

Facultad de Ciencias Veterinarias

Universidad Nacional de La Plata

Especialización de Diagnóstico Veterinario de
Laboratorio

Título: “**Evaluación de la presencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* y anti-*Neospora caninum* en sueros caninos de la provincia de Buenos Aires mediante las técnicas de inmunofluorescencia indirecta y aglutinación directa.**”

Alumno: **Med. Vet. María Laura Gos**

Director: **Dr. Juan Manuel Unzaga**

Codirector: **Dra. Lais Luján Pardini**

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. PLANTEAMIENTO DEL TEMA.....	5
2.1. Morfología.....	6
2.2. Ciclo biológico.....	7
2.3. Signos clínicos.....	11
2.4. Diagnóstico en caninos.....	14
2.4.1 Métodos directos.....	14
2.4.2 Métodos indirectos.....	17
2.5. Prevalencia en caninos.....	19
2.6. Situación en Argentina.....	20
2.7. Tratamiento.....	21
2.8. Prevención y aspectos zoonóticos.....	22
2.9. DESARROLLO.....	22
2.9.1 Materiales y métodos.....	22
2.9.2 Resultados.....	24
3. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	27
4. ANEXOS.....	34
5. BIBLIOGRAFÍA.....	41

INDICE DE ABREVIATURAS

ABC: complejo avidina-biotina
ADN: ácido desoxirribonucleico
ALP: fosfata alcalina
ALT: alanina aminotransferasa
AST: aspartato aminotransferasa
col.: colaboradores
CPK: creatinina quinasa
c.s.p: cantidad suficiente para
2-ME: 2- mercaptoetano
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
ELISA: enzimoimmunoensayo
F.C.V: Facultad de Ciencias Veterinarias
Fig.: figura
g: gramos
HD: hospedador definitivo
HI: hospedador intermediario
IFI: Prueba de inmunofluorescencia indirecta
Ig.: Inmunoglobulina
IHA: Prueba de aglutinación indirecta
LCR: líquido cefalorraquídeo
LSAB: complejo estreptavidina-biotina
MAT: Prueba de aglutinación modificada
ml: mililitros
mg/kg: miligramos por kilogramo de peso
PAP: peroxidasa antiperoxidasa

P.A.S.: ácido peryódico de Schiff Positivo

PBS: solución buffer salina de fosfatos

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

p.i: post inoculación

rpm: revoluciones por minuto

SFB: suero fetal bovino

SNC: sistema nervioso central

µl: microlitros

U.N.L.P.: Universidad Nacional de La Plata

Agradecimientos: Se agradece a la Prof. Med. Vet. Estela Bonzo por el asesoramiento en el análisis estadístico.

1. INTRODUCCION

Objetivos del trabajo final:

A. Objetivos generales:

Determinar la presencia de anticuerpos anti-*T. gondii* y anti-*N. caninum* en caninos de la provincia de Buenos Aires por la técnica de inmunofluorescencia indirecta y evaluar una prueba de aglutinación comercial para la detección de anticuerpos anti-*T. gondii* en caninos domésticos.

B. Objetivos específicos:

1. Determinar la presencia de anticuerpos anti-*T. gondii* y anti-*N. caninum* en caninos provenientes de la provincia de Buenos Aires en el período 2011-2013 mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta.
2. Determinar la relación entre la presencia de anticuerpos anti-*T. gondii* y anti-*N. caninum* por la técnica de inmunofluorescencia indirecta y la presencia de signos clínicos, edad y sexo en caninos provenientes de la provincia de Buenos Aires.
3. Evaluar una prueba de aglutinación directa de origen comercial de uso en diagnóstico humano para la detección de anticuerpos específicos anti-*T. gondii* en caninos domésticos.

Motivos de elección de la temática propuesta:

En los últimos años se ha incrementado la solicitud del diagnóstico serológico de neosporosis y toxoplasmosis en los caninos por parte de los médicos veterinarios por lo cual se considera de importancia conocer la patogenia y la presentación clínica de estas enfermedades, como así también conocer los métodos de diagnóstico disponibles, analizando las ventajas y desventajas que presentan cada uno de ellos.

2. PLANTEAMIENTO DEL TEMA

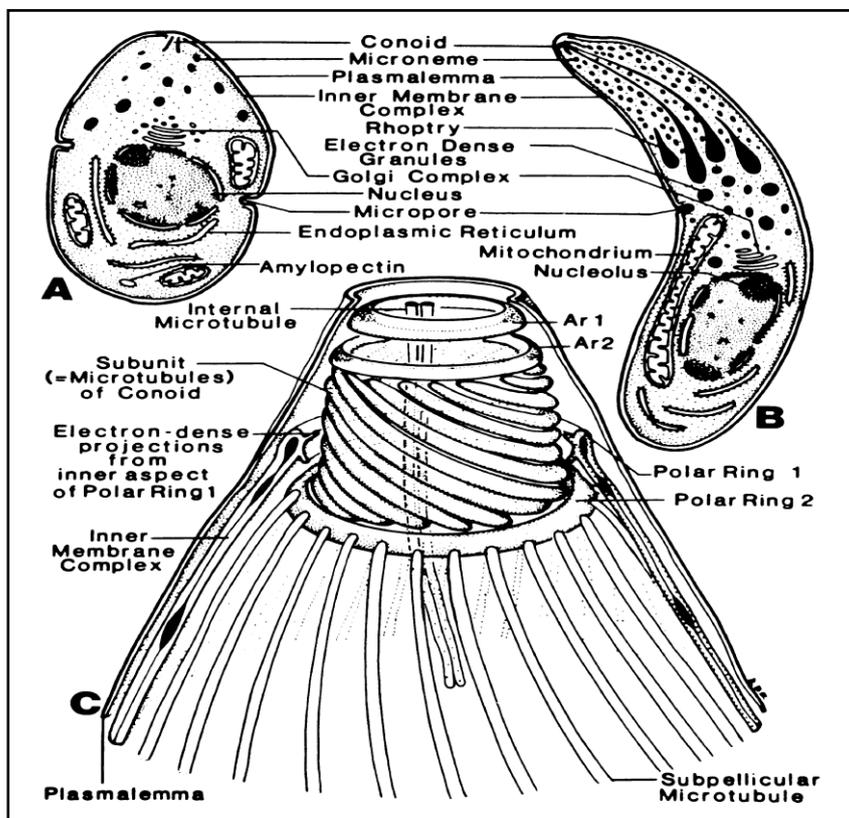
La toxoplasmosis y neosporosis son enfermedades causadas por protozoarios del Phylum Apicomplexa (Dubey y Lappin, 2006). La toxoplasmosis es producida por *Toxoplasma gondii*, parásito que afecta a los animales de sangre caliente, incluido el hombre, produciendo una gran variedad de manifestaciones clínicas (Tenter y col., 2000). La neosporosis es causada por *Neospora caninum*, parásito que fue erróneamente diagnosticado como *T. gondii* hasta su descripción en el año 1988 por Dubey (Dubey y col., 1988), que ocasiona enfermedad neuromuscular y muerte en caninos y es considerado uno de los principales agentes causantes de aborto en

bovinos a nivel mundial (Dubey y Schares, 2011). En los caninos la signología de ambas enfermedades es similar por lo que es necesario realizar el diagnóstico diferencial para establecer su etiología.

2.1 Morfología

T. gondii y *N. caninum* son parásitos unicelulares eucariotas que presentan un extremo anterior puntiagudo (conoidal) y uno posterior redondeado. Ultraestructuralmente presentan un núcleo y un citoplasma con organoides que cumplen las distintas funciones vitales. En su interior tienen una mitocondria, microtúbulos subpeliculares, complejo de Golgi, ribosomas, retículo endoplásmico liso y rugoso, gránulos densos, gránulos de amilopectina y una organela similar a un plásmido denominado apicoplasto. Además, estos parásitos presentan en su extremo anterior un complejo apical (formado por: anillos polares, conoide, roptrias, micronemas y microtúbulos subpeliculares) que facilitan la adhesión y/o penetración a la célula hospedadora (Dubey, 2010a) (Fig. 1).

Figura 1. Estructura de protozoarios Apicomplexa



Modificado de: Dubey, 2010a.

2.2 Ciclo biológico

T. gondii y *N. caninum* presentan **tres formas infectantes**: los esporozoítos (en los ooquistes), los **taquizoítos** (multiplicación rápida) y los **bradizoítos** (multiplicación lenta, formando quistes tisulares). Los ooquistes son eliminados con las heces de los hospedadores definitivos al medio ambiente, mientras que los taquizoítos y los bradizoítos pueden encontrarse en los tejidos de todos los hospedadores (Dubey, 2010a; Dubey y Schares, 2011).

Taquizoítos: Son los estadios que se caracterizan por tener una rápida división intracelular, multiplicándose en la fase aguda de la enfermedad. Se localizan dentro de una vacuola parasitófora en el citoplasma de diferentes tipos celulares. Presentan una forma similar a un gajo de naranja o de medialuna, con el extremo posterior romo y el anterior agudo donde se localiza el complejo apical. Su tamaño es de aproximadamente 6 μm de longitud x 2 μm de ancho, dependiendo del estado de división, con un núcleo de posición central (Fig. 2).

Bradizoítos: Representan la forma de multiplicación lenta que desarrollan dentro de quistes tisulares. Miden aproximadamente 7 μm de longitud x 1,5 μm de ancho y se diferencian de los taquizoítos en que son más delgados, tienen menor cantidad de roptrias, más gránulos de amilopectina P.A.S. positivos y el núcleo es de localización terminal o subterminal. Los quistes tisulares son redondos u ovoides y su tamaño varía considerablemente entre 10 y 100 μm , dependiendo del número de bradizoítos que alojen en su interior (se han encontrado hasta 60 mil de ellos en un quiste de 100 μm). Los quistes de *T.gondii* poseen una pared elástica delgada ($\geq 0.5\mu\text{m}$) y se localizan preferentemente en el tejido nervioso (cerebro, médula, nervios y retina) y en menor medida en hígado y pulmones, donde son de forma esferoidal; y en el músculo esquelético y cardíaco donde tienden a ser más elongados, debido a que toman la forma de la célula que los contiene (Tenter y col., 2000). Los quistes tisulares de *N. caninum* se encuentran preferentemente en tejido nervioso y en músculos y presentan una pared más gruesa ($\geq 1\mu\text{m}$) (Jardine, 1996). Si bien existe esta diferencia en el grosor de la pared de los quistes de ambas especies, la misma depende de la cronicidad de la infección, por lo que muchas veces son indistinguibles al microscopio óptico. La importancia epidemiológica de los quistes tisulares radica en que, en algunas circunstancias, ya sea por interacción con determinados virus o tratamientos inmunosupresores, puede producirse una reactivación a partir de ellos. Además no se observan reacciones inflamatorias en los tejidos donde se encuentran, y pueden

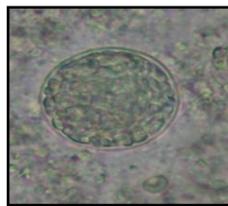
permanecer viables durante mucho tiempo, en algunos casos durante toda la vida del animal (Fig. 2).

Esporozoítos: Son las formas parasitarias que se encuentran en el interior de los ooquistes. Los esporozoítos son similares a los taquizoítos, excepto en que presentan abundantes micronemas, roptrias y gránulos de amilopectina. Miden 8 μm de longitud x 2 μm de ancho y el núcleo es de ubicación subterminal. Los ooquistes son esféricos y miden aproximadamente 10 x 12 μm . Cuando esporulan son subesféricos a elipsoidales, con dimensiones de 11 x 13 μm , conteniendo dos esporocistos en su interior con 4 esporozoítos cada uno (Fig. 2).

