



Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de la Plata

Especialización en Diagnóstico Veterinario
de Laboratorio

Plan de Trabajo Final Integrador

Título: “**Presencia de anticuerpos para *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* en caninos de dos zonas de la ciudad de Mar del Plata.**”

Alumno: Goicoechea, María Laura
Director: Gos, María Laura
Codirector: Venturini, María Cecilia

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	14
HIPÓTESIS	15
DESARROLLO.....	15
RESULTADOS	17
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	18
AGRADECIMIENTOS	21
BIBLIOGRAFÍA	22
ANEXO I	27

INTRODUCCIÓN

Los parásitos *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* son dos protozoarios pertenecientes al Phylum Apicomplexa, que se encuentran estrechamente relacionados (Dubey y Lappin, 2006). Son los agentes causantes de las enfermedades toxoplasmosis y neosporosis respectivamente, que afectan a una amplia variedad de animales incluyendo aves y mamíferos, tanto domésticos como silvestres. Son de vida intracelular, presentan un ciclo de vida que incluye un hospedador definitivo, donde se lleva a cabo la fase asexual y sexual del ciclo, y un hospedador intermediario donde se realiza la fase extraintestinal (Dubey, 2010a; Dubey, 2017a). En los caninos domésticos la neosporosis causa alteraciones en el sistema nervioso central y musculoesquelético, y la toxoplasmosis alteraciones neurológicas principalmente (Dubey, 2010b; Dubey, 2017b).

Historia

Toxoplasma gondii fue descubierto en 1908 cuando se aisló un parásito intracelular del hígado y bazo de un roedor silvestre africano. Por su forma arqueada, y por el nombre del roedor en el que fue hallado se lo denominó *Toxoplasma gondii*. En la década del 30 se asoció la presencia de *T. gondii* a lesiones en retina, meningoencefalitis aguda y trastornos en el embarazo en humanos. En la década del 50 se describió la transmisión congénita del parásito en ovinos y roedores. Más tarde, en las décadas del 60 y 70 se describió la transmisión horizontal de *T. gondii*, relacionándose la presencia de la enfermedad primero al consumo de quistes tisulares y posteriormente a la presencia de los ooquistes en materia fecal de felinos (Dubey, 2009), quedando demostrada la importancia del gato en el ciclo de vida y en la transmisión de la enfermedad (Dubey, 2010a).

Neospora caninum fue descrito por primera vez en 1984 en Noruega relacionado a un síndrome de encefalitis y miositis en perros jóvenes. Inicialmente, por su similitud morfológica fue clasificado erróneamente como *T. gondii*, hasta que Dubey en el año 1988 propuso la denominación actual como una nueva especie. Tiempo después se lo asoció a lesiones de abortos en bovinos. A fines de la década del 90 se comprobó de forma experimental que el perro podía actuar como huésped definitivo (Dubey, 2017a). En el año 2001, en Argentina, se realizó el primer aislamiento a nivel mundial de ooquistes de *N. caninum* hallados en heces de un perro infectado naturalmente,

denominándose a la cepa NC-6 Argentina. Posteriormente se reconocieron otros hospedadores definitivos: dingos, coyotes y lobos grises (Dubey y Schares, 2011).

Morfología

Los protozoos pertenecientes al Phylum Apicomplexa son parásitos unicelulares eucariotas, que se desarrollan en el citoplasma de las células del huésped dentro de vacuolas parasitóforas. Poseen un núcleo y organelas que cumplen las distintas funciones vitales, entre ellas mitocondrias, membranas subpelículas, complejo de Golgi, ribosomas, retículo endoplasmático liso y rugoso, gránulos de amilopectina y una organela similar a un plásmido denominada apicoplasto. En su estructura presentan un extremo apical y el otro redondeado. El complejo apical se sitúa en el polo anterior del parásito, y está constituido por estructuras bien diferenciadas: anillos polares anteriores y posteriores, un conoide formado por microtúbulos, pequeñas vesículas elípticas llamadas micronemas, y roptrias, que excretan sustancias que facilitan la penetración, y microtúbulos que van de un polo a otro. Estas estructuras facilitan la adherencia e invasión de la célula hospedadora y poseen un desplazamiento por deslizamiento. Poseen uno o más microporos, que aparecen como una invaginación de la membrana plasmática (Dubey, 2010a; Dubey, 2017a) (Figura 1).



Figura 1. Estructura de un protozoo perteneciente al Phylum Apicomplexa. (<http://ocw.usal.es/ciencias-biosanitarias/introduccion-a-la-protozoologia-clinica-ii-filos-apicomplexa-y-microsporidia>).

Ciclo biológico

Toxoplasma gondii y *N. caninum* poseen tres estadios infecciosos: los taquizoítos, que se sitúan dentro de células nucleadas en vacuolas parasitóforas y se multiplican rápidamente durante la fase aguda de la enfermedad; los bradizoítos o formas de multiplicación lenta, que se encuentran en el interior de los quistes tisulares, que en el caso de *T. gondii* se localizan preferentemente en el tejido nervioso (cerebro, médula, nervios y retina) y en menor medida en hígado, pulmones y músculo esquelético y cardíaco. Los quistes de *N. caninum* se encuentran en su mayoría en tejido nervioso y músculo. En algunas circunstancias (tratamientos con corticoides, infecciones virales) puede producirse una reactivación de la enfermedad a partir de estos, los quistes pueden no causar ningún daño y persistir en el hospedador durante toda la vida sin causar respuesta inflamatoria. Por último, los esporozoítos son las formas parasitarias que se encuentran en el interior de los ooquistes maduros. Estos últimos son eliminados como ooquistes inmaduros en las heces del hospedador definitivo y en el ambiente bajo determinadas condiciones de temperatura y humedad, esporulan y se vuelven infectantes, siendo capaces de transmitir la infección a otro hospedador susceptible (Dubey, 2010a; Dubey y Schares, 2011).

Ambos parásitos presentan un ciclo evolutivo indirecto en donde *T. gondii* tiene como hospedador definitivo a los felinos domésticos y silvestres, y como intermediario a un amplio rango de hospedadores que incluyen variedad de aves y mamíferos, incluido el hombre. *Neospora caninum* tiene como hospedador definitivo al perro doméstico y otras especies de la familia *Canidae*, y como hospedador intermediario a animales domésticos (bovinos, ovinos, cabras) y silvestres (liebres, ciervos, carpinchos, visones, ardillas, ratones). El ciclo comienza con la ingesta de quistes tisulares por parte del hospedador definitivo, donde se produce la multiplicación asexual y sexual del parásito en el intestino. En ésta última se produce la formación de gametos (gametogonia), dando como resultado la formación de los ooquistes inmaduros. Estos son eliminados en la materia fecal y en condiciones de temperatura moderada y alta humedad maduran en el medio ambiente formando en su interior dos esporocistos con cuatro esporozoítos cada uno (esporogonia), convirtiéndose en un ooquiste infectante capaz de permanecer viable en el ambiente por más de 18 meses en el caso de *Toxoplasma gondii* (Tenter y col., 2000), y para *Neospora caninum* no se conoce con exactitud, aunque se cree que sería similar a *T. gondii* (Dubey, 2017a). En los hospedadores intermediarios se lleva a cabo la fase extraintestinal del

ciclo donde luego de ser ingeridas las formas infectantes se liberan en el intestino y penetran en distintas células, llevándose a cabo una multiplicación rápida con formación de taquizoítos, destrucción de células y diseminación por el organismo. Y una fase lenta de multiplicación que da por resultado la formación de bradizoítos y quistes tisulares (Dubey, 2010a; Dubey, 2017a) (Figura 2 y 3).

