

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de Tesis realizado como requisito para obtener el título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

TÍTULO DEL TRABAJO: Posibles hospedadores definitivos de *Neospora caninum*

AUTOR: Walter Ubaldo Basso

DIRECTOR: Lucila Venturini

LUGAR DE TRABAJO: Laboratorio de Inmunoparasitología, Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

MIEMBROS DEL JURADO:

Titulares: Cecilia Di Lorenzo

Pedro Steffan

Ricardo Moriena

Suplente: Jorge Romero

2003

INDICE

AGRADECIMIENTOS	4
CITAS BIBLIOGRÁFICAS CORRESPONDIENTES A PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS	5
INDICE DE ABREVIATURAS	6
TÍTULO	7
PALABRAS CLAVE	7
RESUMEN	7
TITLE	8
KEY WORDS	8
ABSTRACT	8
1 INTRODUCCIÓN	10
1.1 Fundamentos de la elección y antecedentes del tema	10
1.2 Los coccidios	13
1.2.1 Ubicación taxonómica de los coccidios de interés en medicina veterinaria y de <i>Neospora caninum</i>	13
1.2.2 Características generales de los coccidios	14
1.2.3 Ciclo biológico de los coccidios	15
1.2.4 Principales especies de coccidios que afectan al perro	16
1.3 <i>Neospora caninum</i>	22
1.3.1 Descubrimiento de <i>Neospora caninum</i>	22
1.3.2 Estructura y biología de <i>Neospora caninum</i>	24
1.3.3 Neosporosis en bovinos	29
1.3.4 Neosporosis bovina en Argentina	32
1.3.5 Importancia económica	34
1.3.6 Neosporosis en ovinos y cabras	35
1.3.7 Neosporosis en caninos	36
1.3.8 Neosporosis canina en Argentina	38
1.4 Objetivos	39
1.4.1 Objetivo general	39
1.4.2 Objetivos particulares	40
2 MATERIALES Y MÉTODOS	41
2.1 Obtención de ooquistes y registro de datos	41
2.2 Esporulación de ooquistes	42
2.3 Reconocimiento de ooquistes mediante un suero hiperinmune para <i>Neospora caninum</i> por medio de la técnica de IFI	43
2.4 Inoculación de ooquistes de coccidios hallados en heces de perro en ratones Balb-c (<i>Mus musculus</i>), meriones (<i>Meriones unguiculatus</i>) y cobayos (<i>Cavia porcellus</i>)	46
2.4.1 Inoculación de ooquistes tipo <i>Isospora canis</i> , <i>Isospora complejo ohioensis</i> , y <i>Hammondia heydorni</i> en ratones Balb-c y detección de anticuerpos para <i>N. caninum</i>	46
2.4.2 Inoculación de ooquistes tipo <i>Hammondia heydorni</i> en ratones Balb-c inmunodeprimidos y detección de anticuerpos para <i>Neospora caninum</i>	48
2.4.3 Inoculación de ooquistes tipo <i>Hammondia heydorni</i> en meriones (<i>Meriones unguiculatus</i>) y detección de anticuerpos para <i>Neospora caninum</i>	50
2.4.4 Detección de anticuerpos para <i>N. caninum</i> en perros que eliminaron ooquistes tipo <i>Hammondia heydorni</i>	53
2.4.5 Procesamiento de meriones serológicamente positivos a <i>N. caninum</i>	56
2.4.6 Inoculación de ooquistes tipo <i>Hammondia heydorni</i> en cobayos (<i>Cavia porcellus</i>) y detección de anticuerpos para <i>Neospora caninum</i>	60
2.5 Aplicación de técnicas de PCR para la identificación de ooquistes de <i>N. caninum</i> y confirmación de la infección en meriones y cultivos celulares	62
2.6 Detección de ooquistes en materia fecal y anticuerpos para <i>N. caninum</i> en perros alimentados con tejidos de animales infectados experimentalmente con <i>N. caninum</i>	62

2.7 Determinación de la prevalencia serológica para <i>Neospora caninum</i> en perros de áreas rurales y urbanas de Argentina.....	64
3 RESULTADOS.....	65
3.1 Distribución de tipos de ooquistes de coccidios hallados en heces de caninos	65
3.2. Reconocimiento de ooquistes de coccidios de heces caninas mediante un suero hiperinmune para <i>Neospora caninum</i>	66
3.3 Inoculación de ooquistes de coccidios hallados en heces de perros en ratones Balb-c (<i>Mus musculus</i>), meriones (<i>Meriones unguiculatus</i>) y cobayos (<i>Cavia porcellus</i>)	67
3.3.1 Inoculación de ooquistes tipo <i>Isospora canis</i> , <i>Isospora</i> complejo <i>ohioensis</i> y <i>Hammondia heydorni</i> en ratones Balb-c y detección de anticuerpos para <i>N. caninum</i>	67
3.3.2 Inoculación de ooquistes tipo <i>Hammondia heydorni</i> en ratones Balb-c inmunodeprimidos y detección de anticuerpos para <i>N. caninum</i>	67
3.3.3. Inoculación de ooquistes tipo <i>Hammondia heydorni</i> en meriones y detección de anticuerpos para <i>N. caninum</i>	67
3.3.4 Detección de anticuerpos para <i>N. caninum</i> en perros que eliminaron ooquistes tipo <i>Hammondia heydorni</i>	70
3.3.5 Procesamiento de meriones serológicamente positivos a <i>N. caninum</i>	70
3.3.6 Inoculación de ooquistes tipo <i>Hammondia heydorni</i> en cobayos y detección de anticuerpos para <i>N. caninum</i>	72
3.4 Identificación de ooquistes de <i>Neospora caninum</i> y diagnóstico de infección en meriones y cultivos celulares mediante técnicas de PCR.....	72
3.5 Detección de ooquistes en materia fecal y anticuerpos para <i>N. caninum</i> en perros alimentados con tejidos de animales infectados experimentalmente con <i>N. caninum</i>	73
3.6 Determinación de la prevalencia serológica para <i>N. caninum</i> en perros de áreas rurales y urbanas de Argentina.....	73
4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	74
5 BIBLIOGRAFÍA	80
6 PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS	94
7 ANEXO.....	123

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos aquellos que de una u otra manera colaboraron con el desarrollo de este trabajo de tesis.

A todo el personal docente y no docente de la Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, del Laboratorio de Inmunoparasitología y de la Cátedra de Anatomía y Fisiología Patológicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, al Laboratorio de Enfermedades Parasitarias Animales del USDA Beltsville, Maryland, EE.UU. y al Instituto de Parasitología y Zootología de la Universidad de Medicina Veterinaria de Viena, Austria.

En especial a la Dra. Lucila Venturini por haberme guiado con tanta paciencia en la investigación, aconsejándome, alentándome y brindándome su permanente estímulo y experiencia.

A la Dra. Cecilia Venturini por su gran ayuda en la redacción y corrección del manuscrito y el asesoramiento en los aspectos inmunológicos del trabajo, al Dr. Julio Idiart y Mariana Machuca por la realización de los estudios histopatológicos, al Dr. J. P. Dubey por su constante asesoramiento científico, a la Dra. Renate Edelhofer, Roman Peschke y Dr. Heinrich Prosl por haber confiado en mí, brindándome todo su apoyo y amistad, a José Luis Borén, Diana Bacigalupe, Alejandra Larsen, Juan M. Unzaga e Isidoro Ercoli por su afectuosa y constante colaboración, a Nilda Radman y Diego Eiras por haberme ayudado a conseguir las muestras utilizadas, a Guillermo Balestieri y a Walter Galván por haberme ayudado tanto en la veterinaria, a mi familia Irene, Brai, Tini, mamá y abuela Augusta por haberme comprendido y perdonado todo el tiempo que no les dediqué. Todas las palabras pueden ser pocas para expresar mi agradecimiento a cada uno de los que estuvieron a mi lado.

Muchas gracias.

Walter U. Basso.

**CITAS BIBLIOGRÁFICAS CORRESPONDIENTES A PUBLICACIONES PARCIALES
DEL TRABAJO DE TESIS**

1- “Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef-cattle farms, dairy farms and from urban areas of Argentina”

Basso, W.; Venturini, L.; Venturini, M. C.; Moore, P.; Rambeaud, M.; Unzaga, J. M.; Campero, C. y Dubey, J. P.

Publicado en: Journal of Parasitology 87 (4) 2001, p. 906-907.

2-“First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog”

Basso, W.; Venturini, L.; Venturini, M. C.; Hill, D. E.; Kwok, O. C. H.; Shen, S. K.. y Dubey, J. P.

Publicado en: Journal of Parasitology 87 (3) 2001, p. 612-618.

INDICE DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico
AT: técnica de aglutinación
cm: centímetro
col. : colaboradores
c.s.p.: cantidad suficiente para
dpi: días post infección
EDTA: ácido etilén-diamino-tetraacético
EE.UU.: Estados Unidos
F.C.V.: Facultad de Ciencias Veterinarias
fig.: figura
g: gramo
HD: hospedador definitivo
HI: hospedador intermediario
HP: hospedador paraténico
H&E: hematoxilina y eosina
IFI: inmunofluorescencia indirecta
Ig: inmunoglobulina
im: intramuscular
kg: kilogramo
K.O.: knockout, carente del gen que codifica para el interferón gamma.
l: litro
mg/kg: miligramos por kilogramo de peso
min.: minuto
ml: mililitro
ng: nanogramo
PBS: solución buffer salina de fosfatos
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
pg: picogramo
p.i.: post inoculación
P.O.: *per os*, por vía oral
p/v: peso sobre volúmen
rpm: revoluciones por minuto
sc.: subcutáneo
sin.: sinonimia
SNC: sistema nervioso central
sp.: detrás de un nombre de género indica especie perteneciente a dicho género.
spp.: plural de sp., es decir, varias especies del género.
U.N.L.P.: Universidad Nacional de La Plata
U.S.: United States
µm: micrómetro.

TÍTULO

Posibles hospedadores definitivos de *Neospora caninum*

PALABRAS CLAVE

Neospora caninum, ciclo biológico, hospedador definitivo, ooquiste, perro, merion.

RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo fue determinar si el perro es hospedador definitivo natural de *Neospora caninum*.

Se determinó la reactividad de un suero hiperinmune para *N. caninum* frente a ooquistes de coccidios de heces caninas mediante la prueba de IFI y se inocularon ratones Balb-c, meriones (*Meriones unguiculatus*) y cobayos con ooquistes tipo *Isospora canis*, *Isospora* complejo *ohioensis* y/o *Hammondia heydorni* de perros naturalmente infectados. Se realizaron estudios serológicos, parasitológicos, histopatológicos y moleculares de los mismos para demostrar la ocurrencia de infección por *N. caninum*.

Se determinó la seroprevalencia para *N. caninum* en perros de áreas urbanas y rurales en Argentina.

Se observó fluorescencia en ooquistes tipo *I. canis* e *I. ohioensis* y en ooquistes de *T. gondii* al enfrentarlos al suero hiperinmune para *N. caninum*. Esta se consideró inespecífica.

No se detectaron organismos ni anticuerpos para *N. caninum* (título IFI < 1: 25) en los ratones Balb-c ni en los cobayos inoculados con ooquistes.

Se demostró presencia de anticuerpos para *N. caninum* (AT $\geq$ 1:160) en meriones inoculados con ooquistes tipo *H. heydorni* de 3 de las 23 muestras inoculadas. Se

realizó por primera vez el aislamiento de una cepa de *N. caninum* en meriones y cultivos celulares a partir de las heces de un perro naturalmente infectado. Se demostró que los perros son hospedadores definitivos naturales de *Neospora caninum*.

Se reprodujo el ciclo de *N. caninum* en el perro utilizando meriones infectados experimentalmente como hospedadores intermediarios.

La prevalencia serológica para *N. caninum* en caninos en Argentina fue de 37,8 % (121/320). Ésta fue significativamente mayor en perros de tambos (48 %) y de establecimientos bovinos de cría (54,2 %) que en perros de áreas urbanas (26,2 %), y en perros > 12 meses (47,7 %) que en los ≤ 12 meses (12,7 %), sugiriendo exposición post natal.

TITLE

Possible definitive hosts of *Neospora caninum*

KEY WORDS

Neospora caninum, definitive host, life cycle, oocyst, dog, gerbil.

ABSTRACT

The aim of this research work was to determine if dogs are natural definitive hosts of *Neospora caninum*.

The reactivity of a *N. caninum* hiperimmune antiserum to coccidia oocysts from dog feces was determined by IFAT. Balb-c mice, gerbils (*Meriones unguiculatus*) and guinea pigs were inoculated with oocysts *Isospora canis*, *Isospora ohioensis*-complex and/or *Hammondia heydorni* type. Serological, histopathological and molecular studies were carried out to determine the occurrence of *N. caninum* infection.

The seroprevalence of *N. caninum* in dogs from urban and rural areas from Argentina was determined.

Fluorescence was observed in *I. canis* and *I. ohioensis*-complex type oocysts and in *T. gondii* oocysts when exposed to *N. caninum* hiperimmune antiserum. This fluorescence was considered not specific.

Neither parasites, nor antibodies to *N. caninum* (IFAT titer < 1:25) were detected in Balb-c mice and guinea pigs inoculated with oocysts.

Antibodies to *N. caninum* (AT titer $\geq 1:160$) were detected in gerbils inoculated with *H. heydorni*-type oocysts from 3 of 23 samples. *N. caninum* was isolated for the first time from the feces of a natural infected dog in gerbils and cell cultures. Thus, it was confirmed that dogs are natural definitive hosts of *N. caninum*.

The life cycle of *N. caninum* was reproduced in dogs fed experimentally infected gerbils as intermediate hosts.

The seroprevalence of *N. caninum* in dogs from Argentina was 37,8 % (121/320). The seroprevalence was higher in dogs from dairy farms (48 %) and beef cattle farms (54,2 %) than in dogs from urban areas (26,2 %). The seroprevalence was also higher in dogs older than 12 months of age (47,7 %) than in younger dogs (12,7 %), suggesting post natal infection.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Fundamentos de la elección y antecedentes del tema

Neospora caninum es un protozoo del phylum Apicomplexa que infecta varias especies de mamíferos domésticos y silvestres. Se confundió con *Toxoplasma gondii* hasta 1988. Produce enfermedad neuromuscular y muerte en caninos y es considerado uno de los principales causantes de abortos en bovinos en varios países del mundo **(39, 41)**.

Al inicio del presente trabajo de tesis, los únicos estados descritos de *N. caninum* eran los de taquizoítos y quistes tisulares, siendo la única forma de transmisión comprobada la transplacentaria **(24, 83, 84)**. Se desconocía la morfología de los ooquistes y el hospedador definitivo; dada su estrecha relación con *Toxoplasma gondii*, se suponía que se trataba de un carnívoro **(52)**.

Esta parasitosis estaba siendo estudiada por el grupo de trabajo del Laboratorio de Inmunoparasitología de la Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, al cual me integré para la ejecución del trabajo de tesis doctoral. Hasta ese momento no se habían realizado aislamientos del parásito en el país. Se habían detectado anticuerpos para *N. caninum* en vacas **(101)** y fetos (Venturini, comunicación personal), así como la presencia de lesiones compatibles en el cerebro de estos últimos. Los estudios preliminares indicaban que esta parasitosis tendría una gran importancia como causante de abortos en bovinos y se desconocía si poseía potencial zoonótico.

Experimentalmente se había podido inducir infección transplacentaria en primates no humanos (11).

El objetivo fundamental de este trabajo fue determinar si el perro actuaba como hospedador definitivo de *N. caninum* en la naturaleza. Debido a la amplia distribución de esta parasitosis, se postuló en primera instancia, un hospedador definitivo carnívoro que también esté ampliamente distribuido, como es el perro doméstico. Para confirmar esta hipótesis se propuso identificar los ooquistes de *Neospora caninum* en las heces del posible hospedador utilizando técnicas inmunológicas e inoculaciones experimentales. La introducción de técnicas inmunológicas para la identificación de parásitos permitió diferenciar algunas especies estrechamente relacionadas, consideradas anteriormente como una misma especie, como ocurrió con *T. gondii* y *N. caninum* (50, 68).

En los exámenes de heces realizados con fines diagnósticos, los coccidios se identifican en la mayoría de los casos sólo por las características morfológicas del ooquiste. La identificación realizada sólo por morfología, tiene limitaciones dado que distintas especies pueden producir ooquistes similares (como ocurre con *Hammondia hammondi* y *Toxoplasma gondii*); por analogía, se supuso que los ooquistes de *Neospora caninum* podrían tener las características de los de alguna de las especies de coccidios ya descritas, o bien, que se tratara de una de aquellas especies en las cuales el conocimiento de su ciclo evolutivo es incompleto (*Hammondia heydorni*, complejo *Isospora ohioensis*: *Isospora ohioensis* - *Isospora burrowsi* – *Isospora neorivolta*).

Por lo tanto el estudio se realizó utilizando ooquistes de coccidios correspondientes a los tipos morfológicos *Isospora canis* (34-40 µm), *Isospora* complejo *ohioensis* (17-27

µm) y *Hammondia heydorni* (10-13 µm) obtenidos de heces de perros infectados naturalmente.

Al inicio del presente trabajo, se propuso utilizar un suero hiperinmune para *N. caninum* para reconocer los ooquistes de heces de perro, considerando que este suero podría detectar epitopes comunes a taquizoítos y ooquistes de este parásito. En ese momento ya se conocían los epitopes inmunodominantes de los taquizoitos de *N. caninum* como un grupo de moléculas con pesos moleculares de 37, 29/30, 16/17 y 46 kDa **(12, 16)**, sin embargo, se desconocía la composición antigénica del ooquiste.

Para intentar el aislamiento de *N. caninum* se utilizaron ratones Balb-c, meriones y cobayos. Inicialmente se había comprobado que los ratones endocriados Balb-c presentaban una mayor susceptibilidad a la infección por *N. caninum* que los exocriados **(73)** y luego se determinó que los ratones inmunodeficientes podían desarrollar neosporosis severa **(48)**. Posteriormente se demostró que los meriones (*Meriones unguiculatus*) son altamente susceptibles a la infección por *N. caninum* y que constituyen un modelo animal apropiado para el estudio de esta parasitosis **(58, 53)**. Anteriormente no habían sido utilizados cobayos como modelo experimental para el aislamiento de *N. caninum*.

Para poder esclarecer algunos aspectos epidemiológicos (significado de la transmisión horizontal, posibles formas de contagio) y determinar el grado de exposición de los perros a esta parasitosis, se consideró necesario obtener datos acerca de la prevalencia de la infección por *N. caninum* en perros de distintas edades y de distintos ámbitos en nuestro medio. Para ello se evaluó serológicamente a perros de áreas urbanas y rurales, especialmente a aquellos que habitaban establecimientos de

producción bovina (establecimientos de cría y tambos), y se amplió el muestreo de materia fecal al área rural.

Con el fin de brindar una visión más actualizada de esta parasitosis, se han incluido en esta introducción datos aportados en los últimos años por numerosos grupos de investigación de todo el mundo, desconocidos al inicio del presente estudio.

1.2 Los coccidios

1.2.1 Ubicación taxonómica de los coccidios de interés en medicina veterinaria y de *Neospora caninum*

La ubicación taxonómica de *N. caninum* y de los coccidios de interés en medicina veterinaria se halla en la **tabla 1**.

Tabla 1 Ubicación taxonómica de *N. caninum* y de los coccidios de interés en medicina veterinaria. Adaptado de Levine, (1985) (65).

Reino	Protista
Subreino	Protozoa
Phylum	Apicomplexa
Clase	Sporozoea
Orden	Eucoccidiida
Suborden	Eimeriina
Familia	Género
Cryptosporidiidae	<i>Cryptosporidium</i>
Eimeriidae	<i>Eimeria, Caryospora</i>
Isosporidae	<i>Isospora, Cystoisospora, Toxoplasma, Hammondia, Besnoitia, Neospora</i>
Sarcocystidae	<i>Sarcocystis, Frenkelia</i>

Actualmente los géneros de las familias Eimeriidae, Isosporidae y Sarcocystidae están siendo estudiados filogenéticamente a nivel molecular, lo cual puede dar lugar a nuevos reordenamientos.

1.2.2 Características generales de los coccidios

Los coccidios son un grupo de protozoos parásitos ubicados taxonómicamente dentro del phylum Apicomplexa. Son parásitos intracelulares obligados que afectan principalmente a vertebrados y se propagan por medio de ooquistes.

Los ooquistes son los estados exógenos de resistencia al medio ambiente, capaces de transmitir la infección a otro hospedador susceptible, generalmente eliminados con las heces del hospedador.

Los coccidios de interés en medicina veterinaria y humana se ubican en el suborden Eimeriina (sin: Eimeriorina) dentro del orden Eucoccidiida (sin: Eucoccida). Estos parásitos tienen ciclos evolutivos complejos que comprenden las fases de esquizogonia, gametogonia y esporogonia. Algunas especies completan todo su desarrollo en un mismo hospedador, otras utilizan de forma facultativa u obligada uno o más hospedadores intermediarios, y otras han desarrollado habilidad para utilizar hospedadores paraténicos o de transporte.

1.2.3 Ciclo biológico de los coccidios

Durante su ciclo biológico, todos los coccidios conocidos atraviesan una serie de etapas que comienzan con la llegada de la forma infectante al hospedador y concluyen con la formación de ooquistes capaces de transmitir la infección a otro hospedador susceptible.

El ciclo biológico puede ser directo o indirecto.

En los coccidios de ciclo directo o monoxeno todo el desarrollo endógeno se produce en un mismo hospedador, mientras que en los de ciclo indirecto o heteroxeno, parte del desarrollo endógeno se produce en el hospedador definitivo (HD) (ciclo intestinal) y parte en el hospedador intermediario (HI) (ciclo extraintestinal).

El ciclo intestinal se cumple exclusivamente en el HD y se caracteriza por incluir la fase sexual del ciclo (gametogonia), que concluye con la formación de ooquistes. Según la especie de coccidio, estos ooquistes pueden ser eliminados en forma madura (*Sarcocystis*, *Cryptosporidium*) o inmadura (*Eimeria*, *Isospora*, *Hammondia*, *Toxoplasma*, *Neospora*) produciéndose en este caso una maduración posterior en el medio ambiente (esporogonia) que va a dar como resultado la formación de esporozoítos infectantes en su interior.

El ciclo extraintestinal se cumple en los hospedadores intermediarios y se realiza en distintas células del organismo según la especie de parásito. La reproducción durante el mismo es exclusivamente asexual, por fisión múltiple, endodiogenia o endopoligenia. Cuando el HI ingiere las formas infectantes, éstas se liberan en el intestino, lo atraviesan y se localizan en distintas células del organismo. En la mayoría de las

especies se distinguen dos etapas, una de invasión del organismo en la cual los parásitos se multiplican rápidamente (taquizoítos), y una de multiplicación más lenta en la cual las formas parasitarias se denominan bradizoítos y en la mayoría de los casos quedan contenidos dentro de quistes tisulares.

En algunos coccidios (*T. gondii*, *N. caninum*) en el HD se produce además del ciclo intestinal, un ciclo extraintestinal similar al que ocurre en el HI.

En los ciclos indirectos el cambio de hospedador puede ser obligado (*Sarcocystis*, *Hammondia*), o facultativo (*Toxoplasma*) (79, 78, 75, 104).

1.2.4 Principales especies de coccidios que afectan al perro

***Isospora* spp.:** Las especies de *Isospora* (sin. *Cystoisospora*) que afectan al perro realizan un ciclo directo con utilización de hospedadores paraténicos (HP). En el HD se cumple un ciclo intestinal con eliminación de ooquistes inmaduros con las heces, que esporulan en el medio ambiente. En algunas especies parte de la multiplicación asexual puede producirse en localizaciones extraintestinales.

Los ooquistes son redondos a ovales, con una membrana ooquistica lisa, sin micrópilo. En estado maduro presentan dos esporocistos con cuatro esporozoítos y un cuerpo residual cada uno. (fig. 1)

Cuando un HP (rumiante, roedor) ingiere ooquistes, los esporozoítos liberados en el intestino se dirigen a tejidos extraintestinales (principalmente nódulos linfáticos mesentéricos, bazo, hígado y músculo esquelético) donde se enquistan y quedan en

forma latente hasta ser ingeridos por el hospedador adecuado. Estos estados quísticos se denominan hipnozoítos (sin. cistozoítos, dormozoítos, quistes monozoicos). No se detectó multiplicación de los parásitos en estos sitios, por lo tanto se considera a estos hospedadores como HP y no como HI. Se considera que los tejidos de HP infectados no son infectantes para otros HP. No se produce enfermedad en los HP **(70, 34, 88)**.

Al llegar al intestino del hospedador, estos esporozoítos latentes se liberan y cumplen el ciclo intestinal como si fueran esporozoítos recién liberados de un ooquiste. Algunas especies de *Isospora* (*I. canis*, *I. ohioensis*) pueden formar estados extraintestinales en los HD, principalmente en nódulos linfáticos mesentéricos, bazo, hígado y nódulos mediastinales y traqueobronquiales. Estos se forman a partir de esporozoítos o merozoítos que abandonan el canal intestinal. Generalmente quedan en forma unicelular pero ocasionalmente ocurre una multiplicación asexual en estos sitios y se han visto hasta quince parásitos por célula. Las células afectadas son probablemente macrófagos. Por situaciones de stress podría haber una reactivación de estos estados extraintestinales latentes con la consecuente invasión intestinal. **(70, 66, 56)**.

Las especies de *Isospora* que afectan al perro (fig 2), sitio de multiplicación en el hospedador, tamaño de los ooquistes y prepatencia están representadas en la tabla 2 **(35, 70, 97, 55)**.

La importancia clínica de la infección por *Isospora* en caninos se encuentra en discusión debido a que si bien la presencia de ooquistes asociada a diarrea es frecuente, en general, las infecciones experimentales no se asociaron con enfermedad **(70, 66)**.

Isospora ohioensis produjo enfermedad en cachorros de 7 días infectados experimentalmente, pero no en cachorros destetados o perros jóvenes **(36)**.

Los datos acerca de la patogénesis de la infección por *I. burrowsi* e *I. neorivolta* en perros son escasos; en infecciones experimentales ninguna de estas especies causó enfermedad (55, 97).

FIGURA 1 Representación esquemática de un ooquiste no esporulado (izquierda) y esporulado (derecha) tipo *Isospora*. (88)

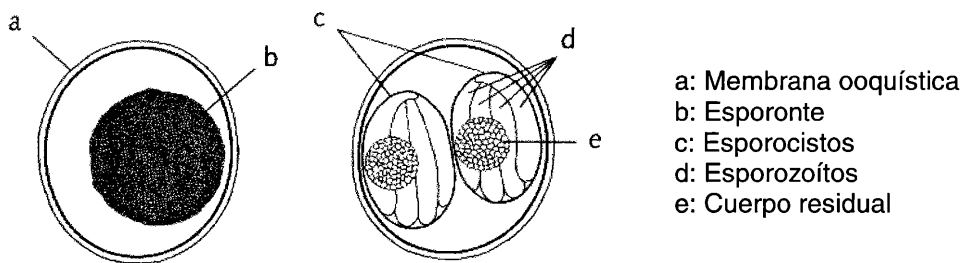
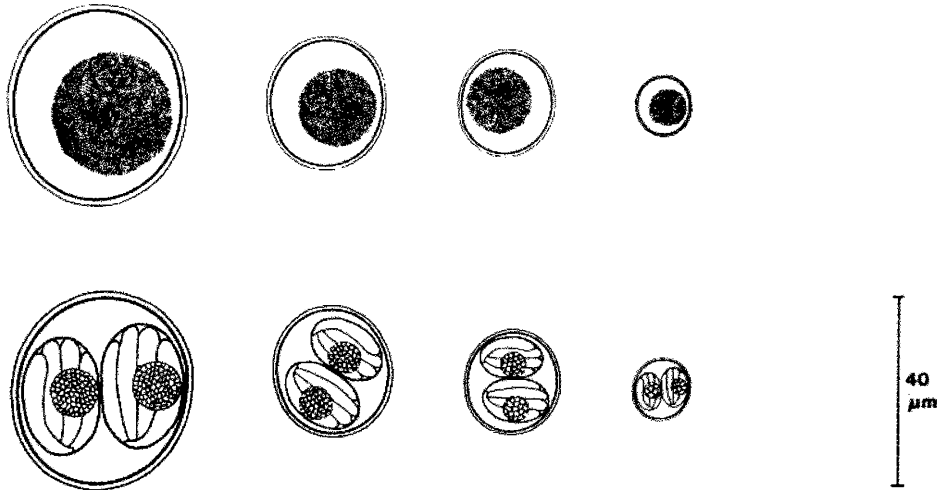


Tabla 2 Especies de *Isospora* que afectan al perro, sitio de multiplicación en el hospedador, tamaño aproximado de los ooquistes y período de prepatencia.

Especie de <i>Isospora</i>		Tamaño de los ooquistes	Localización en el hospedador	Prepatencia
<i>Isospora canis</i>		34-40 µm	células de lámina propia de intestino delgado	9 días
<i>Isospora</i> complejo <i>ohioensis</i>	<i>Isospora ohioensis</i>	17-27µm	enterocitos de intestino delgado, ciego y colon	5-6 días
	<i>Isospora burrowsi</i>		enterocitos y células de lámina propia de intestino delgado	
	<i>Isospora neorivolta</i>		células de lámina propia de intestino delgado	

FIGURA 2: Ooquistes de coccidios en heces de perro. (88)



Fila superior: heces frescas (ooquistes no esporulados). Fila inferior: heces luego de varios días en el medio ambiente (ooquistes esporulados). De izquierda a derecha: *Isospora canis*, *Isospora ohioensis*, *Isospora burrowsi*, *Hammondia heydorni*.

***Hammondia heydorni*:** Cumple un ciclo indirecto obligado. Como HD actúan el perro y cánidos silvestres (zorro, coyote) y como HI rumiantes (vaca, cabra, oveja, camello, alce, ciervo, búfalo), conejo, cobayo y también el perro si se infecta mediante la ingestión de ooquistes (105, 19, 88).

El HD se infecta al ingerir tejidos infectados de un HI (músculo esquelético y corazón, cerebro e hígado), en éste se produce un ciclo intestinal en los enterocitos del intestino delgado que culmina con la eliminación de ooquistes inmaduros tipo *Isospora* con las heces (10-14,6 (11,9) x 9,2-13,1 (11,1) µm) que esporulan en el medio ambiente en aproximadamente 3 días, y un ciclo extraintestinal que afecta músculo esquelético y

corazón. Los ooquistes son estructuralmente similares a los de *N. caninum* y *T. gondii*, pero éstos parásitos se diferencian por sus características biológicas e inmunológicas. La prepatencia es de 5 a 34 días y la patencia de 1 a 18 días. Se considera apatógeno para el HI. En el HD la patogenicidad es discutida.

En el perro no se produce eliminación de ooquistes luego de la ingestión de ooquistes esporulados, pero sí tiene lugar una infección extraintestinal en el mismo como ocurre en los HI.

