

# **Infección Experimental de Terneros con Taquizoítos de *Besnoitia besnoiti* inoculados por Vía Subcutánea e Intradérmica**

## **Experimental Infection of Calves with Tachyzoites of *Besnoitia besnoiti* inoculated by Subcutaneous and Intradermal Route**

David Yanguas-Pérez y Carlos Diezma-Díaz

Tutores:

Gema Álvarez-García e Ignacio Ferre Pérez

Universidad Complutense de Madrid

### *Resumen*

El objetivo del presente estudio fue el desarrollo de un modelo experimental de besnoitiosis bovina. Actualmente, no existen fármacos ni vacunas eficaces frente a esta enfermedad crónica y debilitante del ganado bovino, por tanto, es necesario el desarrollo de un modelo animal. Para ello, 9 terneros frisonos de 3 meses de edad fueron divididos aleatoriamente en 3 grupos de 3 animales cada uno. A continuación, fueron inoculados con  $10^6$  taquizoítos de *B. besnoiti* por vía subcutánea (G1) e intradérmica (G2), mientras que el grupo testigo fue inoculado con PBS por vía intravenosa (G3). Se realizó una monitorización clínica diaria de los animales y se tomó sangre semanalmente para estudiar los valores de anticuerpos y parasitemia en sangre hasta el final del experimento (70 días pi). Los animales de los grupos G1 y G2 desarrollaron anticuerpos a partir del día 21 y 26 pi, respectivamente. Además, estos animales presentaron signos clínicos característicos de fase aguda de la enfermedad, sin embargo, ningún animal desarrolló signos clínicos compatibles con la fase crónica. Este estudio confirma que la inoculación de taquizoítos en terneros no logra desarrollar la fase crónica de la enfermedad.

*Palabras clave: Besnoitia besnoiti, terneros, taquizoítos, ruta de inoculación.*

### *Abstract*

The objective of the present study was the development of an experimental model of bovine besnoitiosis. Currently, there are no effective drugs or vaccines against this chronic and debilitating cattle disease. Therefore, the development of an animal model is necessary. Accordingly, nine 3-month-old Holstein Friesian calves were randomly allocated into 3 groups. They were inoculated with  $10^6$  *B. besnoiti* tachyzoites by subcutaneous (G1) and intradermal routes (G2), whereas the control group was inoculated with PBS intravenously (G3). Calves were monitored daily and blood samples were collected weekly to study antibody levels and parasitaemia until the end of the experiment (70 days pi). Animals from G1 and G2 developed specific antibodies from day 21 and 26 pi, respectively. In addition, these animals presented compatible clinical signs of the acute phase of the disease. However, animals did not manifest clinical signs compatible with the chronic phase. This study confirms that the inoculation of tachyzoites in calves fails to develop the chronic phase of the disease.

*Keywords: Besnoitia besnoiti, calves, tachyzoites, inoculation route.*

---

Trabajo presentado en las XII Jornadas Complutenses, XI Congreso Nacional de Investigación en Ciencias de la Salud para Alumnos Pregraduados y XVI Congreso de Ciencias Veterinarias y Biomédicas.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad gracias al proyecto AGL2013-46442R. Carlos Diezma-Díaz es beneficiario de un contrato predoctoral del Ministerio de Economía y Competitividad (BES-2014-069839).

## Introducción

El protozoo apicomplejo *Besnoitia besnoiti* es el agente causal de la besnoitiosis bovina, una enfermedad crónica y debilitante del ganado vacuno que origina pérdidas económicas considerables, principalmente en sistemas de explotación en extensivo. En España, la enfermedad es endémica en varias regiones montañosas (p.ej. los Pirineos, las sierras de Urbasa y Andía y el Sistema Ibérico) y ya está presente en otras regiones del centro y sur del país.

En el ganado bovino se desarrollan dos fases de la enfermedad: inicialmente la fase aguda, en la cual el estadio de taquizoíto se multiplica en las células endoteliales de los vasos sanguíneos, seguida de una fase crónica, donde el estadio de bradizoíto se acantona en el interior de quistes tisulares del tejido conjuntivo. La fase aguda se caracteriza por la aparición de hipertermia, linfadenomegalia, anorexia, edemas y orquitis. En la fase crónica, el animal puede presentar lesiones en la piel (hiperqueratosis, pliegues y alopecia), quistes tisulares en la conjuntiva ocular y mucosa vulvar y esterilidad en machos (Álvarez-García, Frey, Ortega-Mora y Schares, 2013).

Actualmente no existen fármacos ni vacunas eficaces. Para seguir avanzando en este sentido, sería necesario contar con modelos animales que permitieran valorar la seguridad y eficacia de posibles candidatos terapéuticos. Hasta el momento, no se ha conseguido desarrollar un modelo en animales de laboratorio y los estudios previos realizados en el ganado bovino no son reproducibles.

