

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Frecuencia de anticuerpos IgG contra Neospora
caninum y Toxoplasma gondii en canes con signos
clínicos de afección neuromuscular en la Clínica de
Animales Menores de la FMV-UNMSM**

TESIS

para optar el título profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Nelson Ruiz Ríos

Lima-Perú

2009

DEDICATORIA:

Este trabajo de investigación está dedicado a mi abuelita Lilla, mi camarada, cómplice y amiga. Te extraño mucho!. A mis padres, refugio, ejemplo y aliento constante. Gracias por su amor infinito. Y a mi hermana Lorena, por el apoyo y amistad incondicional.

AGRADECIMIENTOS:

A los ④ restantes (Isabel, Mónica y Raffo), muchas cosas podrán cambiar y otras nunca lo harán, pero nada nos quitará lo vivido aquellos años “sangrientos”... Gracias! =)

A Katty, Antony, Annelisse, Beatriz, gentita de la Casa Gris pentacampeona ‘99 y amigos en general. Gracias por estar ahí.

A los doctores Eva Casas, Diego Díaz, Francisco Suárez y a todos mis amigos de la clínica de animales menores y del laboratorio de parasitología veterinaria de la FMV – UNMSM, gracias por su ayuda en el desarrollo de esta tesis.

A los doctores Diana Bacigalupe, Cecilia Venturini y Juan Unzaga, del Laboratorio de Inmunoparasitología de la FMV de la Universidad Nacional de La Plata por asesorarme y facilitarme parte del material diagnóstico. Y a mi amiga Johana Ramos por el inmenso favor de traerme desde Argentina ese material.

ÍNDICE

	Pág
RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE CUADROS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. TOXOPLASMOSIS CANINA.....	3
2.1.1. ETIOLOGÍA.....	3
2.1.1.1. TAXONOMÍA.....	3
2.1.1.2. MORFOLOGÍA.....	4
2.1.1.2.1. El taquizoíto.....	5
2.1.1.2.2. El quiste tisular.....	5
2.1.1.2.3. Los ooquistes.....	6
2.1.1.3. CICLO BIOLÓGICO.....	6
2.1.2. EPIDEMIOLOGÍA.....	8
2.1.2.1. PARÁSITO.....	8
2.1.2.2. HOSPEDERO.....	8
2.1.2.3. MEDIO AMBIENTE.....	9
2.1.2.4. TRANSMISIÓN.....	10
2.1.2.4.1. TRANSMISIÓN VERTICAL.....	10
2.1.2.4.2. TRANSMISIÓN HORIZONTAL.....	11
2.1.3. PATOLOGÍA.....	12
2.1.3.1. PATOGENIE.....	12
2.1.3.2. SIGNOS CLÍNICOS.....	13
2.1.3.3. LESIONES.....	14
2.1.4. INMUNOLOGÍA.....	15
2.1.4.1. RESPUESTA INMUNE HUMORAL.....	15
2.1.4.2. RESPUESTA INMUNE CELULAR.....	16
2.1.5. DIAGNÓSTICO.....	17
2.1.5.1. CLÍNICO.....	17

2.1.5.2. COPROLOGÍA.....	18
2.1.5.3. SEROLOGÍA.....	18
2.1.5.3.1. Dye Test.....	19
2.1.5.3.2. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).....	20
2.1.5.3.3. Enzimoimmunoensayo (ELISA).....	20
2.1.5.3.4. Hemoaglutinación Indirecta (HAI).....	21
2.1.5.3.5. Otras pruebas serológicas.....	21
2.1.5.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	21
2.1.5.5. AISLAMIENTO.....	22
2.1.6. TRATAMIENTO.....	22
2.1.7. PREVENCIÓN Y CONTROL.....	24
2.2. NEOSPOROSIS CANINA.....	26
2.2.1. ETIOLOGÍA.....	26
2.2.1.1. TAXONOMÍA.....	26
2.2.1.2. MORFOLOGÍA.....	27
2.2.1.2.1. El taquizoíto.....	27
2.2.1.2.2. El quiste tisular.....	27
2.2.1.2.3. Los ooquistes.....	28
2.2.1.3. CICLO BIOLÓGICO.....	28
2.2.2. EPIDEMIOLOGÍA.....	30
2.2.2.1. PARÁSITO.....	30
2.2.2.2. HOSPEDERO.....	31
2.2.2.3. MEDIO AMBIENTE.....	32
2.2.2.4. TRANSMISIÓN.....	32
2.2.2.4.1. TRANSMISIÓN VERTICAL.....	32
2.2.2.4.2. TRANSMISIÓN HORIZONTAL.....	33
2.2.3. PATOLOGÍA.....	33
2.2.3.1. PATOGENIE.....	33
2.2.3.2. SIGNOS CLÍNICOS.....	34
2.2.3.3. LESIONES.....	35
2.2.4. INMUNOLOGÍA.....	36
2.2.4.1. RESPUESTA INMUNE HUMORAL.....	37
2.2.4.2. RESPUESTA INMUNE CELULAR.....	38

2.2.5. DIAGNÓSTICO.....	39
2.2.5.1. CLÍNICO.....	39
2.2.5.2. COPROLOGÍA.....	39
2.2.5.3. INMUNOHISTOQUÍMICA.....	40
2.2.5.4. SEROLOGÍA.....	40
2.2.5.4.1. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).....	41
2.2.5.4.2. Enzimoimmunoensayo (ELISA).....	42
2.2.5.4.3. Microaglutinación.....	42
2.2.5.5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	43
2.2.5.6. AISLAMIENTO.....	43
2.2.5.7. DIAGNÓSTICO POST MORTEM.....	44
2.2.6. TRATAMIENTO.....	44
2.2.7. PREVENCIÓN Y CONTROL.....	45
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
3.1. LUGAR DE ESTUDIO.....	47
3.2. OBJETO DE ESTUDIO.....	47
3.3. MATERIALES.....	48
3.4. EQUIPOS.....	48
3.5. REACTIVOS.....	48
3.6. TOMA DE MUESTRAS.....	48
3.7. DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS.....	49
3.8. ANÁLISIS DE DATOS.....	50
3.8.1. Frecuencia.....	50
3.8.2. Intervalo de Confianza.....	50
3.8.3. Asociación.....	51
IV. RESULTADOS.....	52
V. DISCUSIÓN.....	56
VI. CONCLUSIONES.....	61
VII. RECOMENDACIONES.....	62
VIII. BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	63
IX. APÉNDICE.....	80

LISTA DE CUADROS

	Pá g.
Cuadro 1	Frecuencia de <i>T. gondii</i> en canes domésticos, según la presencia de afección neuromuscular. FMV – UNMSM. 2006 – 2008. Perú. 53
Cuadro 2	Frecuencia de <i>N. caninum</i> en canes domésticos, según la presencia de afección neuromuscular. FMV – UNMSM. 2006 – 2008. Perú. 53
Cuadro 3	Distribución de los signos neurológicos en los animales seropositivos a <i>Toxoplasma gondii</i> . 2006 – 2008. FMV – UNMSM. Lima – Perú. 54
Cuadro 4	Distribución de los signos neurológicos en los animales seropositivos a <i>Neospora caninum</i> . 2006 – 2008. FMV – UNMSM. Lima – Perú. 55
Apéndice 1	Distribución de los animales seropositivos a <i>Toxoplasma gondii</i> según edad, sexo y raza. 2006 – 2008. FMV – UNMSM. Lima – Perú. 80
Apéndice 2	Distribución de los animales seropositivos a <i>Neospora caninum</i> según edad, sexo y raza. 2006 – 2008. FMV – UNMSM. Lima – Perú. 80

LISTA DE FIGURAS

	Pág.	
Foto 1	Vista lateral de un canino de 65 días de edad con mialgia y paraparesia. IFI: <i>Toxoplasma gondii</i> positivo (1:50). FMV – UNMSM. Lima – Perú. (Nelson Ruiz, 2008)	54
Foto 2	Vista frontal de un canino de 65 días de edad con mialgia y paraparesia. IFI: <i>Toxoplasma gondii</i> positivo (1:50). FMV – UNMSM. Lima – Perú. (Nelson Ruiz, 2008)	54
Foto 3	Bóxer macho de 6 años de edad con tetraparesia y nistagmo. IFI: <i>Neospora caninum</i> positivo (1:50). FMV – UNMSM. Lima – Perú. (Nelson Ruiz, 2008)	55
Foto 4	Bóxer macho de 6 años de edad con tetraparesia y nistagmo. IFI: <i>Neospora caninum</i> positivo (1:50). FMV – UNMSM. Lima – Perú. (Nelson Ruiz, 2008)	55

LISTA DE ABREVIATURAS

μm	Micrómetro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (y otros)
FMV	Facultad de Medicina Veterinaria
HCl	Ácido clorhídrico
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IFN- γ	Gamma interferón
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleuquina
MLV	Modified live virus (Virus vivo modificado)
PAS	Acido peryódico de schiff
SNC	Sistema nervioso central
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alpha
UI	Unidades Internacionales
UNMSM	Universidad Nacional Mayor de San Marcos

RESUMEN

Toxoplasma gondii y *Neospora caninum* son dos protozoarios apicomplexos de distribución mundial y potenciales causantes de enfermedades neuromusculares en canes. Sin embargo, en el Perú son escasos los estudios sobre la implicancia de estos agentes en la especie canina. Así, el objetivo de este estudio fue determinar la frecuencia de anticuerpos IgG contra *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii* en canes con alteraciones neuromusculares y observar el tipo de asociación que existe entre la presencia de anticuerpos y la afección neuromuscular. Para el estudio fueron examinados 96 sueros de canes con signos clínicos de afección neuromuscular y 120 sueros de canes sin presencia de signos neuromusculares. Todas las muestras fueron obtenidas en la Clínica de Animales Menores de la FMV – UNMSM. Luego, el diagnóstico se realizó a través de la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para la detección de anticuerpos IgG, considerándose positivos los sueros que presentaron fluorescencia completa del taquizoíto en la dilución 1:50. En los canes con afección neuromuscular, la frecuencia para *Toxoplasma gondii* fue de $23.96 \pm 8.5\%$ (23/96) y para *Neospora caninum* fue de 5.21 ± 4.4 (5/96), mientras que en los canes sin afección neuromuscular la frecuencia para *Toxoplasma gondii* fue de 3.34 ± 3.1 (4/120) y para *Neospora caninum* fue de 1.67 ± 2.5 (2/120). Finalmente, se observó que existe asociación entre la afección neuromuscular y la presencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii*, mientras que no se halló asociación entre tal afección y la presencia de anticuerpos anti-*Neospora caninum*.

Palabras Clave: *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, canes, afecciones neuromusculares, inmunofluorescencia indirecta, anticuerpos IgG.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii and *Neospora caninum* are two apicomplex protozoans that can cause neuromuscular diseases in dogs. In Peru, are only a few studies on the implication of these agents in the canine species. The target of this investigation was to find the association between IgG antibodies and neuromuscular diseases. In this study, 96 sera of dogs with clinical signs of neuromuscular disease and 120 sera of dogs without neuromuscular signs were examined. All the samples were obtained at the Small Animal Clinic of the FMV – UNMSM. The diagnosis was performed by means of indirect immunofluorescence test (IFI) for the detection of IgG antibodies, considering positive the sera that showed complete fluorescence of the tachyzoite in the dilution 1:50. In the dogs with neuromuscular disease, the frequency for *Toxoplasma gondii* was $23.96 \pm 8.5\%$ (23/96) and for *Neospora caninum* was 5.21 ± 4.4 (5/96), meanwhile, in the dogs without neuromuscular disease the frequency for *Toxoplasma gondii* was 3.34 ± 3.1 (4/120) and for *Neospora caninum* was 1.67 ± 2.5 (2/120). Finally, it was observed association between the neuromuscular disease and the presence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies, while did not find association between such disease and the presence of anti-*Neospora caninum* antibodies.

Key words: *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, dogs, neuromuscular affections, indirect immunofluorescence, IgG antibodies.

I. INTRODUCCIÓN

Las afecciones neuromusculares en canes se deben a diversos agentes etiológicos entre los que se encuentran los protozoarios *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii*. En los canes ambas infecciones son clínicamente similares, por lo que inicialmente las manifestaciones clínicas producidas por *Neospora caninum* fueron confundidas con toxoplasmosis. Aunque estas enfermedades son similares, la toxoplasmosis parece ser más frecuente en gatos y la neosporosis en canes (Dubey y Lappin, 1998).

Ambos agentes parasitarios tienen un ciclo de vida del tipo predador (hospedero definitivo) – presa (hospedero intermediario). La reproducción sexual ocurre en el predador y la reproducción asexual en la presa (Rojas, 2003). Los hospederos definitivos de *Neospora caninum* son el canino doméstico (Lindsay *et al.*, 1999b) y el coyote (Gondim *et al.*, 2004a), mientras que los hospederos definitivos de *Toxoplasma gondii* son el gato (Dubey *et al.*, 1970) y otros felinos (Jewell *et al.*, 1972). Los canes pueden actuar como hospederos intermediarios y definitivos para *Neospora caninum* (Dubey, 2003) y como hospederos intermediarios para *Toxoplasma gondii* (Lindsay *et al.*, 1996).

Ambos protozoarios tienen tres estadios infecciosos: Los esporozoítos en ooquistes esporulados, los taquizoítos (de multiplicación activa), y los bradizoítos (de multiplicación lenta) en quistes tisulares. Los ooquistes son excretados con las heces, mientras que los taquizoítos y bradizoítos son encontrados en los tejidos de los hospederos intermediarios (Dubey y Lappin, 1998).

Existen diversas clasificaciones para los signos clínicos de la toxoplasmosis canina, los cuales pueden ser localizados en los sistemas respiratorio, neuromuscular, gastrointestinal, o en una infección generalizada (Dubey y Lappin, 1998; Rojas, 2003). En la neosporosis canina, los signos clínicos son similares a los de la toxoplasmosis canina, predominando los problemas neurológicos y anomalías musculares.

La inmunofluorescencia indirecta (IFI) es la prueba serológica más utilizada para la detección de anticuerpos anti - *Toxoplasma gondii* y anti - *Neospora caninum*, la misma que puede ser adaptada para detectar IgM, IgG o IgA (Dubey y Lappin, 1998). Además, se ha sugerido que la magnitud de los títulos de anticuerpos en los canes seropositivos a *Toxoplasma gondii* y a *Neospora caninum* es indicadora de diagnóstico de enfermedad clínica (Barber y Trees, 1996; Locatelli *et al.*, 2006).

En el Perú se han realizado algunos estudios sobre la presencia de *Neospora caninum* en canes, así tenemos que en los distritos de Molinopampa y Leymebamba en Chachapoyas la seroprevalencia fue de $28,9 \pm 7.5\%$ (Horna, 2003), en canes de establos lecheros de la cuenca izquierda del Valle del Mantaro la seroprevalencia fue de $19.4 \pm 7\%$ (Cornejo, 2004) y en canes de establos lecheros del valle de Lima la frecuencia fue de $32,7 \pm 9\%$ (Del Campo, 2003). Por otro lado, investigaciones sobre la presencia de *Toxoplasma gondii* han sido realizados en diversos animales domésticos y silvestres, como: la oveja, el cerdo, el mono, la alpaca, la llama, y la vicuña, existiendo pocos datos sobre la presencia de este protozooario en canes en el Perú. Sin embargo, recientemente un estudio reportó que la frecuencia de *T. gondii* en canes de varios distritos de Lima era de 36.5% (Morales, 2007).

En ese sentido, el objetivo del presente estudio fue investigar acerca de la presencia de anticuerpos IgG anti - *Toxoplasma gondii* e IgG anti - *Neospora caninum* en canes con afección neuromuscular atendidos en la clínica de animales menores de la FMV - UNMSM. Además de evaluar el tipo de asociación que existe entre la presencia de afección neuromuscular y la presencia de anticuerpos IgG.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. TOXOPLASMOSIS CANINA

El *Toxoplasma gondii* fue descrito por primera vez en 1908 por Nicolle y Manceaux en el Instituto Pasteur de Túnez, cuando éstos aislaron del hígado y el bazo de un roedor salvaje africano (*Ctenodactylus gondi*) un parásito intracelular. Al inicio lo confundieron con *Leishmania sp*, pero un año más tarde concluyeron que se trataba de una nueva especie y la denominaron *Toxoplasma gondii* por su forma arqueada (del griego toxon = arcos) y por el nombre vulgar del roedor en el que fue hallado, el gondi (Dubey, 2007).

El *Toxoplasma gondii* ha sido reportado a nivel mundial y afecta al hombre y a diversas especies de mamíferos domésticos, silvestres y aves. La toxoplasmosis es por lo tanto considerada como una infección cosmopolita y de gran importancia médica y veterinaria por su capacidad de provocar abortos y patologías congénitas en los hospederos intermediarios que parasita (Pantoja y Pérez, 2001; Dubey, 2004).

2.1.1. ETIOLOGÍA

2.1.1.1. TAXONOMÍA

El *Toxoplasma gondii* se incluye dentro del Phylum Apicomplexa, clase Sporozoea, subclase Coccidia, orden Eucoccidida, suborden Eimeriina, familia Sarcocystidae y subfamilia Toxoplasmatinae (Petersen y Dubey, 2001). Los integrantes

de la familia Sarcocystidae se caracterizan por tener ciclos biológicos heteroxenos y por formar quistes en el hospedero intermediario. Todos ellos tienen como hospederos intermediarios a diferentes especies de herbívoros y como hospederos definitivos a diferentes especies de carnívoros (Álvarez, 2003).

En un principio la clasificación del género *Toxoplasma* se hizo basándose principalmente en el hospedero en el que era detectado. Así se diferenciaron 9 especies: *T. alencari*, *T. bahiensis*, *T. brumpti*, *T. colubri*, *T. gondii*, *T. hammondi*, *T. pardalis*, *T. ranae* y *T. serpai*. Luego en los años 30 se observó que los ciclos biológicos y las características inmunológicas de todas estas especies eran idénticos por lo que se les agrupó bajo un mismo género y especie: *Toxoplasma gondii* (Gómez, 2004).

Recientemente, científicos norteamericanos han analizado trazas de ADN de las 46 cepas existentes de *T. gondii* encontradas alrededor del mundo. El grupo concluyó que todas las cepas actuales son descendientes de un antepasado común que existió hace 10 millones de años y que luego dio origen a 4 grupos: dos en Sudamérica, uno en Norteamérica, y uno de distribución mundial. Hace aproximadamente un millón de años, la materia genética de estos 4 grupos antiguos fue redistribuida entre 11 grupos distintos de *T. gondii*, los que a su vez dieron origen a las 46 cepas conocidas en la actualidad, siendo la RH la cepa patógena más utilizada. (Ware y Kasper, 1987; Rosenthal, 2008). Sin embargo, en la actualidad se suele clasificar a *T. gondii* dentro de 3 linajes: Tipo I, Tipo II y Tipo III. Da Silva *et al.* encontraron en 2005 que los Tipos I y III estaban presentes en perros con signos clínicos neurológicos.