El estado del parásito que se encuentra en los tejidos extraintestinales se desconoce. La presencia de éste se confirmó mediante alimentación de perros con tejidos de HI infectados (88, 19, 61).

***Toxoplasma gondii*:** Cumple un ciclo de tipo indirecto facultativo con félidos (domésticos y silvestres) como HD. Los mamíferos, incluyendo al hombre, y las aves actúan como HI. El perro cumple el rol de HI.

Luego de la ingestión de quistes tisulares se produce un ciclo intestinal en el HD (gato), con eliminación de ooquistes inmaduros con las heces (10,7- 13,9 (12,4) x 9,3-10,8 (10,5) μ m) durante 1 a 21 días, luego de una prepatencia de 3-10 días. Al mismo tiempo se produce un ciclo extraintestinal similar al que ocurre en el HI.

El HD (gato) se puede infectar también mediante la ingestión de ooquistes, en este caso se produciría en primer lugar un ciclo extraintestinal (multiplicación por endodiogenia, formación de quistes) como en los HI, y luego, en un 10-20% de los casos, algunos parásitos retornarían al intestino y realizarían un ciclo intestinal. En este caso la

prepatencia es de 18 a 36 días y el número de ooquistes excretados es generalmente menor. Otras vías de infección en el gato son la transplacentaria y la lactogénica (prepatencia 3 semanas) **(67, 88, 38)**.

Los perros pueden infectarse a partir del consumo de carne cruda (u otros tejidos) de HI infectados conteniendo quistes tisulares (o taquizoítos), por la ingestión de ooquistes, o por vía transplacentaria. Al ser ingeridos por un HI, los bradizoítos contenidos en los quistes o los esporozoítos en los ooquistes, penetran hasta la lámina propia del intestino delgado donde se transforman en taquizoítos, e invaden tejidos extraintestinales multiplicándose por endodiogenia. Durante la etapa aguda de la infección, los taquizoítos pueden invadir todos los tipos de células nucleadas, posteriormente comienza la formación de quistes tisulares, sobre todo en corazón, diafragma y SNC. Estos quistes pueden persistir durante toda la vida del hospedador. En algunos casos (por inmunodepresión) algunos de éstos quistes pueden romperse, liberándose bradizoítos que iniciarían una reagudización de la enfermedad.

A diferencia de *N. caninum*, que es un patógeno primario del perro, *T. gondii* es considerado un patógeno oportunista. La infección es generalmente subclínica pero en algunos casos se presentan signos. En la mayoría de los casos clínicos hay una enfermedad o inmunodepresión subyacente; lo más frecuente es la asociación con la infección por el virus de Distemper o con la administración de corticoides. Se presenta generalmente en perros menores de 1 año. Se distinguen las formas generalizada, neuromuscular, respiratoria, miocárdica y ocular. Por la similitud de los signos clínicos y lesiones se debe hacer el diagnóstico diferencial con la infección por *Neospora caninum* **(85, 88, 46, 38)**.

1.3 *Neospora caninum*

1.3.1 Descubrimiento de *Neospora caninum*

En 1984, Bjerkås y col. (17, 15) informaron el hallazgo de un esporozoo formador de quistes no identificado, como causante de meningoencefalitis y miositis en cachorros provenientes de 3 camadas sucesivas de una misma perra de raza Boxer en Noruega. El parásito tenía las características generales de los Apicomplexa, recordaba a *Toxoplasma* y *Besnoitia* pero presentaba diferencias ultraestructurales con respecto a éstos. La pared de los quistes observados en el encéfalo de los cachorros era más gruesa que en *T. gondii*. En los perros infectados no se hallaron anticuerpos contra *T. gondii* por la prueba de Sabin-Feldman y a diferencia de *T. gondii*, este protozoo no fue infectante para ratones. Sí lo fue para un zorro (*Alopex lagopus*) inoculado intramuscularmente (im) con cerebro canino. Por ese motivo se consideró que no se trataba de parásitos que cumplen un ciclo indirecto obligado como *Hammondia*, *Sarcocystis* o *Frenkelia*, en los cuales no ocurriría transmisión entre hospedadores intermediarios. Estudios ultraestructurales posteriores demostraron que el parásito era diferente a todos los protozoos conocidos hasta el momento (18).

En 1988, sobre la base del primer reporte de Bjerkås y col. (17), el Dr. J. P. Dubey del Beltsville Agricultural Research Center, Maryland, EE.UU. decidió hacer una evaluación retrospectiva de casos de toxoplasmosis en caninos (37). En colaboración con el Dr. Carpenter del Angell Memorial Animal Hospital (AMAH), Boston, Massachussets, EE.UU., reexaminó las historias clínicas y los cortes de tejidos de 23 perros cuya muerte había sido atribuída a toxoplasmosis durante los años 1948 a 1987, según

registros del AMAH. Basado en el grosor (1,5 a 3,5 μm) de la pared de quistes tisulares hallados en el sistema nervioso central (SNC) y en el exámen ultraestructural de parásitos en tejidos conservados en formalina o en bloques de parafina, Dubey concluyó que en 10 de los perros de los archivos de Boston había estado involucrado un protozoo diferente a *T. gondii*; junto con colaboradores describió los 10 casos y propuso incluir al parásito en un nuevo género: *Neospora*, siendo *Neospora caninum* la especie tipo (45). Ese mismo año, Dubey y col. en EE.UU., aislaron un parásito similar en cultivos celulares a partir de tejidos de cachorros de una camada con un síndrome idéntico al descrito por Bjerkås y col. en 1984. Mediante la inoculación experimental de perros con taquizoítos de cultivo, reprodujeron la enfermedad demostrando que el parásito aislado era en efecto causante de desórdenes neurológicos, paresia, parálisis, e incluso muerte en perros infectados y desarrollaron una prueba serológica para el diagnóstico de esta parasitosis. Tanto en el cerebro de los cachorros como en el de ratones inoculados con tejido nervioso de los mismos se encontraron quistes de pared gruesa similares a los hallados en el material fijado (50).

En 1989, Lindsay y Dubey desarrollaron un método inmunohistoquímico para diferenciar *N. caninum* de *T. gondii* (68).

En 1991, un estudio morfológico e inmunohistoquímico retrospectivo demostró que los parásitos descritos originalmente por Bjerkås en Noruega eran idénticos a *N. caninum*. (15).

En 1989 Thilsted y Dubey reportaron el hallazgo de organismos similares a *Neospora caninum* en tejidos de fetos bovinos abortados en Nuevo México, EE.UU., y fueron los primeros en considerar a este parásito como causa de aborto en bovinos (92).

Anderson y col. y Barr y col. en 1991 demostraron que *N. caninum* era una de las principales causas de aborto en California (1, 8). Estudios posteriores confirmaron que los aislamientos a partir de bovino y canino representaban la misma especie (62).

1.3.2 Estructura y biología de *Neospora caninum*

1.3.2.1 Morfología

Neospora caninum presenta la morfología típica de los protozoos del orden Eucoccidiida (coccidios).

Taquizoitos (fig.3): se alojan en vacuolas parasitoforas en el citoplasma de la célula hospedadora y se dividen por endodiogenia; son ovoides, semilunares o globulares y miden de 3 a 7 x 1 a 5 μm dependiendo del estado de división. Poseen una membrana, un complejo apical formado por microtúbulos subpeliculares, conoide, anillos polares anteriores y posteriores, 6 a 16 roptrias con contenido electrón-denso, y numerosos micronemas; un núcleo vesicular, nucléolo, mitocondria tubular, complejo de Golgi, ribosomas, retículo endoplásmico, microporo (en ocasiones difícil de detectar), cuerpos lipídicos, cuerpos electrón-densos y cuerpos de amilopectina. Se encuentran en grupos, parasitando células nerviosas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, miocitos, epitelio tubular renal, hepatocitos y otras células nucleadas (44).

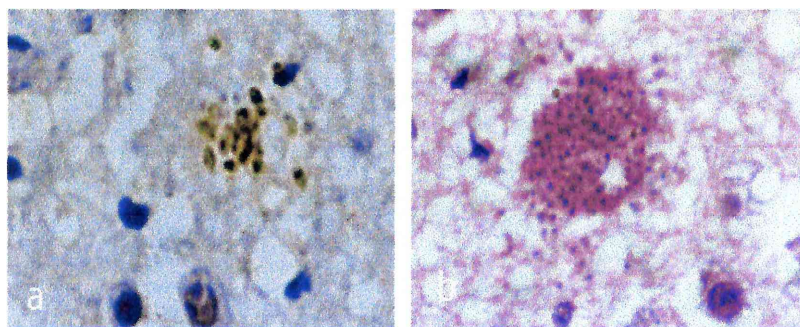


fig.3 :grupo de taquizoítos en el cerebro de un perro :(a) Inmunohistoquímica, (b) H&E

Bradizoítos: son más delgados que los taquizoítos, miden 6 a 8 x 1 a 1,8 μm y tienen las mismas organelas que los taquizoítos, menor cantidad de roptrias y más gránulos de amilopectina P.A.S. positivos; el núcleo es de localización subterminal. Están contenidos dentro de quistes tisulares (fig. 4) localizados principalmente en el tejido nervioso (cerebro, médula, nervios y retina). Estos quistes son esféricos u ovales y miden de 20 a 107 μm . Están rodeados por una pared lisa de hasta 4 μm de espesor, la cual protege a los bradizoítos de reacciones inmunológicas y fisiológicas del hospedador (60). El grosor de la pared depende, entre otros factores, de la edad del quiste (en la mayoría mide 1-2 μm) (44).

Recientemente, Peters y col. reportaron el hallazgo de quistes tisulares de pared fina (0,3-1 μm) en musculatura de perros y bovinos con infección natural por *N. caninum* (86). Anteriormente, en 1996, Lindsay y col. reportaron el hallazgo de un quiste en la

musculatura ocular de un potrillo (74). Aún no se han descrito quistes en músculo en animales infectados experimentalmente (44).

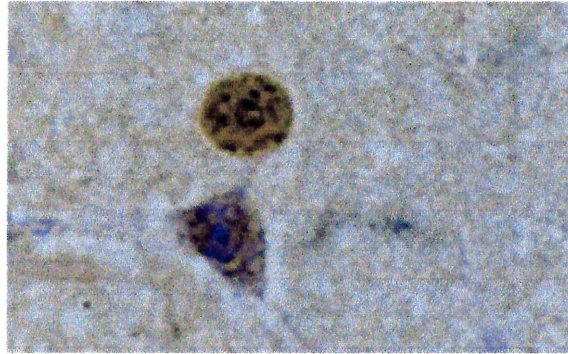


Fig 4: Quiste de *N. caninum* , en cerebro de perro,teñido por Inmunohistoquímica

Ooquistes (fig. 5): Son esféricos o subesféricos y miden 10,6-12,4 x 10,6-12 μm . Son eliminados en forma inmadura con las heces del hospedador definitivo y esporulan en el medio ambiente en 1-3 días, formándose en su interior dos esporocistos con 4 esporozoítos y un cuerpo residual cada uno. Son morfológicamente similares a los ooquistes de *Toxoplasma gondii* y *Hammondia hammondi* presentes en heces de gatos, y a los ooquistes de *Hammondia heydorni* presentes en heces de perros (71, 44).



Fig 5: ooquistes de *N. caninum*

1.3.2.2 Ciclo biológico

El ciclo evolutivo de *N. caninum* es indirecto. El perro es el único hospedador definitivo conocido (77, 71, 13), pero posee un amplio rango de hospedadores intermediarios; se encontró evidencia de infección natural en perros, bovinos, ovinos, caprinos, ciervos, búfalos, camellos, equinos, rinocerontes, coyotes, liebres, zorros, mapaches, leones y guepardos. Experimentalmente se indujo infección en ratones, ratas, perros, zorros, cabras, gatos, ovejas, coyotes, cerdos, meriones, conejos, primates no humanos y bovinos (por vía subcutánea, intraperitoneal, intramuscular y oral) (52, 42).

Tras la ingestión de tejidos infectados de un hospedador intermediario, el perro elimina ooquistes con las heces, que esporulan en el medio ambiente. Según datos experimentales la prepatencia es de 5 a 13 días y la patencia de 1 a 3 semanas, con eliminación intermitente de ooquistes en algunos casos (77, 71, 32).

En el perro se pueden cumplir tanto la fase intestinal como la extraintestinal del ciclo ya que éste puede actuar como hospedador definitivo e intermediario. Los hospedadores intermediarios se infectan por vía horizontal al ingerir estos ooquistes esporulados, produciéndose una multiplicación asexual extraintestinal, con diseminación de taquizoítos a diversos órganos y tejidos durante la fase aguda de la infección, con una subsecuente restricción a los tejidos neuromusculares en etapas posteriores de la misma. Tanto los hospedadores definitivos como los intermediarios pueden además infectarse por vía transplacentaria. La hembra infectada subclínicamente desarrollaría una parasitemia durante la preñez lo que resultaría en la infección del feto (41).

Antes de la descripción de los ooquistes de *N. caninum* en heces de perros infectados experimental y naturalmente, (77, 13) la única vía de transmisión conocida era la transplacentaria. Esta vía se considera de especial importancia en bovinos (3).

Aún se desconocen muchos aspectos del ciclo biológico de este parásito, por ejemplo, los estados enteroepiteliales en el intestino del hospedador definitivo, la frecuencia de eliminación de ooquistes y la supervivencia de éstos en el medio ambiente, si la ingestión de ooquistes esporulados puede inducir eliminación de ooquistes con las heces en perros, y si otros cánidos además de los perros pueden servir como hospedadores definitivos.

1.3.2.3 Relaciones hospedador-parásito:

N. caninum se considera un agente patógeno primario del sistema nervioso y músculoesquelético que puede afectar múltiples sistemas orgánicos. Mediante procesos repetidos de invasión, multiplicación y lisis de las células hospedadoras, se producen lesiones necróticas en los tejidos afectados. El sitio de predilección para la multiplicación primaria de los taquizoítos y para el establecimiento de los quistes tisulares es el SNC (60). Como consecuencia de la destrucción de células nerviosas en el cerebro y en los nervios craneales y espinales se produce una alteración de la conductividad nerviosa que puede desencadenar una severa enfermedad neuromuscular (52). Contrariamente a los taquizoítos, la mayoría de los quistes no están rodeados de reacción inflamatoria y aparentemente podrían persistir por años sin

causar manifestaciones clínicas significativas al hospedador, aunque en algunos casos se observaron granulomas alrededor de quistes degenerativos y de bradizoítos (52).

1.3.3 Neosporosis en bovinos

Neospora caninum puede ocasionar abortos en vacas de cualquier edad, afectando tanto a bovinos lecheros como de carne. La neosporosis es considerada una de las principales causas de aborto en vacas de tambo en varios países del mundo. Ha sido reportada en Europa, América, Asia, África y Oceanía (39, 41). El aborto puede ocurrir desde los 3 meses de gestación hasta el final de la misma, siendo mas frecuentes entre el 5° y el 6° mes. Las vacas que abortan no muestran signos generales de enfermedad (39, 41).

Neospora caninum puede inducir repetición de abortos en una misma vaca (60, 52, 2, 41). Se desconoce si *N. caninum* ocasiona pérdidas tempranas de preñez antes del 3^{er} mes de gestación; es probable que los fetos de 1 a 2 meses de gestación muertos *in utero* sean reabsorbidos determinando la repetición del celo (52). Se ha informado que vacas seropositivas necesitan más dosis inseminantes para quedar preñadas que las seronegativas (91).

Existen evidencias de que las vacas seropositivas a *N. caninum* tienen un mayor riesgo a abortar que aquellas seronegativas al parásito, (96, 94, 63) y de que éstas son eliminadas anticipadamente debido a un bajo desempeño reproductivo (93).

Los fetos pueden morir en el útero, ser reabsorbidos, momificados, o expulsados con un alto grado de autólisis. También se han informado nacimientos prematuros y muerte

perinatal asociados a neosporosis. Frecuentemente acontece el nacimiento de terneros infectados en forma transplacentaria. La mayoría de estos terneros sobrevive y es clínicamente asintomático, sin embargo en ocasiones se han reportado casos de bajo peso al nacimiento y signos neurológicos que van desde ataxia leve hasta tetraparesis. Los signos se observan antes de los 2 meses de edad. Los terneros pueden estar débiles y con incapacidad para levantarse. Los miembros pueden estar flexionados o hiperextendidos o pueden presentar deformaciones. Los reflejos pueden estar presentes, disminuídos o ausentes. En algunos casos se observó exoftalmia o asimetría de los ojos. Por lo general, la temperatura, el ritmo cardíaco y respiratorio son normales. Radiográficamente, la médula espinal aparece normal **(10, 49, 47)**.

En general los fetos o terneros natimortos no presentan lesiones macroscópicas típicas asociadas a una infección por *N. caninum*. Ocasionalmente se han observado focos pálidos en la musculatura esquelética y corazón. Histopatológicamente se han observado cambios degenerativos e inflamatorios en varios tejidos, sobre todo en SNC, corazón, musculatura esquelética e hígado y ocasionalmente en pulmones y riñones **(90, 25)**. Como lesión característica en el SNC se describe una encefalitis multifocal no supurativa, a veces acompañada por focos de necrosis y proliferación glial. Es frecuente la presencia de infiltración leucocítica multifocal no supurativa de las meninges. Las lesiones en el miocardio son muchas veces de consideración pero frecuentemente están enmascaradas por la autólisis **(52)**. Todas las porciones del cerebro y de la médula pueden mostrar lesiones. Un trabajo realizado en nuestro país por Moore y col. demostró que las lesiones histopatológicas se presentaron con mayor frecuencia en el área basal del SNC (bulbo, pedúnculos cerebrales y protuberancia) **(81)**. Se ha

observado necrosis de vellosidades cotiledonarias en placentas abortadas, pero los parásitos se observan raramente en esas lesiones. En las explotaciones bovinas, los abortos pueden presentarse en forma aislada o en grupos en un corto período y pueden ocurrir durante todo el año. Un estudio de Thurmond y Hietala en California **(95)** describió una menor producción láctea en vaquillonas lecheras de primera parición seropositivas a *N. caninum* con respecto a las seronegativas. Las vaquillonas seropositivas tuvieron una producción láctea de aproximadamente 1Kg /día/vaca menor que las seronegativas. La menor producción láctea asociada a la mayor incidencia de abortos en las vacas seropositivas aumentaría el riesgo a descarte prematuro de las mismas **(93)**. En un estudio de Thurmond y Hietala, vacas lecheras seropositivas a *N. caninum* fueron descartadas 6,3 meses antes que las seronegativas **(93)**.

Algunos estudios demostraron una asociación entre seropositividad a *N. caninum* y menor ganancia diaria de peso. Venturini y col. en Argentina, comprobaron una ganancia diaria de peso significativamente menor en los terneros seropositivos de un feed-lot que en los seronegativos **(100)**. Barling y col., comprobaron en ganado de carne, que los animales seropositivos tuvieron un aumento diario de peso post-destete, un peso vivo al momento de la faena y un peso de carcasa significativamente menores que los seronegativos, y que estos ocasionaron un incremento en los costos por tratamientos y una menor retribución económica **(7)**.

1.3.4 Neosporosis bovina en Argentina

En 1995, Venturini y col. (101) informaron por primera vez la presencia de anticuerpos para *N. caninum* en bovinos en la República Argentina.

En 1998, Campero y col. (21) confirmaron la presencia del parásito en nuestro medio mediante técnicas de Inmunohistoquímica y describieron quistes tisulares en el cerebro de 2 fetos bovinos abortados.

En 1999, Venturini y col. (103) informaron una prevalencia serológica para *N. caninum* de 64,5 % (122/189) (Título IFI $\geq$ 1:25) en vacas de tambo con antecedentes de aborto y serología negativa para Brucelosis, provenientes de 19 establecimientos ubicados en el sur de la Provincia de Santa Fe y en Buenos Aires. El 50,26 % (95/189) de estas vacas, presentaron un título IFI $\geq$ 1:200.

En el mismo estudio se obtuvieron prevalencias de 24,4 % (20/82) y 4,5 % (1/22) (Título IFI $\geq$ 1:80) en fetos de vacas Holando-Argentino y Aberdeen-Angus respectivamente. Los fetos fueron obtenidos en un muestreo de vacas de 5-8 meses de gestación realizado entre 1997 y 1998 en frigoríficos del sur de Santa Fe y este de Buenos Aires. También se vieron lesiones sugestivas de neosporosis en 7/8 fetos seropositivos (Título IFI $\geq$ 1:80) examinados histológicamente (encefalitis no supurativa, mangitos perivasculares, degeneración neuronal, gliosis multifocal). Con este estudio se documentó la ocurrencia de infección transplacentaria por *N. caninum* en Argentina. Dado que en los rumiantes no se produce transferencia de anticuerpos a través de la placenta, la presencia de éstos en el suero fetal indica infección.

El cerebro de uno de los fetos seropositivos fue inoculado en 22 ratones Balb-c, demostrándose posteriormente anticuerpos para *N. caninum* en uno de ellos (102).

En 2001, Venturini y col. aislaron *N. caninum* a partir del cerebro de una ternera natimorta con infección transplacentaria por *N. caninum* (título precalostral IFI 1:800) mediante la inoculación en meriones y ratones Balb-c. Se demostró la infección de los mismos mediante estudios serológicos, histológicos e inmunohistoquímicos. Se detectó la presencia de quistes en el cerebro de un ratón y de un merión mediante la observación microscópica en fresco y de cortes histológicos teñidos con H & E y por inmunohistoquímica (98).

En 2002 Moore y col. realizaron un estudio seroepidemiológico en la región de la Pampa Húmeda donde se determinaron seroprevalencias de 4,7% (19/400) en bovinos de cría y 16,6% (174/1048) en bovinos de tambo sin antecedentes de enfermedad reproductiva (título IFI $\geq$ 1: 200), mientras que en muestras de vacas abortadas, las prevalencias fueron de 18,9% (41/216) para bovinos de cría y de 43,1 % (323/750) para bovinos de tambo (título IFI $\geq$ 1: 600). En el mismo estudio se encontraron lesiones microscópicas compatibles con neosporosis en el 22,8% (43/188) de los fetos y/o placentas evaluados, confirmándose la presencia del protozoo en el 67,4% (29/43) de las mismas. La mayoría de los resultados positivos se obtuvieron en material de aborto de vacas de tambo (80).

En 2002, Venturini y col. (100) realizaron un estudio destinado a evaluar si la infección por *N. caninum* tenía alguna influencia sobre la ganancia de peso en terneros de feed-lot, y a determinar la evolución de los títulos serológicos en el mismo. Comparando la ganancia de peso entre terneros seropositivos y seronegativos a *N. caninum* al ingreso

al feed-lot (5-6 meses de edad), y a la finalización del ciclo (8-9 meses), se estableció que terneros seronegativos del mismo peso inicial que los seropositivos tuvieron una ganancia de peso significativamente mayor. Seis animales seronegativos ganaron 126 Kg de peso más que 6 seropositivos. No se observó seroconversión en ningún caso, lo que indicaría que en este estudio las condiciones no fueron favorables para la transmisión horizontal de la enfermedad.

1.3.5 Importancia económica

Si bien las principales consecuencias económicas de la neosporosis bovina se deben a la producción de aborto, también deben ser tenidas en cuenta las pérdidas tempranas de preñez, reabsorción embrionaria, aumento de los intervalos parto-concepción y parto-parto, infertilidad, muerte perinatal y disminución del valor de los animales seropositivos en el reemplazo de vientres en un rodeo.

El impacto económico ocasionado por el aborto dependerá de los costos directos por los fetos perdidos, y de los indirectos. Estos incluyen la asistencia profesional y los costos asociados con el establecimiento del diagnóstico, la recría de las vacas abortadas, el incremento del tiempo de lactancia, la posible pérdida en la producción de leche y el costo de reemplazo si las vacas que abortaron son descartadas **(39, 93, 95)**.

Aunque aun no se dispone de datos firmes acerca de las pérdidas económicas debidas a la neosporosis en la industria ganadera en el mundo, se sabe por ejemplo, que entre el 20 y 30 % de los abortos bovinos ocurridos en California **(1, 2)** y en los Países bajos **(106)** y alrededor del 12,5% de los producidos en Bélgica **(29)** y el Reino Unido **(27)** se

debieron a *N. caninum*. Se ha estimado que las pérdidas económicas en California directamente relacionadas con los abortos por *N. caninum* alcanzarían aproximadamente 35 millones de dólares estadounidenses por año, considerando una población de 1,2 millones de vacas lecheras en edad reproductiva, y que aproximadamente 40.000 abortos anuales podrían estar asociados a neosporosis. En Australia y Nueva Zelandia, se estima que las pérdidas ocasionadas por la neosporosis superan los 100 millones de dólares australianos anuales (87). Sin embargo, todos esos datos son estimados y hay una gran necesidad de estudios científicos que determinen la importancia económica de la neosporosis bovina (39, 40).

1.3.6 Neosporosis en ovinos y cabras

Se comprobó la ocurrencia de abortos y mortalidad neonatal asociados a infección natural por *N. caninum* en cabras enanas en EE.UU. (9, 43), en caprinos lecheros en Costa Rica (57) y Brasil (26) y en ovinos (52). Los signos clínicos y las lesiones producidas son similares a las inducidas por *T. gondii*.

Las lesiones observadas en fetos caprinos abortados y natimortos se localizan principalmente en cerebro, y se caracterizan por encefalitis multifocal no supurativa, microgliosis, necrosis, manguitos perivasculares y presencia de quistes tisulares y/ o taquizoítos. En un feto caprino abortado se halló hidrocefalia e hipoplasia de cerebelo y miositis con presencia de taquizoítos en músculo (57). Las cabras adultas infectadas experimentalmente no desarrollaron signos clínicos, pero seroconvirtieron (54). Experimentalmente se indujeron abortos, reabsorción fetal y muerte perinatal de las

crías en caprinos (**Lindsay y col.,1995 en 42**). Se halló el parásito en cerebro, medula espinal y corazón de los fetos y en las placentas.

En ovinos infectados naturalmente se han detectado anticuerpos para *N. caninum* (**59**) y se hallaron parásitos en un cordero infectado transplacentariamente (**Dubey y col.,1990 en 42**). La inoculación experimental de hembras ovinas preñadas indujo reabsorción fetal y abortos (**51, 20**). Se observaron lesiones principalmente en cerebro, médula, músculos y placenta caracterizadas por encefalitis, miositis y placentitis similares a lo observado en caprinos y bovinos.

1.3.7 Neosporosis en caninos

Neospora caninum puede afectar a perros de cualquier edad, pero la mayoría de los casos severos descritos ocurrieron en cachorros infectados en forma transplacentaria. Los cachorros desarrollan generalmente paresia del tren posterior que evoluciona a parálisis ascendente progresiva. Los miembros posteriores están afectados más severamente que los miembros anteriores, hay atrofia muscular, y en algunos casos éstos se encuentran en hiperextensión rígida. Éste es un signo característico, observado principalmente en cachorros < de 4 meses, y se debería probablemente, a la combinación de parálisis de neuronas motoras inferiores y miositis, lo que resultaría en una contractura fibrosa progresiva rápida de los músculos con la consiguiente fijación de las articulaciones. También se pueden presentar otras manifestaciones neurológicas u orgánicas asociadas que dependerán del sitio parasitado (depresión, convulsiones, nistagmo, anisocoria, neumonía, megaesófago, etc.)

En algunos casos, luego de las manifestaciones de paresia - parálisis, se presenta debilidad cervical, disfagia y muerte en corto tiempo, mientras que otros perros se mantienen alerta y con cuidados, sobreviven por meses o años.

En perros adultos el cuadro es más variado, frecuentemente presentan signos de compromiso multifocal del SNC o polimiositis. También se reportaron casos de dermatitis (prurítica, ulcerativa y fistulosa), neumonía, miocarditis e infección generalizada, con todos los órganos virtualmente involucrados. Se producen casos fatales en perros de todas las edades **(89, 22, 69, 5)**.

Estudios experimentales sugieren que *N. caninum* puede causar muerte fetal, momificación, reabsorción embrionaria y nacimiento de cachorros débiles **(52, 24)**. A diferencia de lo observado en bovinos, no hay reportes de aborto por *N. caninum* en perros. Si bien se desconoce una predisposición racial, la mayoría de los casos descriptos correspondió a las razas labrador retriever, boxer, greyhound, golden retriever y basset hound **(69)**.

Las lesiones más frecuentes consisten en meningoencefalitis no supurativa, con microgliosis y necrosis focal, polirradiculitis no supurativa, polimiositis a nivel de músculo esquelético, cardíaco y esofágico, miocarditis, neumonía y hepatitis.

Las perras seropositivas, con infección subclínica, pueden transmitir la infección en forma vertical a varias camadas sucesivas, y a su vez, esta infección se puede repetir en la siguiente generación. No todos los cachorros de una misma camada están siempre infectados. Algunos de los cachorros infectados desarrollan signos clínicos rápidamente (entre las 2 semanas y los 6 meses de edad), mientras que en otros la infección se puede mantener en forma subclínica con una eventual reactivación

posterior, la que puede estar influida por enfermedades inmunosupresoras o administración de glucocorticoides.

La eficiencia de la transmisión estaría directamente correlacionada con el título de anticuerpos de la perra. Las perras con altos títulos de anticuerpos tendrían mayor probabilidad de producir cachorros infectados, con enfermedad clínica algunos (6).

Se considera que la frecuencia de infección transplacentaria de *N. caninum* en perros en condiciones naturales es demasiado baja para mantener la infección en poblaciones exocriadas por sí sola, y para ello sería necesaria una fuente de infección horizontal (6).

Los signos clínicos son una ayuda valiosa para orientar el diagnóstico. Una parálisis ascendente en perros jóvenes, particularmente si varios cachorros están afectados debe despertar la sospecha de neosporosis. Los valores hematológicos por lo general no están alterados. Puede haber niveles aumentados de enzimas asociadas con necrosis de miocitos e hígado. La neosporosis se parece a la toxoplasmosis clínicamente, sin embargo se puede diferenciar por el examen serológico (69, 52).

1.3.8 Neosporosis canina en Argentina

En 1997, se realizaron los primeros relevamientos serológicos de neosporosis canina en Argentina. Di Lorenzo y col. hallaron una prevalencia de 47,4 % (46/97) en caninos adultos de área urbana de la ciudad de La Plata y alrededores (título $\geq$ 1: 50) (33).

En 1998, Castellano y col. describieron el primer caso de neosporosis clínica en el país, en una perra mestiza de 3 años y medio de edad que presentara un cuadro agudo de tetraplejía. La misma tuvo un título de anticuerpos para *N. caninum* de 1:800 (IFI) al

inicio de los signos. El cuadro remitió tras el tratamiento con Clindamicina durante un mes **(22, 23)**.

