clave: leptospirosis, neosporosis, inmunocromatografía lateral.

Abstract

Abortions in cattle are a major source of economic losses in the livestock industry. Infectious agents are one of the main associated causes. Among the diseases identified as responsible for abortions in cattle in our country, neosporosis and leptospirosis acquire importance, because of the rigged economic losses, and also for the risk involved to public health in case of leptospirosis.

Diagnosis of both diseases is currently based on serological methods that require the production of bacterial and parasitic antigens and at the same time, special equipment present just at reference laboratories, which make it unsuitable for clinical or field applications.

For these reasons this project proposes the development of an immunochromatography test with high sensitivity and specificity based on recombinant antigens for diagnosis of *Leptospira* sp. and *Neospora caninum*. This test that does not require any instrument, would be extremely valuable for use in clinical and field applications for the diagnosis of both diseases. In addition to the new diagnostic development, this project will provide information on the prevalence of these infections and will establish the veterinary epidemiological situation of bovine Leptospirosis and Neosporosis in different geographic areas of Argentina.

Keywords: leptospirosis, neosporosis, immunochromatography.

Introducción

Los abortos en el ganado bovino implican graves pérdidas económicas en la industria pecuaria y, si bien el riesgo de sufrirlos puede deberse a múltiples factores, los agentes infecciosos constituyen una de las principales causas asociadas (Tramuta et ál., 2011). Los desórdenes reproductivos como los abortos o las pariciones prematuras constituyen, en general, los únicos síntomas de enfermedad en los animales preñados.

La Argentina posee alrededor de cincuenta millones de cabezas de ganado, y las pérdidas durante la preñez debido a enfermedades infecciosas tienen un alto impacto económico. Recientemente, en un informe del período

1994-2000 en el que se evaluaron alrededor de cuatrocientos fetos provenientes de abortos bovinos, se pudieron identificar virus, bacterias y parásitos como los agentes causales de dichos abortos, aunque, a pesar de ello, en el 54 % de los casos la causa de los abortos no pudo ser determinada (Campero et ál., 2003). Esta situación está íntimamente relacionada con los métodos de diagnóstico e identificación empleados para cada infección. Entre las diversas enfermedades identificadas como responsables de abortos en bovinos, este proyecto se propone estudiar la leptospirosis y la neosporosis, que constituyen enfermedades de suma importancia debido a las pérdidas económicas aparejadas en el sector pecuario.

La leptospirosis es causada por espiroquetas pertenecientes al género *Leptospira*. Existen nueve especies patógenas en el género. Entre ellas, las de mayor impacto en el ganado bovino son *L. interrogans* y *L. borgpetersenii*. Asimismo, se reconocen alrededor de doscientas serovariedades de este microorganismo con diferentes prevalencias y que, en general, se encuentran asociadas a uno o más hospedadores que actúan como reservorios (Levett, 2001). El serovar Pomona es el de mayor impacto en bovinos en nuestro país, y su manifestación clásica son los denominados abortos en tormenta (Licoff et ál., 2008).

Las técnicas de diagnóstico más comúnmente utilizadas se basan en la detección de anticuerpos contra las leptospirosis, pero los anticuerpos detectables aparecen en sangre alrededor de los cinco a diez días posinfección (Levett, 2001). Existen otras técnicas capaces de detectar dichos anticuerpos, como Microaglutinación en Placa (MAT), ELISA e Inmunofluorescencia indirecta (IFI), que se basan tanto en preparaciones antigénicas como en sonicados de leptospirosis o proteínas recombinantes. Entre estas últimas, la proteína LigA, Omp1 (porina de membrana externa) y la lipoproteína de superficie mayoritaria, LipL32, han sido las más estudiadas y utilizadas en diversos test de ELISA (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010). A pesar de ello, actualmente la técnica MAT es considerada la prueba de referencia: es una técnica bastante compleja de realizar e interpretar y, por ende, no se encuentra ampliamente distribuida en centros de diagnóstico periféricos y en regiones tropicales o subtropicales, donde la leptospirosis es mayormente endémica (Goris et ál., 2013).

Por lo tanto, para aquellas situaciones en las que se requiera un diagnóstico rápido y certero (brotes, abortos en tormenta, etc.) los Test de Diagnóstico Rápido (TDR) juegan un rol fundamental en la detección rápida de casos. Existen diferentes TDR desarrollados para *Leptospira*. Los que alcanzaron mayor sensibilidad y especificidad son aquellos basados en inmunocromatografías de flujo lateral que buscan la detección de IgM en el suero problema.

