

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Veterinarias
***Especialización en diagnóstico de laboratorio
veterinario***

***“ESTUDIO DE NEOSPORA CANINUM EN PERROS
RURALES EN LA PROVINCIA DE SALTA”***

Nombre del Autor: Méd. Vet. Lucía Alejandra Pintos

Nombre del Director: Dra. Magdalena Rambeaud

Nombre del Co-director: Dra. Lucía María Campero

Fecha de presentación: 6/9/2019

Índice

1. INTRODUCCIÓN
 - 1.1. Objetivos
 - 1.2. Alcances del trabajo
 - 1.3. Motivo de la elección del tema
 - 1.4. Resumen

2. PLANTEAMIENTO DEL TEMA
 - 2.1. Historia
 - 2.1.1 Antecedentes de neosporosis en Argentina
 - 2.2. Características del parásito
 - 2.2.1 Morfología
 - 2.2.2 Ciclo y transmisión del parásito
 - 2.3. Aspectos epidemiológicos
 - 2.4. Patogenia
 - 2.5. Sintomatología
 - 2.6. Lesiones
 - 2.7. Diagnóstico
 - 2.7.1. Diagnóstico clínico.
 - 2.7.2. Diagnóstico de laboratorio
 - 2.7.2.1. Diagnóstico coproparasitológico
 - 2.7.2.2. Inmunohistoquímica
 - 2.7.2.3. Pruebas serológicas
 - 2.7.2.3.1. Inmunofluorescencia
 - 2.7.2.3.2. ELISA
 - 2.8. Tratamiento
 - 2.9. Prevención y control

3. DESARROLLO
 - 3.1. Materiales y Métodos
 - 3.1.1. Materiales, equipos y reactivos utilizados

3.1.2. Toma de muestras

3.1.3. Detección de anticuerpos por IFI

3.1.3.1. Diluciones de los sueros problema

3.1.3.2. Procedimiento

3.1.4. Análisis coprológico

3.1.5. Análisis de datos

3.2. Resultados

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

5. BIBLIOGRAFÍA

1. INTRODUCCIÓN:

1.1. OBJETIVOS:

GENERAL:

Evaluar la presencia de *Neospora caninum* en perros de la provincia de Salta (Región del Centro - de los Valles), de zonas rurales cercanas a tambos y campos de cría por medio de métodos diagnósticos directos e indirectos.

ESPECÍFICOS:

- Evaluar la presencia de anticuerpos específicos para *N. caninum* en sueros de perros de zonas rurales de la provincia de Salta por la técnica de Inmunofluorescencia indirecta.
- Evaluar la presencia de ooquistes de *N. caninum* en materia fecal de perros de zonas rurales de la provincia de Salta.
- Relacionar la presencia de *N. caninum* en perros con el contacto estrecho con bovinos.
- Determinar la presencia de co-infecciones con *T. gondii* en perros de zonas rurales de la provincia de Salta con anticuerpos específicos para *N. caninum*

1.2. ALCANCES DEL TRABAJO

- Perros de la provincia de Salta (Región del Centro, de los Valles), de zonas rurales cercanas a tambos y campos de cría.

1.3. MOTIVO DE ELECCION DEL TEMA:

Se decidió estudiar este tema debido al desconocimiento que se tiene sobre la presencia de *N. caninum* y *T. gondii* en la zona de estudio.

1.4. RESUMEN

En la región del norte argentino y sobre todo en la provincia de Salta, no se encuentran datos registrados sobre la presencia de *Neospora caninum* y de *Toxoplasma gondii*. Por tal motivo se realizó un estudio para determinar la presencia de anticuerpos específicos para *N. caninum* en suero de caninos de diferentes edades y sexo que conviven con bovinos de tambo, de cría o sistemas mixtos (cabras - bovinos). Se determinó la presencia de anticuerpos específicos para *N. caninum* en 92 sueros de caninos que convivían con bovinos en diferentes sistemas productivos, de la Provincia de Salta, abarcando los Departamentos de Capital, La Caldera, Chicoana, Rosario de Lerma y Rivadavia. Los sueros se analizaron mediante la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando antígenos de *N. caninum*, y conjugados específicos anti-IgG canina marcada con isotiocianato de fluoresceína para determinar la presencia de anticuerpos específicos para *N. caninum*. Se realizó además el diagnóstico diferencial con *T. gondii*, realizando la IFI para evaluar presencia de anticuerpos anti-*T. gondii*. Adicionalmente, se procedió a tomar muestras de materia fecal de perros del establecimiento para la identificación de ooquistes de *N. caninum*. Los resultados obtenidos por IFI fueron relacionados con el sexo, tipo de producción y la existencia de coinfección de ambas parasitosis calculando los casos positivos y negativos a *N. caninum* y *T. gondii* según las diferentes variables observadas. Se observó que el 35,8% de los animales muestreados fueron positivos a *N. caninum* y el 54,3% fueron positivos a *T. gondii*. Además, el 27% de los animales presentaron anticuerpos para ambas enfermedades. Tanto para *N. caninum* como para *T. gondii* se observó un mayor número de hembras positivas respecto a los machos ($p=0,0018$). La seropositividad a *N. caninum* fue mayor en los perros pertenecientes a tambos, comparados con sistemas mixtos y de cría ($p=0,0001$). En cambio, la seropositividad a *T. gondii* fue mayor en establecimientos mixtos ($p=0,001$). Al analizar la distribución de títulos finales en los animales seropositivos, se observaron animales positivos a todas las diluciones evaluadas, con una tendencia a títulos más bajos para *T. gondii* en relación a los observados para *N. caninum*. No se detectaron ooquistes compatibles con *N. caninum* en ninguna de las muestras de materia fecal analizadas. A nuestro conocimiento, este es el primer reporte de detección de anticuerpos contra estas parasitosis en perros en la provincia de Salta. Se recomienda realizar más estudios al respecto, permitiendo así tener una información

más precisa acerca de la influencia de otras variables como la raza, el sexo, la edad, e inclusive la procedencia y el tipo de alimentación.

2. PLANTEAMIENTO DEL TEMA

Neospora caninum es un parásito protozoario del Phylum Apicomplexa, filogenéticamente cercano a *Toxoplasma gondii*, aunque distintos en su ultraestructura, constitución antigénica y hospedadores (Cordero y col., 1999; Dubey y col., 2006). Los perros actúan como hospedadores definitivos de *N. caninum*, pudiendo desarrollar signos neuromusculares, afectando fundamentalmente a cachorros de pocas semanas de vida, que se suponen han adquirido la infección por vía transplacentaria. Se ha comprobado que los perros pueden infectarse mediante la ingestión de placentas y material de aborto de bovinos. Un perro infectado es una posible fuente de infección para los rumiantes, a través de la eliminación de ooquistes en la materia fecal contaminando el alimento (pastos, forrajes y piensos almacenados) y el agua de bebida que consume el ganado bovino. Los perros enfermos presentan contracturas musculares con hiperextensión y parálisis de una o ambas extremidades posteriores, polirradiculoneuritis, dolores cervicales, reflejos disminuidos, lesiones oculares (ptosis palpebral, pérdida del reflejo oculares, midriasis, nistagmos, etc.) (Barber y col., 1995). *Neospora caninum* puede ser fatal en perros de cualquier edad. En cuanto a la infección por *N. caninum*, en adultos se ha descrito solamente en animales sometidos a tratamiento prolongados con corticoides o en perros de más de 10 años, en los que existe un factor de inmunosupresión considerable (Cordero y col., 1999).

Epidemiológicamente, la importancia de *N. caninum* se debe a que causa abortos y/o muerte neonatal en bovinos (Dubey y col., 1995).

La toxoplasmosis es una enfermedad parasitaria producida por *Toxoplasma gondii*, del Phylum Apicomplexa, que afecta al hombre y diversas especies de mamíferos (gatos, perros, bovinos, caballos, cerdos, ovejas, cabras) y aves (Sanchis y col., 1978). Los felinos son los hospedadores definitivos, eliminando ooquistes en las heces, mientras que los demás homeotermos (incluidos los felinos) son sus hospedadores intermediarios.

Se estima que más de un tercio de la población humana mundial está infectada con *T. gondii* (Dubey y col., 2000). La infección tiene una presentación clínica variable según la especie afectada y el estado inmunológico individual. En los humanos cursa

frecuentemente en forma subclínica, pero puede causar fetopatías si la primo infección se produce durante el embarazo, así como lesiones oculares por infección transplacentaria o postnatal, y encefalitis en individuos inmunosuprimidos (Basso y col., 2011). Los mecanismos de transmisión incluyen: ingestión de carne poco cocida (quistes), contaminación fecal con heces de gatos infectados (ooquistes), transplacentaria y transfusional (Dubey y col., 1995). Las infecciones en perros son leves y asintomáticas, pero en las más intensas, los signos clínicos más típicos son trastornos respiratorios (en un 50% de los casos), digestivos (en un 25%) y nerviosos (en un 25%) por lo que en perros menores de un año se impone el diagnóstico diferencial con el moquillo, que cursa con síntomas muy similar. El comienzo de la enfermedad es insidioso, apareciendo fiebre, anorexia, disnea, vómitos repentinos, diarrea o ambos, convulsiones, ataxia, paresia, parálisis, o ambos. Al contrario de lo que ocurre en los gatos, hay pocos casos de toxoplasmosis canina asociados a lesiones oculares (cuando los hay son similares a los descritos para el gato). En las fases iniciales de la infección puede apreciarse una ligera adenitis (Cordero y col., 1999).