En 2002, en un estudio de Venturini y col. **(99)**, se evaluaron sueros de 223 perros con signos neurológicos (paresia o parálisis del tren posterior, convulsiones, tetraplegía, ataxia y uveítis) mediante la prueba de IFI para *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii* obteniéndose las siguientes prevalencias: *T. gondii*: 27,8 % (62/223) y *N. caninum*: 26,9 % (60/223) y se determinó que la seroprevalencia aumentaba a medida que aumentaba la edad en ambas enfermedades, lo que indicaría la importancia de la transmisión horizontal en esta especie en nuestro medio.

Otros hallazgos relevantes sobre neosporosis canina son presentados y discutidos mas adelante en este trabajo de tesis. Algunos de ellos fueron publicados previamente **(13, 14)**.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Determinar si los perros domésticos son hospedadores definitivos de *Neospora caninum*.

1.4.2 Objetivos particulares

1.4.2.1 Identificar ooquistes de *Neospora caninum* a partir de materia fecal de perros infectados naturalmente.

1.4.2.1.1 Determinar si un suero hiperinmune para *N. caninum* reconoce específicamente la membrana de los ooquistes de *N. caninum* y permite diferenciarlos de otras especies de coccidios de los perros.

1.4.2.1.2 Aislar *N. caninum* en animales de experimentación (ratones Balb-c (*Mus musculus*), meriones (*Meriones unguiculatus*) y cobayos (*Cavia porcellus*)) mediante la inoculación de ooquistes hallados en heces de perros naturalmente infectados.

1.4.2.2 Detectar ooquistes en materia fecal y/o anticuerpos para *N. caninum* en perros alimentados experimentalmente con tejidos de animales infectados con ooquistes de *N. caninum* después de cumplir con el anterior objetivo.

1.4.2.3 Obtener datos acerca de la prevalencia de la infección por *N. caninum* en perros de distintas edades y de distintos ámbitos (rural-urbano)

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Obtención de ooquistes y registro de datos

Durante el desarrollo del presente trabajo (1996-2002) se obtuvieron 1277 muestras de materia fecal de caninos de la provincia de Buenos Aires, Argentina: 407 muestras del partido de Berazategui (1997-2002), 54 muestras de caninos de establecimientos bovinos lecheros del partido de Magdalena (1999-2000) y 816 muestras de caninos de la ciudad de La Plata y alrededores (1996-2002).

Se registraron datos de los caninos de los cuales provenían las muestras de materia fecal utilizadas (edad, sexo, raza, infecciones intercurrentes y presencia de signos clínicos) y se tomaron muestras de sangre para determinar presencia de anticuerpos para *N. caninum* mediante la prueba de Inmunofluorescencia indirecta en los casos en que fue posible.

Las muestras de materia fecal fueron colocadas en frascos de vidrio y refrigeradas hasta el momento de su procesamiento en el laboratorio. En los perros de establecimientos lecheros se indujo la defecación mediante el uso de supositorios de glicerina pediátricos.

Para determinar la presencia de ooquistes de coccidios, las muestras fueron procesadas mediante la técnica de flotación con solución de sacarosa. Se utilizó una solución de sacarosa en agua, densidad 1300.

Se colocó una parte de la muestra de materia fecal y nueve partes de solución de sacarosa en un mortero, se homogeneizó y filtró por filtro de malla metálica (1 mm de abertura) a un tubo de centrifuga utilizando un embudo.

Se centrifugó durante 5 minutos a 2500 rpm.

Se tomaron 1 o 2 gotas de la superficie del sobrenadante con un ansa, se colocó entre porta y cubreobjetos y se examinó al microscopio con los objetivos de 10x y 45x.

En los casos en que se detectaron ooquistes de coccidios, éstos se midieron con un ocular micrométrico graduado y se clasificaron en 3 tipos según su forma y tamaño:

a) Tipo *Isospora canis* (34-40 μm); b) Tipo complejo *Isospora ohioensis* (17-27 μm); c) Tipo *Hammondia heydorni* (10-13 μm). En los casos positivos, se registró la presencia adicional de otros enteroparásitos.

Se determinó la distribución de los tipos de ooquistes en las muestras recolectadas. Los datos de los partidos de Berazategui y La Plata se dividieron en dos categorías de acuerdo a la edad de los animales: perros $\leq$ de 6 meses y $>$ de 6 meses. Para analizar resultados se utilizó el método de chi ².

Las muestras con ooquistes seleccionadas fueron conservadas refrigeradas a 4 °C para su posterior procesamiento ($<$ 1 semana).

2.2 Esporulación de ooquistes

Cada muestra se homogeneizó en un mortero con una solución de ácido sulfúrico 2 % (muestras n° 2 a 37 y n° 44) o bicromato de potasio 2,5 % (muestras n° 38 a 43 y n° 45

a 55) y se filtró con un filtro de malla metálica (1 mm de abertura) y filtros de 300, 150 y 53 μm .

El filtrado se colocó en placas de Petri de 15 cm de diámetro y se incubó a 20° C durante 1 a 2 semanas para permitir que los ooquistes esporularan.

Luego de la incubación, el filtrado se colocó en tubos de centrifuga de 50 ml, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante.

El sedimento se procesó mediante la técnica de flotación con solución de sacarosa (muestras n° 21 a 55) descrita previamente o mediante la técnica de flotación con solución saturada de cloruro de sodio (muestras n° 2 a 10). Para ello se agregó la solución de cloruro de sodio densidad 1150 al tubo conteniendo el sedimento hasta enrasar 50 ml. Se mezcló y dejó reposar durante 20 minutos.

En ambos casos, los ooquistes se colectaron con ansa y pipeta de la capa superior del sobrenadante.

Los ooquistes se lavaron dos veces con solución buffer de fosfatos (PBS) y se concentraron por centrifugación durante 10 minutos a 3000 rpm en el fondo del tubo.

2.3 Reconocimiento de ooquistes mediante un suero hiperinmune para *Neospora caninum* por medio de la técnica de IFI

Para determinar si la membrana de los ooquistes de coccidios hallados en heces de perros era reconocida por anticuerpos presentes en un suero hiperinmune para *N. caninum* se utilizaron ooquistes esporulados correspondientes morfológicamente a los tipos *Isospora canis*, complejo *Isospora ohioensis* y/o *Hammondia heydorni*

provenientes de 8 muestras de materia fecal de caninos de la ciudad de La Plata y alrededores que presentaban infección natural por coccidios (muestras n° 2 a 10. Tabla 3).

Tabla 3: Muestras de materia fecal de caninos utilizadas para la determinación de la reactividad de un suero hiperinmune para *Neospora caninum* frente a ooquistes de coccidios. Tipo de ooquistes presentes y datos del hospedador.

Muestra N°	Tipo de ooquistes	Datos del canino	
		Raza, sexo, edad	Signos clínicos
2	Complejo <i>Isospora ohioensis</i>	Ovejero alemán, macho, 3 años	S/D
3	<i>Hammondia heydorni</i>	S/D	S/D
4	Complejo <i>Isospora ohioensis</i>	S/D	S/D
5	Complejo <i>Isospora ohioensis</i>	Basset, hembra, 2 meses	Diarrea
6*	<i>Hammondia heydorni</i> , complejo <i>Isospora ohioensis</i>	Ovejero alemán, macho 47 días	Diarrea intermitente
8*	<i>Isospora canis</i> , complejo <i>Isospora ohioensis</i>	Dobermann, hembra, 2 meses	Diarrea intermitente
9	Complejo <i>Isospora ohioensis</i>	S/D	S/D
10	Complejo <i>Isospora ohioensis</i>	Mestizo, hembra, 2 meses	Heces normales

S/D: Sin datos

* Presencia de esporocistos de *Sarcocystis* spp.

Los ooquistes esporulados se fijaron sobre portaobjetos para inmunofluorescencia de 12 áreas (Flow, ICN Biomedicals, Inc.). Se colocaron 15 µl de la suspensión de ooquistes en PBS por pocillo, se dejó secar y luego se fijó con metanol.

Se conservaron a -20°C hasta su utilización. Se realizó el mismo procedimiento con ooquistes de *T. gondii*.

Los ooquistes fijados se incubaron con suero hiperinmune para *N. caninum* preparado en cabra (VMRD, Inc.) diluído 1:25, 1:50 y 1:100 en PBS pH 7,2. Se colocaron 15 µl de cada dilución de suero por área y se incubó durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda.

Se lavó durante 10 minutos con una solución buffer de carbonatos pH 9. Se colocaron 15 µl de suero anti IgG de cabra preparado en conejo marcado con fluoresceína (Sigma), y se incubó durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda.

Se lavó durante 10 minutos con una solución buffer de carbonatos pH 9, se colocó líquido de montaje (solución de glicerina en PBS 1:10) entre porta y cubreobjetos y se observó con microscopio de fluorescencia.

Como control se enfrentaron ooquistes de *T. gondii* con suero hiperinmune de conejo anti-*T. gondii* con el mismo procedimiento.

Los ooquistes de *T. gondii* fueron obtenidos en el laboratorio de Inmunoparasitología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, U.N.L.P. por infección experimental de un gato. El suero hiperinmune fue cedido por el Dr. J. P. Dubey, Parasite Biology, Epidemiology

and Systematics Lab., USDA, Beltsville, EE.UU. y se diluyó 1:100 en PBS. Se utilizó un conjugado anti-IgG de conejo preparado en cabra (Sigma).

2.4 Inoculación de ooquistes de coccidios hallados en heces de perro en ratones Balb-c (*Mus musculus*), meriones (*Meriones unguiculatus*) y cobayos (*Cavia porcellus*)

2.4.1 Inoculación de ooquistes tipo *Isospora canis*, *Isospora complejo ohioensis*, y *Hammondia heydorni* en ratones Balb-c y detección de anticuerpos para *N. caninum*.

Se inoculó parte de los ooquistes esporulados de las muestras nº 2, 3, 4, 6, 8, 9 y 10, **(Tabla 3)** por vía intragástrica a 17 ratones Balb-c **(73)** utilizando una cánula metálica con extremo redondeado. Los ratones inoculados fueron alojados en cajas separadas según las muestras. Cuatro ratones no inoculados fueron utilizados como testigos.

A partir de la cuarta semana post-inoculación, se obtuvo sangre por punción retroorbital para detectar presencia de anticuerpos para *N. caninum*.

Después de realizar los exámenes serológicos, los ratones fueron sacrificados por sobredosis de éter.

Se extrajeron muestras de cerebro, cerebelo y médula espinal. Se realizó un macerado con solución fisiológica en un mortero y se observó al microscopio óptico para detectar la presencia de quistes de *N. caninum*.

El número de ooquistes, de ratones inoculados con cada muestra, y el tiempo transcurrido hasta que éstos fueron sangrados, se indican en la **tabla 4**.

Tabla 4: Inoculación de ooquistes esporulados tipo *Isospora canis*, *Isospora* complejo *ohioensis* y *Hammondia heydorni* en ratones Balb-c.

muestra N°	N° de ooquistes inoculados/ ratón	Tipo de ooquistes	N° de ratones inoculados	Sangrado (días post-inoculación)
2	240	<i>I. complejo ohioensis</i>	2	59 y 89
3	30000	<i>H. heydorni</i>	3	28 y 58
4	13100	<i>I. complejo ohioensis</i>	1	28 y 58
6	4850	<i>H. heydorni</i>	2	37
	13750	<i>I. complejo ohioensis</i>		
8	750	<i>I. canis</i>	4	35
	7500	<i>I. complejo ohioensis</i>		
9	62800	<i>I. complejo ohioensis</i>	3	28
10	165000	<i>I. complejo ohioensis</i>	2	28

Para detectar anticuerpos para *N. caninum* se utilizó la prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) (50).

Como antígeno se utilizaron taquizoítos de *N. caninum* cepa NC-1 fijados a portaobjetos, obtenidos mediante cultivo en células Vero en el Laboratorio de Inmunoparasitología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, U.N.L.P. (ver Anexo).

Las muestras de suero de los ratones se diluyeron 1/25 y 1/50 en PBS. Como control positivo se utilizó suero de un ratón infectado experimentalmente con taquizoítos de la cepa NC-1 provista por el Dr. J. P. Dubey y como control negativo suero de un ratón sin inocular.

Se colocaron 15 µl de cada dilución de suero por pocillo.

Se incubó durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda.

Se enjuagó durante 10 minutos con una solución buffer de carbonatos pH 9.

Se colocaron 15 µl de suero anti-IgG de ratón marcado con fluoresceína en cada pocillo (ICN Pharmaceuticals, Inc.).

Se incubó durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda.

Se lavó durante 10 minutos con solución buffer de carbonatos pH 9.

Se colocó líquido de montaje (Solución de glicerina en buffer de carbonatos 50%) entre porta y cubreobjetos y se observó con microscopio de fluorescencia.

Se consideró positivo la presencia de fluorescencia periférica completa en los taquizoítos.

2.4.2 Inoculación de ooquistes tipo *Hammondia heydorni* en ratones Balb-c inmunodeprimidos y detección de anticuerpos para *Neospora caninum*

Se inocularon por vía intragástrica ooquistes esporulados correspondientes morfológicamente al tipo *Hammondia heydorni* provenientes de materia fecal de 10 caninos (muestras n° 3 y n° 21 a 30) en 38 ratones Balb-c.

Se administró dexametasona 0,01 % en el agua de bebida a los ratones durante 3 semanas a partir del día de la inoculación para aumentar la susceptibilidad a la infección (por recomendación del Dr. J. P. Dubey).

El número de ooquistes, de ratones inoculados con cada muestra, y el tiempo transcurrido hasta que éstos fueron sangrados se indican en la **tabla 5**.

El sangrado de los ratones, estudios serológicos y parasitológicos se realizaron como se describió en **2.4.1**.

Tabla 5: Inoculación de ooquistes tipo *Hammondia heydorni* a ratones Balb-c inmunodeprimidos.

Muestra N°	N° de ooquistes tipo <i>H. heydorni</i> inoculados/ratón	N° de ratones inoculados	Sangrado (días post-inoculación)
3*	6500	2	28 y 112
	1000	2	28 y 112
21*	7000	3	28 y 92
22*	8000	4	29 y 77
23*	350	1	28
24*	1500	4	54
25*	11000	4	43
26*	17000	5	43
27 (a)	1000	5	37
28 (b)	20000	4	32
30 (c)	45000	4	33

*: Materias fecales de caninos cedidas por Laboratorio privado de La Plata, sin datos de raza, sexo, edad o signos clínicos.

(a): Canino Dobermann, 3 meses.

(b): Canino Rottweiler, macho, 4 meses, con diarrea.

(c): Canino ovejero alemán, hembra, 2 meses, con diarrea.

2.4.3 Inoculación de ooquistes tipo *Hammondia heydorni* en meriones (*Meriones unguiculatus*) y detección de anticuerpos para *Neospora caninum*.

Se inocularon por vía intragástrica ooquistes esporulados correspondientes al tipo *H. heydorni* provenientes de 23 perros, en 58 meriones.

Los meriones fueron sangrados por punción del seno retroorbitario con una pipeta Pasteur luego de la cuarta semana post-inoculación.

Los datos sobre el número de ooquistes inoculados, cantidad de meriones inoculados con cada muestra y el tiempo transcurrido hasta que éstos fueron sangrados se hallan en la **tabla n° 6**.

Para la detección de anticuerpos para *N. caninum* en meriones se utilizó la técnica de aglutinación directa (Vétoquinol, Francia), según las indicaciones del test comercial.

Se activó el buffer de dilución de muestra mediante el agregado de 2 Mercapto-etanol, a razón de 14 µl/ml de buffer, y se agitó durante un minuto.

Cada muestra de suero se diluyó 1/20, 1/40, 1/80 y 1/160 en buffer de dilución de muestra previamente activado.

Se procedió del mismo modo con el suero control positivo. Como control negativo se utilizó buffer de dilución de muestra.

Se colocaron 50 µl de cada dilución de suero por pocillo (incluyendo al control positivo) en una placa de microtitulación de 96 pocillos con fondo en U.

Se colocaron 50 µl de control negativo en cada uno de dos pocillos.

Se agregaron 50 µl de suspensión antigénica (taquizoítos de *N. caninum* formolados) a cada pocillo conteniendo las diluciones de suero incluyendo los pocillos de los controles positivo y negativo.

Se agitó suavemente en un agitador mecánico durante algunos minutos, se cubrió con una membrana plástica autoadhesiva y se incubó a 30°C durante 12 horas.

Se leyó utilizando un espejo invertido.

Se consideraron positivas las muestras con un título mayor o igual a 1/160, las muestras con un título de 1/80 se consideraron dudosas mientras que un título menor o igual a 1/40 se consideró negativo, según indicaciones del kit.

El título de cada muestra estuvo dado por la última dilución de un suero en el que se observó la formación de un aglutinado visible macroscópicamente siendo esto indicativo de la presencia de anticuerpos, mientras que la sedimentación de la suspensión antigénica en el fondo del pocillo fue considerada como ausencia de los mismos.

Tabla n° 6: Inoculación de ooquistes tipo *Hammondia heydorni* en meriones (*Meriones unguiculatus*)

Muestra N°	N° de meriones inoculados	N° de ooquistes esporulados inoculados/ merion		Sangrado (días post inoculación)
32	2	32/1	81000	91
		32/2	81000	91 y 126
33	3	33/1	800	*
		33/2	270	34
		33/3	270	34
34	2	34/1	810	34
		34/2	810	34
35	2	35/1	1200	91 y 126

		35/2	1200	91 y 126
36	3	36/1	3000	28
		36/2	3000	28
		36/3	3000	28
37	3	37/1	300	44 y 84
		37/2	300	44 y 84
		37/3	escasos	68
38	3	38/1	300	44 y 84
		38/2	300	44 y 84
		38/3	escasos	68
39	2	39/1	3000	88
		39/2	3000	88
40	2	40/1	200	88
		40/2	200	88
41	2	41/1	550	295
		41/2	550	295
42	2	42/1	150000	105
		42/2	150000	105
43	2	43/1	20000	105
		43/2	20000	105
44	2	44/1	80000	89 y 262
		44/2	80000	89 y 262
45	2	45/1	400000	35
		45/2	400000	35
46	2	46/1	900	35
		46/2	900	35
47	5	47/1	18000	29
		47/2	18000	29
		47/3	800	43
		47/4	800	43
		47/5	800	43
49	2	49/1	12000	30
		49/2	12000	30
50	3	50/1	60000	41
		50/2	60000	41
		50/3	60000	41
51	3	51/1	350000	27
		51/2	350000	27
		51/3	350000	27
52	3	52/1	S/D	28
		52/2	S/D	28
		52/3	S/D	28
53	1	53/1	S/D	27

54	4	54/1	4000	*
		54/2	4000	*
		54/3	1000	108
		54/4	1000	108
55	3	55/1	5000	34
		55/2	5000	34
		55/3	5000	34

- Muere pocos días post-infección.

2.4.4 Detección de anticuerpos para *N. caninum* en perros que eliminaron ooquistes tipo *Hammondia heydorni*

En los casos en que fue posible, se tomaron muestras de sangre de los caninos de los cuales provenían las muestras de materia fecal utilizadas, para determinar presencia de anticuerpos para *N. caninum* mediante la prueba de IFI. Los datos de estos caninos (edad, sexo, raza, infecciones intercurrentes, presencia de signos clínicos) y momento de sangrado, se hallan en la **tabla n° 7**.

Los sueros de los caninos fueron procesados mediante la técnica de IFI para *N. caninum* utilizando suero anti-IgG de perro preparado en conejo (Sigma) marcado con fluoresceína a la dilución 1:100. Cada muestra de suero fue procesada a partir de una dilución 1:25. Se utilizaron controles positivo y negativo comerciales (VMRD, Inc.). Se siguió un procedimiento similar al descrito anteriormente para muestras de suero de ratones. (ver **2.4.1**)

Tabla n° 7: Datos de los caninos de los cuales se obtuvieron ooquistes de *Hammondia heydorni* para su inoculación en meriones (*Meriones unguiculatus*).

Muestra N°	Datos de los caninos					
	Raza	Sexo	Edad	Infecciones concomitantes	Signos clínicos	Sangrado #
32 *	S/D					
33 *	Ovejero alemán		5 m			
34 *	S/D					
35 *	S/D					
36	Mestizo	H	3 m	Distemper, <i>Giardia duodenalis</i> , <i>I. canis</i>	Diarrea (a)	0 y 28
37	Rottweiler	M	45 d	<i>Sarcocystis</i> spp.	Heces blandas (b)	0, 28 y 49
38	Pointer	M	75 d	Distemper, <i>Sarcocystis</i> spp, <i>I. complejo ohioensis</i>	Rinitis y conjuntivitis purulenta, tos, adelgazamiento, foliculitis, fiebre, adenomegalia	7
39 (c)	Dobermann		47 d	<i>Toxocara canis</i> , <i>Sarcocystis</i> spp., <i>Giardia duodenalis</i>	Heces blandas	5
40	Dálmata	M	9 m	<i>T. canis</i>	Diarrea con presencia de sangre, vómitos	0
41 (d)	Ovejero alemán		55 d	<i>I. complejo ohioensis</i>	Decaimiento, Diarrea.	
42*	S/D					
43	Labrador	M	5 m	<i>Sarcocystis</i> spp., <i>Giardia duodenalis</i> .	Diarrea intermitente.	0
44*(e)	Rottweiler		4 a		Diarrea	
45	S/D					

46	Pequinés	M	6 m		Diarrea	
47 (f)	Cocker Spaniel	M	50 d	Distemper <i>Sarcocystis</i> spp.	Diarrea con presencia de sangre, rinitis serosa, pústulas en abdomen, fiebre.	137
49	Viejo Pastor Inglés	H	12 a	<i>Ancylostoma caninum</i> , <i>Trichuris vulpis</i> , <i>Sarcocystis</i> spp.	Diarrea crónica, anemia	
50	Dálmata	H	60 d	<i>A. caninum</i>	Diarrea, vómitos, anemia.	
51	Mestizo	M	75 d		Diarrea	0
52	Sib. Husky	M	7 m	<i>Giardia duodenalis</i>	Diarrea	
53	Sib. Husky		6 m	Distemper	Diarrea	
54	Dobermann	H	2 m		Diarrea	
55	Dogo Argentino	H	75 d			

d: días, m: meses, a: años, H: hembra, M: macho, S/D: sin datos.

*: Materias fecales de caninos procedentes de Laboratorio privado de La Plata sin datos de raza, sexo, edad o signos clínicos (salvo indicado).

#: Extracción de sangre del canino para realización de IFI: Días transcurridos entre la primera detección de ooquistes en materia fecal y el sangrado.

(a): Fue alimentado con carne bovina cruda. Tratado con Toltrazuril desde el día 0 durante 3 días (10 mg/Kg/día P.O.).

(b): Fue alimentado con carne bovina cruda. Tratado con Sulfaguanidina durante 5 días (100 mg/Kg/12 hs P.O.) a partir del día de la primera detección de ooquistes tipo *H.*

heydorni; se interrumpe el tratamiento por 5 días y se continúa durante 5 días mas a igual dosis.

(c): Pool de materia fecal de 4 cachorros. Estos fueron alimentados con corazón bovino crudo desde los 37 hasta los 41 días de edad. Eliminaron ooquistes tipo *H. heydorni* desde los 46 hasta los 50 días de edad.

(d): Pool de materia fecal de 4 cachorros.

(e): Canino importado de Alemania un mes previo al examen coproparasitológico. Presentó diarrea desde su llegada al país, antes de su salida no presentaba signos clínicos. En Argentina fue alimentado con carne picada cruda.

(f): Tratado con 0,3 ml Sulfaprim[®] (Trimetoprima 4 g -Sulfadimetoxina -20 g/100 ml) una vez a los 52 días de edad y con Sulfaguanidina durante 5 días (100 mg/Kg/12 hs P.O.) desde los 54 a los 58 días de edad. A los 59 días de edad se detectaban aún ooquistes tipo *H. heydorni* en el examen coproparasitológico y se lo trató con Toltrazuril durante 3 días (10 mg/Kg/día P.O.). Un examen coproparasitológico a los 71 días de edad resultó negativo.

2.4.5 Procesamiento de meriones serológicamente positivos a *N. caninum*

2.4.5.1 Sacrificio

Los meriones seleccionados (meriones n° 37/1 y 37/2, ver tabla 6), serológicamente positivos a *N. caninum*, (título AT $\geq 1:160$) se sacrificaron por sobredosis de éter. (El merión 37/1 recibió dexametasona a razón de 1 mg/100 ml de agua de bebida durante los 7 días previos a la eutanasia).

2.4.5.2 Reinoculación en meriones

Se tomaron en forma estéril muestras de SNC de los meriones n° 37/1 y 37/2, se homogeneizaron por separado en mortero con solución fisiológica con antibióticos (Penicilina 1000 UI/ml y Estreptomicina 100 µg/ml) y cada homogeneizado se reinoculó en dos meriones por vía subcutánea (meriones n° 1a, 1b y 2a, 2b respectivamente) a razón de 1 ml/merión.

Se realizó el mismo procedimiento con muestras de corazón, pulmón, hígado y bazo del merión n° 37/2 realizando un homogeneizado conjunto, y se reinoculó en 2 meriones por vía subcutánea (meriones 2c y 2d), 1 ml de homogeneizado/merión.

A los 6 días post-inoculación se realizaron lavados peritoneales con solución fisiológica estéril a todos los meriones reinoculados (n° 1a, 1b, 2a, 2b, 2c y 2d). Se observaron muestras de estos lavados al microscopio, para determinar presencia de taquizoítos de *N. caninum*.

Todos los meriones reinoculados fueron sangrados por punción del seno retroorbital con pipeta Pasteur a los 30 días post inoculación. Los meriones n° 2a, 2b, 2c y 2d se sangraron nuevamente 301 días post inoculación. Las muestras de suero obtenidas se procesaron mediante la técnica de Aglutinación (Vétoquinol) para *N. caninum*.

2.4.5.3 Inoculación de tejidos en cultivos celulares

Se tomaron en forma estéril muestras de SNC de los meriones n° 37/1 y 37/2.

Se homogeneizó cada muestra con solución de Tripsina 0,25 % (Gibco BRL) en solución fisiológica en un mortero.

Se colocó cada homogeneizado en un tubo de centrifuga de 15 ml y se incubó durante 30 minutos a 37°C.

Se centrifugó a 2500 rpm y se eliminó el sobrenadante.

El sedimento se resuspendió en medio RPMI 1640 (PAA, Austria) con 3 % de suero equino y 1 % de solución de antibióticos y antimicótico (Penicilina G sódica 10000 UI/ml, Sulfato de Estreptomicina 10000 µg/ml, Amphotericina B 25 µg/ml en salina 0.85 %) (Gibco BRL).

Esta suspensión se inoculó en cultivos de células Vero de 48 a 72 horas de crecimiento que ya hubieran formado una monocapa en botellas plásticas de 25 cm² (Greiner Labortechnik).

Se inocularon 3 botellas con la muestra del merión n° 37/1 y 2 botellas con la muestra del merión n° 37/2.

Se incubó a 37°C en una atmósfera con 5 % de CO₂ y 95 % de aire durante 2 horas, al cabo de las cuales se retiró el medio con el homogeneizado de SNC y se lo reemplazó por medio nuevo.

Las botellas se incubaron durante dos meses bajo las condiciones citadas, siendo observadas con un microscopio invertido día por medio.

El medio de cultivo se cambió semanalmente.

2.4.5.4 Exámen microscópico directo y estudios histopatológico e inmunohistoquímico de muestras de tejidos de meriones seropositivos a *N. caninum*

Se realizaron improntas de SNC, hígado, bazo, pulmón y corazón (meriones n° 37/1 y 37/2) y se tiñeron con tinción de Giemsa (Anexo).

Un mínimo de 10 muestras de cada homogeneizado de SNC (meriones n° 37/1 y 37/2) fue observado al microscopio óptico para detectar la presencia de quistes correspondientes a *N. caninum*.

Para el estudio histopatológico, se colocaron muestras de estos órganos, riñón y ojos en solución de formol neutro al 10 % y se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes de 5 µm que se colorearon con Hematoxilina y Eosina (H & E).

Los cortes de SNC también se procesaron para inmunohistoquímica.

Se utilizó el método del complejo avidina-biotina (ABC).

Las muestras se desparafinizaron con xylol y se hidrataron pasando por concentraciones descendentes de alcoholes: 100%, 95%, 70% y 50%.

Se realizó un bloqueo de la peroxidasa endógena con peróxido de Hidrógeno 30 % y posteriormente se trató con pepsina al 0.4 % en solución 6 N de HCl.

Utilizando un kit comercial (Vector Laboratories, U.S.A.), las muestras se trataron en pasos sucesivos con:

- 1) Suero normal de cabra 5 % en PBS (anticuerpo bloqueante)

- 2) Suero hiperinmune anti-*N. caninum* preparado en conejo (cedido por el Dr. J. P. Dubey)
- 3) Anticuerpo biotinilado anti-IgG de conejo preparado en cabra
- 4) Reactivo ABC.

Para visualizar la reacción se utilizó un kit comercial conteniendo solución buffer, solución de 3,3'-Diaminobencidina y peróxido de Hidrógeno (DAB substrate kit for peroxidase, Vector Laboratories) y Hematoxilina de Meyer como coloración de contraste.

En los casos de los kits comerciales se siguieron las indicaciones del fabricante.

Las muestras se deshidrataron por pasaje en gradientes ascendentes de alcoholes y xylol. Se montaron con líquido de montaje (Canadax[®]) y se observaron al microscopio de luz. La técnica completa se halla en el anexo.

2.4.6 Inoculación de ooquistes tipo *Hammondia heydorni* en cobayos (*Cavia porcellus*) y detección de anticuerpos para *Neospora caninum*

Dos cobayos convencionales provenientes del Laboratorio del Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires, negativos serológicamente a *N. caninum* mediante las pruebas de Aglutinación (Vétoquinol) e IFI, fueron inoculados con un pool de ooquistes esporulados tipo *H. heydorni* provenientes de las muestras n° 30, 32, 33, 34, 35, 36, 37 y 38.

Se inoculó un total de 27000 ooquistes a cada cobayo por vía intragástrica. No se registró en que proporción estuvo representada cada una de las muestras que integraron el inóculo.

Se extrajo sangre por punción del seno retroorbitario el día previo a la inoculación y 30 días posteriores a la misma y se realizaron las pruebas de Aglutinación (Vétoquinol) e IFI para la determinación de la presencia de anticuerpos para *N. caninum* en suero. Para la técnica de IFI se utilizó un suero anti-IgG de cobayo preparado en cabra marcado con fluoresceína (Rockland) a una dilución 1/50. Las muestras de suero se diluyeron desde 1/40 para la prueba de Aglutinación y 1/25 para la prueba de IFI.

El procedimiento seguido en ambas técnicas fue el mismo descrito en el punto **2.4.3.** para los meriones.

Se utilizó la técnica de IFI para la detección de anticuerpos anti-*T. gondii* en los mismos sueros. Como antígeno se utilizaron taquizoítos de *T. gondii* fijados a portaobjetos obtenidos mediante cultivo en cavidad peritoneal de ratones en el Laboratorio de Inmunoparasitología de la Facultad de Ciencias Veterinarias U.N.L.P.