Los de mayor aplicación son LeptoTek Lateral Flow (86 % de sensibilidad y 84 % de especificidad) y Leptocheck-WB (80 % y 93 %, respectivamente) fueron los únicos evaluados en muestras de humanos provenientes de diferentes brotes y lugares (Goris et ál., 2013). Entre ambos, Leptocheck-WB es el único que se basa en una proteína recombinante fijada a la fase sólida. Ambos test de inmunocromatografía lateral son comercializados por empresas de origen extranjero.

Neospora caninum es un protozooario Apicomplexa causante de abortos en bovinos de regiones ganaderas de todo el mundo. Su ciclo de vida es heteroxeno. El perro (*Canis familiaris*) y el coyote (*Canis latrans*) son los hospedadores definitivos reconocidos hasta el presente. La infección transplacentaria es un mecanismo eficiente de transmisión de la enfermedad, pero existe evidencia que demuestra la transmisión postnatal en los bovinos (Moore et ál., 2005). Debido a las pérdidas económicas que causa la neosporosis, se han desarrollado diversas técnicas diagnósticas basadas en la detección de anticuerpos contra *N. caninum*, entre ellas ELISA e Inmunofluorescencia Indirecta (IFAT). Sin embargo, la mayoría de estas pruebas utilizan taquizoítos enteros o lisados parasitarios, lo que dificulta la producción y estandarización de estos insumos para las pruebas diagnósticas (Dubey y Schares, 2006). Asimismo, ambas técnicas requieren de equipamiento específico y personal técnico entrenado para realizar las pruebas y evaluar objetivamente los resultados.

En el laboratorio de Hemoparásitos de INTA Castelar hemos clonado, expresado y purificado un antígeno inmunodominante de *N. caninum* denominado SAG-1 por sus siglas en inglés de Surface Antigen 1. Con esta proteína se desarrolló una prueba denominada APIA consistente en una membrana de nitrocelulosa que contiene la proteína SAG-1 recombinante aplicada en forma de línea que puede ser enfrentada a un panel de hasta cuarenta sueros simultáneamente (Wilcowsky et ál., 2011). El test de APIA se evaluó utilizando 232 sueros bovinos de distinta procedencia y mostró una sensibilidad de un 85 % y una especificidad del 96 %. Investigadores japoneses (Liao et ál., 2005) han desarrollado en el año 2005 una inmunocromatografía lateral utilizando el antígeno SAG-1, sin embargo, hasta el presente, esta tira reactiva no está siendo comercializada.

Por tales motivos, se plantea como objetivo general el desarrollo de un nuevo test de inmunocromatografía lateral de fácil implementación para el diagnóstico rápido de abortos bovinos producidos por leptospirosis y neosporosis. El test estará basado en las proteínas recombinantes LipL32 y SAG1, respectivamente, y será diseñado de manera tal que permita su utilización a campo y que cumpla con los estándares

de especificidad y sensibilidad comparables con las técnicas serológicas actualmente en uso. La experiencia adquirida en el desarrollo de estas técnicas posibilitará, además, su implementación a futuro, utilizando antígenos recombinantes de otros patógenos de interés en medicina veterinaria o humana cuyo diagnóstico se base en la detección de anticuerpos en suero u otros fluidos biológicos.

Los resultados obtenidos permitirán también obtener información sobre la prevalencia de estas infecciones veterinarias y establecer la situación epidemiológica de la leptospirosis y la neosporosis bovinas en diferentes áreas geográficas de nuestro país. Esto hará posible planificar y aplicar estrategias adecuadas y efectivas para el control de estas enfermedades.

Metodología

Este trabajo se basa en la hipótesis de que es posible desarrollar un test de diagnóstico rápido basado en el uso de proteínas recombinantes, que sea tan eficiente y sensible como los métodos actualmente en uso y que no requiera de ningún equipamiento sofisticado. Para poner a prueba esta hipótesis, se plantean las siguientes actividades:

1- Producción y purificación de los antígenos recombinantes en sistemas heterólogos (*E. coli*).