2.1.1.2. MORFOLOGÍA

Existen tres estadios infecciosos de *T. gondii* para todos los hospederos: los taquizoítos (individualmente o en grupos), los bradizoítos (en quistes tisulares), y los esporozoítos (en ooquistes esporulados).

2.1.1.2.1. El taquizoíto

Mide aproximadamente 2 x 6 μm y tiene forma de media luna, con un extremo anterior conoidal y un extremo posterior redondeado. Ultraestructuralmente contiene diversas organelas como mitocondrias, complejo de Golgi, ribosomas, roptrias, retículo endoplásmico rugoso y liso; así como cuerpos de inclusión, película protectora, microtúbulos subpeliculares, anillos apicales, anillos polares, conoide, micronemas, microporo, gránulos densos, gránulos de amilopectina (que pueden estar ausentes) y apicoplasto (Xu *et al.*, 1989). El núcleo está situado hacia el área central de la célula, contiene agregados de cromatina y un nucleolo también central (Dubey *et al.*, 1998).

Aunque los taquizoítos pueden moverse por deslizamiento, flexión, ondulación, y rotación, ellos no tienen medios visibles de locomoción como cilios, flagelos o pseudópodos. Las funciones del conoide, roptrias, microporos y micronemas no están completamente esclarecidas pero están probablemente asociadas con la penetración a la célula hospedera y con la creación de un ambiente intracelular adecuado para el crecimiento y desarrollo del parásito. Después de ingresar a la célula, el taquizoíto se vuelve ovoide y es rodeado por una vacuola parasitófora, la cual parece originarse tanto de la célula hospedera como del parásito (Dubey *et al.*, 1998).

Los taquizoítos son extremadamente frágiles y no resisten ni la desecación ni la ebullición, son sensibles a la mayor parte de los desinfectantes como el hipoclorito de sodio al 1% o el etanol al 70% y al jugo gástrico, por lo que no pueden transmitirse por vía digestiva (Gómez, 2004).

2.1.1.2.2. El quiste tisular

El tamaño es variable, un quiste tisular joven puede ser tan pequeño como de 5 μm de diámetro y contener solo 2 bradizoítos, mientras que los más antiguos pueden contener cientos de organismos. Los quistes tisulares en el cerebro son a menudo esféricos y raramente alcanzan un diámetro de 70 μm , mientras que los quistes intramusculares son elongados y pueden medir 100 μm de largo (Dubey *et al.*, 1998).

La pared es elástica y delgada ($<0,5 \mu\text{m}$ de espesor) y encierra cientos de bradizoítos con forma de media luna, cada uno de aproximadamente $7 \times 1,5 \mu\text{m}$ en tamaño. Es argirófila y ligeramente PAS positiva. Está compuesta de materiales de la célula hospedera y del parásito. Por último, el quiste tisular está revestido por un material granular, el cual también ocupa el espacio entre los bradizoítos. Algunos bradizoítos degeneran, especialmente en los quistes tisulares más viejos (Dubey *et al.*, 1998).

La estructura del bradizoíto difiere levemente de la del taquizoíto. Los bradizoítos son más delgados, tienen un núcleo posterior y son menos susceptibles a la destrucción por enzimas proteolíticas (Dubey, 2004). Los quistes tisulares, soportan sin problemas temperaturas de 45°C y la acidez gástrica (Gómez, 2004).

2.1.1.2.3. Los ooquistes

Los ooquistes sin esporular son subesféricos a esféricos y miden de 10 a $12 \mu\text{m}$ de diámetro. La pared consta de dos láminas, los gránulos polares están ausentes y el esporonte ocupa casi todo el ooquiste. Los ooquistes esporulados son subesféricos a elipsoidales y miden de 11 a $13 \mu\text{m}$ de diámetro. Cada ooquiste esporulado contiene dos esporoquistes elipsoidales con residuo y sin cuerpo de Stieda, los cuales miden aproximadamente de 6 a $8 \mu\text{m}$. Cada esporoquiste contiene 4 esporozoítos. Ultraestructuralmente, la pared ooquistica de los ooquistes esporulados consiste de 3 láminas: una lámina externa electrodensa, una lámina media electrolúcida y una lámina interna moderadamente electrodensa (Dubey *et al.*, 1998).

Los ooquistes son sensibles al yodo y al formol pero son resistentes a la mayor parte de los desinfectantes y al jugo gástrico. Son inactivados con temperaturas superiores a los 66°C en menos de 10 minutos (Gómez, 2004).

2.1.1.3. CICLO BIOLÓGICO

El ciclo biológico de *T. gondii* comprende la Fase Enteroepitelial, que se da en el hospedero definitivo; y la Fase Extraintestinal, que se da en los hospederos

intermediarios. Una tercera fase ocurre entre las antes mencionadas, la Fase Esporogónica, y tiene lugar en el medio ambiente. Los hospederos definitivos son el gato doméstico (Dubey *et al.*, 1970) y algunos felinos silvestres (Jewell *et al.*, 1972), mientras que los hospederos intermediarios son todos los animales de sangre caliente, incluyendo al hombre y al propio gato.

Existen tres estadios infecciosos del parásito: el taquizoíto (la forma de división rápida) en los tejidos, el bradizoíto (la forma de división lenta) en quistes tisulares, y los esporozoítos en ooquistes esporulados. La pared del quiste tisular o del ooquiste es disuelta durante la digestión en el hospedero intermediario, liberando bradizoítos o esporozoítos, los cuales ingresan en la lámina propia del intestino delgado y comienzan a multiplicarse como taquizoítos. Los macrófagos sirven luego como vehículos para la diseminación hematogena de los taquizoítos hacia los tejidos extraintestinales pocas horas después de la infección (Kravetz y Federman, 2005). Pueden ingresar prácticamente a cualquier célula y multiplicarse, la célula hospedera eventualmente se rompe y los taquizoítos liberados ingresan a nuevas células. A medida que se desarrolla la resistencia del hospedero, aproximadamente tres semanas después de la infección, los taquizoítos comienzan a desaparecer de los tejidos viscerales, transformándose en bradizoítos dentro de quistes tisulares. Estos quistes son más frecuentes en el músculo esquelético, cerebro y miocardio, por lo general no causan reacción en el hospedero y pueden persistir de por vida (Martínez-Fernández *et al.*, 1998). El cerebro constituye un refugio especial de los quistes, debido al hecho de que está protegido de los anticuerpos por la barrera hematoencefálica, carece de un sistema linfático y presenta niveles muy bajos de expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) (Martín y García, 2003).

En los felinos, luego de la ingestión de quistes tisulares u ooquistes, los bradizoítos y esporozoítos se multiplican dentro de las células epiteliales del intestino delgado. Luego de numerosos ciclos de reproducción asexual, inician el ciclo sexual o gametogonia, que resulta en la formación de ooquistes sin esporular. Los ooquistes son excretados con las heces y esporulan en el medio ambiente en 1 a 5 días bajo condiciones ideales de temperatura y humedad, aunque esto podría llegar a tardar varias semanas. Luego de la esporulación, el ooquiste contiene 2 esporoquistes, cada uno

conteniendo 4 esporozoítos (Dubey, 2004). Los gatos usualmente eliminan los ooquistes una sola vez en su vida (luego de la primoinfección), durante 1 a 2 semanas. El período prepatente oscila entre 3 y 21 días, siendo mucho más corto cuando la infección es por quistes tisulares (3 – 15 días) que cuando es por ooquistes (+ de 18 días)(Varela, 2001).

2.1.2. EPIDEMIOLOGÍA

2.1.2.1. PARÁSITO

Los gatos inmunocompetentes eliminan ooquistes una vez en su vida, durante 1 a 3 semanas. Sin embargo una sola deyección, después de ingerir apenas unos pocos bradizoítos, puede contener cantidades superiores a los 100,000 de ooquistes por gramo de heces, lo cual hace de este estadio infectivo el eslabón más importante en la cadena epidemiológica del *T. gondii* (Rojas, 2003).

Los ooquistes esporulados sobreviven por largos períodos bajo condiciones ambientales moderadas, pudiendo sobrevivir en suelo húmedo por varios meses e incluso años. Igualmente pueden sobrevivir por largos periodos de tiempo en las frutas y verduras (Kniel *et al.*, 2002).

La variedad y resistencia de los estadios infectantes, la capacidad de localizarse en diversos órganos, células, tejidos y líquidos orgánicos y la escasa especificidad al hospedero son también características epidemiológicas importantes de *T. gondii* (Schwartzman, 2001).

2.1.2.2. HOSPEDERO

Los hospederos definitivos de *T. gondii* son los felinos. En América, los hospederos definitivos reportados son el gato doméstico (*Felis catus*), el jaguarundi (*Herpailurus jaguarundi*), el ocelote (*Leopardus pardalis*), y el león de la montaña (*Puma concolor*) (Jewell *et al.*, 1972; Aramini *et al.*, 1998). Los hospederos intermediarios son unas 200 especies de vertebrados, desde primates hasta insectívoros, marsupiales y aves, incluyendo al felino y al hombre (Barriga, 2002).

Los canes son considerados como animales de alta susceptibilidad para *T. gondii*, probablemente por sus hábitos alimenticios y por el contacto cercano con suelos contaminados con ooquistes esporulados (Cabral *et al.*, 1998; García *et al.*, 1999). Frenkel *et al.* en 2003 resaltaron la importancia del hábito de los canes de olfatear heces de gato, ya que esto convierte su piel en una posible fuente de infección para el humano. Por otro lado, se ha demostrado que la infección es más frecuente en canes inmunosuprimidos infectados con el virus del distemper canino (Campbell *et al.*, 1955). En el mismo sentido Ahmed *et al.* en 1983 encontraron que los títulos más altos parecían estar asociados a enfermedades concomitantes o a eventos de estrés.

Estudios serológicos en diversas especies animales han demostrado que la prevalencia de toxoplasmosis se incrementa con la edad, principalmente porque las poblaciones adultas tienen un mayor tiempo de exposición a *T. gondii* y porque una vez producidos, los anticuerpos IgG permanecen de por vida en el organismo (Brito *et al.*, 2002; Barbosa *et al.*, 2003). En canes parece no haber diferencias estadísticamente significativas para las variables raza, sexo, tipo de alimento y hábitos de matar ratones (Ali *et al.*, 2003).

2.1.2.3. MEDIO AMBIENTE

El *T. gondii* es más común en ambientes cálidos y húmedos. Una temperatura media de 20°C y una humedad relativa de 65% son necesarias para la esporulación de ooquistes (Lindsay *et al.*, 1997).

Los ooquistes en el suelo pueden ser diseminados mecánicamente por pulgas, cucarachas, escarabajos de estiércol y gusanos de tierra (Kniel *et al.*, 2002). Igualmente los canes pueden actuar como vectores mecánicos de *T. gondii*, ya que los ooquistes esporulados e ingeridos, eventualmente atraviesan el tracto intestinal canino sin sufrir cambios y son excretados en las heces en el mismo estado infeccioso (Lindsay *et al.*, 1997).

La tasa de infección de la población canina es un indicador de la contaminación ambiental por *T. gondii* (Ali *et al.*, 2003), y del consecuente riesgo para la población humana, ya que humanos y canes están expuestos a similares fuentes de infección, representadas por el ambiente y los hábitos alimenticios (De Souza *et al.*, 2003).

2.1.2.4. TRANSMISIÓN

2.1.2.4.1. TRANSMISIÓN VERTICAL

En 1923, Jankü describió por primera vez quistes tisulares de *T. gondii* en la retina de un infante de 11 meses de edad con hidrocefalia y microftalmia congénita. Esto fue luego reconocido como el primer caso de toxoplasmosis congénita en humanos (Tenter *et al.*, 2000). Más tarde, también fue descrita en muchas especies animales, particularmente en ovejas, cabras y roedores (Dubey, 2007).

La toxoplasmosis congénita se desarrolla a partir del pasaje transplacentario de taquizoítos al feto (Kravetz y Federman, 2005). El período de gestación, la competencia inmunológica de la madre durante la parasitemia, la carga parasitaria y la cepa de *T. gondii* involucrada, constituyen los principales factores de riesgo (Dalgıç, 2008) . Sin embargo, la toxoplasmosis congénita ocurre con más frecuencia cuando el animal gestante es infectado por primera vez y suele ser evitada en los sujetos crónicamente infectados gracias a una adecuada respuesta inmune (Roberts *et al.*, 1994). La continua multiplicación de los taquizoítos en la placenta y en el feto probablemente ocurran por una supresión local de la inmunidad materna y por la inmadurez del sistema inmune fetal (Ahmed *et al.*, 2008).

En ratones y cabras, la transmisión congénita ocurre incluso en infecciones crónicas y pueden repetirse por varias generaciones (Dubey y Shen, 1991). Aunque en la especie canina son pocos los casos de toxoplasmosis congénita, *T. gondii* debe ser considerado dentro del diagnóstico diferencial cuando ocurre muerte de cachorros de una misma camada (Alves y De Lima, 2004). Bresciani *et al.* en 2009, observaron que de 22 crías nacidas de una madre canina infectada, 18 de ellas tenían anticuerpos anti *T.*

gondii antes de ingerir el calostro. Este hecho demuestra que la transferencia placentaria de anticuerpos en canes es posible.

2.1.2.4.2. TRANSMISIÓN HORIZONTAL

Carnívoros y omnívoros, incluyendo al hombre pueden adquirir la infección al ingerir carne cruda o mal cocida conteniendo quistes tisulares. El número y localización de los quistes tisulares depende de la especie del hospedero intermediario parasitado. Los quistes tisulares de *T. gondii* son comunes en tejidos de cerdos, ovejas y cabras; menos frecuentes en aves de corral, conejos, canes y caballos; y raramente son hallados en carne de vaca o búfalo (Tenter *et al.*, 2000). Se estima que el 72% de la carne de cordero, el 28% de la carne de cerdo, el 9% de la carne de caballo y el 4% de la carne de vaca, normalmente comercializada, contiene quistes tisulares viables de *T. gondii* (Gómez, 2004).

Los hospederos intermediarios también pueden adquirir la infección al ingerir ooquistes esporulados en el agua o el alimento, inhalarlos en aerosoles, o entrar en contacto con suelo contaminado. Han sido hallados taquizoítos en leche de varios hospederos intermediarios, incluyendo ovejas, cabras y vacas, aunque la toxoplasmosis aguda en humanos sólo ha sido asociada con el consumo de leche de cabra sin pasteurizar. También ha sido reportada la infección a partir de transfusiones de derivados hematológicos provenientes de pacientes en fase de diseminación hematógona, sin embargo el riesgo de infección por esta vía es escaso y restringido a los humanos y a los animales de compañía. Otros fluidos corporales como la saliva, el esputo, la orina, las lágrimas y el semen, pueden albergar taquizoítos, aunque la transmisión horizontal por estas vías no ha sido demostrada (Tenter *et al.*, 2000).

En años recientes, se ha observado en humanos que el trasplante de corazón, riñón, hígado y médula ósea puede complicarse por infecciones de *T. gondii*, ya sea porque los órganos provienen de pacientes asintomáticos que albergan formas latentes del parásito o porque el receptor estaba previamente infectado y el tratamiento inmunosupresor administrado para evitar el rechazo del trasplante provocaba una recidiva de la infección (Pereira y Pérez, 2002). Además, los humanos pueden adquirir

la infección durante actividades como la caza deportiva. Los quistes tisulares en carne de animales salvajes como liebres, jabalís, venados, canguros y osos, son una fuente potencial de infección. Los cazadores y sus familias pueden adquirir la infección durante la evisceración (Tenter *et al.*, 2000).

2.1.3. PATOLOGÍA

2.1.3.1. PATOGENIE

Por vía digestiva los taquizoítos tienen escasa capacidad para vencer la barrera gástrica; no así los ooquistes esporulados o los quistes tisulares. Los esporozoítos y los bradizoítos son puestos en libertad por la digestión, pasan la barrera de la mucosa y pueden penetrar en cualquier célula. Se rompen las células albergantes y los taquizoítos se propagan por la vía linfática y hemática invadiendo diversos tejidos y órganos, sobre todo al músculo esquelético, miocardio, cerebro, retina y placenta (Martínez-Fernández *et al.*, 1998).

El *T. gondii* puede parasitar cualquier tipo de célula nucleada, siendo fagocitado o penetrándola activamente, formando luego la vacuola parasitófora. La secreción de lípidos especiales de las roptrias impide la actuación del sistema endocítico celular, facilitando así la multiplicación por endogemación múltiple y la formación de nuevos taquizoítos en un proceso vertiginoso que coincide con la fase aguda de la infección. Como consecuencia de la destrucción celular se producen lesiones tisulares con áreas focales de necrosis rodeadas de linfocitos, monocitos y células plasmáticas. El tejido destruido es sustituido por fibrosis, o por gliosis en el caso del sistema nervioso (Martínez-Fernández *et al.*, 1998).

La duración de la fase aguda depende de factores intrínsecos como la cepa de *T. gondii* involucrada, y de factores extrínsecos como la capacidad de respuesta del hospedero. Si el hospedero es inmunocompetente *T. gondii* expresará el gen que transforma los taquizoítos en bradizoítos, los cuales poseen un metabolismo diferente y evaden la respuesta inmunológica desatada refugiándose en las porciones viscerales más alejadas de la acción de los macrófagos activados. Luego comienzan a dividirse

lentamente, por endodiogenia, ocasionando los quistes tisulares con pared argirófila propia. Instaurándose así la fase crónica. En estados de inmunosupresión, los bradizoítos de los quistes tisulares se liberan y revierten a taquizoítos (Martínez-Fernández *et al.*, 1998).

Ante un sistema inmunológico íntegro, la rotura de los quistes tisulares no hace más que activar el sistema Th1 dependiente, con destrucción de los taquizoítos mediante macrófagos activados. En sentido contrario, el equilibrio de la infección crónica puede romperse cuando el sistema inmunitario del hospedero decae. Los quistes tisulares se rompen y provocan focos de toxoplasmosis aguda, con destrucción tisular, en el cerebro particularmente, lo que puede ser fatal. Además de la encefalitis, pueden aparecer, por el mismo mecanismo, otras patologías tales como neumonitis, retinocoroiditis y miocarditis (Martínez-Fernández *et al.*, 1998).

2.1.3.2. SIGNOS CLÍNICOS

La mayoría de las infecciones en animales son asintomáticas. La toxoplasmosis clínica es más común en ovejas y cabras, en las cuales se describe reabsorción embrionaria, momificación fetal, aborto y muerte neonatal. Ocasionalmente se reportan casos en otras especies animales, principalmente en individuos jóvenes o inmunocomprometidos, es así que la toxoplasmosis fatal puede ocurrir en canes inmunosuprimidos debido a una infección concurrente con el virus del distemper canino (Dubey, 2004).