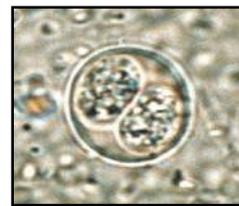
Figura 2. Fotos de estadios infectivos (Laboratorio de Inmunoparasitología. FCV.UNLP)



Taquizoítos



Quiste tisular con
bradizoítos



Ooquiste con
esporozoítos

T. gondii y *N. caninum* presentan **dos formas de transmisión** (Trees y Williams, 2005):

Vía horizontal: se produce a través de la ingesta de tejidos infectados conteniendo quistes tisulares o menos frecuentemente taquizoítos, o bien a través de la ingestión de agua o alimento contaminados con ooquistes esporulados.

Vía vertical o transplacentaria: se produce por el pasaje de taquizoítos que atraviesan la placenta infectando al feto.

Otras formas menos frecuentes son la vía lactogénica y la transfusión de sangre (Dubey y Lappin, 2006).

Ambos parásitos presentan un **ciclo evolutivo** indirecto, que comienza con la ingestión de la forma infectante por parte del hospedador definitivo (HD) y finaliza con la formación y eliminación de ooquistes capaces de transmitir la infección a otro

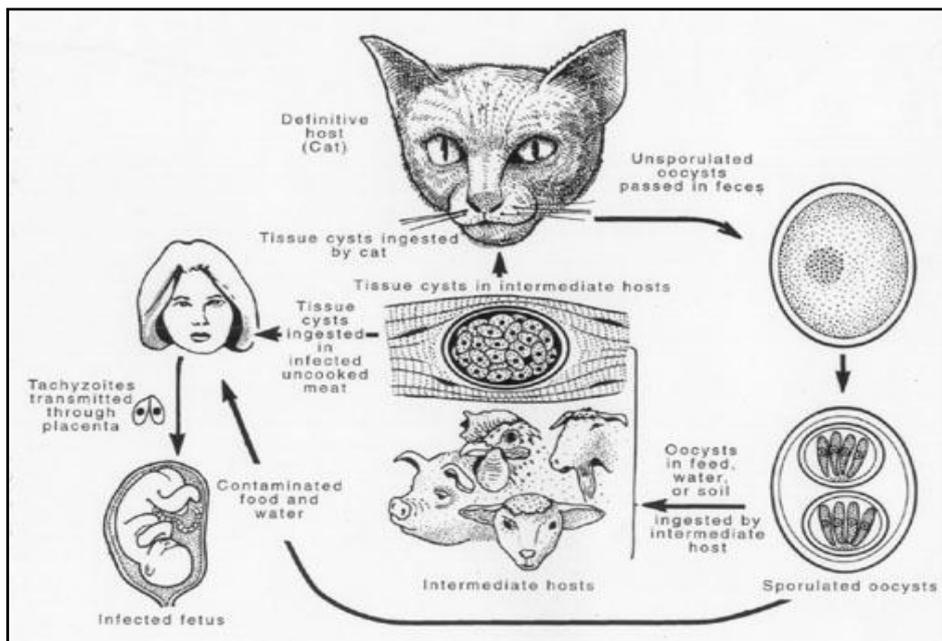
hospedador susceptible. En los HD, felinos domésticos y silvestres en el caso de *T. gondii*, y perros, lobos, coyotes y dingo en el caso de *N. caninum*, se produce el ciclo intestinal que incluye la fase sexual del ciclo (gametogonia) que concluye con la formación de ooquistes. Estos ooquistes son eliminados junto con las heces del animal en forma inmadura y en el ambiente se produce la maduración de los ooquistes convirtiéndose en infectantes (esporogonia), formándose esporozoítos en su interior (Dubey, 1996). El ciclo extraintestinal se produce en los hospedadores intermediarios (HI) que son los mamíferos (incluido el hombre) y aves en el caso de *T. gondii* y una gran variedad de animales domésticos y salvajes en el caso de *N. caninum* y se realiza en distintas células del organismo. Cuando el HI ingiere las formas infectantes, éstas se liberan en el intestino, y se dirigen a distintas células donde se dividen. En este momento de invasión hay dos etapas: una de multiplicación asexual rápida, con formación de taquizoítos; y otra de multiplicación asexual lenta con formación de bradizoítos en quistes tisulares (Fig. 3 y 4).

En los ciclos de *T. gondii* y *N. caninum*, además de producirse el ciclo intestinal en los HD, se puede producir en ellos un ciclo extraintestinal similar al que ocurre en el HI.

En ambos ciclos, los caninos pueden infectarse principalmente a partir del consumo de carne u otros tejidos crudos de HI conteniendo quistes tisulares, y en el caso de *N. caninum* también a partir del consumo de placentas bovinas (Dijkstra y col., 2001). Experimentalmente, algunos perros han sido alimentados con ooquistes esporulados de *T. gondii*, en los cuales se comprobó que éstos pasan directamente a través del tracto gastrointestinal y llegan a sus heces a los dos días post ingestión. A pesar de que estos perros seroconvierten, no se producen signos clínicos ni se produce replicación enteroepitelial. Sin embargo debe tenerse en cuenta que los perros que ingieren arena o piedras con materia fecal de gatos servirían como potenciales vectores mecánicos para la transmisión de la enfermedad a las personas, al eliminar los ooquistes esporulados en su materia fecal (Lindsay y col., 1997).

La transmisión transplacentaria de *T. gondii* se efectúa en un amplio rango de hospedadores como seres humanos, roedores, cabras, ovejas, cerdos, etc., siendo muy eficiente en pequeños rumiantes y roedores, sin embargo poco se conoce de la transmisión transplacentaria en caninos.

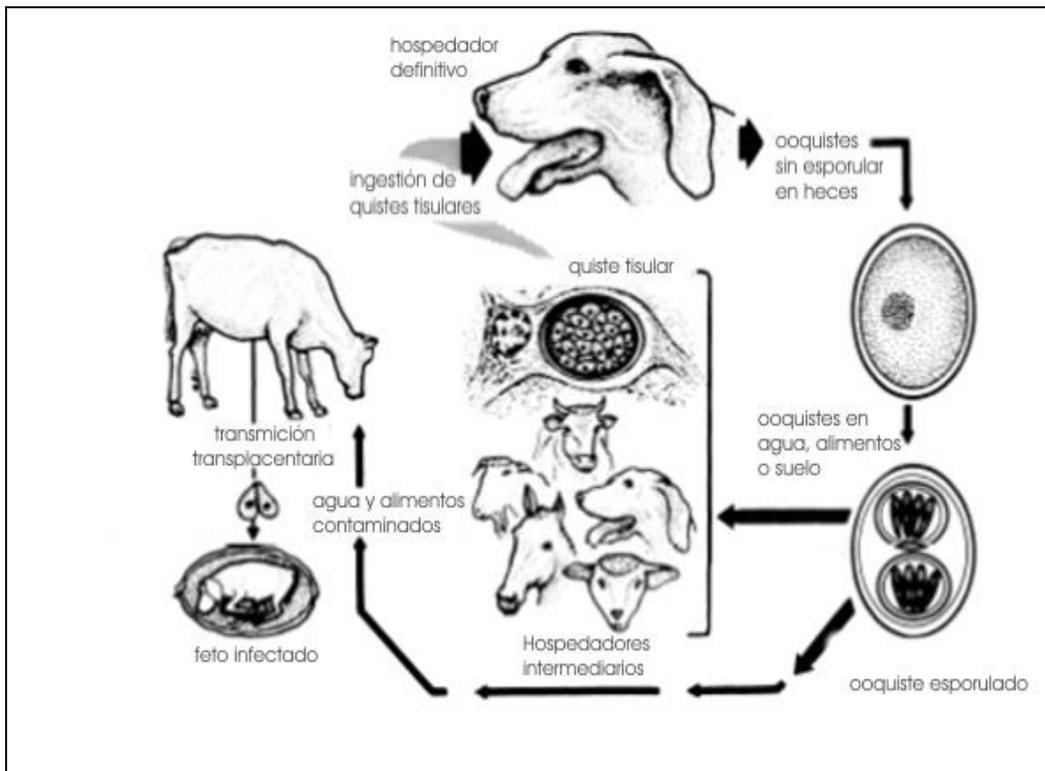
Figura 3. Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*.



Modificado de: Dubey, 2011.

N. caninum presenta una transmisión vertical eficiente tanto en los HD como en los HI (Dubey y col., 1988; Dubey y Lindsay, 1989; Anderson y col., 1997). En los caninos, si bien la infección puede ocurrir luego de la ingestión de tejidos de HI por carnivorismo, la vía de transmisión predominante en las infecciones naturales es la vertical, y la mayoría de los signos ocurren como una exacerbación de una infección adquirida congénitamente. Sin embargo, a diferencia de lo que pasa en los bovinos, esta transmisión es variable y no es capaz de persistir en ausencia de la transmisión horizontal (Barber y Trees, 1998). En los bovinos, *N. caninum* se considera uno de los parásitos con mayor eficiencia de transmisión transplacentaria provocando grandes pérdidas económicas a nivel mundial en la industria ganadera. La fuente puntual de exposición de la neosporosis en un rebaño se ha relacionado con la introducción de un perro (Dijkstra y col., 2002).

Figura 4. Ciclo biológico de *Neospora caninum*.



Modificado de: Dubey y col., 2007a.

2.3 Signos clínicos

Toxoplasmosis

La toxoplasmosis canina generalmente cursa de forma subclínica pero a veces puede originar signos neurológicos, habiéndose reportado lesiones como oftalmítis, miocardítis, nefritis, neumonía, hepatitis y encefalitis no supurativa entre otras. La razón por la cual algunos perros infectados presentan signos clínicos mientras que otros no lo hacen, no se conoce completamente. La edad, sexo, genotipo de *T. gondii* que participa, número de parásitos y forma infectante de los mismos que es ingerida o ingresa al organismo podrían determinar esta diferencia. La presencia de enfermedades concomitantes o de inmunosupresión determinaría que el hospedador sea más susceptible, además el estrés podría agravar la infección. Así, en la mayoría de los casos clínicos reportados existe una enfermedad o inmunodepresión subyacente; siendo lo más frecuente la asociación con la infección por el virus del moquillo, la administración de corticoides, enfermedades tumorales o la aplicación de vacunas con agentes infecciosos vivos atenuados. Sin embargo, la prevalencia de la toxoplasmosis canina ha ido descendiendo debido al incremento de la prevención del moquillo canino mediante los planes de vacunación en los cachorros (Dubey, 2010b).

Los signos clínicos pueden restringirse al aparato respiratorio, neuromuscular o gastrointestinal, o presentarse en una forma sistémica. Esta última forma, generalizada, suele ser más frecuente en animales de menos de un año de edad o en animales inmunosuprimidos y se presenta con fiebre, tonsilitis, disnea, diarrea y vómitos. Puede presentarse ictericia si existe una necrosis extensa del hígado. La forma generalizada puede originar la muerte del animal en una semana.

En los caninos de mayor edad, la presentación más frecuente es la afección del sistema nervioso y muscular. La presencia de signos se produce durante varias semanas y dependen de la localización de la lesión en el cerebro, cerebelo, tronco cerebral, médula espinal o músculos. Se describieron amplias variedades de alteraciones neurológicas, incluyendo hiperexcitabilidad, depresión, convulsiones, deficiencias de pares craneanos, temores, ataxia, paresia y parálisis. Los perros que tienen miositis pueden mostrar marcha anormal, debilidad, entumecimiento y consunción muscular. Puede presentarse infección miocárdica que redunde en arritmias ventriculares en algunos perros infectados. La disnea, vómito o diarrea sólo se producen en perros con enfermedad generalizada. Se han reportado sólo algunos casos de lesiones oculares como uveítis anterior, retinitis, iridociclitis y neuritis del nervio óptico (Dubey y Lappin, 2006).