El suero de los cobayos se diluyó 1/25, 1/50 y 1/100 en PBS.

Se colocaron 15 µl de cada dilución de suero por pocillo.

Se incubó durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda.

Se enjuagó 3 veces durante 1, 5 y 7 minutos con PBS pH 7,2.

Se colocaron 15 µl de suero anti-IgG de cobayo marcado con fluoresceína en cada pocillo (Rockland).

Se incubó durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda.

Se lavó 3 veces durante 1, 5 y 7 minutos con PBS pH 7.2.

Se colocó líquido de montaje (Solución de glicerina en PBS 10%) entre porta y cubreobjetos y se observó con microscopio de fluorescencia.

Los cobayos fueron sacrificados luego del sangrado por sobredosis de éter. Se colocaron muestras de SNC, músculo, hígado, corazón y pulmón en formol neutro 10% y se procesaron para histopatología.

2.5 Aplicación de técnicas de PCR para la identificación de ooquistes de *N. caninum* y confirmación de la infección en meriones y cultivos celulares

Parte de los ooquistes de la muestra n° 37 fue remitida al U.S. Department of Agriculture, Parasite Biology, Epidemiology and Systematics Laboratory en Beltsville, para confirmar su identificación. Se realizaron inoculaciones experimentales en meriones y ratones KO y exámenes serológicos, histopatológicos e inmunohistoquímicos de los mismos. Se inoculó homogeneizado de cerebro de ratones KO en cultivos de células. Se procesaron ooquistes, muestras de cerebro de meriones inoculados con ooquistes y material de los cultivos celulares por técnicas de PCR para *N. caninum* y *H. Heydorni*. Los materiales y métodos utilizados fueron descriptos en detalle en (13)

2.6 Detección de ooquistes en materia fecal y anticuerpos para *N. caninum* en perros alimentados con tejidos de animales infectados experimentalmente con *N. caninum*.

Un canino mestizo de 54 días de edad, proveniente de los alrededores de la ciudad de La Plata, fue alimentado con órganos (SNC, pulmón, corazón, hígado y bazo) y carcaza de un merión (merion n° 37/3) infectado con ooquistes de *N. caninum* de la muestra n° 37 (cepa NC-6 Argentina, 13), que fue seropositivo a *N. caninum* por la prueba de Aglutinación directa (Vétoquinol)(Título $\geq 1:160$).

El cachorro fue alimentado exclusivamente con leche materna y alimento balanceado seco para cachorros desde su nacimiento hasta el día de la inoculación. El cachorro y 2 hermanos de la misma camada sangrados a los 30 días de edad y el día previo a la inoculación fueron seronegativos a *N. caninum* por la prueba de IFI (Título $< 1:25$ IgG). Su madre resultó positiva a *N. caninum* por la prueba de IFI (Título 1:50 IgG). No se detectaron protozoarios en materia fecal en 3 exámenes coproparasitológicos con intervalos de 2 días realizados la semana previa a la inoculación.

El canino fue mantenido en una jaula con piso de alambre durante 25 días desde el día de la inoculación y fue alimentado con alimento balanceado para cachorros y agua *ad libitum*. Las heces fueron recolectadas a diario durante este período y examinadas microscópicamente utilizando la técnica de flotación con solución de sacarosa. Las muestras de materia fecal de cada día fueron rotuladas y colocadas por separado en Placas de Petri con solución de Bicromato de Potasio al 2 % a temperatura ambiente, para permitir la esporulación de los posibles ooquistes presentes.

Se tomaron muestras de materia fecal del canino inoculado, correspondientes a los días 6 a 10 post-inoculación, luego de 15-20 días de incubación en bicromato de potasio 2,5 %; se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos para extraer la solución conservadora; el sedimento se lavó dos veces con PBS, se centrifugó (5 minutos a

2500 rpm) y se administró por vía intragástrica a dos meriones (meriones n° 56/1 y 56/2) a razón de 1,5 ml de sedimento a cada merión.

Se siguió el mismo procedimiento con un homogeneizado correspondiente a las muestras de los días 3 a 10 post inoculación. El sedimento obtenido fue luego procesado por la técnica de flotación con solución de sacarosa; la capa superior de sobrenadante fue administrada por vía intragástrica a 5 meriones (meriones n° 56/3, 56/4, 56/5, 56/6 y 56/7) en tres días sucesivos, recibiendo aproximadamente 1 ml de solución cada uno por día.

Todos los meriones fueron sangrados a los 28 días post-inoculación y las muestras de suero obtenidas procesadas por la técnica de aglutinación directa (Vétoquinol).

A las 3 semanas post inoculación se extrajo sangre del cachorro de la vena cefálica y se evaluó serológicamente mediante la técnica de IFI para *N. caninum*.

2.7 Determinación de la prevalencia serológica para *Neospora caninum* en perros de áreas rurales y urbanas de Argentina

Los materiales y métodos fueron descriptos en (13). Brevemente, se determinó la prevalencia serológica para *N. caninum* en 320 perros de distintas edades de Argentina (160 perros de áreas urbanas, 125 de tambos bovinos y 35 de establecimientos bovinos de cría) mediante la técnica de IFI.

3 RESULTADOS

3.1 Distribución de tipos de ooquistes de coccidios hallados en heces de caninos

Los resultados sobre la distribución de ooquistes de coccidios en heces de caninos de los partidos de Berazategui y La Plata se hallan en las **Tablas n° 8 y n° 9** respectivamente.

En el muestreo de caninos en establecimientos bovinos lecheros del partido de Magdalena detectaron ooquistes correspondientes sólo al tipo complejo *Isospora ohioensis*, en 4 de 54 muestras (7,4 %).

Se detectaron ooquistes tipo *Hammondia heydorni* en el 2,97 % (38/1277) del total de perros muestreados. En caninos de edad conocida la prevalencia fue de 3,1 % (38/1223); en caninos de hasta 6 meses fue de 5,8 % (27/464) y en los mayores de esta edad de 1,4 % (11/759) ($P < 0,001$).

Tabla n° 8: Distribución de tipos de ooquistes de coccidios hallados en heces de caninos del partido de Berazategui.

Tipo de coccidio	Caninos hasta 6 meses		Caninos mayores de 6 meses		Total de caninos	
	N°de muestras positivas/ total	%	N°de muestras positivas/ total	%	N°de muestras positivas/ total	%
<i>Isospora canis</i>	16/209	7,7	5/198	2,5	21/407	5,2
Complejo <i>Isospora ohioensis</i>	39/209	18,7	9/198	4,5	48/407	11,8
<i>Hammondia heydorni</i>	14/209	6,7	7/198	3,5	21/407	5,2
Total	69/209	33	21/198	10,6	90/407	22,1

Tabla n° 9: Distribución de tipos de ooquistes de coccidios hallados en heces de caninos del Partido de La Plata y alrededores.

Tipo de coccidio	Caninos hasta 6 meses		Caninos mayores de 6 meses		Total de caninos	
	N°de muestras positivas/ total	%	N°de muestras positivas/ total	%	N°de muestras positivas/ total	%
<i>Isospora canis</i>	9/255	3,5	3/561	0,5	12/816	1,5
Complejo <i>Isospora ohioensis</i>	27/255	10,6	6/561	1,1	33/816	4
<i>Hammondia heydorni</i>	13/255	5,1	4/561	0,7	17/816	2,1
Total	49/255	19,2	13/561	2,3	62/816	7,6

3.2. Reconocimiento de ooquistes de coccidios de heces caninas mediante un suero hiperinmune para *Neospora caninum*

Se observó fluorescencia periférica débil en los ooquistes del complejo *I. ohioensis* de las muestras n° 2, 4, 8, 9 y 10, y en los ooquistes de *I. canis* de la muestra n° 8 así como en los ooquistes de *T. gondii* al ser enfrentados con el suero caprino hiperinmune para *N. caninum*. No se observó fluorescencia en los ooquistes tipo *H. heydorni* de las muestras n° 3 y 5 ni en los del complejo *I. ohioensis* de las muestras n° 5 y 6.

Se observó fluorescencia débil en los ooquistes de *T. gondii* enfrentados a suero hiperinmune anti-*T. gondii*.

3.3 Inoculación de ooquistes de coccidios hallados en heces de perros en ratones Balb-c (*Mus musculus*), meriones (*Meriones unguiculatus*) y cobayos (*Cavia porcellus*)

3.3.1 Inoculación de ooquistes tipo *Isospora canis*, *Isospora* complejo *ohioensis* y *Hammondia heydorni* en ratones Balb-c y detección de anticuerpos para *N. caninum*

3.3.2 Inoculación de ooquistes tipo *Hammondia heydorni* en ratones Balb-c inmunodeprimidos y detección de anticuerpos para *N. caninum*

No se detectaron anticuerpos para *N. caninum* en los ratones Balb-c inoculados con ooquistes ni en los ratones control no inoculados mediante la técnica de IFI, ni se evidenciaron elementos parasitarios correspondientes a *N. caninum* en el SNC de los mismos mediante el examen microscópico.

3.3.3. Inoculación de ooquistes tipo *Hammondia heydorni* en meriones y detección de anticuerpos para *N. caninum*

Mediante la técnica de Aglutinación se pudo demostrar la presencia de anticuerpos para *N. caninum* en 9 de 55 meriones inoculados con ooquistes tipo *H. heydorni*.

Los ooquistes que indujeron la formación de anticuerpos para *N. caninum* en los meriones correspondieron a 3 de las 23 muestras inoculadas (13 %). Los resultados se expresan en la **tabla n° 10**

Tabla n° 10: Detección de anticuerpos para *Neospora caninum* en meriones inoculados con ooquistes tipo *Hammondia heydorni* mediante el test de Aglutinación directa (Vétoquinol).

Muestra N°	Meriones inoculados		Sangrado (días post inoculación)	Serología <i>N. caninum</i> Título AT
	N°	Identificación		
32	2	32/1	91	<40
		32/2	91	<40
			126	<40
33	3	33/1	*	<40
		33/2	34	<40
		33/3	34	<40
34	2	34/1	34	<40
		34/2	34	<40
35	2	35/1	91	<40
			126	<40
		35/2	91	<40
			126	<40
36	3	36/1	28	<40
		36/2	28	<40
		36/3	28	<40
37	3	37/1	44	≥160
			84	≥160
		37/2	44	≥160
			84	≥160
		37/3	68	≥160
38	3	38/1	44	40
			84	<40
		38/2	44	<40
			84	<40
		38/3	68	<40
39	2	39/1	88	<40
		39/2	88	<40
40	2	40/1	88	<40
		40/2	88	<40
41	2	41/1	295	<40
		41/2	295	<40
42	2	42/1	105	<40

		42/2	105	<40
43	3	43/1	105	<40
		43/2	105	<40
44	2	44/1	89	≥160
			262	≥160
		44/2	89	<40
			262	<40
45	2	45/1	35	<40
		45/2	35	<40
46	2	46/1	35	<40
		46/2	35	<40
47	5	47/1	29	≥160
		47/2	29	≥160
		47/3	43	≥160
		47/4	43	≥160
		47/5	43	≥160
49	2	49/1	30	<40
		49/2	30	<40
50	3	50/1	41	<40
		50/2	41	<40
		50/3	41	<40
51	3	51/1	27	<40
		51/2	27	<40
		51/3	27	<40
52	3	52/1	28	<40
		52/2	28	<40
		52/3	28	<40
53	1	53/1	27	<40
54	2	54/3	108	<40
		54/4	108	<40
55	3	55/1	34	<40
		55/2	34	<40
		55/3	34	<40

3.3.4 Detección de anticuerpos para *N. caninum* en perros que eliminaron ooquistes tipo *Hammondia heydorni*

No se detectaron anticuerpos para *N. caninum* en ninguno de los perros eliminadores de ooquistes a los que se les pudo extraer sangre (n° 36, 37, 38, 39, 40, 43, 47 y 51) en los sangrados realizados (título IFI <1:25).

3.3.5 Procesamiento de meriones serológicamente positivos a *N. caninum*

3.3.5.1 Reinoculación en meriones

En los meriones inoculados con homogeneizado de SNC de los meriones n° 37/1 (meriones n° 1a y 1b) y n° 37/2 (meriones 2a y 2b) y en los inoculados con un homogeneizado de corazón, pulmón, hígado y bazo del merión n° 37/2 (meriones 2c y 2d) no se detectaron anticuerpos para *N. caninum* mediante la técnica de Aglutinación descripta, ni taquizoítos en los lavajes peritoneales a los 6 días post inoculación.

3.3.5.2 Inoculación de tejidos en cultivos celulares

En los cultivos de células Vero inoculados con homogeneizados de SNC de los meriones n° 37/1 y 37/2 no se detectó desarrollo de *N. caninum* durante los 2 meses de control de los mismos. Al cabo de este tiempo los cultivos fueron desechados.

3.3.5.3 Exámen microscópico directo y estudios histopatológico e inmunohistoquímico de muestras de tejidos de meriones seropositivos a *N. caninum*

En la observación microscópica en fresco de muestras de homogeneizado de SNC de los meriones n° 37/1 y 37/2 (positivos a *N. caninum* mediante la prueba de Aglutinación (Título $\geq 1:160$)) no se detectaron quistes correspondientes a este parásito.

En el exámen histopatológico del merion n° 37/1 se observó degeneración neuronal y edema en cerebro, degeneración hidrópica en hígado y neumonía de tipo intersticial, no presentando alteraciones el resto de los cortes observados.

En el merion n° 37/2 se observó gliosis de tipo focal y difusa y edema en cortes de cerebro ; en hígado se notó degeneración hidrópica severa, pérdida de la arquitectura tisular, con pérdida de la disposición de los hepatocitos en cordones y marcada congestión de venas centrolobulillares; en cortes de pulmón se observó un patrón de neumonía intersticial con congestión de vasos sanguíneos, hepatización roja, áreas de enfisema, descamación del epitelio bronquial y alveolitis; en el resto de los cortes no se notaron alteraciones.

En los cortes tratados por inmunohistoquímica no se detectaron parásitos.

3.3.6 Inoculación de ooquistes tipo *Hammondia heydorni* en cobayos y detección de anticuerpos para *N. caninum*.

En los cobayos inoculados con ooquistes tipo *H. heydorni* no se detectaron anticuerpos para *N. caninum* a los 30 días post inoculación mediante las técnicas de aglutinación y de IFI. Las muestras de suero de ambos cobayos obtenidas el día previo a la inoculación y 30 días posteriores a la misma resultaron positivas a *T. gondii* mediante la técnica de IFI (Título ≥ 100). No se detectaron parásitos ni lesiones en los órganos revisados.

3.4 Identificación de ooquistes de *Neospora caninum* y diagnóstico de infección en meriones y cultivos celulares mediante técnicas de PCR

Se demostró la presencia de anticuerpos para *N. caninum* en los 3 meriones inoculados con ooquistes de la muestra n° 37 y de focos inflamatorios y quistes en el cerebro de uno de ellos. Mediante estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos se comprobó la infección en los ratones KO inoculados con homogeneizados de cerebro de estos meriones, demostrándose la presencia de parásitos y lesiones inflamatorias y necróticas en diversos tejidos.

Se realizó el aislamiento de *N. caninum* en cultivos de células M617 inoculadas con el cerebro de uno de los ratones KO inoculados.

Se reprodujo la infección en ratones KO con taquizoítos obtenidos de este cultivo.

Mediante las técnicas de PCR utilizadas se demostró que los ooquistes inoculados y los

organismos obtenidos en cultivos celulares y en cerebro de merion correspondían a *N. caninum*. Los resultados detallados se hallan en **13**.

3.5 Detección de ooquistes en materia fecal y anticuerpos para *N. caninum* en perros alimentados con tejidos de animales infectados experimentalmente con *N. caninum*.

Se detectaron escasos ooquistes tipo *H. heydorni* en la materia fecal del cachorro el día 6 post ingestión del merión infectado (<1 ooquiste por campo de menor aumento).

En uno de los dos meriones inoculados con el sedimento de la materia fecal del cachorro (merión n° 56/1) se detectó un título de 1:80 por el test de aglutinación directa para *N. caninum* (Vétoquinol) mientras que el resto de los meriones fue negativo (Título <1:80).

No se detectó seroconversión del cachorro a los 21 días post ingesta de los tejidos del merión seropositivo a *N. caninum* (Título IFI <1:25).

3.6 Determinación de la prevalencia serológica para *N. caninum* en perros de áreas rurales y urbanas de Argentina

Los resultados fueron informados en **(13)**. Brevemente, Se determinó una prevalencia serológica para *N. caninum* en perros de 37,8 % (121/320). Esta fue de 47,7 % en perros mayores de 12 meses y de 12,7 % en los de hasta 12 meses de edad.

La seroprevalencia fue de 48 % en perros de tambos bovinos, de 54,2 % en perros de establecimientos bovinos de cría y de 26,2 % en perros de áreas urbanas.

4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Durante el presente estudio se detectaron ooquistes tipo *Hammondia heydorni* en el 2,97 % (38/1277) del total de perros muestreados. La prevalencia fue significativamente mayor ($P < 0,001$) en los perros de hasta 6 meses que en los mayores de 6 meses. Del total de muestras de ooquistes tipo *Hammondia heydorni* inoculadas ($n = 34$), 3 muestras (n° 37, 44 y 47) correspondieron a *Neospora caninum*. Dos de las 3 muestras correspondieron a caninos menores de 6 meses. Se estima que en la población de perros investigada, la prevalencia de la neosporosis canina por detección de ooquistes es baja, de aproximadamente de 0,26 % (3,35/1277).

En las pruebas de reconocimiento de ooquistes por medio de la técnica de IFI, se observó fluorescencia débil en ooquistes del complejo *I. ohioensis* e *I. canis* al enfrentarlos a suero hiperinmune para *N. caninum* y también en los ooquistes de *T. gondii* al enfrentarlos con este suero; se consideró inespecífica ya que tuvo intensidad similar en ooquistes de distintos coccidios frente al mismo antisuero. Por lo tanto, si bien esta técnica no fue evaluada utilizando ooquistes de *N. caninum* (debido al escaso número obtenido), se consideró que por su inespecificidad no serviría para ser utilizada en el reconocimiento de los mismos.

En el presente trabajo se utilizaron ratones Balb-c, meriones y cobayos para reproducir experimentalmente la infección por *N. caninum*. Los ratones Balb-c y los meriones son considerados susceptibles a la infección por *N. caninum* (73, 58, 53). Los cobayos no habían sido utilizados anteriormente para el aislamiento de *N. caninum*.

En los ratones Balb-c inoculados con ooquistes tipo *Hammondia heydorni* no se detectaron anticuerpos ni elementos parasitarios correspondientes a *N. caninum*. Se consideró que los ooquistes inoculados en esos casos no correspondieron a *N. caninum* pero no se contó con suficiente cantidad de ooquistes de estas muestras para repetir la inoculación en meriones.

La inoculación en meriones en el presente trabajo permitió diferenciar los ooquistes de *H. heydorni* de los de *N. caninum* y comprobar que los perros son hospedadores definitivos naturales de *N. caninum*. Se demostró que 3 de las 23 muestras de ooquistes tipo *H. heydorni* inoculadas (muestras n° 37, 44 y 47) correspondían a *N. caninum*. La detección de anticuerpos para *N. caninum* mediante el test de Aglutinación en 9 de los 55 meriones inoculados confirmó la identidad de los ooquistes.

Los lesiones halladas en el cerebro de los meriones inoculados en el Laboratorio de Inmunoparasitología fueron compatibles con las causadas por *N. caninum*.

La identidad de estos ooquistes fue confirmada en un trabajo en conjunto con el Dr. J. P. Dubey y col. en el U. S. Department of Agriculture, Parasite Biology, Epidemiology and Systematics Laboratory en Beltsville, Maryland; en este trabajo se detectaron anticuerpos y quistes tisulares de *N. caninum* en el cerebro de meriones inoculados con ooquistes de la muestra n° 37 ; se realizó el aislamiento en cultivos celulares a partir de cerebro de ratones KO inoculados con cerebro de meriones infectados; se estableció

mediante la prueba de PCR que el ADN extraído de los ooquistes, del cerebro de meriones inoculados y de los organismos que desarrollaron en los cultivos celulares correspondía a *N. caninum* (13) y se obtuvo el primer aislamiento de una cepa de *N. caninum* a partir de las heces de un perro naturalmente infectado.

En los 2 caninos que eliminaron ooquistes de *N. caninum* (que indujeron a la formación de anticuerpos en meriones) no se detectaron anticuerpos anti- *N. caninum* (Título IFI < 1:25). Los perros fueron sangrados a los 0, 28 y 49 días (muestra n° 37), y 137 días (muestra n° 47) de ser detectada la eliminación de ooquistes.

En el trabajo de Mc Allister y col. (77) que comprobó que el perro puede actuar experimentalmente como hospedador definitivo de *N. caninum*, 3 perros eliminaron ooquistes luego de la ingestión de quistes tisulares, pero uno de estos perros no desarrolló un título de anticuerpos detectable, y un cuarto perro infectado no eliminó ooquistes pero seroconvirtió. La seroconversión fue evaluada a los 37 días post infección ; el período prepatente observado fue de 8 y 13 días y el patente de 7-19 días. Lindsay y col. (71) alimentaron 2 perros con quistes tisulares de *N. caninum* de la cepa NC-beef; ambos perros eliminaron ooquistes con las heces a partir de los 5 y 6 días post infección, pero sólo uno de ellos seroconvirtió. En el perro n° 1, (tratado con acetato de metilprednisolona), se detectaron anticuerpos tipo IgG a los 35 y 42 días post infección, pero no a los 28 dpi. En el perro n° 2 no se detectaron anticuerpos durante ese mismo período.

En este trabajo, los caninos fueron sangrados después de períodos similares o más extensos, por lo que se considera que la ausencia de seroconversión no se debió a un retraso de la respuesta humoral. La misma podría atribuirse a que no se haya producido

la infección extraintestinal, ya que ambos perros recibieron medicamentos que tienen efectos anticoccidiales (sulfaguanidina en el perro muestra n° 37 y trimetoprima-sulfadimetoxina y toltrazuril en el perro muestra n° 47), que podrían haberla impedido y por lo tanto no se generaron anticuerpos tipo IgG contra taquizoítos. La técnica de IFI utilizada sólo detecta anticuerpos tipo IgG dirigidos contra determinantes antigénicos de los taquizoítos **(24)**. Según Mc Allister, la cepa de parásito podría tal vez influir en la ocurrencia o no de seroconversión **(77)**.

Los perros que eliminaron ooquistes de *N. caninum* en los trabajos de Mc Allister y col. **(77)** y Lindsay y col. **(71)** no presentaron ningún signo clínico durante el período de excreción de ooquistes, en este trabajo el perro n° 37 presentó heces blandas, el n° 44 presentó diarrea crónica (evolución aproximada 1 mes) y el n° 47 diarrea con presencia de sangre, rinitis serosa, pústulas en abdomen y fiebre. Si los signos observados, sobre todo la presencia de diarrea, se deben a *N. caninum* o a otras etiologías asociadas se desconoce. En el caso del canino n° 47, al menos parte de la signología observada fue atribuída a una infección simultánea con Distemper; a los signos mencionados anteriormente deben agregarse defectos en el esmalte dental, observados luego del cambio de dentición del cachorro, hallazgo característico en esta enfermedad.

La inoculación de ooquistes tipo *H. heydorni* en cobayos dió resultados serológicos y parasitológicos negativos para *N. caninum*, incluso habiéndose inoculado una muestra (muestra n° 37), que fue ampliamente confirmada como correspondiente a *N. caninum* **(13)**. Esto podría deberse al escaso número de ooquistes inoculados o a la baja susceptibilidad de esta especie a la infección por *N. caninum*. Se requieren estudios más amplios para determinar este aspecto.

Se completó experimentalmente el ciclo evolutivo de *N. caninum* (cepa NC-6 Argentina) con la eliminación de ooquistes en las heces del perro que ingirió el merión infectado (merion nº 37/3) (Título AT $\geq$ 1:160). Este hecho fue comprobado microscópicamente mediante la observación de ooquistes en la materia fecal del perro y serológicamente por el desarrollo de seropositividad en uno de los meriones inoculados con sedimento de materia fecal.

La eliminación de escasa cantidad de ooquistes concuerda con lo observado por otros autores (44, 77) y sería la razón por la cual se infectó un solo animal y podría deberse al bajo número de quistes consumido (76).

Para reproducir la transmisión hospedador intermediario-perro hasta el presente no se habían utilizado meriones.

Se comprobó que la prevalencia serológica para *N. caninum* en caninos en Argentina (37,8 %) fue más alta que la observada en otros países del mundo (13). Ésta fue significativamente mayor en perros de tambos (48 %) y de establecimientos bovinos de cría (54,2 %) que en perros de áreas urbanas (26,2 %), y en perros > 12 meses (47,7 %) que en los $\leq$ 12 meses (12,7 %), sugiriendo exposición post natal.

Si bien *N. caninum* puede ser eficientemente transmitida por vía vertical en bovinos durante varias generaciones (39), y esto contribuiría significativamente al mantenimiento de la infección en un rodeo, la transmisión postnatal de este parásito en bovinos también está bien documentada (96, 31, 64).

Algunos estudios epidemiológicos encontraron una asociación entre la ocurrencia de neosporosis bovina en tambos y la presencia de perros en los mismos (82). Estos resultados estarían avalados por el descubrimiento de que el perro puede actuar como

hospedador definitivo de *N. caninum* en condiciones experimentales (77) y que en perros naturalmente infectados se produce eliminación de ooquistes al medio, los que constituirían una fuente de infección para los bovinos (13). De Marez y col. (28) lograron infectar oralmente bovinos con ooquistes de *N. caninum*.

Aún resta determinar cuales son las principales fuentes de infección para el perro. Se sabe que los fetos abortados y los terneros infectados por vía trasplacentaria, pueden albergar quistes viables, por lo tanto, los perros podrían infectarse a través de su consumo. Recientemente se demostró que perros alimentados con placentas de vacas seropositivas a *N. caninum* eliminaron ooquistes de *N. caninum* al medio (32). Un estudio de Dijkstra y col. (30), sugiere que los perros de tambos se infectarían a través del consumo de placentas, descargas uterinas y fluidos fetales de bovinos infectados; estos perros a su vez, podrían causar una infección postnatal en el rodeo mediante la eliminación de ooquistes. En el mismo estudio, se comprobó que en tambos con evidencia de infección postnatal en bovinos, los perros defecaban con mayor frecuencia en el sector de alimentación y de almacenamiento de granos y heno, que en tambos sin evidencia de este tipo de infección.

Actualmente se están llevando a cabo estudios para evaluar la importancia de la transmisión horizontal en nuestro medio.

Hasta el momento se desconocen cuales son las principales fuentes de infección para el perro y si además existen otros hospedadores definitivos. Se han detectado anticuerpos para *N. caninum* en varias especies de cánidos silvestres (zorros, coyotes, dingos) (4), pero no se ha comprobado que eliminen ooquistes (72).

5 BIBLIOGRAFÍA

- 1- ANDERSON, M. L.; BLANCHARD, P. C.; BARR, B. C.; DUBEY, J. P.; HOFFMAN, R. L. and CONRAD, P. A.(1991). *Neospora*-like protozoan infections as a major cause of abortion in California dairy cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 198: 241-244.
- 2- ANDERSON, M. L.; PALMER, C. W.; THURMOND, M. C.; PICANSO, J. P.; BLANCHARD, P. C.; BREITMEYER, R. E.; LAYTON, A. W.; MC ALLISTER, M.; DAFT, B.; KINDE, H.; READ, D. H.; DUBEY, J. P.; CONRAD, P. A. and BARR, B. C. (1995). Evaluations of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. J. Am. Vet. Med. Assoc. 207: 1206-1210.
- 3- ANDERSON, M. L.; REYNOLDS, J. P.; ROWE, J. D.; SVERLOW, K. W.; PACKHAM, A. E.; BARR, B. C. and CONRAD, P. A. (1997). Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp. infection in dairy cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 210: 1169-1172.
- 4- BARBER, J. S.; GASSER, R. B.; ELLIS, J.; REICHEL, M. P.; MC MILLAN, D. and TREES, A. J. (1997). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. J. Parasitol. 83: 1056-1054.
- 5- BARBER, J. S and TREES, A. J. (1996). Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. Vet. Record. 139: 439-443.
- 6- BARBER, J. S and TREES, A. J. (1998). Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. Int. J. Parasitol. 28: 57-64.
- 7- BARLING, K. S., J. W. MC. NEILL, J. A. THOMPSON, J. C. PASCHAL, F. T. MC. COLLUM, III, T. M. CRAIG, and L. G. ADAMS. (2000). Association of serologic status

for *Neospora caninum* with postweaning weight gain and carcass measurements in beef calves. J. Am. Vet. Med. Assoc. 217: 1356-1360.

8- BARR, B. C.; ANDERSON, M. L.; DUBEY, J. P. and CONRAD, P. A.(1991). *Neospora*-like protozoan infections associated with bovine abortions. Vet. Pathol. 28: 110-116.

9- BARR, B. C.; ANDERSON, M. L.; WOODS, L. W.; DUBEY, J. P. and CONRAD, P. A.. (1992). *Neospora*-like protozoal infections associated with abortion in goats. J. Vet. Diagn. Invest. 4: 365-367.

10- BARR, B. C.; CONRAD, P. A.; BREITMEYER, R.; SVERLOW, K.; ANDERSON, M. L.; REYNOLDS, J.; CHAUVET, A. E.; DUBEY, J. P. and ARDANS, A. A. (1993). Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: four cases (1990-1992). J. Am.Vet. Med. Assoc. 202: 113-117.

11- BARR, B. C.; CONRAD, P. A.; SVERLOW, K. W.; TARANTAL, A. F. and HENDRICKX, A. G. (1994). Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. Laboratory Investigation. 71: 236-242.

12- BARTA, J. R. and J. P. DUBEY. (1992). Characterization of anti-*Neospora caninum* hyperimmune rabbit serum by western blot analysis and immunoelectron microscopy. Parasitol. Res. 78: 689-694.

13- BASSO, W.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M. C.; HILL, D. E.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K. and DUBEY, J. P. (2001) First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. J. Parasitol. 87: 612-618.

- 14- BASSO, W.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M. C.; MOORE, P.; RAMBEAU, M.; UNZAGA, J. M.; CAMPERO, C., BACIGALUPE, D. and DUBEY, J. P. (2001). Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef-cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. J. Parasitol. 87: 906-907.
- 15- BJERKÅS, I. and DUBEY, J. P. (1991). Evidence that *Neospora caninum* is identical to *Toxoplasma* –like parasite of Norwegian dogs. Acta Vet. Scand. 32: 407-410.
- 16- BJERKÅS, I., M. C. JENKINS, and J. P. DUBEY. (1994). Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1: 214-221.
- 17- BJERKÅS, I.; MOHN, S. F. and PRESTHUS J. (1984). Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and miositis in dogs. Z. Parasitenkd. 70: 271-274.
- 18- BJERKÅS, I. and PRESTHUS J. (1988). Immunohistochemical and ultrastructural characteristics of a cyst-forming sporozoan associated with encephalomyelitis and miositis in dogs. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 96: 445-454.
- 19- BLAGBURN, B. L.; LINDSAY, D. S.; SWANGO, L. J.; PIDGEON, G. L. and BRAUND, K. G. (1988). Further characterization of the biology of *Hammondia heydorni*. Vet. Parasitol. 27: 193-198.
- 20- BUXTON, D.; MALEY, S. W.; THOMSON, K. M.; TREES, A. J. and INNES, E. A. (1997). Experimental infection of non-pregnant and pregnant sheep with *Neospora caninum*. J. Comp. Pathol. 117: 1-16.
- 21- CAMPERO, C. M.; ANDERSON, M. L.; CONOSCIUTO, G.; ODRIOZOLA, H.; BRETSCHNEIDER, G. and POSO, M. A. (1998). *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in Argentina. Vet. Rec. 143: 228-229.

