

Mieloencefalitis equina por protozoos.

Moré, G. A.

Laboratorio de Inmunoparasitología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.
Calle 60 y 118 S/N, CP 1900. La Plata, Argentina.
Investigador asistente Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET),
C1033AAJ, Buenos Aires, Argentina.
Correo electrónico: gastonmore@fcv.unlp.edu.ar

El presente trabajo ha sido galardonado con el Premio Anual AAPAVET Rioplatense 2010/2011 "Congreso Mundial de Parasitología Veterinaria", Primer premio en la categoría "Mejor monografía de actualización original". Esta es una reproducción fiel, tal los requisitos exigidos por el comité de evaluación AAPAVET-Premio anual rioplatense 2010/11.
No existe conflicto de intereses.

Palabras clave

Sarcocystis neurona, mieloencefalitis, equinos, protozoos, Argentina.

Keywords

Sarcocystis neurona, myeloencephalitis, protozoas, horse, Argentina.

RESUMEN

La mieloencefalitis equina por protozoos, conocida como EPM, es causada principalmente por *Sarcocystis neurona* y produce pérdidas significativas en la producción equina. Se caracteriza por presentar signología nerviosa variable en la que predominan la ataxia y atrofia muscular focal. La distribución de EPM se restringe al continente Americano, acorde a la distribución de los hospedadores definitivos de *S. neurona*, las comadrejas *Didelphis albiventris* y *D. virginiana*. En el presente trabajo monográfico se revisan y actualizan aspectos sobre etiología, historia, patogenia, diagnóstico, epidemiología en América y Argentina, su tratamiento y el control de la EPM.

SUMMARY

Equine Protozoal Mieloencephalitis.

Equine Protozoal Mieloencephalitis (EPM) is generally caused by *Sarcocystis neurona* and could produce important economical losses on equine production. The principal signs are diverse neurological disorders principally with ataxia and focal muscle atrophy. EPM distribution is restricted to the American continent, according to the distribution of the definitive hosts of *S. neurona*, the opossums *Didelphis virginiana* and *D. albiventris*. The present manuscript reviews and updates aspects of etiology, history, pathogenesis, diagnosis, epidemiology, treatment and control of the EPM in Argentina and America.

Introducción

La entidad clínica conocida como EPM (sigla del inglés: Equine Protozoal Myeloencephalitis) es una mieloencefalitis que ocurre en equinos de América, causada por protozoarios. Se caracteriza por la presentación de anomalías neurológicas que son ocasionadas por las lesiones que produce el agente etiológico en el sistema nervioso central y varían según las localizaciones del mismo. *Sarcocystis neurona* es el agente etiológico más frecuente de EPM en Norte América, pero se considera que también podría ser causada por los protozoarios *Neospora caninum* y *Neospora hughesi*^{1,2}. Es importante remarcar que solo un porcentaje de los equinos infectados con *S. neurona* desarrollan signos neurológicos de importancia.

La EPM puede afectar a equinos de diferentes edades, raza o sexo. Cualquier equino que muestre anomalías neurológicas, o una "cojera" sutil cuya causa no ha podido establecerse claramente después de un examen cui-

dadoso, puede tener EPM. Los signos clínicos dependen de la localización de los protozoos dentro del sistema nervioso central e incluyen debilidad, tropiezos frecuentes, mala posición de uno o varios miembros, atrofia de los músculos por denervación, ataxia, inclinación de la cabeza o asimetría facial. El inicio de los signos puede ser agudo o más comúnmente, insidioso. Un caballo seriamente afectado puede ser incapaz de levantarse y/o de comer. En infecciones tempranas o menos severas, pueden ocurrir cojeras leves o cualquier combinación de los signos mencionados. En la mayoría de los casos, los caballos afectados están alertas y con apetito normal. En EE. UU. se ha estimado que esta enfermedad podría ocasionar pérdidas millonarias en la producción equina².

Etiología

Sarcocystis neurona es un protozoario del grupo de los coccidios (Apicomplexa: *Sarcocystidae*). Las comadrejas

son sus hospedadores definitivos (HD) y varias especies de mamíferos son sus hospedadores intermediarios (HI) naturales o aberrantes. La historia de *S. neurona* y su asociación como causal de EPM se encuentra resumida en la Tabla 1.

Las comadrejas *Didelphis virginiana* de Norte América y *D. albiventris* de Sudamérica, son hospedadores definitivos que excretan en sus heces ooquistes y/o esporocistos. A diferencia de otras especies de *Sarcocystis*, *S. neurona* tiene un amplio rango de HI como los mapaches, armadillos, nutrias marinas, zorrinos, gatos, otros mamíferos y hasta probablemente aves^{2,4}. En el año 1995 se postuló que *S. neurona* y *S. falcatula* eran la misma especie⁵, pero estudios posteriores brindaron evidencia de que ambos protozoos son biológica y estructuralmente diferentes⁶⁻⁸. Por lo expuesto se considera muy importante la correcta diferenciación molecular y biológica entre *S. neurona* y *S. falcatula*. Los HD de este último protozoo también son las comadrejas, siendo diversas especies

Tabla 1.
Historia de *Sarcocystis* neurona y la EPM.

Contribución/año(s)	Ref.
Reconocimiento del síndrome clínico sin definición del agente etiológico/ 1970	82
Primera identificación de protozoarios en tejidos con lesiones/ 1974	63,64, 83
Definición de EPM como enfermedad/ 1974-76	70, 71
Introducción de la terapia anti-protozoarios/ 1974-76	70, 71
Se considera que los protozoos causales de EPM pertenecen al género <i>Sarcocystis</i> / 1976-80	15, 16
Primer aislamiento del protozoario en cultivo celular, es nombrado <i>Sarcocystis neurona</i> / 1991	17, 18
Descripción del desarrollo <i>in vitro</i> / 1991	17, 84
Desarrollo del Western blot para diagnóstico de <i>S. neurona</i> / 1993	37
Introducción de la técnica de PCR para diagnóstico y caracterización molecular / 1994	85, 86
Se propone a la comadreja (<i>D. virginiana</i>) como hospedador definitivo (HD) de <i>S. neurona</i> / 1995	87
Es inducido el síndrome EPM en caballos alimentados con esporocistos de comadrejas / 1997	24
<i>S. neurona</i> es diferenciado de <i>S. falcatula</i> en base a la susceptibilidad a <i>S. neurona</i> de ratones inmunodeficientes / 1997-98	6, 8
Se confirma a las comadrejas como HD por la inducción de síndrome tipo EPM en ratones inmunosuprimidos alimentados con esporocistos / 1998	6
Se inician estudios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de agentes terapéuticos / 1999-2001	73, 88
<i>S. neurona</i> es aislado de SNC de hospedadores no equinos / 2000	21
Se describe a la comadreja Sudamericana (<i>D. albiventris</i>) de Brasil como HD de <i>S. neurona</i> / 2001	89
Se detectan los quistes musculares de <i>S. neurona</i> y se completa el ciclo biológico / 2000	90
Se propone al equino como hospedador intermediario / 2005	10
Se presentan nuevas pruebas de que ciertas aves podrían ser hospedadores intermediarios de <i>S. neurona</i> / 2008	3

de aves los HI (9).

Los HI naturales ingieren los esporocistos que contienen 4 esporozoítos, que se liberan en la luz intestinal, invaden los tejidos, se multiplican asexualmente y luego forman quistes en los músculos. Los HD se infectarán al comer los quistes musculares, los parásitos se multiplicarán en el intestino y luego de una multiplicación sexual, formarán los ooquistes y esporocistos que serán eliminados con las heces de la comadreja (Figura 1). Los esporocistos

son ovales y miden 10 x 8 µm aproximadamente; los merontes maduros pueden medir 30 µm y los quistes musculares que son microscópicos miden 700 µm aproximadamente y tienen una pared de 1-2 µm de espesor.