2.1. Historia

Los primeros datos de neosporosis se registraron en 1984 con un reporte de Bjerkas en Noruega de un caso de encefalitis y miocarditis en caninos, producido por un protozoario (Bjerkasy col., 1984). Dubey y colaboradores (1988) propusieron el nombre *Neospora caninum* y lograron comprobar los postulados de Koch en esta especie. Seguidamente, Lindsay y col. (1989) obtuvieron el primer aislamiento de *N. caninum* en cultivo celular y en ratón a partir de muestras de cerebro y músculos de origen canino. Thilsted y col. (1989) reportaron la participación de *N. caninum* como causa de aborto en bovinos, como también el primer aislamiento *in vitro* de *N. caninum* permitiendo el desarrollo de una prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para el diagnóstico serológico de la neosporosis; Ese mismo año se desarrolló una prueba de inmunohistoquímica para la detección del parásito en tejidos de animales infectados (Lindsay y col., 1989). Un año después Dubey y su grupo demostraron la transmisión transplacentaria en caninos, felinos, ovinos y bovinos (Dubey y col., 1990). Estos estudios pusieron de manifiesto la importancia de la

transmisión vertical del parásito y establecieron un modelo experimental en el ratón para el estudio de la patogenia de la infección. Desde el punto de vista diagnóstico, Bjerkas (1991) reportó que las cepas aisladas en caninos eran idénticas a las aisladas en bovinos; con este hallazgo y el desarrollo de técnicas de diagnóstico inmunohistoquímico y de ELISA (Bjorkman y col., 1994) se ampliaron las herramientas diagnósticas. En 1998, se caracterizó la ultraestructura y composición antigénica de *N. caninum* lo cual permitió su diferenciación de *T. gondii*, con el que posee una estrecha proximidad filogenética y está relacionado taxonómicamente a otros protozoos formadores de quistes como *Hammondia heydorni* e *Isospora bigemina*. Mc Allister y col. (1998) lograron definir al perro como hospedador definitivo, al demostrar la presencia de oocistos en materia fecal de perros alimentados con tejidos infectados de taquizoítos de *N. caninum*.

Con el paso del tiempo se han ido desarrollando nuevas pruebas diagnósticas indirectas, como la prueba de aglutinación directa (NAT) y el Immunoblot (Börkman y col., 1999; Atkinson y col., 2000) y directas como la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Lally y col., 1996) incluyendo la PCR cuantitativa (Collantes y col., 2002) para el diagnóstico de esta enfermedad.

En Sudamérica, la enfermedad ha sido diagnosticada en Argentina (Campero y col., 1998; Venturini y col., 1999; Moore y col., 2002 - 2003), Brasil (Guedes y col., 2008; Moura y col., 2012), Chile (Patitucci y col., 2000), Perú (Silva y col., 2002; Granados y col., 2014), Venezuela (García y col., 2005; Obando y col., 2010; Suárez y col., 2012), Colombia (Zambrano y col., 2001; López y col., 2007; Oviedo y col., 2007) y Uruguay (Bañales y col., 2006).

2.1.1. Antecedentes de neosporosis en Argentina

El primer reporte de neosporosis en Argentina data de 1995 (Venturini y col., 1995) en el cual se reportó la presencia de anticuerpos para *N. caninum* en rodeos de cría y tambo. En 1997 Campero y col. encontraron lesiones de encefalitis no supurativa, hepatitis y miocarditis en varios fetos bovinos examinados; un año más tarde, *N. caninum* fue diagnosticada por métodos histopatológicos e inmunohistoquímicas (Campero y col., 1998). Por otra parte, se estudiaron fetos provenientes de frigoríficos,

encontrándose que 24 % y 4,5% de muestras provenientes de rodeos de leche y de carne respectivamente, tenían anticuerpos para *N. caninum* (Venturini y col., 1999).

En Argentina sólo se conocen el 33 % de las causas de aborto (Campero y col., 2003) entre las cuales podría estar neosporosis. Moore y col., 2009 durante el periodo 1999-2007, analizaron 666 casos de abortos bovinos espontáneos provenientes de la pampa húmeda en Argentina, la que incluye a Provincia de Buenos Aires, norte de Río Negro, este de La Pampa, sur de Santa Fe, Córdoba y sur de Entre Ríos, diagnosticando un 10% de infecciones por *N. caninum*.

En los últimos trabajos realizados en la Argentina, la prevalencia para neosporosis y toxoplasmosis en sueros de perros con signos clínicos compatibles fue del 25,6% y 30,3%, respectivamente (Venturini y col., 2008), observándose un aumento del número de perros seropositivos con signos clínicos de acuerdo a la edad (Di Lorenzo y col., 1997; Venturini y col., 2008).

En Argentina, se realizaron 3 aislamientos de *N. caninum*. El primer aislamiento reportado en el país denominado NC6-Argentina, fue obtenido a partir de ooquistes provenientes de materia fecal de un perro naturalmente infectado (Bassoy col., 2001). El segundo aislamiento se realizó a partir del sistema nervioso central de un cervato axis del zoológico de La Plata con signología clínica (Basso y col., 2014). Recientemente, se obtuvo el tercer aislamiento a partir del cerebro de un ternero asintomático congénitamente infectado que se denominó NC-Argentina LP1 (Campero y col., 2015).

2.2. Características del parásito

2.2.1. Morfología

Neospora caninum es un protozoo, parásito intracelular, perteneciente al Phylum Apicomplexa, clase Sporozoea, subclase Coccidia, orden Eucoccidia, suborden Eimeriina y familia Sarcocystidae, junto con los géneros *Toxoplasma*, *Sarcocystis*, *Hammondia* y *Besnoitia* (Dubey y col., 1988; Ellis y col., 1994).

Se han identificado tres estadios diferentes en *N. caninum*: los **taquizoítos**, los **quistes** tisulares con bradizoítos en su interior y los **ooquistes**. Los dos primeros son muy similares en *N. caninum* y *T. gondii* cuando se observan mediante microscopía óptica, si bien existen notables diferencias ultraestructurales. Ambos presentan una morfología y una estructura típicas de las fases infectantes de los Apicomplexa, habiéndose descrito las siguientes estructuras: dos anillos polares, un conoide, una película integrada por un plasmalema y una membrana interna, 22 micro túbulos subpeliculares, micronemas, roptrias, una mitocondria, un núcleo, el aparato de Golgi, ribosomas, polisomas, gránulos densos, gránulos de amilopectina, cuerpos lipídicos, vesículas, retículo endoplásmico liso y rugoso y un poro posterior (Speer y col., 1989; Lindsay y col., 1993; Speer y col., 1999).

Los **taquizoítos** son uno de los tres estados infecciosos de *N. caninum* y se encuentran en el hospedador intermediario en forma intracelular, generalmente a nivel citoplasmático, específicamente, en la vacuola parasitófora de la célula del hospedador (Dubey y col., 2003). Puede parasitar a un gran número de células nucleadas como neuronas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, miocitos, y hepatocitos (Dubey y col., 1988; Dubey y col., 1993; Dubey y col., 1999). Su morfología es ovoide, semilunar o globosa (Cordero y col., 1999) (Fig.1). Se dividen por endodiogénesis en forma rápida, miden aproximadamente 3 - 7 μm , de longitud, por 1 - 5 μm de ancho, dependiendo de la etapa de división en la que se encuentren. En su citoplasma se encuentran hasta 150 micronemas y de 8 a 18 roptrias. El número de micronemas es muy variable y pueden encontrarse orientados en forma perpendicular a la membrana interna. Las roptrias contienen material muy electrodensito y son de 2 a 4 veces más gruesas que los micronemas, raramente se observa un micro poro (Speer – Dubey y col., 1989; Speer y col., 1999). Por otra parte, Lindsay y col. (1993) demostraron que la ultraestructura de los taquizoítos de tres aislamientos de origen canino NC-1, NC-2 y NC-3 era similar.

Los **quistes** son un estado encontrado en el hospedador intermediario, principalmente en el sistema nervioso central; morfológicamente, son ovalados o redondos (Dubey y col., 1999) (Fig.2), miden hasta 107 μm de longitud (Bjerkas–Dubey y col., 1991). En su interior se pueden encontrar hasta 200 bradizoítos, los cuales son delgados, miden 6-8 μm de longitud por 1 - 1,8 μm de ancho y contienen las mismas organelas que los taquizoítos, aunque en los bradizoítos el número de roptrias es menor, (Dubey y col., 1999) (fig.2). Por

otro lado, cabe destacar la ausencia de características estructurales diferenciales entre los quistes tisulares y los bradizoítos de origen canino y bovino (Speer – Dubey y col.,1989: Speer y col.,1999). Los bradizoítos se dividen por endodiogénesis, en forma lenta, (Dubey y col., 2003), y morfológicamente son similares a los taquizoítos (Speer y col.,1999).

Finalmente, los **ooquistes** miden 10 a 11 μm , no tienen color (Mc Allister y col., 1998), son morfológicamente similares a los ooquistes de *T. gondii* y *H. heydorni* (Dubey y col., 2002). En su interior, no se aprecia el cuerpo residual ooquistico. La pared del ooquiste es lisa, presenta un grosor de 0,6 - 0,8 μm y no contiene el micrópilo. En su interior se encuentran dos esporocistos elipsoidales de 8,4 μm de longitud por 6,1 μm de anchura, cuya pared de 0,6 - 0,8 μm de grosor no contiene el cuerpo de Stieda. A su vez, en el interior de cada esporocistos se encuentran cuatro esporozoítos 6,5 μm de longitud por 2,0 μm de anchura, (Lindsay *et al*; 1999). (fig.1), (Dubey *et al.*, 1999).

