

Presencia de anticuerpos sericos contra *Neospora caninum* en equinos en Chile*

Sera antibodies to *Neospora caninum* in Chilean horses

A.N. PATITUCCI, MV., MPhil., M.J. PEREZ, MV., MSc., C.M. CARCAMO, MV., L. BAEZA, MV.
Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Católica de Temuco, Casilla 15-D.
Temuco, Chile. E-mail: apatituc@uct.cl

SUMMARY

Neospora caninum is a protozoan parasite that affects cattle and dogs, its infections seem to be widely prevalent in Chile. To date, nothing is known of the presence of *N. caninum* in horse population of the country. In South America, two seroprevalence studies have failed to find antibodies in Argentina and Brazil. The objective of the study was to investigate the presence of *N. caninum* exposure in horses of Chile. Sera from 145 asymptomatic horses (87 from IX Region and 58 from VII Region) were examined for antibodies to *Neospora* using the *Neospora* agglutination test (NAT). Antibodies ($\geq 1:40$) to *N. caninum* were found in 47 (32%) of 145 horses. The results have been also tabulated by breed. This is the first report of presence of antibodies against *Neospora* in horses of Chile and South America. Although equine clinical neosporosis has not been reported other than from United States, a presuntive diagnosis of the disease should be taken into consideration when evaluating abortion and or Central Nervous System illness.

Palabras clave: *Neospora caninum*, *Neospora hughesi*, equinos.

Key words: *Neospora caninum*, *Neospora hughesi*, horses.

INTRODUCCION

Neospora sp. es un parásito protozoario causante de abortos y/o enfermedad del Sistema Nervioso Central (SNC) en una variedad de animales, incluidos, caninos, bovinos, ciervos, caprinos, ovinos, equinos y otros (Dubey, 2003a y b). En equinos, taquizoitos de *Neospora* fueron encontrados por primera vez en el pulmón de un feto *natimorto* de Carolina del Norte, USA (Dubey y Portfield, 1990). Con posterioridad a este hallazgo al parásito se lo ha involucrado como causa de aborto, mortalidad neonatal y enfermedad del SNC y visceral en varias publicaciones (Gray y col., 1996; Daft y col., 1996; Marsh y col., 1996; Hamir y col., 1998; Cheadle y col., 1999; Pronost

y col., 1999). Este protozoo fue aislado por primera vez de tejido equino en 1996 (Marsh y col., 1996). Estudios biológicos y moleculares indican que la especie que infecta a los equinos es distinta a *Neospora caninum* que infecta a perros y bovinos, y tal vez a ciervos, ovejas y cabras (Dubey, 2003b). Marsh y col. (1998) propusieron el nombre *Neospora hughesi* para esta nueva especie.

Hasta el momento muy poco se sabe de la patogenicidad o prevalencia de *Neospora* en equinos, estudios serológicos han detectado anticuerpos en diferentes estados de USA (Dubey y col., 1999b; Cheadle y col., 1999) y Francia (Pitel y col., 2001), pero han fallado en detectarlos en Argentina (Dubey y col., 1999c) y Brasil (Dubey y col., 1999a).

En Chile no existe evidencia de infección en equinos; sin embargo, la enfermedad ha sido

Aceptado: 08.06.2004.

* Proyecto DIUC, N° 2003-3-01

descrita en bovinos (Patitucci y col., 1999, 2000) y caninos (Patitucci y col., 2001), por lo que ella también podría encontrarse afectando a los equinos en el país. Considerando esta posibilidad, nos propusimos buscar anticuerpos contra *N. caninum* en sueros equinos como primer paso para evaluar la presencia de infección por *Neospora* en equinos en Chile.

MATERIAL Y METODOS

En el presente trabajo se analizarán sueros de un total de 145 equinos (87 de la IX Región y 58 de la VIII Región de Chile). Los animales fueron seleccionados por conveniencia en criaderos, un club hípico y un frigorífico. Fueron categorizados como equinos de salto (60), Criollos (36), Pura Sangre de carrera (28) y de trabajo (21), los cuales se encontraban en el frigorífico local para faenamiento. Con excepción de este último grupo, todos los animales estudiados se encontraban bajo atención médico-veterinaria. En los criaderos y el club hípico no existían antecedentes de abortos y/o presentación de signología neurológica. Conjuntamente con la toma de las muestras se recolectó información relacionada al sexo y la edad de los animales.

