

DESARROLLO DE TÉCNICAS SEROLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA NEOSPOROSIS CANINA.

Natalia Romeral Requena y Adriana Aguado Martínez

Tutor: Luis Ortega Mora y Gema Álvarez García

Dpto. de Sanidad Animal. Fac. de Veterinaria. UCM

RESUMEN

Neospora caninum es un coccidio parásito que está considerado actualmente como uno de las principales agentes productores de aborto en el ganado bovino en todo el mundo. Por su parte, en el perro la infección por *N. caninum* puede originar un cuadro neurológico. El diagnóstico *in vivo* de la neosporosis canina se puede realizar mediante la observación de signos clínicos que siempre debe confirmarse mediante la realización de un diagnóstico laboratorial. El diagnóstico laboratorial incluye, por un lado, la detección directa de ooquistes en las muestras de heces y, por otro, la detección de anticuerpos específicos en muestras de suero que permite evidenciar la transmisión congénita, así como detectar la infección en los animales adultos. Actualmente, no se dispone de una técnica serológica normalizada y comúnmente aceptada, sino que se han desarrollado varias técnicas con distintos puntos de corte para cada aplicación particular y con diferentes criterios para la interpretación de los resultados.

De acuerdo con las necesidades que plantea el empleo de las actuales técnicas serológicas en el diagnóstico de la neosporosis canina en los animales adultos, se propuso la realización de dos objetivos en el presente trabajo de investigación que a continuación se detallan.

INTRODUCCIÓN

Neospora caninum es un protozoo parásito del grupo de los Apicomplexa descrito por primera vez en 1988 como causante de encefalomiелitis en el perro (Dubey *et al.*, 1988) y, desde 1989, como agente productor de aborto y mortalidad neonatal en el ganado bovino (Thilsted *et al.*, 1989). Los hospedadores definitivos de *N. caninum* descritos hasta el momento, son el perro (McAllister *et al.*, 1998) y el coyote (Gondim *et al.*, 2004). Los bovinos y otras especies de rumiantes actúan como hospedadores intermediarios (Dubey,

2003). En el ciclo biológico de *N. caninum* existen tres estadios diferentes: los taquizoítos, los quistes tisulares con bradizoítos en su interior y los ooquistes. Los taquizoítos y quistes tisulares con bradizoítos, son las fases asexuales de *N. caninum* que se encuentran en el hospedador intermediario. Los taquizoítos son los responsables de la fase aguda, multiplicándose rápidamente en muchos tipos celulares. En la fase crónica, los taquizoítos se diferencian en bradizoítos formando los quistes tisulares, localizándose principalmente en el SNC (Dubey, 2003). Los ooquistes de *N. caninum* son eliminados en las heces por el hospedador definitivo y esporulan en el medio ambiente a las 24 h.

Los estudios serológicos realizados demuestran tasas de prevalencia de rebaño e individual elevadas, tanto en ganado de aptitud láctea como cárnica, en las principales zonas productoras del mundo. En España, un estudio reciente ha demostrado que el 60% de los rebaños bovinos de carne y de leche tiene algún animal infectado, siendo la tasa de prevalencia individual del 15% (Bartels *et al.*, 2006).

A pesar de que en los últimos años se ha avanzado de forma considerable en el conocimiento de la infección en el hospedador definitivo, diversos aspectos permanecen todavía sin dilucidar. La infección por *N. caninum* en el perro es asintomática en los animales adultos, sin embargo en cachorros congénitamente infectados, se han descrito casos de paresia de los miembros posteriores o anteriores, que evoluciona progresivamente hacia una parálisis (Dubey, 2003). Los datos que se conocen sobre la prevalencia de la infección en el perro proceden principalmente de estudios serológicos. Los valores de seroprevalencia obtenidos son muy variados y varían en función del país y origen de los animales. La presencia de ooquistes en perros naturalmente infectados se ha señalado en diversos estudios (Basso *et al.*, 2001; McGarry *et al.*, 2003), pero los datos que se conocen acerca de la prevalencia de ooquistes de *N. caninum* en las heces son muy escasos. Asimismo, en perros naturalmente infectados el número de ooquistes por gramo de heces es bajo comparado con el obtenido en gatos infectados con *Toxoplasma gondii* (Schaes *et al.*, 2005).