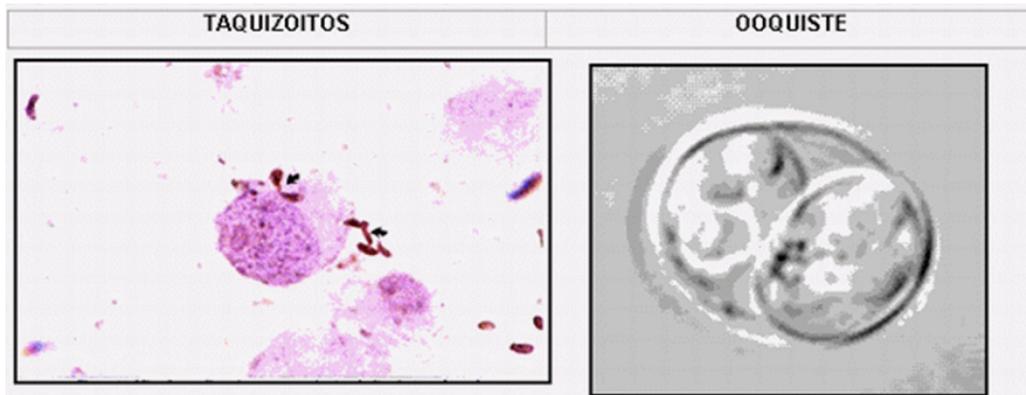


Figura N°1 Morfología de *N. caninum*. Fuente: Cordero. Parasitología Veterinaria. Dubey 1999

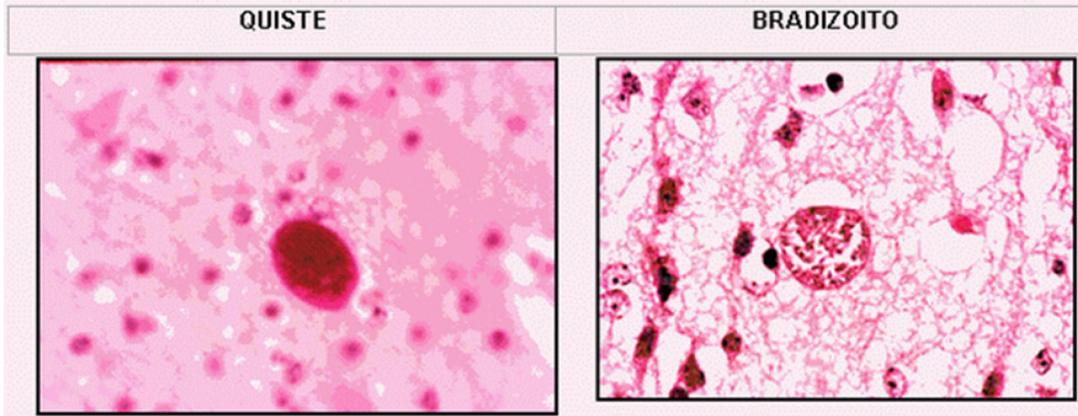


Figura N°2 Morfología de *N. caninum*. Fuente: Cordero. Parasitología Veterinaria. Dubey 1999

2.2.2 Ciclo y transmisión del parásito

Los hospedadores definitivos (representados principalmente por animales carnívoros, siendo el más importante el *Canis domesticus*), adquieren la infección (transmisión horizontal) ingiriendo tejidos con quistes de hospedadores intermediarios (rumiantes, entre otros, siendo el de mayor importancia económica los *Bos taurus*). La pared del quiste es degradada por los jugos gástricos liberando las formas parasitarias que iniciarán los estados entero-epiteliales (Dubey –Lindsay y col., 1996). Desarrollándose la fase sexual, en su intestino, con la formación de ooquistes que, consecuentemente a los 5 días son eliminados por medio de las heces sin esporular (McAllister y col., 1998) y una vez en el medio externo, al cabo de 48- 72 horas, (Lindsay y col., 2001) esporulan cuando las condiciones son óptimas, estando listos para infectar a los hospedadores intermediarios. Los ooquistes son ingeridos por los hospedadores intermediarios con las pasturas, forrajes etc. Seguidamente, los esporozoítos son liberados en el tracto intestinal, se dividen en una fase asexual, causando daño tisular y diseminando la infección a otros tejidos del hospedador (Dubey – Lindsay y col., 1996), donde formarán los quistes tisulares con bradizoítos en su interior, responsables de la fase crónica de la infección, que han sido observados tanto en el tejido nervioso (cerebro, médula espinal, nervios periféricos y retina) de diversas especies con infecciones naturales y experimentales (Dubey y col., 1988; Barr y col., 1992; Kobayashi y col., 2001). El ciclo de vida de *N. caninum* se encuentra esquematizado en la Figura 3.

En ambos tipos de hospedadores (intermediarios y definitivos) pueden presentarse la transmisión vertical o transplacentaria (Fig.4) con características que dependen de la especie animal. Esta etapa puede ser asintomática, o generar patología fetal y aborto, que al ser ingeridos por el perro completan el ciclo con formación de ooquistes (Lindsay y col., 1989).

La transmisión transplacentaria se ha demostrado en infecciones experimentales no solo en el ganado bovino, sino también en la oveja (Dubey y col., 1990; McAllister y col., 1996; Buxton y col., 1998), cabra (Lindsay y col., 1995), perro (Dubey y col., 1989; Cole y col., 1995), gato (Dubey y col., 1989), mono (Barr y col., 1994), cerdo (Jensen y col., 1998) y ratón (Cole y col., 1995). La existencia de la infección en determinadas líneas familiares y la ausencia aparente de transmisión horizontal observadas en la explotación, indican que el parásito puede transmitirse de madres infectadas a la descendencia durante varias generaciones y que la infección puede mantenerse en las explotaciones donde la reposición con ganado propio es la norma en ausencia de un hospedador definitivo.

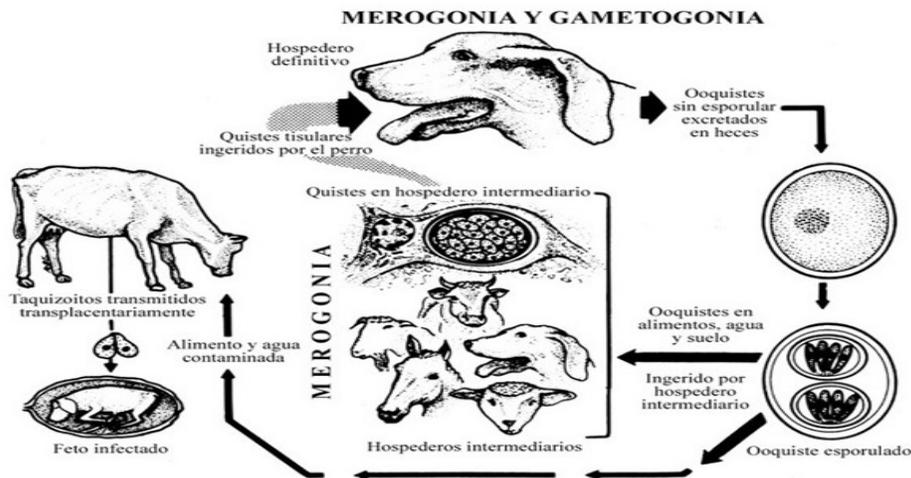


Figura N°3: Ciclo de vida de *Neospora caninum*. Fuente: Dubey, 2003 -

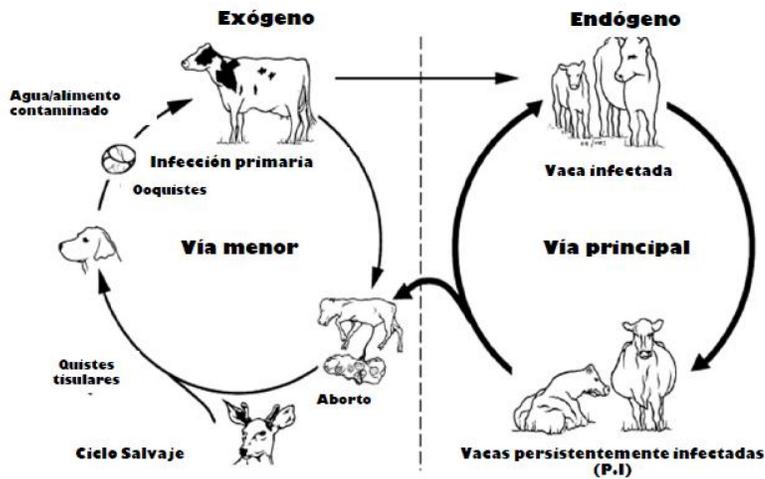


Figura N°4: Vías de transmisión de la neosporosis. Fuente: Dubey, 2006.

2.3. Aspectos epidemiológicos

La neosporosis es reconocida como una importante causa de abortos en bovinos lecheros en distintos países del mundo. En Argentina se ha descrito la transmisión transplacentaria, siendo la prevalencia en fetos del 24,4% y del 64,5% en vacas lecheras con antecedentes de abortos (Venturini y col., 1999). En los animales alimentados con forrajes, se ha descrito como potencial factor de riesgo la ingestión de alimentos contaminados con hongos, ya que la presencia de micotoxinas en bajas y repetidas dosis pueden provocar inmunosupresión, lo cual favorecería la reactivación de la enfermedad (Bartels y col., 1999). Varios estudios epidemiológicos han encontrado asociación entre la seroprevalencia de *N. caninum* y la presencia de perros en el predio, lo cual sugiere su rol de transmisión de la enfermedad (Paré y col., 1998; Bartels y col., 1999). Los perros provenientes de áreas rurales generalmente presentan serología positiva en un mayor porcentaje de casos en relación con perros de áreas urbanas (Basso y col., 2001). También se considera que podría existir algún otro hospedador intermediario, dado el bajo número de oocistos que en general se encuentra en las heces de perro. Sin embargo, aún quedan interrogantes en cuanto al papel que desempeña el perro en la epidemiología

de la neosporosis bovina, cuál es el período de eliminación de ooquistes y por cuánto tiempo estos permanecen infectantes en el medio (Dijkstra y col., 2001).