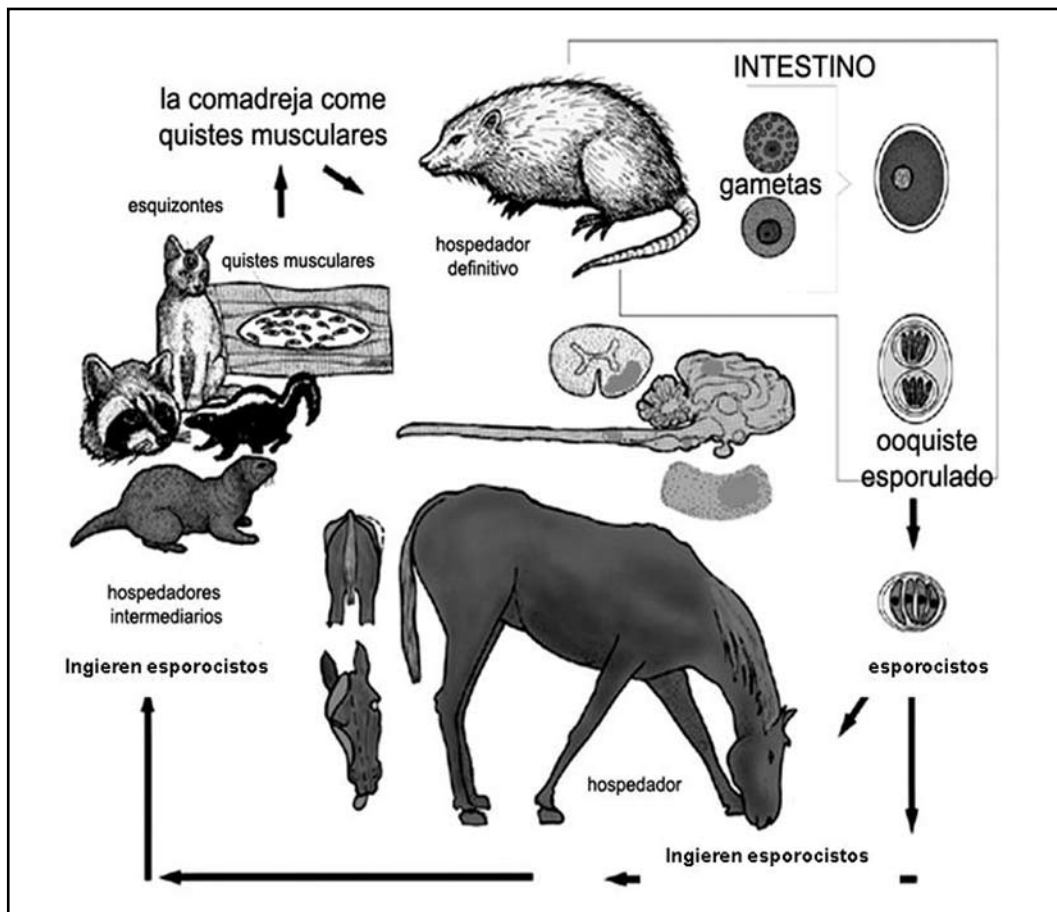
En los hospedadores intermediarios aberrantes sólo se identificaron estados asexuales del parásito (merontes con merozoítos) en el cerebro y la médula espinal; pueden afectar cualquier parte del sistema nervioso central (SNC) y ser detectados en preparados histológi-

cos. El equino es considerado hospedador aberrante² aunque un reporte lo ubica como intermediario, basándose en evidencias morfológicas y moleculares de quistes detectados en músculos de la lengua de un equino¹⁰.

A diferencia de otros coccidios, la multiplicación asexual dentro de las células del hospedador intermediario ocurre por endopoligenia libre en el citoplasma (sin vacuola parasitófora). Ultraestructuralmente, los merozoítos del género *Sarcocystis* carecen de roptrias.

Figura 1.

Ciclo evolutivo de *Sarcocystis neurona* (Tomado y adaptado de Dubey y col., 2001).



Tomado y adaptado de Dubey y col., 2001.

Neospora caninum y *N. hughesi* también son protozoarios del tipo Apicomplexa estrechamente relacionados entre sí y son agentes que potencialmente pueden ocasionar EPM, aunque son muy pocos los casos descritos^{11, 13}.

Neospora caninum se localiza preferentemente en el SNC; infecta principalmente a los bovinos ocasionando abortos, signos neurológicos en terneros y pérdidas en la producción de carne y leche. También infecta a los perros y otros cánidos en los que puede causar enfermedad sistémica, con un cuadro predominantemente neurológico. Es de ciclo indirecto facultativo, forma quistes en los tejidos de los HI (principalmente bovinos) que son ingeridos por sus hospedadores definitivos, el perro y el coyote, que luego eliminan ooquistes con sus heces, reiniciando el ciclo. En Argentina puede alcanzar hasta 73% de seroprevalencia en bovinos¹⁴ y tiene una amplia distribución; hasta el presente *N. hughesi* solo ha sido hallada

en EE. UU., y su ciclo evolutivo completo aún se desconoce¹¹.

2.1 Aislamiento y modelos experimentales

Desde la descripción de *S. neurona* como causal de EPM^{15, 16} se intentaron completar los postulados de Kock, logrando aislamientos del protozoo en cultivos celulares, por primera vez en 1991^{17, 18}. Estos se realizaron a partir de homogenatos de tejidos nerviosos de equinos con EPM, inoculados en líneas celulares de monocitos bovinos (M617). A partir de esos primeros aislamientos denominados SN-1 y SN-2, se obtuvieron otros utilizando tejidos de equinos (en algunos casos previamente inmunodeprimidos) en las mismas líneas celulares y en células dérmicas equinas (*Equine dermal cells*)¹⁹. Como la cantidad de *S. neurona* en el SNC suele ser baja y su desarrollo *in vitro* en general es lento, se recomienda mantener los cultivos celulares inoculados con mate-

rial sospechoso no menos de 2 meses. Hasta el momento todos los aislamientos de *S. neurona* a partir de tejidos equinos se han realizado en EE.UU. y en Panamá.

También se ha aislado *S. neurona* a partir de la inoculación de esporocistos procedentes de intestinos de comadrejas (*Didelphis virginiana* y *D. albiventris*) en cultivos celulares²⁰ o en ratones knock-out para interferon gamma (KO)⁶. Estos aislamientos se realizaron con material proveniente de animales de EE.UU. y Brasil demostrando ser patógenos para ratones KO². Otros aislamientos de *S. neurona* se obtuvieron mediante la inoculación de tejidos de nutrias marinas (*Enhydra lutris nereis*) en cultivos celulares^{21, 22}.

Las líneas clásicas de ratones como BALB/c, C57/Black y SCID no son susceptibles a la infección por *S. neurona*; en cambio los ratones nude y los KO desarrollan encefalitis a las dos semanas postinoculación (dpi), siendo po-

sible detectar parásitos en SNC a partir de 11 dpi y en vísceras 10-14 dpi^{6, 8}. Hasta el momento no se han desarrollado modelos de reproducción de la infección con *S. neurona* en grandes animales. Los caballos inoculados con esporocistos de *S. neurona* desarrollaron anticuerpos y signos clínicos, pero el parásito no fue detectado en tejidos y no se recuperó en inoculaciones en células^{23, 24}. Se ha manifestado que los signos clínicos serían más severos en animales estresados por el transporte, sin embargo en inoculaciones experimentales de *S. neurona* y corticoesteroides no se modificó el cuadro clínico²⁵. Los caballos inoculados con *S. neurona* directamente en el espacio subaracnóideo desarrollaron anticuerpos en niveles elevados, pero no signos clínicos²⁶.