A la hora de diagnosticar la infección por *N. caninum* en el perro debemos realizar un diagnóstico clínico-epidemiológico, teniendo en cuenta la presencia o ausencia de sintomatología nerviosa, su procedencia y la edad, el cual si bien puede ser indicativo siempre debe confirmarse con un diagnóstico laboratorial. En relación con el diagnóstico de la infección por *N. caninum* en el perro, la detección de anticuerpos específicos mediante la

técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), es el método más utilizado. Los títulos obtenidos en los perros analizados son generalmente bajos, indicando una infección subclínica. Recientemente, también se ha validado un ELISA comercial con un 72% de sensibilidad y un 90% de especificidad (Capelli *et al.*, 2006). Los resultados serológicos no permiten identificar a los perros que eliminan ooquistes, ya que en un estudio experimental, la mayoría de los perros que eliminaron ooquistes no mostraron títulos positivos por IFI (McAllister *et al.*, 1998). El empleo de proteínas recombinantes en el diagnóstico serológico de la neosporosis canina podría ofrecer una serie de ventajas de forma similar a lo observado en el ganado bovino. Un estudio reciente ha señalado que el reconocimiento de la proteína de taquizoítos localizada en los gránulos densos NcGRA7 podría considerarse como marcador de una infección aguda. Por su parte, el reconocimiento de la proteína específica de la fase de bradizoíto NcSAG4 estaría relacionado con el establecimiento de una infección crónica (Aguado-Martínez *et al.*, 2007). En lo que respecta a los antígenos inmunodominantes detectados por sueros de perros con infección natural, se han descrito las mismas bandas inmunodominantes de bajo y medio peso molecular que se han detectado con sueros de origen bovino, sin embargo también se han detectado bandas de alto peso molecular, entre las que destaca un antígeno de 152 kDa reconocido por sueros procedentes de perros que eliminaron ooquistes en sus heces (Schaes *et al.*, 2001).

Con estos antecedentes previamente mencionados se propuso la realización de dos objetivos en el presente trabajo de investigación. En primer lugar se pretendió poner a punto las pruebas convencionales serológicas (ELISA, IFI y western blot) empleando un panel de sueros bien referenciado de perros naturalmente infectados. En segundo lugar se desarrollaron pruebas ELISA basadas en el empleo de proteínas recombinantes de *N. caninum* (rNcSAG4 y rNcGRA7) con el objetivo de mejorar el resultado obtenido mediante de las pruebas serológicas convencionales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras de suero analizadas

Se analizaron muestras de suero de perros procedentes de granja, los cuales fueron analizados en primer lugar por la técnica de IFI. Para el desarrollo de las pruebas ELISA se analizaron muestras de suero negativas y positivas, tal y como se especifica en el apartado de resultados.

Técnicas serológicas

IFI

Para la realización de la IFI se empleó la metodología descrita por Trees *et al.*, 1994. Los sueros se titularon mediante la realización de diluciones dobles a partir de una dilución 1/50, considerándose ésta como punte corte.

ELISA

En la puesta a punto de la prueba de ELISA se siguió la metodología descrita por Alvarez-García *et al.* (2003), valorarándose diferentes variables como la concentración de antígeno, la solución de bloqueo y la dilución del anticuerpo secundario anti-IgG de perro conjugado con peroxidasa. En la prueba ELISA basada en el empleo de antígeno soluble del taquizoíta de *N. caninum* las condiciones óptimas de la prueba fueron finalmente 0,2 ug/ pocillo y una dilución de anticuerpo secundario 1/10000. En cuanto a las pruebas ELISA basadas en el empleo de proteínas recombinantes de *N. caninum* se seleccionaron la proteína NcGRA7 de gránulos densos del taquizoíta y la proteína de membrana NcSAG4 específica de la fase de bradizoíta, las cuales tienen un indudable valor diagnóstico en el ganado bovino (Aguado-Martínez *et al.*, 2007). Las proteínas fueron producidas y purificadas siguiendo la metodología descrita por Aguado-Martínez *et al.* (2007). En ambas pruebas las condiciones finalmente seleccionadas fueron 0,2 ug/ pocillo y una dilución de anticuerpo secundario 1/10000.