Neosporosis

En los carnívoros se considera a *N. caninum* como un agente patógeno primario del sistema nervioso y musculoesquelético que a veces puede afectar múltiples sistemas orgánicos. Los signos clínicos en perros son similares a aquellos con toxoplasmosis, pero predominan los déficits neurológicos y anormalidades musculares. Pueden presentarse otros signos por afección del hígado, pulmones y del miocardio, igualmente cualquier tejido puede estar afectado. La neosporosis puede también ser asintomática o causar enfermedad en los caninos de cualquier edad.

Las perras seropositivas, con infección subclínica o infectadas de manera crónica, pueden transmitir la infección en forma vertical a varias camadas sucesivas, y a su vez, esta infección se puede repetir en la siguiente generación. La afección de los cachorros de la misma camada es variable, ya que no necesariamente toda la camada nacida de una hembra asintomática infectada desarrolla anticuerpos anti-*N. caninum* o presenta signos de la enfermedad. Es decir, si bien suelen enfermar varios integrantes de la camada generalmente no todos se encuentran infectados, y, a su vez, dentro de los infectados, algunos de los cachorros 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 (Barber y Trees, 1998). Si bien la neosporosis canina se considera causa frecuente de mortalidad neonatal, no hay reportes de aborto por *N. caninum* en perros, a diferencia de lo que ocurre en bovinos. Algunos estudios experimentales sugieren que *N. caninum* puede causar muerte fetal, momificación, reabsorción embrionaria y nacimiento de cachorros débiles (Cole y col., 1995).

Las infecciones son más frecuentes y severas en animales menores de 6 meses de edad infectados congénitamente. En ellos suelen presentarse trastornos neuromusculares progresivos derivados principalmente de lesiones de encefalomiелitis, polirradiculoneuritis y polimiositis. 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. Este último signo es característico, observado principalmente en cachorros menores 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, nistagmos, anisocoria, neumonía, megaesófago, etc.) aunque generalmente los perros no manifiestan signos neurológicos centrales y se mantienen alertas. En algunos casos, luego de las manifestaciones de paresia - parálisis, se presenta debilidad cervical, disfagia y muerte en corto tiempo, mientras que otros perros que se mantienen alerta y con cuidados, pueden sobrevivir por meses o años, pero sufren la parálisis y sus complicaciones (Basso y col., 2005).

En perros adultos el cuadro es más variado, frecuentemente presentan signos de compromiso multifocal del SNC o polimiositis, si bien la enfermedad es menos severa en ellos. También se reportaron casos de dermatitis (prurítica, ulcerativa y fistulosa), neumonía, miocarditis e infección generalizada, con todos los órganos virtualmente involucrados. No se sabe si la enfermedad clínica en perros gerontes se debe a infección primaria aguda o exacerbación de un proceso crónico. La patogenia de la enfermedad se relaciona primariamente con la replicación de los taquizoítos en la fase

aguda, pero se debe tener en cuenta que la administración de corticoides puede activar los bradizoítos en los quistes tisulares promoviendo la enfermedad clínica (Ruehlmann y col., 1995; Barber y Trees, 1996; Dubey y Lappin, 2006; Dubey y col., 2007).

Si bien se desconoce una predisposición racial, la mayoría de los casos descritos correspondió a las razas Labrador Retriever, Boxer, Greyhound, Golden Retriever y Basset Hound (Basso, 2003).

En Argentina, Castellano y col. describieron el primer caso de neosporosis clínica en una perra mestiza de 3,5 años 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. Se encontraron anticuerpos séricos contra *N. caninum* en la madre y en los hermanos de la perra afectada. El cuadro remitió tras el tratamiento con clindamicina durante un mes (Castellano y col., 1999).

2.4 Diagnóstico en caninos

El diagnóstico de estas enfermedades se realiza por métodos directos e indirectos. En los caninos, el diagnóstico de toxoplasmosis y neosporosis se realiza principalmente por métodos serológicos, aunque en el caso de la neosporosis es posible realizar la identificación de ooquistes en materia fecal por técnicas de concentración (Técnica de Sheather) (Basso y col, 2001b).

2.4.1 Métodos directos:

Los métodos directos de diagnóstico son aquellos que permiten detectar la presencia del parásito o de su ADN. Si bien estos métodos permiten realizar el diagnóstico definitivo de la infección, la mayoría sólo son posibles como parte del diagnóstico *post mortem*. Se incluyen las técnicas coproparasitológicas (para detectar las formas infectantes en la materia fecal), histopatológicas y moleculares (para detectar al parásito en tejidos o fluidos). El aislamiento y el análisis de lesiones características mediante histopatología complementado con inmunohistoquímica son los métodos directos más utilizados.

Presencia de signos clínicos compatibles: Los signos clínicos son una ayuda valiosa para orientar al diagnóstico, pero no permiten realizar el diagnóstico definitivo ya que pueden presentarse en una variedad de enfermedades. Una parálisis ascendente en perros jóvenes, particularmente si varios cachorros de una misma camada están afectados debe despertar la sospecha de neosporosis. En el caso de la

toxoplasmosis es más difícil, debido a que generalmente se presenta asociada a una enfermedad concomitante, pero debería sospecharse cuando existen signos clínicos compatibles y el animal a su vez cursa con un estado de inmunosupresión. Si el diagnóstico clínico se complementa con la realización de estudios hematológicos y bioquímicos se debe tener en cuenta que éstos pueden presentar algunas alteraciones de sus valores pero los mismos son muy variables, lo cual dependerá de los órganos que se encuentren afectados en el animal. Puede presentarse en algunos casos anemia, leucocitosis con neutrofilia y linfocitosis, monocitosis y eosinofilia. Cuando existe afección muscular pueden encontrarse aumentadas las actividades de ciertas enzimas, como creatinina quinasa (CPK) y aspartato aminotransferasa (AST). También se pueden encontrar niveles aumentados de otras enzimas cuando los animales presentan necrosis del hígado, como alanina aminotransferasa (ALT) y fosfatasa alcalina (ALP). Los perros que presentan afección del páncreas también pueden presentar aumento de las enzimas amilasa y lipasa séricas. Si se realiza el análisis del líquido cefalorraquídeo (LCR) a menudo se encuentra un incremento en la concentración proteica y del recuento de células nucleadas. Los linfocitos y monocitos suelen predominar, aunque pueden notarse también neutrófilos. Los eosinófilos pueden ser las células predominantes en unos pocos casos de perros y gatos infectados. Rara vez el examen citológico del LCR revela a los protozoarios dentro de las células (Dubey y Lappin, 2006; Nelson y Couto, 2005).

Presencia de lesiones histopatológicas compatibles: Los cortes histopatológicos teñidos con hematoxilina y eosina, permiten la observación de quistes tisulares y taquizoítos asociados o no a lesiones en sistema nervioso, músculo, hígado, pulmón y otros tejidos. En el sistema nervioso central suele presentarse una meningoencefalitis multifocal no supurativa con gliosis, vasculitis y necrosis, y con predominio de infiltrados de macrófagos, células plasmáticas y linfocitos. En los pulmones se presentan necrosis y exudado en alveolos. En músculos se presenta necrosis de fibras musculares y reemplazo por tejido conectivo. En el animal vivo, pueden realizarse biopsias de los músculos afectados lo cual dará un diagnóstico definitivo si se encuentra el parásito. La realización de la biopsia muscular debe considerarse cuando los estudios serológicos dan resultados negativos o inconclusos pero aún se sospecha de la enfermedad luego de descartar los diagnósticos diferenciales (Dubey y Lindsay, 1996).

Identificación de los parásitos por Inmunohistoquímica: La inmunohistoquímica permite la detección de diferentes estadios del parásito en tejidos de animales

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

Aislamiento de los parásitos: El aislamiento se puede realizar inoculando material proveniente de animales infectados en diferentes cepas de ratones de laboratorio por vía subcutánea o bien con ooquistes esporulados por vía oral. También es posible realizar aislamientos en cultivos celulares (Dubey, 2010a). Los órganos más recomendados para la inoculación son: cerebro, diafragma, pulmón e hígado de animales que han sufrido la infección. Para la inoculación se prepara un homogenato de los órganos con solución fisiológica y antibióticos (penicilina-estreptomocina). Luego de 7 a 10 días post inoculación (p.i) se busca la presencia de taquizoítos realizando un lavado peritoneal de los ratones inoculados. La ausencia del parásito en SNC o líquido peritoneal no indica que el ratón no se infectó, por lo tanto es importante realizar la detección de anticuerpos en los ratones a los 28 días p.i. En el caso de ser negativos a los métodos serológicos se concluye la búsqueda, pero en el caso de ser positivos o bien, si el animal muere durante el transcurso de su infección, se determina la presencia de quistes en el sistema nervioso central mediante observación en fresco en microscopio óptico. Los quistes tisulares pueden encontrarse a partir de las 4- 6 semanas p.i. A partir de los quistes tisulares así como de los taquizoítos obtenidos por lavado peritoneal pueden infectarse cultivos celulares que se mantienen hasta observar el crecimiento del parásito (Dubey, 2010a).

Identificación de *T. gondii* o *N. caninum* por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): La técnica de PCR puede utilizarse para verificar la presencia de estos parásitos en los tejidos a través de la identificación de fragmentos de ADN específicos, lo que a su vez también permite diferenciarlos entre sí utilizando *primers* específicos. La desventaja que presenta es que puede determinar un resultado falso negativo, ya que se procesa una pequeña cantidad de muestra. La *nested* PCR

seguida por cortes con enzimas de restricción puede utilizarse para determinar el genotipo de la cepa infectante (Dubey, 2010a).

Identificación de ooquistes en materia fecal: Es posible encontrar en materia fecal de caninos ooquistes de *N.caninum*, dado a que el perro actúa como hospedador definitivo en su ciclo. Los perros no producen ooquistes de *T. gondii* como lo hacen los felinos, pero pueden transmitirlo en forma mecánica luego de ingerir heces felinas. Debido a su pequeño tamaño, para su detección en la materia fecal se utilizan técnicas de concentración y de flotación, mediante el uso de soluciones de alta densidad. La técnica más utilizada es la Técnica de Sheather, que utiliza una solución azucarada (Dubey y col., 2002; Dubey y col., 2007b). La materia fecal se mezcla con la solución en un mortero y luego se centrifuga a 2500 rpm durante 6 minutos en un tubo de centrifuga. Los elementos parasitarios quedan concentrados en el menisco superior y se toman con un ansa metálica. Se observan al microscopio óptico para su identificación. Los ooquistes de *N. caninum* y *T. gondii* son esféricos o subesféricos y muy pequeños. En el caso de los ooquistes de *N. caninum*, se debe tener en cuenta que son morfológicamente similares a los ooquistes de *Hammondia heydorni*.

2.4.2 Métodos indirectos:

Los métodos indirectos implican la detección de anticuerpos anti-*N. caninum* y anti-*T. gondii* tanto en hospedadores definitivos como en intermediarios mediante distintas técnicas serológicas. Si bien la muestra de elección para la detección de anticuerpos es el suero del animal sospechoso, la detección también puede hacerse en el LCR, humor acuoso y líquidos fetales.

Las pruebas indirectas más utilizadas son la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), aglutinación (MAT), enzimoimmunoensayo (ELISA) e *Immunoblot*. Estas pruebas presentan distinta sensibilidad y especificidad según las características del antígeno utilizado. Algunas de las pruebas utilizan como antígeno taquizoítos enteros, por lo que los epitopes superficiales son los que están expuestos; en otras pruebas se utilizan taquizoítos fragmentados por diferentes métodos, en los cuales están mayormente expuestos los epitopes citoplasmáticos. Las características de cada una de ellas se describen a continuación (Venturini y col., 2014):

Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI): Es la técnica más utilizada en la actualidad en las especies domésticas tanto para el diagnóstico de toxoplasmosis

como de neosporosis. Se utilizan taquizoítos enteros fijados a un portaobjetos como antígeno que se enfrenta al suero problema. Para revelar la unión se utiliza un conjugado o anticuerpo secundario a la inmunoglobulina unido a una sustancia fluorescente o fluorocromo, que al ser excitada por luz ultravioleta, emite un haz de luz de mayor longitud de onda, que se visualiza con un microscopio de fluorescencia. Es importante tener en cuenta que, si bien el antígeno puede utilizarse para el diagnóstico en cualquier especie, como conjugado se debe utilizar anti-inmunoglobulina anti-especie específica, en este caso anti perro marcado con isotiocianato de fluoresceína.