La sangre fue obtenida de la vena yugular y enviada a la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Católica de Temuco, donde se separó el suero, el cual fue congelado a -20°C hasta su análisis.

Los sueros fueron analizados mediante Test de Aglutinación para *Neospora* (NAT, ©) según la técnica descrita por Romand y col. (1998). Dicho “test” posee como antígeno taquizoitos completos de *N. caninum*, aislados de un canino (NC-1), fijados en formalina. La reacción de aglutinación se realiza en microplacas de 96 pocillos de fondo redondo. Para el procesamiento cada suero se diluyó en 1:40 en solución salina tamponada (PBS pH 7.2) conteniendo 2-mercaptoethanol. Todos los sueros fueron chequeados en prueba tamiz en dilución 1:40 y 1:80. Los sue-

ros positivos en 1:80 fueron subsecuentemente diluidos y chequeados en 1:160 y 1:320. Los sueros y la preparación antigénica fueron mezclados e incubados durante una noche a 30°C realizándose su lectura a las 24 horas. La presencia de anticuerpos séricos produce la aglutinación en suspensión de los parásitos visible macroscópicamente en el fondo de las microplacas. La ausencia de anticuerpos produce la sedimentación en un “botón” de los parásitos en el fondo de las microplacas. Con cada “set” de sueros procesados se incluyeron sueros controles positivos y negativos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se encontraron anticuerpos en 32,0% (47/145) de los equinos estudiados. En el cuadro 1 se resumen los resultados categorizados por grupo y dilución de suero.

Del total de animales muestreados, 51.0% (74/145) correspondían a machos y 49.0% (71/145) a hembras. El 37.8% (28/74) de los machos y el 26.7 (19/71) de las hembras presentaron anticuerpos.

Los resultados del presente trabajo indican la presencia de anticuerpos contra *Neospora* en los equinos de la VIII y IX Regiones de Chile. En este estudio se seleccionó arbitrariamente un título de 1:40 del NAT como dilución de corte, basado en estudios serológicos derivados de

CUADRO 1. Número de equinos por grupo con presencia de anticuerpos séricos detectados mediante la técnica NAT en las diferentes diluciones procesadas.

Number of horses with antibodies at NAT test.

Grupo	Diluciones NAT				Posit. /tot. Grupo
	1/40	1/80	1/160	1/320	
Salto	11	7	0	2	15/37
Chileno	7	0	1	1	6/29
Carrera	2	7	0	1	10/28
Otros *	6	1	0	1	8/21
Total	26	15	1	5	47/145

© Vetoquinol S.A., Magny-Vernois BP 189-70204 Lure Cedex (France).

* Animales remitidos al frigorífico local.

infecciones experimentales con parásitos apicomplexa muy cercanamente relacionados (Romand y col., 1998). El mismo valor de corte fue utilizado por Dubey y col. (1999a,b y c); y por Pitel y col. (2001).

Organismos de *Neospora* fueron aislados de equinos de 11 años de edad y descritos como una nueva especie de *Neospora*: *N. hughesi*, basados principalmente en diferencias moleculares (Marsh y col., 1998). Sin embargo, se comprobó que esta nueva especie reacciona en forma cruzada con *N. caninum* (Marsh y col., 2001). De ser válida esta información los resultados del presente trabajo podrían deberse a reacciones contra *N. caninum* o *N. hughesi* o ambos.

En equinos, *Neospora* ha sido involucrado como causa de abortos, *natimortos* y mortalidad perinatal en varios trabajos (Dubey y Portfield, 1990; Daft y col., 1996; Hamir y col., 1998; Cheadle y col., 1999; Pronost y col., 1999). Otros estudios indican que el parásito es la causa demostrable de enfermedad neurológica (Marsh y col., 1996) y en un caso, el parásito se lo relaciona a lesiones que se limitan a intestino delgado y se asocia a los linfonódulos (Gray y col., 1996). Los organismos de *Neospora* se encuentran mayoritariamente en cerebro y médula espinal, pero en algunos casos también se han encontrado en nervios periféricos, músculos del ojo, y del intestino de fetos abortados (Walsh y col., 2000). A pesar de todos estos hallazgos descritos en la literatura y la seropositividad hallada en el presente trabajo, hasta ahora no existe en el país información de ninguno de estos cuadros asociados a *Neospora*.