En canes, los signos clínicos de la toxoplasmosis son variables y dependen de la edad, de la presencia de infecciones concomitantes, de la severidad de la infección y de los órganos afectados. En los neonatos, la toxoplasmosis generalmente ocurre bajo la forma hiperaguda, diseminada y fatal. En canes jóvenes, los signos clínicos más frecuentes son gastrointestinales, respiratorios y neuromusculares, aunque también puede ocurrir una infección generalizada, la cual cursa con fiebre intermitente, disnea, diarrea y vómito. La forma neuromuscular es caracterizada por radiculomielitis y miositis, que llevan a paresia y a parálisis progresiva, a veces con compromiso del sistema nervioso central. Los signos neurológicos varían de acuerdo a la localización de

las lesiones: convulsiones y letargia indican lesiones en el cerebro; ataxia, temblor e inestabilidad indican lesión cerebelar; parálisis de los miembros se asocia a lesión medular; y atrofia muscular, claudicación y mialgia son indicativas de miositis (Alves y De Lima, 2004).

En canes adultos los signos clínicos son variables, siendo los más comunes: anorexia, letargia, fiebre, disnea por neumonía intersticial, signos de alteraciones laboratoriales asociadas a hepatitis, hiperestesia debido a la miositis y diversos signos neurológicos cuando existe compromiso del sistema nervioso central (Alves y De Lima, 2004).

2.1.3.3. LESIONES

En virtud de la multiplicación intracelular excesiva durante la fase inicial de la infección, *T. gondii* causa un efecto citopatológico directo, caracterizado por necrosis. Las lesiones macroscópicas más frecuentes son áreas de necrosis en cerebro, pulmón, músculo esquelético, hígado y nódulos linfáticos mesentéricos. Sin embargo, también pueden ser observadas en el páncreas, bazo y riñones. Igualmente se han descrito úlceras en el estómago e intestino (Alves y De Lima, 2004). Las lesiones oculares son generalmente precoces ya que se ha demostrado que aparecen al término de la tercera semana post inoculación. En el examen directo del ojo se observó áreas de hiperreflexividad. Alteraciones como papiledema, exudado peripapilar y disminución de la pigmentación del tapetum fueron observados con retinografía. Retinitis, uveítis anterior, iridociclitis, hiperplasia del epitelio ciliar, queratoconjuntivitis, microftalmia, microcórnea, estrabismo, nistagmo y neuritis del nervio óptico también han sido vistas (Fahnehjelm *et al.*, 2000; Bonini *et al.*, 2002; Swinger *et al.*, 2009)

Las alteraciones histopatológicas en el pulmón son características de una neumonía intersticial y van desde un exudado fibrinoso asociado a necrosis de la pared alveolar, bronquial y vascular, hasta un engrosamiento de la pared alveolar con infiltración de linfocitos, plasmocitos y células gigantes. La alteración predominante en el músculo es la necrosis que envuelve la miofibra, los vasos sanguíneos y el tejido conjuntivo, que dependiendo del estadio de la infección, puede estar asociado a grados

variables de fibrosis, ya que las áreas de necrosis son reparadas por la proliferación de tejido conjuntivo fibroso. Los músculos afectados se presentan pálidos y flácidos (Alves y De Lima, 2004). Las lesiones neurológicas son caracterizadas por meningoencefalitis asociada a vasculitis, necrosis y gliosis, con un eventual compromiso de los nervios periféricos. Además de infiltrados multifocales leptomenígeos de macrófagos, células plasmáticas, linfocitos y algunos neutrófilos que han sido observados (Dubey y Lappin, 1998).

2.1.4. INMUNOLOGÍA

La infección aguda con *T. gondii* activa una cascada de respuestas inmunes protectoras. El parásito provoca a nivel del intestino la producción de anticuerpos de tipo IgA, que constituye más del 80% del total de anticuerpos en mucosa y es un importante modulador de protección e indicador de infección (Martín y García, 2003). Si el parásito evade la respuesta inmune de la mucosa intestinal, se activan las respuesta inmune humoral y celular.

Sobre el control de la replicación del parásito durante la toxoplasmosis crónica, se han formulado dos hipótesis. De acuerdo a la primera, la respuesta inmune del hospedero induce la transformación de los taquizoítos en bradizoítos y es crucial en el mantenimiento de *T. gondii* en el estado de desarrollo tardío. La segunda hipótesis sugiere que la respuesta inmune controla la replicación de los taquizoítos, pero no ejerce efecto sobre los bradizoítos, de manera que los parásitos son continuamente liberados de los quistes tisulares provocando una amplificación constante del sistema inmune (Martín y García, 2003).

2.1.4.1. RESPUESTA INMUNE HUMORAL

Durante la respuesta inmune humoral, *T. gondii* induce rápidamente niveles detectables de anticuerpos de tipo IgM e IgG en el suero. Las evoluciones más frecuentes (>90 % de los casos) involucran: una rápida elevación de los títulos de IgM, que desaparecen después de varios meses; títulos de IgG ascendentes durante 2 ó 3 meses, que pueden superar los 1000 UI/mL; o títulos de IgG persistentes durante 6 a 12 meses,

para luego disminuir lentamente. Excepcionalmente pueden haber respuestas inmunológicas mayores y más prolongadas con títulos de IgG superiores a 1000 UI/mL durante años, acompañados o no de IgM. En respuestas inmunológicas mínimas, observadas frecuentemente cuando se aplica un tratamiento precoz, los títulos de IgM son variables, con un ascenso lento y de débil amplitud de los niveles de IgG, hasta un máximo de 100 UI/mL. Para considerar como primoinfección a las respuestas inmunológicas sin aparición de IgM se toma en cuenta la aparición y aumento de los títulos de IgG durante dos o tres meses (Martín y García, 2003).

Se ha demostrado experimentalmente que la depleción de las células B mediante la administración de anti- μ anticuerpos en ratones infectados con *T. gondii* produce mortalidad asociada con neumonía, miocarditis y/o encefalitis. Esto sugiere que la producción de anticuerpos por las células B puede ser importante para controlar la infección. De manera similar se observó que un grupo de ratones deficientes en células B fueron más susceptibles a la infección por *T. gondii* en comparación con el grupo control (Frenkel y Taylor, 1982; Kang *et al.*, 2000).

2.1.4.2. RESPUESTA INMUNE CELULAR

Los anticuerpos juegan un rol importante en la resistencia contra *T. gondii*, pero en la actualidad se acepta que la inmunidad mediada por células juega el rol principal. El desarrollo de una fuerte respuesta inmune celular es esencial para minimizar los niveles de replicación parasitaria y daño tisular. En la ausencia de esta respuesta, la continua citólisis de células infectadas puede conducir a severas patologías. Esto es mejor ilustrado en individuos con defectos en la función de células T, en los que hay un gran riesgo de desarrollar toxoplasmosis clínica debido a una replicación descontrolada del protozooario (Shapira *et al.*, 2004).

El inicio de la inmunidad protectora depende de la producción innata de citoquinas, las cuales modulan la movilización y activación de varias células inmunes. Este proceso depende de la capacidad de las células T en proliferar y diferenciarse en células efectoras, así como para generar células de memoria parásito-específicas de larga vida, requeridas para prevenir la reactivación de esta infección persistente.

Mientras que la IL-12 juega un papel primordial en el desarrollo de una inmunidad celular fuerte y efectiva, la IL-10 parece modular la síntesis, tanto de la IL-12 como la de IFN- γ , evitando una respuesta inmune excesiva que podría causar inflamación extensiva y daño en los tejidos hospederos. La IL-7 y la IL-15 también parecen ser importantes durante la infección aguda, regulando la producción de IFN- γ . Las citoquinas como el IFN- γ y el TNF- α , activadores de la función de los macrófagos, son importantes en el control de la replicación de los taquizoítos durante las fases aguda y crónica de la infección (Martín y García, 2003).

Las células T CD4+ y CD8+ son importantes para limitar la infección crónica del SNC. Las células CD4+ son necesarias para la protección a largo plazo mientras que en la infección aguda, las más importantes son las células CD8+. Han sido descritas células CD8+ y CD4+ con función citolítica y otras productoras de IFN- γ (Roberts *et al.*, 2007). Los antígenos parasitarios responsables de la inducción de las células CD8+ no han sido descritos totalmente, aunque el principal antígeno de membrana, el SAG-1, ha sido reportado como el responsable de la fuerte respuesta inmune de las células CD8+ en ratones inmunizados. Este antígeno es capaz de inducir altos niveles de IFN- γ y células CD8+ citotóxicas, directamente dañinas para las formas extracelulares del parásito (Khan *et al.*, 1991).

Además, otras líneas celulares como plaquetas (Yong *et al.*, 1991), células NK (Subauste *et al.*, 1992), leucocitos polimorfonucleares y mastocitos (Bliss *et al.*, 2001; Del Río *et al.*, 2001), también han demostrado tener actividad microbicida e intervenir en la respuesta inmune contra *T. gondii*.

2.1.5. DIAGNÓSTICO

2.1.5.1. CLÍNICO

El diagnóstico clínico de la toxoplasmosis es difícil de establecer ya que los signos clínicos son diversos, inespecíficos y en muchos casos están ausentes. Si bien la presencia de signos clínicos neuromusculares nos puede dar algún indicio o sospecha de

la enfermedad, es necesario reforzar el diagnóstico con ensayos serológicos o con la demostración del propio parásito.

2.1.5.2. COPROLOGÍA

Los ooquistes son detectados en heces de gatos infectados utilizando métodos de concentración (como la flotación en solución sobresaturada de azúcar), ya que pueden haber muy pocos ooquistes como para ser detectados en un frotis directo. Para lograr una identificación definitiva de los ooquistes de *T. gondii* es necesario diferenciarlos de los ooquistes de otros coccidios emparentados, haciéndolos esporular e inoculándolos en ratones (Dubey, 2004).

Está demostrado que en cualquier tiempo dado, sólo el 1% de gatos estará eliminando ooquistes de *T. gondii*, razón por la cual la detección de éstos en las heces felinas resulta poco valioso para propósitos epidemiológicos (Dubey, 2004).

2.1.5.3. SEROLOGÍA

La serología es bastante empleada en el diagnóstico de la toxoplasmosis. No obstante, las pruebas serológicas presentan algunos inconvenientes como su insuficiente estandarización, dificultades de interpretación, y el escaso resultado que proporcionan en infecciones latentes (Martín y García, 2003).

T. gondii es un protozooario complejo con distintos estadios de vida, cada uno con expresión de antígenos estadio-específicos (Kasper, 1989). El antígeno más inmunodominante es el antígeno de superficie taquizoíta-específico SAG1 (previamente conocido como P30), el cual comprende más del 5% del total de la proteína del taquizoíta (Burg *et al.*, 1988). Es considerado el antígeno de primera elección para ser utilizado en los tests diagnósticos, debido a su inmunodominancia y a la poca reacción cruzada que tiene con antígenos de otros microorganismos (Petersen y Liesenfeld, 2007). Otros antígenos de superficie (SAG2, SAG3 y SAG4) han sido identificados, siendo SAG2 y SAG3 taquizoíta-específicos y SAG4 bradizoíta-específico (Cesbron-Delauw *et al.*, 1994; Odberg-Ferragut *et al.*, 1996). Igualmente, otros dos grupos de antígenos han sido estudiados para su uso en pruebas diagnósticas: los antígenos de

gránulos densos GRA's, en particular GRA1, GRA6 y GRA7 (Lecordier *et al.*, 2000; Fischer *et al.*, 1998) y los antígenos del micronema MIC's (Garcia-Règuet *et al.*, 2000; Lourenco *et al.*, 2001). Los antígenos bradizoíto específicos (BAG1) y de la matrix (MAG1) podrían en teoría ser importantes, pero aún no se han utilizado en ensayos diagnósticos (Bohne *et al.*, 1993; Holec *et al.*, 2007). Por otro lado, existen diferentes cepas de *T. gondii* con diferentes antígenos específicos para cada una de ellas (Ware y Kasper, 1987). Sin embargo, los antígenos de superficie son comunes para todas las cepas (Navarro *et al.*, 1998).

Después de la infección, aparecen en primer lugar anticuerpos específicos contra las proteínas de la membrana del parásito y posteriormente contra los constituyentes citoplasmáticos del mismo. Las primeras inmunoglobulinas son de tipo IgM e IgA que alcanzan el nivel máximo en 3 ó 4 semanas, desapareciendo normalmente a los 3 ó 4 meses. No obstante, tanto la IgM como la IgA pueden permanecer durante largo tiempo, incluso años, por lo que la detección individual de cada uno de estos anticuerpos no puede ser utilizada como único marcador de infección aguda, aunque sirve como importante apoyo en el diagnóstico. Los anticuerpos de tipo IgG alcanzan su nivel máximo hacia el tercer mes, disminuyendo lentamente hasta alcanzar un nivel que permanece en sangre durante toda la vida (Martínez-Fernández *et al.*, 1998).

2.1.5.3.1. Dye Test

De las técnicas desarrolladas para el diagnóstico serológico, se sigue considerando como técnica de referencia la establecida por Sabin y Feldman en 1948, el *Dye Test*, por su sensibilidad y especificidad, pero dada la dificultad, el elevado costo y el riesgo de trabajar con el parásito vivo, solo se realiza en centros especializados.

La técnica se fundamenta en la afinidad del parásito por el azul de metileno en relación a la presencia del complemento. Si hay anticuerpos presentes en la muestra, el parásito se hace permeable para el azul de metileno y es coloreado en presencia del complemento; en cambio, si los anticuerpos no están presentes, el parásito permanece sin teñirse (Petersen y Liesenfeld, 2007). La lectura se hace con el microscopio de

contraste de fase, y el umbral de positividad normalmente admitido es de 2 UI/mL (Martín y García, 2003).

2.1.5.3.2. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Es un método simple, introducido en la década de los 60's y ampliamente utilizado en la actualidad. Es relativamente económico y se encuentran disponibles kits comerciales. Sin embargo, el método requiere de un microscopio de fluorescencia y de una persona capacitada en la lectura de las láminas para reducir al mínimo la subjetividad de los resultados. Ocasionalmente puede resultar difícil encontrar conjugados específicos de algunas especies animales (Buxton y Maley, 2004).

Los anticuerpos presentes en la muestra de suero se fijan sobre el parásito inactivado de la lámina portaobjetos, esta unión se pone de manifiesto mediante el uso de anti inmunoglobulinas marcadas con isocianato de fluoresceína. La lectura se realiza con el microscopio de fluorescencia, en una habitación oscura y puede facilitarse mediante el uso de una tinción de contraste con el Azul de Evans (Martín y García, 2003; Buxton y Maley, 2004). Comparada con el *Dye Test*, la Inmunofluorescencia Indirecta ha demostrado ser específica pero poco sensible, aunque la curva de evolución de la IgG es muy similar para ambas pruebas (Martínez-Fernández *et al.*, 1998).

2.1.5.3.3. Enzimoimmunoensayo (ELISA)

La técnica de ELISA es simple, tiene alta especificidad y sensibilidad, permite ensayar un gran número de muestras y no existe riesgo durante su ejecución. Además se dispone comercialmente de conjugados, sustratos y kits completos de diferentes laboratorios, aunque requiere de un espectrofotómetro para la lectura de los resultados. Permite la detección de anticuerpos en medios complejos, para lo cual se utilizan tres principios técnicos: la inmunocompetencia, el método indirecto y la inmunocaptura (Buxton y Maley, 2004).

Actualmente se considera de gran interés la técnica de ELISA de avidez de IgG, que mide la fuerza de la unión antígeno-anticuerpo, diferenciándose de esta forma los anticuerpos de baja avidez producidos en la fase temprana de la infección, de los de alta avidez propios de la fase tardía. La avidez o afinidad de una reacción antígeno-anticuerpo se mide por el grado de disociación de dicha unión. Generalmente a los 4 meses post infección los anticuerpos IgG presentan alta avidez, aunque en algunos casos se han mantenido de baja avidez hasta por 11 meses o más (Martínez-Fernández *et al.*, 1998).

2.1.5.3.4. Hemaglutinación Indirecta (HAI)

Es una técnica simple y de fácil lectura. Permite evaluar varias muestras a la vez y los kits comerciales tienen precios bastante accesibles. Glóbulos rojos previamente estabilizados y sensibilizados se ponen en contacto con la muestra a analizar y la presencia de anticuerpos se traduce por un fenómeno de hemaglutinación. El tratamiento de los sueros seropositivos con 2-mercapto-etanol permite diferenciar las infecciones agudas de las crónicas al distinguir la IgG tras la supresión de la actividad aglutinante de la IgM (Martín y García, 2003).

2.1.5.3.5. Otras pruebas serológicas

Existen otras pruebas serológicas menos utilizadas en el diagnóstico rutinario de la toxoplasmosis. Así tenemos: la difusión en gel, la contraelectroforesis, el radioinmunoensayo, el fluoroinmunoensayo, la aglutinación en látex, la inmunodifusión en agar y la radioprecipitación. Estas pruebas se realizan con mayor frecuencia para casos especiales como la toxoplasmosis ocular o para el diagnóstico en pacientes inmunosuprimidos.

2.1.5.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Actualmente se están desarrollando técnicas de biología molecular para la detección del genoma de *T. gondii*. La más interesante es la reacción en cadena de la

polimerasa (PCR), la cual se basa en la amplificación de secuencias específicas del gen B1, el gen que codifica el antígeno de superficie p30, el TGR 1E o el rARN 18S, para detectar la presencia del parásito en diversas muestras de tejidos y fluidos corporales (Fuentes *et al.*, 1996).

Esta técnica ofrece un diagnóstico rápido con una enorme sensibilidad y especificidad, aunque está en estudio su valoración ya que el resultado depende de la existencia del parásito en la porción de muestra procesada y hay que extremar las medidas de control para evitar el riesgo de posibles contaminaciones (falsos positivos) y detectar la presencia de inhibidores (falsos negativos) (Martínez-Fernández *et al.*, 1998).

2.1.5.5. AISLAMIENTO

El aislamiento de *T. gondii* en cultivos celulares o en animales de experimentación supone un diagnóstico específico, pero la sensibilidad varía mucho según las condiciones de la muestra (estado de conservación, carga parasitaria, virulencia de la cepa implicada). Los resultados en los cultivos celulares son más rápidos que en animales de experimentación, aunque en éstos últimos se ha observado una mayor sensibilidad. La prueba sólo se puede realizar en laboratorios de referencia dada su complejidad (Martínez-Fernández *et al.*, 1998). Para que los resultados sean óptimos las muestras deben mantenerse frescas, libres de contaminación y no deben congelarse en ningún momento puesto que el parásito moriría (Buxton y Maley, 2004).