Existen dos vías de transmisión de estos protozoos (Trees y Williams, 2005): la vía horizontal, que se produce a través de la ingesta de tejidos que contienen quistes, o bien a través de la ingestión de ooquistes esporulados que contaminan el agua, pasturas y otros alimentos; y la vía vertical, en la cual a partir de la parasitemia de la madre se produce el pasaje de taquizoítos por vía transplacentaria al feto (Dubey y Lappin, 2006). La eficiencia de transmisión transplacentaria en caninos ha sido demostrada para *N. caninum* y parece estar directamente relacionada con el título de anticuerpos de la perra. Las perras con altos títulos de anticuerpos tienen mayor probabilidad de parir cachorros infectados, con o sin enfermedad clínica (Barber y Trees, 1998; Dubey; 2017b).

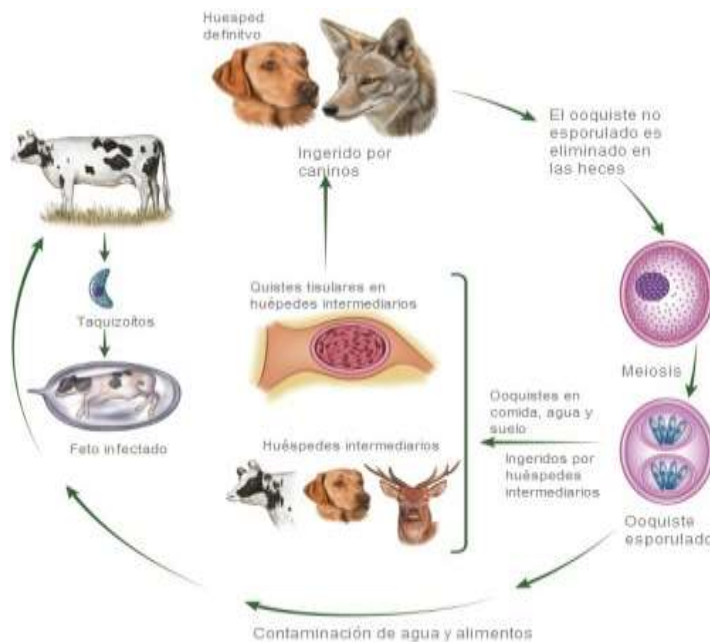


Figura 2. Ciclo biológico de *N. caninum*. Modificado de: Dubey, 2017a.

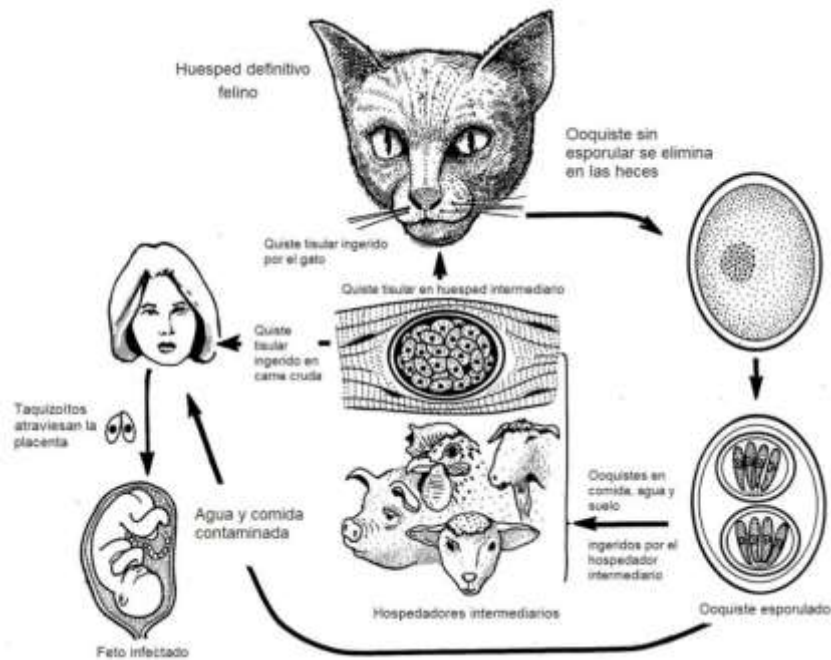


Figura 3. Ciclo biológico de *T. gondii*. Modificado de: Dubey, 2010a.

Signos clínicos

En los caninos, la neosporosis se considera una enfermedad primaria del sistema nervioso y musculoesquelético, pudiendo comprometer diversos órganos. Afecta a cachorros y perros adultos, pero la manifestación más frecuente de signos clínicos se produce en perros menores a un año infectados por vía transplacentaria. Existen estudios experimentales que sugieren que *N. caninum* puede causar muerte fetal, aunque no se han reportado abortos en infecciones naturales (Cole y col., 1995; Dubey, 2017b). Las hembras con infección subclínica pueden transmitir el parásito a varias camadas sucesivas, pero no todos los cachorros de una misma camada se infectan; y a su vez algunos de estos cachorros desarrollan signos clínicos entre las dos semanas y los seis meses de vida, mientras que en otros se puede mantener la infección de forma subclínica durante toda la vida. También puede producirse una reactivación posterior influenciada por enfermedades o drogas inmunosupresoras (Barber y Trees, 1998; Lindsay y col., 1999). La presentación de esta enfermedad puede variar desde asintomática, en perros aparentemente sanos, a trastornos neuromusculares progresivos. Los cachorros desarrollan generalmente paresia del tren posterior que evoluciona a parálisis ascendente progresiva, atrofia muscular,

siendo los miembros posteriores los más afectados, y en algunos casos se encuentran en hiperextensión rígida. También se pueden observar otras manifestaciones neurológicas u orgánicas asociadas que dependerán del sitio parasitado (convulsiones, nistagmo, anisocoria, neumonía, megaesófago, debilidad cervical). En algunos casos los animales mueren en corto tiempo, mientras que en otros pueden sobrevivir meses o años, pero sufren parálisis y sus complicaciones (Basso y col., 2005). En perros adultos pueden darse varias presentaciones y la enfermedad es menos severa. Se han reportado casos de dermatitis, neumonía, miocarditis e infección generalizada (Dubey y Lappin, 2006).

