

**PRESENCIA DE *NEOSPORA CANINUM* Y OTROS PARÁSITOS
GASTROINTESTINALES EN PERROS PROCEDENTES DE POBLACIONES DE
RIESGO EN ESPAÑA**

Elena Vázquez Moreno

Tutoras: Esther Collantes Fernández y Susana Pedraza Díaz

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

RESUMEN

Neospora caninum es un protozoo parásito del grupo de los Apicomplexa descrito como agente productor de aborto y mortalidad neonatal en el ganado bovino. En el ciclo biológico del parásito, el perro actúa como hospedador definitivo y los bovinos como hospedadores intermediarios. En relación a la infección por *N. caninum* en el perro, se ha sugerido que los perros vagabundos y de granjas podrían tener un papel importante en la epidemiología de la neosporosis bovina. En este estudio se analizaron muestras de suero y heces de estas dos poblaciones de riesgo para la detección de anticuerpos frente a *N. caninum* así como de ooquistes del parásito. La presencia de anticuerpos anti-*N. caninum* se detectó por inmunofluorescencia indirecta (IFI) en el 47,5% (67/141) de los sueros procedentes de los perros de granja y en 39,5% (53/134) de los perros vagabundos ($P > 0,05$; Chi-cuadrado). Cuando se analizaron los niveles de anticuerpos, los perros de granja tuvieron títulos significativamente superiores a los obtenidos en los perros vagabundos ($P < 0,01$; t-student). En relación a la detección de ooquistes, sólo en un perro de granja se pudo observar la presencia de ooquistes en heces semejantes a los de *N. caninum*. También se estudió la prevalencia de otros parásitos gastrointestinales por técnicas coprológicas o de PCR. Los valores observados fueron significativamente superiores en los perros vagabundos (72,54%) que en los de granja (55,64%) ($P < 0,01$; Chi-cuadrado). Concretamente en los perros vagabundos fue significativamente más frecuente la presencia de Ancylostomatidae, *Toxocara* y *Toxascaris*, así como de cestodos de la Familia Taenidae. Respecto a la prevalencia de las formas parasitarias de *Trichuris* y protozoos (*Cystoisospora*, *Giardia* y *Cyptosporidium*) no se observaron diferencias significativas entre ambas poblaciones de perros.

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 & Dubey, 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, 2007). Los datos que se conocen sobre la prevalencia de la infección por *N. caninum* en el perro proceden principalmente de estudios serológicos, obteniéndose resultados muy variados en función del país y origen de los animales (Dubey et al., 2007). Por su parte, se ha observado que las tasas de seropositividad encontradas en los perros de origen rural son significativamente más elevadas que las observadas en perros urbanos (Wouda et al., 1999; Basso et al., 2001b; Fernandes et al., 2004; Ferroglio et al., 2007). En este sentido, también se ha señalado una asociación significativa entre la presencia de perros en las granjas y el porcentaje de vacas seropositivas indicándose que la presencia de perros cerca de granjas es un posible factor de riesgo (Bartles et al., 1999; Wouda et al., 1999). La infección por transmisión horizontal del ganado bovino posiblemente tendría lugar por la ruta orofecal, el hospedador definitivo eliminaría pequeñas cantidades de ooquistes (McAllister et al., 1998) que contaminarían el pasto, forrajes, agua de bebida o piensos almacenados. Sin embargo, la presencia de ooquistes en perros naturalmente infectados se ha señalado en muy pocas ocasiones (Basso et al., 2001a; Slapeta et al., 2002; McGarry et al., 2003; Schares et al., 2005). Por otra parte, los parásitos gastrointestinales son uno de los agentes enteropatógenos más importantes en el perro y varios de estos agentes son responsables de importantes zoonosis como *Larva migrans* (toxocariosis y ancilostomidosis), Equinococosis, Giardiosis y Criptosporidiosis.

En España recientemente se ha sugerido que los perros vagabundos y de granjas bovinas podrían tener un papel importante en la epidemiología de la neosporosis bovina. Asimismo, las poblaciones caninas poco controladas y con acceso a zonas habitadas por el hombre, pueden representar una fuente importante de infección parasitaria, por lo que es importante conocer la presencia de estos parásitos gastrointestinales.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue investigar la presencia de la infección por *N. caninum* mediante la detección de anticuerpos y de otros parásitos gastrointestinales en perros procedentes de poblaciones de riesgo en España.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental

Para este estudio se recogieron muestras de suero y heces de perros vagabundos procedentes de un hábitat rural o semi-rural, recibidos en los servicios municipales de saneamiento de La Rioja, y de perros de explotaciones de ganado bovino procedentes de Lugo. En total se muestrearon 285 perros (134 de La Rioja y 151 de Galicia). Las muestras de suero se analizaron por inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de anticuerpos anti-*N. caninum* y las de heces mediante el método coprológico rutinario para carnívoros (Método Teleman) para la detección parásitos gastrointestinales. La presencia de *Cryptosporidium* y *N. caninum* en heces se analizó también mediante PCR. Por otra parte, debido a que los ooquistes *N. caninum* y de *Hammondia heydorni* son morfológicamente indistinguibles y que el perro puede actuar como hospedador definitivo de ambos parásitos, las muestras heces con ooquistes similares se analizaron por técnicas de PCR específicas. Asimismo con el objetivo de confirmar la etiología de los ooquistes también se realizó un bioensayo en Gerbo (*Meriones unguatus*).

IFI

La detección de anticuerpos específicos frente a *N. caninum* en el suero de los perros se determinó mediante la técnica de IFI (Trees et al., 1993). Como antígeno se emplearon taquizoítos de *N. caninum* (aislado Nc-1) obtenidos en cultivo celular. Como punto de corte se consideró la dilución 1:50 y las muestras que resultaron positivas se titularon, realizándose diluciones seriadas hasta conseguir la última dilución positiva.

Método Teleman

Se procesaron aproximadamente 5 g de heces de cada animal utilizando el método coprológico rutinario para carnívoros (Método Teleman), y posteriormente se realizó una

flotación con solución de sacarosa. Las muestras se examinaron con un microscopio óptico utilizando el objetivo de 400.

Extracción de ADN y técnicas de PCR en heces

El ADN se extrajo de las heces utilizando la técnica de isotiocianato de guanidina y silica, tras agitación con bolitas de zirconio con esferas de vidrio (0,5 mm de diámetro). Una vez aislado el DNA se realizó una PCR para la detección de *N. caninum* (Buxton et al., 1998) y otra para *Cryptosporidium* (Xiao et al., 2000). Por su parte en las muestras en las que se observó la presencia de ooquistes de 9–14 µm de diámetro, también se realizó una PCR para la detección de *H. Heydorni* (Slapeta et al., 2002).

Bioensayo

El bioensayo se realizó a partir de ooquistes esporulados de muestras fecales en las que se observaron ooquistes semejantes a los de *N. caninum* o *H. Heydonri*. Con el fin de inducir el proceso de esporulación, al sedimento del Teleman se añadió una solución de SO₄H₂ al 2,5% y se conservaron a temperatura ambiente en condiciones aeróbicas durante 3-5 días. A continuación, los ooquistes esporulados fueron purificados y concentrados mediante solución de sacarosa y lavados con agua destilada. Los gerbos (*Meriones unguulatus*) fueron infectados oralmente con los ooquistes. Los gerbos inoculados se sacrificaron a los 4 meses recogiendo el cerebro para ser analizado por una PCR específica de *N. caninum*. Por su parte, se recogió sangre para el análisis serológico por IFI.

Extracción de ADN y PCR de muestras de tejido

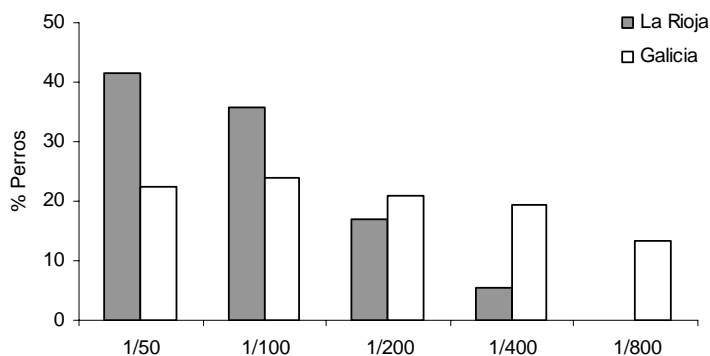
Para la extracción del ADN a partir de las muestras procedentes de los gerbos, se empleó como método de extracción una prueba comercial (Realpure, Durviz) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para detectar la presencia del parásito en las muestras de cerebro se empleó una PCR anidada del segmento ITS1 (Buxton et al., 1998).