2.1.6. TRATAMIENTO

Las drogas disponibles usualmente suprimen la replicación pero no son completamente efectivas matando al parásito. La clindamicina es la droga de elección para el tratamiento de la toxoplasmosis en caninos y felinos, aunque a dosis mayores que las utilizadas para tratar infecciones por anaerobios. Debido a la buena absorción intestinal, la dosis oral y parenteral son similares. Los signos clínicos de enfermedad sistémica usualmente comienzan a mejorar dentro de las 24 a 48 horas después del inicio de la terapia. Mejora el apetito, desaparece la hiperestesia, y la fiebre usualmente

remite. Los déficits de la neurona motora inferior y la atrofia muscular pueden tomar semanas para resolver en animales con polimiositis. Igualmente esta droga ha sido efectiva en cruzar la barrera hematoencefálica en animales y humanos infectados, aunque los signos pueden no remitir totalmente debido al daño permanente causado por la inflamación del SNC (Dubey y Lappin, 1998).

En caninos y felinos la clindamicina oral puede causar anorexia, vómitos, diarrea e incluso colitis ulcerativa, especialmente a altas dosis (Dubey, 1999). Estos efectos colaterales se detienen tan pronto la dosis es reducida o la terapia es discontinuada y parecen estar relacionados a una irritación gastrointestinal local, ya que no son observados con la terapia parenteral a dosis similares. También ha sido documentado en humanos tratados con clindamicina el sobrecrecimiento de *Clostridium difficile*, mas no en caninos y felinos (Dubey y Lappin, 1998).

La combinación de sulfonamidas de rápida acción (como la sulfadiazina, sulfametazina, sulfamerazina, y sulfas triples) con la pirimetamina también es útil en la terapia contra la toxoplasmosis. Estas drogas actúan sinérgicamente bloqueando el camino metabólico del ácido p-amino benzoico y del ácido fólico-folínico respectivamente, por lo que se recomienda adicionar ácido fólico o folinato de calcio al tratamiento (Dubey, 1999). Se estima que la sulfadiazina multiplica por 6 la acción antiparasitaria de la pirimetamina, la cual tiene mayor eficacia que el trimetoprim cuando es usada en combinación con sulfas. El trimetoprim-sulfonamida cruza bien la barrera hematoencefálica, aunque ha sido reportado un caso en el que esta combinación resultó ser inefectiva en el tratamiento de un canino con severa uveítis y neuritis óptica.

Antibióticos como la doxiciclina, la minociclina, la azitromicina y la claritromicina, han mostrado ser efectivos *in vivo* e *in vitro* contra *T. gondii* en ratones y humanos, y pueden ser utilizados cuando aparecen los efectos colaterales con la clindamicina (Morris y Kelly, 1992). Otras nuevas drogas, como el trimetrexato y piritrexim, que son antifolatos; roxitromicin, un macrólido; atovaquone, una hidroxinaphtoquinona; arprinocid, un análogo de la purina; y derivados del trioxano, también han sido efectivas en el tratamiento de la toxoplasmosis experimental en

ratones, pero no están disponibles para su uso clínico en caninos y felinos (Dubey y Lappin, 1998).

2.1.7. PREVENCIÓN Y CONTROL

La toxoplasmosis canina mantiene una estrecha relación con la toxoplasmosis humana, posiblemente porque el canino es sometido a hábitos alimenticios semejantes a los del hombre, hábitos que a su vez varían de una población humana a otra (Tenter *et al.*, 2000). El consumo de carne cruda o mal cocida ha sido identificada como el principal factor de riesgo de infección, aunque esto no explica los altos porcentajes de seropositividad en algunas poblaciones de humanos vegetarianos y animales herbívoros, en los cuales se presume que la infección se daría por ooquistes. El *T. gondii* en carne muere por exposición al frío o al calor extremo, siendo recomendable que antes de ser ingerida, la temperatura interior de ésta alcance los 67°C en cocción ó los -20°C en congelación (Pereira y Pérez, 2002). Las mascotas del hogar deben ser alimentadas con alimento balanceado comercial, y se debe evitar en ellos ciertos hábitos como la coprofagia, geofagia o pica.

Se debe evitar el consumo de leche sin pasteurizar, en especial la leche de cabra, la cual ha sido asociada a brotes de toxoplasmosis en el hombre; y promover costumbres básicas de higiene sobre el lavado riguroso de frutas, verduras y de todo el material utilizado en la preparación de alimentos (Tenter *et al.*, 2000). Además ha sido propuesta la detección de ooquistes en agua y suelo para la elaboración de programas dirigidos a reducir la contaminación de aguas urbanas, recreacionales o de irrigación (Dumètre y Dardé, 2003).

La convivencia con gatos, también es considerada un factor de riesgo importante debido a la eliminación de ooquistes (Alves y De Lima, 2004). La evaluación coprológica en estos animales ha demostrado ser de poco valor, por lo que la evaluación serológica es recomendable. Si el animal resulta seropositivo, el peligro de eliminación de ooquistes es mínimo (no nulo), sin embargo si el animal es seronegativo significa que aún no ha sido expuesto a *T. gondii* y que puede infectarse y eliminar ooquistes en cualquier momento. Independientemente del estado serológico del felino, se debe

limpiar y desinfectar su caja de deposiciones diariamente y usando guantes (Pereira y Pérez, 2002).

La vacunación de ovejas con una cepa atenuada de *T. gondii* reduce la muerte neonatal en corderos y ésta vacuna se encuentra disponible comercialmente (Dubey, 2007). En la actualidad no existe una vacuna apropiada para uso humano. Las líneas de investigación sobre este tema están dirigidas principalmente a las proteínas implicadas en el proceso de unión con la célula hospedera (Gómez, 2004).

2.2. NEOSPOROSIS CANINA

El *Neospora caninum* es un protozoario que afecta a canes y otras especies animales. Aunque el parásito ha sido reconocido recientemente, la neosporosis no es una enfermedad nueva, ya que en estudios retrospectivos *N. caninum* fue hallado en canes que murieron en 1957 y 1958 (Dubey *et al.*, 1990).

La neosporosis canina cursa con signos clínicos neuromusculares, cuyas formas más severas afectan principalmente a los cachorros congénitamente infectados. La enfermedad fue descrita por primera vez en 1984 en 3 pariciones sucesivas de una hembra canina bóxer en Noruega (Bjerkas *et al.*, 1984). Seis de siete cachorros desarrollaron debilidad del tren posterior y ataxia entre los 2 y 6 meses de edad. Posteriormente debido a su pobre condición fueron eutanasiados y examinados en la necropsia. Ninguno de los cachorros presentó anticuerpos anti - *T. gondii* en suero. Además los quistes tisulares observados en los cerebros tenían pared gruesa, haciéndolos distintos de los descritos para *T. gondii* (Lindsay *et al.*, 1999c).

El 1988, investigadores de Estados Unidos describieron en 10 canes un parásito protozoario que causaba un rango de signos clínicos similares a los observados para *T. gondii*, y bautizaron a dicho organismo como *Neospora caninum*. El parásito noruego fue más tarde confirmado como *N. caninum* (Dubey *et al.*, 1988).

2.2.1. ETIOLOGÍA

2.2.1.1. TAXONOMÍA

El *Neospora caninum* se incluye dentro del Phylum Apicomplexa, clase Sporozoea, subclase Coccidia, orden Eucoccidida, suborden Eimeriina y familia Sarcocystidae, junto con los géneros *Toxoplasma*, *Sarcocystis*, *Hammondia* y *Besnoitia* (Ellis *et al.*, 1994). Cabe destacar cuatro especies estrechamente relacionadas: *N. caninum*, *T. gondii*, *H. hammondi* y *H. heydorni*, cuyos ooquistes tienen un tamaño similar. Sin embargo, estas especies presentan importantes diferencias tanto biológicas

como estructurales, que justifican la existencia del género *Neospora* (Dubey *et al.*, 2002a; Dubey *et al.*, 2002b).

Desde el punto de vista biológico, son notables las diferencias en cuanto a la composición antigénica, el ciclo biológico y las manifestaciones clínicas de la infección. Por otra parte, el canino es el hospedero definitivo de *N. caninum* y *H. heydorni*, mientras que el gato es el hospedero definitivo de *T. gondii* y *H. hammondi*. En cuanto a las manifestaciones clínicas, la parálisis del tren posterior en los animales congénitamente infectados por *N. caninum*, es un signo que no se ha observado en animales en los que se ha diagnosticado una infección por *T. gondii*, y hasta el momento se desconoce la relevancia clínica de *H. hammondi* y *H. heydorni* (Dubey *et al.*, 2002a). También destacan las diferencias ultraestructurales entre los ooquistes, quistes tisulares y taquizoítos de estas especies (Lindsay *et al.*, 1999a; Speer *et al.*, 1999).

2.2.1.2. MORFOLOGÍA

2.2.1.2.1. El taquizoíto

Los taquizoítos tienen un tamaño que oscila entre 3 – 7 μm de longitud x 1 – 5 μm de anchura, y una forma ovoide, globular o lunar, dependiendo de la etapa de división en la que se encuentren. Ultraestructuralmente los taquizoítos derivados de cultivo celular son idénticos a los observados *in vivo*. Ambos poseen una película integrada por un plasmalema y una membrana interna, un complejo apical formado por 22 microtúbulos subpeliculares, dos anillos apicales, un conoide y un anillo polar; organelas secretoras, micronemas, 8 – 24 roptrias, gránulos densos, mitocondrias, núcleo, nucleolo, aparato de Golgi, ribosomas, polisomas, gránulos de amilopectina, cuerpos lipídicos, vesículas, retículo endoplásmico liso y rugoso, y un poro posterior (Speer y Dubey, 1989).

2.2.1.2.2. El quiste tisular

Los quistes tisulares miden aproximadamente 100 μm de diámetro, tienen forma redondeada u oval y pueden contener en su interior hasta 200 bradizoítos. La pared

quistica, con más de 4 μm de espesor, está formada por dos membranas: la externa, una única membrana electro densa, y la interna de mayor grosor, granular y con estructuras tubulares. Los bradizoítos miden aproximadamente 6 –8 μm de longitud x 1 – 1,8 μm de anchura y contienen las mismas organelas que los taquizoítos, aunque en los bradizoítos el número de roptrias es menor y tienen más gránulos de amilopectina (Speer y Dubey, 1989).

2.2.1.2.3. Los Ooquistes

Los ooquistes de *N. caninum* son morfológicamente similares a los de *T. gondii* y *H. heydorni*, tienen forma esférica o sub-esférica y su tamaño medio es de 11,7 μm de longitud x 11,3 μm de anchura. La pared del ooquiste es lisa, de 0,6 – 0,8 μm de espesor y no contiene micrópilo. En su interior se encuentran dos esporoquistes elipsoidales (8,4 μm de longitud x 6,1 μm de anchura), cuya pared tiene un grosor de 0,6 – 0,8 μm , no presentando cuerpo de Stieda. A su vez, en el interior de cada esporoquiste se encuentran 4 esporozoítos de forma alargada (6,5 μm de longitud x 2,0 μm de anchura) y el cuerpo residual esporoquistico (Lindsay *et al.*, 1999a).

2.2.1.3. CICLO BIOLÓGICO

El ciclo biológico de *N. caninum* involucra la participación de dos hospederos. Los canes y recientemente los coyotes, son descritos como hospederos definitivos (McAllister *et al.*, 1998; Lindsay *et al.*, 1999b; Gondim *et al.*, 2004a). Como hospederos intermediarios son descritos las vacas, las cabras, los caballos y los ciervos, aunque también se han detectado anticuerpos en suero de búfalos, coyotes, zorros y camellos naturalmente infectados y es sugerido que estas especies son también hospederos intermediarios naturales. Además de definitivo, el canino puede actuar también como un hospedero intermediario (Georgieva *et al.*, 2006).

El ciclo de vida de *N. caninum* comprende tres estadios infecciosos: taquizoítos, bradizoítos (en quistes tisulares) y esporozoítos (en ooquistes esporulados). Los taquizoítos y los quistes tisulares son estadios detectados en hospederos intermediarios. Ambas formas son intracelulares y están localizadas en el citoplasma de la célula

hospedera, con o sin vacuola parasitófora. En hospederos intermediarios infectados, los taquizoítos son hallados en células nerviosas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales vasculares, miocitos, células epiteliales, células tubulares renales y hepatocitos. Los quistes tisulares son detectados en el cerebro, medula espinal y retina de hospederos intermediarios. Los ooquistes son eliminados con las heces de los hospederos definitivos. Ellos esporulan en el medio ambiente y se vuelven infectivos para los hospederos intermediarios (Dubey, 1992).

Los hospederos definitivos, son infectados al ingerir membranas fetales, placentas, órganos de fetos abortados o musculatura de hospederos intermediarios conteniendo taquizoítos o quistes tisulares. Una reproducción sexual toma lugar en el intestino canino y consecuentemente ooquistes no esporulados son eliminados de 5 a 17 días después de la infección con quistes tisulares. Los ooquistes esporulan en el medio ambiente, volviéndose infectivos. Ya esporulados contienen 2 esporoquistes, cada uno con 4 esporozoítos en su interior (Georgieva *et al.*, 2006). Los canes que han ingerido tejidos vacunos infectados pueden llegar a eliminar hasta 160,700 ooquistes, siendo necesarios apenas 300 ooquistes para lograr la infección experimental en las vacas (Gondim *et al.*, 2002).

Los hospederos intermediarios pueden ser infectados vía alimento o agua contaminada con ooquistes esporulados. Los esporozoítos son liberados dentro de los intestinos, ingresan en la lámina propia y se multiplican como taquizoítos para luego diseminarse vía linfa y sangre a todo el organismo. En células nerviosas, cuando una respuesta inmune fuerte contra el protozooario está presente, los taquizoítos pueden transformarse en bradizoítos (replicación lenta). Alrededor del bradizoíto, quistes tisulares son formados y ellos permanecen en un estado de latencia. En estados inmunosupresivos del hospedero intermediario, los bradizoítos pueden ser reactivados (Georgieva *et al.*, 2006).

2.2.2. EPIDEMIOLOGÍA

2.2.2.1. PARÁSITO

El ooquiste es el estadio más importante en la epidemiología de la neosporosis, aunque se sabe poco acerca de la biología del mismo. En la actualidad existen reportes de eliminación de ooquistes a partir de canes naturalmente infectados en Argentina (Basso *et al.*, 2001), República Checa (Slapeta *et al.*, 2002), Gran Bretaña (McGarry *et al.*, 2003), Brasil (Paiva *et al.*, 2005), Alemania (Schaes *et al.*, 2005) y Portugal (Basso *et al.*, 2009).

Si no logran penetrar en la célula hospedera, los taquizoítos dejan de ser infectivos en pocas horas luego de haber sido inoculados en cultivos celulares. En los quistes, los bradizoítos conservan su capacidad infectante durante periodos de tiempo prolongados (al menos un año en cerebro de ratones con infección experimental) y son resistentes a la acción del HCl y la pepsina. Los quistes tisulares pueden sobrevivir hasta 14 días a 4° C. Sin embargo los bradizoítos conservados en tejido nervioso a -20° C mueren transcurridas 24 horas (Álvarez, 2003).

Son relativamente numerosos los aislados de *N. caninum* reportados hasta el momento. Éstos aislados difieren básicamente a nivel molecular y las variables utilizadas para clasificarlos son: localización geográfica, especie origen de la muestra (canina y bovina fundamentalmente), grado de desarrollo animal (feto, joven o adulto) y el tipo de muestra (SNC en la mayoría de los casos). Se han descrito diferencias biológicas, antigénicas y genéticas entre los diferentes aislados. En los canes por ejemplo, se han descrito hasta 14 aislados de *N. caninum*, siendo el NC - 1 el más patógeno (Pérez, 2004).

Los antígenos de *Neospora caninum* tienen origen diverso: superficie, gránulos densos, roptrias y micronemas (Álvarez, 2003). Aunque únicamente se han identificado antígenos del taquizoíto o compartidos por el taquizoíto y el bradizoíto pues la identificación de antígenos específicos de la fase de bradizoíto no ha sido todavía posible (Collantes, 2003).

2.2.2.2. HOSPEDERO

El *N. caninum* causa infección natural en caninos y bovinos, aunque también ha sido descrito en equinos, felinos, pequeños rumiantes y animales silvestres, siendo posible la infección experimental en ratones, ratas y gerbos (Woods *et al.*, 1994; Alves y De Lima, 2004, Yu *et al.*, 2009). Se ha demostrado que los coyotes también pueden actuar como hospederos definitivos (Gondim *et al.*, 2004a). Se ha descrito la presencia de anticuerpos anti-*Neospora caninum* en el humano aunque sin enfermedad clínica (Lobato *et al.*, 2006).

En los escasos estudios existentes, *N. caninum* ha mostrado ser más patógeno para el ratón que para otras especies animales (Dubey *et al.*, 2007). Aparentemente los canes eliminan más ooquistes después de ingerir tejidos bovinos que después de alimentarse con tejidos murinos, siendo los jóvenes los que eliminan más ooquistes que los adultos (Dubey, 2007). La neosporosis clínica es reportada con mayor frecuencia en camadas de 3 – 6 semanas (Dubey y Lappin, 1998), sin embargo los casos confirmados han ocurrido en canes tan jóvenes como de 2 días de edad y tan viejos como de 15 años (Barber, 1998).

Se presume que cualquier raza puede ser afectada con la infección, y ha sido confirmada en más de 30 razas, incluyendo al Yorkshire terrier, Cavalier spaniel, West highland white terrier, Border collie, Springer spaniel, Husky siberiano, Gran danés, Boyero de Berna, Labrador retriever, Golden retriever, Greyhound, Basset hound, Boxer y Lebrél irlandés (Georgieva *et al.*, 2006; Barber, 1998). Además, es poco lo que se sabe sobre el efecto de la raza en la eliminación de los ooquistes (Dubey, 2007).

Igualmente la neosporosis se puede presentar en canes de ambos sexos y procedentes de áreas urbanas o rurales. Otras enfermedades concurrentes como el virus del distemper canino no son comunes en la neosporosis canina, aunque la inmunosupresión (natural o iatrogénica) puede exacerbar la enfermedad (Barber, 1998).

2.2.2.3. MEDIO AMBIENTE

Climas templados y húmedos (los rangos de temperatura y humedad óptimos para *Neospora caninum* aún no han sido definidos) favorecen la esporulación y supervivencia de los ooquistes, lo cual puede incrementar el riesgo de infección post natal (Dubey *et al.*, 2007). Diversos factores como la altitud y climas fríos y poco húmedos dificultan la supervivencia del ooquiste infeccioso (Casas *et al.*, 2006).

2.2.2.4. TRANSMISIÓN

Las vías naturales de infección no están completamente esclarecidas aunque experimentalmente *N. caninum* tiene capacidad infectante si es inoculado por vía subcutánea, intramuscular, intraperitoneal u oral (Alves y De Lima, 2004).