En la toxoplasmosis canina, la manifestación de signos se asocia a un estado de inmunosupresión del animal, por lo que *T. gondii* es considerado un patógeno oportunista ya que la infección es generalmente subclínica. Sin embargo, bajo determinadas condiciones, los signos clínicos se ponen de manifiesto, predominando las presentaciones respiratorias y neuromusculares. La presencia de enfermedades concomitantes, el estrés o la inmunosupresión determinarían que el hospedador sea más susceptible lo que podría reactivar la infección. Es frecuente la toxoplasmosis con manifestación de signos clínicos, asociada a la infección con el virus del moquillo, la administración de corticoides o con enfermedades tumorales (Dubey, 2010b). Los signos clínicos pueden aparecer por afección del aparato respiratorio, neuromuscular o gastrointestinal, o presentarse de forma generalizada, siendo la presentación más frecuente en cachorros menores a un año de edad. En la aparición de signos influyen la edad y el estado inmunológico del animal. Se han descrito casos de lesiones oculares (coriorretinitis y uveítis anterior) (Dubey y Lappin, 2006).

Diagnóstico

El diagnóstico de estas enfermedades se puede realizar mediante métodos directos e indirectos. Los métodos directos permiten detectar la presencia del parásito o de su ADN. Se incluyen las técnicas coproparasitológicas, histopatológicas y moleculares (Dubey, 2010a; Dubey, 2017a; Lindsay y Dubey, 1989). Los métodos indirectos se basan en la detección de anticuerpos para *N. caninum* y *T. gondii* mediante distintas técnicas serológicas, siendo las más utilizadas la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), aglutinación indirecta (MAT), ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) e *Immunoblot* (Dubey y Lappin, 2006).

Métodos directos:

- Presencia de signos compatibles: No permiten realizar un diagnóstico definitivo, porque los signos aislados pueden ser comunes a varias enfermedades. Sin embargo, la presencia de parálisis ascendente en varios cachorros de una misma camada resulta sospechoso de neosporosis (Dubey y Lappin, 2006).
- Histopatología: Permite detectar la presencia de quistes tisulares o taquizoítos en muestras de cortes de tejido obtenidas *post-mortem*, teñidas con hematoxilina y eosina. En el animal vivo, se pueden realizar biopsias de músculos afectados, lo cual dará un diagnóstico definitivo si se encuentra el parásito (Basso y col., 2005; Dubey y Lappin, 2006).
- Inmunohistoquímica: Permite la detección de quistes o taquizoítos en cortes de tejidos utilizando un suero hiperinmune con anticuerpos específicos anti-*T. gondii* o anti-*N. caninum*, y un anticuerpo secundario anti-especie unido a una enzima peroxidasa o biotina/estreptavidina, que actúan en presencia de un sustrato y un cromógeno, dando una reacción coloreada. Permite diferenciar los quistes tisulares de *T. gondii* con los de *N. caninum*, y detectar taquizoítos en los tejidos (Basso y col., 2005; Lindsay y Dubey, 1989).
- Aislamiento del parásito: Se realiza inoculando material proveniente de animales infectados en diferentes cepas de ratones por vía subcutánea o intraperitoneal. Se inocula un homogenato de los órganos afectados con solución fisiológica y antibióticos y luego se busca la presencia de taquizoítos realizando un lavado peritoneal de los ratones inoculados y posteriormente al mes la presencia de anticuerpos específicos y de quistes tisulares. El aislamiento también puede realizarse en cultivos celulares. (Basso y col., 2001b; Dubey, 2010a).
- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): Detecta la presencia del parásito en los tejidos a través de la identificación de fragmentos de ADN específicos, y también permite diferenciar la infección entre ambos parásitos al utilizar *primers* específicos (Dubey, 2010a, Dubey, 2017a).
- Identificación de ooquistes en materia fecal: Se busca la presencia de ooquistes en la materia fecal de los hospedadores definitivos, es decir ooquistes morfológicamente

compatibles con los de *N. caninum* en el perro, y ooquistes de *T. gondii* en el gato. Para esto se utilizan técnicas de concentración y de flotación, mediante el uso de soluciones de alta densidad, siendo la más utilizada la técnica de Sheather (Basso y col., 2001b). Los ooquistes de *N. caninum* son similares a los ooquistes de *Haemmondia heydorni* que también pueden encontrarse en materia fecal de caninos y los de *T. gondii* a los de *Haemmondia hammondi* que pueden encontrarse en la materia fecal de felinos, por lo que posteriormente a su hallazgo por microscopía óptica deben realizarse técnicas moleculares para poder diferenciarse (Dubey, 2010a, Dubey, 2017a).

Métodos indirectos (Dubey, 2010a; Dubey, 2017a):

- Inmunofluorescencia indirecta (IFI): Es considerada una prueba de referencia, y también es utilizada para la estandarización de otras pruebas diagnósticas. Se utilizan como antígeno taquizoítos enteros fijados a áreas de un portaobjetos. Permite detectar anticuerpos dirigidos contra antígenos de superficie del parásito en el suero problema. Utiliza como conjugado inmunoglobulinas anti-especie específicas marcadas con una sustancia fluorescente (isotiocianato de fluoresceína), y se observa mediante un microscopio de fluorescencia.
- Prueba de aglutinación directa modificada (MAT): Emplea 2-mercaptoetanol para desnaturalizar las inmunoglobulinas M séricas e inespecíficas. Es una aglutinación directa debido a que utiliza taquizoítos naturalmente particulados. Se utiliza para el diagnóstico de toxoplasmosis en animales.
- Aglutinación indirecta: Se utilizan fracciones antigénicas de taquizoítos adsorbidas a partículas utilizadas como soporte (glóbulos rojos, partículas de látex: LAT). No son aconsejables para el diagnóstico y seguimiento serológico ya que, por sus características, no detectan estados iniciales de la infección. Se utiliza para el diagnóstico de toxoplasmosis.
- Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA): Permite la detección de IgM, IgG e IgA. En esta prueba, que se realiza en una policubeta, la unión antígeno-anticuerpo se

revela por un conjugado anti-especie específico unido a una enzima que al reaccionar con el sustrato específico, en presencia de un cromógeno, produce una reacción coloreada. La lectura se hace a través de un espectrofotómetro que brinda una lectura objetiva de los resultados. Como los títulos de anticuerpos pueden persistir periodos largos de tiempo y presentar fluctuaciones, no pueden ser utilizados para estimar si un individuo sufre enfermedad aguda o crónica, es por eso que existen ELISAs de avidéz que permiten identificar infecciones recientes.