En este trabajo, se partirá de las proteínas ya clonadas y expresadas en nuestros laboratorios. Se pondrán a punto las condiciones de crecimiento de cada uno de los cultivos de *Escherichia coli*, acorde a su grado de expresión determinada en baja escala, para luego extrapolar estas condiciones a la producción en mayor escala. Las proteínas recombinantes se encuentran fusionadas a un pentapéptido carboxiterminal rico en residuos aminoacídicos de histidina, que facilita la purificación de estas mediante cromatografía de afinidad a través de resinas quelantes de Ni (HiTrap affinity columns, Pharmacia Biotech). Las proteínas se purificarán utilizando cromatografía de afinidad, y se evaluará la necesidad de aumentar el grado de pureza mediante columnas de intercambio iónico y tamiz molecular o purificación por electroelución a partir de geles de poli(acrilamida) preparativos. Estos procedimientos se evaluarán en cada etapa del proceso, y se analizarán las ventajas que otorgaría el grado de pureza respecto del costo y la complejidad. Esta técnica ya ha sido desarrollada en nuestro grupo y se encuentra detallada en el trabajo de Wilkowsky et ál. (2003).

2- Obtención de anticuerpos policlonales contra LipL32 de *Leptospira* sp. y de SAG1 de *Neospora caninum*.

Las proteínas LipL32 y SAG1 recombinantes producidas en *E. coli* y purificadas por cromatografía de afinidad se usarán junto con adyuvante de Freund para inmunizar conejos y obtener los sueros contra cada proteína. Estas actividades se realizarán con la supervisión de la CICUAE del CICVyA de INTA Castelar. Los títulos de los anticuerpos respectivos serán determinados por ELISA indirecto. Estos mismos anticuerpos serán utilizados como control de los experimentos posteriores y para ser fijados en la línea control de la inmunocromatografía.

3- Desarrollo de una inmunocromatografía de flujo lateral (strip test) para la detección de anticuerpos contra *Leptospira* sp. y *Neospora caninum* utilizando los antígenos recombinantes LipL32 y SAG-1.

Las tiras reactivas para inmunocromatografía se desarrollarán en una primera etapa por separado para cada antígeno, y se intentará, en una segunda etapa, realizar el test incluyendo los dos antígenos en una sola tira. Brevemente, el strip test consistirá en una tira de nitrocelulosa que llevará el antígeno unido a partículas coloidales coloreadas en un extremo. Al aplicar una muestra de suero positiva, el antígeno es reconocido por anticuerpos específicos y los complejos antígeno-anticuerpo unidos a las partículas migran por capilaridad y quedan retenidos en la mitad de la tira por un anticuerpo anti IgG bovino covalentemente unido a la nitrocelulosa. Por lo tanto, la aparición de una banda coloreada corresponderá a un resultado positivo. Como control positivo del test y en la parte superior de la tira, se incorporará un anticuerpo policlonal específico contra el antígeno en cuestión que, al unirse a las partículas libres conteniendo solo el antígeno, dará una segunda banda coloreada. Se evaluarán cuidadosamente las condiciones de pegado del antígeno a las partículas y concentraciones de los reactivos, así como la estabilidad del test y su vida útil. Los protocolos para la conjugación de los antígenos recombinantes a las nanopartículas de oro coloidal (SIGMA, USA), la adsorción de los anticuerpos a la tira de nitrocelulosa (Hiflow, Millipore, USA) y la adsorción del conjugado oro-proteína a filtros de fibra de vidrio (Whatman, UK) serán adaptados del trabajo publicado por Kim et ál. (2007).

4- Recolección de muestras de suero de bovinos natural o experimentalmente infectados con *Leptospira* sp. y *Neospora caninum* y de bovinos negativos a estos organismos.

Se colectarán sueros de:

4.1. Bovinos infectados naturalmente con ambos patógenos, confirmado mediante serología positiva (MAT, IFI o ELISA).

4.2. Bovinos negativos a leptospirosis y neosporosis.

5- Estandarización, validación y comparación del strip test con las pruebas de MAT y ELISA para *Leptospira* sp. y *Neospora caninum*, respectivamente.

Se analizarán sueros de grupos de bovinos naturalmente infectados (n=50) con cada patógeno. La infección será confirmada por los métodos serológicos habituales (MAT para leptospirosis y ELISA para Neosporosis). También se analizarán muestras de sueros de otro grupo de bovinos (n=100) serológicamente negativos a estas enfermedades y sueros heterólogos infectados con otros patógenos (como *Brucella* sp. y *Toxoplasma*). Los sueros se usarán para determinar la especificidad, la sensibilidad y el valor predictivo del strip test.