WB

Para la realización de la técnica de western blot se siguió la metodología descrita por Alvarez-García *et al.* (2002) con el objetivo de detectar bandas inmunodominantes del taquizoíta de *N. caninum* de bajo y medio peso molecular.

Análisis de los resultados

El grado de concordancia entre dos pruebas diagnósticas se valoró mediante el cálculo del valor *kappa* (κ) (Thrusfield, 1995).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Concordancia IFI-ELISA de extracto soluble

Con el objetivo de estimar el grado de concordancia entre las técnicas de IFI y ELISA basado en el empleo de extracto soluble de taquizoítos se analizó un total de 42 sueros positivos y 46 sueros negativos por IFI. Los resultados obtenidos aparecen reflejados en la Tabla 1. El valor de κ obtenido correspondió a una concordancia moderada. Cuando se compararon los resultados obtenidos en el presente trabajo con los publicados por otros autores el valor de κ fue superior en nuestro caso, ya que Silva *et al.* (2007) han detectado una concordancia débil entre ambas técnicas ($\kappa=0,3$). Estos resultados ponen de manifiesto la dificultad de estandarizar las pruebas serológicas en la neosporosis canina donde con frecuencia las infecciones son subclínicas detectándose bajos niveles de anticuerpos.

Antígenos inmunodominantes detectados mediante la prueba de western blot

Se analizaron sueros de perro negativos y positivos por IFI con diferentes títulos de anticuerpos, detectándose el mismo patrón de antígenos inmunodominantes que cuando se emplean sueros de origen bovino (bandas de 17-18, 34, 37 y 60-62 kDa) (Fig.1). Al igual que en el ganado bovino se observó una asociación entre el título de anticuerpos por IFI y la intensidad de reconocimiento de las bandas inmunodominantes. En futuros estudios se pretende estudiar el patrón de antígenos inmunodominantes de alto peso molecular con el objetivo de detectar la banda proteica de 152 kDa descrita por Schares *et al.* (2005).

ELISAs recombinantes

Para el desarrollo de las pruebas ELISA basadas en el empleo de antígenos recombinantes se analizó un total de 24 sueros, de los cuales 13 fueron positivos y 11 negativos mediante la técnica de IFI. En base a los resultados obtenidos en el presente estudio y a la utilidad diagnóstica de estas proteínas en el ganado bovino la posible interpretación de los datos aparece reflejada en la Tabla 2, lo cual deberá ser confirmado en un futuro mediante el análisis de un panel de sueros más amplio incluyendo sueros procedentes de animales que eliminen ooquistes y/ o con sintomatología nerviosa asociada a la infección por *N. caninum*.

Tabla 1: Concordancia (κ) entre la IFI y la prueba ELISA de extracto soluble.

ELISA	IFI	
	+	-
+	32	16
-	10	30

$\kappa = 0,41$

Figura 1: Antígenos de taquizoítos de *N. caninum* reconocidos por sueros de perro con diferentes títulos de anticuerpos específicos por IFI.

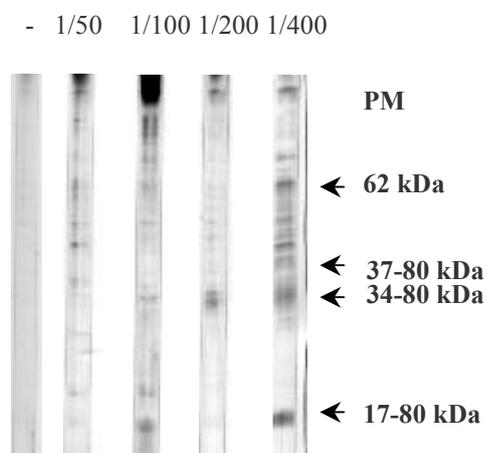


Tabla 2: Resultados obtenidos con las pruebas ELISA recombinantes (ELISAs rNcSAG4 y rNcGRA7).