Por otra parte, se ha observado experimentalmente que algunos perros eliminadores de ooquistes no presentan anticuerpos para *N. caninum*, lo que hace pensar en una localización intestinal estricta del parásito, sin invasión de tejidos extraintestinales (Dijkstra y col., 2001). Aun cuando se desconocen varios aspectos epidemiológicos de la enfermedad, se acepta el rol del perro como hospedador definitivo de *N. caninum* (Mc Allistar y col., 1998), y que éste contaminaría alguna fuente de alimento ingerida por los hospedadores intermediarios (herbívoros).

2.4. Patogenia:

N. caninum es altamente patogénico para bovinos y caninos, aunque también puede inducir a enfermedad en ovejas, cabras, caballos y ciervos (Georgieva y col., 2006), produciendo la muerte celular por la multiplicación activa de los taquizoítos. Los taquizoítos, responsables de la fase aguda de la infección, invaden una gran variedad de tipos celulares en el hospedador parasitado incluyendo macrófagos, neutrófilos, células neuronales, hepatocitos, fibroblastos, miocitos y células endoteliales de los vasos sanguíneos y renales (Dubey y col., 1988; Speer y col., 1989). Penetran en la célula hospedadora mediante invasión activa, localizándose en el interior de una vacuola parasitófora en el citoplasma. El fenómeno de invasión celular ha sido ampliamente estudiado en cultivos celulares y conlleva un previo reconocimiento y adhesión a la célula hospedadora. En el interior de la vacuola parasitófora los taquizoítos se multiplican mediante endodiogenia, pudiendo albergar una célula más de 100 taquizoítos. Tras la ruptura celular, los taquizoítos salen al medio extracelular y en pocas horas se inician los mecanismos de adhesión e invasión de nuevas células diana (Hemphill y col., 1996). La destrucción celular y, por consiguiente, la enfermedad depende de un equilibrio entre la habilidad de los taquizoítos para penetrar y multiplicarse en la célula hospedadora y la habilidad del hospedador para inhibir la multiplicación del parásito.

Los quistes tisulares con bradizoítos en su interior, responsables de la fase crónica de la infección, han sido observados tanto en el tejido nervioso (cerebro, médula espinal,

nervios periféricos y retina) de diversas especies con infecciones naturales y experimentales (Dubey y col., 1988; Barr y col., 1992; Kobayashi y col., 2001), como también en el tejido muscular esquelético del perro y de la vaca con infecciones naturales (Peters y col., 2001). Los quistes tisulares a menudo no originan reacción inmunológica del hospedador, y no se sabe cuánto tiempo pueden permanecer en el sistema nervioso central, aunque en ratones infectados experimentalmente, ellos permanecen viables al menos por 1 año. La formación de granulomas alrededor de los quistes tisulares degenerados y bradizoítos sugiere que ciertos quistes tisulares se rompen. La carga parasitaria y la cepa involucrada influirán en la severidad de las infecciones resultantes (Lindsay y col., 1999). En caninos, *N. caninum* puede producir severa enfermedad neuromuscular. Puede destruir una variedad de células neuronales incluyendo aquellas de los nervios craneales y espinales, y la presencia de gran número de organismos puede alterar la conductividad de las células afectadas. La causa de la hiperextensión de los miembros posteriores no es conocida con certeza, pero se cree que responde a la combinación de parálisis de la neurona motora superior con miositis, resultando en una contractura fibrosa progresiva de los músculos y fijación de las articulaciones (Barber y col., 1998).

La variación en el número y la distribución del parásito en el hospedador se debe a las rutas de infección y a la diferencia de la respuesta inmunológica según la etapa de la enfermedad. Se cree que la diseminación de los taquizoítos en los órganos viscerales ocurre en la fase aguda de la infección y que más tardíamente, los organismos se restringen a los sistemas nervioso y muscular (Alves y col., 2004).

2.5. Sintomatología:

Las perras con altos títulos de anticuerpos tendrían mayor probabilidad de producir cachorros infectados, con enfermedad clínica (Barber y col., 1998). Si bien la neosporosis canina se considera causa frecuente de mortalidad neonatal, no hay reportes de aborto por *N. caninum* en perros, a diferencia de lo que ocurre en bovinos. Algunos estudios experimentales sugieren que *N. caninum* puede causar muerte fetal, momificación, reabsorción embrionaria y nacimiento de cachorros débiles (Cole y col., 1995).

La neosporosis se puede presentar en cualquier edad. La mayoría de los casos descritos implicaron varios miembros de camadas en los que los signos clínicos aparecieron entre las 2 y las 20 semanas de edad, pero ha habido casos confirmados en perros tan jóvenes como de dos días de edad (Barber y col., 1996) y tan viejos como de 15 años (Dubey y col., 1988). En caninos la enfermedad puede ser asintomática en algunos casos y fatal en otros, tanto en perros jóvenes como adultos, siendo los producidos por infección congénita los casos más dramáticos (Dubey y col., 1989; Cuddony col., 1992). Las infecciones son más frecuentes y severas en animales menores de 6 meses de edad infectados congénitamente.

En cuanto a la sintomatología en sí, *N. caninum* tiene mayor afinidad por el sistema nervioso y muscular; por ello, suelen presentarse trastornos neuromusculares progresivos, derivados principalmente de lesiones de encefalomiелitis, polirradiculoneuritis y polimiositis que cursan con signos neurológicos como ataxia, reflejo patelar disminuido o pérdida de orientación (Georgieva y col., 2006). Se puede observar paresia de los miembros posteriores la cual puede evolucionar a una parálisis progresiva e hiperextensión rígida. Esta hiperextensión en algunos casos llega a ser tan marcada que el miembro no puede ser flexionado incluso bajo anestesia. Los animales con parálisis del tren posterior pueden estar alertas y sobrevivir por meses. La paresia del tren posterior puede ser unilateral o bilateral, y la parálisis puede ser flácida o espástica. También se ha descrito la mialgia, la cual es común en los músculos cuádriceps y lumbares (Barber y col., 1998), aunque también son mencionados los músculos abdominales, gastrocnemio, masetero y diafragma (Dubey y col., 2005). En algunos casos, luego de las manifestaciones de paresia - parálisis, se presenta debilidad cervical, disfagia y muerte en corto tiempo, mientras que otros perros que se mantienen alerta y con cuidados, pueden sobrevivir por meses o años, pero sufren la parálisis y sus complicaciones (Basso y col., 2005). También puede haber una presentación no neurológica observándose: miocarditis, neumonía, dermatitis, pancreatitis, hepatitis o adenitis, ya que los taquizoítos de *N. caninum* producen necrosis en estos órganos (Dubey y col., 1988), dando lugar a signos clínicos tales como vómitos y polidipsia como complicaciones de casos neuromusculares.

2.6. Lesiones:

Las principales lesiones observadas en neonatos son neumonía, miocarditis, hepatitis, necrosis muscular y encefalomiелitis, aunque también hay relatos esporádicos de infección ocular, úlcera de mucosa oral y dermatitis ulcerativa. Las principales lesiones macroscópicas son áreas de hemorragia y necrosis multifocal de los órganos afectados, granulomas en vísceras, estrías blanquecinas en los músculos (principalmente del diafragma) y megaesófago. En los casos más severos puede haber hipotrofia y fibrosis muscular (Alves y col., 2004).

La lesión más característica es una encefalomiелitis no purulenta y de distribución multifocal, que se caracteriza por la presencia de uno o varios focos de necrosis que, ocasionalmente, muestran hemorragias o áreas de mineralización (Boulton y col., 1995). Rodeando a estos focos se localiza un infiltrado inflamatorio formado por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas y áreas de gliosis, con proliferación de la microglía y de los astrocitos. Se puede observar alrededor de los quistes tisulares la formación de granulomas y bradizoítos en degeneración, debido a que algunos quistes tisulares se rompen produciendo una reacción inflamatoria en el hospedador (Dubey y col., 1990; Mayhew y col., 1991). Esporádicamente, pueden apreciarse manguitos perivasculares de células mononucleares alrededor de estas lesiones. En el corazón, la alteración típica es una miocarditis que puede variar desde focal a difusa y está constituida por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas en menor número que se localizan entre las fibras musculares que pueden mostrar signos de degeneración e incluso necrosis con posterior calcificación (Wouda y col., 1996).

En el resto de órganos, aunque todos serían susceptibles de presentar lesiones, éstas aparecen con menos frecuencia. El hígado presenta una hepatitis no purulenta caracterizada por una necrosis de los hepatocitos asociada a un infiltrado de macrófagos y linfocitos distribuidos de forma difusa, aunque más intensamente en los espacios porta (Barr y col., 1990; Wouda y col., 1996, 1997). Con menor frecuencia, pueden detectarse infiltrados inflamatorios semejantes a los descritos en otros órganos, como pulmón (focales o difusos), riñón (localizados preferentemente en la zona cortical), en páncreas o la glándula adrenal. En los ganglios linfáticos únicamente se observa una hiperplasia reactiva, con presencia de folículos linfoides prominentes.

Neospora caninum puede ser detectado en las lesiones del SNC y con menor frecuencia en el corazón, hígado, pulmón y riñón. Son necesarias secciones seriadas del tejido para poner de manifiesto al agente, aún en presencia de lesiones evidentes. Los taquizoítos se pueden encontrar asociados a las zonas de necrosis del SNC en número escaso y son difícilmente identificables sin la ayuda de técnicas inmunohistoquímicas, tanto en el neuropilo como en el interior del citoplasma de las neuronas. Ocasionalmente, pueden observarse asociados a los infiltrados inflamatorios y áreas de gliosis presentes en el encéfalo o formando grupos, sin pared que los delimite, en zonas donde no existe lesión. Los quistes tisulares de *N. caninum* son menos frecuentes y aparecen en el tejido nervioso sin asociarse con la presencia de lesiones, aunque, excepcionalmente, pueden observarse en zonas de infiltrado inflamatorio. Peters y col. (2001) reportaron la detección de quistes tisulares en tejido muscular de animales con infección natural. Las técnicas inmunohistoquímicas, utilizando anticuerpos específicos para *N. caninum* son también de gran ayuda en la identificación de los quistes. Diferentes partes de la musculatura pueden presentar atrofia, que, junto con algunas deformaciones de las extremidades, serían consecuencia de las alteraciones nerviosas.