- 22-** CASTELLANO, M. C.; BASSO, W.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M. C.; BACIGALUPE, D. y UNZAGA, J. M. (1999). Neosporosis canina. Descripción de un caso. *Selecciones Veterinarias*. 7 (3): 244-246.
- 23-** CASTELLANO, M.C.; BASSO, W.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M. C.; BACIGALUPE, D.; UNZAGA, J. M.; ALVAREZ, M. L.; DI LORENZO, C. (1998). Canine Neosporosis in Argentina. A Case Report. XXIII Congress of the World Small Animal Veterinary Association. Buenos Aires, 5/10 – 9/10/1998. Proceedings: pag. 806.
- 24-** COLE, R. A.; LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L.; SORJONEN, D. C. and DUBEY, J. P. (1995). Vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *J. Parasitol.* 81: 208-211.
- 25-** CONRATHS, F. J. and SCHARES, G. (1999). Diagnostik und Epidemiologie *Neospora caninum*-assoziierter Aborte beim Rind. *Tierarztl. Prax. Ausg. G. Grosstiere. Nutztiere*. 27: 145-153.
- 26-** CORBELLINI, L. G.; COLODEL, E. M. and DRIEMEIER, D. (2001). Granulomatous encephalitis in a neurologically impaired goat kid associated with degeneration of *Neospora caninum* tissue cysts. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13: 416-419.
- 27-** DAVISON, H. C.; OTTER, A. and A. J. TREES. (1999). Significance of *Neospora caninum* in British dairy cattle determined by estimation of seroprevalence in normally calving cattle and aborting cattle. *Int. J. Parasitol.* 29: 1189-1194.
- 28-** DE MAREZ, T.; LIDDELL, S.; DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C. and GASBERRE, L. (1999). Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. *Int. J. Parasitol.* 29: 1647-1657.

- 29-** DE MEERSCHMAN, F.; SPEYBROECK, N.; BERKVEN, D.; RETTIGNERA, C.; FOCANT, C. ; LECLIPTEUX, T.; CASSART, D. and LOSSON, B. (2002). Fetal infection with *Neospora caninum* in dairy and beef cattle in Belgium. *Theriogenology* 58: 933-945.
- 30-** DIJKSTRA, TH.; BARKEMA, H. W.; EYSKER, M.; HESSELINK, J. W. and WOUDA, W. (2002). Natural transmission routes of *Neospora caninum* farm dogs and cattle. *Vet. Parasitol.* 105: 99-104.
- 31-** DIJKSTRA, TH.; BARKEMA, H. W.; EYSKER, M. and WOUDA, W. (2001). Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. *Int. J. Parasitol.* 31: 209-215.
- 32-** DIJKSTRA, TH.; EYSKER, M.; SCHARES, G.; CONRATHS, F. J., WOUDA, W. and BARKEMA, H. W. (2001). Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int. J. Parasitol.* 31: 747-752.
- 33-** DI LORENZO, C.; VENTURINI, M. C.; CASTELLANO, C.; VENTURINI, L.; UNZAGA, J. M. y BACIGALUPE, D. (1997). Detección de anticuerpos anti- *Neospora caninum* y anti- *Toxoplasma gondii* en perros de área urbana. *Revista de Medicina Veterinaria.* 78: 325-326.
- 34-** DUBEY, J. P. (1975). Experimental *Isospora canis* and *Isospora felis* infection in mice, cats and dogs. *J. Protozool.* 22: 416-417.
- 35-** DUBEY, J. P. (1978). Life-cycle of *Isospora ohioensis* in dogs. *Parasitology* 77: 1-11
- 36-** DUBEY, J. P. (1978). Pathogenicity of *Isospora ohioensis* infection in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173: 192-197.

- 37-** DUBEY, J. P. (1996). WAAVP and Pfizer Award for excellence in veterinary parasitology research pursuing life cycles and transmission of cyst-forming coccidia of animals and humans. *Vet. Parasitol.* 64: 13-20.
- 38-** DUBEY, J. P. (1998). Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int. Journal for Parasitology* 28: 1019-1024.
- 39-** DUBEY, J. P. (1999). Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Vet. Parasitol.* 84: 349-367.
- 40-** DUBEY, J. P. (1999). Neosporosis in cattle: biology and economic impact. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 214 (8): 1160-1163.
- 41-** DUBEY, J. P. (2003). Neosporosis in cattle. *J. Parasitol.* 89 (Suppl.): S42-S56.
- 42-** DUBEY, J. P. (2003). Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J. Parasitol.* 41 (1): 1-16.
- 43-** DUBEY, J. P.; ACLAND, H. M. and A. N. HAMIR. (1992). *Neospora caninum* (Apicomplexa) in a stillborn goat. *J. Parasitol.* 78: 532-534.
- 44-** DUBEY, J. P., BARR, B. C.; BARTA, J. R.; BJERKAS, I.; BJORKMAN, C.; BLAGBURN, B. L.; BOWMAN, D. D.; BUXTON, D.; ELLIS, J. T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D. E.; HOWE, D. K.; JENKINS, M. C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A. E.; MATTSSON, J. G.; MCALLISTER, M. M.; MODRY, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L. D.; SPEER, C. A.; TREES, A. J.; UGGLA, A.; UPTON, S. J.; WILLIAMS, D. J. and D. S. LINDSAY. (2002). Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *Int. J. Parasitol.* 32: 929-946.

- 45-** DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A; TOPPER, M. J. and UGGLA, A. (1988). A newly recognized fatal protozoan disease of dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 192: 1269-1285.
- 46-** DUBEY, J. P.; CARPENTER, J.; TOPPER, M. J. and UGGLA, A. (1989). Fatal toxoplasmosis in dogs. Journal of the American Animal Hospital Association. 25: 659-664.
- 47-** DUBEY, J. P. and DE LAHUNTA (1993). Neosporosis associated congenital limb deformities in a calf. Applied parasitology. 34: 229-233.
- 48-** DUBEY, J. P., K. R. DOROUGH, M. C. JENKINS, S. LIDDELL, C. A. SPEER, O. C. KWOK, and S. K. SHEN. (1998). Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. Int. J. Parasitol. 28: 1293-1304.
- 49-** DUBEY, J. P., HARTLEY, W. J. and LINDSAY, D. S. (1990). Congenital *Neospora caninum* infection in a calf with spinal cord anomaly. J. Am. Vet. Med. Assoc. 197: 1043-1044.
- 50-** DUBEY, J. P.; HATTEL, A. L.; LINDSAY, D. S. and TOPPER, M. J. (1988) Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. J. Am. Vet. Med. Assoc. 193: 1259-1263.
- 51-** DUBEY, J. P. and LINDSAY, D. S. (1990). *Neospora caninum* induced abortion in sheep. J. Vet. Diagn. Invest. 2: 230-233.
- 52-** DUBEY, J. P. and LINDSAY, D. S. (1996). A review of *Neospora caninum* and neosporosis. Vet. Parasitol. 67: 1-59.

- 53- DUBEY, J. P. and LINDSAY, D. S. (2000). Gerbils are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocysts. *Parasitol. Res.* 86: 165-168.
- 54- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; ADAMS, D. S.; GAY, J. M.; BASZLER, T. V.; BLAGBURN, B. L. and THULLIEZ, P. (1996). Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. *Am. J. Vet. Res.* 57: 329-336.
- 55- DUBEY, J. P. and MAHRT, J. L. (1978). *Isospora neorivolta* SP. N. from the domestic dog. *J. Parasitol.* 64: 1067-1073.
- 56- DUBEY, J. P. and MEHLHORN, H. (1978). Extraintestinal stages of *Isospora ohioensis* from dogs in mice. *J. Parasitol.* 64: 689-695.
- 57- DUBEY, J. P.; MORALES, J. A.; VILLALOBOS, P.; LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L. and TOPPER, M. J. (1996). Neosporosis-associated abortion in a dairy goat. *J. Am. Vet. Assoc.* 208: 263-265.
- 58- GONDIM, L. F. P.; SAEKI, S.; ONAGA, H.; HARITANI, M.; YAMANE, I. (1999). Maintenance of *Neospora caninum* tachyzoites using Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *N. Z. Vet. J.* 47: 36.
- 59- HELMICK, B.; OTTER, A.; MCGARRY, J. and BUXTON, D. (2002). Serological investigation of aborted sheep and pigs for infection by *Neospora caninum*. *Res. Vet. Sci.* 73:187.
- 60- HEMPHILL, A. (1999). The host-parasite relationship in neosporosis. *Adv. in Parasitol.* 11: 47-104.
- 61- HEYDORN, A. O. (1973). Zum Lebenszyklus der kleinen Form von *Isospora bigemina* des Hundes. I: Rind und Hund als mögliche Zwischenwirte. *Berl. Münch. Tierärztl. Wsch.* 86: 323-329.

- 62-** JARDINE, J. E. (1996). The ultrastructure of bradizoites and tissue cysts of *Neospora caninum* in dogs: absence of distinguishing morfological features between parasites of canine and bovine origin. Vet. Parasitol. 62: 231-240.
- 63-** JENSEN, A. M.; BJORKMAN, C; KJELDSSEN, A. M.; WEDDERKOPP, A.; WILLADSEN, C.; UGGLA, A. and LIND. P. (1999). Associations of *Neospora caninum* seropositivity with gestation number and pregnancy outcome in Danish dairy herds. Prev. Vet. Med. 40:151-163.
- 64-** KASHIWAZAKI, Y.; PHOLPARK, S.; CHAROENCHAI, A.; POLSAR, C.; TEEVERAPANYA, S. and PHOLPARK, M. (2001). Postnatal neosporosis in dairy cattle in northeast Thailand. Vet. Parasitol. 94: 217-220.
- 65-** LEVINE, N. D. (1985). Veterinary Protozoology. Iowa State University Press. Ames, Iowa. 360-362.
- 66-** LINDSAY, D.; BLAGBURN, B. (1991). Coccidial parasites of cats and dogs. Comp. Contin. Ed. Pract. Vet. 13: 759-765.
- 67-** LINDSAY, D.; BLAGBURN, B., DUBEY, J. P. (1998). Feline toxoplasmosis and the importance of the *Toxoplasma gondii* oocyst. Comp. Cont. Educ. Pract. Vet. 448-461, 506.
- 68-** LINDSAY, D. S. and DUBEY, J. P. (1989). Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. Am. J. Vet. Res. 50: 1981-1983.
- 69-** LINDSAY, D. S. and DUBEY, J. P. (2000). Canine neosporosis. J. Vet. Parasitol. 14: 1-11.

- 70-** LINDSAY, D.; DUBEY, J.P.; BLAGBURN, B. (1997) Biology of *Isospora* spp from Humans, Nonhuman Primates, and Domestic Animals. *Clinical Microbiology Reviews*, 10: 19-34.
- 71-** LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P and DUNCAN, R. B. (1999). Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 82: 327-333.
- 72-** LINDSAY, D. S.; KELLY, E. J.; MC KOWN, R. D.; STEIN, F. J.; PLOZER, J.; HERMAN, J.; BLAGBURN, B. L. and DUBEY, J. P. (1996). Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in coyotes (*Canis latrans*) and experimental infection of coyotes with *Neospora caninum*. *J. Parasitol.* 82: 657-659.
- 73-** LINDSAY, D. S.; LENZ, S. D.; COLE, R. A.; DUBEY, J. P. and BLAGBURN, B. L. (1995). Mouse model for central nervous system *Neospora caninum* infections. *J. Parasitol.* 81: 313-315.
- 74-** LINDSAY, D. S.; STEINBERG, H.; DULBIELZIG, R. R.; SEMRAD, S. D.; KONKLE, D. M.; MILLER, P. E. and BLAGBURN, B. L. (1996). Central nervous system neosporosis in a foal. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8: 507-510.
- 75-** LONG, P. (1990) *Coccidiosis of Man and Domestic Animals*. 1ª edición. CRC Press Inc., Boca Ratón, Florida, U.S.A.
- 76-** MC ALLISTER, M. M. (1999) Uncovering the Biology and Epidemiology of *Neospora caninum*. *Parasitology Today* 15 (6): 216-217.
- 77-** MC ALLISTER, M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A. and MC GUIRE A. M. (1998). Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *J. Parasitol.* 28: 1473-1478.

- 78-** MEHLHORN, H. (2000) Encyclopedic Reference of Parasitology, 2nd edition, Heidelberg, Springer Verlag, Berlin.
- 79-** MEHLHORN, H.; PIEKARSKI, G. (1993) Fundamentos de Parasitología, Parásitos del hombre y de los animales domésticos. 3^o edición. Acribia, España. Capítulo 5.
- 80-** MOORE, D. P.; CAMPERO, C. M., ODEON, A. C.; POSSO, M. A.; CANO, D.; R. LEUNDA, M.; BASSO, W.; VENTURINI, M. C. and SPATH, E. (2002). Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. Vet. Parasitol. 107: 303-316.
- 81-** MOORE, D. P.; POSSO, M. A.; ODEON, A. C. y CAMPERO, C. M. (2000). Caracterización histopatológica de lesiones causadas por *Neospora caninum* en el sistema nervioso central de fetos bovinos abortados. Segunda Reunión Argentina de Patología Veterinaria. 27 al 29/9/2000. Libro de Resúmenes: 127.
- 82-** PARÉ, J; FECTEAU, G.; FORTIN, M. and MARSOLAIS, G. (1998). Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. J. Am. Vet. Med. Assoc. 213 (11): 1595-1598.
- 83-** PARE, J.; HIETALA, S. K. and THURMOND, M. C. (1995) Congenital *Neospora* Infection in Dairy-Cattle. Veterinary Record 134 (20): 531-532.
- 84-** PARE, J.; THURMOND, M. C. and HIETALA, S. K.. (1996). Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhoo mortality. Can. J. Vet. Res. 60: 133-139.
- 85-** PATITUCCI, A. N., ALLEY, M. R.; JONES, B. R. and CHARLESTON, W. A. G. (1997). Protozoal encephalomyelitis of dogs involving *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in New Zealand. New Zealand Veterinary Journal 45: 231-235.

- 86-** PETERS, M.; LÜTKEFELS, E.; HECKEROTH, A. R. and 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.
- 87-** REICHEL, M. P. (2000). *Neospora caninum* infections in Australia and New Zealand. *Aust. Vet. J.* 78: 258-261.
- 88-** ROMMEL, M. (2000) Protozoeninfektionen von Hund und Katze. En: -ROMMEL, M.; ECKERT, J.; KUTZER, E.; KÖRTING, W.; SCHNIEDER, T. *Veterinärmedizinische Parasitologie*, 5. Auflage, Parey, Berlin. 495-526.
- 89-** RUEHLMANN, C.; PODELL, M.; OGLESBEE, M., and DUBEY, J. P. (1995). Canine neosporosis: a case report and literature review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 31: 174-183.
- 90-** SCHARES, G.; M. PETERS; R. WURM; K. TACKMANN; K. HENNING, and F. J. CONRATHS. (1997). *Neospora caninum* causes abortions in a cattle herd in North Rhine Westphalia. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 104: 208-212.
- 91-** STENLUND, S.; H. KINDAHL; U. MAGNUSSON, A. UGGLA and C. BJÖRKMAN. (1999). Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 85: 227-234.
- 92-** THILSTED, J. P. and DUBEY, J. P. (1989). Neosporosis-like abortion in a herd of dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1: 205-209.
- 93-** THURMOND, M. C. and S. K. HIETALA. (1996). Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 57: 1559-1562.

- 94- THURMOND, M. C. and HIETALA, S. K. (1997). Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. Am.J.Vet.Res. 58: 1381-1385.
- 95- THURMOND, M. C. and HIETALA, S. K.. (1997). Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first- lactation dairy cows. J. Am. Vet. Med. Assoc. 210: 672-674.
- 96- THURMOND, M.; HIETALA, S. and BLANCHARD, P. C. (1997). Herd-based diagnosis of *Neospora caninum* epidemic abortion in cows and evidence for congenital and post-natal transmission. J. Vet. Diagn. Invest. 9: 44-49.
- 97- TRAYSER, C. V. and TODD, K. S. Jr. (1978). Life cycle of *Isospora burrowsi* n sp (Protozoa: Eimeriidae) from the dog *Canis familiaris*. Am. J. Vet. Res. 39: 95-98.
- 98- VENTURINI, M. C.; BACIGALUPE, D.; VENTURINI, L.; BASSO, W.; MOORE, P.; UNZAGA, J. M.; MACHUCA, M. and CAMPERO, C. (2001) . Isolation of *N. caninum* from the brain of a dairy calf in Argentina. Proceedings of the XVIII International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. Stresa, Italia. 26/8 – 30/8/2001. B9 p.
- 99- VENTURINI, M. C.; BASSO, W.; VENTURINI, L.; BACIGALUPE, D.; LARSEN, A.; UNZAGA, J. M. (2002). Detección de anticuerpos para *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii* en sueros de perros remitidos para el diagnóstico.
- XIV Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. Villa General Belgrano, Córdoba, Argentina. 13/11-15/11/2002. Libro de resúmenes. PAR 04

- 100-** VENTURINI, L.; BOERO, C.; BASSO, W., VENTURINI, C y MORENO H. (2002).
Neosporosis en terneros de un feed-lot: su evolución y efectos asociados en la ganancia de peso. Proceedings de la XVIª Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Diagnóstico. Córdoba, Argentina. 13-15 Noviembre de 2002. E-16.
- 101-** VENTURINI, L.; DI LORENZO, C.; VENTURINI, C. y ROMERO, J. (1995)
Anticuerpos anti *Neospora* sp. en vacas que abortaron. Vet. Arg. 12: 167- 170.
- 102-** VENTURINI, M. C.; VENTURINI, L.; BACIGALUPE, D.; BASSO, W.; MACHUCA, M.; ECHAIDE, I.; UNZAGA, J. M.; DI LORENZO, C. and DUBEY, J. P. (1999).
Neospora caninum infections in foetuses and dairy cows with abortions in Argentina. Proceedings of the XVII International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. Copenhagen, Denmark. 15/8 – 19/8/1999. b.2.02.
- 103-** VENTURINI, M. C.; VENTURINI, L.; BACIGALUPE, D.; MACHUCA, M.; ECHAIDE, I.; BASSO, W.; UNZAGA, J. M.; DI LORENZO, C.; GUGLIELMONE, A.; JENKINS, M. C. and DUBEY, J. P. (1999). *Neospora caninum* infections in bovine foetuses and dairy cows with abortions in Argentina. Int. J. Parasitol. 29: 1705-1708.
- 104-** VIGNAU, M. L.; VENTURINI, L. M.; ROMERO, J. R. (1999) Parasitología Práctica, I edición. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata.
- 105-** WADAJKAR, S. V.; SHASTRI, U. V.; NARLADKAR, B. W. (1994). Transmission of *Hammondia heydorni* to guinea pigs and rabbits via dog. J. Appl. Anim. 5: 77-79.
- 106-** WOUDA, W.; MOEN, A. R. and SCHUKKEN, Y. H. (1998). Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. Theriogenology. 49: 1311-1216.

6 PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS

6.1 Determinación serológica de la prevalencia de la infección por *N. caninum* en perros de establecimientos de producción bovina y de áreas urbanas de Argentina.

Esta parte del trabajo de tesis fue publicada previamente en idioma inglés como "*Prevalence of Neospora caninum infection in dogs from beef-cattle farms, dairy farms and from urban areas of Argentina*" Basso, W.; Venturini, L.; Venturini, M. C.; Moore, P.; Rambeaud, M.; Unzaga, J. M.; Campero, C. y Dubey, J. P. en: *Journal of Parasitology* 87 (4) 2001, p. 906-907.

Se adjunta la traducción de este trabajo.

Prevalencia de la infección por *Neospora caninum* en perros de establecimientos bovinos de cría, tambos, y áreas urbanas de Argentina.

Resumen:

La prevalencia de anticuerpos para *Neospora caninum* fue determinada en suero de 320 perros de Argentina utilizando el test de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Se encontraron anticuerpos para *N. caninum* en 121 de 320 (37,8 %) sueros con títulos de 1:50 (21 perros), 1:100 (23 perros), 1:200 (23 perros), 1:400 (17 perros), 1:800 (23 perros), y $\geq 1:1600$ (14 perros). La seropositividad ($\text{IFI} \geq 1:50$) fue mayor en perros de tambos (48 % de 125) y en establecimientos bovinos de cría (54 % de 35) que en

perros de áreas urbanas (26,2 % de 160). La prevalencia de anticuerpos anti-*Neospora caninum* fue mayor en perros mayores de 12 meses de edad (47,7 % 105 de 222) que en perros de hasta 12 meses inclusive (12,7 % de 86) sugiriendo exposición postnatal a la infección por *N. caninum* en perros.

Introducción:

Neospora caninum es una importante causa de mortalidad en perros y bovinos en muchos países incluyendo a la Argentina (10), (8), (22), (13).

Hasta hace poco tiempo, la transmisión vertical de la madre al feto era considerada la principal ruta de transmisión de *N. caninum* en bovinos y perros (10).

En 1998 se identificó al perro como hospedador definitivo de *N. caninum* (16). A pesar de esto, el rol del perro en la epidemiología de la infección por *N. caninum* no se conoce completamente porque sólo unos pocos ooquistes son eliminados y porque ooquistes de *N. caninum* no han sido identificados en las heces de perros naturalmente infectados (14, 11).

Estudios de Canadá, Japón y los Países Bajos, han reportado una correlación positiva entre perros y neosporosis bovina (17, 20, 23). Por lo tanto, la prevalencia de anticuerpos anti-*N. caninum* fue comparada en perros de áreas urbanas y rurales en Argentina.

Materiales y Métodos:

Se examinó suero de 320 perros para la detección de anticuerpos para *N. caninum* utilizando el test de IFI con taquizoítos de *N. caninum* cepa NC-1 derivados de cultivo y

conjugado anti-IgG canina producido en conejo (Sigma, St. Louis, Missouri) (9). Los sueros fueron evaluados por IFI a partir de una dilución 1:50.

160 sueros provinieron de perros atendidos en veterinarias de áreas urbanas, 151 de ellos con datos concernientes a presencia o ausencia de signos neurológicos relacionados con neosporosis. 125 sueros fueron de perros de 23 tambos localizados en la provincia de Buenos Aires, 1 en la provincia de Jujuy, 3 en la provincia de La Pampa y 1 en Tierra del Fuego. 35 sueros fueron de perros de 10 establecimientos de cría bovina de la provincia de Buenos Aires.

Se obtuvieron datos del sexo de 317 perros, de la edad de 308 y de la raza de 314 perros. Los resultados se analizaron utilizando el test de χ^2 (Stalcat, Epi6).

Resultados:

Se encontraron anticuerpos para *N. caninum* en 121 (37,8 %) de 320 perros con títulos de 1:50 (21 perros), 1:100 (23 perros), 1:200 (23 perros), 1:400 (17 perros), 1:800 (23 perros), 1:600 (9 perros), 1:3200 (3 perros), 1:6400 (1 perro), y 1:52500 (1 perro).

La prevalencia de anticuerpos (IFI, $\geq$ 1:50) fue mayor en perros de establecimientos de cría bovina (54,2 % de 35) y de tambos (48 % de 125) que en perros de áreas urbanas (26,2% de 160). Las diferencias fueron estadísticamente significativas ($P < 0,001$). En los 153 perros de áreas urbanas, la seroprevalencia no fue estadísticamente diferente en machos (28,1 % de 71) que en hembras (25,6 % de 82) ($P = 0,86$).

En los 153 perros de los que se conocieron datos acerca de la raza, la seroprevalencia fue de 23,9 % en los de raza pura y de 36,1 % en los mestizos (diferencia no significativa $P = 0,21$). Los títulos de anticuerpos en los perros con signos clínicos no

fueron diferentes de aquellos sin signos clínicos reportados. La prevalencia de anticuerpos aumentó con la edad de los perros con seroprevalencias de: 13 % de 46, $\geq$ 12 meses; 12,9 % de 31, 13-24 meses; 34,3 % de 32, 25-48 meses; y 45,4 % de 44, $\geq$ 49 meses (significativo $P = 0,001$).

La prevalencia de anticuerpos anti-*N. caninum* fue significativamente mayor ($P < 0,001$) en perros > 12 meses de edad (60,9 % de 87) que en perros ≤ 12 meses (9,6 % de 31) en tambos. A pesar de que el número de perros de establecimientos de cría bovina fue bajo, parece mantenerse la misma tendencia; se encontraron anticuerpos anti-*N. caninum* en 2 de 9 (22 %) perros ≤ 12 meses y en 17 de 28 (60,7 %) perros > 12 meses de edad en establecimientos de cría. En términos generales, la prevalencia en perros ≤ 12 meses (12,7 % de todos los perros de edad conocida) fue significativamente menor ($P = 0,001$) que en perros > 12 meses de edad (47,7 % de 222).

Discusión:

La seroprevalencia de *N. caninum* en perros en Argentina fue mayor que en perros de otros países. En términos generales, se detectaron anticuerpos anti-*N. caninum* en el 37,8 % de 320 perros en este estudio y en el 47,4 % de 97 perros adultos en un estudio previo en Argentina (7). La mayoría de los estudios reportados por otros países fueron sobre perros urbanos. Incluso en perros urbanos de Argentina la prevalencia fue del 26,2 %. La prevalencia general en Argentina es mayor que 2 % de 229 perros de Kansas (15), 7 % de 1007 perros de 35 Estados de EE.UU., y de 3 Provincias de Canadá (4), 17 % de 163 perros de Inglaterra (21), 6 % de 104 perros de North Mymms (12), 0,5 % de 398 perros de Suecia (3), 11 % de 360 perros de Bélgica (2), 15,3 % de

98 perros de Dinamarca (18), 22 % de 200 perros de Nueva Zelandia (19), 9 % de 451 perros en Australia, 20 % de 414 perros de Uruguay, 0,2 % de 500 perros de las Islas Malvinas, 0 de 140 perros de Kenya (1), 29 % de 194 perros de Italia (6), y 20 %, 30 de 150 perros de Turquía (5). La mayoría de estos estudios estuvieron basados en un título de IFI $\geq$ 1:50. Por lo tanto los resultados deberían ser comparables.

Sólo dos estudios previos compararon la prevalencia de *N. caninum* en perros de ciudad y perros rurales. Sawada y col. en 1998 (20) reportaron anticuerpos anti-*N. caninum* en el 31 % de 48 perros de tambos y en el 7 % de 198 perros de áreas urbanas de Japón. Wouda y col. en 1999 (23) reportaron una mayor prevalencia en perros rurales (23,6 % de 152) que en perros de ciudad (5,5 % de 344) en los Países Bajos, lo cual concuerda con los resultados del presente estudio en Argentina.

El aumento de la tasa de prevalencia de anticuerpos anti-*N. caninum* en perros mayores en el presente estudio indica exposición post-natal a este parásito. El ganado bovino es importante para la economía argentina. Si los perros de los establecimientos bovinos constituyen la fuente de alguna de las infecciones por *N. caninum* en bovinos y si bovinos y perros se infectan a partir de una misma fuente requiere investigación.

Bibliografía

- 1- BARBER, J. S.; GASSER, R. B.; ELLIS, J.; REICHEL, M. P.; MC MILLAN, D. and TREES, A. J. (1997). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. *Journal of Parasitology* 83: 1056-1058.
- 2- BARBER, J. S.; VAN HAM, L.; POLLS, I. and TREES, A. J. (1997). Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in Belgian dogs. *Journal of Small Animal Practice* 38: 15-16.
- 3- BJÖRKMAN, C.; LUNDÉN, A.; HOLMDAHL, J.; BARBER, J.; TREES, A. J. and UGGLA, A. (1994). *Neospora caninum* in dogs: Detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. *Parasite Immunology* 16: 643-648.
- 4- CHEADLE, M. A; LINDSAY, D. S. and BLAGBURN, B. L. (1999). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs. *Veterinary Parasitology* 85: 325-330.
- 5- COSKUN, S. Z.; AYDYN, L. and BAUER, C. (2000). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in domestic dogs in Turkey. *Veterinary Record* 146: 649.
- 6- CRINGOLI, G.; CAPUANO, F.; VENEZIANO, V.; ROMANO, L.; SOLIMENE, R.; BARBER, J. S.; and TREES, A. J. (1996). Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* in dog sera. *Parasitologia* 38: 282.
- 7- DI LORENZO, C.; VENTURINI, C.; CASTELLANO, C.; VENTURINI, L.; UNZAGA, J. M. and BACIGALUPE, D. (1997). Detection of antibodies anti-*Neospora caninum* and anti-*Toxoplasma gondii* in dogs in urban area. *Revista de Medicina Veterinaria* 78: 325-326.

- 8- DUBEY, J. P 1999. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Veterinary Parasitology* 84: 349-367.
- 9- DUBEY, J. P.; HATTEL, A. L.; LINDSAY, D. S. and TOPPER, M. J. (1988) Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 193: 1259-1263.
- 10- DUBEY, J. P. and LINDSAY, D. S. (1996). A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology* 67: 1-59.
- 11- DUBEY, J. P. and LINDSAY, D. S. (2000). Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocysts. *Parasitology Research* 86: 165-168.
- 12- LATHE, C. L. (1994). *Neospora caninum* in British dogs. *Veterinary Record* 134: 532.
- 13- LINDSAY, D. S. and DUBEY, J. P. (2000). Canine neosporosis. *Journal of Veterinary Parasitology* 14: 1-11.
- 14- LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. and DUNCAN, R. B. (1999). Confirmation that dogs are a definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology* 82: 327-333.
- 15- LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; UPTON, S. J. and RIDLEY, R. K. (1990). Serological prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs from Kansas. *Journal of the Helminthological Society of Washington* 57: 86-88.
- 16- MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A. and MC GUIRE, A. M. (1998). Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology* 28: 1473-1478.