Prueba de Aglutinación Modificada (MAT): Utilizada para el diagnóstico de toxoplasmosis. Utiliza 2-mercaptoetanol que actúa sobre la inmunoglobulina M sérica, lo que permite diferenciar infecciones agudas de crónicas. Otra ventaja que presenta es que puede utilizarse en distintas especies, ya que no usa un conjugado para revelar la unión antígeno-anticuerpo que se observa a simple vista. Es una aglutinación del tipo directa debido a que utiliza taquizoítos naturalmente particulados.

Aglutinación indirecta (IHA): Utilizada para el diagnóstico de toxoplasmosis. En esta prueba las fracciones antigénicas son adsorbidas a partículas utilizadas como soporte (glóbulos rojos, partículas de látex). Si bien pueden utilizarse para estudios de prevalencia serológica, no son aconsejables para el diagnóstico y seguimiento serológico ya que tienen baja sensibilidad y no detectan estadios iniciales de la infección.

Enzimoimmunoensayo (ELISA): En esta prueba la unión antígeno-anticuerpo se revela por un conjugado unido a una enzima que al reaccionar con su sustrato específico, en presencia de un cromógeno, produce una reacción coloreada. Es una prueba de alta sensibilidad cuantitativa ya que permite la detección de cantidades pequeñas de complejos antígeno-anticuerpo. La lectura de la reacción se hace con un espectrofotómetro (lector de ELISA), por lo que permite una lectura objetiva de los resultados. Otra ventaja que presenta es que permite analizar un número elevado de muestras a la vez. Se utiliza tanto para el diagnóstico de toxoplasmosis como para neosporosis. No existen kits comerciales para uso en caninos en el país, aunque son frecuentemente usados debido a sus ventajas para determinar seroprevalencias en otros países (Nazir y col., 2014; Gozdzik y col., 2011).

Immunoblot: La unión antígeno-anticuerpo se produce sobre una membrana de nitrocelulosa donde previamente se han transferido las proteínas fraccionadas de estos parásitos, luego de que se realice una corrida electroforética de las mismas en un gel de poliacrilamida. Las diferentes porciones antigénicas se enfrentan con los sueros problemas, y si éstos reaccionan con una o varias porciones se puede observar al revelar la reacción. Para ello se utiliza un suero conjugado con peroxidasa, anti-especie, en presencia de un cromógeno y de un sustrato. Así se determina contra qué porción del antígeno reacciona el suero, identificándolo de acuerdo a su peso molecular. Hasta el momento en caninos sólo se han identificado las fracciones inmunodominantes para *N. caninum*, mientras que no se han realizado estudios para *T. gondii* (Pinheiro y col., 2005). Esta prueba presenta la ventaja de ser muy específica, pero como desventaja es muy laboriosa y su realización lleva mucho tiempo, por lo que su uso en estas enfermedades en los caninos se limita a ser utilizada como prueba confirmatoria, o bien para determinar títulos de corte y descartar reacciones cruzadas entre *N.caninum* y *T.gondii* en otras pruebas (Silva y col., 2007).

2.5 Prevalencia en caninos

A nivel mundial, la toxoplasmosis canina presenta una prevalencia variable según la región y de acuerdo a la técnica empleada. Según Dubey (Dubey, 2010b) se han reportado en Brasil 40 a 80% según la región (IFI); México 51,5% (MAT); Suiza 23% (ELISA) y Estados Unidos 25% (MAT). En los últimos años se ha encontrado una seroprevalencia de 28,4% en Pakistán (ELISA) (Ahmad y col., 2014), en China algunos estudios determinan una prevalencia variable según la técnica de diagnóstico utilizada de 24% (IHA) (Quian y col., 2015) y otros de 51,9% (ELISA) (Jiang y col., 2015). Se encontró una seroprevalencia mayor que la del año 2010 en países como México, de 67,3% (MAT) en el estado de Veracruz (Alvarado-Esquivel y col., 2014) y en Brasil, de 70,8% (IFI) en el estado de Paraná (de Paula Dreer y col., 2013).

Los estudios de seroprevalencia para neosporosis canina provienen de distintas regiones. Así se han encontrado valores más elevados en países con distintas características climáticas como en Costa Rica 48,4% (ELISA) (Dubey y Schares, 2011), Rumania 32,7% (IFI) (Gavrea y col., 2012), Turquía 28,5% (IFI) (Dubey y Schares, 2011) Pakistán 23,5% (ELISA) (Nazir y col., 2014) y en Polonia 21,7% (ELISA e IB) (Guzdzik y col., 2011). Mientras que seroprevalencias menores se encontraron en Granada 1,6% (ELISA) (Sharma y col., 2015), Canadá 3,7% (IFI) (Dubey y Schares, 2011), Portugal 7,9% (ELISA) (Maia y col., 2014), y en distintas

áreas de Brasil: en estados del Noreste se encontraron prevalencias de 4,2% (IFI) (de Sousa y col., 2012) y 9,3% (IFI) (Sicupira y col., 2012) y en la región sur como en Mina Gerais 11,4% (IFI) (Nagueira y col., 2013) y 4,9% en Sao Paulo (IFI) (Langoni y col., 2013).

Si bien se ha determinado que la seroprevalencia de *T. gondii* en perros está distribuida mundialmente y en forma variable, se observa que en todos los países donde se ha estudiado, la misma aumenta con la edad de los animales debido a una mayor exposición, lo que indicaría una infección predominantemente del tipo horizontal. A su vez, la mayor parte de los animales positivos se encuentra en áreas rurales debido a que es más frecuente que cacen pequeños animales como roedores que actúan como hospedadores intermediarios en el ciclo. También se encuentra una mayor frecuencia de la enfermedad y exposición en perros y gatos que son alimentados con carne cruda en lugar de dietas comerciales (Dubey y Lappin, 2006).

Para el caso de neosporosis, la seroprevalencia varía según la localización geográfica y según sea determinada sobre cánidos domésticos o silvestres. Así en una misma área geográfica, los cánidos silvestres presentan una mayor tasa de prevalencia que los perros con dueños, como así también los perros que habitan en campos, en comparación con los perros de áreas urbanas (Dubey y Lappin, 2006). Es muy frecuente la presencia de la infección en bovinos de explotaciones lecheras cuando hay una alta densidad de perros en ellas; algunos estudios epidemiológicos encontraron una asociación entre la ocurrencia de neosporosis bovina en tambos y la presencia de perros en los mismos (Paré y col., 1998). Se sugiere que los perros de tambos se infectarían a través del consumo de placentas, descargas uterinas y fluidos fetales de bovinos infectados; éstos 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 (Dijkstra y col., 2002). Al igual que lo que ocurre con la infección por *T. gondii* en caninos, en esta enfermedad también los perros que son alimentados con carne bovina cruda tienen una prevalencia más elevada que los que se alimentan con dietas comerciales.

2.6 Situación en Argentina

En Argentina, los primeros relevamientos serológicos de neosporosis y toxoplasmosis canina se realizaron en el año 1997. Di Lorenzo y col. (1997), evaluaron 97 animales adultos sanos y enfermos, provenientes de La Plata y alrededores y se determinó una

prevalencia del 43,2 % para toxoplasmosis y del 47,4% para neosporosis por IFI (título \geq 1:50). De las muestras positivas, 28 (28,8%) tuvieron anticuerpos para ambos parásitos. En este estudio no se detectaron diferencias significativas entre los valores de prevalencia serológica entre ambas infecciones (χ^2 0.05; p: 0.821), lo que la exposición a ambos agentes en estos animales fue cuantitativamente similar.

Posteriormente, Venturini y col., 2008; evaluaron la prevalencia de estas enfermedades en 1001 sueros caninos provenientes de áreas urbanas con signos clínicos, analizados durante un período de 10 años (1997-2007). Los sueros fueron analizados por IFI con diluciones desde 1:50 hasta 1:800. En este estudio se determinó la seroprevalencia de ambas enfermedades según la edad y también se analizó la distribución de los animales de acuerdo a los títulos de anticuerpos. Se detectaron anticuerpos anti-*T. gondii* en un 30,3% y anti-*N. caninum* en el 25,6%; y se observó una distribución según la edad de 16,6 % en animales menores a 12 meses para toxoplasmosis y de 16,3% para neosporosis; de 31,1% en animales entre 13 y 60 meses para toxoplasmosis y del 22,8% para neosporosis; y del 40,9% en animales mayores a 61 meses para toxoplasmosis y del 37,6% para neosporosis. En cuanto a los títulos observados, el 67% de los perros positivos a neosporosis en el grupo de animales hasta los 12 meses de edad, tuvieron títulos \geq de 1:400, mientras que en ese mismo grupo se detectaron anticuerpos para toxoplasmosis en el 65% de los perros pero con títulos menores de 1:200.

En otro estudio se evaluó sólo la prevalencia de neosporosis en 320 caninos pero que en este caso provenían tanto de áreas rurales como urbanas de Argentina donde se determinó una prevalencia del 37,8% para esta enfermedad y 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 (Basso y col., 2001a).

2.7 Tratamiento

El tratamiento recomendado para la toxoplasmosis y neosporosis en caninos consiste en la administración del clorhidrato de clindamicina (10mg/kg/día bucal cada 12 horas) durante un mínimo de 4 semanas. Esta droga demostró atravesar la barrera hematoencefálica. La trimetoprima-sulfadiacina (15 mg/ kg, bucal, cada 12 horas) puede emplearse como droga alternativa, especialmente en combinación con pirimetamina (1mg/kg/día) durante 4 semanas (Nelson y Couto, 2005).

El pronóstico para los perros con afectación neurológica grave es desfavorable. Sin embargo es frecuente, en casos iniciales, que se produzca remisión de los signos en forma gradual al cabo del mes de iniciado el tratamiento, llegando muchas veces a la recuperación completa de la actividad motora y en algunos casos se observa recuperación de los movimientos voluntarios de los miembros luego de la primera semana (Castellano y col., 1999).

2.8 Prevención y aspectos zoonóticos

La toxoplasmosis y neosporosis canina puede prevenirse administrando la carne y sus derivados en forma cocida. En el caso de neosporosis, como existe un vínculo epidemiológico entre perros y ganado, se debe reducir la contaminación del alimento de las vacas con heces caninas, y no se debería permitir que los perros ingieran placentas bovinas; como así también las perras que tienen camadas con afectación clínica no deben integrar el plantel de reproductores, debido a que como ocurren infecciones transplacentarias repetidas, es mayor el riesgo para los cachorros nacidos de perras que ya tuvieron camadas infectadas. Para el caso de *T.gondii*, se recomienda evitar la coprofagia debido a que, si bien los perros no completan la fase enteroepitelial del ciclo de este parásito, ellos pueden transmitir mecánicamente los ooquistes luego de la ingesta de heces felinas. No deberían, si es posible, administrarse glucocorticoides en los animales seropositivos a cualquiera de las dos enfermedades porque existe la probabilidad de reactivar la infección y promover el desarrollo de enfermedad clínica por activación de los bradizoítos en los quistes tisulares (Dubey, 2010b; Dubey y Schares, 2011).

En cuanto al potencial zoonótico, sólo la toxoplasmosis se reconoce como una enfermedad importante de transmisión al hombre (Tenter y col., 2000); si bien anticuerpos *anti-N. caninum* han sido detectados en personas, no existe asociación con manifestaciones clínicas hasta el momento (Oshiro y col., 2015).