	IFI	rNcGRA7	rNcSAG4	Interpretation
Resultados	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Negativo	Negativo	Positivo	Infección crónica
	Positivo	Negativo	Positivo	Infección crónica
	Positivo	Positivo	Positivo	Infección crónica + recrudescencia

BIBLIOGRAFÍA

- Aguado-Martínez, A., Alvarez-Garcia, G., Fernández-García, A., Risco-Castillo, V., Arnaiz-Seco, I., Rebordosa, X., Ortega-Mora, L.M., 2007. Usefulness of the recombinant proteins rNcSAG4 and rNcGRA7-based ELISA tests to distinguish primo-infection, recrudescence and chronic bovine neosporosis. WAAVP Gante.
- Alvarez-Garcia, G., Collantes-Fernandez, E., Costas, E., Rebordosa, X., Ortega-Mora, L.M., 2003. Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods in bovine neosporosis. Vet. Res. 34, 341-352.
- Alvarez-Garcia, G., Pereira-Bueno, J., Gomez-Bautista, M., Ortega-Mora, L.M., 2002. Pattern of recognition of *Neospora caninum* tachyzoite antigens by naturally infected pregnant cattle and aborted fetuses. Vet. Parasitol. 107, 15-27.
- Bartels, C.J., Arnaiz-Seco, I., Ruiz-Santa-Quitera, A., Bjorkman, C., Frossling, J., von, B.D., Conraths, F.J., Schares, G., van, M.C., Wouda, W., Ortega-Mora, L.M., 2006. Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden 3. Vet. Parasitol. 137, 17-27.
- Dubey, J.P., 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. Korean J. Parasitol. 41, 1-16.
- Basso, W., Venturini, L., Venturini, M.C., Moore, P., Rambeau, M., Unzaga, J.M., Campero, C., Bacigalupe, D., Dubey, J.R., 2001. Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef-cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. J. Parasitol. 87, 906-907.
- Capelli, G., Natale, A., Nardelli, S., Frangipane di, R.A., Pietrobelli, M., 2006. Validation of a commercially available cELISA test for canine neosporosis against an indirect fluorescent antibody test (IFAT). Prev. Vet. Med. 73, 315-320.
- Dubey, J.P., Carpenter, J.L., Speer, C.A., Topper, M.J., Uggla, A., 1988. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 192, 1269-1285.
- Gondim, L.F., McAllister, M.M., Pitt, W.C., Zemlicka, D.E., 2004. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int. J. Parasitol. 34, 159-161.
- McGarry, J.W., Stockton, C.M., Williams, D.J., Trees, A.J., 2003. Protracted shedding of oocysts of *Neospora caninum* by a naturally infected foxhound. J. Parasitol. 89, 628-630.
- McAllister, M.M., Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Jolley, W.R., Wills, R.A., McGuire, A.M., 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int. J. Parasitol. 28, 1473-1478.

- Schares, G., Heydorn, A.O., Cuppers, A., Conraths, F.J., Mehlhorn, H., 2001. Cyclic transmission of *Neospora caninum*: serological findings in dogs shedding oocysts. *Parasitol. Res.* 87, 873-877.
- Schares, G., Pantchev, N., Barutzki, D., Heydorn, A.O., Bauer, C., Conraths, F.J., 2005. Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. *Int. J. Parasitol.* 35, 1525-1537.
- Silva, D.A., Lobato, J., Mineo, T.W., Mineo, J.R., 2007. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. *Vet. Parasitol.* 143, 234-244.
- Thilsted, J.P., Dubey, J.P., 1989. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1, 205-209.
- Trees, A.J., Guy, F., Low, J.C., Roberts, L., Buxton, D., Dubey, J.P., 1994. Serological evidence implicating *Neospora* species as a cause of abortion in British cattle. *Vet. Rec.* 134, 405-407.