2.2.2.4.1. TRANSMISIÓN VERTICAL

La neosporosis canina congénita ha sido reproducida experimentalmente vía inoculación subcutánea e intramuscular de taquizoítos de cultivos celulares (Georgieva *et al.*, 2006). Jacobson y Jardine postularon en 1993 que las hembras caninas con infección subclínica pueden transmitir la neosporosis a sus camadas, comprometiendo hasta el 70% de sus cachorros. Sin embargo, estudios más recientes concluyeron que la tasa de transmisión vertical en canes es baja, ya que el 80% de los cachorros de hembras seropositivas no están infectados al nacimiento (Barber y Trees, 1998).

La frecuencia de transmisión vertical de la infección por *N. caninum* naturalmente adquirida en canes es variable pero demasiado baja para sustentar la infección por sí sola. La infección post natal debe ocurrir para mantener la infección en los porcentajes de seroprevalencia reportados en poblaciones caninas (Barber y Trees, 1998).

Sucesivas camadas de una misma hembra subclínicamente infectada pueden nacer infectadas, y la mayoría de esos cachorros, aunque no todos, tienen manifestaciones clínicas. Otros cachorros pueden llevar la infección de manera

subclínica reactivándose posteriormente con enfermedades inmunosupresivas, administración de vacunas MLV (virus vivo modificado) o administración de glucocorticoides.

2.2.2.4.2. TRANSMISIÓN HORIZONTAL

Se ha demostrado la transmisión horizontal de *N. caninum* entre animales salvajes y domésticos, específicamente entre el ciervo de cola blanca y el canino doméstico, y entre la vaca y el coyote (Gondim *et al.*, 2004b). Los canes pueden actuar como hospederos intermediarios al consumir alimento o agua de bebida contaminados con ooquistes esporulados de *N. caninum* (Dubey, 2003).

La infección post natal en los canes puede ocurrir por ingestión de tejidos de bovinos infectados (fetos abortados, placentas y restos de animales muertos), calostro o leche de origen bovino contaminados con taquizoítos de *N. caninum* (Dijkstra *et al.*, 2002; Moskwa *et al.*, 2007). La presencia de ooquistes en heces de canes naturalmente infectados se ha referido en contadas ocasiones (Basso *et al.*, 2001; Slapeta *et al.*, 2002; McGarry *et al.*, 2003; Paiva *et al.*, 2005; Schares *et al.*, 2005; Basso *et al.*, 2009) y apenas se conoce la frecuencia de eliminación. Sin embargo, se ha propuesto que la eliminación de ooquistes luego de la ingestión de placentas infectadas es mayor que luego de la ingestión de fetos abortados o de calostro contaminado con taquizoítos (Collantes, 2003).

2.2.3. PATOLOGÍA

2.2.3.1. PATOGENIE

El *N. caninum* es altamente patogénico para vacas y canes, aunque también puede inducir a enfermedad en ovejas, cabras, caballos y ciervos (Georgieva *et al.*, 2006). Causa muerte celular por la multiplicación activa de los taquizoítos y es capaz de producir lesiones necróticas sumamente visibles en pocos días. En contraste con la toxoplasmosis, la cual a menudo es asociada con enfermedades inmunosupresoras

primarias como el virus del distemper, parece que *N. caninum* es un patógeno primario ya que ningún otro agente etiológico ha sido identificado en la neosporosis canina fatal.

En canes, *N. caninum* puede producir severa enfermedad neuromuscular. Puede destruir una variedad de células neuronales incluyendo aquellas de los nervios craneales y espinales, y la presencia de gran número de organismos puede alterar la conductividad de las células afectadas. La causa de la hiperextensión de los miembros posteriores no es conocida con certeza, pero se cree que responde a la combinación de parálisis de la neurona motora superior con miositis, resultando en una contractura fibrosa progresiva de los músculos y fijación de las articulaciones (Barber, 1998).

Los quistes tisulares a menudo no originan reacción inmunológica del hospedero, y no se sabe cuánto tiempo pueden permanecer en el sistema nervioso central, aunque en ratones infectados experimentalmente, ellos permanecen viables al menos por 1 año. La formación de granulomas alrededor de los quistes tisulares degenerados y bradizoítos sugiere que ciertos quistes tisulares se rompen. La carga parasitaria y la cepa involucrada influirán en la severidad de las infecciones resultantes. (Lindsay *et al.*, 1999c)

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

2.2.3.2. SIGNOS CLÍNICOS

Los cachorros congénitamente infectados a menudo no manifiestan ningún signo clínico de enfermedad, sin embargo cuando los presentan, suelen ser casos severos de neosporosis canina que cursan con signos neurológicos como ataxia, reflejo patelar disminuido o pérdida de orientación (Georgieva *et al.*, 2006). Se puede observar paresia de los miembros posteriores la cual puede evolucionar a una parálisis progresiva e hiperextensión rígida. Esta hiperextensión en algunos casos llega a ser tan marcada que

el miembro no puede ser flexionado incluso bajo anestesia. Los animales con parálisis del tren posterior pueden estar alertas y sobrevivir por meses. La paresia del tren posterior puede ser unilateral o bilateral, y la parálisis puede ser flácida o espástica. También se ha descrito la mialgia, la cual es común en los músculos cuádriceps y lumbares (Barber, 1998), aunque también son mencionados los músculos abdominales, gastrónemio, masetero y diafragma (Dubey *et al.*, 2005).

Otras disfunciones que suelen ocurrir incluyen dificultad para tragar, parálisis de la mandíbula, flacidez muscular, atrofia muscular e incluso miocarditis, dermatitis y neumonía (Lindsay *et al.*, 1999c; Romero, 2005). Fiebre, inapetencia e incontinencia urinaria y fecal, son raras pero pueden desarrollarse conforme avanza la enfermedad. Pancreatitis, hepatitis y adenitis pueden ocurrir siempre que los taquizoítos hayan causado necrosis en dichos órganos, resultando en vómitos y polidipsia como complicaciones de los casos neuromusculares. También han sido reportadas algunas alteraciones oculares tales como reflejo pupilar lento, anisocoria, estrabismo, ptosis y nistagmo (Barber, 1998).

2.2.3.3. LESIONES

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

Microscópicamente, los taquizoítos pueden ser encontrados aislados o aglomerados en todos los tejidos. Una infiltración focal de células mononucleares rodeando un área central de necrosis es la lesión característica de neosporosis en el SNC (Barber, 1998; Stenlund, 2000; Alves y De Lima, 2004). La paresia, signo clínico comúnmente reportado, discurre con poliradiculitis, meningoencefalitis y polimiositis. En el SNC, ocurre meningoencefalitis multifocal no supurativa, con focos de necrosis

en la sustancia gris (asociados a infiltrado peri vascular y gliosis) y de forma menos evidente necrosis de la sustancia blanca. Es común la presencia de quistes con o sin reacción local (Alves y De Lima, 2004). Casos de dermatitis nodular, polimiositis y encefalitis multifocal son descritas en canes con edades entre los 18 meses y los 6 años (Georgieva *et al.*, 2006).

2.2.4. INMUNOLOGÍA

Debido a la cercanía filogenética entre *N. caninum* y *T. gondii*, y a la similitud observada entre algunas de sus moléculas, se ha iniciado el uso de una denominación común para ambos parásitos. *T. gondii* posee una familia de al menos 8 antígenos denominados SAG (antígenos superficiales) y SRS (secuencias relacionadas a SAG1). *N. caninum* expresa antígenos inmunodominantes semejantes a ellos (Echaide, 2000).

El SAG1 de *N. caninum*, NcSAG1, es una proteína de 29/36 kDa, localizada sólo en la superficie de los taquizoítos, y estaría involucrada en la adherencia pre-invasión. Otra proteína, NcSRS2 de 35/43 kDa, se ubica en la superficie de bradizoítos y taquizoítos, y tendría una función similar. Si bien las proteínas de estos parásitos muestran secuencias bien conservadas, localización, y probablemente función similar, éstas son antigénicamente diferentes (no hay reacción cruzada entre epítomos) (Echaide, 2000).

Existe también un segundo grupo de proteínas localizadas en los gránulos densos de ambos géneros denominadas GRA, y parecen estar relacionadas al funcionamiento de la vacuola parasitófora (VP). La VP se forma durante la invasión y es derivada del parásito y de la célula hospedera. Para *N. caninum* se han identificado NcGRA7 (33kDa) y NcGRA6 (37kDa), ambas asociadas a la membrana de la VP y a la red vacuolar. Además, en los gránulos densos también se aisló una potente hidrolasa (NTPasa) que posee su homóloga en los gránulos densos de *T. gondii*. Su función aún no ha sido determinada (Echaide, 2000; Moore, 2005).

Se desconoce si el tipo de respuesta inmune generada por la ingestión de ooquistes es similar a la observada con la inoculación de taquizoítos, aunque existe

evidencia de variación antigénica entre estadios de taquizoítos y bradizoítos (Moore *et al.*, 2005). Se ha demostrado que *N. caninum* induce a respuesta inmune humoral y celular en los animales infectados. La presencia de anticuerpos probablemente no asegura el control de la infección, lo cual parece depender más de los mecanismos inmunes mediadas por células (Stenlund, 2000).

En la actualidad el ratón es el modelo animal más utilizado para el estudio de la respuesta inmune producida por *N. caninum*. En ese sentido, el desarrollo de modelos murinos con inmunodeficiencias selectivas de origen genético ha sido de gran ayuda en el estudio de la inmunidad celular frente a la infección (Collantes, 2003).

2.2.4.1. RESPUESTA INMUNE HUMORAL

Las infecciones naturales y experimentales de animales logradas a partir de taquizoítos u ooquistes de *N. caninum* han permitido la caracterización de la inmunidad mediada por anticuerpos. En el caso de infecciones experimentales en ratones destaca la producción de IgG1 e IgG2a. Una respuesta de tipo Th2 asociada a la producción de altos niveles de IgG1, que a su vez esta estimulada por la IL-4, se ha relacionado con una mayor susceptibilidad y agravamiento de la infección. Por el contrario la producción de IgG2a, dirigida principalmente por la IL-12 y el IFN- γ , es característica de una respuesta inmune de tipo Th1 y tiene un papel crucial en las fases iniciales de la infección interviniendo en la eliminación del parásito. Se ha postulado que el desarrollo de anticuerpos específicos probablemente limita la parasitemia o facilita la lisis de los taquizoítos extracelulares (Moore *et al.*, 2005).

Ratones deficientes de células B, y por lo tanto sin la capacidad de sintetizar anticuerpos, murieron presentando lesiones de encefalitis necrotizante multifocal cuando fueron inoculados con *N. caninum*. Diferentes estudios realizados en ratones han descrito que luego de la infección, los anticuerpos predominantes son del isotipo IgG2 siendo bajos o nulos los niveles de IgG1. Se observó un aumento de mortalidad en ratones con elevada proporción IgG1:IgG2 (Álvarez, 2003; Collantes, 2003; Moore *et al.*, 2005).

2.2.4.2. RESPUESTA INMUNE CELULAR

Los mecanismos dependientes de la inmunidad mediada por células son relevantes para controlar un parásito intracelular obligado como *N. caninum*, especialmente por su habilidad para evadir la respuesta inmune (Moore *et al.*, 2005).

En ratones, la infección provoca la estimulación de la respuesta celular con la producción de IFN- γ . Los macrófagos, las células NK y las células dendríticas responden tras la infección, liberando citoquinas como la IL-12, IL-10, IL-4, el IFN- γ y el TNF- α , que junto con los linfocitos CD4+ y CD8+ intervienen en la regulación del balance de la respuesta celular Th1/Th2. Este balance es crucial en la respuesta protectora desarrollada frente al parásito. El IFN- γ y la IL-12, responsables de una respuesta de tipo Th1, tienen efecto sinérgico y están implicados en el control de la neosporosis aguda. Su depleción origina un aumento de la susceptibilidad de los ratones a la infección. Por otro lado, la IL-4 está relacionada con una respuesta de tipo Th2 y con el progreso de la enfermedad, razón por la cual una posible estrategia para disminuir la transmisión congénita es neutralizar la producción de IL-4, favoreciendo de esta forma la producción de IFN- γ e IL-12 (Álvarez, 2003).

Ambas poblaciones de linfocitos T, CD4+ y CD8+, juegan un papel importante en la prevención de la infección en las fases más avanzadas. Las células T CD8+ son parcialmente responsables de la protección frente a *N. caninum*, a diferencia de la infección por *T. gondii* donde las células T CD8+ juegan un papel esencial en la protección (Álvarez, 2003).

Deben considerarse dos mecanismos en función de la fase de la infección. En una fase temprana destaca la participación de IFN- γ producido por las células T activadas como primera línea de defensa, destruyendo a los parásitos intracelulares y aumentando así la resistencia a la infección. En fases más avanzadas de la infección las células CD4+ jugarían un papel más importante que el IFN- γ . Al principio de la interacción, las células CD4+ (activadas por el IFN- γ) originan una respuesta inmune de tipo Th1, activando a su vez a las células CD4 citotóxicas que se encargan de destruir

las células infectadas con el parásito. Las células CD4+ también serían responsables de la disminución de la tasa de mortalidad, ya que además intervienen en la producción de altos niveles de anticuerpos (Álvarez, 2003).

2.2.5. DIAGNÓSTICO

2.2.5.1. CLÍNICO

En los primeros años *N. caninum* era diagnosticado mediante la interpretación de los signos clínicos e histopatología, que describía lesiones en el SNC, músculos y otros órganos afectados. Esta forma de diagnóstico tenía el problema de que era con frecuencia erróneamente diagnosticado como *T. gondii* debido a las similitudes estructurales (Romero, 2005).

La interpretación de los signos clínicos representa un medio diagnóstico presuntivo que se debe reforzar mediante la serología. No obstante se debe sospechar de neosporosis en canes con paresia del tren posterior y ataxia. De igual manera, una historia de enfermedad neuromuscular neonatal en más de un cachorro o más de una camada de una misma hembra canina, es también sugerente de neosporosis. (Lindsay *et al.*, 1999c; Romero, 2005)

2.2.5.2. COPROLOGÍA

Ooquistes de *N. caninum* nunca han sido observados en canes con una infección sistémica activa. Esto indica que el examen de heces es probablemente de escaso valor para diagnosticar enfermedad debido a una infección por *N. caninum* (Lindsay *et al.*, 1999c).

Además la identificación misma de los ooquistes es dificultosa ya que los canes infectados eliminan ooquistes sin esporular cuyo tamaño y morfología son similares a los de *Hammondia heydorni* (Lindsay *et al.*, 1999a).

2.2.5.3. INMUNOHISTOQUÍMICA

Bjerkas y Presthus utilizaron una técnica inmunohistoquímica cuando reportaron en 1989 el primer caso de infección en canes por un organismo parecido a *T. gondii*. Luego, el primer test inmunohistoquímico específico para detectar *N. caninum* fue un complejo inmunoperoxidasa, desarrollado para detectar al parásito en secciones de tejido alojados en parafina y fijados con formalina. En los años subsecuentes, nuevos tests inmunohistoquímicos fueron desarrollados para hacer un diagnóstico más específico. Además, la inmunohistoquímica ha sido utilizada para validar tests serológicos (Romero, 2005).

La utilización de anticuerpos policlonales en la técnica de inmunohistoquímica puede ocasionar reacción cruzada con *T. gondii*. Se han desarrollado anticuerpos monoclonales pero su utilización para la inmunohistoquímica aún no ha sido evaluada (Moore *et al.*, 2001).

2.2.5.4. SEROLOGÍA

N. caninum induce a la producción de anticuerpos por parte del hospedero. De ahí que un test serológico pueda ser útil para detectar animales infectados. Estos anticuerpos pueden permanecer detectables por varios meses e incluso años, razón por la cual un resultado positivo a anticuerpos, sólo indica exposición al parásito y no necesariamente enfermedad clínica (Stenlund, 2000).

En ensayos serológicos, los títulos y valores de absorbancia son dependientes de la composición del antígeno, anticuerpos secundarios y otros reactivos. Además, los niveles o puntos de corte pueden ser arbitrariamente seleccionados para proveer la sensibilidad y especificidad requerida para una aplicación en particular. La edad y clase de un animal pueden también afectar la selección de un punto de corte (Barber, 1998; Romero, 2005).

Los principales tests serológicos utilizados para diagnosticar neosporosis han sido la inmunofluorescencia indirecta (IFI), el ensayo inmunoabsorbente ligado a

enzimas (ELISA) y el inmunoblot. Sin embargo, IFI y ELISA son los más utilizados ya que son relativamente baratos (Romero, 2005) y han mostrado una alta sensibilidad y especificidad (Pinheiro *et al.*, 2005).

2.2.5.4.1. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

La inmunofluorescencia indirecta fue el primer método diagnóstico desarrollado para suero canino y aún es el más utilizado. En algunos casos se recomienda en combinación con el inmunoblot (IFI + IB) para clasificar un individuo como seropositivo o seronegativo a *Neospora caninum*, ya que no existe una técnica serológica que pueda ser considerada como “*gold standard*” (Ortega *et al.*, 2006).

Una característica importante del IFI es su habilidad para detectar los anticuerpos IgG e IgM producidos por el hospedero en respuesta a la infección por *N. caninum*; aunque en la actualidad, el rol de los títulos de IgM en la demostración de infecciones agudas es aún desconocido. Se ha sugerido que un título de IgG de 1:800 o mayor, es considerado fuertemente sugestivo de neosporosis clínica, esto debido a que todos los casos confirmados de neosporosis que se han reportado han tenido títulos de 1:800 a más; sin embargo, algunos cachorros congénitamente infectados, pueden tener títulos tan bajos como 1:100 (Lindsay *et al.*, 1999c)

La detección de anticuerpos mediante IFI no es indicativo de neosporosis clínica. Sin embargo, se ha propuesto que incluso una dilución sérica de 1:25 demuestra exposición al parásito (Pinheiro *et al.*, 2005). Un pequeño número de reacciones cruzadas entre *N. caninum* y *T. gondii* han sido reportadas en canes naturalmente infectados, aunque estas reacciones cruzadas no se han considerado como un evento importante. Una parte significativa de canes que eliminaron ooquistes luego de una infección experimental no mostraron seroconversión mediante IFI para *N. caninum* (Romero, 2005; Georgieva *et al.*, 2006).

2.2.5.4.2. Enzimoimmunoensayo (ELISA)

El test de ELISA ha sido ampliamente utilizado en el serodiagnóstico de la neosporosis. La facilidad para procesar un gran número de muestras, la obtención de valores de sensibilidad y especificidad superiores a las obtenidas con IFI, y la falta de subjetividad cuando se debe emitir un resultado, han hecho de ella una prueba confiable (Moore *et al.*, 2001).

El punto de corte o el valor de absorbancia asignado a una prueba es motivo de controversia ya que depende de factores tales como composición del antígeno, anticuerpos identificados y de los conjugados utilizados. Un determinado punto de corte debería ajustarse a cada circunstancia o situación epidemiológica. Para optimizar la prueba, algunos autores han descrito que los taquizoítos formolizados preservan los antígenos de membrana e impiden la exposición de antígenos internos, responsables de la reacción cruzada con otros Apicomplexa (Moore *et al.*, 2001).