En un ensayo experimental anterior con terneros frisonos se inocularon por vía intravenosa 3 dosis diferentes de taquizoítos:  $10^6$ ,  $10^7$  y  $10^8$ . Los animales desarrollaron la fase aguda de la enfermedad, pero ninguno desarrolló signos clínicos compatibles con la fase crónica. Sin embargo, los terneros inoculados con la dosis más baja presentaron una mayor distribución intra-órgánica del parásito. Teniendo en cuenta estos resultados, en el presente estudio se eligió la dosis más baja de taquizoítos y se ha considerado otra variable como la vía de inoculación que podría ser determinante en el desarrollo del modelo (Diezma-Díaz et al., 2016).

## Objetivo

El objetivo del presente estudio fue desarrollar un modelo *in vivo* de infección experimental por *B. besnoiti* en terneros frisonos inoculados con  $10^6$  taquizoítos por vía subcutánea e intradérmica.

## Material y métodos

Todos los procedimientos experimentales realizados en este ensayo han sido aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Complutense y de la Comunidad de Madrid (Ref. PROEX 092/14).

Se emplearon 9 terneros frisonos machos de 3 meses de edad, que se dividieron aleatoriamente en 3 grupos (G1, G2 y G3) de 3 animales cada uno (T1, T2 y T3). Dos grupos fueron inoculados con  $10^6$  taquizoítos del aislado *Bb*-Spain 3 (Diezma-Díaz et al., 2016) por vía subcutánea (G1) y por vía intradérmica (G2). El grupo G3 fue empleado como testigo y se le administró PBS por vía intravenosa.

Se realizó una exhaustiva inspección clínica diaria incluyendo la toma de temperatura desde 7 días antes de la infección hasta 47 días post-infección (pi) y, posteriormente, una vez a la semana hasta el final del experimento (70 días pi). Se cuantificaron los signos clínicos más característicos de esta enfermedad estableciéndose la siguiente puntuación en función de la gravedad: 0 a la ausencia de signos clínicos, 1 si se observaba linfadenomegalia local, 2 si desarrollaban fiebre, linfadenomegalia sistémica y/o signos respiratorios o quistes en conjuntiva y, finalmente, 3 si desarrollaban edema, orquitis y anorexia en la fase aguda o quistes en conjuntiva y lesiones en piel en la crónica. Además, se tomaron muestras de sangre 2 veces por semana durante el primer mes pi y, posteriormente, semanalmente hasta el final del experimento, para estudiar la parasitemia mediante PCR convencional y determinar la respuesta inmune humoral (anticuerpos específicos frente a *B. besnoiti*) mediante *Bb*ELISA-SALUVET (García-Lunar, 2015).

## Resultados y discusión

Todos los animales de los grupos infectados (G1 y G2) presentaron linfadenomegalia en los ganglios precurales durante los primeros 4 días hasta los 47 días pi. En uno de los terneros inoculados por vía subcutánea (G1T3) se detectó febrícula ( $>39,5^{\circ}\text{C}$ ) durante los primeros 14 días pi. Además, se observaron signos respiratorios como tos y secreción nasal en 2 de los 3 animales del G1 (Tabla 1). Al no detectarse signos clínicos graves, como orquitis y edemas, la gravedad de la fase aguda se clasificó como leve. Desafortunadamente, no se detectaron signos clínicos compatibles con la fase crónica como lesiones en piel y/o presencia de quistes en conjuntiva ocular.

Diezma-Díaz et al. (2016) obtuvieron resultados similares cuando inocularon a terneros con diferentes dosis de taquizoítos por vía intravenosa. Los animales mostraron signos clínicos de fase aguda similares con gravedad leve-moderada, sin presentar lesiones de fase crónica.

Como se muestra en la Figura 1, el grupo G1 seroconvirtió en torno al día 21 pi, seguido del grupo G2 (26 días pi), manteniéndose los valores de anticuerpos más elevados en los grupos infectados con respecto al grupo testigo ( $p<0,001$ ; Test ANOVA de 2 vías; Test Tukey). En los grupos G1 y G2, los valores de anticuerpos se incrementaron de forma significativa desde el día 21 al día 26 pi y desde el día 40 pi hasta el sacrificio ( $p<0,001$ ), alcanzándose valores más elevados en los animales inoculados por vía subcutánea (G1).

Tabla 1

Gradación clínica de los animales hasta el día 39 post-infección. \*G3: Ligera linfadenopatía local y tos sin descarga nasal en T1 y T3. Enfermedades respiratorias subclínicas típicas de terneros de esta edad no pueden controlarse por completo con la vacunación.