2.7. Diagnostico

En pequeños animales el método diagnóstico de elección es por medio de la serología para la detección de anticuerpos específicos; esta puede o no estar acompañada con análisis coprológico para la identificación de ooquistes de *N. caninum* en materia fecal, por medio de técnicas cualitativas de concentración con soluciones sobresaturadas de cloruro de sodio (Técnica de Willis) o solución glucosada (Técnica de Sheather) (Basso y col., 2001).

2.7.1. Diagnóstico clínico:

Es complicado debido a que los cachorros congénitamente infectados a menudo no manifiestan ningún signo clínico de enfermedad, sin embargo, cuando se presentan síntomas como paresia del tren posterior y ataxia, o una historia clínica de enfermedad neuromuscular neonatal en más de un cachorro o más de una camada de una misma

hembra canina, es también sugerente de neosporosis. (Lindsay y col., 1999; Romero y col., 2005). Otra dificultad que presenta el diagnóstico clínico es la similitud de síntomas que comparte con *T. gondii*. Por tal motivo es necesario realizar el diagnóstico diferencial de laboratorio.

2.7.2. Diagnóstico de laboratorio:

Este incluye, por un lado, la detección directa de ooquistes en las muestras de heces y, por otro, la detección de anticuerpos específicos para *N. caninum*, considerando siempre que éstos pueden mantenerse por varios meses e incluso años, por lo cual un resultado de serología positiva, sólo indica exposición al parásito y no necesariamente enfermedad clínica (Stenlund y col., 2000). Por tal motivo para llegar al diagnóstico definitivo es necesario el aislamiento de *N. caninum*. El aislamiento se puede realizar inoculando material proveniente de animales infectados en diferentes cepas de ratones de laboratorio por vía subcutánea o bien con ooquistes esporulados por vía oral. También es posible realizar aislamientos en cultivos celulares (Dubey y col., 2010). Los órganos más recomendados para la inoculación son: cerebro, diafragma, pulmón e hígado de animales que han sufrido la infección. Algunas de las líneas de ratones utilizadas con esos fines son Balb/c endocriados e inmunodeprimidos y más recientemente las líneas inmunodeficientes, como los Nude mice y Interferón gamma Knockout mice (Hemphill y col., 1999) y los meriones (*Meriones unguiculatus*) (Dubey y col., 2000, Venturini y col., 2001). Sin embargo, el aislamiento de *N. caninum* es extremadamente difícil y no se practica rutinariamente para el diagnóstico de la enfermedad.

2.7.2.1. Diagnóstico coproparasitológico

Ooquistes de *N. caninum* nunca han sido observados en canes con una infección sistémica activa. Esto indica que el examen de heces es probablemente de escaso valor para diagnosticar enfermedad debido a una infección por *N. caninum* (Lindsay *et al.*, 1999). Además, la identificación misma de los ooquistes es difícil ya que los canes infectados eliminan ooquistes sin esporular cuyo tamaño y morfología son similares a los de *Hammondia heydorni* (Lindsay *et al.*, 1999). En caso de detectar ooquistes, es necesario confirmar la especie mediante una PCR.

2.7.2.2. IHQ (inmunohistoquímica):

Esta técnica permite la detección de diferentes estadios del parásito (taquizoítos o quistes) en tejidos de animales infectados conservados en formol, mediante la utilización de anticuerpos específicos. Las pruebas más utilizadas son la de PAP (peroxidasa anti peroxidasa), ABC (complejo avidina-biotina) y LSAB (estreptavidina-biotina), empleando un suero primario hiperinmune anti-*T. gondii* o anti-*N. caninum*. La ventaja en relación con la tinción de hematoxilina y eosina es que la inmunohistoquímica permite diferenciar los quistes tisulares de *T. gondii* de los de *N. caninum* y detectar taquizoítos en los tejidos, que son difíciles de hallar con las técnicas de coloración de rutina, debido a que las lesiones histopatológicas que producen ambos parásitos son similares. Si bien los quistes de *N. caninum* presentan una pared más gruesa que aquellos de *T. gondii*, no es fácil poder diferenciarlos si no se utiliza esta técnica (Lindsay y col., 1989; Dubey y col., 2010).

2.7.2.3 Pruebas serológicas:

Los métodos serológicos más usados son la inmunofluorescencia indirecta (IFI), y el enzimo inmuno ensayo (ELISA); ambos se basan en la detección de anticuerpos para *N. caninum* (Bjorkman y col., 1999; Dubey y col., 2003).

2.7.2.3.1. Inmunofluorescencia:

Es una técnica de inmunodiagnóstico ampliamente usada como técnica estándar, para detectar anticuerpos anti-*N. caninum* en el suero de animales, (Dubey y col., 1996). Estos anticuerpos pueden permanecer detectables por varios meses e incluso años, razón por la cual un resultado positivo a anticuerpos, sólo indica exposición al parásito y no necesariamente enfermedad clínica (Stenlund y col., 2000). Un pequeño número de reacciones cruzadas entre *N. caninum* y *T. gondii* han sido reportadas en canes naturalmente infectados, aunque estas reacciones cruzadas no se han considerado como un evento importante. Una parte significativa de canes que eliminaron ooquistes luego de una infección experimental no mostraron seroconversión mediante IFI para *N. caninum* (Romero y col., 2005; Georgieva y col., 2006).

2.7.2.3.2. ELISA:

Es una técnica que permite la detección de anticuerpos en medios complejos, para lo cual se utilizan tres principios técnicos: la inmunocompetencia, el método indirecto y la inmuno captura (Buxton –Maley y col., 2004). Como ventaja es una prueba simple, que permite

además procesar un gran número de muestras y una interpretación objetiva de los resultados respecto a la IFI (Moore y col., 2001). Como desventaja, la mayoría de los test de ELISA desarrollados para el diagnóstico de neosporosis deben importarse, lo que implica un elevado costo y tiempo de espera.

2.8. Tratamiento:

Un diagnóstico temprano de la neosporosis aumenta las probabilidades de éxito de un tratamiento, dependiendo del compromiso del SNC y de la severidad de los signos observados. El tratamiento de elección es la Clindamicina (10 a 15 mg/Kg, vía oral, 2 veces al día, durante 4 a 6 semanas), aunque también se han utilizado drogas como trimetropin-sulfadiazina. Hay que tener en cuenta, que no hay hasta el momento un tratamiento ni una vacuna capaz de prevenir que una hembra canina infectada transmita la infección a sus cachorros (Lindsay y col., 1999). Pero en cachorros con compromiso severo de los miembros posteriores, la muerte puede ser evitada, aunque la función motora de estos usualmente no regresa a la normalidad (Lindsay y col., 1999).

2.9. Prevención y control:

Hembras caninas con títulos de 1:50 por IFI han producido cachorros afectados, sin embargo, la infección y enfermedad parece darse más en cachorros nacidos de hembras con títulos serológicos más altos. Aunque el porcentaje de transmisión vertical es relativamente bajo, se debe evitar la reproducción de hembras seropositivas. Hay que ser muy cuidadoso al momento de la interpretación de los resultados de IFI y la consecuente advertencia a los propietarios, ya que en algunos países puede haber implicancias legales por recomendar la no reproducción de algún animal valioso. Se recomienda también a los criadores realizar una evaluación serológica a cada cachorro antes de su venta (Barber y col., 1998).

La ruta de infección post natal es probablemente por la ingestión de carne cruda (especialmente carne de vacuno), por lo tanto, se recomienda a los propietarios cocinar bien la carne antes de alimentar a sus mascotas o hacerlo a base de alimento balanceado

comercial. Al parecer el congelamiento también podría destruir al parásito, aunque se ha reportado un aislamiento exitoso de *N. caninum* después de un congelamiento prolongado a - 52°C (Bryan y col., 1994). Por último, debe evitarse alimentar a los canes de establecimientos rurales con fetos abortados, membranas fetales o terneros muertos (Barber y col., 1998; Dubey y col., 2003).

3. DESARROLLO:

3.1. Materiales y métodos

3.1.1. Materiales, equipos y reactivos utilizados

- Tubos 10 ml
- Agujas N° 21G x 1 ½"
- Micropipetas de 1 – 10ml
- Tips descartables
- Fluido de montaje
- Placa de 96 pocillos
- Centrifuga de 5000 rpm
- Agitador
- Estufa
- Microscopio de Fluorescencia.
- Antígenos de *Neospora caninum* adsorbidos en el portaobjetos
- Antígenos de *T. gondii* adsorbidos en el portaobjetos
- Conjugados específicos anti-IgG canina marcada con isotiocianato de fluoresceína (Sigma-Aldrich)
- Sueros controles positivos y negativos para *T. gondii* y *N. caninum*
- Solución salina tamponada (PBS)
- Buffer carbonato

3.1.2. Toma de muestras:

Se obtuvieron 92 muestras de sangre de caninos que conviven con bovinos en 14 establecimientos con diferentes sistemas productivos de la Provincia de Salta, abarcando los Departamentos de Capital, Vaqueros, La Caldera, Chicoana, Rosario de Lerma, El Carril y Rivadavia. Las muestras de sangre fueron tomadas por punción venosa anti-braquial (2-3 mL). De cada perro muestreado se identificó el sexo, edad aproximada y sistema de producción en el cual se encontraba habitando. Posteriormente las muestras fueron distribuidas en tubos sin anticoagulante, previamente identificados, colocadas en conservadoras con refrigerantes para su traslado al laboratorio privado, donde se procedió a una centrifugación de 2500 rpm durante 5 minutos para la obtención del suero y conservados a -20°C hasta su procesamiento por la prueba de IFI. Adicionalmente, se procedió a tomar muestras de materia fecal de perros, del establecimiento, que fueron recogidas con guantes del suelo debido a la dificultad que se presentó a la hora de tomar las muestras directamente del recto.