2.9 DESARROLLO

2.9.1 Materiales y métodos:

Diseño experimental

Se determinó la presencia de anticuerpos anti-*T. gondii* y anti-*N. caninum* de 1290 sueros caninos provenientes de áreas urbanas (provincia de Buenos Aires) con y sin

signos clínicos asociados, remitidos al Servicio de Diagnóstico de Toxoplasmosis y Neosporosis del Laboratorio de Inmunoparasitología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP (LAINPA-FCV-UNLP) en el período comprendido entre los años 2011-2013. Los sueros fueron analizados por la técnica de IFI. Para ello se usó como antígeno portaobjetos con taquizoítos de la cepa NC-1 de *N. caninum* y RH de *T. gondii* elaborados en el LAINPA, FCV, UNLP y conjugado anti-Ig G de perro elaborado en conejo (Sigma-Aldrich) (anexo).

Los resultados obtenidos por IFI fueron relacionados con la presencia de signos clínicos, edad y sexo de los animales estudiados utilizando la prueba de *chi cuadrado*. Se apartaron del análisis aquellas muestras donde no se aclaraba el dato o variable analizada. Para determinar la presencia de anticuerpos anti-*T. gondii* y anti-*N. caninum* según la edad, se consideraron tres intervalos de edad (menores a 1 año, animales entre 1 a 5 años, mayores a 5 años) de acuerdo a estudios previos (Venturini y col.; 2008). En cuanto a los signos clínicos, se analizaron teniendo en cuenta los signos reportados por los veterinarios al remitir la muestra y se consideró como animales sin signos cuando no se aclaraba la presencia de los mismos y con signos cuando presentaron al menos 1 de los siguientes signos clínicos: parálisis del tren posterior, convulsiones, ataxia, incoordinación, debilidad de miembros, dificultad para caminar, mialgia, atrofia muscular, tetraplejía, trastornos locomotores, pérdida de propiocepción, hiperestesia, megaesófago, ceguera repentina, decaimiento y anorexia. La relación entre la presencia de signos clínicos y la presencia de anticuerpos se determinó teniendo en cuenta la presencia de al menos uno de los signos clínicos mencionados en los animales estudiados.

Para evaluar la utilidad de un kit comercial para diagnóstico de toxoplasmosis humana en caninos y poder adaptarlo al diagnóstico de toxoplasmosis en estos últimos, se seleccionaron al azar 297 sueros previamente analizados por la técnica de IFI. El tamaño de la muestra se calculó en base al supuesto de prevalencia teórica del 50%, con 95% de confianza y un 5% de certeza (Thrusfield, 1990), y se tomaron 99 sueros de cada año analizado. Para la realización de esta prueba se utilizó un kit comercial para humanos AD TOXO COLOR, Polychaco y se procedió según las recomendaciones del fabricante (anexo). Se utilizaron controles positivos y negativos de caninos y se realizó una prueba preliminar para determinar el valor de corte de éstos últimos.

La concordancia entre ambas pruebas se determinó a través del *índice kappa*, y se determinaron los valores de sensibilidad y especificidad (Anon, 2008). El tamaño de

muestra, los resultados de *chi cuadrado* e *índice kappa* se determinaron mediante el software de dominio público Winepi (<http://www.winepi.net/sp/index.htm>).

2.9.2 Resultados:

La presencia de anticuerpos anti-*T. gondii* del período 2011-2013 fue de 33,6% (433/1290) y la de anticuerpos anti- *N. caninum* para el mismo período fue del 25,3% (326/1290). Un 12,5% (161/1290) de los caninos presentaron anticuerpos contra ambas enfermedades.

La distribución de las distintas variables en relación a toxoplasmosis se expresa en las siguientes tablas:

Tabla1. Distribución de presencia de anticuerpos anti-*T. gondii* por sexo.

	Positivo a toxoplasmosis	Negativo a toxoplasmosis	Total
Hembra	136	326	462
Macho	167	390	557
Total	303	716	1019

Tabla 2. Distribución de presencia de anticuerpos anti-*T. gondii* por edad.

	Positivos a toxoplasmosis	Negativos a toxoplasmosis	Total
<1 año	25	158	183
1 -5 años	101	297	398
> 5 años	151	255	406
Total	277	710	987

Tabla 3. Distribución de presencia de anticuerpos anti-*T. gondii* y presencia de signos clínicos.

	Positivo a toxoplasmosis	Negativo a toxoplasmosis	Total
Presencia de signos	109	238	347
Ausencia de signos	324	619	943
Total	433	857	1290

La distribución de las distintas variables en relación a neosporosis se expresa en las siguientes tablas:

Tabla 4. Distribución de presencia de anticuerpos anti-*N. caninum* por sexo.

	Positivo a neosporosis	Negativo a neosporosis	Total
Hembra	114	348	462
Macho	138	419	557
Total	252	767	1019

Tabla 5. Distribución de presencia de anticuerpos anti-*N. caninum* por edad.

	Positivo a neosporosis	Negativo a neosporosis	Total
<1 año	28	155	183
1 -5 años	89	309	398
> 5 años	124	282	406
Total	241	746	987

Tabla 6. Distribución de presencia de anticuerpos anti-*N. caninum* y presencia de signos clínicos.

	Positivo a neosporosis	Negativo neosporosis	Total
Presencia de signos	93	253	346
Ausencia de signos	233	772	1005
Total	326	1025	1351

De los caninos machos analizados, un 30% (167/557) fue seropositivo a *T. gondii* y el 24,8% (138/557) a *N. caninum*; mientras que para las hembras el 29,4% (136/462) presentó anticuerpos anti-*T. gondii* y el 24,7% (114/462) presentó anticuerpos anti-*N. caninum*. Según el análisis de *chi cuadrado* no se observó relación entre el sexo y la presencia de anticuerpos específicos anti-*T. gondii* y anti-*N. caninum*, respectivamente.

Los porcentajes de caninos con anticuerpos anti-*T. gondii* de acuerdo a la edad fueron: menores de 1 año 13,7% (25/183), entre 1 y 5 años 25,4% (101/398) y en mayores de 5 años 37,2% (151/406). Los porcentajes para el caso de la presencia de anticuerpos anti-*N. caninum* fueron: menores de 1 año 15,3% (28/183), entre 1 y 5 años 22,4% (89/398) y en mayores a 5 años 30,5% (124/406). Según el análisis de *chi cuadrado*, se encontraron diferencias significativas entre los rangos de edad para ambas enfermedades.

Dentro del grupo de animales que presentaron anticuerpos anti-*T. gondii*, un 25,2% (109/433) presentó uno o más de uno de los signos clínicos compatibles, mientras que de los caninos seropositivos a *N. caninum*, un 28,5% (93/326) de ellos presentó signos clínicos. No se encontró relación entre la cantidad de animales con signos y estas enfermedades.

Los resultados de concordancia para toxoplasmosis entre la prueba de Aglutinación Directa (AD TOXO COLOR, Polychaco) y de IFI se realizaron de acuerdo a los datos obtenidos que se expresan en la siguiente tabla.

Tabla 7. Distribución de resultados positivos y negativos para IFI y Aglutinación Directa (AD TOXO COLOR, Polychaco).

		IFI		
		Negativos	Positivos	Total
Aglutinación Directa	Negativos	171	71	242
	Positivos	28	27	55
	Total	199	98	297

Las pruebas diagnósticas de Aglutinación Directa (AD TOXO COLOR, Polychaco) e IFI presentaron un grado de concordancia escaso dado que presentaron un *índice kappa* de 0.152.

La prueba diagnóstica de Aglutinación Directa (AD TOXO COLOR, Polychaco) presenta una sensibilidad de 27,6% y una especificidad de 85,9%. En esta situación de prevalencia, un resultado positivo tiene una probabilidad de 49,1% de ser realmente un individuo enfermo, mientras que un resultado negativo tiene una probabilidad de 70,7% de ser realmente un individuo sano.

Además en la población estudiada se ha observado una prevalencia real del 33,6%, aunque la prueba diagnóstica evaluada muestra una prevalencia aparente del 18,5%.

Los 27 sueros que resultaron positivos a ambas pruebas presentaron una distribución de títulos a IFI de la siguiente manera: 5 sueros positivos a 1:50, 7 a 1:100, 3 a 1:200, 6 a 1:400 y 6 a 1:800. De los 71 sueros que resultaron positivos a IFI y negativos a MAT, el 66,2% (47/71) presentaron títulos bajos a IFI (1:50 a 1:200) mientras que el 33,8% (24/71) presentaron títulos altos (1:400 y 1:800).

3. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Objetivo 1 y 2:

La presencia de anticuerpos anti-*T. gondii* y anti-*N. caninum* en este trabajo fue del 33,6% y del 25,3% respectivamente, lo que demuestra la presencia de ambas enfermedades en la población canina en nuestro medio.

Las diferencias encontradas en la presencia de anticuerpos anti-*T. gondii* en relación a otros países podrían deberse a que la población canina estudiada en este trabajo queda sesgada a sueros que presentaban un diagnóstico presuntivo de toxoplasmosis/neosporosis remitidos para su análisis en el LAINPA-FCV-UNLP. Las variaciones climáticas también son un factor importante a tener en cuenta, como ejemplo de ello, en países con temperaturas medias anuales más cálidas (Brasil, México) las prevalencias son mayores (entre 51,5% y 80%) a las encontradas en este estudio, mientras que en otros países con temperaturas anuales más bajas o bien con diferencias climáticas estacionales (Estados Unidos, Pakistán, Suiza) las prevalencias son algo menores (entre 23% y 28,4%). Las temperaturas más cálidas y la alta humedad favorecen a la esporulación de los ooquistes de *T. gondii* en el medio ambiente y por lo tanto la continuidad del ciclo biológico (Dubey, 1998). Es necesario evaluar muestras de sueros caninos de otras regiones del país con características climáticas más extremas para ampliar la información obtenida en este estudio. También sería necesario determinar si otros factores como los hábitos alimentarios y densidad de animales que conviven podrían influir en las diferencias halladas. En un estudio realizado en China la seroprevalencia fue menor (24%) mientras que en otro estudio en el mismo país fue mayor (51,9%) en relación a nuestro estudio; esto podría deberse a la técnica utilizada para el diagnóstico serológico, ya que en el primer caso se utilizó la prueba de IHA que tiene menor sensibilidad que IFI. Las variaciones en la prevalencia en diferentes regiones podrían deberse en parte a la técnica utilizada para el diagnóstico de esta enfermedad ya que no se han validado las distintas pruebas serológicas en caninos (Dubey, 2010b).

En cuanto a las diferencias de seroprevalencia de neosporosis encontradas a nivel mundial, se observa una mayor discrepancia debido a que países con diferentes temperaturas y alejados entre sí (Canadá, Granada, Portugal) presentan seroprevalencias bajas (entre 1,6 a 7,9%) y similares entre sí. Se destaca la baja prevalencia encontrada en diferentes zonas de Brasil en relación a los estudios de nuestro país, a pesar de la cercanía geográfica y de haberse utilizado IFI como prueba diagnóstica en ambos casos; mientras que es similar a aquella de países más alejados y de diferentes condiciones climáticas (Rumania, Pakistán). Se desconocen las condiciones de viabilidad y resistencia de los ooquistes de *N. caninum* en el medio ambiente, pero las diferencias encontradas podrían relacionarse a ello.

En cuanto al análisis sobre los animales seropositivos con signos compatibles en este trabajo la seroprevalencia fue del 25,2% para toxoplasmosis y 28,5% para neosporosis, similar a la encontrada en el estudio realizado entre 1997 y 2007 en

nuestro medio (Venturini y col., 2008), lo que indicaría que la exposición a la infección ha sido cuantitativamente similar a través de los años. En este último estudio, si bien la cantidad de sueros analizados (1001) es similar a la realizada en este trabajo (1290), es importante destacar que se realizó en un período mayor de tiempo (10 años). Actualmente se ha incrementado el envío de muestras para el diagnóstico serológico de estas enfermedades lo cual podría deberse a una mayor información y actualización de la signología de estas enfermedades por parte de los veterinarios clínicos y su inclusión como diagnóstico diferencial de enfermedades con manifestaciones semejantes.