3. Patogenia

Sarcocystis neurona puede afectar cualquier región del SNC, desde la porción anterior del cerebro hasta el final de la médula espinal. No hay descripciones de la ubicación de *S. neurona* dentro de nervios periféricos. Los esquizontes han sido detectados en neuronas, células de la glía y células mononucleares. Se propone que, durante las infecciones de los equinos, el transporte dentro de células mononucleares sería la manera en que los protozoos se protegen para llegar al SNC e infectarlo²⁷. Se desconoce con exactitud el modo en el que *S. neurona* se multiplica dentro otros tejidos de equinos, pero se sabe que 3 semanas post-infección se encuentra confinado al SNC². Se desconocen muchos de los factores relacionados con la generación de cuadros clínicos de EPM. La inoculación de merozoítos de *S. neurona* dentro de los espacios subaracnóideos no determinó la aparición de signos clínicos, aunque si se detectó seroconversión. Por eso se postula que la multiplicación previa en otros tejidos distintos del SNC, podría jugar un rol importante²⁶.

Las lesiones se producirían por la destrucción de células nerviosas por parte de los protozoos y por la consecuente inflamación. Los signos varían acorde al segmento o región del SNC afectado pudiendo graduar desde infecciones asintomáticas a cuadros graves con ataxia, atrofia muscular por denervación, parálisis, postración y muerte. Se desconocen los factores que modifican la severidad de la EPM, aunque parecerían no estar asociados a malnutrición y otras enfermedades concomitantes conocidas. La respuesta inmune podría tener un rol fundamental en la manifestación de casos de EPM, ya que se ha demostrado un número significativamente más alto de linfocitos T

CD4 y neutrófilos en sangre periférica de caballos con EPM versus animales normales²⁸. También se demostró un predominio de expresión de citoquinas pro-inflamatorias (IL8, Interferon gamma y FNT alpha) en tejidos nerviosos de equinos con EPM²⁹.

4. Diagnóstico

Aunque existen muchos desórdenes neurológicos en equinos, la EPM es la enfermedad más comúnmente diagnosticada en Norteamérica². Para diferenciar la EPM de desórdenes musculares primarios y otras enfermedades neurológicas se necesitan procedimientos diagnósticos auxiliares.

4.1 Signos clínicos

Se considera que la EPM es una enfermedad progresiva y debilitante con afección de diversas áreas del SNC, sin embargo se considera que la ataxia, tambaleos y atrofia muscular son los signos más característicos². La aparición de los signos clínicos puede ser aguda o bien tener un curso insidioso, con signos focales o multifocales de enfermedad neurológica que puede afectar al cerebro, tronco del encéfalo, la médula espinal o cualquier combinación de las áreas del SNC. Algunos caballos afectados con EPM tienen una función anormal de las vías respiratorias superiores, cojera inusual o atípica o incluso convulsiones. En casos severos, el caballo puede tener dificultades al pararse, caminar o tragar y la enfermedad puede progresar muy rápidamente. En algunos animales parece estabilizarse o permanecer estable por un período de tiempo. Los primeros signos clínicos a menudo se confunden con una cojera o claudicación de miembros torácicos y/o pelvianos. En muchos casos la enfermedad tiende a tener una progresión gradual de los signos clínicos, pero en otros pueden aparecer signos leves seguidos de una progresión rápida y muy grave. En el examen físico, los signos vitales suelen ser normales, aunque los animales pueden presentarse delgados y ligeramente deprimidos. El examen neurológico revela a menudo una debilidad asimétrica, ataxia y espasticidad con participación de las cuatro extremidades. Con frecuencia pueden ser observadas áreas de hipoalgesia o completa pérdida de la sensibilidad. Frecuentemente se observa déficit en los nervios craneales, lo que se manifiesta con inclinación de la cabeza, depresión, parálisis del nervio facial y dificultad para tragar, aunque los signos no siempre se limitan a estas áreas. Las alteraciones de la marcha son a menudo el resultado de los daños de la médula espinal y pueden

ser muy variables dependiendo de la localización y gravedad de las lesiones. La mayoría de los caballos afectados con EPM permanecen alertas y tienen valores hematológicos normales. Uno de los signos clínicos de gran ayuda es que a menudo presentan marcha asimétrica con atrofia muscular focal, lo que puede ser importante para hacer un diagnóstico diferencial de EPM con otras enfermedades neurológicas. Entre ellas, la mielopatía cervical vertebral (CVM) es una de las enfermedades neurológicas más comunes que afectan a la médula espinal, como resultado de la estenosis del canal vertebral que a veces puede estar acompañada de la inestabilidad entre las vértebras. La CVM es más frecuente en los caballos de 1-3 años de edad y más común en machos. Generalmente se presenta con signos simétricos, con los miembros pélvicos más afectados que los miembros torácicos. La mielitis equina causada por herpes virus (VHE-1) es una vasculitis viral de los caballos, que puede afectar a cualquier raza. Generalmente hay una historia previa de abortos y/o signos respiratorios leves en la explotación, que puede afectar a un número variable de caballos. Por lo general, la ataxia es simétrica con debilidad de miembros posteriores. Ocasionalmente los caballos con HVE-1 pueden estar en decúbito y ser incapaces de levantarse. En el diagnóstico diferencial de EPM deben considerarse otras enfermedades y condiciones que pudieran llevar a la aparición de signos compatibles como por ejemplo traumas, encefalopatía hepática, síndrome de cauda equina, sustancias neurotóxicas, botulismo y tétanos entre otros.

4.2 Albúmina

La relación entre la concentración de albúmina en líquido cefalorraquídeo (LCR) y suero puede ser un indicador de lesiones que afectan la barrera hematoencefálica. En los casos de EPM este cociente se encuentra elevado. Se debe ser cuidadosos en su interpretación, sobre todo considerando la relativa frecuencia de contaminación del LCR con sangre durante la toma de muestra^{2, 30}.

4.3 Serología

La detección de anticuerpos para *S. neurona* no confirma la EPM, ya que un alto porcentaje de equinos puede haber tenido contacto con el parásito sin enfermar. Por otro lado, el período de incubación suele ser mayor a dos semanas, por lo que en general los equinos con signos neurológicos de EPM presentan anticuerpos detectables en los test serológicos². Debido a la reactividad cruzada entre las especies del género *Sarcocystis* es posible detectar anticuerpos en sueros equinos usando

antígenos de especies heterólogas. La detección de anticuerpos en LCR es sugestiva de la infección del SNC con *Sarcocystis* spp. Sin embargo, aproximadamente el 10% de los equinos con otra enfermedad neurológica pueden resultar falsos positivos por aumento de la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica o por contaminación de la muestra con sangre^{2, 30}.

Para el diagnóstico serológico de *Neospora* sp. en equinos se utilizan diversas pruebas, pudiendo detectar anticuerpos para *Neospora hughesi* con antígeno de *N. caninum*, porque hay reactividad cruzada entre ambas especies. La detección de anticuerpos contra estas especies tiene una baja frecuencia en equinos^{11, 31, 32}.

4.3.1 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Para esta prueba se utilizan merozoítos de aislamientos de *S. neurona* de referencia cultivados en células (monocitos bovinos). Los protozoarios intactos son montados en las áreas de los portaobjetos para IFI. Su sensibilidad es considerada elevada, aunque su especificidad es muy discutida, debido a que la reactividad para los antígenos superficiales del parásito son compartidos por otros protozoarios del mismo género^{30, 33-36}. Incluso, es posible detectar anticuerpos contra el género *Sarcocystis* usando como antígeno merozoítos o bradizoítos de especies heterólogas².