- 17- PARÉ, J.; FECTEAU, G.; FORTIN, M. and MARSOLAIS, G. (1998). Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. Journal of the American Veterinary Medical Association 213: 1595-1598.
- 18- RASMUSSEN, K., and JENSEN, A. L. (1996). Some epidemiologic features of canine neosporosis in Denmark. Veterinary Parasitology 62: 345-349.
- 19- REICHEL, M. P. 1998. Prevalence of *Neospora* antibodies in New Zealand dairy cattle and dogs. New Zealand Veterinary Journal 46: 38.
- 20- SAWADA, M.; PARK, C. H.; KONDO, H.; MORITA, T.; SHIMADA, A.; YAMANE, I. and UMEMURA, T. (1998). Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. Journal of Veterinary Medical Science 60: 853-854.
- 21- TREES, A. J.; GUY, E.; TENNANT, B. J.; BALFOUR, A. H. and DUBEY, J. P. (1993). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in a population of urban dogs in England. Veterinary Record 132: 125-126.
- 22- VENTURINI, M. C.; VENTURINI, L.; BACIGALUPE, D.; MACHUCA, M.; ECHAIDE, I.; BASSO, W.; UNZAGA, J. M.; DI LORENZO, C.; GUGLIELMONE, A.; JENKINS, M. C. and DUBEY J. P. (1999). *Neospora caninum* infections in bovine fetuses and dairy cows with abortions in Argentina. International Journal for Parasitology 29: 1705-1708.
- 23- WOUDA, W.; DIJKSTRA, T.; KRAMER, A. M. H.; VAN MAANEN, C. and BRINKHOF, J. M. A. (1999). Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. International Journal for Parasitology 29: 1677-1682.

6.2 Primer aislamiento de *Neospora caninum* a partir de las heces de un perro infectado naturalmente

Esta parte del trabajo de tesis fue publicada previamente en idioma inglés como “*First isolation of Neospora caninum from the feces of a naturally infected dog*” Basso, W.; Venturini, L.; Venturini, M. C.; Hill, D. E.; Kwok, O. C. H.; Shen, S. K. y Dubey, J. P. en: Journal of Parasitology 87 (3) 2001, p. 612-618.

Se adjunta la traducción de este trabajo.

Primer aislamiento de *Neospora caninum* a partir de las heces de un perro infectado naturalmente

Resumen:

Neospora caninum es una de las principales causas de aborto en bovinos en todo el mundo. Los bovinos se infectan con *Neospora caninum* por la ingestión de ooquistes del medio ambiente o transplacentariamente de la madre al feto. Experimentalmente, los perros pueden actuar como hospedadores definitivos, pero éstos eliminan pocos ooquistes luego de la ingestión de quistes tisulares. Hasta este momento se desconocía un hospedador definitivo natural. En el presente estudio, *N. caninum* fue aislado de las heces de un perro. Meriones (*Meriones unguiculatus*) alimentados con heces de este perro desarrollaron anticuerpos contra *N. caninum* en el test de Aglutinación para *N. caninum*, y se encontraron quistes tisulares en sus cerebros. *N. caninum* fue aislado en

cultivos celulares y en ratones knockout para el gen del interferón gama, inoculados con homogeneizados de cerebro de meriones infectados. Se confirmó que el ADN obtenido de los ooquistes fecales del perro, del cerebro de los meriones alimentados con heces de este perro, y de organismos aislados en cultivos celulares inoculados con cerebro de merión correspondió a *N. caninum*. La identificación de ooquistes de *N. caninum* mediante bioensayo y mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) demuestra que el perro es un hospedador natural para *N. caninum*.

Introducción:

Neospora caninum se considera actualmente como una de las más importantes causas de aborto en bovinos en muchos países, particularmente Estados Unidos, Nueva Zelanda, Australia y los Países Bajos (revisado por Dubey y Lindsay, (12) y Dubey, (7)). La transmisión del parásito de la madre al feto (transmisión vertical) y la ingestión de ooquistes de las heces de perros son los dos modos de infección conocidos de *N. caninum* en bovinos (30, 4). Hasta el descubrimiento del estado de resistencia (ooquiste) de *N. caninum*, la introducción inicial del parásito en un rodeo se mantenía sin explicación (23, 21). Debido a que *N. caninum* es eficientemente transmitida de forma vertical en un rodeo durante varias generaciones, el rol que jugaría el ooquiste en la epidemiología natural de la enfermedad es incierto. Experimentalmente, el perro no aparenta ser un buen hospedador definitivo para *N. caninum* debido a que luego de la ingestión de quistes tisulares sólo excreta escasos ooquistes, y la excreción ocurre de manera irregular y sólo por un corto período de tiempo. No han sido recuperados ooquistes de *N. caninum* de heces de perros naturalmente infectados. En el presente

estudio se reporta por primera vez la presencia de ooquistes de *N. caninum* en heces de un perro infectado en forma natural.

Materiales y Métodos

Perro naturalmente infectado con *N. caninum*.

Un canino Rottweiler macho de 45 días de edad y 6,5 kg de peso fue atendido por un veterinario debido a la presencia de heces blandas. El canino había vivido cerca de La Plata, Argentina con su madre hasta los 43 días de edad cuando fue vendido. Durante este tiempo el cachorro fue amamantado naturalmente por la perra y alimentado varias veces con carne vacuna cruda. Se examinó materia fecal del cachorro en busca de huevos de parásitos y ooquistes de coccidios utilizando las técnicas de flotación de azúcar y de sulfato de zinc. Se hallaron ooquistes pequeños tipo *Hammondia-Neospora*. El perro fue tratado con sulfaguanidina (100 mg/kg 2 veces por día, oralmente) durante 5 días, no tratado durante 5 días y luego vuelto a tratar con la misma dosificación durante 5 días más. Las heces se volvieron firmes y el dueño no trajo al perro para un examen post-tratamiento. El perro fue vacunado contra distemper, parvovirus, adenovirus, parainfluenza, rabia y *Leptospira* spp.

Las heces colectadas previamente al tratamiento con sulfonamidas fueron homogeneizadas en una solución de bicromato de potasio al 2,5%, pasadas por filtros de 300, 150 y 53 µm, centrifugadas e incubadas a temperatura ambiente (~22° C) durante 14 días. Los ooquistes fueron concentrados mediante flotación en solución de azúcar (densidad 1,18) lavados, y almacenados a 4° C en solución de bicromato de

potasio al 2,5 % hasta el momento de usarlos. Ooquistes de este perro fueron enviados por vía aérea al U.S. Department of Agriculture, Parasite Biology, Epidemiology and Systematics Laboratory in Beltsville, Maryland para identificación posterior.

Bioensayo de ooquistes

En Beltsville se administraron ooquistes de heces caninas por vía oral a meriones (*Meriones unguiculatus*), y se inocularon tejidos de meriones a ratones “knockout” (KO) (carentes del gen que codifica la producción de Interferon gamma) procediendo como fue descrito por Dubey y col., 1998 (9) y Dubey y Lindsay, 2000 (13). Los ratones KO y los meriones tienen el mismo origen previamente descrito. Todos los tejidos de importancia de animales que hayan muerto o que hayan sido sacrificados fueron fijados en formalina bufferada neutra al 10%. Se hicieron cortes de muestras de tejidos embebidos en parafina con un espesor de 5 µm; éstos se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y se examinaron microscópicamente. Cortes desparafinizados de algunos tejidos se tiñeron con anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* y anti-*N. caninum* según fue descrito por Lindsay y Dubey, 1989^a(17). Algunos cortes seleccionados fueron también teñidos con anticuerpos anti-BAG-5 específicos contra bradizoítos según descrito por Mc. Allister, Parmley y col., 1996 (25). Una dilución 1:10000 de suero de conejo anti-BAG-5 no tiñe taquizoítos de *T. gondii* ni de *N. caninum* pero tiñe bradizoítos de ambas especies.

Los ratones y meriones que sobrevivieron fueron sangrados a las 5-10 semanas post inoculación (PI), y sus sueros fueron examinados mediante tests de aglutinación para

detectar anticuerpos anti-*T. gondii* (8) y anti-*N. caninum* (27) utilizando taquizoítos enteros formolados de los respectivos organismos, derivados de ratones.

Para la propagación de organismos se inocularon homogeneizados de tejidos en forma subcutánea (sc) en ratones KO y en meriones y se sembraron en cultivos celulares utilizando métodos descritos previamente (18, 9, 13). En los casos en que los ratones se enfermaron, se les administró sulfadiazina sódica (1mg/ml) en el agua de bebida (19).

Una alícuota de ooquistes fue suministrada por vía oral a 3 meriones (n° 7946, 7947, 7949); los ooquistes habían sido almacenados durante 60 días. A 2 meriones se les inoculó acetato de metilprednisolona (MPA; Pharmacia and UpJohn, Kalamazoo, Michigan) por vía intramuscular 63 días después de haber ingerido los ooquistes (DPI) (n° 7947: 8 mg; n° 7949: 4 mg). El merión n° 7946 fue sacrificado 63 DPI; los meriones n° 7947 y 7949 fueron sacrificados 75 DPI, 12 días post aplicación de MPA.

A todos los meriones se les realizó necropsia. El cerebro del merión n° 7946 que no recibió MPA se dividió en dos mitades. Una mitad fue fijada para histología y la otra mitad homogeneizada en 3 ml de solución buffer de fosfatos (PBS); 2 ml del homogeneizado fue inoculado a 4 ratones KO (Tabla 1), y 1 ml fue almacenado a -70° C para PCR. Homogeneizado de cerebro de los meriones n° 7947 y 7949 fueron inoculados en 8 ratones KO (Tabla 1).

Cultivo in vitro

Homogeneizados de cerebro de los ratones KO n° 2868 y 2665 y corazón del ratón n° 2634 (Tabla 1) se inocularon en células M617 como fuera descrito por Dubey y col.,

1998 (10). Taquizoítos (1×10^6) obtenidos a partir de estos cultivos celulares se inocularon en 3 ratones KO por vía subcutánea.

Aislamiento de DNA genómico

Ooquistes de las heces del perro de La Plata fueron resuspendidos en buffer de extracción de DNA (50 mM Tris, pH 8.0, 100 mM NaCl, 50 mM EDTA, 2% SDS) y colocados en un tubo Eppendorf conteniendo perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro. La muestra de ooquistes fue disgregada usando un agitador de perlas tipo Mini-Beadbeater (Biospec Products, Bartlesville, Oklahoma) durante 3 minutos a temperatura ambiente. Luego fue tratada con Proteinasa K (concentración final, 1 % p/v) en buffer de extracción de DNA durante 2 hs. a 65°C; los ácidos nucleicos fueron extraídos con iguales volúmenes de fenol, fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 v/v), y cloroformo, precipitados con 1/10 volúmenes de NaAc 3 M y 2,2 volúmenes de etanol y almacenado a -20°C durante 2 hs. El ADN precipitado fue recolectado por centrifugación, tratado con RNase-it (Stratagene, La Jolla, California), reextraído con solventes orgánicos y precipitado como se describió arriba. El pellet fue resuspendido en dH₂O y la concentración de DNA genómico fue determinada por espectrofotometría a 280/260 nm. El DNA se conservó congelado hasta su uso en pruebas de PCR.

Cerebros de los meriones a los que se le administró heces del perro fueron emulsionados con un homogeneizador de tejidos Polytron y tratados como se describió antes. Cultivos celulares conteniendo parásitos fueron congelados rápidamente y molidos en forma manual utilizando un mortero previamente enfriado y luego tratados como arriba. El DNA de *Hammondia heydorni* fue el mismo usado por Ellis et al., 1999

(14), y fue obtenido a partir de ooquistes de un perro infectado naturalmente (2). Taquizoítos de *N. hughesi* y *N. caninum* fueron obtenidos in vitro a partir de cultivos en células HCT-8 y procesados para extracción de DNA como se describió arriba.

Pruebas de PCR

DNA genómico de *N. caninum*, *N. hughesi* o *H. Heydorni* respectivamente, se agregó a tubos conteniendo “master mix” para PCR: 1 mM MgCl₂, 1 X PCR-Buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,3), 200 μM dNTPs, 200pg de cada primer y 2,5 unidades de Amplitaq polimerasa (Gene Amp Kit; Perkin-Elmer, Branchburg, New Jersey). Para evitar la inhibición de PCR por contaminantes fecales presentes en las preparaciones de ADN de ooquistes, se agregó albúmina de suero bovino a las reacciones en una concentración de 0,8 mg/ml y el ADN de ooquistes fue diluido (1:10 o 1:100 a partir de 10 ng) para reducir la concentración de inhibidores. Los productos de PCR fueron precipitados con EtOH y separados por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% a 100 V. Luego se tiñeron los geles con bromuro de etidio y se visualizaron utilizando un “UVP image acquisition system” (Ultra Violet Products Inc., Upland, California). Las condiciones de PCR fueron aquellas descritas por Yamage et al., 1996 (35) utilizando la secuencia genómica Nc 5 de *N. caninum*, Guo y Johnson, 1995 (16) y Spencer et al., 2000 (29) utilizando “random amplified polymorphic DNA (RAPD), y Ellis et al., 1999 (14) utilizando secuencias ITS (internal transcribed spacer) de *Hammondia heydorni*.

Tabla 1: Aislamiento de *N. caninum* en ratones KO inoculados con homogeneizado de cerebro de meriones alimentados con ooquistes de las heces de un perro infectado naturalmente de Argentina.

Merión n°	Ratón KO n°	Vía de inoculación	Día de necropsia †	<i>N. caninum</i> en tejidos §
7946	2632	s. c*	K 116	-
	2633	s. c	K 116	-
	2634	i. p	D 32	B, H, P
	2635	i. p	K 116	-
7947	2868	s. c	DK 12	H, Li, Lu
	2869	s. c	K 24 ‡	B, H, K, P
	2870	i. p	D 15	H, K, Li, Lu, P, Sp
	2871	i. p	D 14	H, K, Lu, P
7949	2663	s. c	DK 32	A, B, Li, Lu, O, P
	2664	s. c	DK 33	B, H, Li, Sk, Sp
	2666	i. p	D 18	H, Lu, Rg, Sk, T
	2665	i. p	DK 20	H, Lu, P

*s. c: subcutáneo, i. p: intraperitoneal

† D: muerto, K: sacrificado, DK: sacrificado estando enfermo.

‡ Se le administró sulfadiazina de sodio en el agua de bebida 12-22 días luego de la inoculación con homogeneizado de cerebro.

§ A: adrenal, B: cerebro, H: corazón, K: riñón, Li: hígado, Lu: pulmón, O: omento, P: páncreas, Rg: ganglio renal, Sk: músculo esquelético, Sp: bazo

Resultados:

Todos los meriones se mantuvieron clínicamente normales. No se vieron ni lesiones ni parásitos en los tejidos de los meriones n° 7946 y 7947. Se vieron 2 quistes de *N. caninum* que medían 28 x 26 μm y 32 x 27 μm en cortes de cerebro del merión n° 7949. En el cerebro había escasos focos de inflamación. Los quistes tisulares tenían pared lisa, >1 μm de espesor (Fig.1). En otros 3 cortes adicionales de cerebro de este merión no se vieron quistes tisulares. Los meriones tuvieron títulos > 1:500 en la prueba de aglutinación para *N. caninum* pero no se detectaron anticuerpos contra *T. gondii* (< 1:25).

N. caninum fue aislado de ratones KO inoculados con homogeneizados de cerebro de c/u de los 3 meriones (Tabla 1).

Sólo 1 de los 4 ratones KO inoculados con el cerebro del merión 7946 se infectó con *N. caninum* mientras que los 8 ratones KO inoculados con los cerebros de los meriones n° 7947 y n° 7949 desarrollaron neosporosis.

En los ratones KO la lesión predominante fue la miocarditis (Fig. 2). La miocarditis se caracterizó por necrosis y marcada infiltración leucocitaria mixta (Fig. 2A). En el corazón sólo pudieron identificarse taquizoítos (Fig. 2B, C). Se vieron más organismos en los cortes teñidos por inmunohistoquímica con anticuerpos anti-*N. caninum* (Fig. 2 D) que en los teñidos con H&E. La muerte de los ratones KO fue atribuida a la miocarditis. En el cerebro del ratón KO n° 2869 (tratado con sulfadiazina) se vió un quiste tisular cerca de una lesión de encefalitis en un corte de cerebro teñido con H&E (Fig. 3A) y varios quistes en cortes teñidos con anticuerpos anti-BAG-5 (Fig. 3B).

Ocho días luego de la inoculación de células M617 con cerebro del ratón KO n° 2868 se vieron organismos extracelulares en el cultivo. El aislamiento del parásito creció lentamente. Se recolectaron aproximadamente 3×10^6 taquizoítos del medio de cultivo a los 2 meses de la inoculación inicial y aproximadamente 1×10^6 organismos a los 86 días de haber inoculado la botella original con el homogeneizado del cerebro. En este momento la mayoría de las células hospedadoras estaban destruídas y los taquizoítos recolectados fueron criopreservados. Este aislamiento de *Neospora caninum* fue designado como NC-6 Argentina.

En los cultivos celulares inoculados con cerebro del ratón KO 2665 se vieron protozoarios por primera vez a los 15 días post-inoculación. 99 días después se vieron muchos organismos y el cultivo fue criopreservado.

El cultivo inoculado con homogeneizado de corazón del ratón KO 2634 se contaminó con bacterias y fue descartado.

Los 3 ratones KO inoculados con taquizoítos derivados de cultivos celulares murieron de neosporosis aguda generalizada en los días 11 ó 12 con taquizoítos presentes en casi todos los tejidos (Fig. 3C, D).

La prueba de PCR utilizando el par de primers específicos para *N. caninum* Np 6/21 originó un amplicon de 328 pares de bases (pb) en la electroforesis en geles de agarosa a partir de las muestras conteniendo ADN genómico de los supuestos ooquistes de *N. caninum* aislados de heces del perro de La Plata (Fig. 4).

No se detectó amplificación utilizando estas mismas muestras de ADN genómico en pruebas de PCR con primers específicos para las regiones ITS de *Hammondia heydorni* (ITS 1 y 2).

El ADN aislado de los cerebros de los 3 meriones que ingirieron heces del perro de La Plata conteniendo los supuestos ooquistes de *N. caninum* fue amplificado usando el par de primers Np 6/21.

El ADN genómico derivado de taquizoítos de *N. hughesi* no fue amplificado usando este mismo par de primers (Fig. 5).

El random primer F6 (Spencer et al., 2000)(29) amplificó un producto de PCR de 450 pb a partir de muestras conteniendo ADN del cerebro del merión 7949 (descrito arriba); de taquizoítos de *N. caninum* conocidos; de los supuestos ooquistes de *N. caninum* del perro de La Plata y de ooquistes de *N. caninum* conocidos provenientes de un perro infectado experimentalmente (Fig. 6).

Es importante destacar que ADN del cerebro del merión 7949, ADN de los supuestos ooquistes de *N. caninum* y ADN de cultivos celulares inoculados con homogeneizados de cerebro de merión pudieron distinguirse de ADN de ooquistes de *H. heydorni* y de ADN de taquizoítos de *N. hughesi* utilizando el primer F6 que produjo amplicones de 500 pb y 220 pb respectivamente.

ADN aislado de cerebro del merión 7949, ADN de taquizoítos aislados mediante cultivos en células M617 y ADN de ooquistes de heces del perro de La Plata fue amplificado usando el par de primers Np 6/21 y produjo el amplicon esperado de 328 pb, indicando la presencia de ADN de *N. caninum* (Fig. 7).

Fig. 1 Quiste tisular *N. caninum*-like en el cerebro del merión n° 7949, alimentado con heces del perro infectado naturalmente. Nótese la pared quística gruesa (puntas de flecha). Tinción hematoxilina y eosina.

Fig. 2 Miocarditis y taquizoítos de *N. caninum* en el corazón del ratón KO n° 2868 inoculado con homogeneizado del cerebro del merión n° 7949. **A-C**, tinción hematoxilina y eosina; **D**, tinción inmunohistoquímica con anticuerpos anti-*N. caninum*. **A**. Severa infiltración mixta de leucocitos en el miocardio. **B**. Mayor aumento para mostrar degeneración de miocardiocitos, infiltración de células mononucleares y neutrófilos, y taquizoítos (flechas). **C**. Foco inflamatorio con un gran grupo de taquizoítos (flechas). **D**. Taquizoítos (flechas) teñidos con anticuerpos anti-*N. caninum*.

Fig. 3 Lesiones y *N. caninum* en tejidos de ratones KO inoculados con el aislamiento argentino de *N. caninum*. **A**. Encefalitis focal en el cerebro del ratón KO n° 2869, 24 días post-inoculación de homogeneizado de cerebro del merión n° 7949. Nótese un quiste tisular (flecha) cerca de un foco inflamatorio; taquizoítos también están presentes en la lesión pero no son visibles en este plano de foco. Tinción hematoxilina y eosina. **B**. Quiste tisular (flecha) en sección adyacente del cerebro del ratón de la fig. 3 A. Tinción inmunohistoquímica con anticuerpos anti-*N. caninum*. **C**. y **D**. Taquizoítos en improntas de pulmón de un ratón KO inoculado s. c con organismos de cultivo celular. Nótese organismos individuales (flechas pequeñas), en división (punta de flecha) y ya divididos (flecha grande). Tinción de Giemsa.

Fig. 4 Ooquistes recolectados de las heces del perro de La Plata y procesados para extracción de ADN; carril 1, marcadores HAE III; carril 2, ADN de ooquistes de

Hammondia heydorni; carril 3 ADN de ooquistes del perro de La Plata. Resultados de PCR con primers Np6/21 de *N. caninum*.

Fig. 5 Amplicon de 328 pares de bases utilizando ADN aislado del cerebro de 3 meriones alimentados con ooquistes y el set de primers Np6/21. Carriles 1, 2 y 3, cerebros de los meriones 1, 2 y 3; carril 4, resultado de PCR utilizando ADN de taquizoítos de *Neospora hughesi* y primers Np6/21.

Fig. 6 Amplificación de ADN de *Neospora caninum* aislado de cerebro de meri6n con Random primer F6 (Spencer et al. 2000)(meri6n n6 7949, carril 1), ADN de taquizoítos de *N. caninum* control (carril 2), ADN de ooquistes de *N. caninum* del perro de La Plata (carril 3), ADN de ooquistes de *Hamondia heydorni* (carril 5), ADN de taquizoítos de *N. hughesi* (carril 6).

Fig. 7 Amplicon de 328 pares de bases utilizando el set de primers Np6/21 y ADN aislado de: carril 1, cerebro de meri6n alimentado con ooquistes (meri6n n6 7949), carril 2, taquizoítos aislados de cultivos celulares inoculados con bradizoítos de cerebro de meri6n, carril 3, ooquistes aislados de las heces del perro de La Plata, carril 4, taquizoítos de *N. hughesi*, carril 5, ooquistes de *Hammondia heydorni* y, carril 6, taquizoítos de NC-1 ,control.

Discusión:

Los parásitos provenientes de las heces del perro de La Plata fueron identificados como *N. caninum* basado en la estructura, antigenicidad y características moleculares. Se diferenció de *N. hughesi*, la única otra especie conocida de *Neospora*. *N. hughesi* no parece persistir (o infectar) meriones. Meriones inoculados con taquizoítos de *N. hughesi* desarrollaron anticuerpos contra *N. caninum*, pero el parásito no pudo ser demostrado en tejidos de merión. (Walsh et al., 2000 (31); Dubey et al, 2001 (11)), mientras que en el presente trabajo se han visto quistes tisulares de *N. caninum* en cerebro de 1 merión, y *N. caninum* se pudo aislar del cerebro de los 3 meriones inoculados. Interesante es la severa miocarditis observada en los ratones KO inoculados con tejidos de meriones. En ambos estudios previos (Walsh et al., 2000 (31); Dubey et al, 2001 (11)), los ratones KO inoculados con taquizoítos de *N. hughesi* desarrollaron miocarditis severa mientras que en los inoculados con NC-1 u otras cepas de *N. caninum* la lesión predominante fue la hepatitis.

Por lo tanto el hallazgo de miocarditis severa en los ratones KO inoculados con la cepa de *N. caninum* aislada de las heces del perro de La Plata fue sorprendente, y este resultado indica que ese criterio no es confiable para distinguir *N. caninum* de *N. hughesi*.

El n° de ooquistes presentes en las heces del perro de Argentina no fue determinado pero presumiblemente fue bajo. A 2 meriones alimentados con heces de este perro se les dio MPA con la intención de provocar una reactivación de la neosporosis; en uno de los dos meriones que recibió MPA se vieron 2 quistes tisulares. El hallazgo de quistes tisulares en un merión fue probablemente debido al azar y no debido a la administración

de MPA debido a que no había evidencia histológica de reactivación de la infección por *N. caninum*.

El tamaño de los quistes tisulares (27-32 μm) también sugiere que estos quistes se originaron por la infección primaria ya que habían pasado menos de 2 semanas entre la administración de MPA y el sacrificio de los meriones.

Nada se sabe acerca de la sensibilidad inducida por corticoides a la infección por *N. caninum* en meriones.

Para estos bioensayos se usaron meriones ya que estos habían probado ser susceptibles a la infección por *N. caninum* (Cuddon et al., 1992 (3); Gondim et al., 1999 (15); Dubey y Lindsay, 2000 (13).

A pesar de esto, hasta el momento no habían sido encontrados quistes tisulares bien desarrollados en meriones (Dubey, observación personal no publicada).

La epidemiología natural de *N. caninum* en rodeos bovinos no está totalmente comprendida. Hay evidencias que indican que en epidemias de abortos inducidos por *N. caninum* habría una fuente de infección externa más que una reactivación de una infección crónica en el rodeo (34), (24), (32), (22), (5). También hay evidencia seroepidemiológica que relaciona infección por *N. caninum* en bovinos, con seropositividad en perros en establecimientos bovinos (28), (1), (26), (33).

Los intentos para producir ooquistes de *N. caninum* en el laboratorio mediante el suministro de animales infectados experimentalmente durante mucho tiempo no tuvieron éxito. Es posible que la eliminación de ooquistes en el perro requiera la ingestión de una especie particular de hospedador intermediario; no se conoce ningún

hospedador intermediario natural de *N. caninum* de pequeño tamaño. La detección específica de ooquistes de *N. caninum* en heces de perro fue previamente imposible debido a la imposibilidad de distinguir morfológicamente los ooquistes de *N. caninum* de los de *H. heydorni*, de los cuales el perro también es hospedador definitivo (6) y de *H. hammondi* y *T. gondii*, cuyos ooquistes pueden contaminar las heces caninas (20). El uso de las técnicas de PCR descritas aquí, que permiten identificar específicamente los ooquistes de *N. caninum* resultarán en estudios epidemiológicos más precisos para determinar la prevalencia de *N. caninum* en perros domésticos y en cánidos silvestres. De todos modos los resultados del presente estudio no dejan dudas de que el perro es un hospedador definitivo natural de *N. caninum*.

Bibliografía

- 1- BARTELS, C. J. M.; WOUDA, W. and SCHUKKEN, Y. H. (1999). Risk factors for *Neospora caninum* associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology* 52: 247- 257.
- 2- BLAGBURN, B. L.; LINDSAY, D. S.; SWANGO, L. J.; PIDGEON, G. L. and BRAUND, K. G. (1988). Further characterization of the biology of *Hammondi heydorni*. *Veterinary Parasitology* 27: 193 -198.
- 3- CUDDON, P.; LIN, D. S.; BOWMAN, D. D.; LINDSAY, D. S.; MILLER, T. K.; DUNCAN, I. D.; DE LAHUNTA, A.; CUMMINGS, J.; SUTER, M.; COOPER, B.; KING, J. M., and DUBEY, J. P. (1992). *Neospora caninum* infection in English springer spaniel

littermates: Diagnostic evaluation and Organism isolation. Journal of Veterinary Internal Medicine 6: 325-332.

4- DE MAREZ, T.; LIDDELL, S.; DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C. and GASBARRE, L.. (1999). Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: Humoral and cellular immune responses. International Journal for Parasitology 29: 1647- 1657.

5- DIJKSTRA, T. H.; BARKEMA, W.; EYSKER, M. and WOUDA, W. (2001). Evidence of post natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. International Journal for Parasitology 31: 209- 215.

6- DUBEY, J. P. (1993). *Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis*, and other tissue cyst forming coccidia of humans and animals. In Parasitic protozoa, Vol. 6, J. P Kreier (ed.). Academic Press, New York, New York, p. 1- 158.

7- DUBEY, J. P. (1999). Recent advances in *Neospora* and neosporosis. Veterinary Parasitology 84: 349 -367.

8- DUBEY, J. P. and DESMONTS, G. (1987). Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. Equine Veterinary Journal 19: 337-339.

9- DUBEY, J. P.; DOROUGH, K. R.; JENKINS, M. C.; LIDDELL, S.; SPEER, C. A.; KWOK, O. C. H. and SHEN, S. K. (1998). Canine neosporosis: Clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. International Journal for Parasitology 28: 1293-1304.

10- DUBEY, J. P.; HATTEL, A. L.; LINDSAY, D. S. and TOPPER, M. J. (1988). Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. Journal of the American Veterinary Medical Association 193: 1259-1263.

- 11- DUBEY, J. P.; LIDDELL, S.; MATTSON, D.; SPEER, C. A.; HOWE, D. K. and JENKINS, M. C. (2001). Characterization of the Oregon isolate of *Neospora hughesi* from a horse. *Journal of Parasitology*. 87: 345-353.
- 12- DUBEY, J. P. and LINDSAY, D. S. (1996). A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology* 67: 1-59.
- 13- DUBEY, J. P. and LINDSAY, D. S. (2000). Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocysts. *Parasitology Research* 86: 165-168.
- 14- ELLIS, J. T.; MORRISON, D. A.; LIDDELL, S.; JENKINS, M. C.; MOHAMMED, O. B.; RYCE, C. and DUBEY, J. P., (1999). The genus *Hammondia* is paraphyletic. *Parasitology* 118: 357-362.
- 15- GONDIM, P L. F.; SAEKI, H.; ONAGA, H.; HARITANI, M. and YAMANE, I. (1999). Maintenance of *Neospora caninum* tachyzoites using Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *New Zealand Veterinary Journal* 47: 36.
- 16- GUO, Z. G., and JOHNSON, A. M. (1995). Genetic comparison of *Neospora caninum* with *Toxoplasma* and *Sarcocystis* by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. *Parasitology Research* 81:365-370.
- 17- LINDSAY, D. S. and DUBEY, J. P (1989a.). Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *American Journal of Veterinary Research* 50: 1981-1983.
- 18- LINDSAY, D. S. and DUBEY, J. P. (1989b). In vitro development of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) from dogs. *Journal of Parasitology* 75: 163-165.

- 19- LINDSAY, D. S. and DUBEY, J. P. (1990). Effects of sulfadiazine and amprolium on *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) infections in mice. *Journal of Parasitology* 76: 177-179.
- 20- LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; BUTLER, J. M. and BLAGBURN, B. L. (1997). Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. *Veterinary Parasitology*. 73: 27-33.
- 21- LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. and DUNCAN, R. B. (1999). Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology* 82: 327-333.
- 22- MC ALLISTER, M. M.; BJÖRKMAN, R.; ANDERSON-SPRECHER, and ROGERS, D. G. (2000). Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 217: 881-887.
- 23- MC ALLISTER, M. M; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A. and MC GUIRE, A. M. (1998). Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology* 28: 1473-1478.
- 24- MC ALLISTER, M. M; HUFFMAN, E. M.; HIETALA, S. K.; CONRAD, P A.; ANDERSON, M. L. and SALMAN, M. O. (1996). Evidence suggesting a point source exposure in an outbreak of bovine abortion due to neosporosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 8: 355-357.
- 25- MC ALLISTER, M. M; PARMLEY, S. F.; WEISS, L. M.; WELCH, V. J. and MC GUIRE, A. M.. 1996. An immunohistochemical method for detecting bradyzoite antigen (BAG 5) in *Toxoplasma gondii*-infected tissues cross-reacts with a *Neospora caninum* bradyzoite antigen. *Journal of Parisitology* 82: 354-355.