Basso y col. (2001) encontraron una seroprevalencia de neosporosis mayor (37,8%) a la observada en este estudio (25,3%) sin embargo la población analizada correspondía a 320 caninos de áreas rurales y urbanas. Cuando estos autores analizaron sólo los perros de áreas urbanas, la seroprevalencia (26,2%) fue similar a la encontrada en este trabajo por lo que sería interesante comparar datos de caninos de áreas rurales para poder determinar si el riesgo a contraer esta enfermedad es mayor debido a la presencia de bovinos que incrementa las posibilidades de infección horizontal.

En este estudio se encontró un 12,5% de caninos que presentaron anticuerpos para ambas enfermedades, con lo que se concluye que éstos presentaron co-infecciones. En el diagnóstico serológico se debe tener en cuenta que en los caninos puede existir una reactividad cruzada entre *T. gondii* y *N. caninum*, ya que ambos parásitos se encuentran muy emparentados filogenéticamente y comparten antígenos comunes. En este estudio la dilución de los sueros se realizó a partir de 1:50, y aunque se ha determinado que la prueba de IFI es la más utilizada en nuestro medio debido a su sensibilidad y practicidad, debería tenerse en cuenta que puede detectarse reactividad cruzada cuando las diluciones del suero son menores a 1:50 (Dubey y Lindsay, 1993).

En cuanto a la relación entre las variables sexo, edad y presencia de signos clínicos con la presencia de anticuerpos específicos para *T. gondii* y *N. caninum* sólo se encontraron diferencias significativas con la edad de los animales. La seroprevalencia encontrada en los rangos de edad analizados son similares a los obtenidos en el trabajo de Venturini y col., 2008 y de Basso y col., 2001. Se observó que el número de animales seropositivos en ambas enfermedades se incrementa a medida que aumenta la edad de los mismos, lo que indicaría la importancia de la transmisión horizontal o de la infección postnatal en estos parásitos. En el trabajo de Venturini y col., 2008 se observó que en el rango de animales menores a 12 meses la mayor proporción de los títulos para toxoplasmosis se ubican en las diluciones menores, mientras que para

neosporosis se ubican entre las diluciones mayores. Esto permitiría considerar que si éstos se infectan, manifiestan signos de neosporosis acompañados de títulos de anticuerpos mayores que los que se detectan para toxoplasmosis. Por otra parte, es posible que los títulos de anticuerpos (Ig G) para toxoplasmosis, generalmente más bajos, se relacionen con infecciones crónicas y no necesariamente con los signos clínicos que manifiestan los animales. En este trabajo no se realizó el análisis de los títulos de anticuerpos según la edad. Di Lorenzo y col. (1997) observaron una seroprevalencia mayor para ambas enfermedades (43,2% para toxoplasmosis y 47,4% para neosporosis), es importante resaltar que los perros muestreados eran adultos lo cual podría relacionarse con el hecho de ser la categoría que mayor porcentaje de anticuerpos presenta en todos los casos, sin embargo la proporción de caninos con anticuerpos contra ambas enfermedades fue mayor (28,8%) en relación a este trabajo (12,5%).

Objetivo 3:

En este trabajo se evaluó si la prueba de aglutinación directa de origen comercial de producción nacional para diagnóstico de toxoplasmosis en humanos, permitía determinar sueros positivos a *T. gondii* en caninos. Se realizaron modificaciones en el protocolo de acuerdo a la bibliografía disponible (Desmonts y Remington, 1980) y se comparó con la prueba de IFI utilizada de rutina en el Laboratorio de Inmunoparasitología, UNLP. Se utilizaron los datos obtenidos como un primer paso en la validación de la misma, debido a la alta sensibilidad y especificidad de esta prueba comercial en el diagnóstico de toxoplasmosis humana.

La prueba de Aglutinación Directa (AD TOXO COLOR, Polychaco) podría utilizarse en los laboratorios veterinarios de diagnóstico como prueba tamiz para detectar animales negativos y reducir el número de muestras a procesar por una prueba de referencia de alta sensibilidad y especificidad como la IFI. En un trabajo anterior donde se analizaron sueros caninos (114) con IFI y una prueba de Aglutinación Directa con un kit comercial (Toxo Screen DA, Biomerieux, Ref 75 481), ésta última presentó una sensibilidad pobre (73,4%), pero una aceptable especificidad (98%) (Macrì y col., 2009). En la práctica veterinaria, es muy frecuente que algunos laboratorios de diagnóstico veterinario deriven el diagnóstico serológico de toxoplasmosis a otros laboratorios especializados que cuentan con el equipamiento necesario para realizar la prueba de IFI, especialmente el microscopio de fluorescencia que es muy costoso para ser adquirido por un laboratorio de diagnóstico de rutina, como así también los conjugados que son productos importados. Estos conjugados, en el caso de la IFI deben ser

específicos para especie e isotipo, es decir, si se quiere determinar anticuerpos anti- *T. gondii* en distintas especies animales, se deberán adquirir conjugados anti-inmunoglobulina anti-especie específica (por ejemplo anti-gato, anti-cabra, anti-bovino, etc.) marcadas con isotiocianato de fluoresceína, mientras que en el caso de la prueba de Aglutinación Directa se pueden determinar anticuerpos en distintas especies sin la necesidad de conjugados específicos.

A su vez, otra ventaja que presenta la prueba de Aglutinación Directa es que su lectura no demanda un entrenamiento particular por el veterinario a cargo del diagnóstico, debido a que la misma es de interpretación más simple, con lo cual se reduce la subjetividad que muchas veces presenta la lectura de IFI entre los distintos operadores que la realizan (Fulton y Voller, 1964). Esta prueba también permite analizar una mayor cantidad de muestras, variable según la cantidad de diluciones que se realicen. En el caso de su uso en humanos como así también en animales, tiene la ventaja de que utiliza un antígeno inactivado, con lo que reduce el riesgo de infección del operador (Fulton, 1965).

A su vez, la prueba de Aglutinación Directa, al utilizar 2-mercaptoetanol (2-ME) permitiría diferenciar serológicamente si la infección de un animal es aguda (Ig M) o crónica (Ig G), lo cual representaría una importante ventaja en relación a las demás pruebas serológicas. Esto se debe a que las moléculas de Ig M e Ig G se comportan de modo diferente frente a la acción de agentes reductores como el 2-ME. El 2-ME fracciona las Ig M en subunidades pequeñas sin actividad aglutinante, en tanto que no actúa sobre la Ig G. Cabe destacar que en este trabajo todos los sueros fueron investigados por Ig G únicamente.

En las pruebas serológicas más frecuentemente usadas, como la IFI, un resultado positivo como única determinación indica que el animal presenta anticuerpos específicos contra el parásito, y por lo tanto que ha sido expuesto al agente. Para poder relacionar los signos clínicos compatibles con la presencia del parásito o una infección activa en un determinado momento, es necesario realizar la determinación de los anticuerpos específicos en dos muestras pareadas (21 días de intervalo entre muestras como mínimo) debido a que la mayoría de las pruebas usadas determinan un único isotipo de inmunoglobulina, generalmente Ig G. De este modo, la prueba utilizada podrá determinar si existe seroconversión, que es el movimiento en el título de anticuerpos de 2 a 4 diluciones de la segunda muestra en relación a la primera muestra. Esto se explica por la concentración que adquieren las inmunoglobulinas ante un primer contacto con el agente. Al inicio de una infección, la inmunoglobulina

que predomina es la Ig M, la cual comienza a ser detectable en suero a partir del día 5-7 posterior al contacto con el parásito, para realizar un pico en su concentración aproximadamente al día 14 y luego descender. La Ig G, más específica, por su parte, aparece a los 14 días, alcanza su máxima concentración a los 21 días y luego desciende en forma variable. Así, si un título de anticuerpos específicos para una enfermedad en una segunda muestra, aumenta o disminuye en relación a la primera, se puede confirmar que esta infección es activa. Si los títulos se mantienen iguales en ambas muestras, se relaciona con una infección crónica y se podría considerar que no está asociada esta enfermedad necesariamente a los signos que presenta el animal en ese momento. Si bien al analizar muestras pareadas se obtiene un resultado concluyente del momento de la infección, es poco frecuente que los veterinarios envíen la segunda muestra para su análisis.

Los resultados de concordancia entre la prueba de IFI y la de Aglutinación Directa (AD TOXO COLOR, Polychaco) obtenidos en este trabajo fueron muy bajos, como así también los valores de sensibilidad y especificidad de esta última, por lo que se concluye que esta prueba comercial de Aglutinación Directa (AD TOXO COLOR, Polychaco) con sus modificaciones no podría utilizarse como prueba tamiz en perros. Debería tener al menos un valor de especificidad mayor para que la prueba nos asegure que los resultados negativos son verdaderos negativos y así confirmar por otra prueba de mayor sensibilidad los positivos. Además los valores de prevalencia más bajos obtenidos sobre los 297 sueros analizados por Aglutinación Directa en relación a los analizados por IFI también permitirían confirmar esos resultados. Al analizar las posibles causas de estos resultados se concluye que las diferencias podrían deberse a:

1. El título de corte utilizado: en este trabajo se utilizó el mismo título de corte que se utiliza en IFI (1:50), según lo reportado en la bibliografía (Dubey, 2010). Si bien los sueros utilizados como controles caninos y humanos evidenciaron buenos resultados para la prueba de Aglutinación Directa en esa dilución, las diferencias encontradas en los restantes sueros analizados podrían deberse a que este título podría ser un valor de corte muy alto para la misma, con lo cual no se detectan los sueros positivos con títulos bajos por IFI (1:50, 1:100 Y 1:200). Esto podría determinar una disminución de la sensibilidad de la prueba de Aglutinación Directa (AD TOXO COLOR, Polychaco). Sería necesario realizar otras pruebas confirmatorias, como el *Immunoblot*, para definir otro valor de título de corte.

2. Presencia de fenómeno de zona: el fenómeno de zona ocurre en las pruebas de aglutinación cuando existe un exceso de anticuerpos en relación a la cantidad de

antígeno presente en la reacción, lo cual satura los sitios de unión de los antígenos y no permite la formación del enrejado de Marrack que es lo que genera el efecto visible en un resultado positivo. Así, al existir un exceso de anticuerpos se visualiza como un resultado negativo aunque haya anticuerpos en el suero problema. Esto podría explicar el motivo por el cual algunos resultados positivos a IFI con títulos altos (1:400 y 1:800) resultarían negativos por la prueba de Aglutinación Directa utilizada en este trabajo. Esto podría determinar una disminución de la especificidad de esta última. Para definir si estos sueros son verdaderos positivos, sería necesario realizar un mayor número de diluciones de los mismos, para evitar el fenómeno de zona. Sin embargo esto reduciría el número de muestras posibles a analizar por placa, con lo cual no se justificaría la utilización de esta prueba como tamiz en vez de utilizar la prueba de IFI empleada como de referencia.

