

ESTRATEGIAS PARA LA MEJORA DEL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA BESNOITIOSIS BOVINA

Paula García Lunar

Tesis Doctoral

Besnoitia besnoiti es un protozoo apicomplejo formador de quistes responsable de la besnoitiosis bovina, una enfermedad crónica y debilitante que origina importantes pérdidas económicas en el ganado bovino a nivel mundial. En la actualidad, no existen tratamientos ni vacunas disponibles y, por tanto, las medidas de control se deben basar en la detección de animales infectados para reducir la prevalencia en zonas endémicas y evitar la entrada de la enfermedad en zonas libres a través de la compra de animales infectados. Los principales retos en la investigación sobre este parásito son, por un lado, la mejora de las técnicas serológicas para realizar un diagnóstico preciso y, por otro lado, el empleo de las nuevas pruebas diagnósticas desarrolladas para determinar el impacto de la enfermedad mediante estudios de prevalencia e incidencia. Dada la rápida diseminación de la besnoitiosis bovina en Europa, se han desarrollado numerosas técnicas de diagnóstico serológico. Sin embargo, éstas no han sido validadas en estudios comparativos y, por ello, los datos epidemiológicos descritos por los diferentes laboratorios, no son comparables. Además, no se ha establecido una prueba de referencia, lo cual es de vital importancia para el establecimiento de un protocolo de diagnóstico común entre los países afectados. Por otra parte, se ha puesto de manifiesto la necesidad de mejorar la sensibilidad (Se) de las pruebas para detectar a los animales infectados durante la fase aguda, así como los infectados durante la fase crónica que presentan niveles bajos de anticuerpos, los cuales en diversas ocasiones se encuentran por debajo del punto de corte de las técnicas diagnósticas. Además, también es necesario mejorar su especificidad (Esp), ya que las actuales pruebas ELISA, que se emplean de forma rutinaria en el diagnóstico de la infección, pueden dar lugar a un elevado número de resultados falsos-positivos que pueden repercutir de forma negativa en la eficacia de los planes de control.

Por ello, en la presente Tesis Doctoral, se han validado por primera vez las técnicas de diagnóstico serológico que se utilizan de forma rutinaria en Europa y se ha establecido un criterio de diagnóstico común entre los países que utilizan habitualmente estas técnicas (Objetivo 1). En este trabajo, se ha demostrado la utilidad de los ELISAs en el diagnóstico y en los estudios epidemiológicos debido a las buenas características diagnósticas observadas. Sin embargo, el Western blot ha mostrado

características diagnósticas mejores y, por ello, se ha considerado la prueba de referencia. Por tanto, se recomienda su empleo como prueba confirmatoria en determinadas ocasiones, como en el caso de resultados dudosos, para determinar el estatus sanitario de las nuevas incorporaciones en rebaños libres de la enfermedad y para el diagnóstico de los animales valiosos antes de llevar a cabo un sacrificio selectivo.

Sin embargo, estudios recientes han puesto de manifiesto la existencia de un número elevado de resultados falsos-positivos mediante la prueba ELISA, lo cual puede comprometer notablemente los planes de control. Por ello, en el Objetivo 2, se ha investigado su origen. Para ello, se han estudiado las reacciones cruzadas serológicas entre antígenos del taquizoíta de *B. besnoiti*, y anticuerpos específicos anti-*N. caninum* y/o anti-*Sarcocystis* spp., ya que son parásitos filogenéticamente cercanos y sus infecciones son muy prevalentes en el ganado bovino a nivel mundial. Este trabajo ha puesto de manifiesto que los resultados falsos-positivos obtenidos con la prueba BbSALUVET ELISA 1.0, están asociados no sólo a la presencia de anticuerpos específicos anti-*Sarcocystis* spp. y anti-*N. caninum*, sino también a un elevado nivel de anticuerpos frente a ambos. Además, se ha puesto de manifiesto la importancia de incluir un número apropiado de sueros procedentes de animales seropositivos frente a *Sarcocystis* spp. y/o *N. caninum*, que además presenten niveles elevados de anticuerpos frente a ambos parásitos en el proceso de validación de las técnicas serológicas de la besnoitiosis bovina.