- *Immunoblot*: Mediante una electroforesis en gel se separan las proteínas de los taquizoítos y luego son transferidas a una membrana adsorbente, como membranas de nitrocelulosa. Las diferentes proteínas se enfrentan con los sueros problemas con anticuerpos específicos contra ellas. La unión antígeno-anticuerpo es detectada por métodos enzimáticos.

Tratamiento

Para el tratamiento de estas enfermedades en caninos se han utilizado clindamicina, sulfadiazinas y pirimetamina, solas o combinadas con otros medicamentos. En el caso de la neosporosis, los perros adultos con parálisis aguda por miositis suelen responder mejor cuando los tratamientos se inician de forma temprana. En perros recién nacidos, la mejoría clínica a veces no se produce cuando la parálisis avanzó rápidamente. Sin embargo, se recomienda que todos los perros de una camada afectada sean tratados tan pronto como se haga el diagnóstico para reducir la posibilidad de aparición de signos clínicos (Dubey, 2017b). La trimetoprima-sulfonamida, o la pirimetamina y la sulfonamida sola, son las drogas de primera elección en animales con afección neurológica, debido a que penetran de manera eficiente en el sistema nervioso central. La clindamicina es efectiva para suprimir la replicación y diseminación de taquizoítos, pero no sería tan efectiva contra los bradizoítos enquistados. A pesar de la mejoría clínica, el tratamiento con drogas no elimina la infección del organismo (Dubey y Lappin, 2006; Dubey, 2010a; Dubey, 2017b).

Prevalencia mundial y situación en Argentina

A nivel mundial se han establecido diferentes prevalencias en caninos para *N. caninum* y *T. gondii*. Estas diferencias podrían ser debido a las distintas regiones geográficas, factores climáticos, origen de los caninos en estudio, la presencia de signos clínicos de los animales estudiados y métodos diagnósticos utilizados, entre otros factores (Dubey, 2010b; Dubey, 2017b). También se observó que la seroprevalencia fue diferente según el origen de los caninos en una misma área geográfica, así en muchos lugares del mundo, los perros provenientes de áreas rurales, presentan una mayor tasa de infección que los perros urbanos, lo cual puede atribuirse a los hábitos alimenticios relacionados con la ingestión de carne cruda, restos de vísceras y placentas, o bien por alimentarse de pequeños mamíferos que actuarían como reservorios de este parásito (Antony y Williamson, 2003; Lasri y col., 2004; Wanha y col., 2005; Haddadzadeh y col., 2007; Ghalmi y col., 2009; Nazir y col., 2014). Las seroprevalencias estudiadas para ambas enfermedades en los distintos países y las pruebas utilizadas se detallan en la tabla 1.

Tabla 1. Seroprevalencia de *N. caninum* y *T. gondii* en caninos en distintos países.

País (Referencia bibliográfica)	Neosporosis (%)	Nº de caninos	Prueba utilizada	Toxoplasmosis (%)	Nº de caninos	Prueba utilizada
Rumania (Gavrea y col., 2012)	32,7	1114	IFI			
Irán (Hosseininejad y Hosseini, 2011)	29	548	ELISA	26,8	548	ELISA
Pakistán (Nazir y col., 2014)	23,5	600	cELISA			
(Ahmad y col., 2014)				28,4	408	ELISA
Polonia (Gózdziak y col., 2011)	21,7	257	ELISA			
Algeria (Ghalmi y col., 2009)	22,5	337	IFI			
Albania (Hamel y col., 2015)	18,3	602		51,7	602	IFI
China (Wang y col., 2016)	14,5	1176	IFI			
China (Yu y col., 2008)				24	534	ELISA
Japón (Kubota y col., 2008)	10,4	1206	ELISA			
Suiza (Sager y col., 2006)	7,3	1080	ELISA			
República Checa (Václavek y col., 2007)	4,7	470	IFI			
(Sédlak y Bártová, 2006)				25,8	413	IFI

Corea (Nguyen y col., 2012)	3,6	556	IFI	12,8	556	LAT
Austria (Wanha y col., 2005)	3,6	1770	IFI	242	26	IFI
Granada (Sharma y col., 2015)	1,6	368	ELISA			
Hungría (Hornok y col., 2006)	1	402	IFI			
Brasil (Dubey, 2017b)*	2,6-67,6	37-345	IFI			
(Dubey, 2010b)*				8,1-88,5%	24-540	IFI/ELISA/ MAT/ HAI
Colombia (Dubey y col., 2007)				16,8	309	MAT

*variable según estado de Brasil estudiado; IFI: Inmunofluorescencia Indirecta; ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima; cELISA: ELISA de competición. MAT: aglutinación directa modificada. LAT: aglutinación indirecta en látex. HAI: hemoaglutinación indirecta.

En Argentina se encontraron seroprevalencias para neosporosis del 25,3 al 47,4% y para toxoplasmosis del 33,6 al 43,2%. (Di Lorenzo y col., 1997; Basso y col., 2001a; Venturini y col., 2008; Gos, 2016). En la tabla 2 se indican los estudios de seroprevalencia para *N. caninum* y para *T. gondii* realizados en nuestro país.

Tabla 2. Seroprevalencia de *T. gondii* y *N. caninum* en caninos de Argentina.

Referencia bibliográfica	Nº de caninos	Prueba utilizada	% seroprevalencia <i>N. caninum</i>	% seroprevalencia <i>T. gondii</i>
Di Lorenzo y col., 1997	97	IFI	47,4%	43,2%
Basso y col., 2001a	320	IFI	37,8%	No estudiada
Venturini y col., 2008	1001	IFI	25,6%	30,3%
Gos, 2016	1290	IFI	25,3%	33,6%

IFI: Inmunofluorescencia Indirecta.

Prevención

En el caso de *N. caninum*, se recomienda que aquellas perras seropositivas no se utilicen para reproducción debido a que este parásito puede transmitirse repetidamente a través de camadas sucesivas en los caninos. Los perros no deben ser alimentados con carne cruda, especialmente carne vacuna. En los establecimientos bovinos, no se les debe permitir a los perros tener acceso al material de aborto, ya que se pueden infectar a partir del consumo de placentas bovinas

(Dijkstra y col., 2002). Se debe evitar, cuando sea posible, que los caninos defequen en comederos, fuentes de riego, pastos o corrales donde se aloja el ganado. No se ha desarrollado ninguna vacuna para combatir la neosporosis. No se conocen medicamentos para prevenir la transmisión transplacentaria (Dubey, 2017b). En el caso de la toxoplasmosis es importante limitar las posibilidades de excreción de ooquistes por los gatos: suministrarles carne o vísceras cocidas, alimento balanceado, evitar que cacen, limpiar la bandeja sanitaria diariamente con agua hirviendo antes de que ocurra la esporulación de los ooquistes eliminados. Y para evitar la infección en humanos se deben utilizar guantes para las tareas de jardinería, lavar bien las verduras y no comer carne mal cocida (Dubey, 2010a; Tenter, 2000).

OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar la presencia de anticuerpos para *N. caninum* y *T. gondii* en caninos domésticos de la ciudad de Mar del Plata, provincia de Buenos Aires.

Objetivos específicos

- Determinar la presencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* y anti-*Neospora caninum* en caninos de la ciudad de Mar del Plata, mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta.
- Evaluar la relación entre la presencia de anticuerpos específicos con la edad, sexo, raza y lugar de origen de los animales.

Importancia del tema

Toxoplasma gondii y *Neospora caninum* pueden causar enfermedades clínicas en animales domésticos y silvestres. En los caninos ambos parásitos pueden originar manifestaciones neurológicas dejando secuelas graves si no son tratados en la fase aguda de estas

enfermedades. Por otra parte, los caninos con infección subclínica son importantes como centinelas de la contaminación ambiental con los ooquistes de ambos protozoos, pero en el caso particular de *T. gondii*, constituye un dato a tener en cuenta desde el punto de vista de la salud pública. Desde el punto de vista epidemiológico, la detección de anticuerpos también se puede relacionar con sus hábitos alimenticios, el posible acceso a presas que actúan como hospedadores intermediarios o vísceras desechadas de otros animales. Es interesante conocer los factores de riesgo asociados a estas enfermedades en los caninos para conocer los grupos de perros que están más expuestos desde el punto de vista clínico y sanitario. Debido a que en la ciudad de Mar del Plata no existen estudios de seroprevalencia para neosporosis y toxoplasmosis en caninos, resulta una temática original que aporta los primeros datos en esta zona geográfica.

HIPÓTESIS

- Los caninos de la ciudad de Mar del Plata presentan anticuerpos contra *N. caninum* y *T. gondii*. y la seroprevalencia se relaciona a distintos factores de riesgo.

DESARROLLO

Materiales y Métodos

Se determinó la presencia y título de anticuerpos anti-*T. gondii* y anti-*N. caninum* en 91 sueros caninos provenientes de dos regiones distantes, ubicadas a 17km. una de la otra, en la ciudad de Mar del Plata. Del total de sueros, 40 se obtuvieron de un refugio canino situado en la Ruta Provincial 2 (Grupo Refugio) (-37.86970030739821, -57.60934710536515), y los 51 restantes de barrios cercanos al Centro Municipal de Zoonosis (Grupo Zoonosis) del partido de General Pueyrredón (-37.980835423110804, -57.59372110451963). En el Grupo Refugio eran en su mayoría caninos mestizos alimentados con alimento balanceado, suplementado con arroz y carcasas de pollo crudas. En general, las instalaciones del lugar permitían el contacto directo entre ellos. El Grupo Zoonosis estaba formado en su mayoría por animales mestizos y también caninos de las siguientes razas: Rottweiler, Fox Terrier, Dogo Argentino, Pitbull Terrier, Caniche,

Zarpea y Ovejero Alemán. La alimentación de los animales de este grupo era muy variada y en relación al hábitat muchos de ellos tenían o no acceso al exterior

Los sueros fueron recolectados durante el mes de enero de 2017. Para ello se extrajeron de 3 a 5 ml de sangre de la vena cefálica ante braquial en tubos sin anticoagulante. Las muestras se conservaron a temperatura ambiente por dos horas y luego se refrigeraron. De cada animal se confeccionó una planilla con los siguientes datos: número de identificación, sexo, raza, edad y región geográfica. En las instalaciones del Laboratorio Fares Taire de la ciudad de Mar del Plata se centrifugaron las muestras a 2000 rpm durante 10 minutos para obtener los sueros sanguíneos, los cuales se colocaron en tubos pepenador de 1,5ml rotulados, y se mantuvieron a -20° hasta su procesamiento.

En el Laboratorio de Inmunoparasitología de la Facultad de Ciencias Veterinarias (LAINPA-FCV-UNLP), se analizaron los sueros mediante la prueba de IFI. Como antígenos se utilizaron taquizoítos de la cepa RH de *T. gondii* y de la cepa NC-1 de *N. caninum* colocados sobre portaobjetos y elaborados en el mismo laboratorio (Gos, 2016). Para la prueba de IFI se diluyeron los sueros en base 2 a partir de 1:50 hasta 1:800 en solución buffer de fosfatos (PBS) 1x y se incubaron con el antígeno a 37°C durante 30 minutos. Se lavó en agitación con PBS 1x para *T. gondii* y solución de carbonatos 1x para *N. caninum*, realizando tres lavados de 10, 5 y 3 minutos cada uno. Se incubó a 37°C con el conjugado anti-Ig G canina específica marcada con isotiocianato de fluoresceína (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos. Se realizaron nuevamente tres lavados y los portaobjetos se montaron con glicerina en PBS o carbonatos para *T. gondii* y *N. caninum* respectivamente. Los portaobjetos se observaron con microscopio de epifluorescencia (Leica) (Gos, 2016). Se consideró un resultado positivo cuando se observó fluorescencia verde en toda la periferia del taquizoíto (Venturini y col., 2008; Gos, 2016).

Los resultados obtenidos por IFI fueron relacionados con la edad, raza, sexo y lugar de origen de los caninos muestreados mediante la prueba de *chi cuadrado* utilizando el software de dominio público Winepi (<http://www.winepi.net/sp/index.htm>). En la variable edad se consideraron los intervalos menores y mayores a un año. En todos los casos se obtuvo el valor de significación (p). Cuando el valor de (p) es menor de 0,05 podemos afirmar que las variables están significativamente asociadas.

RESULTADOS

Del total de animales muestreados se observó la presencia de anticuerpos para *T. gondii* en el 39,6% (36/91) y de anticuerpos para *N. caninum* en el 27,4% (25/91). En un 21,9% de los caninos (20/91) se observaron anticuerpos para ambas enfermedades.

En relación a los factores de riesgo se determinó asociación con el lugar de origen y la edad de los caninos. En cuanto al lugar de origen, el 52,5% de los caninos del Grupo Refugio presentaron anticuerpos para *T. gondii* y el 42,5% para *N. caninum*, mientras que en los del Grupo Zoonosis el 29,4% fueron seropositivos a *T. gondii* y el 15,6% a *N. caninum* (*T. gondii* $p=0,0254$, *N. caninum* $p=0,0045$). En el grupo de caninos menores a 1 año de edad el 16,6% presentó anticuerpos para *T. gondii*, y el 13,3% resultó seropositivo a *N. caninum*. En cambio, en los animales mayores a un año, un 50,8% resultó seropositivo a *T. gondii* y un 34,4% a *N. caninum* (*T. gondii* $p=0,0017$, *N. caninum* $p=0,0341$). No se encontró asociación entre la presencia de anticuerpos para ambas enfermedades con el sexo (*T. gondii* $p=0,7672$; *N. caninum* $p=0,1698$) ni con la raza de los caninos (*T. gondii* $p=0,7839$; *N. caninum* $p=0,5818$). La tabla 3 describe las seroprevalencias para cada factor de riesgo analizado para ambas enfermedades.