4.3.2 Inmunoblot

La prueba de Immunoblot (o Western Blot) detecta la presencia de anticuerpos específicos para *S. neurona* en suero sanguíneo y en LCR, y es la técnica más usada para el diagnóstico de EPM en EE. UU.². Fue desarrollada inicialmente en el año 1993³⁷ adoptando luego diversas metodologías así como interpretaciones en la especificidad de las bandas reconocidas, correspondientes al peso molecular de las proteínas de *S. neurona*^{38, 39}. El diagnóstico de rutina en el laboratorio de referencia Equine Biodiagnostics Incorporated (EBI, Lexington, Kentucky, EE.UU.), se realiza usando 10⁶ merozoítos sonificados por gel, obtenidos de cultivos celulares, y sometidos a condiciones desnaturalizantes. Se utilizan geles de poliacrilamida con diferente concentración (de 12 a 20%), anti-IgG equina biotinilada adicionada de estreptavidina-peroxidasa como conjugado y aminoetilcarbazol-H₂O₂ como revelador. También se puede usar como conjugado suero hiperinmune anti-IgG equina con peroxidasa y revelar con Diaminobenzidina (DAB) o cloronaftol^{2, 32}.

Se consideran específicas las proteínas de 7-10 Kd y la de 16 Kd; sin embargo otros autores recomiendan la banda de 30 Kd como específica, eliminando las

posibles reacciones inespecíficas con una incubación de las membranas con sueros bovinos positivos a *Sarcocystis* spp.^{40, 41}. Esta proteína de 30 Kd es la inmunodominante por lo que la reacción suele ser mucho más intensa que para las otras, se la denomina SnSAG1 (*Sarcocystis neurona* surface antigen 1)⁴².

4.3.3 Elisa

Durante los últimos años se han estado desarrollando diversas técnicas de Ensayo Inmunoenzimático (ELISA), usando como antígenos algunas proteínas de superficie de *S. neurona*. Estas pruebas, principalmente las que utilizan como antígeno a las proteínas recombinantes denominadas SnSAG4 y SnSAG2 y/o las combinaciones de varios antígenos de superficie, parecen tener una sensibilidad y especificidad similares a las de la técnica de Immunoblot^{36, 43-47}. El análisis de los perfiles proteicos de aislamientos de *S. neurona* y posteriores estudios moleculares de expresión de secuencias, han demostrado variaciones importantes de los antígenos de superficie (SnSAG); incluso algunos aislamientos no expresarían algunos SnSAGs^{48, 49}. Este hallazgo es muy relevante desde el punto de vista del diagnóstico y en el planteo de futuras estrategias de control.

4.3.4 Prueba de aglutinación

Esta prueba se ha desarrollado para la detección de anticuerpos específicos para *S. neurona* en especies diferentes a los équidos. Se utilizan merozoítos del aislamiento denominado SN6, cultivados en células, que se enfrentan con el suero del animal sospechoso, con el agregado de 2-mercaptoetanol para destruir las Ig M⁵⁰. Esta prueba no es considerada específica para el diagnóstico en equinos, sin embargo es la técnica de referencia en especies como ratones, armadillos, gatos y zorritos⁵¹⁻⁵⁵. También se la ha utilizado para la búsqueda de anticuerpos en mapaches, detectando una seroprevalencia del 92% en EE.UU.⁵⁶.

4.4 Diagnóstico molecular

La técnica de PCR (*Polymerase chain reaction*) en líquido cefalorraquídeo fue considerada muy adecuada para el diagnóstico cuando fue descrita⁵⁷, sin embargo actualmente se conoce su baja sensibilidad^{2, 58}. A pesar de que los merozoítos de *S. neurona* libres en el LCR podrían ser lisados, se ha comprobado que dado que penetran en leucocitos en cultivo²⁷, podrían encontrarse dentro de estas células contenidas en el LCR de caballos con EPM. Una de las técnicas más ampliamente empleadas en el diagnóstico molecular, es la descrita por Tanhausser y col en 1999 mediante PCR y corte con enzi-

mas de restricción (RFLP) que permite diferenciar *S. neurona* de *S. falcatula* en muestras de esporocistos y tejidos. Para ésta técnica se amplifican dos fragmentos diferentes, que son luego sometidos a corte con 2 enzimas de restricción cada uno, logrando patrones de restricción diferenciales para cada especie⁵⁹. El análisis de las secuencias de los genes que codifican el ARN de la subunidad menor del ribosoma (18S ARNr), evidenció dos grupos dentro del género *Sarcocystis*, por un lado los que tienen rumiantes como HI y por el otro los que tienen HI no rumiantes. Este mismo estudio situó estrechamente relacionado a *S. neurona* con *S. mucosa*, la que se cree es una especie que usaría marsupiales como HD⁶⁰.

Se ha propuesto también una técnica de PCR usando el gen del 18S ARNr como target, que permitiría un diagnóstico rápido y específico de los esporocistos en materia fecal y con una sensibilidad mayor a la detección microscópica y otros métodos propuestos previamente⁶¹. Los diferentes aislamientos de *S. neurona* de EE.UU., caracterizados molecularmente, estarían estrechamente relacionados entre ellos, formando un grupo diferente a los aislamientos de Sudamérica⁶².

Actualmente se están haciendo diversos estudios moleculares para poner en evidencia pequeñas diferencias detectadas entre los aislamientos de *S. neurona* y que se supone podría enmarcar diferencias en su comportamiento biológico y respuesta inmune⁵⁸. Muchas de las diferencias se han encontrado en la expresión génica de algunos SnSAG, como así también en las secuencias de los genes que codifican estos SnSAG⁴⁹.

4.5 Histopatología

Las lesiones de EPM se encuentran siempre confinadas al SNC. Las lesiones macroscópicas más frecuentes en casos agudos, son pequeños y múltiples focos hemorrágicos distribuidos aleatoriamente a lo largo de la médula y encéfalo (Figura 2). En los casos subagudos y crónicos las áreas lesionadas se presentan como focos múltiples con cambios de coloración, pudiendo ser más pálidas o con pigmentaciones oscuras. La mayoría de las lesiones se encuentran en la médula espinal, y por otro lado, el tallo encefálico es la región del encéfalo más afectada.

Las lesiones microscópicas predominantes son focos hemorrágicos múltiples, inflamación no-suprativa multifocal y pequeños focos de necrosis^{2, 63, 64}. Son frecuentes los manguitos perivasculares formados por células mononucleares, especialmente en las meninges. El tipo de respuesta inflamatoria es muy variable y consiste en

infiltrados con mezcla de linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, células gigantes y macrófagos “espumosos” o células de Gitter. La detección de estados parasitarios, en los cortes teñidos con Hematoxilina y eosina, es difícil y poco frecuente.

4.6 Inmunohistoquímica

La técnica de Inmunohistoquímica (IHQ) permite localizar el parásito en tejidos, identificarlo correctamente y asociarlo a zonas de lesiones (Figura 3); aunque es difícil su hallazgo debido a la amplia distribución de los protozoos

en el SNC². Como en otras infecciones por protozoos se la considera como técnica confirmatoria para la identificación del agente causal en el examen postmortem⁶⁵. De rutina se utilizan anticuerpos policlonales específicos para *S. neurona* como anticuerpo primario.

Figura 2.

Lesiones agudas de EPM.

A. Se observan múltiples focos hemorrágicos en la sustancia blanca y duramadre.

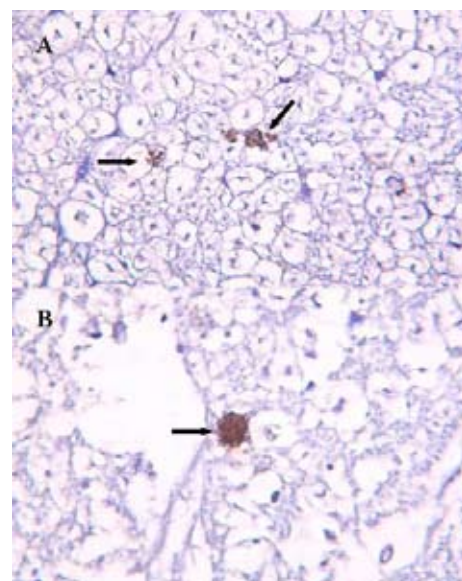
B. Diferentes grados de hemorragias en cortes transversales de médula espinal, principalmente en la materia gris (Tomado y adaptado de Dubey y col., 2001).