En animales infectados experimental y naturalmente, la avidéz de la IgG tiende a incrementarse con el curso de la infección, describiéndose un ELISA con inmunoestimuladores e incubación con urea, que permite identificar animales crónica o recientemente infectados sobre la base de esta determinación (Georgieva *et al.*, 2006).

La mayoría de los tests de ELISA desarrollados para el diagnóstico de neosporosis han sido desarrollados para evaluar suero vacuno y no son transferibles o útiles para la evaluación de suero canino (Barber, 1998; Moore *et al.*, 2001).

2.2.5.4.3. Microaglutinación

La microaglutinación es una prueba serológica relevante en el diagnóstico de la neosporosis. No requiere conjugados de difícil adquisición y permite analizar sueros de diferentes especies simultáneamente. Tiene alta repetibilidad entre operarios, es barata, de fácil lectura y utiliza poco equipamiento y materiales (Moore *et al.*, 2001).

Comparándose la técnica de microaglutinación con la de IFI, la sensibilidad y especificidad que se obtuvo fue 100% vs. 98% y 97% vs. 99% respectivamente (Moore *et al.*, 2001).

2.2.5.5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La técnica de PCR ha permitido un gran avance en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas por ser extremadamente sensible y específica (Moore *et al.*, 2001). Fue gracias al PCR que se confirmó la taxonomía de *N. caninum* y su inclusión en la familia Sarcocystidae. También se logró demostrar que *N. caninum* tenía un alto grado de divergencia con respecto a *T. gondii* y otras especies de *Sarcocystis* (Ellis *et al.*, 1994).

Otros estudios confirman la utilidad del PCR como una importante herramienta en el diagnóstico específico y exacto. Igualmente se han desarrollado PCR múltiples para la detección del ADN de *T. gondii* y *N. caninum* en muestras biológicas felinas y caninas de animales con evidencia serológica de toxoplasmosis y neosporosis (Moore *et al.*, 2001; Romero, 2005).

2.2.5.6. AISLAMIENTO

El primer aislamiento de *N. caninum* se logró a partir de material del SNC obtenido de un canino infectado. Posteriormente se reporta en California el primer aislamiento a partir de un feto bovino abortado. En la actualidad se han reportado aislamientos del parásito en California, Suecia, Japón y recientemente, en el Reino Unido, Italia y Portugal. En canes los aislamientos son principalmente de animales con signos clínicos neuromusculares (Moore *et al.*, 2001), y la gran mayoría proviene de muestras de cerebro, aunque también existen aislados provenientes de muestras de heces (Basso *et al.*, 2001; Basso *et al.*, 2009).

N. caninum ha sido cultivada *in vitro* en monocitos bovinos, células endoteliales de arteria cardiopulmonar bovina, células de riñón bovino, fibroblastos humanos, células Vero (células renales de mono verde africano) y otras líneas celulares en donde

solo taquizoítos han sido observados. En esta etapa de su crecimiento *in vitro*, el parásito mantiene la infectividad para los animales. Se han mantenido taquizoítos activos en cultivos celulares durante 8 años sin perder infectividad para ratones (Moore *et al.*, 2001; Collantes, 2003).

El protozooario puede mantenerse *in vivo* mediante la inoculación de meriones, los cuales son altamente susceptibles. Los taquizoítos pueden multiplicarse en las células peritoneales de los meriones y así ser transferidos mediante inóculos sucesivos (Moore *et al.*, 2001; Georgieva *et al.*, 2006).

2.2.5.7. DIAGNÓSTICO POST MORTEM

El diagnóstico post mortem esta basado en la detección de parásitos en lesiones de los canes afectados. Lesiones características de neosporosis, son la necrosis del SNC y del hígado, granulomas de más de 1cm de diámetro en tejidos viscerales, estriaciones blanco amarillentas en los músculos (especialmente en el diafragma), atrofia cerebral y dermatitis ulcerativa (Barber, 1998)

La histopatología utilizando tinciones ordinarias, puede revelar lesiones sugerentes de neosporosis, y los taquizoítos o los quistes tisulares pueden ser vistos, pero para la diferenciación con *T. gondii* y para la confirmación del diagnóstico, ensayos serológicos con antígenos específicos son necesarios (Echaide, 2000).

2.2.6. TRATAMIENTO

De manera general, los canes infectados por *N. caninum* tienen mayor probabilidad de sobrevivir cuando los signos del SNC son menos severos. La desaparición de los signos clínicos suele darse luego de una o dos semanas después de instaurado el tratamiento (Alves y De Lima, 2004). El temprano reconocimiento de la infección e inicio del tratamiento específico son esenciales para un resultado clínico positivo. La muerte puede ser evitada en cachorros con compromiso severo de los miembros posteriores, aunque la función motora de estos usualmente no regresa a la normalidad (Lindsay *et al.*, 1999c).

Las drogas que inhiben la multiplicación de *T. gondii*, también son eficaces contra *N. caninum*. Estas drogas son efectivas contra taquizoítos en cultivos celulares, pero hasta el momento no hay drogas eficaces contra los quistes tisulares. Los tratamientos descritos para la neosporosis consisten de la combinación de trimetoprim, pirimetamina, sulfonamidas y clindamicina. El grado de éxito de estos tratamientos es usualmente bajo, aunque existe un reporte de resolución completa de signos clínicos en un canino adulto con la administración combinada de 1mg/Kg/día de pirimetamina y 20mg/Kg/día de sulfadoxina durante un mes (Alves y De Lima, 2004).

La neosporosis canina neonatal es tratada con clindamicina oral (15 – 22 mg/Kg/12hrs, durante 4 a 8 semanas). La combinación de pirimetamina oral (0.25 – 0.5 mg/Kg) y una sulfonamida oral (preferiblemente sulfadiazina; 30 mg/Kg) cada 12 horas por 2 a 4 semanas es también efectiva. El uso sinérgico de pirimetamina y sulfonamidas eventualmente origina una supresión de la médula ósea, la cual puede ser corregida con la adición de ácido fólico (5mg/día) o levadura (100mg/Kg/día) en la dieta del animal (Dubey y Lappin, 1998). Es importante anotar que no hay tratamiento para prevenir que una hembra canina infectada transmita la infección a sus cachorros (Lindsay *et al.*, 1999c).

2.2.7. PREVENCIÓN Y CONTROL

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

La ruta de infección post natal es probablemente por la ingestión de carne cruda (especialmente carne de vacuno), por lo tanto se recomienda a los propietarios cocinar bien la carne antes de alimentar a sus mascotas o hacerlo a base de alimento balanceado comercial. Al parecer el congelamiento también podría destruir al parásito, aunque se ha reportado un aislamiento exitoso de *N. caninum* después de un congelamiento prolongado a -52°C . Por último, debe evitarse alimentar a los canes de establo con fetos abortados, membranas fetales o terneros muertos (Barber, 1998; Dubey, 2003).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE ESTUDIO

Las muestras fueron obtenidas en la clínica de animales menores de la FMV – UNMSM, durante el período de dos años comprendido entre Agosto del 2006 y Julio del 2008. El procesamiento de las muestras se realizó en el Laboratorio de Parasitología Animal de la FMV – UNMSM.

3.2. OBJETO DE ESTUDIO

Se tomaron muestras de sangre entera de 96 canes “Casos” y de 120 canes “Control”. Se consideró como afección neuromuscular los siguientes signos clínicos:

- Mialgia
- Nistagmo
- Ataxia
- Paresia
- Parálisis
- Convulsiones

Definición de Caso: Canes ≥ 2 meses de edad con dos o mas signos clínicos neuromusculares.

Definición de Control: Canes ≥ 2 meses de edad sin signos o con un solo signo clínico de afección neuromuscular.

3.3. MATERIALES

- Tubos Vacutainer de 10 ml
- Agujas de doble salida N° 21G x 1 ½”
- Viales de 0.5 ml
- Pipetas Pasteur descartables de 2ml
- Micropipetas de 1 – 10ml
- Tips descartables
- Fluido de montaje (glicerina tamponada)

3.4. EQUIPOS

- Centrífuga de 5000 rpm
- Agitador
- Estufa
- Microscopio de Fluorescencia

3.5. REACTIVOS

- Láminas con taquizoítos fijados
- Anti IgG1 canino marcado con fluoresceína – 5 – isotiocianato (FITC)
- Sueros controles positivos y negativos para *T. gondii* y *N. caninum*
- Solución salina tamponada (PBS)
- Buffer carbonato

3.6. TOMA DE MUESTRAS

Las muestras de sangre fueron obtenidas por hemostasia y punción de la vena cefálica, colectadas en tubos vacutainer e identificadas apropiadamente. El suero fue

separado mediante centrifugación y almacenado a -20° C hasta su procesamiento con la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

3.7. DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS

Las muestras fueron analizadas mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta, utilizando un conjugado canino importado del laboratorio VMRD (Pullman, WA – USA). El protocolo utilizado para el diagnóstico de cada parásito fue el siguiente:

- Dilución del suero problema en una proporción de 1:50 con PBS
- Adición de 12 μ L de dilución en cada pocillo de las láminas de inmunofluorescencia con los taquizoítos fijados. Los dos primeros pocillos correspondieron a los sueros controles positivo y negativo.
- Incubación en estufa a 37 $^{\circ}$ C por 30 minutos y en cámara húmeda.
- Dos lavados de 10 minutos cada uno y con leve agitación (El lavado se realiza con PBS para *T. gondii* y con Buffer carbonato para *N. caninum*).
- Secado de la lámina
- Adición de 12 μ L del conjugado anti IgG1 canino en cada pocillo y protegiéndolo de la luz.
- Incubación en la estufa a 37 $^{\circ}$ C por 30 minutos y en cámara húmeda.
- Dos lavados de 10 minutos cada uno y con leve agitación (El lavado se realiza con PBS para *T. gondii* y con Buffer carbonato para *N. caninum*).
- Secado de la lámina
- Adición de fluido de montaje (glicerina tamponada) y colocación de una laminilla cubreobjetos.
- Lectura con microscopio de fluorescencia.

Interpretación: Se determinó la positividad de la muestra al observarse fluorescencia completa del taquizoíto, considerándose negativas aquellas muestras con fluorescencia parcial (apical) o ausente.

3.8. ANÁLISIS DE DATOS

Presencia de Anticuerpos	Afección Neuromuscular	
	CASOS	CONTROLES
Si	a	b
No	c	d

3.8.1. Frecuencia

En los “casos”, se calculó la frecuencia relativa de anticuerpos para cada protozooario haciendo uso de la siguiente fórmula:

$$f = \frac{a}{a + c}$$

En los “controles”, se calculó la frecuencia relativa de anticuerpos para cada protozooario haciendo uso de la siguiente fórmula:

$$f = \frac{b}{b + d}$$

donde:

f : Frecuencia relativa

3.8.2. Intervalo de Confianza

$$IC = z \sqrt{\frac{pq}{n}}$$

donde:

IC : Intervalo de Confianza
z : 1.96 (valor tabular 0.95)
p : Proporción de positivos
q : 1 – p
n : Número de muestras

3.8.3. Asociación

Se evaluó la asociación entre la seropositividad y el estado del animal (afección neuromuscular), mediante el cálculo del Odds Ratio:

$$OR = \frac{axd}{bxc}$$

Considerando sus respectivos intervalos de confianza del 95%, calculados mediante:

$$e^{\ln(OR) \pm Z_{\alpha/2} EE [\ln(OR)]}$$

Interpretación:

1. Si el intervalo de confianza del OR toca el número 1, entonces no existe asociación.
2. Si el intervalo de confianza del OR no toca el número 1 y su límite inferior está por encima de él, entonces además de ser significativo indica que existe una asociación dañina o perjudicial.
3. Si el intervalo de confianza del OR no toca el número 1 y su límite superior está por debajo de él, entonces además de ser significativo indica que existe una asociación beneficiosa, buena o protectora.

IV. RESULTADOS

El presente estudio fue realizado en 96 canes con signos clínicos de afección neuromuscular y en 120 canes que no presentaban tales signos, observándose que en canes con afección neuromuscular la frecuencia de seropositivos a *Toxoplasma gondii* fue de $23.96 \pm 8.5\%$ (23/96), y en canes sin afección neuromuscular fue de $3.34 \pm 3.1\%$ (4/120). Por otro lado se encontró que la frecuencia de seropositivos a *Neospora caninum* en canes con afección neuromuscular fue de $5.21 \pm 4.4\%$ (5/96), y en canes sin afección neuromuscular fue de $1.67 \pm 2.5\%$ (2/120). Los detalles de las frecuencias halladas para ambos agentes parasitarios se presentan en los cuadros 1 y 2.

Al evaluar la asociación entre la “presencia de afección neuromuscular” y la “presencia de anticuerpos anti – *Toxoplasma gondii*” se halló un Odds ratio de 9.14 con intervalo de confianza entre 3.03 y 27.39. Tales valores indican la existencia de una asociación significativa entre ambas variables. Igualmente, al evaluar la asociación entre la “presencia de afección neuromuscular” y la “presencia de anticuerpos anti – *Neospora caninum*” se halló un Odds ratio de 3.24 con intervalo de confianza entre 0.61 y 17.29. Tales valores indican independencia entre ambas variables (no existe asociación).

Adicionalmente se observó que los signos clínicos mas frecuentes en los animales seropositivos a *T. gondii* y a *N. caninum* fueron la mialgia y la ataxia. Los detalles de la distribución de los signos clínicos en los animales seropositivos se presentan en los cuadros 3 y 4.

Cuadro 1 Frecuencia de *T. gondii* en canes domésticos, según la presencia de afección neuromuscular. FMV – UNMSM. 2006 – 2008. Perú.

Afección Neuromuscular	Animales Negativos	Animales Positivos	Frecuencia ± IC (%)
No	116	4	3.34 ± 3.1
Si	73	23	23.96 ± 8.5
TOTAL	189	27	12.5 ± 4.5

Cuadro 2 Frecuencia de *N. caninum* en canes domésticos, según la presencia de afección neuromuscular. FMV – UNMSM. 2006 – 2008. Perú.

Afección Neuromuscular	Animales Negativos	Animales Positivos	Frecuencia ± IC (%)
No	118	2	1.67 ± 2.5
Si	91	5	5.21 ± 4.4
TOTAL	209	7	3.24 ± 2.3

Cuadro 3. Distribución de los signos neurológicos en los animales seropositivos a *Toxoplasma gondii*. 2006 – 2008. FMV – UNMSM. Lima – Perú.

	Muestras																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
A	x	x	x	x			x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	
B	x	x		x		x			x	x	x		x	x	x	x					x		
C	x		x		x	x		x									x		x				x
D							x												x	x			x
E			x						x			x										x	
F					x																		

A: Mialgia B: Ataxia C: Nistagmo
D: Paresia E: Convulsiones F: Parálisis



Foto 1. Vista lateral de un canino de 65 días de edad con mialgia y paraparesia. IFI: *Toxoplasma gondii* positivo (1:50). FMV – UNMSM. Lima – Perú. (Nelson Ruiz, 2008)



Foto 2. Vista frontal de un canino de 65 días de edad con mialgia y paraparesia. IFI: *Toxoplasma gondii* positivo (1:50). FMV – UNMSM. Lima – Perú. (Nelson Ruiz, 2008)

Cuadro 4. Distribución de los signos neurológicos en los animales seropositivos a *Neospora caninum*. 2006 – 2008. FMV – UNMSM. Lima – Perú.

	Muestras				
	1	2	3	4	5
A	x		x	x	
B	x		x		
C		x			x
D					x
E				x	
F		x			

A: Mialgia B: Ataxia C: Nistagmo
D: Paresia E: Convulsiones F: Parálisis



Foto 3. Bóxer macho de 6 años de edad con tetraparesia y nistagmo. IFI: *Neospora caninum* positivo (1:50). FMV – UNMSM. Lima – Perú. (Nelson Ruiz, 2008)



Foto 4. Bóxer macho de 6 años de edad con tetraparesia y nistagmo. IFI: *Neospora caninum* positivo (1:50). FMV – UNMSM. Lima – Perú. (Nelson Ruiz, 2008)

V. DISCUSIÓN

Toxoplasma gondii y *Neospora caninum* son dos protozoarios apicomplexos con ciclos biológicos heteroxenos que tienen una distribución mundial y afectan a una gran variedad de especies animales. En los canes cursan con signos clínicos que comprenden los sistemas gastrointestinal, respiratorio y neuromuscular. El presente estudio aporta los primeros datos acerca de la presencia de estos dos agentes protozoarios en canes con signos clínicos de afección neuromuscular en el Perú.

La prevalencia de infección en canes de diferentes países y usando diferentes pruebas serológicas varía de 0% a 100% para *Toxoplasma gondii* (Alí *et al.*, 2003) y de 0% (Barber *et al.*, 1997) a 100% (Sawada *et al.*, 1998) para *Neospora caninum*; aunque puede resultar inapropiado comparar resultados de estudios que han utilizado pruebas serológicas, puntos de corte, y variables de estratificación diferentes (De Souza *et al.*, 2003).

En el presente estudio se utilizó para el diagnóstico serológico la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), una de las más utilizadas para detectar anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* y anti-*Neospora caninum* en canes (Dubey y Beattie, 1988; Dubey *et al.*, 2007). Ésta prueba brinda resultados comparables a los obtenidos por el Dye Test y se le considera mas segura ya que no utiliza taquizoítos vivos. Gharavi *et al.* reportaron en 2008 para la inmunofluorescencia indirecta una sensibilidad y especificidad para *T. gondii* de 97.3% y 96% respectivamente, y valores predictivos positivos y negativos de 98.6% y 92%. La prueba se puede adaptar para detectar IgG,

IgM o IgA (Dubey y Lappin, 1998). En nuestro estudio se utilizó la inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos IgG ya que el objetivo fue determinar la frecuencia de serorreactores (mas no la frecuencia de infección aguda), en animales con signos clínicos de enfermedad neuromuscular en la FMV – UNMSM.

En cuanto a las diferencias en la presentación de los signos clínicos, éstas se deben principalmente a la localización del parásito en el organismo hospedero. Una gran variedad de autores mencionan a la afección neuromuscular como una característica común entre ambas infecciones protozoarias (Dubey y Lappin, 1998) dada su predilección por los sistemas nervioso y muscular. Dolor muscular (Barber, 1998; Pereira y Pérez, 2002), nistagmo (Barber, 1998; Tarlow *et al.*, 2005), ataxia (Barber, 1998; Dubey y Lappin, 1998), paresia, paraparesia, parálisis (Dubey y Lapin, 1998; Georgieva *et al.*, 2006) y convulsiones (Alves y De Lima, 2004; Tarlow *et al.*, 2005) representan los principales signos clínicos de enfermedad neuromuscular descritos para *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum*, y fueron considerados para nuestro muestreo.