- 26- PARÉ, J.; FECTEAU, G.; FORTIN, M. and MARSOLAIS, G. (1998). Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. Journal of the American Veterinary Medical Association 213: 1595-1598.
- 27- ROMAND, S.; THULLIEZ, P. and DUBEY, J. P. (1998). Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. Parasitology Research 84: 50-53.
- 28- SAWADA, M.; PARK, C. H.; KONDO, H.; MORITA, T.; SHIMADA, A.; YAMANE, I. and UMEMURA, T. (1998). Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. Journal of Veterinary Medical Science 60: 853-854.
- 29- SPENCER, J. A.; WITHEROW, A. K. and BLAGBURN, B. L.. (2000). A random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction technique that differentiates between *Neospora* species. Journal of Parasitology 86, 1366-1368.
- 30- THILSTED, J. P, and DUBEY, J. P. (1989). Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 1: 205-209.
- 31- WALSH, C. P.; DUNCAN, R. B.; ZAJAC, A. M.; BLAGBURN, B. L. and LINDSAY, D. S. (2000). *Neospora hughesi*: Experimental infections in mice, gerbils, and dogs. Veterinary Parasitology 92: 119-128.
- 32- WOUDA, W.; BARTELS, C. J. M. and MOEN, A. R. (1999). Characteristics of *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995-1997). Theriogenology 52: 233-245.
- 33- WOUDA, W.; DIJKSTRA, T.; KRAMER, A. M. H.; VAN MAANEN, C. and BRINKHOF, J. M. A.. (1999). Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. International Journal for Parasitology 29: 1677-16A2.

- 34- YAEGER, M. J.; SHAWD-WESSELS, S. and LESLIE-STEEN, P. (1994). *Neospora* abortion storm in a midwestern dairy. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 6: 506-508.
- 35- YAMAGE, M.; FLECHTNER, O. and GOTTSTEIN, B. (1996). *Neospora caninum*: Specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Parasitology* 82: 272-279.

7 ANEXO

7.1 Soluciones

Solución buffer de carbonatos

Solución madre:

Na₂CO₃.....11,4 g

NaHCO₃.....33,6 g

NaCl.....8,5 g

Agua destilada..... c.s.p. 1 l.

Solución de trabajo: diluir la solución madre en agua destilada en proporción de 1: 4. El pH debe ser 9.

Líquido de montaje para Inmunofluorescencia de *Toxoplasma gondii*

Solución 1:5 de glicerina en PBS (solución de trabajo).

Líquido de montaje para Inmunofluorescencia de *Neospora caninum*

Solución 1:1 de glicerol en buffer de carbonatos (solución de trabajo).

7.2 Técnica de inmunohistoquímica para *Neospora caninum*

Técnica del complejo avidina-biotina (ABC)

Modificado de acuerdo a Vectastain Elite ABC anti-rabbit IgG Kit, Vector Laboratories, inc., (revisado por Oliver Kwok, USDA, 1995)

Primera parte:

1- Desparafinizar los cortes de tejido (3-5 μ m) con xileno:

Sumergir en xileno 20 min.

Sumergir en xileno fresco 5 min.

2- Eliminar el xileno e hidratar:

Sumergir en etanol 100 % 15 min.

95 % 5 min.

70 % 5 min.

50 % 5 min.

Sumergir en agua destilada, 5 min, dos veces.

3- Bloquear la peroxidasa endógena:

Sumergir en peróxido de hidrógeno al 3 % en metanol (6 ml 30 % H_2O_2 + 200 ml de agua), 15 min.

Enjuagar en solución fisiológica 5 min. 2 veces.

4- Digestión con pepsina:

Incubar los preparados en baño María a 37°C en pepsina al 0,4% en HCl 0,01N durante 15 min. (0,8 g pepsina , 0.333 ml HCl 6N, 200 ml de solución fisiológica, precalentada a 37°C durante 30 min.)

Enjuagar con solución fisiológica 1 min.

Sumergir en PBS por 5 min. Dos veces.

5- Bloqueo de reacciones inespecíficas:

Incubar con suero normal de cabra diluído (3 gotas de stock + 10 ml buffer) durante 30 min. El suero bloqueante es de la misma especie en la que se produjo el anticuerpo secundario.

Eliminar el suero (no enjuagar), secar cuidadosamente alrededor de los cortes

6- Aplicar el **anticuerpo primario** (Suero hiperinmune anti-*Neospora* hecho en conejo) diluído 1 / 2000 sobre el corte.

Incubar toda la noche a 4° C.

Segunda parte (al otro día):

7- Eliminación de anticuerpos primarios no fijados:

Enjuagar con PBS goteando.

Sumergir en PBS 10 min.

Dejar escurrir y secar cuidadosamente alrededor de los cortes.

8- Aplicar el **anticuerpo secundario biotinilado** (suero anti-conejo preparado en cabra):

Diluir 1 gota de solución de anticuerpos secundarios biotinilados + 3 gotas de suero bloqueante en 10 ml de buffer y cubrir el corte.

Incubar durante 30 min.

Lavar 10 min. en buffer.

Secar los cortes cuidadosamente alrededor.

9- Aplicar el reactivo ABC

Incubar durante 30 min. con el reactivo ABC. (Prepararlo 45 min. antes: dos gotas de A y dos gotas de B en 10 ml de buffer).

Lavar 5 min. en buffer. Secar alrededor.

10-Incubar los cortes con el sustrato: solución de peroxidasa (Preoxidase substrate kit, DAB, Vector SK-4100)

Lavar con agua corriente.

11-Tinción de contraste

Teñir con hematoxilina de Meyer el tiempo necesario

Lavar en agua corriente

12- Deshidratar

Sumergir en etanol 50% 2 min.

70% 2 min

95% 2 min

100% 2 min

Xileno 2 min

Mantener en Xileno mientras se realiza el montaje.

7.4 Cultivo in vitro de *Neospora caninum* y producción de antígeno para la prueba de inmunofluorescencia indirecta

7.4.1 Cultivo de células Vero

Las células Vero se cultivan en botellas plásticas de 25 cm² en medio RPMI 1640 con glutamina, antibióticos y antimicótico (Penicilina G sódica 10000 UI/ml, Sulfato de Estreptomicina 10000 µg/ml, Amphotericina B 25 µg/ml en salina 0.85 %). Durante la

fase de crecimiento de las células, el medio se suplementa con 10% de suero fetal bovino libre de anticuerpos para *N.caninum* hasta observar el desarrollo de una monocapa. Para mantenimiento se utiliza medio con una concentración de 3% de suero fetal bovino.

Repique de células

- 1- Se elimina el medio de la botella con la monocapa de células completamente formada.
- 2- Se agregan 5 ml de PBS pH 7,2, se enjuaga y elimina.
- 3- Se agregan 2,7 ml de PBS y 0,3 ml de solución de Tripsina-EDTA (5 g de tripsina/l 1:250, 2 g Edta/l) e incubar a 37° 30 min.
- 5- Una vez desprendidas las células se agregan 4 ml de medio.
- 6- Se coloca 1ml de esa suspensión en cada nueva botella de cultivo con 5ml de medio con 10% de SFB colocado previamente.
- 7- Se incuba a 37° C bajo una atmósfera de 5% de CO₂.
- 8- Las células se repican una vez por semana. En dos a cinco días puede estar formada la monocapa.

7.4.2 Infección de las células con la cepa NC-1 de *Neospora caninum*

Se utilizan cultivos celulares 4 días posteriores al repique. Se cambia el medio con Suero fetal bovino por medio con 10% de suero equino. Las botellas de cultivo se

inoculan con 1 o 2 ml del sobrenadante de la botella infectada previamente de acuerdo a la concentración de taquizoítos (15-20 por campo de 40X)

El momento óptimo para repicar los parásitos es al observar taquizoítos libres en focos de lisis celular. (aproximadamente a la semana de la infección).

7.4.3 Preparación de antígeno para inmunofluorescencia

1. La monocapa se desprende con un raspador cuando los taquizoítos aún se encuentran dentro de las células.
2. Se recoge el medio con las células desprendidas y se lo coloca en un tubo de centrifuga.
3. Se centrifuga a 2500 rpm durante 5 minutos.
4. Se elimina el sobrenadante y se resuspende en 10 ml de PBS.
5. La suspensión se pasa tres veces por cada una de las siguientes agujas: 21 G, 23 G, 25 G y 27 G.
6. Se centrifuga a 2500 rpm durante 5 minutos.
7. Se elimina el sobrenadante y se resuspende en 5 ml de PBS.
8. Se cuenta el número de taquizoitos y se concentra a 10 millones/ml.
9. Colocar aproximadamente 12 µl de la suspensión por pocillo de los portaobjetos.
10. Dejar secar a temperatura ambiente.
11. Fijar con metanol.
12. Dejar secar y conservar a -20°.

Prevalence of *Neospora caninum* Infection in Dogs From Beef-Cattle Farms, Dairy Farms, and From Urban Areas of Argentina

W. Basso, L. Venturini, M. C. Venturini, P. Moore*, M. Rambeau, J. M. Unzaga, C. Campero*, D. Bacigalupe, and J. P. Dubey†, Catedra de Parasitologia, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, 60 y 118, 1900 La Plata, Argentina; *Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria, Balcarce, Argentina; and †author for correspondence at United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Animal and Natural Resources Institute, Parasite Biology, Epidemiology and Systematics Laboratory, Building 1001, BARC-East, Beltsville, Maryland 20705-2350

ABSTRACT: Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies was determined in sera of 320 dogs from Argentina using the indirect fluorescent antibody test (IFAT). Antibodies to *N. caninum* were found in 121 of 320 (37.8%) sera with titers of 1:50 (21 dogs), 1:100 (23 dogs), 1:200 (23 dogs), 1:400 (17 dogs), 1:800 (23 dogs), and $\geq 1:1,600$ (14 dogs). The seropositivity (IFAT, $\geq 1:50$) was higher in dogs from dairy (48% of 125) and beef (54.2% of 35) farms than in dogs from urban areas (26.2% of 160). Prevalence of anti-*N. caninum* antibodies was higher in dogs more than 12 mo of age (47.7%, 105 of 222) versus in 12-mo-old or younger dogs (12.7% of 86), suggesting postnatal exposure of *N. caninum* infection in dogs.

Neospora caninum is an important cause of mortality in dogs and cattle in many countries including Argentina (Dubey and Lindsay, 1996; Dubey, 1999; Venturini et al., 1999; Lindsay and Dubey, 2000). Until recently, vertical transmission from mother to fetus was thought to be the main route of transmission of *N. caninum* in cattle and dogs (Dubey and Lindsay, 1996). In 1998, the dog was identified as a definitive host of *N. caninum* (McAllister et al., 1998). However, the role of the dog in the epidemiology of *N. caninum* infection is not fully known because only a few oocysts are shed, and *N. caninum* oocysts have not been identified in the feces of naturally infected dogs (Lindsay et al., 1999; Dubey and Lindsay, 2000). Studies from Canada, Japan, and The Netherlands, have reported a positive relationship between dogs and bovine neosporosis (Paré et al., 1998; Sawada et al., 1998; Wouda et al., 1999). Therefore, the prevalence of *N. caninum* antibodies was compared in dogs from urban and rural areas in Argentina.

Sera of 320 dogs were examined for the detection of anti-*N. caninum* antibodies using the indirect immunofluorescence antibody test (IFAT) with culture-derived tachyzoites of the NC-1 isolate and rabbit anti-canine IgG conjugate (Sigma, St. Louis, Missouri) (Dubey et al., 1988). Sera were tested by IFAT at 2-fold dilutions, beginning at 1:50. One hundred sixty sera were from dogs seen in veterinary hospitals in urban areas, 151 of them with data concerning presence or absence of neosporosis-related neurologic signs. One hundred twenty-five sera were from dogs from 23 dairy farms located in the Province of Buenos Aires, 1 in the province of Jujuy, 3 in the province of La Pampa, and 1 from Tierra del Fuego. Thirty-five sera were from dogs from 10 beef cattle farms in the province of Buenos Aires. Sex was known for 317 dogs, age for 308, and breed for 314 dogs. Results were analyzed by the chi-square test (Stalcat, Epi6).

Antibodies to *N. caninum* were found in 121 (37.8%) of 320 dogs with titers of 1:50 (21 dogs), 1:100 (23 dogs), 1:200 (23 dogs), 1:400 (17 dogs), 1:800 (23 dogs), 1:600 (9 dogs), 1:3,200 (3 dogs), 1:6,400 (1 dog), and 1:52,500 (1 dog). The

prevalence of antibodies (IFAT, $\geq 1:50$) was higher in dogs from beef (54.2% of 35) and dairy (48% of 125) farms than from dogs from urban areas (26.2% of 160); the differences were statistically significant ($P < 0.001$). Of the 153 urban dogs, the seroprevalence in males (28.1% of 71) was not statistically different ($P = 0.86$) from that in females (25.6% of 82). Of the 153 dogs with breed data, seroprevalence was 23.9% of 117 in purebred dogs versus 36.1% of 36 crossbred dogs (not significant $P = 0.21$). The antibody titers in dogs with clinical signs were not different from those in dogs without reported clinical signs. Prevalence of antibodies increased with age of the dog with seroprevalence of: 13% of 46, ≤ 12 -mo-old; 12.9% of 31, 13–24-mo-old; 34.3% of 32, 25–48-mo-old dogs; and 45.4% of 44, 49-mo or older dogs (significant $P = 0.001$).

Prevalence of *N. caninum* antibodies was significantly higher ($P < 0.001$) in dogs > 12 mo of age (60.9% of 87) versus ≤ 12 -mo-old dogs (9.6% of 31) from dairy farms. Although the number of dogs from beef farms was low, similar trends were apparent; antibodies to *N. caninum* were found in 2 of 9 (22%), 12-mo-old or younger dogs versus 17 of 28 (60.7%) dogs older than 12 mo from the beef farms. Overall, prevalence in 12-mo-old or younger dogs (12.7% of all dogs of known age) was significantly lower ($P = 0.001$) than in dogs older than 12 mo (47.7% of 222).

The seroprevalence of *N. caninum* in dogs in Argentina was higher than in dogs from other countries. Overall, *N. caninum* antibodies were found in 37.8% of 320 dogs in this survey and in 47.4% of 97 adult dogs in a previous survey from Argentina (Di Lorenzo et al., 1997). Most surveys reported from other countries were from urban dogs. Even in urban dogs from Argentina, the prevalence was 26.2%, which is higher than 2% of 229 dogs from Kansas (Lindsay et al., 1990), 7% of 1,077 dogs from 35 states in the U.S. and 3 provinces in Canada (Cheadle et al., 1999), 17% of 163 dogs from England (Trees et al., 1993), 6% of 104 dogs from North Mymms (Lathe, 1994), 0.5% of 398 dogs from Sweden (Björkman et al., 1994), 11% of 360 dogs from Belgium (Barber, van Ham et al., 1997), 15.3% of 98 dogs from Denmark (Rasmussen and Jensen, 1996), 22% of 200 dogs from New Zealand (Reichel, 1998), 9% of 451 dogs in Australia, 20% of 414 dogs from Uruguay, 0.2% of 500 dogs from the Falkland Islands, 0 of 140 dogs from Kenya (Barber, Gasser et al., 1997), 29% of 194 dogs from Italy (Cringoli et al., 1996), and in 30 of 150 (20%) of dogs from Turkey (Coşkun et al., 2000). Most of these surveys were based on an IFAT titer of $\geq 1:50$. Thus, results should be comparable.

Only 2 previous surveys compared the prevalence of *N. caninum* in urban and rural dogs. Sawada et al. (1998) reported *N. caninum* antibodies in 31% of 48 dogs from dairy farms and 7% of 198 dogs from urban areas in Japan. Wouda et al. (1999) reported a higher prevalence in farm dogs (23.6% of 152) versus urban dogs (5.5% of 344) from The Netherlands, which is in agreement with results of the present study from Argentina.

Increasing rates of prevalence of *N. caninum* antibodies in older dogs in the present study indicate postnatal exposure of this parasite. Cattle are economically important to Argentina's economy. Whether dogs on cattle farms are the source of some of *N. caninum* infections in cattle or whether both cattle and dogs are infected from a common source needs investigation.

LITERATURE CITED

- BARBER, J. S., R. B. GASSER, J. ELLIS, M. P. REICHEL, D. McMILLAN, AND A. J. TREES. 1997. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. *Journal of Parasitology* **83**: 1056–1058.
- , L. VAN HAM, I. POLIS, AND A. J. TREES. 1997. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in Belgian dogs. *Journal of Small Animal Practice* **38**: 15–16.
- BJÖRKMAN, C., A. LUNDÉN, J. HOLMDAHL, J. BARBER, A. J. TREES, AND A. UGGLA. 1994. *Neospora caninum* in dogs: Detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. *Parasite Immunology* **16**: 643–648.
- CHEADLE, M. A., D. S. LINDSAY, AND B. L. BLAGBURN. 1999. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs. *Veterinary Parasitology* **85**: 325–330.
- COŠKUN, Š. Z., L. AYDYN, AND C. BAUER. 2000. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in domestic dogs in Turkey. *Veterinary Record* **146**: 649.
- CRINGOLI, G., F. CAPUANO, V. VENEZIANO, L. ROMANO, R. SOLIMENE, J. S. BARBER, AND A. J. TREES. 1996. Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* in dog sera. *Parasitologia* **38**: 282.
- DI LORENZO, C., C. VENTURINI, C. CASTELLANO, L. VENTURINI, J. M. UNZAGA, AND D. BACIGALUPE. 1997. Detection of antibodies anti-*Neospora caninum* and anti-*Toxoplasma gondii* in dogs in urban area. *Revista de Medicina Veterinaria* **78**: 325–326.
- DUBEY, J. P. 1999. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Veterinary Parasitology* **84**: 349–367.
- , A. L. HATTEL, D. S. LINDSAY, AND M. J. TOPPER. 1988. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **193**: 1259–1263.
- , AND D. S. LINDSAY. 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology* **67**: 1–59.
- , AND ———. 2000. Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocysts. *Parasitology Research* **86**: 165–168.
- LATHE, C. L. 1994. *Neospora caninum* in British dogs. *Veterinary Record* **134**: 532.
- LINDSAY, D. S., AND J. P. DUBEY. 2000. Canine neosporosis. *Journal of Veterinary Parasitology* **14**: 1–11.
- , ———, AND R. B. DUNCAN. 1999. Confirmation that dogs are a definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology* **82**: 327–333.
- , S. J. UPTON, AND R. K. RIDLEY. 1990. Serological prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs from Kansas. *Journal of the Helminthological Society of Washington* **57**: 86–88.
- MCALLISTER, M. M., J. P. DUBEY, D. S. LINDSAY, W. R. JOLLEY, R. A. WILLS, AND A. M. MCGUIRE. 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology* **28**: 1473–1478.
- PARÉ, J., G. FECTEAU, M. FORTIN, AND G. MARSOLAIS. 1998. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **213**: 1595–1598.
- RASMUSSEN, K., AND A. L. JENSEN. 1996. Some epidemiologic features of canine neosporosis in Denmark. *Veterinary Parasitology* **62**: 345–349.
- REICHEL, M. P. 1998. Prevalence of *Neospora* antibodies in New Zealand dairy cattle and dogs. *New Zealand Veterinary Journal* **46**: 38.
- SAWADA, M., C. H. PARK, H. KONDO, T. MORITA, A. SHIMADA, I. YAMANE, AND T. UMEMURA. 1998. Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. *Journal of Veterinary Medical Science* **60**: 853–854.
- TREES, A. J., F. GUY, B. J. TENNANT, A. H. BALFOUR, AND J. P. DUBEY. 1993. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in a population of urban dogs in England. *Veterinary Record* **132**: 125–126.
- VENTURINI, M. C., L. VENTURINI, D. BACIGALUPE, M. MACHUCA, I. ECHAIDE, W. BASSO, J. M. UNZAGA, C. DI LORENZO, A. GUGLIEMONE, M. C. JENKINS, AND J. P. DUBEY. 1999. *Neospora caninum* infections in bovine fetuses and dairy cows with abortions in Argentina. *International Journal for Parasitology* **29**: 1705–1708.
- WOUDA, W., T. DIJKSTRA, A. M. H. KRAMER, C. VAN MAANEN, AND J. M. A. BRINKHOF. 1999. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *International Journal for Parasitology* **29**: 1677–1682.

FIRST ISOLATION OF *NEOSPORA CANINUM* FROM THE FECES OF A NATURALLY INFECTED DOG

W. Basso, L. Venturini, M. C. Venturini, D. E. Hill*, O. C. H. Kwok*, S. K. Shen*, and J. P. Dubey*†

Catedra de Parasitologia, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, 60 y 118, 1900 La Plata, Argentina.
e-mail: jdubey@anri.barc.usda.gov

ABSTRACT: *Neospora caninum* is a major cause of abortion in cattle worldwide. Cattle become infected with *N. caninum* by ingesting oocysts from the environment or transplacentally from dam to fetus. Experimentally, dogs can act as definitive hosts, but dogs excrete few oocysts after ingesting tissue cysts. A natural definitive host was unknown until now. In the present study, *N. caninum* was isolated from the feces of a dog. Gerbils (*Meriones unguiculatus*) fed feces from the dog developed antibodies to *N. caninum* in the *Neospora caninum* agglutination test, and tissue cysts were found in their brains. *Neospora caninum* was isolated in cell culture and in gamma-interferon gene knockout mice inoculated with brain homogenates of infected gerbils. The DNA obtained from fecal oocysts of the dog, from the brains of gerbils fed dog feces, and from organisms isolated in cell cultures inoculated with gerbil brains was confirmed as *N. caninum*. The identification of *N. caninum* oocyst by bioassay and polymerase chain reaction demonstrates that the dog is a natural definitive host for *N. caninum*.

Neospora caninum is now recognized as one of the most important causes of abortion in cattle in many countries, particularly the U.S., New Zealand, Australia, and the Netherlands (reviewed in Dubey and Lindsay, 1996; Dubey, 1999). Transfer of the parasite from a dam to the fetus (vertical transmission) and ingestion of oocysts from the feces of dogs are the 2 known modes of infection by *N. caninum* in cattle (Thilsted and Dubey, 1989; De Marez et al., 1999). Until the discovery of the resistant stage (oocyst) of *N. caninum*, initial introduction of the parasite into a herd remained unexplained (McAllister et al., 1998; Lindsay et al., 1999). Because *N. caninum* is efficiently transmitted vertically in cattle for several generations, the role of the oocyst in the natural epidemiology of *N. caninum* is uncertain. Experimentally, the dog does not seem to be a good definitive host for *N. caninum* because after feeding tissue cysts, only a few oocysts are shed, and shedding occurs inconsistently and for only a short period of time. *Neospora caninum* oocysts have not been recovered from feces of naturally infected dogs. In the present study, the presence of *N. caninum* oocysts in the feces of a naturally infected dog is reported for the first time.

MATERIALS AND METHODS

Dog naturally infected with *N. caninum*

A 45-day-old, 6.5-kg male Rottweiler dog was examined by a veterinarian because of soft feces. The dog had lived near La Plata, Argentina, with its mother until sold at 43 days of age. During this time, the pup was nursed naturally by the bitch and had been fed uncooked beef several times. Feces of the pup were examined for parasite eggs and coccidian oocysts using zinc sulfate and sugar flotation. Small, *Hammondia-Neospora*-like oocysts were found in fecal floats. The dog was treated with sulfaguanidine (100 mg/kg, twice daily, orally) for 5 days, not treated for 5 days, and then the sulfonamide treatment was repeated for 5 days. The dog's feces became firm and the owner did not bring the dog for post-treatment examination. The dog had been vaccinated against distemper, parvo-, adeno-, parainfluenza-, and rabies viruses, and against *Leptospira* spp.

Feces collected from the dog before sulfonamide treatment were homogenized in 2.5% potassium dichromate, passed through 300-, 150-, and 53- μ m wire sieves, centrifuged, and incubated at room temperature

(~22 C) for 14 days. Oocysts were concentrated by flotation in a sugar solution (specific gravity 1.18), washed, and stored at 4 C in 2.5% potassium dichromate until used. Oocysts from this dog were shipped via air to the U.S. Department of Agriculture Parasite Biology, Epidemiology and Systematics Laboratory in Beltsville, Maryland for further identification.

Bioassay of oocysts

At Beltsville, oocysts from dog feces were fed to Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*), and tissues of gerbils were bioassayed in gamma-interferon gene knockout (KO) mice as described (Dubey et al., 1998; Dubey and Lindsay, 2000). The KO mice and gerbils were obtained from the same source as previously described. All important tissues of animals that died or those killed were fixed in buffered neutral 10% formalin. Paraffin-embedded sections were cut at 5- μ m thickness, stained with hematoxylin and eosin (H&E), and examined microscopically. Deparaffinized sections of some tissues were stained with antibodies to *Toxoplasma gondii* and *N. caninum* as described (Lindsay and Dubey, 1989a). Selected sections were also stained with bradyzoite-specific anti-BAG-5 antibodies as described by McAllister, Parmley et al. (1996). A 1:10,000 dilution of anti-BAG-5 rabbit serum does not stain tachyzoites of *N. caninum* or *T. gondii* but stains bradyzoites of both species.

Surviving mice and gerbils were bled 5–10 wk postinoculation (PI), and their sera were examined for antibodies to *T. gondii* (Dubey and Desmonts, 1987) and *N. caninum* (Romand et al., 1998) in agglutination tests using mouse-derived formalin-fixed whole tachyzoites of the respective organism.

For propagation of organisms, tissue homogenates were inoculated subcutaneously (s.c.) into KO mice and gerbils, and seeded on to cell cultures using methods described previously (Lindsay and Dubey, 1989b; Dubey et al., 1998; Dubey and Lindsay, 2000). If mice became ill, they were given sulfadiazine sodium (1 mg/ml) in drinking water (Lindsay and Dubey, 1990).

An aliquot of oocysts was fed to 3 gerbils (no. 7946, 7947, 7949); the oocysts had been stored for 60 days. Two gerbils were inoculated intramuscularly with 8 mg (gerbil no. 7947) or 4 mg (gerbil no. 7949) of methyl prednisolone acetate (MPA; Pharmacia and UpJohn, Kalamazoo, Michigan) 63 days after feeding oocysts (DAFO). Gerbil no. 7946 was killed 63 DAFO. Gerbil nos. 7947 and 7949 were killed 75 DAFO, 12 days after inoculation with MPA.

All gerbils were necropsied. The brain of gerbil no. 7946, that was not given MPA, was divided into 2 halves. One half was fixed for histology and the other half was homogenized in 3 ml phosphate-buffered saline (PBS); 2 ml of the homogenate was inoculated into 4 KO mice (Table I), and 1 ml was stored at -70 C for polymerase chain reaction (PCR). Brain homogenate from gerbil nos. 7947 and 7949 were inoculated into 8 KO mice (Table I).

In vitro cultivation

Brain homogenate from KO mice nos. 2868 and 2665 and heart of mouse no. 2634 (Table I) were inoculated onto M617 cells as described

Received 6 April 2001; revised 16 April 2001; accepted 16 April 2001.

* United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Animal and Natural Resources Institute, Parasite Biology, Epidemiology and Systematics Laboratory, Building 1001, BARC-East, Beltsville, Maryland 20705-2350.

† Author for correspondence.

TABLE I. Isolation of *Neospora caninum* in KO mice injected with brain homogenate of gerbils fed oocysts from the naturally infected dog from Argentina.

Gerbil no.	KO mouse no.	Route of injection	Day of necropsy†	<i>N. caninum</i> in tissues§
7946	2632	s.c*	K116	none
	2633	s. c	K116	none
	2634	i. p	D32	B, H, P
	2635	i. p	K116	none
7947	2868	s. c	DK12	H, Li, Lu
	2869	s. c	K24‡	B, H, K, P
	2870	i. p	D15	H, K, Li, Lu, P, Sp
	2871	i. p	D14	H, K, Lu, P
7949	2663	s. c	DK32	A, B, Li, Lu, O, P
	2664	s. c	DK33	B, H, Li, Sk, Sp
	2666	i. p	D18	H, Lu, Rg, Sk, T
	2665	i. p	DK20	H, Lu, P

* s.c., Subcutaneous, i.p., intraperitoneal.

† D = died, K = killed, DK = killed when ill.

‡ Given sulfadiazine sodium in drinking water 12–22 days after injection with brain homogenate.

§ A = adrenal, B = brain, H = heart, K = kidney, Li = liver, Lu = lung, O = omentum, P = pancreas, Rg = renal ganglion, Sk = skeletal muscle, Sp = spleen.

(Dubey et al., 1998). Tachyzoites (1×10^6) from cell culture were inoculated s.c. into 3 KO mice.

Genomic DNA isolation

Oocysts from feces of the La Plata dog were resuspended in DNA-extraction buffer (50 mM Tris, pH 8.0, 100 mM NaCl, 50 mM EDTA, 2% SDS) and placed in an Eppendorf tube containing 0.5-mm-diameter

glass beads. The oocyst sample was disrupted using a Mini-Beadbeater (Biospec Products, Bartlesville, Oklahoma) for 3 min at room temperature. The disrupted oocyst solution was then treated with Protease K (final concentration, 1% w/v) in DNA extraction buffer for 2 hr at 65 °C, extracted with equal volumes of phenol, phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1 v/v), and chloroform, precipitated with 1/10 volume of 3 M NaAc and 2.2 vol of ice-cold ethanol, and stored at –20 °C for 2 hr. Precipitated DNA was collected by centrifugation, treated with RNase-it (Stratagene, La Jolla, California), re-extracted with organic solvents, and precipitated as described above. The pellet was resuspended in dH₂O and the genomic DNA concentration was determined by spectrophotometric analysis at 280/260 nm. The DNA was stored frozen until used in PCR assays.

Brains of gerbils fed feces of the dog were emulsified using a Polytron tissue homogenizer and treated as above. Cell cultures containing parasites were snap frozen and ground to a powder manually using a chilled mortar and pestle, then treated as above. *Hammondia heydorni* DNA was the same as that used by Ellis et al. (1999), and was obtained from oocysts from a naturally infected dog (Blagburn et al., 1988). *Neospora hughesi* and *N. caninum* tachyzoites were collected from in vitro culture in HCT-8 cells and processed for DNA extraction as described above.

