

FRECUENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA *Neospora caninum* Y *Toxoplasma gondii* EN CANES CON SIGNOS CLÍNICOS DE AFECCIÓN NEUROMUSCULAR

FREQUENCY OF ANTIBODIES AGAINST *NEOSPORA CANINUM* Y *TOXOPLASMA GONDII* IN DOGS WITH CLINICAL SIGNS OF NEUROMUSCULAR DISEASE

Nelson Ruíz R.¹, Eva Casas A.^{1,4}, Francisco Suárez A.², Diego Díaz C.³,
Viviana Fernández P.³

RESUMEN

Toxoplasma gondii y *Neospora caninum* son causantes de enfermedades neuromusculares en canes. El objetivo de este estudio de Caso-Control fue encontrar la asociación entre la presencia de anticuerpos contra *N. caninum* y *T. gondii* en canes con signos clínicos neuromusculares. Se colectó muestras de sangre a 96 y 120 canes con y sin signos clínicos de afección neuromuscular, respectivamente. Los sueros se analizaron con la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para la detección de anticuerpos (IgG), donde los sueros con fluorescencia completa del taquizoíto en la dilución 1:50 fueron considerados positivos. La frecuencia para *T. gondii* fue de $24.0 \pm 8.5\%$ (23/96) y de 3.3 ± 3.1 (4/120) para canes con y sin afecciones neuromusculares, respectivamente, y para *N. caninum* fue de 5.2 ± 4.4 (5/96) y de 1.7 ± 2.5 (2/120) para canes con y sin afecciones neuromusculares, respectivamente. Se observó asociación significativa entre la afección neuromuscular y la presencia de anticuerpos anti-*T. gondii*, mas no así con anticuerpos anti-*N. caninum*.

Palabras clave: *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, canes, afección neuromuscular, inmunofluorescencia indirecta, anticuerpos IgG

ABSTRACT

Toxoplasma gondii and *Neospora caninum* can cause neuromuscular disorders in dogs. The aim of the Case-Control study was to determine the association between antibodies anti *N. caninum* and anti-*T. gondii* in dogs with neuromuscular disorders. Blood samples were collected in 96 and 120 dogs with and without clinical signs of neuromuscular disorders respectively. Serum samples were analyzed by the indirect immunofluorescence test (IFI) for the detection of IgG antibodies, considering positive the sera showing complete fluorescence of the tachyzoite in the dilution 1:50. The

¹ Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, ² Laboratorio de Medicina Veterinaria Preventiva, ³ Clínica de Animales Menores, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima

⁴ E-mail: evacasas@gmail.com

frequency for *T. gondii* was $24.0 \pm 8.5\%$ (23/96) and 3.3 ± 3.1 (4/120) for dogs with and without signs of neuromuscular disorders, and for *N. caninum* was 5.2 ± 4.4 (5/96) and 1.7 ± 2.5 (2/120) for dogs with and without signs of neuromuscular disorders, respectively. There was a significant association between neuromuscular disorders and the presence of anti-*T. gondii* antibodies but not in the case of the presence of anti-*N. caninum* antibodies.

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

INTRODUCCIÓN

Toxoplasma gondii y *Neospora caninum* son protozoarios apicomplexos con ciclos biológicos heteroxenos que tienen una distribución mundial y afectan a una gran variedad de especies animales. Los sistemas gastrointestinal, respiratorio y neuromuscular son afectados en los canes. Las manifestaciones clínicas por problemas neuromusculares son similares por lo que, inicialmente, los casos producidos por *Neospora caninum* fueron confundidas con toxoplasmosis. No obstante, 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 *N. caninum* son cánidos como el perro doméstico (Lindsay *et al.*, 1999) y el coyote (Gondim *et al.*, 2004), mientras que los hospederos definitivos de *T. gondii* son el gato (Dubey *et al.*, 1970) y otros felinos (Jewell *et al.*, 1972). Además, los canes pueden actuar como hospederos intermediarios y definitivos para *N. caninum* (Dubey, 2003) y como hospederos intermediarios para *T. gondii* (Lindsay *et al.*, 1996).

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

Existen diversas clasificaciones para los signos clínicos de la toxoplasmosis canina, dependiendo de su localización 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.

En el Perú, se han realizado estudios sobre la presencia de *N. caninum* en canes, reportándose una seroprevalencia de 29% en Chachapoyas (Horna *et al.*, 2003), y de 19 y 33% en canes de establos lecheros en el Valle del Mantaro (Cornejo *et al.*, 2004) y de Lima (Del Campo *et al.*, 2003). Asimismo, investigaciones sobre la presencia de *T. gondii* en el país han sido realizadas en diversas especies de animales domésticos y silvestres como cabras, ovejas, cerdos, monos, alpacas, llamas y vicuñas, habiéndose reportado recientemente una frecuencia de 36.5% de *T. gondii* en canes de Lima (Morales *et al.*, 2008).