Algunos autores indican que la tasa de infección de la población canina es considerada como un indicador de la contaminación ambiental por *T. gondii* (Ali *et al.*, 2003), y del consecuente riesgo para la población humana, ya que humanos y canes están expuestos a similares fuentes de infección, representadas por el ambiente y los hábitos alimenticios (De Souza *et al.*, 2003).

Es así que, la frecuencia de IgG anti-*Toxoplasma gondii* en canes con signos de afección neuromuscular en el presente estudio fue de 23.96 ± 8.5 (23/96), valor similar a las frecuencias halladas en Brasil y Argentina en canes con similares signos clínicos, con frecuencias de 14.8% (7/47) (Locatelli *et al.*, 2006) y 30.3% (303/1001) (Venturini *et al.*, 2007) en Argentina, y de 32.5% (26/80) (Brito *et al.*, 2002) en Brasil. Sin embargo, no es posible asegurar de que cada caso sea una toxoplasmosis clínica, dada la posibilidad de que los signos neurológicos sean originados por otras infecciones, como el distemper canino (Brito *et al.*, 2002). No obstante, se ha planteado que la magnitud de los títulos de anticuerpos en los canes es indicadora de enfermedad clínica (Locatelli *et al.*, 2006).

Además se encontró que la frecuencia de IgG anti-*Toxoplasma gondii* en canes sin manifestaciones neuromusculares en el presente estudio fue de 3.34 ± 3.1 (4/120) y está por debajo de las frecuencias halladas en otras partes del mundo en canes sin signos clínicos neuromusculares; así tenemos frecuencias de 84.1% (159/189) (García *et al.*, 1999), 63.5% (143/225) (Barbosa *et al.*, 2003), 40.5% (124/306) (Aricapa *et al.*, 2003) y 25.9% (107/413) (Sedlak y Bartova, 2006). Sin embargo, la frecuencia hallada en este trabajo es similar al 6.1% (40/658) hallado por Lin en canes de Taiwán utilizados como mascotas (Lin, 1998).

La baja frecuencia de IgG anti-*Toxoplasma gondii* en canes sin manifestaciones neuromusculares hallada en nuestro estudio probablemente se debe a que la gran mayoría de los canes muestreados son mascotas mantenidas dentro del hogar, con menor probabilidad de tener contacto con roedores y palomas, además de ser alimentadas con concentrado. Esto se corresponde con un estudio realizado en Brasil, en el cual se halló diferencias significativas entre las frecuencias de IgG anti-*Toxoplasma gondii* en canes de regiones urbanas mantenidos dentro del hogar (5.2%) y canes callejeros (31.6%) o de regiones rurales (34.3%) (De Souza *et al.*, 2003).

Por otro lado, la frecuencia de IgG anti-*Neospora caninum* en canes con signos de afección neuromuscular en el presente estudio es de 5.21 ± 4.4 (5/96), y es similar a las frecuencias obtenidas en otros estudios en canes con signos neurológicos, así tenemos el 6.7% (11/163) obtenido por Mineo *et al.* en 2001, el 6.9% (4/58) hallado por Varandas *et al.* en 2001 y el 7% (75/1077) reportado por Cheadle *et al.* en 1999. Sin embargo, nuestra frecuencia es menor que el 17% (8/47) reportado por Locatelli *et al.* en 2006 y que el 25.6% (256/1001) reportado por Venturini *et al.* en 2007.

Así también, la frecuencia de IgG anti-*Neospora caninum* en canes sin manifestaciones neuromusculares en el presente estudio es de 1.67 ± 2.5 (2/120) y es similar a las frecuencias de 7.1% en Japón (Sawada *et al.*, 1998) y de 5.5% en Holanda (Wouda *et al.*, 1999) reportadas en canes mantenidos dentro de casa en zonas urbanas. Las diferencias entre las proporciones de seropositividad entre los canes mantenidos dentro y fuera del hogar se deben a que estos últimos tienen más probabilidades de

contacto con otras especies infectadas, por ejemplo los canes callejeros tienen contacto con felinos, roedores y canidos silvestres, además los canes de establos tienen un estrecho contacto con bovinos (Moore, 2005).

El *Neospora caninum* causa infección natural en caninos y bovinos, y la transmisión horizontal debe ocurrir para mantener la infección en los porcentajes de seroprevalencia reportados en poblaciones caninas (Barber y Trees, 1998). Las bajas frecuencias reportadas en canes de zonas urbanas en comparación con los canes de establos se debe en parte a la mayor probabilidad que tienen estos últimos en ingerir placentas y tejidos de fetos bovinos abortados. No obstante, como se ha descrito en el ciclo biológico, la posibilidad de transmisión horizontal por el consumo de carne cruda o mal cocida o mediante transmisión vertical siempre esta presente. Por otro lado, el ciclo natural para *Toxoplasma gondii* involucra al felino doméstico y a varias especies animales de sangre caliente que pueden vivir normalmente en las ciudades como los canes y el humano. Por lo que la presencia de *Toxoplasma gondii* en regiones urbanas es más probable.

Se ha sugerido en humanos que la terapia antibiótica continua puede suprimir la síntesis de anticuerpos IgG anti *Toxoplasma gondii* (Petersen y Liesenfeld, 2007). Sin embargo, esta dinámica no ha sido reportado en canes, aunque existe la posibilidad de que se dé una situación similar. Escenario que no alteraría los resultados serológicos de canes que han sido muestreados antes de instaurarse el tratamiento, como es el caso del presente estudio. Sin embargo, si afectaría a aquellos protocolos diagnósticos que se basan en exámenes serológicos seriados para la demostración de un infección aguda.

La evaluación de la asociación entre las variables presencia de IgG anti-*Toxoplasma gondii* y afección neuromuscular indica una asociación significativa y dañina entre ambas variables, esto no concuerda con lo reportado por Varandas *et al.* en 2001, quienes no encontraron una correlación significativa entre la serología positiva a los agentes protozoarios y la presencia de neuropatías. Por otro lado, al evaluar la asociación entre la presencia de IgG anti-*Neospora caninum* y afección neuromuscular, el presente estudio no halló asociación.

Otra observación es que los signos clínicos frecuentes en los animales con afección neuromuscular que resultaron positivos a la prueba de inmunofluorescencia indirecta fueron mialgia y ataxia. Podemos presumir que la mialgia se debe principalmente a la multiplicación excesiva de los protozoarios en las células musculares, lo que origina inflamación de la zona afectada con los subsecuentes signos de dolor. Por otro lado, la ataxia se debe principalmente a una lesión a nivel del SNC y es mencionada como signo clínico frecuente en casos de toxoplasmosis y neosporosis canina (Mineo *et al.*, 2001; Brito *et al.*, 2002; Locatelli *et al.*, 2006).

Adicionalmente, es oportuno recordar que este estudio estratificó las muestras específicamente para la variable afección neuromuscular, no considerándose otras variables como edad, sexo o raza. Sin embargo, en los animales seropositivos, se observó en relación a la edad, que el mayor porcentaje fueron canes mayores de un año, en relación al sexo, el mayor porcentaje fueron machos y en relación a la raza, el mayor porcentaje fue de una raza definida. Los detalles de las variables edad, sexo y raza de los animales seropositivos se presentan en los apéndices 1 y 2.

Finalmente, consideramos que los resultados del presente estudio son relevantes para el Clínico Médico Veterinario dedicado a los animales de compañía, dado que deberían ser valorados al momento de solicitar un descarte serológico por inmunofluorescencia indirecta en pacientes con afección neuromuscular.

VI. CONCLUSIONES

1. El 23.96 % \pm 8.5 % (23/96) del total de animales con afección neuromuscular presentaron anticuerpos contra *Toxoplasma gondii*.
2. Se observó asociación estadística significativa entre los reactores a *Toxoplasma gondii* y la variable afección neuromuscular.
3. El 5.21 % \pm 4.4 % (5/96) del total de animales con afección neuromuscular presentaron anticuerpos contra *Neospora caninum*.
4. No se observó asociación estadística significativa entre los reactores a *Neospora caninum* y la variable afección neuromuscular.
5. El 2.08 % \pm 2.8 % (2/96) del total de animales con afección neuromuscular presentaron anticuerpos contra ambos protozoarios.

VII. RECOMENDACIONES

1. Debido a la escasa información acerca de la presencia de *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* en canes de zonas urbanas en el Perú, se recomienda realizar mayor número de estudios al respecto, permitiendo así tener una información más precisa acerca de la influencia de otras variables como la raza, el sexo, la edad, e inclusive la procedencia y el tipo de alimentación.
2. Se recomienda igualmente, considerar al *Toxoplasma gondii* dentro del diagnóstico diferencial para las afecciones neuromusculares.
3. Por último, dado que los signos clínicos respiratorios y gastrointestinales de la toxoplasmosis canina son similares a los de otras enfermedades, se recomienda determinar la frecuencia de anticuerpos anti – *Toxoplasma gondii* en canes con tales signos clínicos.

VIII. BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. **Ahmed BA, Gaafar SM, Weirich WE, Kanitz CL. 1983.** Relationship of *Toxoplasma* infections to other diseases in dogs. *Vet Parasitol* 12 (2): 199 – 203.
2. **Ahmed YF, Sokkar SM, Desouky HM, Soror AH. 2008.** Abortion due to toxoplasmosis in small ruminants. *Global Veterinaria* 2 (6): 337 – 342.
3. **Ali CN, Harris JA, Watkins JD, Adesiyun AA. 2003.** Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in dogs in Trinidad and Tobago. *Vet Parasitol* 113: 179 – 187.
4. **Álvarez G. 2003.** Identificación y caracterización de antígenos de *Neospora caninum* con interés inmunodiagnóstico en bovinos. Memoria presentada para optar al grado de Doctor. Madrid: Univ. Complutense de Madrid. 279p.
5. **Alves T, De Lima R. 2004.** Encephalitis caused by *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs. *Clínica Veterinária* 48: 44 – 52.
6. **Aramini JJ, Stephen C, Dubey JP. 1998.** *Toxoplasma gondii* in Vancouver island cougars (*Felis concolor vancouverensis*): serology and oocyst shedding. *J Parasitol* 84 (2): 438 – 440.

7. **Aricapa HJ, Perez JE, Cardona JM, Piedrahita A. 2003.** Seroprevalencia de toxoplasmosis humana y canina en el municipio de Manizales. *Biosalud* 14: 9 – 17.
8. **Barber JS, Trees AJ. 1996.** Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. *Veterinary Record* 139: 439 – 443.
9. **Barber JS, Glasser RB, Ellis J, Reichel MP, McMillan D, Trees AJ. 1997.** Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. *J Parasitol* 83: 1056 – 1058.
10. **Barber JS. 1998.** Canine neosporosis. *Waltham Focus* Vol 8 N° 1: 25 – 29.
11. **Barber JS, Trees AJ. 1998.** Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *Int J Parasitol* 28: 57 – 64.
12. **Barbosa MVF, Guimaraes JE, Almeida MAO, Gondim LFP, Regis GB. 2003.** Frequency of IgG antibodies against – *Toxoplasma gondii* in sera of stray dogs in the city of Salvador – Bahia, Brazil. *Braz J Vet Res Anim Sci* 40 (6): 457 – 465.
13. **Barriga O. 2002.** Las enfermedades parasitarias de los animales domésticos en la América Latina. 1ª ed. Santiago de Chile: Editorial Germinal. p 189 – 192.
14. **Basso W, Venturini L, Venturini MC, Hill DE, Kwok OCH, Shen SK, Dubey JP. 2001.** First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *J Parasitol* 87 (3): 612 - 618.
15. **Basso W, Herrmann DC, Conraths FJ, Pantchev N, Vrhovec MG, Schares G. 2009.** First isolation of *Neospora caninum* from the faeces of a dog from Portugal. *Vet Parasitol* 159 (2): 162 – 166.

16. **Bjerkas I, Mohn SF, Presthus J. 1984.** Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z Parasitenkd* 70: 271 – 274.
17. **Bjerkas I, Presthus J. 1989.** The neuropathology in toxoplasmosis-like infection caused by a newly recognized cyst-forming sporozoon in dogs. *APMIS* 97 (5): 459 – 468.
18. **Bliss SK, Gavrilesco LC, Alcaraz A, Denkers EY. 2001.** Neutrophil depletion during *Toxoplasma gondii* infection leads to impaired immunity and lethal systemic pathology. *Infect. Immun.* 69 (8): 4898 – 4905.
19. **Bohne W, Heesemann J, Gross U. 1993.** Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated macrophages. *Infect Immun* 61 (3): 1141 – 1145.
20. **Bonini C, Navarro I, Farias AC, Batista MS, Machado R, Marangoni ER, Prudencio LB, Rodrigues M, Suehiro V. 2002.** Toxoplasmose ocular em caes jovens inoculados com *Toxoplasma gondii*. *Cienc Rural* 32 (5): 807 – 812.
21. **Bresciani KDS, Costa AJ, Toniollo GH, Luvizzoto MCR, Kanamura CT, Moraes FR, Perri SHV, Gennari SM. 2009.** Transplacental transmission of *Toxoplasma gondii* in reinfected pregnant female canines. *Parasitol Res* [Epub ahead of print].
22. **Brito AF, Souza LC, Silva AV, Langoni H. 2002.** Epidemiological and serological aspects in canine toxoplasmosis in animals with nervous symptoms. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97 (1): 31 – 35.
23. **Burg JL, Perelman D, Kasper LH, Ware PL, Boothroyd JC. 1988.** Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 141 (10): 3584 – 3591.

- 24. Buxton D, Maley SW. 2004.** Toxoplasmosis. En: Vallat B, Edwards S. Manual de pruebas de diagnóstico y vacunas para los animales terrestres. p 1202 – 1209.
- 25. Cabral DD, Silva DAO, Mineo JR, Ferreira FA, Duran FP. 1998.** Frequency of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in apparently healthy dogs of the city of Uberlandia-MG. Braz J Vet Parasitol 7: 87 – 90.
- 26. Campbell RSF, Martin WB, Gordon ED. 1955.** Toxoplasmosis as a complication of canine distemper. Vet. Rec. 48, 708 – 712.
- 27. Casas G, Chávez A, Casas E, Leyva V, Alvarado A, Serrano E, Ticona D, Puray N. 2006.** Presencia de *Neospora caninum* en llamas de una empresa ganadera de la Sierra Central. Rev Investig Vet Perú 17 (1): 8 – 13.
- 28. Cesbron-Delauw MF, Tomavo S, Beauchamps P, Fourmaux MP, Camus D, Capron A, Dubremetz JF. 1994.** Similarities between the primary structure of two distinct major surface proteins of *Toxoplasma gondii*. J Biol Chem 269 (23): 16217 – 16222.
- 29. Collantes E. 2003.** Patogenia de la neosporosis en el feto bovino y en un modelo murino experimental. Memoria presentada para optar al grado de Doctor. Madrid: Univ. Complutense de Madrid. 253p.
- 30. Cornejo N. 2004.** Seroprevalencia de *Neospora caninum* en perros de establos lecheros de la cuenca izquierda del Valle del Mantaro. Tesis para optar al título profesional de Médico Veterinario. Lima: FMV – Univ Nac Mayor de San Marcos. 50p.
- 31. Cheadle MA, Lindsay DS, Blagburn BL.1999.** Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs. Vet Parasitol 85 (4): 325 – 330.

- 32. Da Silva AV, Pezerico SB, De Lima VY, Moretti L, Pinheiro JP, Tanaka EM, Garcia M, Langoni H. 2005.** Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains isolated from dogs with neurological signs. *Vet Parasitol* 127: 23 – 27.
- 33. Dalgıç N. 2008.** Congenital *Toxoplasma gondii* infection. *Marmara Medical Journal* 21 (1): 89 – 101.
- 34. De Souza SLP, Gennari SM, Yai LEO, D’Auria SRN, Cardoso SMS, Guimaraes JS, Dubey JP. 2003.** Occurrence of *Toxoplasma gondii* antibodies in sera from dogs of the urban and rural areas from Brazil. *Braz J Vet Parasitol* 12 (1): 1 – 3.
- 35. Del Campo JF. 2003.** Frecuencia de *Neospora caninum* en perros de establos lecheros del valle de Lima. Tesis para optar al título profesional de Médico Veterinario. Lima: FMV – Univ Nac Mayor de San Marcos. 52p.
- 36. Del Río L, Bennouna S, Salinas J, Denkers EY. 2001.** CXCR2 deficiency confers impaired neutrophil recruitment and increased susceptibility during *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol* 167: 6503 – 6509.
- 37. Dijkstra T, Barkema HW, Eysker M, Hesselink JW, Wouda W. 2002.** Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. *Vet Parasitol* 105 (2): 99 – 104.
- 38. Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK. 1970.** The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J Exp Med* 132: 636 – 662.
- 39. Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Uggla A. 1988.** Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J Am Vet Med Assoc* 192 (9): 1269 – 1285.
- 40. Dubey JP, Beattie CP. 1988.** Toxoplasmosis of animals and man. Boca Raton: CRC Press. 220p.

41. **Dubey JP, Koestner A, Piper RC. 1990.** Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 197: 857 – 860.
42. **Dubey JP, Shen K. 1991.** Rat model of congenital toxoplasmosis. *Infect Immun* 59 (9): 3301 – 3302.
43. **Dubey JP. 1992.** A review of *Neospora caninum* and *Neospora*-like infections in animals. *J Protozool Res* 2: 40 – 52.
44. **Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. 1998.** Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* 11(2): 267 – 299.
45. **Dubey JP, Lappin MR. 1998.** Toxoplasmosis and neosporosis. In: Greene CE, eds. *Infectious diseases of the dog and cat*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Company. 493 – 509.
46. **Dubey JP. 1999.** Toxoplasmosis. En: Cox FEG, Kreier JP, Wakelin D, eds. *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections*, vol. V: Parasitology. 9th ed. London: Hodder Arnold. p 303 – 318.
47. **Dubey JP, Hill DE, Lindsay DS, Jenkins MC, Uggla A, Speer CA. 2002a.** *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* are separate species/organisms. *Trends Parasitol* 18 (2): 66 – 69.
48. **Dubey JP, Barr BC, Barta JR, Bjerkas I, Björkman C, Blagburn BL, Bowman DD, 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. 2002b.** Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *Int J Parasitol* 32: 929 – 946.