Tabla 3. Seroprevalencias para toxoplasmosis y neosporosis en los caninos según los distintos factores de riesgo evaluados.

Factor de riesgo	Categoría	N	TOXOPLASMOSIS		NEOSPOROSIS	
			Positivos	Prevalencia %	Positivos	Prevalencia %
Lugar de origen	Refugio	40	21	52,5^a	17	42,5^a
	Zoonosis	51	15	29,4^b	8	15,6^b
Edad	< 1 año	30	5	16,6^a	4	13,3^a
	> 1 año	61	31	50,8^b	21	34,4^b
Sexo	hembra	59	24	40,6	19	32,2
	macho	32	12	37,5	6	18,7
Raza	mestiza	77	30	38,9	22	28,5
	pura	14	6	42,8	3	21,4

N: número de caninos evaluados. ^{a,b}: letras diferentes indican diferencias significativas.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Este trabajo describe los primeros datos epidemiológicos de la presencia de anticuerpos para *N. caninum* y para *T. gondii* en caninos de la ciudad de Mar del Plata, en Argentina.

En este estudio la seroprevalencia total hallada para *N. caninum* fue del 27,4% y para *T. gondii* del 39,6%. Estos valores fueron similares a los hallados en estudios realizados previamente en caninos de la ciudad de La Plata y alrededores, provincia de Buenos Aires, que utilizaron la misma prueba serodiagnóstica (Venturini y col., 2008; Gos, 2016) aunque en ellos, la presencia de anticuerpos se determinó en sueros de animales que presentaban signos clínicos neuromusculares y por eso acudieron a la consulta. En el caso de la neosporosis, la seroprevalencia fue menor a la reportada por Basso y col. (2001) (37,8%), sin embargo en este último estudio se analizaron perros provenientes tanto de zonas rurales como urbanas, y la seroprevalencia de los 160 caninos urbanos (26,2%) fue similar a la encontrada en nuestro trabajo (Basso y col., 2001). Esto permitiría sugerir que en la ciudad de Mar del Plata se presentarían condiciones climáticas o ambientales (temperatura media anual de 14 °C y precipitaciones promedio anual de 920 mm) semejantes para estas parasitosis, en relación con otras zonas de la provincia. En relación a las seroprevalencias descritas en otros países, el valor hallado en nuestro estudio para neosporosis en caninos se encuentra entre los más altos que han sido reportados (Ghalmi y col. 2009; Gózdziak y col., 2011; Hosseininejad y Hosseini, 2011; Gavrea y col., 2012; Nazir y col., 2014). Para la toxoplasmosis, la seroprevalencia fue mayor a la descrita en la mayoría de los países (Wanha y col., 2005; Sedlak y col., 2006; Dubey y col., 2007; Yu y col., 2008; Hosseininejad y col., 2011; Ahmad y col., 2014) aunque coincide con algunos trabajos de determinadas regiones de Brasil (Dubey, 2010b). Las mayores seroprevalencias encontradas también podrían deberse a las diferencias climáticas, dado a que las temperaturas medias anuales más cálidas, favorecen la esporulación de los ooquistes en el medio ambiente (Dubey, 2010a).

Del total de caninos analizados, el 21,9% presentaron anticuerpos para las dos enfermedades. De ellos el 65% y el 50% presentaron títulos mayores a 1:400 para *T. gondii* y a *N. caninum* respectivamente, lo que demostraría que estos animales pudieron haber presentado coinfecciones. Se debe tener en cuenta que, al ser parásitos emparentados filogenéticamente,

pueden existir reacciones cruzadas en las pruebas serológicas debido a que comparten muchos antígenos, sin embargo, estas reacciones se evidencian en general con títulos más bajos (Dubey, 2010a).

Entre los factores de riesgo estudiados se encontraron diferencias significativas con el lugar de origen y la edad de los animales para ambas enfermedades. En cuanto al origen de los caninos la mayor seroprevalencia se observó en los caninos del Refugio. Estos resultados podrían relacionarse a que en general eran perros callejeros y fueron recogidos y alojados en el refugio en edad adulta, por lo que no fue posible conocer sus hábitos de vida previos. En cambio, los animales del barrio cercano a Zoonosis, que en su mayoría eran perros con propietario conocido, la prevalencia fue casi la mitad que la anterior para las dos enfermedades. Estas diferencias sugieren la importancia del estilo de vida y los hábitos alimenticios en la transmisión de las mismas. Estos hallazgos concuerdan con los de Hosseininejad y Hosseini (2011) que hallaron una mayor seroprevalencia para neosporosis y toxoplasmosis en perros callejeros y de rebaños del 43,3% y 42,5% respectivamente, en relación con los perros mantenidos como mascotas con valores del 8,7% para *N. caninum* y 7% para *T. gondii*, sin embargo no discriminan la seroprevalencia entre los perros callejeros y los rurales. Otros autores también encontraron diferencias significativas entre animales seropositivos para *T. gondii* y el lugar de origen de los mismos, describiendo una seroprevalencia del 18,5% en perros callejeros y del 5,1% en perros domésticos en Corea (Nguyen y col. 2007), al igual que en Pakistán en donde Ahmad y col. (2014) encontraron mayor seroprevalencia para *T. gondii* en caninos con acceso al exterior (36,8%) que en aquellos que no salían de sus casas (23,4%). En Irán se describió una situación similar con una tasa de infección para toxoplasmosis del 31% en perros callejeros con respecto a un 9% en perros domésticos (Hosseininejad y col. 2011). Estos autores sugieren que los perros callejeros tendrían una mayor exposición a alimentos, suelo o fuentes de agua contaminados con ooquistes esporulados de *T. gondii*, debido a la importante contaminación ambiental con este parásito, o al acceso de hospedadores intermediarios infectados, como roedores o aves y al consumo de carne cruda. Para el caso de neosporosis, la mayoría de los trabajos describen las diferencias de seroprevalencias entre caninos que viven en medios rurales en relación a los urbanos (Antony y Willson, 2003; Haddadzadeh y col., 2007), pero sin diferenciar entre los callejeros y mascotas. En nuestro trabajo se observó que los perros del Refugio también presentaron mayor seroprevalencia para esta enfermedad en relación a los del barrio cercano a

Zoonosis; esto podría explicarse en parte, por los hábitos alimenticios, ya que los perros de refugios son alimentados más frecuentemente con comida casera y huesos que pueden no estar totalmente cocidos y contener restos de carne cruda. En cambio las mascotas, en general se alimentan con alimento balanceado.