En ese sentido, el objetivo del presente estudio fue investigar acerca de la presencia de anticuerpos IgG anti-*T. gondii* y anti-*N. caninum* en canes con afección neuromuscular, así como evaluar el tipo de asociación existente entre la presencia de afección neuromuscular y la presencia de anticuerpos IgG, proporcionando de esta manera un mayor sustento a la decisión del clínico veterinario en la ampliación de las posibilidades del diagnóstico diferencial para afecciones neuromusculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de Caso-Control. Como Caso se consideró a canes de dos o más meses de edad con dos o más signos clínicos neuromusculares, y como Control a canes de dos o más meses de edad sin signos o con un solo signo clínico de afección neuromuscular. Se consideró como afección neuromuscular los signos clínicos de mialgia, nistagmo, ataxia, paresia, parálisis y convulsiones.

Se colectaron muestras de sangre de 96 canes del grupo Casos y de 120 canes del grupo Control en la Clínica de Animales Menores de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM), Lima, durante un periodo de dos años (agosto de 2006 a julio de 2008). Las muestras se colectaron indistintamente de la raza o sexo del animal. El suero se separó mediante centrifugación y fue almacenado a -20 °C hasta su procesamiento con la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) en el Laboratorio de Parasitología de la FMV-UNMSM.

La prueba de IFI se realizó utilizando un conjugado canino del laboratorio VMRD (Pullman, WA-USA), siguiendo el protocolo estándar (Sánchez *et al.*, 2002). La muestra se consideró positiva al observarse fluorescencia completa del taquizoíto, y negativa cuando ocurrió fluorescencia parcial (apical) o ausente.

Se calculó la frecuencia relativa de anticuerpos así como el respectivo intervalo de confianza para cada protozooario. Asimismo, se evaluó la asociación entre la seropositividad y el estado del animal (afección neuromuscular) mediante el cálculo del Odds Ratio para cada protozooario.

RESULTADOS

La frecuencia de canes seropositivos a *T. gondii* y con afecciones neuromusculares fue de $24.0 \pm 8.5\%$ (23/96), y en canes sin afección neuromuscular fue de $3.3 \pm 3.1\%$ (4/120). Asimismo, en el caso de *N. caninum*, la seroprevalencia fue $5.2 \pm 4.4\%$ (5/96) y de $1.7 \pm 2.5\%$ (2/120) en canes con y sin afección neuromuscular, respectivamente (Cuadro 1).

Se encontró una asociación significativa entre la presencia de afección neuromuscular y presencia de anticuerpos anti-*T. gondii*, siendo el Odds Ratio de 9.1 con un intervalo de confianza entre 3.0 y 27.4. Asimismo, la asociación entre la presencia de afección neuromuscular y la presencia de anticuerpos anti-*N. caninum* resultó en un Odds Ratio de 3.24 con intervalo de confianza entre 0.61 y 17.29, indicando independencia entre ambas variables.

Adicionalmente, se observó que mialgia y ataxia fueron los signos clínicos más frecuentes en los animales seropositivos a *T. gondii* y a *N. caninum*, y nistagmo en menor nivel.

DISCUSIÓN

La frecuencia de IgG anti-*T. gondii* en canes con signos de afección neuromuscular fue de $24.0 \pm 8.5\%$, valor estadísticamente similar a las frecuencias halladas en Brasil (Brito *et al.*, 2002) y Argentina (Locatelli *et al.*, 2006; Venturini *et al.*, 2007) en canes con similares signos clínicos; sin embargo, no es

Cuadro 1. Frecuencia de *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* en canes según la presencia de afecciones neuromusculares (Lima, 2006-2008)

Protozoario	Afección neuromuscular	Canes muestreados (n)	Canes positivos	
			N.º	% ± I.C. ¹
<i>T. gondii</i>	No	120	4	3.3 ± 3.1
	Sí	96	23	24.0 ± 8.5
<i>N. caninum</i>	No	120	2	1.7 ± 2.5
	Sí	96	5	5.2 ± 4.4

¹ Intervalo de confianza del 95%

posible asegurar que cada caso haya sido debido a una toxoplasmosis clínica, dada la posibilidad de que los signos neurológicos sean originados por otras infecciones (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).