Figura 3.

Inmunohistoquímica de médula y encéfalo afectado por EPM.

Se observan merozoítos libres (A) y merontes intracelulares (B) de *S. neurona* (flechas). 40 X. (Imagen original, Moré y col., 2008).



5. Epidemiología

La distribución de la EPM está limitada al Continente Americano. Se ha informado en EE.UU. que aproximadamente del 30 al 50 % de los equinos pueden tener anticuerpos para *S. neurona*; los casos detectados en Europa, Sud África y Asia ocurrieron en equinos importados. La mayoría de los casos clínicos son esporádicos, pero a menudo se pueden detectar más de uno en la misma explotación; en pocas ocasiones se han presentado varios casos simultáneamente y se sugiere que en esas circunstancias se han reunido una mayor cantidad de factores de riesgo. El riesgo de desarrollar signos clínicos de la enfermedad se incrementa con la edad, el tipo de ejercicio, el transporte, injurias, cirugías o partos. Se han descrito y diagnosticado casos clínicos de EPM en Estados Unidos, Canadá, Brasil, Panamá y recientemente en Argentina^{2, 66}.

La distribución de EPM se relaciona con la de las comadreas, que eliminan millones de esporocistos al medio con las heces. En Sudamérica los datos son escasos, *S. neurona* se detectó por primera vez en 1992, por medio de tinciones inmunohistoquímicas de cortes de cerebro y médula espinal de dos equinos atáxicos, uno de ellos nacido en Argentina y criado en Brasil y el otro nacido y criado en Brasil⁶⁷. En 2001, Dubey y col. aislaron el parásito de la comadreja *Didelphis albiventris*, comprobando su papel de hospedador definitivo para Sudamérica. Trabajos recientes indican que en algunas zonas de Brasil la prevalencia puede llegar a 84 % con un estimado de 70% para 961 equinos examinados de 10 zonas distintas⁶⁸. En ese mismo país, el 24 % de 961 equinos examinados fueron positivos para *Neospora* sp. (68). En Francia, Pronost y col. (1999) hallaron anticuerpos en 55% de 67 caballos y ADN de

N. caninum en un feto equino abortado⁶⁹. En EE. UU. se han informado 7 casos de neosporosis equina de los cuales 5 presentaron signos neurológicos².

La presencia de anticuerpos en un número elevado de equinos, incluso sin signos clínicos, sumado a la dificultad de recuperar los protozoos en las infecciones experimentales, hace suponer que algunos animales pueden controlar o incluso eliminar *S. neurona* de sus tejidos. Los factores que facilitan la aparición y gravedad de los signos clínicos de EPM se desconocen.

6. EPM en Argentina

La EPM impacta negativamente en la producción equina por la muerte de animales, pérdida o disminución del rendimiento deportivo y por el aumento de los costos en atención profesional, diagnóstico y tratamiento. Sin embargo hasta el momento el diagnóstico se-

rológico de la enfermedad en Argentina, se realiza enviando sueros de los animales sospechosos a EE.UU. para su análisis por Western Blot. El elevado costo de ese estudio y las dificultades para el envío de material biológico a ese país, incide en que sea poco accesible y en que no pueda realizarse en forma rutinaria en nuestro medio. Por eso, los profesionales de la actividad hípica y de laboratorios de diagnóstico de enfermedades infecciosas en equinos, han manifestado la importancia y necesidad de incorporar el diagnóstico de EPM en nuestro país, como diagnóstico diferencial de otras enfermedades neurológicas. Las publicaciones sobre *S. neurona* en Argentina se reducen al caso de un equino muerto en Brasil, como se mencionó anteriormente y a los resultados del estudio serológico realizado por Dubey y col. en 1999, en el que se detectaron 27 seropositivos de 76 equinos sin signos neurológicos.

Recientemente se ha confirmado el diagnóstico de un caso de EPM mediante histopatología, Inmunohistoquímica y PCR-RFLP⁶⁶, pero la falta de datos sobre su prevalencia e importancia en Argentina no permite estimar las pérdidas que ocasiona.

Actualmente en el Laboratorio de Inmunoparasitología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, se han puesto a punto las técnicas moleculares para diferenciar *S. neurona* de *S. falcatula*⁵⁹. *Sarcocystis falcatula* había sido descrito en 1999 por el grupo de trabajo de ese Laboratorio en colaboración con el Dr. J.P. Dubey. En la actualidad gracias a su colaboración y la del Dr. D. Howe se importaron proteínas de *S. neurona* y sueros controles para la puesta en funcionamiento de la técnica de Western blot en nuestro país.

7. Tratamiento

Ante la sospecha de EPM, el tratamiento debe instaurarse lo antes posible para lograr buenos resultados. La remisión de los signos se logra en un 70-75% de los equinos tratados oportunamente. En muchos casos, se usa la respuesta al tratamiento como un indicador diagnóstico, aunque la falta de confirmación específica puede generar dudas a este respecto.

Desde hace muchos años se utilizan los inhibidores de la dihidrofolato reductasa como las sulfonamidas y pirimetamina^{70, 71}. Tradicionalmente se usa la dosis de 20 mg/kg y 1 mg/kg de sulfadiazina y pirimetamina respectivamente, vía oral una vez al día. La duración debe ser prolongada (12 semanas) hasta la remisión de los signos y esto puede llevar a complicaciones secundarias como anemia, leucopenia y diarreas, principalmente debidas a la pirimetamina. Los animales en tratamiento deben monitorearse mediante estudios hematológicos, en caso de detectarse anemia puede interrumpirse el tratamiento y brindar en la dieta ácido fólico. Las hembras preñadas en tratamiento pueden presentar malformaciones fetales y hasta abortos, por lo que deben contemplarse otras opciones en estos casos.

El diclazuril se presenta como una alternativa para equinos en los que ha fallado la terapia tradicional o en aquellos en los que aparecen complicaciones⁷². Esta droga tiene muy buena eficacia *in vitro* y actividad anti-*S. neurona* en ratones inoculados con dosis letales. Aparentemente sería muy efectiva para los estadíos de división iniciales de los protozoos^{73, 74}.

El toltrazuril y su metabolito el ponazuril también tienen una potencial utilidad en el tratamiento de EPM, ambas tienen

buen absorción oral y solubilidad, logrando niveles importantes dentro del LCR⁷⁵. Durante los últimos años han sido muy utilizadas con buenos resultados y sin registrar efectos secundarios⁷⁶⁻⁷⁹.

La aplicación de corticoides debe restringirse solo a casos graves para reducir la inflamación inicial, y solamente en una o dos dosis; tratamientos más prolongados pueden conducir a un agravamiento del cuadro.

8. Control

Hasta el momento no se dispone de una vacuna efectiva para el control de la EPM. Se ha postulado que los anticuerpos contra las proteínas de membrana Sn14 y Sn16 (14 y 16 Kd) podrían inhibir la penetración de *S. neurona* en células de cultivo³⁸. La inoculación de formulaciones comerciales conteniendo merozoitos inactivados de *S. neurona*, desencadena una respuesta detectable de IgG, aunque la carencia de modelos experimentales equinos de infección hace difícil evaluar la posible prevención ante el desafío⁸⁰. Sumado a esto último, no existe una prueba serológica que permita diferenciar los animales vacunados de los expuestos naturalmente⁸¹. Un estudio reciente postula que la proteína recombinante SnSAG1 podría inducir anticuerpos que inhiben el desarrollo de los merozoitos de *S. neurona* *in vitro* y disminuiría la aparición de signos clínicos en equinos vacunados⁴³.