En relación a la edad en este estudio encontramos que el número de caninos seropositivos para ambas enfermedades aumenta con relación a la edad de los animales, lo que sugiere que en la región estudiada las infecciones se transmiten principalmente por vía horizontal. Se considera que los animales mayores han tenido más oportunidades de adquirir la infección al ingerir alimentos o agua contaminados con ooquistes o carne con quistes. Estos resultados coinciden con los estudios donde se estudia la edad como factor de riesgo para estas enfermedades en caninos (Basso y col.; 2001; Wanha y col., 2005; Václavek y col., 2007; Kubota y col., 2008; Venturini y col., 2008; Gózdziak y col., 2011; Hosseininejad y Hosseini, 2011; Hosseininejad y col., 2011; Gavrea y col. 2012; Ahmad y col., 2014; Gos, 2016; Wang y col., 2016).

En este estudio no se hallaron diferencias significativas en relación al sexo de los animales y la seroprevalencia. Estos resultados coinciden con la mayoría de los estudios en caninos a nivel mundial y en Argentina (Wanha y col., 2005; Hornok y col., 2006; Venturini y col., 2008; Ghalmi y col., 2009; Basso y col., 2011; Gózdziak y col., 2011; Hosseininejad y Hosseini, 2011; Hosseininejad y col., 2011; Gavrea y col., 2012; Nguyen y col., 2012; Ahmad y col., 2014; Gos, 2016; Wang y col., 2016).

En relación a las razas de los caninos, no se observaron diferencias significativas para ninguna de las enfermedades estudiadas. Para el caso de neosporosis, la mayoría de los casos sintomáticos que se han descritos corresponden a las razas Labrador Retriever, Boxer, Greyhound, Golden Retriever y Basset Hound (Basso y col., 2005; Dubey, 2017b). Sin embargo en la actualidad la presencia de anticuerpos para estas enfermedades no parece estar asociada a que los animales sean de raza pura o mestizos (Wanha y col., 2005; Hornok y col., 2006; Ghalmi y col., 2009; Gavrea y col., 2012; Nazir y col., 2014; Wang y col., 2016).

Dado que estas observaciones se basan en el muestreo de un número limitado de animales y zonas dentro de la ciudad, se considera que se necesitarían más estudios, con un mayor número

de muestras para determinar las variables que influyen en la seroprevalencia y obtener resultados más concluyentes.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a Ivana Viera y al Laboratorio Fares Taie de la ciudad de Mar del Plata por brindar sus instalaciones para realizar el centrifugado de las muestras, a mi familia y a Anita por el apoyo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmad N, Ahmed H, Irum S, Qayyum M. Seroprevalence of Ig G and Ig M antibodies and associated risk factors for toxoplasmosis in cats and dogs from sub-tropical arid parts of Pakistan. *Trop Biomed.* 2014; 31(4):777-84.
2. Antony A, Williamson NB. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs of rural or urban origin in central New Zeland. *N Z Vet J.* 2003; 51: 232-237.
3. Barber JS y Trees AJ. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *Int. J. Parasitol.* 1998; 28: 57-64.
4. Basso W, Venturini L, Venturini MC, Moore P, Rambeaud M, Unzaga JM, Campero C, Bacigalupe D, Dubey JP. Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef-cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. *J. Parasitol.* 2001a; 87: 906-907.
5. Basso W, Venturini L, Venturini MC, Hill DE, Kwok OC, Shen SK, Dubey JP. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *J Parasitol.* 2001b; 87(3):612-8.
6. Basso W, Venturini MC, Bacigalupe D, Kienast M, Unzaga JM, Larsen A, Machuca M, Venturini L. Confirmed clinical *Neospora caninum* infection in a boxer puppy from Argentina. *Vet Parasitol.* 2005; 131: 299-303.
7. Cole RA, Lindsay DS; Blagburn BL, Sorjonen DC, Dubey JP. Vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *J. Parasitol.* 1995; 81: 208-211.
8. Dijkstra TH, Barkema HW, Eysker M, Hesselink JW, Wouda W. Natural transmission routes of *Neospora caninum* farm dogs and cattle. *Vet. Parasitol.* 2002; 105: 99-104.
9. Di Lorenzo C, Venturini MC, Castellano C, Venturini L, Unzaga JM, Bacigalupe D. Detección de anticuerpos anti- *Neospora caninum* y anti- *Toxoplasma gondii* en perros de área urbana. *Revista de Medicina Veterinaria.* 1997; 78:325-326.
10. Dubey J.P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 2009; 39(8), 877-882.

11. Dubey JP. General biology. En: Dubey JP Toxoplasmosis of animals and humans. 2 da. Edición. CRC Press. Boca Raton. FL, USA. 2010a, p. 1-72.
12. Dubey JP. Toxoplasmosis in dogs. En: Dubey JP Toxoplasmosis of animals and humans. 2 da. Edición. CRC Press. Boca Raton. FL, USA. 2010b, p. 161-167.
13. Dubey JP. General biology. En: Dubey, JP. Neosporosis in animals. CRC Press. Boca Raton. FL, USA. 2017a, p. 7-111.
14. Dubey JP. Neosporosis in dogs. En: Dubey, JP. Neosporosis in animals. CRC Press. Boca Raton. FL, USA. 2017b, p. 261-315.
15. Dubey JP, Cortés-Vecino JA, Vargas-Duarte JJ. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in dogs from Colombia, South America and genetic characterization of *T. gondii* isolates. Vet Parasitol. 2007; 145: 45-50
16. Dubey JP, Lappin MR. Toxoplasmosis and Neosporosis. En: Greene C Infectious diseases of the dog and cat. 3ra. Edición. WB Saunders Com, 2006, p.493-509.
17. Dubey JP, Schares G. Neosporosis in animals, the last five years. Vet Parasitol. 2011; 180:90-108.
18. Gavrea R, Mircean V, Pastiu A, Cozma V. Epidemiological survey of Neospora caninum infection in dogs from Romania. Vet Parasitol. 2012; 188: 382-385.
19. Ghalmi F, China B, Kaidi R, Losson B. First epidemiological study on exposure to Neospora caninum in different canine populations in the Algiers District (Algeria). Parasitol Int. 2009; 58: 444-450.
20. Gos, ML. Evaluación de la presencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* y anti-*Neospora caninum* en sueros caninos de la provincia de Buenos Aires mediante las técnicas de inmunofluorescencia indirecta y aglutinación directa. Trabajo final de Especialización en Diagnóstico Veterinario de Laboratorio. FCV-UNLP. 2016.
21. Goździk K, Wrzesień R, Wielgosz-Ostolska A, Bień J, Kozak-Ljunggren M, Cabaj W. Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* in dogs from urban areas in Central Poland. Parasitol Res. 2011; 108 (4):991-6.