Existe poca información que avale la seroprevalencia de *Neospora sp.* en equinos. Se han detectado anticuerpos en diferentes estados de USA, con porcentajes que variaron entre 10% (McDole y Gay, 2002), 11.5% (Cheadle y col., 1999), 17% (Vardeleon y col., 2001) y 21.3% (Dubey y col., 1999b). En otros países los porcentajes descritos son: 2% en Korea del Sur (Gupta y col., 2002), 23% en Francia (Pitel y col., 2001), 0% en Argentina (Dubey y col., 1999c) y en Brasil (Dubey y col., 1999a). El porcentaje de seropositividad encontrado en el

presente trabajo es alto, lo que haría suponer que la difusión de la enfermedad también sería alta. Datos referentes a bovinos y caninos coincidirían con una alta prevalencia de infección a *Neospora* en el país (Patitucci y col., 1999, 2000, 2001).

Los resultados del presente trabajo deberían ser considerados cuando se evalúan equinos con sintomatología nerviosa y/o abortos.

RESUMEN

Neospora sp. es un parásito protozoario causante de abortos y/o enfermedad del Sistema Nervioso Central (SNC) en caninos, bovinos, ciervos, caprinos, ovinos, equinos y otros. En equinos, se lo ha involucrado como causa de aborto, mortalidad neonatal y enfermedades del SNC y viscerales. La especie que infecta a los equinos es distinta a *Neospora caninum* y se denomina *Neospora hughesi*. En Chile no existe evidencia de infección en equinos, sin embargo, la enfermedad ha sido informada en bovinos y caninos, por lo que el objetivo de este trabajo fue buscar anticuerpos contra la enfermedad en sueros equinos. Para ello se tomaron muestras de sangre a 145 equinos (87 de la IX Región y 58 de la VIII Región de Chile). Los sueros fueron analizados mediante Test de Aglutinación para *Neospora* (NAT). Cada suero se diluyó en 1:40 en solución salina tamponada (PBS pH 7.2) conteniendo 2-mercaptoetanol y fueron analizados en 1:40 y 1:80. Los sueros positivos a 1:80 fueron examinados a 1:160 y 1:320. Anticuerpos contra *N. caninum* ($\geq 1:40$) se encontraron en 32% (47/145) de los equinos estudiados. Debido a que *N. caninum* y *N. hughesi* dan reacción cruzada, ambos o uno de ellos podrían ser los responsables de la seropositividad. Estos resultados indican que equinos provenientes de la VIII y IX regiones de Chile son reaccionantes a la infección de *Neospora*, por lo que su diagnóstico presuntivo debería ser considerados ante la presencia de cuadros clínicos con sintomatología nerviosa y/o abortos en esta especie.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. O. Araya, MV, PhD, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, por los aportes realizados al manuscrito.