La obtención de nuevos aislamientos, sobre todo en Argentina, permitirá hacer estudios sobre la respuesta inmune y el desarrollo de posibles estrategias de control aplicables en nuestro medio, considerando la supuesta variabilidad molecular y antigénica entre los aislamientos.

Agradecimientos

En esta oportunidad deseo agradecer a la Dra. Cecilia Venturini y a todo el grupo de trabajo del Laboratorio de Inmunoparasitología, FCV-UNLP, por brindarme cada día un medio ambiente de trabajo afectuoso y agradable.

Bibliografía

1. Marsh AE, Barr BC, Packham AE, Conrad PA. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: *Sarcocystidae*). J Parasitol 1998; 84(5):983-91.
2. Dubey JP, Lindsay DS, Saville WJ, Reed SM, Granstrom DE, Speer CA. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). Vet Parasitol 2001; 95(2-4):89-131.
3. Mansfield LS, Mehler S, Nelson K, Elsheikha HM, Murphy AJ, Knust B, et al. Brown-headed cowbirds (*Molothrus ater*) harbor *Sarcocystis neurona* and act as intermediate hosts. Vet Parasitol 2008; 153(1-2):24-43.
4. Miller MA, Barr BC, Nordhausen R, James ER, Magargal SL, Murray M, et al. Ultrastructural and molecular confirmation of the development of *Sarcocystis neurona* tissue cysts in the central nervous system of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). Int J Parasitol 2009; 39(12):1363-72.
5. Dame JB, MacKay RJ, Yowell CA, Cutler TJ, Marsh A, Greiner EC. *Sarcocystis falcatula* from passerine and psittacine birds: synonymy with *Sarcocystis neurona*, agent of equine protozoal myeloencephalitis. J Parasitol 1995; 81(6):930-5.
6. Dubey JP, Lindsay DS. Isolation in immunodeficient mice of *Sarcocystis neurona* from opossum (*Didelphis virginiana*) faeces, and its differentiation from *Sarcocystis falcatula*. Int J Parasitol 1998; 28(12):1823-8.
7. Marsh AE, Barr BC, Tell L, Koski M, Greiner E, Dame J, et al. In vitro cultivation and experimental inoculation of *Sarcocystis falcatula* and *Sarcocystis neurona* merozoites into budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). J Parasitol 1997; 83(6):1189-92.
8. Marsh AE, Barr BC, Lakritz J, Nordhausen R, Madigan JE, Conrad PA. Experimental infection of nude mice as a model for *Sarcocystis neurona*-associated encephalitis. Parasitol Res 1997; 83(7):706-11.
9. Dubey JP, Venturini L, Venturini C, Basso W, Unzaga J. Isolation of *Sarcocystis falcatula* from the South American opossum (*Didelphis albiventris*) from Argentina. Vet Parasitol 1999; 86(4):239-44.
10. Mullaney T, Murphy AJ, Kiupel M, Bell JA, Rossano MG, Mansfield LS. Evidence to support horses as natural intermediate hosts for *Sarcocystis neurona*. Vet Parasitol 2005; 133(1):27-36.
11. Cheadle MA, Lindsay DS, Rowe S, Dykstra CC, Williams MA, Spencer JA, et al. Prevalence of antibodies to *Neospora* sp. in horses from Alabama and characterisation of an isolate recovered from a naturally infected horse [corrected]. Int J Parasitol 1999; 29(10):1537-43.
12. Hamir AN, Tornquist SJ, Gerros TC, Topper MJ, Dubey JP. *Neospora caninum*-associated equine protozoal myeloencephalitis. Vet Parasitol 1998; 79(4):269-74.
13. Marsh AE, Barr BC, Madigan J, Lakritz J, Nordhausen R, Conrad PA. Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. J Am Vet Med Assoc 1996; 209(11):1907-13.
14. Moré G, Basso W, Bacigalupe D, Venturini MC, Venturini L. Diagnosis of *Sarcocystis cruzi*, *Neospora caninum*, and *Toxoplasma gondii* infections in cattle. Parasitol Res 2008; 102(4):671-5.
15. Dubey JP. A review of *Sarcocystis* of domestic animals and of other coccidia of cats and dogs. J Am Vet Med Assoc 1976; 169(10):1061-78.
16. Simpson CF, Mayhew IG. Evidence for *Sarcocystis* as the etiologic agent of equine protozoal myeloencephalitis. J Protozool 1980; 27(3):288-92.
17. Davis SW, Daft BN, Dubey JP. *Sarcocystis neurona* cultured in vitro from a horse with equine protozoal myelitis. Equine Vet J 1991; 23(4):315-7.
18. Dubey JP, Davis SW, Speer CA, Bowman DD, de Lahunta A, Granstrom DE, et al. *Sarcocystis neurona* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa), the etiologic agent of equine protozoal myeloencephalitis. J Parasitol 1991; 77(2):212-8.
19. Mansfield LS, Schott HC, 2nd, Murphy AJ, Rossano MG, Tanhauser SM, Patterson JS, et al. Comparison of *Sarcocystis neurona* isolates derived from horse neural tissue. Vet Parasitol 2001; 95(2-4):167-78.
20. Murphy AJ, Mansfield LS. Simplified technique for isolation, excystation, and culture of *Sarcocystis* species from opossums. J Parasitol 1999; 85(5):979-81.
21. Lindsay DS, Thomas NJ, Dubey JP. Biological characterisation of *Sarcocystis neurona* isolated from a Southern sea otter (*Enhydra lutris nereis*). Int J Parasitol 2000; 30(5):617-24.
22. Miller MA, Crosbie PR, Sverlow K, Hanni K, Barr BC, Kock N, et al. Isolation and characterization of *Sarcocystis* from brain tissue of a free-living southern sea otter (*Enhydra lutris nereis*) with fatal meningoencephalitis. Parasitol Res 2001; 87(3):252-7.
23. Cutler TJ, MacKay RJ, Ginn PE, Gillis K, Tanhauser SM, LeRay EV, et al. Immunoconversion against *Sarcocystis neurona* in normal and dexamethasone-treated horses challenged with *S. neurona* sporocysts. Vet Parasitol 2001; 95(2-4):197-210.
24. Fenger CK, Granstrom DE, Gajadhar AA, Williams NM, McCrillis SA, Stamper S, et al. Experimental induction of equine protozoal myeloencephalitis in horses using *Sarcocystis* sp. sporocysts from the opossum (*Didelphis virginiana*). Vet Parasitol 1997; 68(3):199-213.
25. Saville WJ, Stich RW, Reed SM, Njoku CJ, Oglesbee MJ, Wunschmann A, et al. Utilization of stress in the development of an equine model for equine protozoal myeloencephalitis. Vet Parasitol 2001; 95(2-4):211-22.
26. Lindsay DS, Dykstra CC, Williams A, Spencer JA, Lenz SD, Palma K, et al. Inoculation of *Sarcocystis neurona* merozoites into the central nervous system of horses. Vet Parasitol 2000; 92(2):157-63.
27. Lindsay DS, Mitchell SM, Yang J, Dubey JP, Gogal RM, Jr., Witonsky SG. Penetration of equine leukocytes by merozoites of *Sarcocystis neurona*. Vet Parasitol 2006; 138(3-4):371-6.
28. Yang J, Ellison S, Gogal R, Norton H, Lindsay DS, Andrews F, et al. Immune response to *Sarcocystis neurona* infection in naturally infected horses with equine protozoal myeloencephalitis. Vet Parasitol 2006; 138(3-4):200-10.
29. Pusterla N, Wilson WD, Conrad PA, Barr BC, Ferraro GL, Daft BM, et al. Cytokine gene signatures in neural tissue of horses with equine protozoal myeloencephalitis or equine herpes type 1 myeloencephalopathy. Vet Rec 2006; 159(11):341-6.
30. Finno CJ, Packham AE, David Wilson W, Gardner IA, Conrad PA, Pusterla N. Effects of blood contamination of cerebrospinal fluid on results of indirect fluorescent antibody tests for detection of antibodies against *Sarcocystis neurona* and *Neospora hughesi*. J Vet Diagn Invest 2007; 19(3):286-9.
31. Gupta GD, Lakritz J, Kim JH, Kim DY, Kim JK, Marsh AE. Seroprevalence of *Neospora*, *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from Jeju island, South Korea. Vet Parasitol 2002; 106(3):193-201.
32. Vardeleon D, Marsh AE, Thorne JG, Loch W, Young R, Johnson PJ. Prevalence of *Neospora hughesi* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from various geographical locations. Vet Parasitol 2001; 95(2-4):273-82.