La frecuencia de IgG anti-*T. gondii* en canes sin manifestaciones neuromusculares (3.3 ± 3.1%) se encontró por debajo de frecuencias de 25 a 85% reportadas en otros países en canes sin signos clínicos neuromusculares (García *et al.*, 1999; Aricapa *et al.*, 2003; Barbosa *et al.*, 2003; Sedlak y Bartova, 2006); sin embargo, esto depende largamente de la distribución del parásito, ya que también hay reportes con frecuencias similares a las del presente estudio (Lin, 1998). Recientemente, se ha reportado una frecuencia de 36.5% de *T. gondii* en canes sin signos clínicos de afección neuromuscular en varios distritos de Lima (Morales *et al.*, 2008). Es posible que la baja frecuencia pueda deberse a que la gran mayoría de los canes eran mascotas mantenidas dentro del hogar, con menor probabilidad de tener contacto con roedores y palomas, además de ser alimentadas con concentrado (De Souza *et al.*, 2003).

La frecuencia de IgG anti-*N. caninum* en canes con signos de afección neuromus-

cular fue de 5.2 ± 4.4%, similar a las frecuencias obtenidas en otros estudios en canes con signos neurológicos (Cheadle *et al.*, 1999; Mineo *et al.*, 2001; Varandas *et al.*, 2001), aunque también se han reportado valores inferiores (Locatelli *et al.*, 2006; Venturini *et al.*, 2007).

Por otro lado, la frecuencia encontrada en canes sin manifestaciones neuromusculares (1.7 ± 2.5%) fue similar a otros reportes (Sawada *et al.*, 1998; Wouda *et al.*, 1999) en canes mantenidos dentro de casas en zonas urbanas. Las diferencias entre frecuencias de seropositividad entre canes mantenidos dentro y fuera del hogar se deben a que estos últimos tienen mayor probabilidad de contacto con otras especies infectadas (felinos, roedores y cánidos silvestres) y los canes de establos tienen un estrecho contacto con bovinos (Moore, 2005). Es así, que en canes de establos lecheros de la cuenca izquierda del valle del Mantaro se encontró una seroprevalencia de 19.4 ± 7% (Cornejo *et al.*, 2004) y en canes de establos lecheros del valle de Lima de 32.7 ± 9% (Del Campo *et al.*, 2003).

Los signos clínicos más frecuentes en animales con afección neuromuscular que resultaron positivos a la prueba de IFI fueron mialgia y ataxia. La mialgia podría deberse a la multiplicación excesiva de los protozoarios en las células musculares, causando inflama-

ción y dolor. Por otro lado, la ataxia se debe principalmente a una lesión a nivel del sistema nervioso central 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).

La asociación significativa entre la presencia de IgG anti-*T. gondii* y afección neuromuscular no concuerda con el reporte de Varandas *et al.* (2001); sin embargo, esta asociación está fuertemente ligada a la presencia de otros factores que causen signos neuromusculares. La ocurrencia de determinados signos clínicos depende principalmente de la localización del parásito en el organismo hospedero. La afección neuromuscular es 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 Lappin, 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*.

En el presente estudio se utilizó la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta para el diagnóstico serológico por ser una de las más utilizadas para detectar anticuerpos anti-*T. gondii* y anti-*N. caninum* en canes (Dubey y Beattie, 1988; Dubey *et al.*, 2007). La prueba brinda resultados comparables a los obtenidos por el Dye Test y se le considera más segura ya que no utiliza taquizoítos vivos. Se reporta una sensibilidad y especificidad para *T. gondii* de 97.3 y 96%, respectivamente (Gharavi *et al.*, 2008). Asimismo, la prueba se puede adaptar para detectar IgG, IgM o IgA (Dubey y Lappin, 1998). En este estudio se utilizó para la detección de anticuerpos IgG, ya que el objetivo fue determinar la frecuencia de serorreacciones, mas no la frecuencia de infección aguda en animales con signos clínicos de enfermedad neuromuscular.

CONCLUSIONES

- El $24.0 \pm 8.5\%$ (23/96) de animales con afección neuromuscular presentaron anticuerpos contra *Toxoplasma gondii*.
- Se observó asociación estadística significativa entre los reactivos a *T. gondii* y la variable afección neuromuscular.
- El $5.2 \pm 4.4\%$ (5/96) de animales con afección neuromuscular presentaron anticuerpos contra *Neospora caninum*.
- No se observó asociación estadística significativa entre los reactivos a *N. caninum* y la variable afección neuromuscular.

LITERATURA CITADA

1. **Alves T, De Lima R. 2004.** Encephalitis caused by *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs. *Clínica Vet* 48: 44-52.
2. **Aricapa HJ, Pérez JE, Cardona JM, Piedrahita A. 2003.** Seroprevalencia de toxoplasmosis humana y canina en el municipio de Manizales, año 2003. *Biosalud* 14: 9-17.
3. **Barber J. 1998.** Canine neosporosis. *Waltham Focus* 8(1): 25-29.
4. **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: 457-465.
5. **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.
6. **Cornejo N, Chávez A, Casas E, Arana C. 2004.** Seroprevalencia de *Neospora caninum* en perros de establos lecheros de la cuenca izquierda del valle del Mantaro. *Rev Inv Vet, Perú* 15(1): 70-75.