22. Haddadzadeh HR, Sadrebazzaz A, Malmasi A, Ardakani HT, Nia PK, Sadreshirazi N. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from rural and urban environments in Tehran, Iran. *Parasitol Res.* 2007; 101: 1563-1565.
23. Hamel D, Shukullari E, Rapti D, Silaghi C, Pfister K, Rehbein S. Parasites and vector borne pathogens in client- owned dogs in Albania. *Parasitol Res.* 2015; 115: 489-499.
24. Hornok S, Edelhofer R, Fok E, Berta K, Fejes P, Répási A, Farkas R. Canine neosporosis in Hungary: Screening for seroconversion of household, herding and stray dogs. *Vet Parasitol.* 2006; 137: 197-201.
25. Hosseininejad M, Hosseini F. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection in dogs from west and central parts of Iran using two indirect ELISA test and assessment of associate risk factors. *Iranian J Vet Res.* 2011; 12: 46-51.
26. Hosseininejad M, Malmasi A, Hosseini F, Ghaffari M, Khorrami N, Mohebai M, Shojai S, Mirani A, Azizzadeh M, Mirshokraei P, Aliari A. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in dogs in Tehran, Iran. *Iranian J of Parasitol.* 2011; 6: 1-8.
27. Kubota N, Sakata Y, Miyazaki N, Itamoto K, Bannai H, Nishikawa Y, Xuan X, Inoku H. Serological surey of *Neospora caninum* infection among dogs in Japan through species-specific ELISA. *J Vet Med Sci.* 2008; 70: 869-872.
28. Lasri S, De Meerschman F, Rettignr F, Focant C, Losson B. Comparison of three techniques for the serological diagnosis of *Neospora caninum* in the dog and their use for epidemiological studies. *Vet Parasitol.* 2004; 123: 25-32.
29. Lindsay DS, Dubey JP. Inmunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *Am J Vet Res.* 1989; 50: 1981-1983.
30. Lindsay DS, Dubey J P, Duncan R B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Vet Parasitol.* 1999; 82(4), 327-333.
31. Nazir MM, Maqbool A, Akhtar M, Ayaz M, Ahmad AN, Ashraf K, Ali A, Alam MA, Ali MA, Khalid AR, Lindsay DS. *Neospora caninum* prevalence in dogs raised under different living conditions. *Vet Parasitol.* 2014; 204(3-4):364-8.

32. Nguyen TTD, Che SE, Byun JW, Koh HB, Lee HS, Kang S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from Korea. *Acta Parasitol.* 2012; 57: 7-12.
33. Sager H, Steiner-Moret C, Müller N, Staubli D, Esposito M, Schares G, Hässig M, Stärk K, Gottstein B. Incidence of *Neospora caninum* and other intestinal protozoan parasites in populations of Swiss dogs. *Vet Parasitol.* 2006; 139: 84-92.
34. Sédлак K, Bártová E. The prevalence of *Toxoplasma gondii* IgM and IgG antibodies in dogs and cats from the Czech Republic. *Veterinari Medicina.* 2006; 51: 555-558.
35. Sharma R, Kimmitt T, Tiwari K, Chikweto A, Thomas D, Lanza Perea M, Bhaiyat MI. Serological evidence of antibodies to *Neospora caninum* in stray and owned Grenadian dogs. *Trop Biomed.* 2015; 32(2):286-90.
36. Tenter A, Heckeroth A, Weiss L. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.* 2000; 30:1217-1258.
37. Trees AJ, Williams D. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends Parasitol.* 2005; 21(12):558-561.
38. Václavek P, Sedlák K, Hurková L, Vodraska P, Sebesta R, Koudela B. Serological survey of *Neospora caninum* in dogs in the Czech Republic and a long- term study of dynamics of antibodies. *Vet Parasitol.* 2007; 143: 35-41.
39. Venturini MC, Unzaga JM, Basso W, Bacigalupe B, Larsen A, Pardini L, Moré G, Venturini L. Neosporosis y toxoplasmosis en perros con signos clínicos en diez años de diagnóstico serológico. XVII Reunión Científica Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Diagnóstico, 2008; Resumen P18. Ciudad de Santa Fe, Argentina.
40. Wang S, Yao Z, Zhang N, Wang D, Ma J, Liu S, Zheng B, Zhang B, Liu K, Zhan H. Serological study of *Neospora caninum* infection in dogs in central China. *Parasite.* 2016; 23: 35.
41. Wanha K, Edelhofer R, Gabler-Eduardo C, Prosl H. Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs and foxes in Austria. *Vet Parasitol.* 2005; 128:189-193.

42. Yu J, Ding j, Xia Z. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in pet dogs and cats in Beijing, China. Acta Parasitologica. 2008; 53: 317-319.

ANEXO I

Preparación de soluciones de lavado y montaje

Solución buffer de fosfatos (P.B.S.)

- Solución madre:

Cloruro de sodio (NaCl)..... 40 g

Cloruro de potasio (KCl)..... 1 g

Di-sodio hidrógeno fosfato (Na₂HPO₄)..... 5,75 g

Potasio di-hidrógeno fosfato (KH₂PO₄)..... 1 g

Agua destilada.....c.s.p. 500 ml

- Solución de trabajo: Se utiliza la solución madre diluida 1:10 en agua destilada. El pH final será de 7,2.

Solución buffer de carbonatos (Rinse buffer)

- Solución madre:

Na₂CO₃..... 5,7 g

NaHCO₃.....1,8 g

NaCl..... 4,25 g

Agua destilada..... c.s.p. 500ml.

- Solución de trabajo: Se utiliza la solución madre diluida en agua destilada en proporción de 1:4. El pH final será de 9.

Líquido de montaje para Inmunofluorescencia de *T. gondii*

Para preparar 10 ml de esta solución:

P.B.S. 9 ml

Glicerina 1 ml

Líquido de montaje para Inmunofluorescencia de *N. caninum*

Se mezcla en partes iguales glicerol y la solución buffer de carbonatos.

Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta

1. Los sueros caninos se diluyeron en base 2 a partir de 1:50 hasta 1:800 en PBS en placas con fondo en U de 96 pocillos.
2. Se incubaron los sueros con el antígeno de *T. gondii* y de *N. caninum* en los portaobjetos a 37° C durante 30 minutos en cámara húmeda.
3. Los portaobjetos se lavaron en agitador con solución de buffer de carbonatos para *N. caninum* y con PBS para *T. gondii* tres veces: 10 minutos, 5 minutos y 3 minutos, cambiando la solución de lavado cada vez.
4. Luego del secado, se colocó el conjugado anti-Ig G canina específica FITC (Sigma) y se incubó por 30 minutos a 37° C en cámara húmeda.
5. Se procedió a realizar el lavado de la misma manera que en el paso 3.
6. Luego del secado, se montó con glicerina al 50% en buffer de carbonatos para *N. caninum* y al 10% en PBS para *T. gondii*.
7. Se observó con el microscopio de fluorescencia a 20X y 40X. Se consideró un resultado positivo cuando se observó fluorescencia verde-amarillenta en toda la periferia del taquizoíto.