33. Duarte PC, Ebel ED, Traub-Dargatz J, Wilson WD, Conrad PA, Gardner IA. Indirect fluorescent antibody testing of cerebrospinal fluid for diagnosis of equine protozoal myeloencephalitis. *Am J Vet Res* 2006; 67(5):869-76.
34. Duarte PC, Daft BM, Conrad PA, Packham AE, Saville WJ, MacKay RJ, et al. Evaluation and comparison of an indirect fluorescent antibody test for detection of antibodies to *Sarcocystis neurona*, using serum and cerebrospinal fluid of naturally and experimentally infected, and vaccinated horses. *J Parasitol* 2004; 90(2):379-86.
35. Duarte PC, Daft BM, Conrad PA, Packham AE, Gardner IA. Comparison of a serum indirect fluorescent antibody test with two Western blot tests for the diagnosis of equine protozoal myeloencephalitis. *J Vet Diagn Invest* 2003; 15(1):8-13.
36. Johnson AL, Burton AJ, Sweeney RW. Utility of 2 immunological tests for antemortem diagnosis of equine protozoal myeloencephalitis (*Sarcocystis neurona* Infection) in naturally occurring cases. *J Vet Intern Med*; 24(5):1184-9.
37. Granstrom DE, Dubey JP, Davis SW, Fayer R, Fox JC, Poona-cha KB, et al. Equine protozoal myeloencephalitis: antigen analysis of cultured *Sarcocystis neurona* merozoites. *J Vet Diagn Invest* 1993; 5(1):88-90.
38. Liang FT, Granstrom DE, Zhao XM, Timoney JF. Evidence that surface proteins Sn14 and Sn16 of *Sarcocystis neurona* merozoites are involved in infection and immunity. *Infect Immun* 1998; 66(5):1834-8.
39. Dubey JP, Kerber CE, Granstrom DE. Serologic prevalence of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in horses in Brazil. *J Am Vet Med Assoc* 1999; 215(7):970-2.
40. Rossano MG, Mansfield LS, Kaneene JB, Murphy AJ, Brown CM, Schott HC, 2nd, et al. Improvement of western blot test specificity for detecting equine serum antibodies to *Sarcocystis neurona*. *J Vet Diagn Invest* 2000; 12(1):28-32.
41. Rossano MG, Kaneene JB, Schott HC, 2nd, Sheline KD, Mansfield LS. Assessing the agreement of Western blot test results for paired serum and cerebrospinal fluid samples from horses tested for antibodies to *Sarcocystis neurona*. *Vet Parasitol* 2003; 115(3):233-8.
42. Spencer JA, Ellison SE, Guarino AJ, Blagburn BL. Cell-mediated immune responses in horses with equine protozoal myeloencephalitis. *J Parasitol* 2004; 90(2):428-30.
43. Ellison S, Witonsky S. Evidence that antibodies against recombinant SnSAG1 of *Sarcocystis neurona* merozoites are involved in infection and immunity in equine protozoal myeloencephalitis. *Can J Vet Res* 2009; 73(3):176-83.
44. Murphy JE, Marsh AE, Reed SM, Meadows C, Bolten K, Saville WJ. Development and evaluation of a *Sarcocystis neurona*-specific IgM capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J Vet Intern Med* 2006; 20(2):322-8.
45. Hoane JS, Morrow JK, Saville WJ, Dubey JP, Granstrom DE, Howe DK. Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of equine antibodies specific to *Sarcocystis neurona* surface antigens. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12(9):1050-6.
46. Yeargan MR, Howe DK. Improved detection of equine antibodies against *Sarcocystis neurona* using polyvalent ELISAs based on the parasite SnSAG surface antigens. *Vet Parasitol* 2011; 176(1):16-22.
47. Dangoudoubiyam S, Oliveira J, Viquez C, Gomez-Garcia A, Gonzalez O, Romero J, et al. Detection Of Antibodies Against *Sarcocystis neurona*, *Neospora* spp., and *Toxoplasma gondii* In Horses From Costa Rica. *J Parasitol* 2011; 97(3):522-4.
48. Crowdus CA, Marsh AE, Saville WJ, Lindsay DS, Dubey JP, Granstrom DE, et al. SnSAG5 is an alternative surface antigen of *Sarcocystis neurona* strains that is mutually exclusive to SnSAG1. *Vet Parasitol* 2008; 158(1-2):36-43.
49. Howe DK, Gaji RY, Marsh AE, Patil BA, Saville WJ, Lindsay DS, et al. Strains of *Sarcocystis neurona* exhibit differences in their surface antigens, including the absence of the major surface antigen SnSAG1. *Int J Parasitol* 2008; 38(6):623-31.
50. Lindsay DS, Dubey JP. Direct agglutination test for the detection of antibodies to *Sarcocystis neurona* in experimentally infected animals. *Vet Parasitol* 2001; 95(2-4):179-86.
51. Witonsky SG, Gogal RM, Jr., Duncan RB, Lindsay DS. Protective immune response to experimental infection with *Sarcocystis neurona* in 57BL/6 mice. *J Parasitol* 2003; 89(5):924-31.
52. Mitchell SM, Richardson DJ, Cheadle MA, Zajac AM, Lindsay DS. Prevalence of agglutinating antibodies to *Sarcocystis neurona* in skunks (*Mephitis mephitis*), raccoons (*Procyon lotor*), and opossums (*Didelphis virginiana*) from Connecticut. *J Parasitol* 2002; 88(5):1027-9.
53. Dubey JP, Lindsay DS, Saville WJ. Serologic responses of cats against experimental *Sarcocystis neurona* infections. *Vet Parasitol* 2002; 107(3):265-9.
54. Dubey JP, Lindsay DS, Hill D, Romand S, Thulliez P, Kwok OC, et al. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Sarcocystis neurona* in sera of domestic cats from Brazil. *J Parasitol* 2002; 88(6):1251-2.
55. Lindsay DS, Rosypal AC, Spencer JA, Cheadle MA, Zajac AM, Rupprecht C, et al. Prevalence of agglutinating antibodies to *Sarcocystis neurona* in raccoons, *Procyon lotor*, from the United States. *Vet Parasitol* 2001; 100(3-4):131-4.
56. Hancock K, Zajac AM, Elvinger F, Lindsay DS. Prevalence of agglutinating antibodies to *Sarcocystis neurona* in raccoons (*Procyon lotor*) from an urban area of Virginia. *J Parasitol* 2004; 90(4):881-2.
57. Marsh AE, Barr BC, Madigan J, Lakritz J, Conrad PA. Sequence analysis and polymerase chain reaction amplification of small subunit ribosomal DNA from *Sarcocystis neurona*. *Am J Vet Res* 1996; 57(7):975-81.
58. Elsheikha HM, Mansfield LS. Molecular typing of *Sarcocystis neurona*: current status and future trends. *Vet Parasitol* 2007; 149(1-2):43-55.
59. Tanhauser SM, Yowell CA, Cutler TJ, Greiner EC, MacKay RJ, Dame JB. Multiple DNA markers differentiate *Sarcocystis neurona* and *Sarcocystis falciparum*. *J Parasitol* 1999; 85(2):221-8.
60. Jenkins MC, Ellis JT, Liddell S, Ryce C, Munday BL, Morrison DA, et al. The relationship of *Hammondia hammondi* and *Sarcocystis mucosa* to other heteroxenous cyst-forming coccidia as inferred by phylogenetic analysis of the 18S SSU ribosomal DNA sequence. *Parasitology* 1999; 119 (Pt 2):135-42.
61. Elsheikha HM, Murphy AJ, Trembley SJ, Mansfield LS, Ghanam MS, el-Garhy MF. Molecular and microscopic techniques for detection of *Sarcocystis neurona* sporocysts in fecal samples. *J Egypt Soc Parasitol* 2006; 36(2):713-25.
62. Elsheikha HM, Murphy AJ, Mansfield LS. Phylogenetic congruence of *Sarcocystis neurona* Dubey et al., 1991 (Apicomplexa: Sarcocystidae) in the United States based on sequence analysis and restriction fragment length polymorphism (RFLP). *Syst Parasitol* 2005; 61(3):191-202.
63. Dubey JP, Davis GW, Koestner A, Kiryu K. Equine encephalomyelitis due to a protozoan parasite resembling *Toxoplasma gondii*. *J Am Vet Med Assoc* 1974; 165(3):249-55.
64. Beech J, Dodd DC. *Toxoplasma*-like encephalomyelitis in the horse. *Vet Pathol* 1974; 11(1):87-96.
65. Hamir AN, Moser G, Galligan DT, Davis SW, Granstrom DE, Dubey JP. Immunohistochemical study to demonstrate *Sarcocystis neurona* in equine protozoal myeloencephalitis. *J Vet Diagn Invest* 1993; 5(3):418-22.