Por lo tanto, como conclusión final, en la población analizada y en base a lo anteriormente expuesto, no se recomienda el uso del kit comercial AD TOXO COLOR, Polychaco, como *screening* o tamiz para el diagnóstico de toxoplasmosis en caninos domésticos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmad N, Ahmed H, Irum S, Qayyum M. Seroprevalence of Ig G and Ig M antibodies and associated risk factors for toxoplasmosis in cats and dogs from sub-tropical arid parts of Pakistan. Trop Biomed. 2014; 31(4):777-84.
2. Alvarado-Esquivel C, Romero-Salas D, Cruz-Romero A, García-Vázquez Z, Peniche-Cardaña A, Ibarra-Priego N, Ahuja-Aguirre C, Pérez-de-León AA, Dubey JP. High prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs in Veracruz, México. BMC Vet Res. 2014; 10:191.
3. Anderson ML, Reynolds JP, Rowe JD, Sverlow KW, Packham AE, Barr BC, Conrad PA. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp infection in dairy cattle. J Am Vet Med Assoc. 1997; 210(8):1169-72.
4. Anon. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. In: OIE Terrestrial Manual. 2008; Chapter 1.1.4, 12 p.
5. Barber JS, Trees AJ. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. Vet. Record. 1996; 139: 439-443.
6. Barber JS y Trees AJ. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. Int. J. Parasitol. 1998; 28: 57-64.
7. Basso W. Posibles hospedadores definitivos de *Neospora caninum*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. 2003.
8. Basso W, Venturini L, Venturini MC, Moore P, Rambeaud M, Unzaga JM, Campero C, Bacigalupe D, Dubey JP. Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef-cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. J. Parasitol. 2001a; 87: 906-907.
9. Basso W, Venturini L, Venturini MC, Hill DE, Kwok OC, Shen SK, Dubey JP. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. J Parasitol. 2001b; 87(3):612-8.

10. Basso W, Venturini MC, Bacigalupe D, Kienast M, Unzaga JM, Larsen A, Machuca M, Venturini L. Confirmed clinical *Neospora caninum* infection in a boxer puppy from Argentina. *Vet Parasitol.* 2005; 131: 299-303.
11. Castellano MC, Basso W, Venturini L, Venturini MC, Bacigalupe D, Unzaga JM. Neosporosis canina. Descripción de un caso. *Selecciones Veterinarias.* 1999; 7 (3): 244-246.
12. Cole RA, Lindsay DS; Blagburn BL, Sorjonen DC, Dubey JP. Vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *J. Parasitol.* 1995; 81: 208-211.
13. de Paula Dreer MK, Gonçalves DD, da Silva Caetano IC, Gerônimo E, Menegas PH, Bergo D, Ruiz Lopes-Mori FM, Benitez A, de Freitas JC, Evers F, Navarro IT, Martins Lde A. Toxoplasmosis, leptospirosis and brucellosis in stray dogs housed at the shelter in Umuarama municipality, Paraná, Brazil. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2013; 19 (1):23.
14. de Sousa ME, Porto WJ, de Albuquerque PP, de Souza Neto OL, Pinheiro Júnior JW, Mota RA. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs in the state of Alagoas, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2012; 21(3):287-90.
15. Desmonts G, Remington JS. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: Method for increasing sensitivity and specificity. *J of Clin Microbiol.* 1980; 2(6):562-568.
16. Di Lorenzo C, Venturini MC, Castellano C, Venturini L, Unzaga JM, Bacigalupe D. Detección de anticuerpos anti- *Neospora caninum* y anti- *Toxoplasma gondii* en perros de área urbana. *Revista de Medicina Veterinaria.* 1997; 78:325-326.
17. Dijkstra T, Eysker T, Schares G, Conraths FJ, Wouda W, Barkema HW. 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.* 2001; 31: 747–752.

18. Dijkstra TH, Barkema HW, Eysker M, Hesselink JW, Wouda W. Natural transmission routes of *Neospora caninum* farm dogs and cattle. *Vet. Parasitol.* 2002; 105: 99-104.
19. Dubey JP. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. *J. Parasitol.* 1996; 82:957-961.
20. Dubey JP. *Toxoplasma gondii* oocysts survival under defined temperatures. *J Parasitol.* 1998; 84: 862-865.
21. Dubey JP. General Biology. En: Dubey JP *Toxoplasmosis of animals and humans*. 2 da. Edición. Maryland, USA. 2010a, p. 1-72.
22. Dubey JP. *Toxoplasmosis in dogs*. En: Dubey JP *Toxoplasmosis of animals and humans*. 2 da. Edición. Maryland, USA. 2010b, p. 161-167.
23. Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Uggla A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1988; 192 (9):1269-85.
24. Dubey, JP; Lindsay, DS. Transplacental *Neospora caninum* infection in dogs. *Am J Vet Res.* 1989; 50: 1578-79.
25. Dubey JP, Lindsay DS. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol.* 1996; 67(1-2):1-59.
26. Dubey JP, Barr BC, Barta JR, Bjerkas I, Bjorkman C, Blagburn BL, Bowman D D, Buxton D, Ellis JT, Gottstein B, Hemphill A, Hill DE, Howe DK, Jenkins MC, Kobayashi Y, Koudela B, Marsh AE, Mattsson JG, Mcallister MM, Modry D, Omata Y, Sibley LD, Speer CA, Trees AJ, Uggla A, Upton SJ, Williams DJ, Lindsay DS. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *Int. J. Parasitol.* 2002; 32: 929-946.
27. Dubey JP, Lappin MR. *Toxoplasmosis and Neosporosis*. En: Greene C *Infectious diseases of the dog and cat*. 3ra. Edición. WB Saunders Com, 2006, p.493-509.

28. Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. Clin Microbiol Rev. 2007a; 20 (2):323-67.
29. Dubey JP, Vianna MCB, Kwok OCH, Hill DE, Miska KB, Tuo W, Velmurugan GV, Conors M, Jenkins MC. Neosporosis in Beagle dogs: Clinical signs, diagnosis, treatment, isolation and genetic characterization of *Neospora caninum*. Vet Parasitol. 2007b; 149: 158-166.
30. Dubey JP, Schares G. Neosporosis in animals, the last five years. Vet Parasitol. 2011; 180:90-108.
31. Fulton, JD. Micro-agglutination test for *Toxoplasma* antibodies. Immunology. 1965; 9:461-495.
32. Fulton JD, Voller A. Evaluation of immunofluorescent and direct agglutination methods for detection to specific *Toxoplasma* antibodies. Brit Med. 1964; 2:1173-1175.
33. Gavrea R, Mircean V, Pastiu A, Cozma V. Epidemiological survey of *Neospora caninum* infection in dogs from Romania. Vet Parasitol. 2012; 188(3-4):382-5.
34. Goździk K, Wrzesień R, Wielgosz-Ostolska A, Bień J, Kozak-Ljunggren M, Cabaj W. Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* in dogs from urban areas in Central Poland. Parasitol Res. 2011; 108 (4):991-6.
35. Jardine JE. The ultrastructure of bradizoites and tissue cysts of *Neospora caninum* in dogs: absence of distinguishing morphological features between parasites of canine and bovine origin. Vet Parasitol. 1996; 62:231-240.
36. Jiang HH, Li MW, Xu MJ, Cong W, Zhu XQ. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in Dogs in Zhanjiang, Southern China. Korean J Parasitol. 2015; 53(4):493-6.
37. Langoni H, Fornazari F, da Silva RC, Monti ET, Villa FB. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs. Braz J Microbiol. 2014; 44 (4):1327-30.

38. Lindsay DS, Dubey JP. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *Am J Vet Res.* 1989; 50: 1981-1983.
39. Lindsay DS, Dubey JP, Butler JM. Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. *Vet Parasitol.* 1997; 73:27-33.
40. Maia C, Cortes H, Brancal H, Lopes AP, Pimenta P, Campino L, Cardoso L. Prevalence and correlates of antibodies to *Neospora caninum* in dogs in Portugal. *Parasite.* 2014; 21:29.
41. Macrì G, Sala M, Linder AM, Pettrossi N, Scarpulla M. Comparison of indirect fluorescent antibody test and modified agglutination test for detecting *Toxoplasma gondii* immunoglobulin G antibodies in dog and cat. *Parasitol Res.* 2009; 105 (1):35-40.
42. Moré G, Paridini L, Basso W, Marín R, Bacigalupe D, Auad G, Venturini L, Venturini MC. Seroprevalence of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis sp.* In llamas (*Lama glama*) from Jujuy, Argentina. *Vet Parasitol.* 2008; 155: 158-160.
43. Nazir MM, Maqbool A, Akhtar M, Ayaz M, Ahmad AN, Ashraf K, Ali A, Alam MA, Ali MA, Khalid AR, Lindsay DS. *Neospora caninum* prevalence in dogs raised under different living conditions. *Vet Parasitol.* 2014; 204(3-4):364-8.
44. Nelson KW, Couto CG. Enfermedades protozoarias sistémicas. Toxoplasmosis canina. Neosporosis. En: *Medicina Interna de Animales Pequeños.* 3ra. Edición. Editorial Intermédica. Buenos Aires, Argentina. 2005, p. 1384-1386.
45. Nogueira CI, Mesquita LP, Abreu CC, Nakagaki KY, Seixas JN, Bezerra PS, Rocha CM, Guimaraes AM, Peconick AP, Varaschin MS. Risk factors associated with seroprevalence of *Neospora caninum* in dogs from urban and rural areas of milk and coffee production in Minas Gerais state, Brazil. *Epidemiol Infect.* 2013; 141(11):2286-93.

46. Oshiro LM, Motta-Castro AR, Freitas SZ, Cunha RC, Dittrich RL, Meirelles AC, Andreotti R. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* serodiagnosis In Human Immunodeficiency Virus Carriers. Rev Soc Bras Med Trop. 2015; 48 (5):568-72.
47. Paré J, Fecteau G; Fortin M, Marsolais G. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1998; 213 (11): 1595-1598.
48. Pinheiro AM, Costa MF, Paule B, Vale V, Ribeiro M, Nascimento I, Schaer RE, Almeida MA, Meyer R, Freire SM. Serologic immunoreactivity to *Neospora caninum* antigens in dogs determined by indirect immunofluorescence, western blotting and dot-ELISA. Vet Parasitol. 2005; 130 (1-2):73-9.
49. Qian WF, Yan WC, Wang TQ, Zhai K, Han LF, Lv CC. Prevalence and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in pet dogs in Central China. Korean J Parasitol. 2015; 53 (1):125-8.
50. Ruehlmann C, Podell M, Oglesbee M y Dubey JP. Canine neosporosis: a case report and literature review. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1995; 31: 174-183.
51. Sharma R, Kimmitt T, Tiwari K, Chikweto A, Thomas D, Lanza Perea M, Bhaiyat MI. Serological evidence of antibodies to *Neospora caninum* in stray and owned Grenadian dogs. Trop Biomed. 2015;32(2):286-90.
52. Sicupira PM, de Magalhães VC, Galvão Gda S, Pereira MJ, Gondim LF, Munhoz AD. Factors associated with infection by *Neospora caninum* in dogs in Brazil. Vet Parasitol. 2012; 185(2-4):305-8.
53. Silva DA, Lobato J, Mineo TW, Mineo JR. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. Vet Parasitol. 2007; 143(3-4):234-44.

54. Tenter A, Heckeroth A, Weiss L. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.*2000; 30:1217-1258.
55. Thrusfield, M., *Epidemiología Veterinaria*, ed.1990, Zaragoza, España: Editorial Acribia, S.A. 339.
56. Trees AJ, Williams D. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends Parasitol.* 2005; 21(12):558-561.
57. Venturini MC, Unzaga JM, Basso W, Bacigalupe B, Larsen A, Pardini L, Moré G, Venturini L. Neosporosis y toxoplasmosis en perros con signos clínicos en diez años de diagnóstico serológico. XVII Reunión Científica Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Diagnóstico, 2008; Resumen P18. Ciudad de Santa Fe, Argentina.
58. Venturini MC, Bacigalupe D, Miceli G, Larsen A, Rambeaud M, Pardini L, Dellarupe A, Serena S, Campero LM, Gos ML, Bernstein M. Manual de Inmunodiagnóstico. Pertenciente al curso de Inmunobiología Animal Básica de la Carrera de Medicina Veterinaria, FCV, UNLP. 2014.