BIBLIOGRAFIA

- CHEADLE, M.A., D.S. LINDSAY, S. ROWE, C.C. DYKSTRA, M.A. WILLIAMS, J.A. SPENCER, M.A. TOIVIO-KINNUCAN, S.D. LENZ, J.C. NEWTON, M.D. ROLLSMA, B.L. BLAGBURN. 1999. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in horse. *Int. J. Parasitol.* 29: 1537-1543.
- DAFT, B.M., B.C. BARR, N. COLLINS, K. SVERLOW. 1996. *Neospora* encephalomyelitis and polyradiculoneuritis in an aged mare with Cushing's disease. *Equine Vet. J.* 28: 240-243.
- DUBEY, J.P. 2003a. Neosporosis in cattle. *J. Parasitol.* 89: S42-S56.
- DUBEY, J.P. 2003b. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Kor. J. of Parasitol.* 41: 1-16.
- DUBEY, J.P., C.E. KERBER, D.E. GRANSTROM. 1999a. Serologic prevalence of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in horses in Brazil. *JAVMA.* 215: 225-230 .
- DUBEY, J.P., M.L. PORTERFIELD. 1990. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an aborted equine fetus. *J. Parasitol.* 76: 732-734.
- DUBEY, J.P., S. ROMAND, P. THULLIEZ, O.C. KWOK, S.K. SHEN, H.R. GAMBLE. 1999b. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in horses in North América. *J. Parasitol.* 85: 968-969.
- DUBEY, J.P., M.C. VENTURINI, L. VENTURINI, J. MCKINNEY, M. PECORARO. 1999c. Prevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses from Argentina. *Vet. Parasitol.* 86: 59-62.
- GRAY, M.L., B.G. HARMON, L. SALES, J.P. DUBEY. 1996. Visceral neosporosis in a 10-year-old horse. *J.Vet. Diagn. Invest.* 8: 130-133.
- GUPTA, G.D., J. LAKRITZ, J.H. KIM, D.Y. KIM, J.K. KIM, A.E. MARSH. 2002. Seroprevalence of *Neospora*, *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from Jeju island, South Korea. *Vet. Parasitol.* 106: 193-201.
- HAMIR, A.N., S.J. TORNQUIST, T.C. GERROS, M.J. TOPPER, J.P. DUBEY. 1998. *Neospora caninum*-associated equine protozoal myeloencephalitis. *Vet Parasitol* 79:269-274.
- LINDSAY, D.S., H. STEINBERG, R.R. DUBIELZIG, S.D. SEMRAD, D.M. KONKLE, P.E. MILLER, B.L. BLAGBURN. 1996. Central nervous system neosporosis in a foal. *J.Vet. Diagn. Invest.* 8:507-510.
- MARSH, A.E., B.C. BARR, J. MADIGAN, J. LAKRITZ, R. NORDHAUSEN, P.A. CONRAD. 1996. Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. *JAVMA.* 209: 1907-1913.
- MARSH, A.E., B.C. BARR, A.E. PACKHAM, P.A. CONRAD. 1998. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). *J Parasitol.* 84:983-991.
- MARSH, A.E., P.J. JONSON, J. RAMOS-VARA, J.C. JONSON. 2001. Characterization of *Sarcocystis neurona* isolate from a Missouri horse with equine protozoal myeloencephalitis. *Vet. Parasitol.* 95:143-154.
- MCDOLE, M.G., J.M. GAY. 2002. Seroprevalence of antibodies against *Neospora caninum* in diagnostic equine serum samples and their possible association with fetal loss. *Vet. Parasitol.* 105: 257-260.
- PATITUCCI, A.N., M.J. PEREZ, C.F. LUDERS, M.H. RATTO, A.G. DUMONT. 1999. Evidencia serológica de infección por *N. caninum* en rebaños lecheros del Sur de Chile. *Arch. Med. Vet.* 2: 215-218.
- PATITUCCI, A.N., M.J. PEREZ, K.F. ISRAEL, M.A. ROZAS. 2000. Prevalencia de anticuerpos séricos contra *N caninum* en dos rebaños lecheros de la IX Región de Chile. *Arch. Med. Vet.* 2: 209-215.
- PATITUCCI, A.N., M.J. PEREZ, M.A. ROZAS K.F. ISRAEL. 2001. *Neospora caninum*: presencia de anticuerpos séricos en poblaciones caninas rurales y urbanas de Chile. *Arch. Med. Vet.* 33: 227-232.
- PITEL, P.H., S. PRONOST, S. ROMAND, P. THULLIEZ, G. FORTIER, J.J. BALLEST. 2001. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in horses in France. *Equine Vet. J.* 33: 205-207.
- PRONOST, S., P.H. PITEL, S. ROMAND, P. THULLIEZ, C. COLLOBERT, G. FORTIER. 1999. *Neospora caninum*: première mise evidence en France sur un avorton equin, analyse et perspectives. *Parat. Vet. Equine Vet. J.* 33: 205-207.
- ROMAND, S., P. THULLIEZ, J.P. DUBEY. 1998. Direct Agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Parasitol. Res.* 84: 50-53.
- VARDELEON D., A.E. MARSH, J.G. THORNE, W. LOCH, R. YOUNG, P.J. JOHNSON. 2001. Prevalence of *Neospora hughesi* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from various geographical locations. *Vet. Parasitol.* 95: 273-282.
- WALSH C.P., R.B. DUNCAN, A.M. ZAJAC, B.L. BLAGBURN, D.S. LINDSAY. 2000. *Neospora hughesi*: experimental infections in mice, gerbils, and dogs. *Vet. Parasitol.* 92: 119-128.