3.1.3. Detección de anticuerpos por IFI:

Los sueros fueron analizados por la técnica de IFI en el Laboratorio de Inmunoparasitología (LAINPA) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de la Plata, utilizando antígenos de *N. caninum* adsorbidos en el portaobjetos, y conjugados específicos anti-IgG canina marcada con isotiocianato de fluoresceína (Sigma-Aldrich) para determinar la presencia o no de anticuerpos específicos para *N. caninum*. Se realizó además el diagnóstico diferencial con *T. gondii*, para evaluar presencia de anticuerpos anti-*T. gondii* utilizando similar metodología a la mencionada para *N. caninum*.

El protocolo utilizado para el diagnóstico de cada parásito fue el siguiente:

3.1.3.1. Diluciones de los sueros problema:

- Se realizaron las diluciones de los sueros problema en PBS en placa de 96 pocillos.
- Se colocaron cantidades constantes de PBS, 100 µl en todos los pocillos excepto en el primero.
- Se colocó 8 µl de suero en 192 µl de PBS en el 1er pocillo (Dilución 1:25).

- Se realizaron las diluciones siguientes pasando 100 µl desde el primer pocillo en adelante, homogeneizando cuidadosamente en cada pasaje.

3.1.3.2 . Procedimiento:

Se realizó inicialmente un screening a fin de determinar la presencia de anticuerpos anti- *N. caninum* o anti- *T. gondii* utilizando un punto de corte de 1:50 en la IFI. Aquellos sueros que resultaron positivos a dicho punto de corte fueron analizados hasta una dilución final de 1:800.

- Se colocaron las muestras diluidas en el portaobjeto y los sueros controles positivos y negativos.
- Se incubó el antígeno con el suero problema a 37° C durante 30 minutos en cámara húmeda.
- Se realizaron 3 lavados de 10, 5 y 3 minutos con buffer de carbonatos pH 9 (*N. caninum*) o PBS (*T. gondii*), con agitación.
- Se incubó con el conjugado correspondiente, 30 minutos a 37° C, en cámara húmeda.
- Se montó con glicerina al 50 % en buffer de carbonatos (*N. caninum*) o glicerina al 90% en PBS (*T. gondii*).
- Se observó con microscopio de fluorescencia, considerándose positiva la última dilución del suero en la cual se observó fluorescencia completa en todo el contorno del parásito.

3.1.4. Análisis coprológico:

La toma de muestra de materia fecal directamente del recto. Esta práctica no fue posible en muchos de los animales, debido a que eran muy ariscos y además al momento de la toma de la muestra muchos presentaron el tubo digestivo sin contenido de materia fecal. Por tal motivo se hicieron *pools* de muestras de materia fecal recogido de diferentes sectores del predio al cual pertenecía el canino.

Se realizó una técnica que concentra los ooquistes por medio de la flotación en una solución de densidad específica 1300. (Solución de Sheather: 500 gr de azúcar, agua csp 1 lts y 10 ml de formol 40%).

Procedimiento:

- Se disolvió 50 ml de solución de Sheather y una cucharada de materia fecal.
- Se filtró la mezcla con un colador.
- Luego se recogió 10 ml a través de un embudo, en un tubo de centrifuga.
- Se centrifugó 5 minutos a 2500 rpm.
- Se tomo una gota con un ansa de la superficie.
- Se observo al microscopio.

3.1.5. Análisis de datos:

Se calculó el porcentaje de animales seropositivos a *N. caninum*, y *T. gondii*, para estimar la asociación entre la seropositividad a *N. caninum* y cada una de las variables (potenciales factores de riesgo), teniendo en cuenta el sexo y el tipo de producción, y la existencia de coinfección de ambas parasitosis, utilizándose para esto, el software InfoStat® versión 2017. Se separó a los animales en 2 grupos según su sexo y se determinó la cantidad los animales que presentaron anticuerpos (resultado positivo) y los que no presentaron anticuerpos (resultado negativo) a IFI, tanto para *N. caninum*, como para *T. gondii*. Teniendo en cuenta el sistema de producción, se dividió a las muestras en 3 grupos: 1) caninos que conviven con animales de cría; 2) caninos que conviven con animales de tambo; y 3) caninos que conviven con animales de sistema mixto; determinándose luego cuales resultaron positivos y cuales negativos a IFI, tanto para *N. caninum* como para *T. gondii*. También se analizó el porcentaje de animales positivos a los distintos títulos finales de *N. caninum* y *T. gondii*.

3.2. Resultados:

Se observó que el 35,8% de los animales muestreados fueron positivos a *N. caninum* y el 54,3% fueron positivos a *T. gondii*. Además, el 27% de los animales presentaron anticuerpos para ambas enfermedades.

En las siguientes tablas se observan los datos obtenidos de las diferentes variables utilizadas como indicadores para el análisis estadístico.

Tabla 1. Distribución de la presencia de anticuerpos anti-*Neospora caninum* según el sexo.

	Positivo	Negativo	Total
Hembras	17 (54,8%)	14 (45,2%)	31 (100%)
Machos	16 (26,2%)	45 (73,8%)	61 (100%)
Total	33 (35,9%)	59 (61,1%)	92 (100%)

Tabla 2. Distribución de la presencia de anticuerpos anti-*Neospora caninum* en caninos según el tipo de producción.

	Positivo	Negativo	Total
Tambo	8 (44,4%)	10 (55,6%)	18 (100%)
Mixto	18 (35,3%)	33 (64,7%)	51 (100%)
Cría	7 (30,4%)	16 (69,6%)	23 (100%)
Total	33 (35,9%)	59 (61,1%)	92 (100%)

Tabla 3. Distribución de la presencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* según el sexo.

	Positivo	Negativo	Total
Hembras	22 (71%)	9 (29%)	31 (100%)
Machos	28 (45,9%)	33 (54,1%)	61 (100%)
Total	50 (54,3%)	42 (45,7%)	92 (100%)

Tabla 4. Distribución de la presencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en caninos según el tipo de producción.

	Positivo	Negativo	Total
Tambo	10 (55,6%)	8 (44,4%)	18 (100%)
Mixto	31 (60,8%)	20 (39,2%)	51 (100%)
Cría	9 (39,1%)	14 (17,4%)	23 (100%)
Total	50 (54,3%)	42 (45,7%)	92 (100%)

Tanto para *N. caninum* como para *T. gondii* se observó un mayor número de hembras positivas respecto a los machos ($p=0,0018$; Tablas 1 y 3). En cuanto al sistema de

producción del cual provenían los animales, la seropositividad a *N. caninum* fue mayor en los perros pertenecientes a tambos, comparados con sistemas mixtos y de cría ($p=0,0001$; Tabla 2). En cambio, la seropositividad a *T. gondii* fue mayor en establecimientos mixtos, comparados con establecimientos de tambo y de cría ($p=0,001$; Tabla 4).

No se detectaron ooquistes compatibles con *N. caninum* en ninguna de las muestras de materia fecal analizadas.

Al analizar la distribución de títulos finales en los animales seropositivos, se observaron animales positivos a todas las diluciones evaluadas, con una tendencia a títulos más bajos para *T. gondii* en relación a los observados para *N. caninum* (Figura 5).

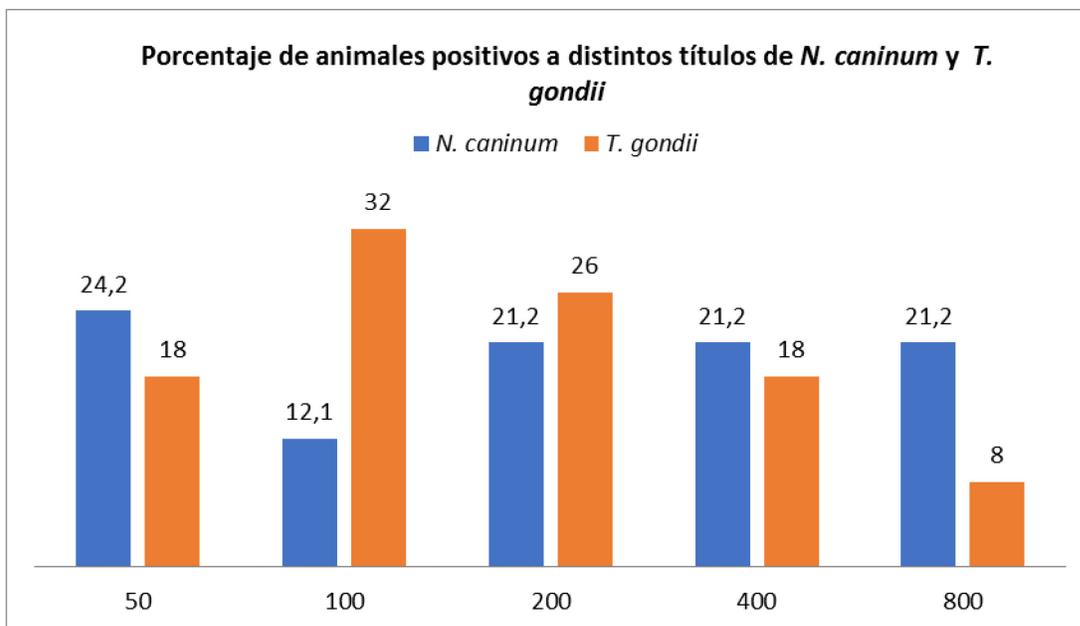


Figura 5. Porcentaje de animales positivos a distintos títulos finales de *N. caninum* (n=33) y *T. gondii* (n=50).