Resultados preliminares

Como primer resultado de este trabajo se cuenta con ambas proteínas recombinantes (SAG 1 y LipL32) obtenidas previamente en nuestro laboratorio. Se logró expresarlas en el sistema heterólogo de *E. coli* con un alto rendimiento (Figura 1) y se evaluaron las condiciones de crecimiento de cada uno de los cultivos de *Escherichia coli*, acorde a su grado de expresión determinada en baja escala, lo que permitirá la producción a gran escala posteriormente. La fusión de ambas proteínas al pentapéptido carboxiterminal rico en residuos aminoácidos de histidina facilitó su purificación mediante cromatografía de afinidad.

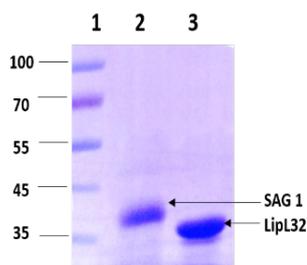


Figura 1: Expresión de las proteínas SAG-1 de *N. caninum* y LipL21 de *L. interrogans* en sistema heterólogo *E. coli*. Línea 1: MPM; Línea 2: SAG-1; Línea 3: LipL32.

Utilizando las proteínas recombinantes ya purificadas, se inmunizaron conejos para la obtención de sueros contra cada una de ellas. Los mismos se emplearon como controles positivos en la etapa del desarrollo de cada inmunocromatografía.

Las inmunocromatografías para cada proteína fueron ya desarrolladas. Cada antígeno fue fijado a la membrana de nitrocelulosa unido a partículas

coloidales coloreadas en un extremo. Ambos antígenos fueron reconocidos por anticuerpos específicos y el complejo antígeno-anticuerpo formado, unido a las partículas de oro coloidal, migran por capilaridad quedando retenidos en la mitad de la tira por un anticuerpo anti IgG bovino covalentemente unido a la nitrocelulosa, se obtiene así una banda coloreada correspondiente al resultado positivo (Figura 2). Los sueros evaluados en este ensayo poseían serología positiva o negativa según corresponda, conforme a las pruebas de referencia de cada enfermedad.

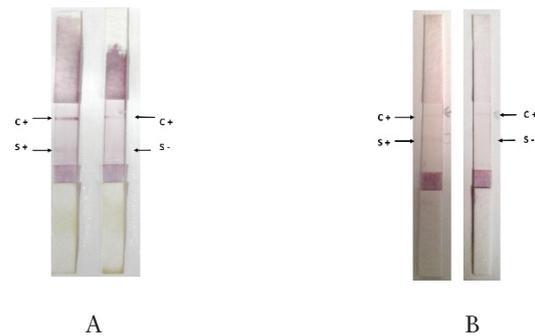


Figura 2: Inmunocromatografía de flujo lateral. A LipL32. B. SAG-1. C+: Control positivo del test (Suero policlonal de conejo anti-LipL32 o anti SAG-1), S+: suero incógnita con resultado positivo. S-: suero incógnita con resultado negativo.

Los próximos pasos consistirán en la evaluación de un mayor número de sueros provenientes de animales con serología positiva y negativa para ambas enfermedades, y la posterior estandarización y validación de este desarrollo respecto de las técnicas de referencia para cada una.

Discusión

La eficiencia reproductiva es un factor determinante en la viabilidad económica de la industria ganadera. Aquellos factores que afectan la reproducción de los animales conllevan un impacto económico sustancial en los productores, exigidos por sostener una descendencia viable y saludable (Wolf, 2003). Las causas de la ineficiencia reproductiva son numerosas y, por ello, nos propusimos estudiar solo dos de las enfermedades infecciosas que están estrechamente relacionadas a la producción de abortos. En nuestro país, la leptospirosis y la neosporosis constituyen enfermedades endémicas cuyo control depende de diversos factores, entre ellos, la disponibilidad de métodos de diagnóstico de fácil implementación.

El diagnóstico de animales infectados se realiza mediante pruebas serológicas como MAT y ELISA, ambas pruebas diagnósticas precisan la producción y estandarización de los insumos antes mencionados. Asimismo, ambas técnicas requieren de equipamiento específico y personal técnico entrenado para realizarlas y evaluar objetivamente los resultados. Por tal motivo, la obtención de una prueba de inmunocromatografía con elevada sensibilidad y especificidad basada en antígenos recombinantes para el diagnóstico de *Leptospira* sp. y *Neospora caninum*, sencilla de realizar y útil para su aplicación en gran escala, es el objetivo principal que nos propusimos en este trabajo.