66. Moré G, Monina M, Idiart J, Venturini MC, Girotti G, Venturini L. Mielencefalitis equina por protozoos (EPM). Primera descripción de un caso en la República Argentina. In: XVII Reunión Científica Técnica de la AAVLD; 2008; Santa Fe, Argentina; 2008. p. P 6.
67. Masri MD, Alda JL, Dubey JP. *Sarcocystis neurona*-associated ataxia in horses in Brazil. *Vet Parasitol* 1992; 44(3-4):311-4.
68. Hoane JS, Gennari SM, Dubey JP, Ribeiro MG, Borges AS, Yai LE, et al. Prevalence of *Sarcocystis neurona* and *Neospora* spp. infection in horses from Brazil based on presence of serum antibodies to parasite surface antigen. *Vet Parasitol* 2006; 136(2):155-9.
69. Pronost S, Pitel PH, Romand S, Thulliez P, Collobert-Laugier C, Fortier G. *Neospora caninum*: première mise en évidence en France sure un avorton équin analyse et perspectives. *Pract Vet Equine* 1999; 31:111-114.
70. Beech J. Equine protozoan encephalomyelitis. *Vet Med Small Anim Clin* 1974; 69(12):1564-6.
71. Mayhew IG, de Lahunta A, Whitlock RH, Pollock RVH. Equine protozoal myeloencephalitis. In: 22nd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners; 1976; Dallas, Texas; 1976. p. 107-114.
72. Dirikolu L, Lehner F, Nattrass C, Bentz BG, Woods WE, Carter WG, et al. Diclazuril in the horse: its identification and detection and preliminary pharmacokinetics. *J Vet Pharmacol Ther* 1999; 22(6):374-9.
73. Dubey JP, Fritz D, Lindsay DS, Shen SK, Kwok OC, Thompson KC. Diclazuril preventive therapy of gamma interferon knockout mice fed *Sarcocystis neurona* sporocysts. *Vet Parasitol* 2001; 94(4):257-64.
74. Lindsay DS, Dubey JP. Determination of the activity of diclazuril against *Sarcocystis neurona* and *Sarcocystis falcatula* in cell cultures. *J Parasitol* 2000; 86(1):164-6.
75. Furr MO, Quance J, Kennedy T. A 10-day toxicity study of toltrazuril 5% suspension in the horse. *Vet Ther* 2000; 1(4):245-51.
76. Furr M, McKenzie H, Saville WJ, Dubey JP, Reed SM, Davis W. Prophylactic administration of ponazuril reduces clinical signs and delays seroconversion in horses challenged with *Sarcocystis neurona*. *J Parasitol* 2006; 92(3):637-43.
77. Franklin RP, MacKay RJ, Gillis KD, Tanhauser SM, Ginn PE, Kennedy TJ. Effect of a single dose of ponazuril on neural infection and clinical disease in *Sarcocystis neurona*-challenged interferon-gamma knockout mice. *Vet Parasitol* 2003; 114(2):123-30.
78. Kennedy T, Campbell J, Selzer V. Safety of ponazuril 15% oral paste in horses. *Vet Ther* 2001; 2(3):223-31.
79. Lindsay DS, Dubey JP, Kennedy TJ. Determination of the activity of ponazuril against *Sarcocystis neurona* in cell cultures. *Vet Parasitol* 2000; 92(2):165-9.
80. Marsh AE, Lakritz J, Johnson PJ, Miller MA, Chiang YW, Chu HJ. Evaluation of immune responses in horses immunized using a killed *Sarcocystis neurona* vaccine. *Vet Ther* 2004; 5(1):34-42.
81. Witonsky S, Morrow JK, Leger C, Dascanio J, Buechner-Maxwell V, Palmer W, et al. *Sarcocystis neurona*-specific immunoglobulin G in the serum and cerebrospinal fluid of horses administered *S. neurona* vaccine. *J Vet Intern Med* 2004; 18(1):98-103.
82. Rooney JR, Prickett ME, Delaney FM, Crowe MW. Focal myelitis-encephalitis in horses. *Cornell Vet* 1970; 60(3):494-501.
83. Cusick PK, Sells DM, Hamilton DP, Hardenbrook HJ. Toxoplasmosis in two horses. *J Am Vet Med Assoc* 1974; 164(1):77-80.
84. Davis SW, Speer CA, Dubey JP. In vitro cultivation of *Sarcocystis neurona* from the spinal cord of a horse with equine protozoal myelitis. *J Parasitol* 1991; 77(5):789-92.
85. Granstrom DE, MacPherson JM, Gajadhar AA, Dubey JP, Tramontin R, Stamper S. Differentiation of *Sarcocystis neurona* from eight related coccidia by random amplified polymorphic DNA assay. *Mol Cell Probes* 1994; 8(5):353-6.
86. Fenger CK, Granstrom DE, Langemeier JL, Gajadhar A, Cothran G, Tramontin RR, et al. Phylogenetic relationship of *Sarcocystis neurona* to other members of the family Sarcocystidae based on small subunit ribosomal RNA gene sequence. *J Parasitol* 1994; 80(6):966-75.
87. Fenger CK, Granstrom DE, Langemeier JL, Stamper S, Donahue JM, Patterson JS, et al. Identification of opossums (*Didelphis virginiana*) as the putative definitive host of *Sarcocystis neurona*. *J Parasitol* 1995; 81(6):916-9.
88. Lindsay DS, Dubey JP. Determination of the activity of pyrimethamine, trimethoprim, sulfonamides, and combinations of pyrimethamine and sulfonamides against *Sarcocystis neurona* in cell cultures. *Vet Parasitol* 1999; 82(3):205-10.
89. Dubey JP, Lindsay DS, Kerber CE, Kasai N, Pena HF, Gennari SM, et al. First isolation of *Sarcocystis neurona* from the South American opossum, *Didelphis albiventris*, from Brazil. *Vet Parasitol* 2001; 95(2-4):295-304.
90. Dubey JP, Saville WJ, Lindsay DS, Stich RW, Stanek JF, Speert CA, et al. Completion of the life cycle of *Sarcocystis neurona*. *J Parasitol* 2000; 86(6):1276-80.