PCR assays

Genomic DNA from *N. caninum*, *N. hughesi*, or *H. heydorni*, was added to tubes of a PCR master mix containing 1 mM MgCl₂, 1× PCR buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3), 200 μM dNTPs, 200 pg each primer, and 2.5 units Amplitaq polymerase (Gene Amp kit; Perkin-Elmer, Branchburg, New Jersey). To avoid PCR inhibition by fecal contaminants present in the oocyst DNA preparations, bovine serum albumin was added to the reactions at a concentration of 0.8 mg/ml, and oocyst DNA was diluted (1:10 or 1:100 from 10 ng) to reduce the concentration of inhibitors. PCR products were EtOH-precipitated and separated electrophoretically in 1.5% agarose gels at 100 V. Gels were then stained with ethidium bromide and visualized with a UVP image acquisition system (Ultra Violet Products Inc., Upland, California). PCR conditions were those described by Yamage et al. (1996) using the Nc 5 genomic sequence of *N. caninum*, Guo and Johnson (1995) and Spencer et al. (2000) using random amplified polymorphic DNA (RAPD), and Ellis et al. (1999) using *H. heydorni* internal transcribed spacer (ITS) sequence.

RESULTS

All gerbils remained clinically normal. Lesions or parasites were not seen in tissues of gerbil nos. 7946 and 7947. Two *N.*

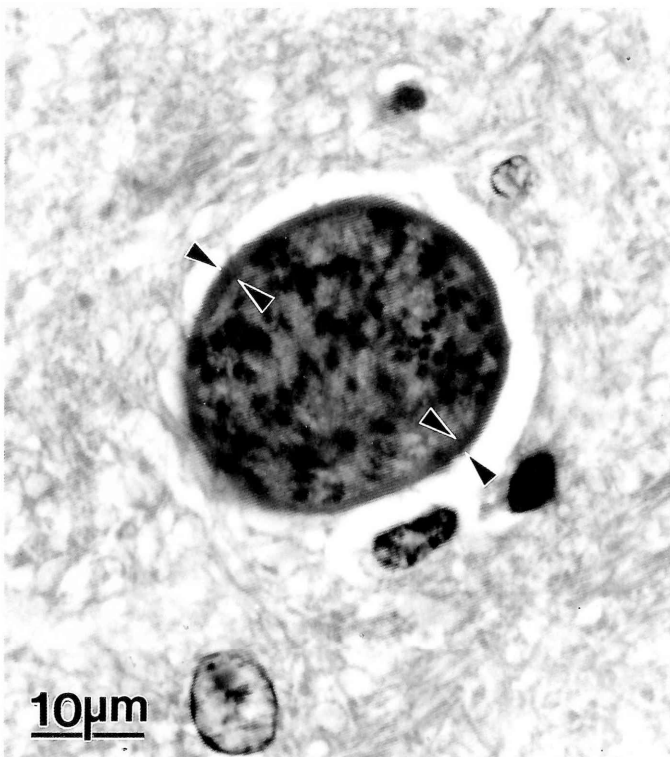


FIGURE 1. *Neospora caninum*-like tissue cyst in the brain of gerbil no. 7949 fed feces from the naturally infected dog. Note thick cyst wall (arrowheads). Hematoxylin and eosin stain.

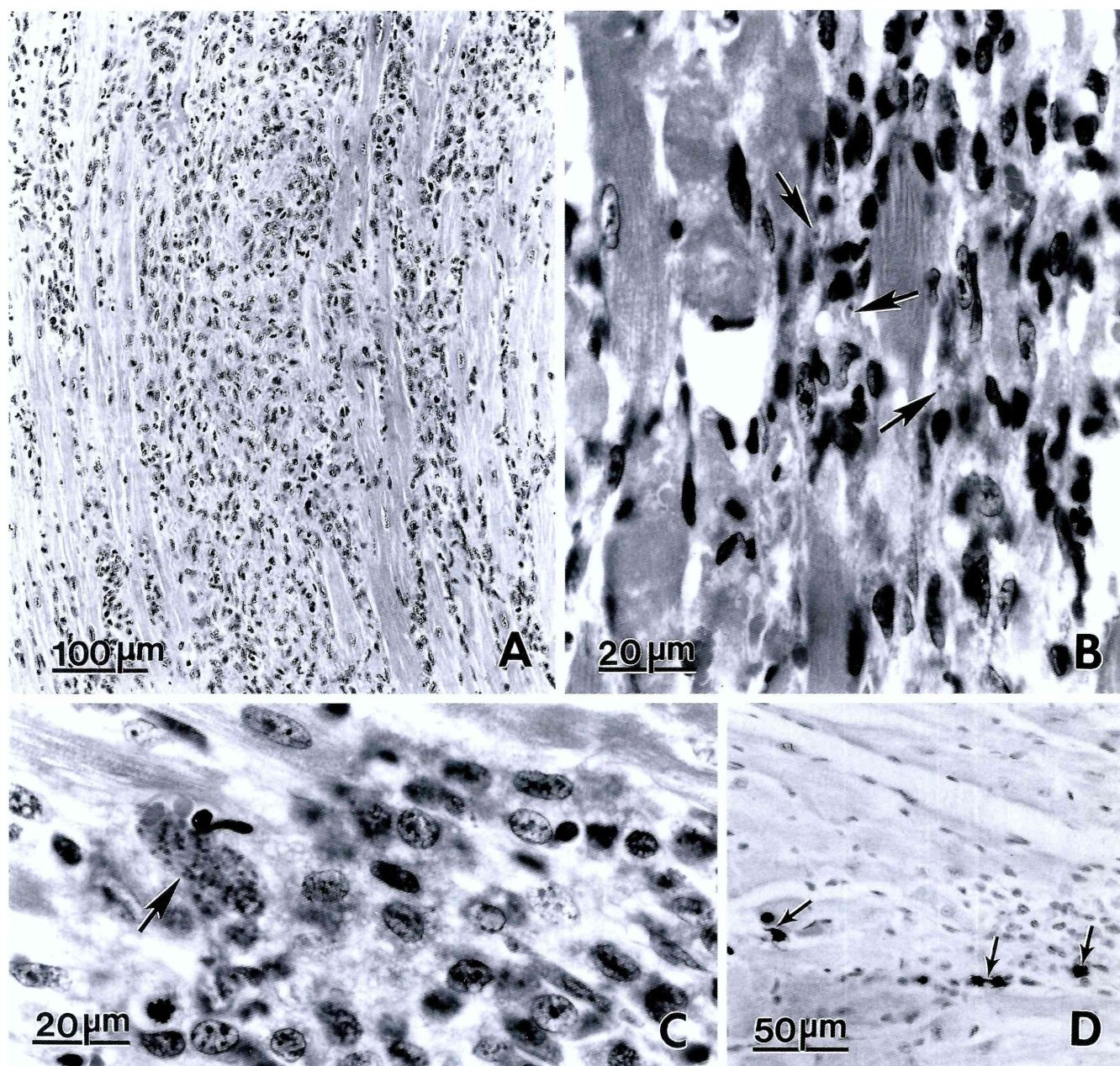


FIGURE 2. Myocarditis and *Neospora caninum* tachyzoites in the heart of KO mouse no. 2868 inoculated with brain homogenate of gerbil no. 7949. A–C, Hematoxylin and eosin stain; D, immunohistochemical stain with anti-*N. caninum* antibodies. A. Severe infiltration of mixed leukocytes in myocardium. B. Higher magnification to show degeneration of myocardiocytes, infiltration of mononuclear cells and neutrophils, and tachyzoites (arrows). C. Inflammatory focus with a large group of tachyzoites (arrows). D. Tachyzoites (arrows) stained with anti-*N. caninum* antibodies.

caninum tissue cysts measuring $28 \times 26 \mu\text{m}$ and $32 \times 27 \mu\text{m}$ were seen in sections of brain of gerbil no. 7949; there were few foci of inflammation in its brain. Tissue cysts had smooth, $>1\text{-}\mu\text{m}$ thick cyst walls (Fig. 1). Tissue cysts were not seen in 3 additional sections made from the brain of this gerbil. The gerbils had *N. caninum* agglutination test titers of $>1:500$, but had no antibodies to *T. gondii* ($<1:25$).

Neospora caninum was isolated in KO mice inoculated with brain homogenate of each of the 3 gerbils (Table I). Only 1 of the 4 KO mice inoculated with brain from gerbil no. 7946 was

infected with *N. caninum*, whereas all 8 KO mice inoculated with brains from gerbil nos. 7947 and 7949 developed neosporosis. In KO mice, the predominant lesion was myocarditis (Fig. 2). The myocarditis was characterized by necrosis and marked infiltration by mixed leukocytes (Fig. 2A); only tachyzoites were identified in the heart (Fig. 2B, C). More organisms were seen in sections stained immunohistochemically with anti-*N. caninum* antibodies (Fig. 2D) than in H&E-stained sections. Death of KO mice was attributed to myocarditis. In the brain of KO mouse no. 2869 (treated with sulfadiazine) a tissue cyst

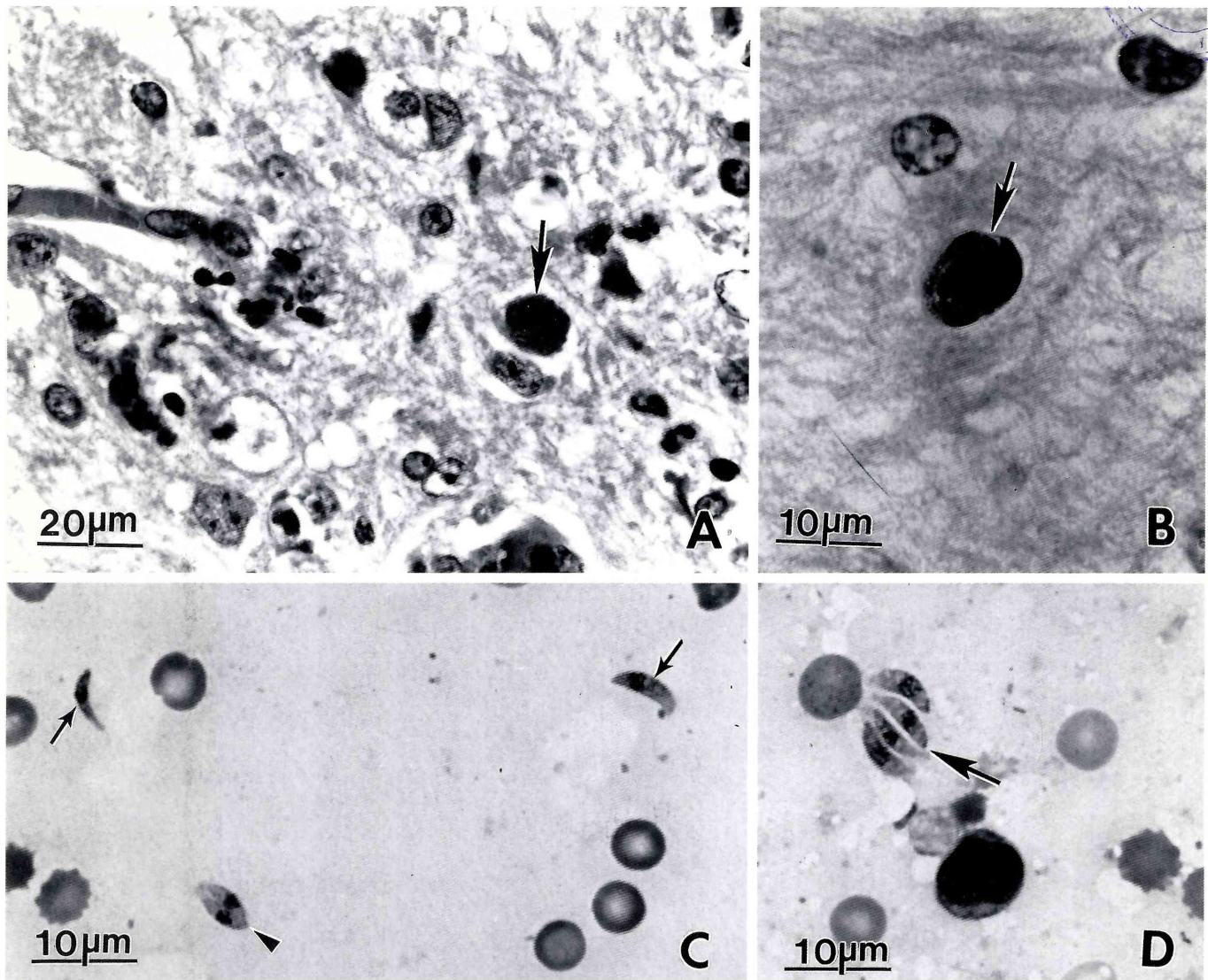


FIGURE 3. Lesions and *Neospora caninum* in tissues of KO mice inoculated with Argentinean isolate of *N. caninum*. **A.** Focal encephalitis in the brain of KO mouse No. 2869, 24 days after inoculation with brain homogenate of gerbil No. 7949. Note a tissue cyst (arrow) near an inflammatory focus; tachyzoites are also present in the lesion but not visible in this plane of focus. Hematoxylin and eosin stain. **B.** Tissue cyst (arrow) in an adjacent section of brain from the mouse in Figure 3A. Immunohistochemical stain with anti-*N. caninum* antibodies. **C.** and **D.** Tachyzoites in impression smear of lung of a KO mouse inoculated s.c. with organisms from cell culture. Note individual (small arrows), dividing (arrowhead), and divided organisms (large arrow). Giemsa stain.

was seen near an encephalitic lesion in section of brain stained with H&E (Fig. 3A), and several tissue cysts were seen in sections stained with BAG-5 antibodies (Fig. 3B).

Eight days after inoculation of M617 cells with brain of the KO mouse no. 2868, extracellular organisms were seen in culture. The protozoan isolate grew slowly. Approximately 3×10^6 tachyzoites were collected from the culture medium 2 mo after initial inoculation and about 1×10^6 organisms were collected 86 days from the time the original flask was inoculated with brain homogenate; at this time, most host cells were destroyed, and the collected tachyzoites were cryopreserved. This isolate of *N. caninum* is designated NC-6 Argentina.

Protozoa were first seen in culture 15 days after inoculation with brain tissue from KO mouse no. 2665. Ninety-nine days later, many organisms were seen and the culture was cryopre-

served. The culture inoculated with heart homogenate of KO mouse no. 2634 became contaminated with bacteria and was discarded. The 3 KO mice that were inoculated with culture-derived tachyzoites died of acute, generalized neosporosis on day 11 or 12, with tachyzoites in almost all tissues (Fig. 3C, D).

The PCR assay using the *N. caninum*-specific Np6/21 primer set resulted in 1 amplicon of 328 bp on electrophoretic gels in samples containing genomic DNA from putative *N. caninum* oocysts isolated from feces of the La Plata dog (Fig. 4). No amplification was seen using this same genomic DNA in PCR assays with *H. heydorni* ITS-specific primers (ITS1 and 2). The DNA isolated from the brains of 3 gerbils fed La Plata dog feces containing the same putative *N. caninum* oocysts was amplified using the Np6/21 primer set; genomic DNA isolated

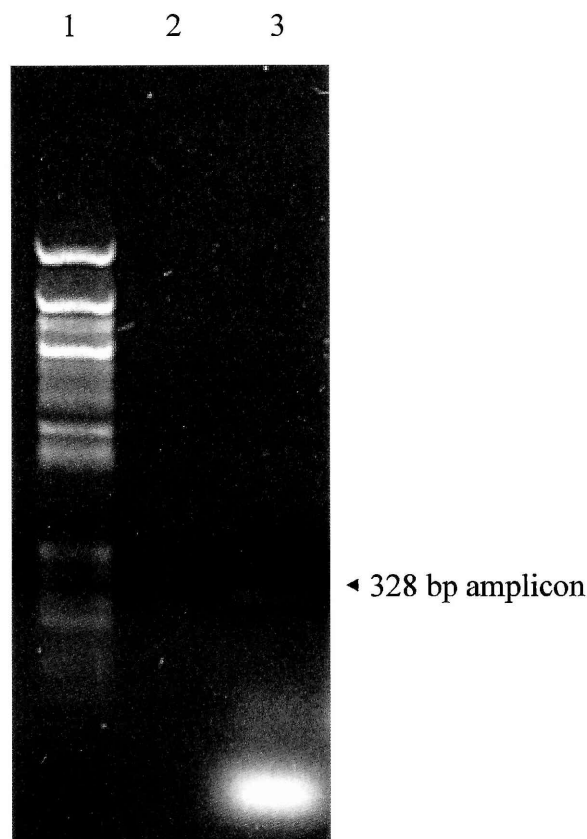


FIGURE 4. Oocysts collected from La Plata dog feces and processed for DNA isolation; Lane 1, HAE III markers; Lane 2, oocyst DNA *Hammondia heydorni* ITS primer PCR results; Lane 3, La Plata dog oocyst DNA *Neospora caninum* Np6/21 primer PCR results.

from *N. hughesi* tachyzoites was not amplified using these same primers (Fig. 5). Random primer F6 (Spencer et al., 2000) amplified a 450-bp PCR product in assays containing DNA from the brain of gerbil no. 7949 (described above), known *N. caninum* tachyzoites, putative *N. caninum* oocysts from the La Plata dog, and known *N. caninum* oocysts from an experimentally infected dog (Fig. 6). Importantly, DNA from the brain of gerbil no. 7949, putative *N. caninum* oocyst DNA from the La Plata dog, and DNA from cell cultures inoculated with gerbil brain homogenates was distinguished from *H. heydorni* oocyst DNA

and *N. hughesi* tachyzoite DNA preparations using the F6 primer that produced 500-bp and 220-bp amplicons, respectively. DNA isolated from the brain of gerbil no. 7949, DNA from tachyzoites isolated from M617 cell culture, and DNA from oocysts isolated from feces of the La Plata dog was amplified using the Np6/21 primers and produced the expected 328-bp amplicon, indicating the presence of DNA from *N. caninum* (Fig. 7).

DISCUSSION

The parasite from the feces of the dog from La Plata was identified as *N. caninum* based on structure, antigenicity, and molecular characteristics. It was distinguished from *N. hughesi*, the only other known species of *Neospora*. *Neospora hughesi* does not appear to persist (or infect) gerbils. Gerbils inoculated with *N. hughesi* tachyzoites developed antibodies to *N. caninum*, but the parasite could not be demonstrated in gerbil tissues (Walsh et al., 2000; Dubey et al., 2001), whereas in the present report tissue cysts were seen in the brain of 1 gerbil and *N. caninum* was isolated from brains of all 3 inoculated gerbils. Of interest is the severe myocarditis seen in KO mice inoculated with gerbil tissues. In both previous studies (Walsh et al., 2000; Dubey et al., 2001), KO mice inoculated with *N. hughesi* developed severe myocarditis, whereas in KO mice inoculated with NC-1 and other strains of *N. caninum* the predominant lesion was hepatitis. Therefore, finding severe myocarditis in KO mice inoculated with the strain of *N. caninum* isolated from the La Plata dog feces was surprising and the results indicate that this criterion is not reliable in distinguishing *N. hughesi* from *N. caninum*.

The number of *N. caninum* oocysts present in feces of the dog from Argentina was not determined but presumably was low. Two gerbils fed dog feces were given MPA with the intention of causing relapsing neosporosis. Two tissue cysts were seen in 1 of the 2 gerbils given MPA. Finding tissue cysts in 1 gerbil was probably a chance factor and not due to MPA administration because there was no histologic evidence for relapse of *N. caninum* infection. The size of the tissue cysts (27–32 μ m) also suggests that these tissue cysts originated from the primary infection because less than 2 wk had elapsed between administration of MPA and killing of the gerbils. Nothing is known of the corticoid sensitivity of gerbils to *N. caninum* infection. Gerbils were used for bioassay in the present study because they had been found susceptible to *N. caninum* infec-

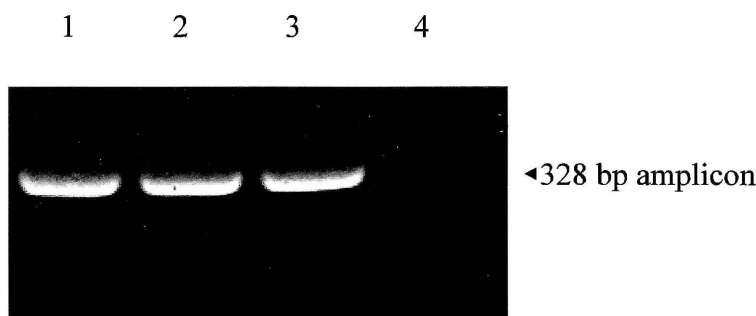


FIGURE 5. 328 bp amplicon using DNA isolated from brains of 3 oocyst-fed gerbils and Np6/21 primer set. Lanes 1, 2, and 3, gerbil brains 1, 2, and 3; lane 4, PCR results using *Neospora hughesi* tachyzoite DNA and Np6/21 primers.

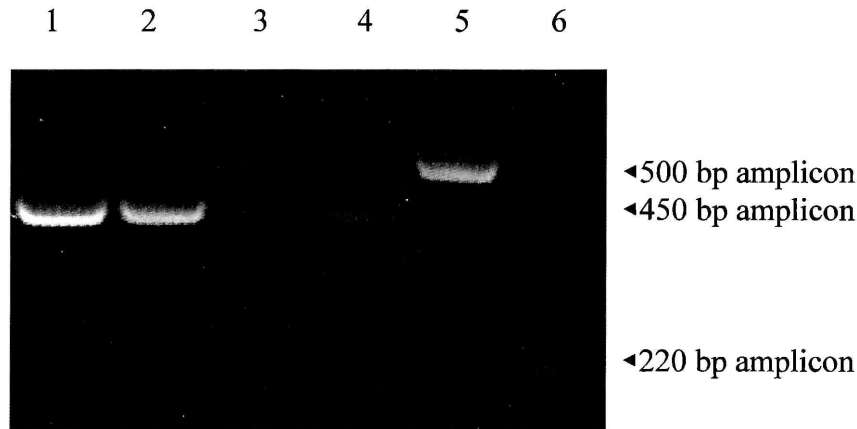


FIGURE 6. Random primer F6 (Spencer et al., 2000) amplification of *Neospora caninum* DNA isolated from gerbil brain (gerbil No. 7949, lane 1), *N. caninum* tachyzoite control DNA (lane 2), *N. caninum* oocyst DNA from La Plata dog (lane 3), *N. caninum* oocyst control DNA (lane 4), *Hammondia heydorni* oocyst DNA (lane 5), and *Neospora hughesi* tachyzoite DNA (lane 6).

tion (Cuddon et al., 1992; Gondim et al., 1999; Dubey and Lindsay, 2000). However, well-developed *N. caninum* tissue cysts have not been previously found in gerbils (J. Dubey, unpubl. obs.).

The natural epidemiology of *N. caninum* in bovine herds is not well understood. There is evidence that in epidemics of *Neospora*-induced abortion, the source of the infection is external rather than a relapse of chronic *N. caninum* infection in the cow herd (Yaeger et al., 1994; McAllister, Huffman et al., 1996; Wouda, Bartels and Moen, 1999; McAllister, Bjokman et al., 2000; Dijkstra et al., 2001). There is also seroepidemiologic evidence linking *N. caninum* infection in cattle with seropositivity in dogs on cattle farms (Sawada et al., 1998; Bartels et al., 1999; Paré et al., 1999; Wouda, Dijkstra et al., 1999). Yet, attempts to produce *N. caninum* oocysts in the laboratory by feeding experimentally infected animals have been largely unsuccessful. It is possible that oocyst shedding in dogs requires ingestion of a particular species of intermediate host; a small natural intermediate host for *N. caninum* is unknown.

Specific detection of *N. caninum* oocysts in dog feces was previously impossible due to an inability to morphologically distinguish *N. caninum* oocysts from *H. heydorni* for which dogs are also a definitive host (Dubey, 1993), and *H. hammondi* and *T. gondii*, whose oocysts might contaminate dog feces (Lindsay et al., 1997). The use of the PCR assays described here that can specifically identify *N. caninum* oocysts will result in more precise epidemiological studies to determine the prevalence of *N. caninum* in domestic dogs and in wild canids. However, the results of the present study leave no doubt that the dog is a natural definitive host for *N. caninum*.

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to Valsin Fournet for technical assistance, and Dr. H. R. Gamble for advice.

LITERATURE CITED

- BARTELS, C. J. M., W. Wouda, and Y. H. Schukken. 1999. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology* **52**: 247–257.
- BLAGBURN, B. L., D. S. LINDSAY, L. J. SWANGO, G. L. PIDGEON, and K. G. BRAUND. 1988. Further characterization of the biology of *Hammondi heydorni*. *Veterinary Parasitology* **27**: 193–198.
- CUDDON, P., D. S. LIN, D. D. BOWMAN, D. S. LINDSAY, T. K. MILLER, I. D. DUNCAN, A. DE LAHUNTA, J. CUMMINGS, M. SUTER, B. COOPER, J. M. KING, and J. P. DUBEY. 1992. *Neospora caninum* infection in English springer spaniel littermates: Diagnostic evaluation and organism isolation. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **6**: 325–332.
- DE MAREZ, T., S. LIDDELL, J. P. DUBEY, M. C. JENKINS, and L. GASBARRE. 1999. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: Humoral and cellular immune responses. *International Journal for Parasitology* **29**: 1647–1657.
- DIJKSTRA, T., H. W. BARKEMA, M. EYSKER, and W. Wouda. 2001. Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. *International Journal for Parasitology* **31**: 209–215.
- DUBEY, J. P. 1993. *Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of humans and animals. In *Parasitic protozoa*, Vol. 6, J. P. Kreier (ed.). Academic Press, New York, New York, p. 1–158.
- . 1999. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Veterinary Parasitology* **84**: 349–367.
- , and G. DESMONTS. 1987. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Equine Veterinary Journal* **19**: 337–339.
- , K. R. DOROUGH, M. C. JENKINS, S. LIDDELL, C. A. SPEER, O. C. H. KWOK, and S. K. SHEN. 1998. Canine neosporosis: Clinical



FIGURE 7. 328 bp amplicon using Np6/21 primer set and DNA isolated from, Lane 1, oocyst-fed gerbil brain (gerbil No. 7949), Lane 2, tachyzoites isolated from in vitro cell cultures inoculated with bradyzoites from gerbil brain, Lane 3, oocysts isolated from feces of La Plata dog, Lane 4, *N. hughesi* tachyzoites, Lane 5, *Hammondia heydorni* oocysts, and Lane 6, NC-1 tachyzoite control.

- signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. *International Journal for Parasitology* **28**: 1293–1304.
- , A. L. HATTEL, D. S. LINDSAY, AND M. J. TOPPER. 1988. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **193**: 1259–1263.
- , S. LIDDELL, D. MATTSON, C. A. SPEER, D. K. HOWE AND M. C. JENKINS. 2001. Characterization of the Oregon isolate of *Neospora hughesi* from a horse. *Journal of Parasitology* **87**: 345–353.
- , AND D. S. LINDSAY. 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology* **67**: 1–59.
- , AND ———. 2000. Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocysts. *Parasitology Research* **86**: 165–168.
- ELLIS, J. T., D. A. MORRISON, S. LIDDELL, M. C. JENKINS, O. B. MOHAMMED, C. RYCE, AND J. P. DUBEY. 1999. The genus *Hammondia* is paraphyletic. *Parasitology* **118**: 357–362.
- GONDIM, P. L. F., H. SAEKI, H. ONAGA, M. HARITANI, AND I. YAMANE. 1999. Maintenance of *Neospora caninum* tachyzoites using Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *New Zealand Veterinary Journal* **47**: 36.
- GUO, Z. G., AND A. M. JOHNSON. 1995. Genetic comparison of *Neospora caninum* with *Toxoplasma* and *Sarcocystis* by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. *Parasitology Research* **81**: 365–370.
- LINDSAY, D. S., AND J. P. DUBEY. 1989a. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *American Journal of Veterinary Research* **50**: 1981–1983.
- , AND ———. 1989b. In vitro development of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) from dogs. *Journal of Parasitology* **75**: 163–165.
- , AND ———. 1990. Effects of sulfadiazine and amprolium on *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) infections in mice. *Journal of Parasitology* **76**: 177–179.
- , ———, J. M. BUTLER, AND B. L. BLAGBURN. 1997. Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. *Veterinary Parasitology* **73**: 27–33.
- , ———, AND R. B. DUNCAN. 1999. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology* **82**: 327–333.
- MCCALLISTER, M. M., BJÖRKMAN, R. ANDERSON-SPRECHER, AND D. G. ROGERS. 2000. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **217**: 881–887.
- , J. P. DUBEY, D. S. LINDSAY, W. R. JOLLEY, R. A. WILLS, AND A. M. MCGUIRE. 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology* **28**: 1473–1478.
- , E. M. HUFFMAN, S. K. HIETALA, P. A. CONRAD, M. L. ANDERSON, AND M. O. SALMAN. 1996. Evidence suggesting a point source exposure in an outbreak of bovine abortion due to neosporosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **8**: 355–357.
- , S. F. PARMLEY, L. M. WEISS, V. J. WELCH, AND A. M. MCGUIRE. 1996. An immunohistochemical method for detecting bradyzoite antigen (BAG 5) in *Toxoplasma gondii*-infected tissues cross-reacts with a *Neospora caninum* bradyzoite antigen. *Journal of Parasitology* **82**: 354–355.
- PARÉ, J., G. FECTEAU, M. FORTIN, AND G. MARSOLAI. 1998. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **213**: 1595–1598.
- ROMAND, S., P. THULLIEZ, AND J. P. DUBEY. 1998. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Parasitology Research* **84**: 50–53.
- SAWADA, M., C. H. PARK, H. KONDO, T. MORITA, A. SHIMADA, I. YAMANE, AND T. UMEMURA. 1998. Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. *Journal of Veterinary Medical Science* **60**: 853–854.
- SPENCER, J. A., A. K. WITHEROW, AND B. L. BLAGBURN. 2000. A random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction technique that differentiates between *Neospora* species. *Journal of Parasitology* **86**, 1366–1368.
- THILSTED, J. P., AND J. P. DUBEY. 1989. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **1**: 205–209.
- WALSH, C. P., R. B. DUNCAN, A. M. ZAJAC, B. L. BLAGBURN, AND D. S. LINDSAY. 2000. *Neospora hughesi*: Experimental infections in mice, gerbils, and dogs. *Veterinary Parasitology* **92**: 119–128.
- WOUDA, W., C. J. M. BARTELS, AND A. R. MOEN. 1999. Characteristics of *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995–1997). *Theriogenology* **52**: 233–245.
- , T. DIJKSTRA, A. M. H. KRAMER, C. VAN MAANEN, AND J. M. A. BRINKHOF. 1999. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *International Journal for Parasitology* **29**: 1677–1682.
- YAEGER, M. J., S. SHAWD-WESSELS, AND P. LESLIE-STEEN. 1994. *Neospora* abortion storm in a midwestern dairy. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **6**: 506–508.
- YAMAGE, M., O. FLECHTNER, AND B. GOTTSSTEIN. 1996. *Neospora caninum*: Specific oligonucleotide primers for the detection of brain “cyst” DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Parasitology* **82**: 272–279.