RESULTADOS

Seroprevalencia de *N.caninum*

La presencia de anticuerpos anti-*N. caninum* se detectó en el 43,63% (120/275) de los perros, obteniéndose títulos entre 1:50 y 1:800. La seroprevalencia más elevada se observó en los perros de granja, de los cuales el 47,51% fueron positivos (67/141). En los perros de La Rioja la seroprevalencia obtenida fue del 39,55% (53/134), no observándose diferencias estadísticamente significativamente al comparar estas dos poblaciones ($P>0,05$; Chi-cuadrado). Cuando se analizaron los niveles de anticuerpos, los perros de Galicia tuvieron títulos significativamente superiores a los obtenidos en los perros de la Rioja ($P<0,01$; t-student). Al estudiar la distribución de los títulos (Figura 1), en los perros de Galicia se observó significativamente más animales con títulos 1:400 y 1:800 ($P\leq 0,05$; Chi-cuadrado), mientras que el título 1:50 fue significativamente más frecuente en los perros de La Rioja ($P<0,05$; Chi-cuadrado). 39,5%; en Galicia, un 47,5% ($P>0,05$; Chi-cuadrado).

Figura 1. Distribución de los títulos en los perros seropositivos de La Rioja y Galicia



Por otra parte, los perros muestreados de Galicia procedían de 85 explotaciones bovinas, de las cuales 65 eran granjas seropositivas a *N. caninum* y 20 seronegativas. Se estudió la prevalencia de perros seropositivos en ambos tipos de explotaciones y aunque la prevalencia de perros con anticuerpos frente a *N. caninum* fue mayor en las granjas seropositivas que en las seronegativas (58,46% versus 40%) no se observaron diferencias significativas ($P>0,05$; Chi-cuadrado). Asimismo, aunque los títulos de los perros de las

granjas seropositivas fueron también más elevados que aquellos procedentes de explotaciones negativas, tampoco el análisis estadístico reveló significación ($P > 0,05$; t-student). Sin embargo, sí se observó una asociación positiva entre la presencia de anticuerpos en un perro y la seropositividad de una explotación de ganado bovino (riesgo relativo = 2,1; odd ratio).

Prevalencia de perros que eliminan formas parasitarias en heces

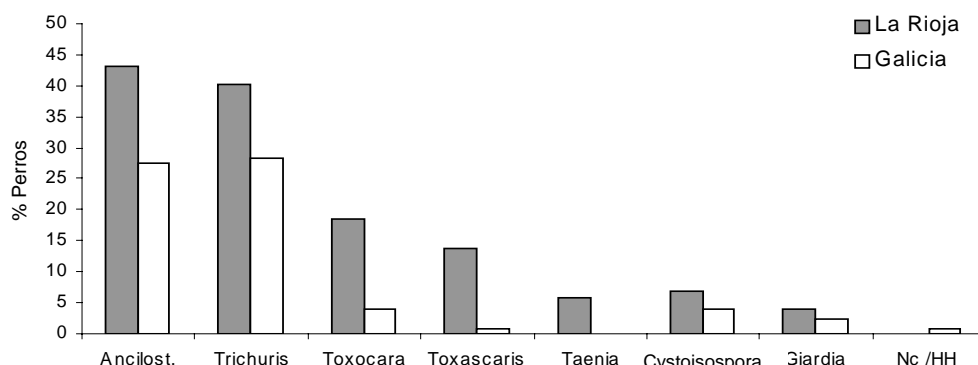
N. caninum

En total se analizaron 226 muestras de heces (102 de La Rioja y 124 de Galicia) y sólo en un perro de granja se pudo observar la presencia de ooquistes semejantes a los de *N. caninum*. El perro fue inicialmente seronegativo y el número de ooquistes observados fue muy bajo. La muestra se puso a esporular en una solución de dicromato potásico al 2,5% durante un periodo máximo de 7 días a temperatura ambiente, observándose al quinto día la presencia de algunos ooquistes esporulados. Se realizó una PCR específica de *N. caninum* y *H. Heydorni* pero se obtuvieron resultados negativos. A los 6 meses de recibir esta muestra, se recibió otra muestra de suero del mismo perro obteniéndose un título 1:50, pudiendo indicar que los ooquistes podrían ser de *N. caninum*. Por otra parte, con el fin de incrementar la oportunidad de detectar la presencia de *N. caninum* en las heces se realizó una PCR de 188 muestras de heces, siendo todas negativas.