Debido a las limitaciones de las técnicas serológicas anteriormente descritas, el Objetivo 3 de la presente Tesis Doctoral se ha centrado en la identificación de nuevas dianas diagnósticas para mejorar la Se y Esp de las pruebas. Para ello, en primer lugar, mediante dos abordajes proteómicos, se ha intentado identificar antígenos específicos del taquizoíta de *B. besnoiti* (Sub-objetivos 3.1 y 3.2). Estos trabajos han permitido describir el proteoma y el inmunoma del estadio de taquizoíta de *B. besnoiti*, por primera vez, y se ha observado que la mayoría de las manchas proteicas inmunogénicas están localizadas entre 37 y 50 kDa y en la zona ácida de un gradiente de pH 3-10. Además, el proteoma e inmunoma de *B. tarandi* fue similar al descrito en *B. besnoiti*, si bien se han podido detectar diferencias en abundancia de proteínas entre ambas especies. En estos estudios, se han identificado, por primera vez, 17 proteínas de *B. besnoiti* y *B. tarandi* abundantes y/o inmunogénicas. Desafortunadamente, todas ellas actúan en procesos conservados en los parásitos apicomplejos. En particular, cabe destacar que la mayoría se corresponde con proteínas del metabolismo, proteínas de estrés térmico y proteínas involucradas en la invasión de la célula hospedadora. Además, se han identificado seis proteínas más abundantes en el taquizoíta de *B. besnoiti* (lactato deshidrogenasa (LDH), proteína de estrés térmico (HSP) 90, purina nucleósido fosforilasa y tres proteínas hipotéticas) y seis más abundantes en el taquizoíta de *B. tarandi* (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), LDH, proteína disulfuro

isomerasa (PDI), proteína de la caperuza del ARNm y dos proteínas hipotéticas). Por otra parte, se han detectado 25 manchas proteicas implicadas en las reacciones cruzadas que se producen entre los anticuerpos específicos anti-*N. caninum* y el extracto del taquizoíto de *B. besnoiti*, de las cuales se pudieron identificar la fructosa 1,6-bisfosfatasa aldolasa, enolasa (ENO), HSP60, HSP90 y la actina. Desafortunadamente, en ninguno de los estudios proteómicos llevados a cabo, se han podido identificar dianas diagnósticas, ya que todas las proteínas identificadas corresponden a proteínas conservadas entre protozoos.

Además, se han obtenido ocho anticuerpos monoclonales (MABs) frente a un extracto total y un extracto enriquecido en proteínas de membrana del taquizoíto de *B. besnoiti* (Sub-objetivo 3.3). Estos MABs han sido caracterizados en base a la localización de los epítomos reconocidos mediante microscopía confocal y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Además se ha valorado su especificidad de género, especie y estadio mediante el estudio de las reacciones cruzadas con el estadio de taquizoíto de *B. tarandi*, *N. caninum*, *T. gondii*, con el estadio de cistozoíto de *Sarcocystis* spp., así como con el estadio de bradizoíto de *B. besnoiti*. Los MABs útiles para el diagnóstico deben reconocer antígenos inmunodominantes y específicos de *B. besnoiti*. Por ello, los MABs específicos del taquizoíto de *Besnoitia* spp. 2.G.A, 2.A.12 y 2.G.4, junto con los MABs que reconocen el extremo apical (1.17.8 y 8.9.2) y la superficie del taquizoíto (3.10.8 y 5.5.11) podrían ser buenos candidatos con fines diagnósticos.

Finalmente, se ha obtenido un extracto de taquizoítos liofilizados de *B. besnoiti* y se ha empleado para desarrollar una nueva prueba ELISA (BbSALUVET ELISA 2.0) (Sub-objetivo 3.4). En base a los resultados obtenidos en el Objetivo 2, esta prueba se ha validado usando un alto número de sueros con un resultado de ELISA falso-positivo y falso-negativo. Además, las características diagnósticas se han comparado con las observadas cuando se emplea una prueba *in house* (APure-BbELISA) basada en un extracto enriquecido en proteínas de membrana del taquizoíto y un ensayo comercial (PrioCHECK *Besnoitia* Ab 2.0) previamente desarrolladas. Cabe destacar que BbSALUVET ELISA 2.0 y APure-BbELISA han mostrado características diagnósticas similares y, por tanto, pueden ser utilizadas indistintamente con fines diagnósticos sin la necesidad de emplear el Western blot como prueba confirmatoria. PrioCHECK *Besnoitia* Ab 2.0 ha mostrado valores excelentes de Esp, si bien los valores de Se observados fueron inferiores al 90%. Por lo tanto, en este caso, se recomienda el empleo del Western blot para evitar resultados de ELISA falsos-negativos. Por otra parte, se ha confirmado la utilidad adicional de la nueva prueba BbSALUVET ELISA 2.0 para la detección de la infección por *Besnoitia* spp. en rumiantes silvestres y, por tanto, puede resultar útil para detectar anticuerpos específicos anti-*Besnoitia* spp. en estas especies. Finalmente, es la primera vez que se

emplean taquizoítos liofilizados de *B. besnoiti* para el diagnóstico de *Besnoitia* spp. Su producción fácil y escalable, junto con los buenos resultados obtenidos, hacen que sea un extracto con fines comerciales muy atractivo y, por ello, la prueba ELISA basada en este extracto antigénico se ha protegido mediante una patente.