Semana pi	FASE AGUDA												
	1		2		3		4		5		6		
	Días pi	1-4	5-7	8-11	12-14	15-18	19-21	22-25	26-28	29-32	33-35	36-39	
		1	1		1	1	1	1	1	1	1		T1
						0						1	
<b>G1</b>	T2	1	1	0	1	1	1	0	1	2	1	1	
	T3	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
<b>G2</b>	T2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	T3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>G3*</b>	T2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	T3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

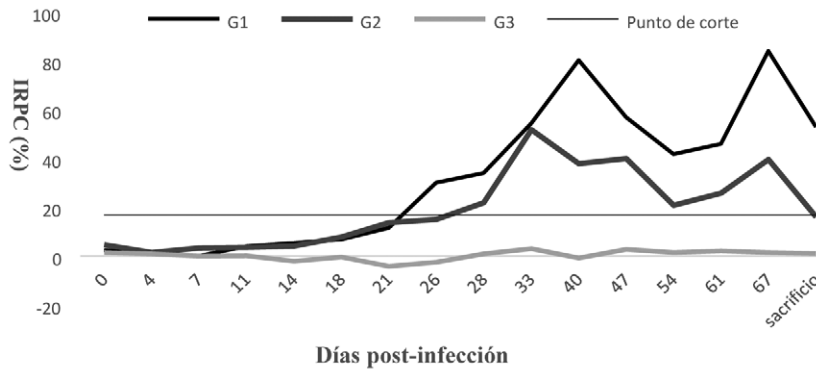


Figura 1. Valores de IgGs frente a *B. besnoiti* en los terneros inoculados a lo largo del experimento.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, si se comparan con los obtenidos por Diezma-Díaz et al. (2016), demuestran que los animales seroconvierten antes y desarrollan valores de anticuerpos más elevados al ser inoculados con taquizoítos por vía intravenosa. La seroconversión más tardía observada en los terneros inoculados por vía intradérmica podría apoyar la hipótesis de la evasión de la respuesta inmunitaria por parte del parásito. La ruta de inoculación podría influir en las células de respuesta inmunitaria innata que actúan en el punto de inoculación, como los macrófagos, células *Natural Killers* y los neutrófilos y que, a

su vez, podrían influir en la respuesta inmunitaria adaptativa (Muñoz-Caro, Silva, Ritter, Taubert y Hermosilla, 2014).

### Conclusiones

Se ha desarrollado un modelo de infección experimental por *B. besnoiti* en terneros frisonos, realizándose una monitorización clínica exhaustiva y determinándose numerosos parámetros mediante diversas metodologías serológicas y moleculares. A pesar de lograr reproducir la fase aguda de

la enfermedad con gravedad leve, no se han detectado signos clínicos característicos de la fase crónica. La vía de inoculación de los taquizoítos no parece influir notablemente en el desarrollo de los signos clínicos de besnoitiosis bovina en los terneros. En la actualidad, se están analizando tejidos de diferentes localizaciones recogidos tras el sacrificio de los animales por histología y PCR para determinar la presencia de lesiones y del parásito. En función de los resultados, se planteará la necesidad de mejorar el presente modelo con el objetivo de inducir signos clínicos más graves, estudiando otras variables del parásito que puedan influir en la infección, como el estadio parasitario.

### Referencias

- Álvarez-García, G., Frey, C. F., Ortega-Mora, L. M., & Schares, G. (2013). A century of bovine besnoitiosis: An unknown disease re-emerging in europe. *Trends in Parasitology*, 29(8), 407-415. <http://doi.org/10.1016/j.pt.2013.06.002>
- Diezma-Díaz, C., Jiménez-Meléndez, A., Re, M., Ferreras, M. C., Benavides-Silván, J., Gutiérrez-Expósito, D., . . . Álvarez-García, G. (Junio de 2016). First experimental infection with *Besnoitia besnoiti* tachyzoites in calves. *Comunicación presentada en las Actas del XXIX Congreso de la Società Italiana di Parassitologia (SolPa) y el European Parasitology Veterinary College*. Bari, Italia.
- García-Lunar, P. (2015). *Estrategias para la mejora del diagnóstico serológico de la besnoitiosis bovina* (Tesis doctoral). Recuperada de <https://eprints.ucm.es/38790/1/T37621.pdf>
- Muñoz-Caro, T., Silva, L. M. R., Ritter, C., Taubert, A., & Hermosilla, C. (2014). *Besnoitia besnoiti* tachyzoites induce monocyte extracellular trap formation. *Parasitology Research*, 113(11), 4189-4197. <http://doi.org/10.1007/s00436-014-4094-3>