7. **Cheadle MA, Lindsay DS, Blagburn BL. 1999.** Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs. *Vet Parasitol* 85: 325-330.
8. **De Souza SLP, Gennari SM, Yai LEO, D'Auria SRN, Cardoso SMS, Guimaraes JS, Dubey JP. 2003.** Ocurrance of *Toxoplasma gondii* antibodies in sera from dogs of the urban and rural areas from Brazil. *Braz J Vet Parasitol* 12(1): 1-3.
9. **Del Campo J, Chávez A, Delgado A, Falcón, Casas E, Serrano E. 2003.** Frecuencia de *Neospora caninum* en perros de establos lecheros del valle de Lima. *Rev Inv Vet, Perú* 14: 145-149.
10. **Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK. 1970.** The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J Exp Med* 132: 636-662.
11. **Dubey JP, Beattie CP. 1988.** *Toxoplasmosis of animals and man.* Boca Raton, USA: CRC Press. 220 p.
12. **Dubey JP, Lappin MR. 1998.** *Toxoplasmosis and neosporosis.* In: Greene CE (eds). *Infectious diseases of the dog and cat.* 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders. p 493-509.
13. **Dubey JP. 2003.** Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J Parasitol* 41(1): 1-16.
14. **Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. 2007.** Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Rev* 20: 323-367.
15. **Garcia 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.
16. **Georgieva DA, Prelezov PN, Koinarski VTS. 2006.** *Neospora caninum* and neosporosis in animals – a review. *Bulg J Vet Med* 9(1): 1-26.
17. **Gharavi MJ, Oormazdi H, 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.
18. **Gondim LFP, McAllister MM, Pitt WC, Zemlicka DE. 2004.** Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 34: 159-161.
19. **Horna S, Chávez A, Casas E, Serrano E. 2003.** Seroprevalencia de *Neospora caninum* en caninos en dos distritos de la provincia de Chachapoyas. *Rev Inv Vet, Perú* 14: 150-154.
20. **Jewell ML, Frenkel JK, Johnson KM, Reed V, Ruiz A. 1972.** Development of *Toxoplasma* oocysts in neotropical felidae. *Am J Trop Med Hyg* 21: 512-517.
21. **Lin DS. 1998.** Seroprevalences to *Toxoplasma gondii* in privately-owned dogs in Taiwan. *Prev Vet Med* 35: 21-27.
22. **Lindsay DS, Dubey JP, Butler JM, Blagburn BL. 1996.** Experimental tissue cyst induced *Toxoplasma gondii* infections in dogs. *J Euk Microbiol* 43(5): 113s (Abstr).
23. **Lindsay DS, Upton SJ, Dubey JP. 1999.** A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. *Int J Parasitol* 29: 1521-1523.
24. **Locatelli DR, Dal Pizzol J, Fridlund-Plugge N, Hoffmann DCS, Richartz RRTB, Patricio MAC, et al. 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: XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. Rio de Janeiro: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária.
25. **Mineo TWP, Silva DAO, Costa GHN, Von Ancken ACB, Kasper LH, Souza MA, et al. 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.
26. **Moore DP. 2005.** Neosporosis in South America. *Vet Parasitol* 127: 87-97.
27. **Morales J, Noé N, Falcón N, Chávez A. 2008.** Presencia de gatos como factor de riesgo para la presentación de infecciones por *Toxoplasma gondii* en canes. *Rev Inv Vet, Perú* 20: 128-133.

28. **Pereira A, Pérez M. 2002.** Toxoplasmosis. *Offarm* 21(4): 123-129.
29. **Rojas M. 2003.** Nosoparasitosis de perros y gatos peruanos. Lima: Martegraf. 83 p.
30. **Sánchez EL, Náquira CG, Vega ES. 2002.** Manual de procedimientos para el diagnóstico serológico de las zoonosis parasitarias. Serie de Normas Técnicas N° 32. Instituto Nacional de Salud. 57 p.
31. **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: 853-854.
32. **Sedlak K, Bartova E. 2006.** The prevalence of *Toxoplasma gondii* IgM and IgG antibodies in dogs and cats from the Czech Republic. *Vet Med-Czech* 51: 555-558.
33. **Tarlow JM, Rudloff E, Lichtenberger M, Kirby R. 2005.** Emergency presentations of 4 dogs with suspected neurologic toxoplasmosis. *J Vet Emerg Crit Care* 15: 119-127.
34. **Varandas NP, Rached PA, Costa GHN, Souza LM de, Castagnoli KC, Costa AJ da. 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.
35. **Venturini MC, Unzaga J, Basso W, Bacigalupe D, Larsen A, Pardini L, et al. 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.
36. **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: 1677-1682.