ANEXOS

Anexo 1: Técnicas utilizadas en los métodos serológicos

Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta

Preparación del antígeno:

Cultivo de células: Se utilizaron células Vero (células epiteliales de riñón de mono verde africano *Chlorocebus* sp.) mantenidas con medio de cultivo RPMI 1640 con glutamina, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) para crecimiento o 3% SFB para mantenimiento y con 1 % de antibiótico (Penicilina 10.000 UI/ml – Estreptomicina 10mg/ml) y antimicótico (Anfotericina B 0,25mg/ml).

Semanalmente se repicaron en nuevas botellas una vez observada la formación de una monocapa de la siguiente manera:

- Se elimina el medio de la botella.
- Se agrega PBS pH 7,2 y enjuaga, se elimina el PBS.
- Se agrega 2,7 ml de PBS y 0,3 ml de Tripsina- EDTA sol. 10 x (5 g de tripsina/l 1:250, 2g EDTA/l) e incuba a 37° 30 min.
- Una vez desprendidas las células, se completa hasta 5 ml con RPMI.
- Se coloca 1 ml de esa suspensión en cada nueva botella de cultivo con 5 ml de medio con 10 % de SFB colocado previamente.
- Se incuba a 37° bajo una atmósfera con 5 % de CO₂.
- Las células deben multiplicarse una vez por semana. En tres a cinco días puede estar formada la monocapa.

Preparación del antígeno para *T. gondii*: se recolectó el sobrenadante de una botella infectada de 6-7 días donde se observó que los taquizoítos se encontraron en un 80% fuera de la célula. Se centrifugó 10 minutos y se resuspendió en solución fisiológica. Se centrifugó y lavó tres veces. Se inactivaron los taquizoítos con 1% de formol. Se resuspendió en solución de PBS en una dilución aproximada de 10⁷ taquizoítos/ml. Se colocó aproximadamente 10 µl de la suspensión en cada área del portaobjeto para IFI y se secó a temperatura ambiente. Los portaobjetos se conservaron a -20° C.

Preparación del antígeno para *N. caninum*: se recolectó la monocapa de una botella infectada donde se observó que el 50% de los taquizoítos se encontraron fuera de las células. Se pasaron por agujas de diferentes calibres para facilitar la liberación de los taquizoítos. Se centrifugó y lavó tres veces. Se resuspendieron en PBS en una dilución aproximada de 10^7 taquizoítos/ml. Se colocó aproximadamente 10 μ l de la suspensión en cada área del portaobjetos para IFI, se secó a temperatura ambiente y se fijó con metanol. Los portaobjetos se conservaron a -20° C.

Preparación de soluciones de lavado y montaje:

Solución buffer de fosfatos (P.B.S.)

Solución madre:

Cloruro de sodio (NaCl)..... 40 g
Cloruro de potasio (KCl)..... 1 g
Di-sodio hidrogeno fosfato(Na_2HPO_4).....5,75 g
Potasio di-hidrogeno fosfato (KH_2PO_4).....1 g
Agua destilada.....c.s.p. 500 ml

Solución de trabajo: se utiliza la solución madre diluida 1:10 en agua destilada.

El pH final será de 7,2.

Solución buffer de carbonatos (Rinse buffer)

Solución madre:

Na_2CO_3 5,7 g
 NaHCO_3 16,8 g
NaCl.....4,25 g
Agua destilada..... c.s.p. 500ml.

El pH es de 9.

Solución de trabajo: Se utiliza la solución madre diluida en agua destilada en proporción de 1: 4.

Líquido de montaje para Inmunofluorescencia de T. gondii:

Para preparar 10 ml de esta solución:

P.B.S. 9 ml

Glicerina 1 ml

Líquido de montaje para Inmunofluorescencia de N. caninum:

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

La prueba de Inmunofluorescencia Indirecta se realizó de la siguiente manera:

1. Los sueros caninos se diluyeron en base 2 a partir de 1:50 hasta 1:800 en PBS en placas con fondo en U de 96 pocillos.
2. Se incubaron los sueros con el antígeno de *T. gondii* y de *N. caninum* en los portaobjetos a 37° C durante 30 minutos en cámara húmeda.
3. Los portaobjetos se lavaron en agitador con solución de buffer de carbonatos para *N. caninum* y con PBS para *T. gondii* tres veces: 10 minutos, 5 minutos y 3 minutos, cambiando la solución de lavado cada vez.
4. Luego del secado, se colocó el conjugado anti-Ig G canina específica FITC (Sigma) y se incubó por 30 minutos a 37° C en cámara húmeda.
5. Se procedió a realizar el lavado de la misma manera que en el paso 3.
6. Luego del secado, se montó con glicerina al 50% en buffer de carbonatos para *N. caninum* y al 10% en PBS para *T. gondii*.
7. Se observó con el microscopio de fluorescencia a 20X y 40X. Se consideró un resultado positivo cuando se observó fluorescencia verde-amarillenta en toda la periferia del taquizoíto (Moré y col., 2008).

Prueba de Aglutinación directa para T. gondii

El kit de Aglutinación directa AD TOXO Polychaco provee los siguientes reactivos:

Frasco 1. Antígeno. 12 ml de suspensión estabilizada de *T. gondii*.

Frasco 2. Diluyente de muestras. 30 ml de solución salina con conservantes.

Frasco 3. Ampolla de 1 ml de 2-mercaptoetanol (2-ME).

Frasco 4. Solución proteica. 0,3 ml de solución proteica estabilizada, con conservadores.

Frasco 5. Control positivo de humano. 0,5 ml de una dilución de suero reactivo para anticuerpos contra *T. gondii*, titulado, inactivado, con conservantes. Listo para usar.

Frasco 6. Control negativo de humano. 0,5 ml de una dilución de suero no reactivo para anticuerpos contra *T. gondii*, titulado, inactivado, con conservantes. Listo para usar.

Los reactivos deben guardarse preferentemente entre 2^o y 8^o C. No congelar.

Preparación de los reactivos del kit según recomendaciones del fabricante:

Antígeno (frasco 1): antes de usar, asegurar una buena homogeneización, agitando intensamente el frasco y luego pasando su contenido 3 o 4 veces a través de una jeringa con aguja fina. Repetir el procedimiento cada vez que lo use. Mantener el frasco en posición vertical.

Diluyente de muestra (frasco 2): antes de utilizar el diluyente, agregar 100 µl de Solución Proteica (frasco 4), cada 10 ml de diluyente. Preparar la cantidad necesaria para el uso inmediato, ya que sólo es estable durante dos días si se mantiene entre 2^o y 8^o C.

2-mercaptoetanol (ampolla 3): preparar una solución de 2-ME 1:100 en solución fisiológica (NaCl 0,85% P/V). Utilizar esta solución solamente el día de la preparación.

Control positivo y negativo: están listos para usar, por lo que no requieren tratamiento con 2-ME.

Procedimiento:

a. Tratamiento de los sueros con 2-ME:

1. En dos recipientes adecuados colocar 100 µl de suero con 100 µl de 2-ME en uno y en el otro 100 µl d suero con 100 µl de solución fisiológica, por cada uno de los sueros a analizar.
2. Incubar 30 minutos a 37° C.
3. Luego de la incubación, proceder a la titulación. Observar que ninguno se encuentre gelificado.

4. Los sueros están diluidos 1:2.
- b. Titulación: Si se desea investigar Ig G específica, titular solamente el suero tratado con 2-ME. Si se desea diferenciar una infección reciente de una crónica titular el suero tratado y no tratado en paralelo para detectar además Ig M.
 1. Colocar 25 μ l del Diluyente de muestras utilizando un microgotero o una micropipeta calibrada, a partir del primer pocillo de una policubeta descartable. Utilizar la cantidad de pocillos necesarios hasta la dilución (título) de las muestras y controles que desea investigar. Dejar un pocillo sólo con Diluyente de muestras para utilizarlo como Control de Reactivo.
 2. Sumergir un microdiluidor de 25 μ l en un recipiente con agua destilada, secarlo con papel de filtro por rotación y seguidamente tomar el suero diluido en el tratamiento anterior. Al retirarlo controlar que cubra la totalidad de los espacios libres.
 3. Sumergir el microdiluidor cargado en el primer pocillo y girar el mismo entre ambas manos no menos de 10 veces. Esta operación asegurará una perfecta homogeneización de la muestra.
 4. Transferir los microdiluidores a la fila siguiente y repetir la misma operación hasta la dilución deseada.
 5. Retirar los microdiluidores y secarlos con papel de filtro. Sumergirlos sucesivamente en dos recipientes con agua destilada y secarlos con papel de filtro para usarlos nuevamente.
 6. Repetir los pasos 2 a 5 con cada muestra a investigar, con el Control Positivo y el Control Negativo provistos en el equipo. Si se utiliza una micropipeta automática de 25 μ l para la toma y dilución de la muestra y los controles, homogeneizar por carga y descarga, transfiriendo 25 μ l de pocillo en pocillo hasta la dilución deseada, descartando los últimos 25 μ l.
 7. Depositar con una micropipeta o microgotero 25 μ l del Antígeno previamente homogeneizado en los pocillos utilizados.
 8. Agitar la policubeta golpeando con los dedos sobre sus paredes laterales, durante no menos de 30 segundos.
 9. Dejar la policubeta en reposo a resguardo de vibraciones durante un mínimo de cuatro horas y leer.

Lectura:

Luego de transcurridas cuatro horas de incubación, realizar una primera lectura y controlarla al día siguiente. La lectura se realiza sobre un “espejo” utilizando además una lámpara que ilumine la policubeta transversalmente desde abajo.

El primer pocillo corresponde a la dilución 1:4 para el suero y 1:2 para los controles positivo y negativo.

Reacción positiva: formación de un manto en el fondo del pocillo por aglutinación del antígeno, que debe ocupar más del 50% del mismo.

Reacción negativa: formación de un botón nítido o botón con centro de luz, de bordes regulares, por sedimentación del antígeno.

Control de reactivo: debe formar un botón nítido por sedimentación del antígeno, como la reacción negativa. Si el antígeno está autoaglutinado, la imagen del control de reactivo sería como la reacción positiva. Si esto ocurre, verifique la homogeneización, su estado de conservación (debido a su posible congelamiento) y la fecha de vencimiento del kit.

Modificaciones realizadas en el trabajo

- Se analizaron por placa 91 sueros problemas, debido a que se cinco pocillos fueron utilizados para: control positivo de humano, control negativo de humano, control positivo de perro, control negativo de perro y para el diluyente de muestra.
- Tratamiento de los sueros con 2-ME: Se trataron los 91 sueros problemas y los controles positivo y negativo de perros (total de 93 sueros) en la misma dilución (1:2) que la recomendada en el kit. Se colocó 12,5 µl del suero problema en 12,5 µl del 2-ME en microtubos de 0,5 ml, debido a que los volúmenes de sueros remitidos eran escasos. El 2-ME se preparó como indica el kit (1:100: 12 µl de 2-ME puro en 1188 µl de solución fisiológica). No se realizó la dilución de los mismos con solución fisiológica, debido a que sólo se investigó la presencia de Ig G, para comparar los resultados con la prueba de IFI. La incubación fue a igual temperatura y tiempo que la recomendada en el kit. (37⁰C por 30 minutos en estufa de cultivo).
- Se preparó el diluyente de muestra de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, utilizando 46 µl del la solución proteica en 4554 µl del diluyente. Se colocaron 46 µl de esta

preparación en cada pocillo de una policubeta aparte en donde se realizaron las diluciones.

- Se colocó 4 μ l de cada suero problema y de los controles caninos, mientras que en los controles humanos se colocó 2 μ l para obtener la dilución 1:25.
- En otra policubeta provista por el kit, se colocó 12,5 μ l de la preparación del diluyente y solución proteica y sobre estas se colocó 12,5 μ l de la dilución anterior, obteniéndose la dilución final de 1:50. Luego se le agregó 12,5 μ l del antígeno provisto por el kit previamente homogeneizado, y se procedió a realizar la lectura de igual forma que la recomendada por el fabricante.