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES:

Teniendo en cuenta los objetivos de este trabajo se detectó la presencia de anticuerpos anti- *N. caninum* y anticuerpos anti- *T. gondii* en 35,8 % y 54,3 % de los animales muestreados respectivamente, lo que evidencia la presencia de ambos parásitos en animales de la zona estudiada. A nuestro conocimiento, este es el primer reporte de

detección de anticuerpos contra estas parasitosis en perros en la provincia de Salta. En los últimos trabajos realizados en la Argentina, la prevalencia para neosporosis y toxoplasmosis en perros con signos clínicos compatibles fue del 25,6% y 30,3%, respectivamente (Venturini y col., 2008). Sin embargo, dicho trabajo fue realizado con muestras provenientes principalmente de zonas urbanas. El presente estudio se realizó con sueros de animales provenientes de zonas rurales, observándose una mayor seropositividad para ambas enfermedades, posiblemente por factores predisponentes como la alimentación con productos de abortos de bovinos, y un contacto directo con los hospedadores intermediarios, entre otros. En cuanto a las diferencias de seroprevalencia de neosporosis encontradas a nivel mundial, se observó una mayor discrepancia debido a que países con diferentes temperaturas y alejados entre sí (Canadá, Granada, Portugal) presentan seroprevalencias bajas (entre 1,6 a 7,9%) y similares entre sí. Se destaca la baja prevalencia encontrada en diferentes zonas de Brasil en relación a los estudios de nuestro país, a pesar de la cercanía geográfica y de haberse utilizado IFI como prueba diagnóstica en ambos casos (Mineo y col., 2001).

En cuanto al sistema de producción en el cual habitaban los animales, se observó mayor seropositividad para *N. caninum* en los animales provenientes de tambo comparado con los sistemas mixto y de cría. Esto también puede estar relacionado con un mayor contacto directo entre los perros y los bovinos en dicho sistema de producción.

En relación a las diferencias encontradas según el sexo se evidenciaron diferencias significativas, observándose una distribución no uniforme. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en los campos muestreados en número de animales machos encontrado superaban ampliamente al de hembras, debido a la dificultad que presenta tener hembras en los campos por su capacidad prolífica.

.En este estudio se encontró un 27% de caninos que presentaron anticuerpos para ambas enfermedades, lo cual sugiere que éstos presentaron coinfecciones. En el diagnóstico serológico se debe tener en cuenta que en los caninos puede existir una reactividad cruzada entre *T. gondii* y *N. caninum*, ya que ambos parásitos se encuentran muy emparentados filogenéticamente y comparten antígenos comunes. En este estudio la dilución de los sueros se realizó a partir de 1:50, y aunque se ha determinado que la prueba de IFI es la más utilizada en nuestro medio debido a su alta sensibilidad y

especificidad, debería tenerse en cuenta que puede detectarse reactividad cruzada cuando las diluciones del suero son menores a 1:50 (Dubey y Lindsay, 1993).

Por lo tanto como conclusión final, debido a la ausencia de datos en la provincia de Salta de *N. caninum* y de *T. gondii*, consideramos que los resultados del presente estudio son relevantes para los dueños de los campos que tienen a los rumiantes como animal productivo, debiéndose tener en cuenta la presencia de caninos en estos predios, su control sanitario y especialmente su alimentación, evitando la ingesta de material de abortos y de otros hospedadores intermedios, y su acceso al alimento y agua de los bovinos.

Debido a la escasa información acerca de la presencia de *N. caninum* y *T. gondii* en canes de zonas rurales y urbanas en la provincia de Salta, se recomienda realizar más estudios al respecto, permitiendo así tener una información más precisa acerca de la influencia de otras variables como la raza, el sexo, la edad, e inclusive la procedencia y el tipo de alimentación.

5. BIBLIOGRAFIA

Ali CN, Harris JA, Watkins JD, Adesiyun AA. 2003. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in dogs in Trinidad and Tobago. *Vet Parasitol* 113: 179–187.

Alves T, De Lima R. 2004. Encephalitis caused by *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs. *Clínica Veterinária* 48: 44-52.

Bañales P, Fernandez L, Repiso MV, Gil A, Dargatz DA, Osawa T. 2006. A nationwide survey on seroprevalence of *Neospora caninum* infection in beef cattle in Uruguay. *VetParasitol* 139(1-3):15-20.

Barber JS. 1998. Canine neosporosis. *Waltham Focus* Vol 8 N° 1: 25-29.

Barber JS, Trees AJ. 1998. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *International Journal for parasitology* 28:57-64.

Barber JS, Glasser RB, Ellis J, Reichel MP, McMillan D, Trees AJ. 1997. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. *J Parasitol* 83: 1056-1058.

Barber JS, Trees AJ. 1996. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. *Vet. Record.* 139: 439-443.

Barber JS, Holmdahl OJ, Owen MR, Guy F, Uggl A, Trees AJ. 1995. Characterization of the first European isolate of *Neospora caninum*. 111:563-568.

Barr BC, Conrad PA, Sverlow KW, Tarantola F, Hendrickx AG. 1994. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. *Lab Invest* 71:236-242

- Barr BC, Anderson ML, Woods LW, Dubey JP, Conrad PA.1992.** Neospora-like protozoal infections associated with abortion in goats. J.Vet.Diagn.Invest. 4:365-367.
- Basso W, More G, Quiroga MA, Balducchi D, Schares G, Venturini MC.2014.** *Neospora caninum* is a cause of perinatal mortality in axis deer (*Axis axis*). Vet Parasitol. 199:255-258.
- Basso W, Venturini M. 2011.**La Toxoplasmosis en los animales domésticos y silvestres criados en cautiverio: aspectos epidemiológicos y diagnósticos. Revista Veterinaria Argentina. (XXXII) N° 332. ISSN 1852-317X.
- Basso W, Venturini MC, Bacigalupe D, Kienast M, Unzaga JM, Larsen A, Machuca M, Venturini L. 2005.**Confirmed clinical *Neospora caninum* infection in a boxer puppy from Argentina. Vet Parasitol. 131: 299-303.
- Basso W, Venturini L, Venturini MC, Hill DE, Kwok OC, Shen SK. 2001.**First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. J Parasitol. 87:612-618.
- BartelsCJ, Wouda W, Schukken YH. 1999.** Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). Theriogenology 52:247-257.
- Bjerkas I, Dubey JP. 1991.**Evidence that *Neospora caninum* is identical to the Toxoplasma-like parasite of Norwegian dogs. Acta Vet.Scand.32:407-410.
- Björkman C, UgglA A. 1999.**Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. Int. J. for Parasitol. 29: 1497-1507.
- Björkman C, Lunden A, Holmdahl J, Barber J, Trees A J, UgglA A. 1994.** *Neospora caninum* in dogs: detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. Parasite Immunol. 16:643-648.
- Bryan L, Gajadhar A, Dubey J, Haines D. 1994.** Bovine neonatal encephalomyelitis associated with a *Neospora* sp. Protozoan.Can Vet J. 35(2):111-3.
- Buxton D, Maley SW. 2004.** Toxoplasmosis. En: Vallat B, Edwards S. Manualde pruebas de diagnóstico y vacunas para los animales terrestres. p 1202 – 1209.
- Buxton, D. 1998.** Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. Vet.Res. 29:289-310.
- Cordero del Campillo M, Rojo VazquezFA.1999.** “Parasitología veterinaria” .1° edición. Ed- Mc Graw-Hill Interamericana.
- Campero LM, Venturini MC, Moore DP, Massola L, Lagomarsino H, García B, Bacigalupe D, Rambeaud M,Pardini L, Leunda MR, Schares G, Campero CM. 2015.**Isolation and molecular characterization of a new *Neospora caninum* isolate from cattle in Argentina. Exp Parasitol. 155:8-12.
- Campero CM, Moore DP, Lagomarsino H, Odeon AC, Castro M, Visca, H.** Serological status and abortion rate in progeny obtained by natural service or embryo transfer from *Neospora caninum*-seropositive cows. J. Vet. Med. Series B. 50: 458-460.
- Campero CM, Moore DP, Odeón AC, Cipolla AL, Odriozola E. A. 2003.** Etiology of bovine abortion in Argentina. Veterinary Research Communications. 27: 359-369.
- Campero CM, Anderson ML, Conosciuto G, Odriozola H, Bretschneider G, Poso MA. 1998.** Neospora caninum-associated abortion in a dairy herd in Argentina. Vet. Rec. 143:228-229.
- ColeRA, Lindsay DS, Blagburn BL, Dubey JP. 1995.**Vertical transmission of *Neospora caninum* in mice. J.Parasitol. 81:730-732
- Collantes FE, Zaballos A, Alvarez G, Ortega LM.2002.**Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. J.Clin.Microbiol. 40:1194-1198.