Hoy existen distintas pruebas comerciales basadas en inmunocromatografía de flujo lateral para ambas enfermedades, pero poseen un costo elevado. Por ello, apostamos al desarrollo de un producto nacional que permita complementar las pruebas de referencia actualmente aprobadas. Se espera que en el corto plazo este tipo de metodología pueda ser incorporado como prueba paralela en distintos planes de control. Nuestro objetivo es ofrecer al mercado un test superior a los comerciales importados, en términos de calidad (especificidad/sensibilidad) y precio. Si bien este proyecto requiere la importación de insumos, una vez desarrollado este requerimiento será prácticamente nulo y todos los reactivos utilizados para el producto serán nacionales.

La experiencia adquirida en el desarrollo de estas técnicas permitirá, además, su implementación a futuro utilizando antígenos recombinantes de otros patógenos de interés en medicina veterinaria o humana cuyo diagnóstico se base en la detección de anticuerpos en suero u otros fluidos biológicos.

Los resultados obtenidos posibilitarán también obtener información sobre la prevalencia de estas infecciones veterinarias y establecer la situación epidemiológica de la leptospirosis y la neosporosis bovinas en diferentes áreas geográficas de nuestro país. Esto permitirá planificar y aplicar estrategias adecuadas y efectivas para el control de estas enfermedades.

Bibliografía

- Adler, B. y A. de la Pena Moctezuma (2010), "Leptospira and leptospirosis", *Vet Microbiol* 140, pp. 287-296.
- Campero, C. M.; Moore, D. P.; Odeón, A. C.; Cipolla, A. L. y E. Odriozola (2003), "Aetiology of bovine abortion in Argentina", *Veterinary Research Communication* 27, pp. 359-369.
- Dubey, J. P. y G. Schares (2006), "Diagnosis of bovine neosporosis", *Vet Parasitol.* 140, pp. 1-34.
- Goris, M. G. A.; Leeflang, M. M. G.; Loden, M.; Wagenaar, J. F. P.; Klatser, P. R.; Hartskeerl, R. A. y K. R. Boer (2013), "Prospective Evaluation of Three Rapid Diagnostic Tests for Diagnosis of Human Leptospirosis", *PLoS Negl Trop Dis* 7 (7), p. 2290 [en línea]. Disponible en: <doi:101371/journalpntd.0002290>.
- Kim, C.; Alhassan, A.; Verdida, R. A.; Yokoyama, N.; Xuan, X.; Fujisaki, K.; Kawazu, S. y I. Igarashi (2007), "Development of two immunochromatographic tests for the serodiagnosis of bovine babesiosis", *Vet Parasitol* 148, pp. 137-143.
- Levett, P. N. (2001), "Leptospirosis", *Clin Microbiol Rev* 14, pp. 296-326.
- Liao, M.; Zhang, S.; Xuan, X.; Zhang, G.; Huang, X.; Igarashi, I. y K. Fujisaki (2005), "Development of rapid immunochromatographic test with recombinant NcSAG1 for detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle", *Clin Diagn Lab Immunol.* 12, pp. 885-887.
- Licoff, N.; Koval, A.; López, S.; Margueritte, J. y M. Mejía (2008), "Brote de leptospirosis en feedlot: descripción del caso, confirmación diagnóstica y medidas de control implementadas", *Vet. Arg.* 25 p. 250 [en línea]. Disponible en: <www.produccion-animal.com.ar>.
- Moore, D. P.; Odeón, A. C.; Venturini, M. C. y C. M. Campero (2005), "Neosporosis bovina: conceptos generales, inmunidad y perspectivas para la vacunación", *Revista Argentina de Microbiología* 37, pp. 217-228.
- Wilkowsky, S. E.; Gimenez Bareiro, G.; Mon, M. L.; Prando Moore, D.; Caspe, G.; Campero, C.; Fort, M. y M. I. Romano (2011), "An Applied Printing Immunoassay With Recombinant NcSAG1 For Detection Of Antibodies To *Neospora caninum* in cattle", *J. Vet. Diagn. Inv.* 23, pp. 971-976.
- Tramuta, C.; Lacerenza, D.; Zoppi, S.; Gorla, M.; Dondo, A.; Ferroglio, E.; Nebbia, P. y S. Rosati (2011), "Development of a set of multiplex standard polymerase chain reaction assays for the identification of infectious agents from aborted bovine clinical samples", *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23, pp. 657-664.
- Wolf, C. A. (2003), "The economics of dairy production", *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 9, pp. 271-93.