Otros parásitos gastrointestinales

En las muestras procedentes de La Rioja, en el 72,54% (74/102) de la heces se observó la presencia de uno o varios parásitos gastrointestinales, siendo significativamente superior que la prevalencia encontrada en los perros de Galicia que fue del 55,64% (69/124) ($P < 0,01$; Chi-cuadrado). Cuando se compararon las prevalencias, se observó que en los perros de La Rioja fue significativamente más frecuente la presencia de Ancylostomatidae ($P = 0,01$; Chi-cuadrado), *Toxocara* y *Toxascaris* ($P < 0,001$; Chi-cuadrado) así como de cestodos de la Familia Taenidae ($P < 0,05$; Chi-cuadrado). Respecto a la prevalencia de las formas parasitarias de protozoos (*Cystoisospora*, *Giardia* y *N. caninum/H. heydorni*) y de *Trichuris* no se observaron diferencias significativas entre ambas poblaciones de perros ($P > 0,05$; Chi-cuadrado) (Figura 2). Asimismo se realizó una PCR para la detección de *Cryptosporidium* en 188 muestras de heces de los perros de Galicia, siendo todas negativas.

Figura 2. Prevalencia de parásitos gastrointestinales en los perros de La Rioja y Galicia.



Bioensayo

Mediante bioensayo se inocularon los ooquistes esporulados a gerbos. A los 25, 40 y 150 días post-inoculación se realizó un IFI, siendo negativo en todos los casos. A los 4 meses se sacrificaron y se hizo análisis del cerebro por PCR, siendo igualmente negativa.

CONCLUSIONES

En las poblaciones de perros vagabundos y de granja estudiadas fue frecuente el contacto con *N. caninum*, porque los valores de seroprevalencia observados fueron elevados. Asimismo, los perros de granja podrían tener mayor accesibilidad a posibles fuentes de infección, ya que sus títulos de anticuerpos son significativamente más elevados, y se ha observado una asociación positiva entre la seropositividad del perro y la explotación bovina. No encontramos una asociación entre los resultados de seroprevalencia y la presencia de ooquistes. La observación de perros que eliminen ooquistes parece ser muy difícil, ya que el patrón de eliminación de *N. caninum* puede ser similar al de *Toxoplasma gondii* en el gato y sólo se produce en la primoinfección y durante los primeras semanas aproximadamente.

Las poblaciones de perros vagabundos y de granja son una importante fuente de contaminación ambiental de otras formas de parásitos gastrointestinales, lo cual podría tener repercusiones en la salud humana y animal.

Agradecimientos

En este estudio han participado Javier Regidor, los Servicios municipales de Saneamiento de La Rioja, Laboratorio Regional de Sanidad y Producción Animal de Lugo. Agradecer especialmente su colaboración a Ignacio Árnaiz y a los veterinarios de Lugo por la recogida de las muestras y los datos. Est estudio ha sido financiado por Proyecto Complutense (PR1/06-14467-B) e INIA (RTA04-047-C2).

BIBLIOGRAFÍA

- Basso, W., Venturini, L., Venturini, M.C., Hill, D.E., Kwok, O.C.H., Shen, S.K., Dubey, J.P., 2001a. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *J. Parasitol.* 87, 612-618.
- Basso, W., Venturini, L., Venturini, M.C., Moore, P., Rambeau, M., Unzaga, J.M., Campero, C., Bacigalupe, D., Dubey, J.P., 2001b. Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef-cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. *J. Parasitol.* 87, 906-909.
- Bartels, C.J.M., Wouda, W., Schukken, Y.H., 1999. Risk factors for *Neospora caninum* associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology.* 52, 247-257.
- 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.
- Dubey, J.P., Schares, G., Ortega-Mora, L.M., 2007. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Rev.* 20, 323-67.
- Fernandes, B.C.T.M., Gennari, S.M., Souza, S.L.P., Carvalho, J.M., Oliveira, W.G., Cury, M.C., 2004. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs from urban, periurban and rural areas of the city of Uberlandia, Minas Gerais-Brazil. *Vet. Parasitol.* 123, 33-40.
- Ferroglio, E., Pasino, M., Ronco, F., Bena, A., Trisciuglio, A., 2007. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in urban and rural dogs in north-west Italy. *Zoonoses Public Health.* 54, 135-9.
- Gondim, L.F., McAllister, M., Pitt, W., Zemlicka, D., 2004. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 34, 159-161.

- 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.
- 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.
- 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, 628-30.
- 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.
- 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, 1525-37.
- Slapeta, J.R., Modry, D., Kyselova, I., Horejs, R., Lukes, J., Koudela, B., 2002. Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. *Vet. Parasitol.* 109, 157-67.
- Thilsted, J. P. and J. P. Dubey. 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.
- Wouda, W., Dijkstra, T., Kramer, A.M., van Maanen, C., Brinkhof, J.M., 1999. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *Int. J. Parasitol.* 29, 1677-82.
- Xiao L, Alderisio K, Limor J, Royer M, Lal AA. 2000. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. *Appl Environ Microbiol.*;66:5492-8.