- 49. Dubey JP. 2003.** Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. Korean J Parasitol 41(1): 1 – 16.
- 50. Dubey JP. 2004.** Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. Vet Parasitol 126: 57 – 72.
- 51. Dubey JP, Knickman E, Greene CE. 2005.** Neonatal *Neospora caninum* infections in dogs. Acta Parasitológica 50 (2): 176 – 179. 4
- 52. Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. 2007.** Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. Clin Microbiol Rev 20 (2): 323 – 367.
- 53. Dubey JP. 2007.** The history and life cycle of *Toxoplasma gondii*. In: Weiss LM, Kim K, eds. *Toxoplasma gondii*. The model apicomplexan: perspectives and methods. 1st ed. Great Britain: Academic Press. p 1 – 17.
- 54. Dumètre A, Dardé ML. 2003.** How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples?. FEMS Microbiol Rev 27: 651 – 661.
- 55. Echaide I. 2000.** La neosporosis bovina. En: Jornada sobre enfermedades emergentes del bovino. Río Cuarto: Facultad de Agronomía y Veterinaria – Universidad Nacional de Río Cuarto. p 1 – 6.
- 56. Ellis J, Luton K, Baverstock PR, Brindley PJ, Nimmo KA, Johnson AM. 1994.** The phylogeny of *Neospora caninum*. Mol Biochem Parasitol 64 (2): 303 – 311.
- 57. Fahnehjelm KT, Malm G, Ygge J, Engman ML, Maly E, Evengard B. 2000.** Ophthalmological findings in children with congenital toxoplasmosis. Acta Ophthalmol 78: 569 – 575.

- 58. Fischer HG, Stachelhaus S, Sahn M, Meyer HE, Reichmann G. 1998.** GRA7, an excretory 29 kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells. *Mol Biochem Parasitol* 91 (2): 251 – 262.
- 59. Frenkel JK, Taylor DW. 1982.** Toxoplasmosis in Immunoglobulin M – Suppressed Mice. *Infect Immun* 38 (1): 360 – 367.
- 60. Frenkel JK, Lindsay DS, Parker BB, Dobesh M. 2003.** Dogs as possible mechanical carriers of *Toxoplasma*, and their fur as a source of infection of young children. *Int J Infect Dis* 7: 292 – 293.
- 61. Fuentes I, Rodríguez M, Domingo CJ, Castillo F, Juncosa T, Alvar J. 1996.** Urine sample used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. *J Clin Microbiol* 34 (10): 2368 – 2371.
- 62. García JL, Navarro IT, Ogawa L, Oliveira RC. 1999.** Seroepidemiology of toxoplasmosis in cats and dogs from rural properties of Jaguapita county, Paraná State, Brazil. *Ciência Rural* 29 (1): 99 – 104.
- 63. Garcia-Règuet N, Lebrun M, Fourmaux MN, Mercereau-Puijalon O, Mann T, Beckers CJM, Samyn B, Van Beeumen J, Bout D, Dubremetz JF. 2000.** The microneme protein MIC3 of *Toxoplasma gondii* is a secretory adhesin that binds to both the surface of the host cells and the surface of the parasite. *Cell Microbiol* 2 (4): 353 – 364.
- 64. Georgieva DA, Prelezov PN, Koinarski VTS. 2006.** *Neospora caninum* and neosporosis in animals – a review. *Bulg J Vet Med* 9 (1): 1 – 26.
- 65. Gharavi MJ, Oormazdi, Roointan ES. 2008.** A comparative study on sensitivity and specificity of conventional and unconventional IgG and IgM assays for diagnosis of toxoplasmosis. *Iranian J Publ Health* 37 (4) : 42 – 45.

- 66. Gómez F. 2004.** Estudio sobre la toxoplasmosis en Andorra y el Alto Urgel. Memoria presentada para optar al grado de Doctor. Barcelona: Univ. de Barcelona. 289p.
- 67. Gondim LFP, Gao L, McAllister MM. 2002.** Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and *in vitro* isolation from oocysts. J Parasitol 88 (6):1159 – 1163.
- 68. Gondim LFP, McAllister MM, Pitt WC, Zemlicka DE. 2004a.** Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int J Parasitol 34: 159 – 161.
- 69. Gondim LFP, McAllister MM, Mateus-Pinilla NE, Pitt WC, Mech LD, Nelson ME. 2004b.** Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. J Parasitol 90 (6): 1361 – 1365.
- 70. Holec L, Hiszczyńska-Sawicka E, Gašior A, Brillowska-Dąbrowska A, Kur J. 2007.** Use of MAG1 recombinant antigen for diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in humans. Clin Vaccine Immunol 14 (3): 220 – 225.
- 71. Horna SV. 2003.** Seroprevalencia de *Neospora caninum* en caninos en dos distritos de la provincia de Chachapoyas. Tesis para optar al título profesional de Médico Veterinario. Lima: FMV – Univ Nac Mayor de San Marcos. 60p.
- 72. Jacobson LS, Jardine JE. 1993.** *Neospora caninum* infection in three labrador littermates. J S Afr Vet Assoc 64 (1): 47 – 51.
- 73. Jankü J. 1923.** Pathogenesa a pathologická anatomie tak nazvaného vrozeného kolobomu žluté skvrny v oku normálně velikem a mikrophthalmickém s nálezem parazitů v sítnici. Cas Lek Cesk 62:1021 – 1027.

- 74. Jewell ML, Frenkel JK, Johnson KM, Reed V, Ruiz A. 1972.** Development of *Toxoplasma* oocysts in neotropical felidae. Am J Trop Med Hyg 21 (5): 512 – 517.
- 75. Kang H, Remington JS, Suzuki Y. 2000.** Decreased resistance of B cell – deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN- γ , TNF- α , and inducible nitric oxide synthase. J Immunol 164 (5): 2629 – 2634.
- 76. Kasper LH. 1989.** Identification of stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. Infect Immun 57 (3): 668 – 672.
- 77. Khan IA, Ely KH, Kasper LH. 1991.** A purified parasite antigen (p30) mediates CD8+ T cell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice. J Immunol 147 (10): 3501 – 3506.
- 78. Kniel KE, Lindsay DS, Sumner SS, Hackney CR, Pierson MD, Dubey JP. 2002.** Examination of attachment and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts on raspberries and blueberries. J Parasitol 88 (4):790 – 3.
- 79. Kravetz JD, Federman DG. 2005.** Toxoplasmosis in pregnancy. Am J Med 118: 212 – 216.
- 80. Lecordier L, Fourmaux MP, Mercier C, Dehecq E, Masy E, Cesbron-Delauw MF. 2000.** Enzymelinked immunosorbent assays using the recombinant dense granule antigens GRA6 and GRA1 of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies. Clin Diagn Lab Immunol 7 (4): 607 – 611.
- 81. Lin DS. 1998.** Seroprevalences to *Toxoplasma gondii* in privately-owned dogs in Taiwan. Prev Vet Med 35:21 – 27.
- 82. Lindsay DS, Dubey JP, Butler JM, Blagburn BL. 1996.** Experimental tissue cyst induced *Toxoplasma gondii* infections in dogs. J Euk Microbiol 43 (5): 113s

- 83. Lindsay DS, Dubey JP, Butler JM, Blagburn BL. 1997.** Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. *Vet Parasitol* 73: 27 – 33.
- 84. Lindsay DS, Upton SJ, Dubey JP. 1999a.** A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. *Int J Parasitol* 29: 1521 – 1523.
- 85. Lindsay DS, Dubey JP, Duncan RB. 1999b.** Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* 82: 327 – 333.
- 86. Lindsay DS, Dubey JP, McAllister M. 1999c.** *Neospora caninum* and the potential for parasite transmission. *Compen Cont Educ Pract Vet* 21: 317 – 321.
- 87. Lobato J, Silva DAO, Mineo TWP, Amaral JDH, Silva GR, Costa-Cruz JM, Ferreira MS, Borges AS, Mineo JR. 2006.** Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: High seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. *Clin Vaccine Immunol* 13 (1): 84 – 89.
- 88. Locatelli DR, Dal Pizzol J, Fridlund-Plugge N, Hoffmann DCS, Richartz RRTB, Patricio MAC, Lenati LF, Machado PC, Rosinelli AS. 2006.** Ocorrência de anticorpos anti – *Neospora caninum* e anti – *Toxoplasma gondii* em caes com sinais neurológicos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. En: 14º Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. Rio de Janeiro: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária. p 327.
- 89. Lourenco EV, Pereira SR, Faca VM, Coelho-Castelo AAM, Mineo JR, Roque-Barreira MC, Greene LJ, Panunto-Castelo A. 2001.** *Toxoplasma gondii* micronemal protein MIC1 is a lactose-binding lectin. *Glycobiology* 11 (7): 541 – 547.

- 90. Martín I, García SM. 2003.** Toxoplasmosis en el hombre. *Bioquímica* 28 (3): 19 – 27.
- 91. Martínez-Fernández AR, Fuentes I, Rodríguez M, Domingo CJ. 1998.** Toxoplasmosis. *Medicine* 7 (81): 3760 – 3766.
- 92. McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire AM. 1998.** Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 28 (9): 1473 – 1478.
- 93. McGarry JW, Stockton CM, Williams DJL, Trees AJ. 2003.** Protracted shedding of oocysts of *Neospora caninum* by a naturally infected foxhound. *J Parasitol* 89 (3): 628 – 630.
- 94. Mineo TWP, Silva DAO, Costa GHN, Von Ancken ACB, Kasper LH, Souza MA, Cabral DD, Costa AJ, Mineo JR. 2001.** Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. *Vet Parasitol* 98: 239 – 245.
- 95. Moore DP, Odeón AC, Campero CM. 2001.** Neosporosis bovina : una actualización. *Vet Arg* 18 (180): 752 – 775.
- 96. Moore DP, Odeón AC, Venturini MC, Campero CM. 2005.** Neosporosis bovina : conceptos generales, inmunidad y perspectivas para la vacunación. *Rev Argent Microbiol* 37: 217 – 228.
- 97. Moore DP. 2005.** Neosporosis in South America. *Vet Parasitol* 127: 87 – 97.
- 98. Morales JJ. 2007.** Presencia de felinos domésticos como factores de riesgo para la presentación de infecciones por *Toxoplasma gondii* en caninos domésticos. Tesis para optar al título profesional de Médico Veterinario. Lima: FMV – Univ Nac Mayor de San Marcos. 47p.

99. **Morris JT, Kelly JW. 1992.** Effective treatment of cerebral toxoplasmosis with doxycycline. *Am J Med* 93 (1): 107 – 108.
100. **Moskwa B, Pastusiak K, Bien J, Cabaj W. 2007.** The first detection of *Neospora caninum* DNA in the calostrum of infected cows. *Parasitol Res* 100 (3): 633 – 636.
101. **Navarro I, Vidotto O, Bekner A, Mitsuka R, Vitor J, Namie P, Cortés J. 1998.** Comportamento imunológico e antigênico de cinco amostras de *Toxoplasma gondii* inoculadas en gatos. *Ciencia Rural* 28 (3): 453 – 459.
102. **Nicolle C, Manceaux L. 1908.** Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C R Acad Sci* 147: 763 – 766.
103. **Odberg-Ferragut C, Soete M, Engels A, Samyn B, Loyens A, Van Beeumen J, Camus D, Dubremetz JF. 1996.** Molecular cloning of the *Toxoplasma gondii* SAG4 gene encoding an 18 kDa bradyzoite specific surface protein. *Mol Biochem Parasitol* 82 (2): 237 – 244.
104. **Ortega LM, Fernández A, Gómez M. 2006.** Diagnosis of bovine neosporosis: recent advances and perspectives. *Acta Parasitológica* 51 (1): 1 – 14.
105. **Paiva F, Andreotti R, Piacenti AK, Borghesan TC. 2005.** Prevalência de *Neospora caninum* em caes na cidade de Campo Grande, MS. En: I Forum Brasileiro de Estudos sobre *Neospora caninum*. Sao Paulo: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária.
106. **Pantoja A, Pérez L. 2001.** Reseña histórica acerca de las investigaciones relacionadas con la toxoplasmosis. *Rev Cubana Med Trop* 53 (2): 111 – 117.
107. **Pereira A, Pérez M. 2002.** Toxoplasmosis. *Offarm* 21 (4): 123 – 129.

- 108. Pérez FJ. 2004.** Variabilidad adaptativa y patogénica en *Neospora caninum*. Memoria presentada para optar al grado de Doctor. Madrid: Univ. Complutense de Madrid. 187p.
- 109. Petersen E, Dubey JP. 2001.** Biology of toxoplasmosis. In: Joynson DHM, Wreghitt TG, eds. *Toxoplasmosis: A comprehensive clinical guide*. United Kingdom: Cambridge University Press. p 1 – 42.
- 110. Petersen E, Liesenfeld O. 2007.** Clinical disease and diagnostics. In: Weiss LM, Kim K, eds. *Toxoplasma gondii*. The model apicomplexan: perspectives and methods. 1st ed. Great Britain: Academic Press. p 81 – 100.
- 111. Pinheiro AM, Costa MF, Paule B, Vale V, Ribeiro M, Nascimento I, Schaer RE, Almeida MAO, Meyer R, Freire SM. 2005.** Serologic immunoreactivity to *Neospora caninum* antigens in dogs determined by indirect immunofluorescence, western blotting and dot-ELISA. *Vet Parasitol* 130: 73 – 79.
- 112. Roberts CW, Brewer JM, Alexander J. 1994.** Congenital toxoplasmosis in the Balb/c mouse: prevention of vertical disease transmission and fetal death by vaccination. *Vaccine* 12 (15): 1389 – 1394.
- 113. Roberts CW, Gazzinelli RT, Khan IA, Nowakowska D, Esquivel A, McLeod R. 2007.** Adaptive immunity and genetics of the host immune response. In: Weiss LM, Kim K, eds. *Toxoplasma gondii*. The model apicomplexan: perspectives and methods. 1st ed. Great Britain: Academic Press. p 609 – 720.
- 114. Rojas M. 2003.** Nosoparasitosis de perros y gatos peruanos. 1ª ed. Lima – Perú: Martegraf. p 44 – 52.

115. **Romero JJ. 2005.** Appraisal of the epidemiology of *Neospora caninum* infection in Costa Rica dairy cattle. Memoria presentada para optar al grado de Doctor. Wageningen: Univ. Agraria de Wageningen. 138p.
116. **Rosenthal B. 2008.** A family tree for *Toxoplasma*. Agricultural Research Magazine 56 (8): 18 – 20.
117. **Sabin AB, Feldman HA. 1948.** Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). Science 108: 660 – 663.
118. **Sawada M, Park Ch, Kondo H, Morita T, Shimada A, Yamane I, Umemura T. 1998.** Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. J Vet Med Sci 60 (7): 853 – 854.
119. **Schaes G, Pantchev N, Barutzki D, Heydorn AO, Bauer C, Conraths FJ. 2005.** Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. Int J Parasitol 35 (14): 1525 – 1537.
120. **Schwartzman JD. 2001.** Toxoplasmosis. In: Gillespie SH, Pearson RD, eds. Principles and practice of clinical parasitology. 1st ed. England: Wiley & Sons Ltd. p 113 – 138.
121. **Sedlak K, Bartova E. 2006.** The prevalence of *Toxoplasma gondii* IgM and IgG antibodies in dogs and cats from the Czech Republic. Veterinarni Medicina 51 (12): 555 – 558.
122. **Shapira S, Harb OS, Caamano G, Hunter CA. 2004.** The NF- κ B signaling pathway: immune evasion and immunoregulation during toxoplasmosis. Int J Parasitol 34: 393 – 400.

123. **Slapeta JR, Modrý D, Kyselová I, Horejs R, Lukes J, Koudela B. 2002.** Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. *Vet Parasitol* 109: 157 – 167.
124. **Speer CA, Dubey JP. 1989.** Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum*. *J Protozool* 36: 458 – 463.
125. **Speer CA, Dubey JP, McAllister MM, Blixt JA. 1999.** Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 29: 1509 – 1519.
126. **Stenlund S. 2000.** *Neospora caninum* in cattle in Sweden. Isolation of the parasite and studies of its transmission. Memoria presentada para optar al grado de Doctor. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences. 40 p.
127. **Subauste CS, Dawson L, Remington JS. 1992.** Human lymphokine-activated killer cells are cytotoxic against cells infected with *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med* 176: 1511 – 1519.
128. **Swinger RL, Schmidt KA, Dubielzig RR. 2009.** Keratoconjunctivitis associated with *Toxoplasma gondii* in a dog. *Vet Ophthalmol* 12 (1): 56 – 60.
129. **Tarlow JM, Rudloff E, Lichtenberger M, Kirby R. 2005.** Emergency presentations of 4 dogs with suspected neurologic toxoplasmosis. *J Vet Emerg Crit Care* 15 (2): 119 – 127.
130. **Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. 2000.** *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 30: 1217 – 1258.
131. **Varandas NP, Rached PA, Nogueira GH, Melo L, Carrao K, Da Costa AJ. 2001.** Frequency of antibodies for *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs in northeast of Sao Paulo State. *Sci Agrarias Londrina* 22 (1): 105 – 111.

132. **Varela N. 2001.** La toxoplasmosis en los primates del nuevo mundo. Boletín GEAS 2 (4): 30 – 35.
133. **Venturini MC, Unzaga J, Basso W, Bacigalupe D, Larsen A, Pardini L, Moré G, Venturini L. 2007.** Neosporosis y toxoplasmosis en perros con signos clínicos en diez años de diagnóstico serológico. En: XVII Reunión Científica Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico (II). Santa Fe: Red de Helminología para América Latina y El Caribe.
134. **Ware PL, Kasper LL. 1987.** Strain-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. Infect Immun 55 (3): 778 – 783.
135. **Woods LW, Anderson ML, Swift PK, Sverlow KW. 1994.** Systemic neosporosis in a California black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*). J Vet Diagn Invest 6: 508 – 510.
136. **Wouda W, Dijkstra T, Kramer AM, Van Maanen C, Brinkhof JM. 1999.** Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. Int J Parasitol 29 (10): 1677 – 1682.
137. **Xu LH, Wang YF, Chen JL, Xu ZX, Yu YF, Tao XM. 1989.** Studies on the fine structure of *Toxoplasma gondii* tachyzoite. Chin J Parasitol Parasitic Dis 7 (2): 105 – 107.
138. **Yong EC, Chi EY, Fritsche TR, Henderson WR Jr. 1991.** Human platelet-mediated cytotoxicity against *Toxoplasma gondii*: role of thromboxane. J Exp Med 173: 65 – 78.
139. **Yu X, Chen N, Hu D, Zhang W, Li X, Wang B, Kang L, Li X, Liu Q, Tian K. 2009.** Detection of *Neospora caninum* from farm-bred young blue foxes (*Alopex lagopus*) in China. J Vet Med Sci 71 (1): 113 – 115.

IX. APÉNDICE

Apéndice 1. Distribución de los animales seropositivos a *Toxoplasma gondii* según edad, sexo y raza. 2006 – 2008. FMV – UNMSM. Lima – Perú.

	EDAD		SEXO		RAZA	
	< 1 año	> 1 año	Machos	Hembras	Definida	Indefinida
Positivos	6	17	18	5	13	10
Frecuencia	26.1	73.9	78.3	21.7	56.5	43.5

Apéndice 2. Distribución de los animales seropositivos a *Neospora caninum* según edad, sexo y raza. 2006 – 2008. FMV – UNMSM. Lima – Perú.

	EDAD		SEXO		RAZA	
	< 1 año	> 1 año	Machos	Hembras	Definida	Indefinida
Positivos	0	5	5	0	4	1
Frecuencia	0	100	100	0	80	20