- Cuddon P, Lin DS, Bowman DD, Lindsay DS, Miller TK, Duncan ID, de Lahunta A, Cummings J, Suter M, Cooper B.1992.***Neospora caninum* infection in English Springer Spaniel littermates.Diagnostic evaluation and organism isolation. *J.Vet.Intern.Med.* 6:325-332.
- Davison HC, French NP, Trees AJ.1999.**Herd-specific and age specific seroprevalence of *Neospora caninum* in 14 British dairy herds. *Vet.Rec.*144:547- 550.
- De Souza SLP, Gennari SM, Yai LEO, D'Auria SRN, Cardoso SMS, Guimaraes JS, Dubey JP. 2003.**Ocurrence of *Toxoplasma gondii* antibodies in sera from dogs of the urban and rural areas from Brazil. *Braz J Vet Parasitol* 12. 1: 1 - 3.
- Di Lorenzo C, Venturini MC, Castellano C, Venturini L, Unzaga JM, Bacigalupe D.1997.**Detección de anticuerpos anti- *Neospora caninum* y anti- *Toxoplasma gondii* en perros del área urbana. *Revista de Medicina Veterinaria.*78:325.
- DijkstraT, Eysker M, Shares G, Conraths FG, Wouda W, Barkeman HW. 2001.** Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but no after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int.J. Parasitol.* 31:747-752.
- Dijkstra T, Barkema HW, Eysker M, Wouda W. 2001.** Evidence of postnatal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. *Int. J. Parasitol.* 31:209-215.
- Dubey JP, Schares G. 2006.** Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet Parasitol.* 140: 134.
- Dubey JP.2010.**General Biology. En: Dubey JP *Toxoplasmosis of animals and humans.* 2 da. Edición. Maryland, USA. 1-72.
- Dubey JP, Schares G, Ortega, Mora LM. 2007.** Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Rev* 20. 2: 323-367.
- Dubey JP.2003.**Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J Parasitol.* 41:1-16.
- Dubey JP, Barr BC, Barta JR, Bjerkas I, Björkman C, Blagburn BL.2002.** Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidian. *Int. J. Parasitol.* 32: 929-946.
- DubeyJP, Lindsay, DS. 2000.** Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocysts. *Parasitol. Res.* 86:165-168.
- DubeyJP, Lindsay, DS.1990.** *Neospora caninum* induced abortion in sheep. *J.Vet.Diagn.Invest* 2:230-233.
- DubeyJP, Lindsay DS. 1989.** Fatal *Neospora caninum* infection in kittens. *J.Parasitol.* 75:148-151.
- Dubey JP, Lindsay DS. 1989.** Transplacental *Neospora caninum* infection in dogs. *Am.J.Vet.Res.* 50:1578-1579.
- Dubey JP, Beattie CP. 1988.** *Toxoplasmosis of animals and man.* Boca Raton:CRC Press. 220p.
- Dubey JP.1999.**Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Vet.Parasitol.* 84:349-367.
- Dubey JP, Lappin MR. 1998.** *Toxoplasmosis and neosporosis.* In: Greene CE, eds. *Infectious diseases of the dog and cat.* 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Company. 493-509.
- Dubey, JP, Lindsay, DS, Adams DS, Gay JM, Baszler TV, Blagburn BL, Thulliez P. 1996.** Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. *American Journal of Veterinary Research.* 57:329-336.
- Dubey JP, Lappin MR, Thulliez P.1995.**Long term antibody responses of cat fec *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *J. Parasitology.* 81: 887-893.
- Dubey JP, de Lahunta A.1993.**Neosporosis associated congenital limb deformities in a calf. *Appl. Parasitol.* 34:229-233.
- Dubey JP, Hartley WJ, Lindsay DS. 1990.**Congenital *Neospora caninum* infection in a calf with spinal cord anomaly. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 197:1043-1044.

- Dubey JP, Hattel AL, Lindsay DS. 1988.** et.al. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. J AM Vet Med Assoc. 193:1259-1263.
- EllisJ, Luton K, Baverstock PR, Brindley PJ, Nimmo KA, Johnson AM. 1994.**The phylogeny of *Neospora caninum*. Mol. Biochem. Parasitol. 64:303-311.
- Fernandez ME, Campero CM, Morrell E. 2007.** Pérdidas reproductivas en bovinos causadas por abortos, muertes prematuras, natimortos y neonatos: casuística del período 2006- 2007. Rev. Med. Vet. 88:246-254.
- Georgieva DA, Prelezov PN, Koinarski VTS. 2006.** *Neospora caninum* and neosporosis in animals – a review. Bulg J Vet Med 9.1:1-26.
- Gharavi MJ, Oormazdi, Roointan ES. 2008.** A comparative study on sensivity and specificity of conventional and unconventional IgG and IgM assays for diagnosis of toxoplasmosis. Iranian J Publ Health 37.4: 42 – 45.
- Hemphill, A., Gottstein, B. 1996.** Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. Parasitol. Res. 82:497-504.
- Jensen L, Jensen TK, LindP, Henriksen SA, UgglA A, Bille-Hansen V. 1998.** Experimental porcine neosporosis. APMIS 106:475-482.
- Kobayashi Y, Yamada M, Omata Y, Koyama T, Saito A, Matsuda T, Okuyama K, Fujimoto S, Furuoka H, Matsui T. 2001.**Naturally-occurring *Neospora caninum* infection in an adult sheep and her twin fetuses. J.Parasitol. 87:434-436.
- Lindsay, DS, Ritter DM, Brake D. 2001.** Oocyst excretion in dogs fed mouse brains containing tissue cysts of a cloned line of *Neospora caninum*. J.Parasitol. 87:909-911.
- Lindsay DS, Upton SJ, Dubey JP.1999.**A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. Int.J.Parasitol. 29:1521-1523.
- Lindsay DS, Dubey JP, McAllister M. 1999.** *Neospora caninum* and the potential for parasite transmission. CompenCont Educ Pract Vet 21: 317 – 321.
- Lindsay DS, Dubey JP, Butler JM, Blagburn BL. 1996.** Experimental tissue cyst induced *Toxoplasma gondii* infections in dogs. J Euk Microbiol 43. 5: 113
- Lindsay, D. S., Rippey, N. S., Powe, T. A., Sartin, E. A., Dubey, J. P., Blagburn, B. L. 1995.**Abortions, fetal death, and stillbirths in pregnant pygmy goats inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum*. Am.J.Vet.Res.56:1176-1180.
- Lindsay DS, Speer CA, Toivio-Kinnucan MA, Dubey JP, Blagburn BL. 1993.**Use of infected cultured cells to compare ultrastructural features of *Neospora caninum* from dogs and *Toxoplasma gondii*. Am.J.Vet.Res. 54:103-106.
- Lindsay DS, Dubey J. 1989.** Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. Am.J.Vet.Res. 50:1981-1983.
- Mayhew IG, Smith KC, Dubey JP, Gatward LK, McGlennon NJ. 1991.**Treatment of Encephalomyelitis Due To *Neospora caninum* In A Litter Of Puppies. Journal Of Small Animal Practice
- Mineo T.W.P., Silva D.A.O., Costa G.H.N., VonAncken A.C.B., Kasper L.H., Souza M.A., Cabral D.D., Costa A.J. 2001.** Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil, Vet. Parasitol. 98: 239-245.
- Moore D, Reichel M, Spath E, Campero C. 2013.** *Neospora caninum* causes severe economic losses in cattle in the humid pampa region of Argentina. Trop Anim Health Prod. 45: 1237-41.
- Moore D, Pérez A, Agliano S, Brace M, Cantón G, Cano D, Leunda M, Odeón A, Odriozola E, Campero C.** Risk factors associated with *Neospora caninum* infections in cattle in Argentina. Vet Parasitol 2009; 161: 122-5.

- Moore DP, Campero CM, Odeon AC, Poso MA, Cano D, Leunda MR, Basso W, Venturini MC, Späth EAJ. 2002.** Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. *Vet. Parasitol.* 107: 303-316.
- Moore DP, Odeón AC, Campero CM. 2001.** Neosporosis bovina: una actualización. *VetArg* 18.180: 752-775
- McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire AM. 1998.** Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 28:1473-1478.
- McAllister M M, McGuire AM, Jolley WR, Lindsay DS, Trees AJ, Stobart RH. 1996.** Experimental neosporosis in pregnant ewes and their offspring. *Vet.Pathol.* 33:647-655.
- Paré J, Fecteau G, Fortin M, Marsolais G. 1998.** Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 213:1595-1598.
- Paré J, Thurmond MC, Hietala SK. 1997.** *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J.Parasitol.* 83:82-87.
- Peters M, Lutkefels E, Heckerroth AR, Schares G. 2001.** Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. *Int.J.Parasitol.* 31:1144-1148.
- Pinheiro AM, Costa MF, Paule B, Vale V, Ribeiro M, Nascimento I, Schaer RE, Almeida MAO, Meyer R, Freire SM. 2005.** Serologic immunoreactivity to *Neospora caninum* antigens in dogs determined by indirect immunofluorescence, western blotting and dot-ELISA. *Vet Parasitol* 130: 73 - 79.
- Romero JJ. 2005.** Appraisal of the epidemiology of *Neospora caninum* infection in Costa Rica dairy cattle. Memoria presentada para optar al grado de Doctor. Wageningen: Univ. Agraria de Wageningen. 138p.
- Sanchis F.S. 1978.** Estudio de Reinfecção Experimental do gato pelo *Toxoplasma gondii*. Sao Paulo-SP, 1978. Tese (libre docente)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual de Sao Paulo.
- Sawada M, Park Ch, Kondo H, Morita T, Shimada A, Yamane I, Umemura T. 1998.** Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. *J Vet Med Sci* 60.7: 853 – 854.
- Speer CA, Dubey JP, McAllister MM, Blixt JA. 1999.** Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Int.J.Parasitol.* 29:1509-1519.
- Speer CA, Dubey JP. 1989.** Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum*. *J.Protozool.* 36:458-463.
- Stenlund S. 2000.** *Neospora caninum* in cattle in Sweden. Isolation of the parasite and studies of its transmission. Memoria presentada para optar al grado de Doctor. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences. 40 p.
- Venturini MC, Venturini L, Bacigalupe D, Machuca M, Echaide I, Basso W, Unzaga JM, Di Lorenzo C, Guglielmone A, Jenkins MC, Dubey JP. 1999.** *Neospora caninum* infections in bovine fetuses and dairy cows with abortions in Argentina. *J Parasitol.* 29:1705-1708.
- Venturini MC, Unzaga JM, Basso W, Bacigalupe B, Larsen A, Pardini L, Moré G, Venturini L. 2008.** 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; Ciudad de Santa Fe, Argentina.