

Universidad Nacional
Facultad de Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria

**Seroprevalencia de *Sarcocystis neurona*, *Neospora hughesi* y
Toxoplasma gondii en equinos de Costa Rica**

Modalidad: Tesis de grado

**Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado Académico
Licenciatura en Medicina Veterinaria**

Catalina Víquez Murillo

Campus Presbítero Benjamín Núñez

2010

Aprobación del Tribunal Examinador

Seroprevalencia de *Sarcocystis neurona*, *Neospora hughesi* y *Toxoplasma gondii* en equinos de Costa Rica

Msc. Maria Antonieta Corrales Araya

Decano _____

Dra. Laura Castro

Directora _____

Dr. Juan José Romero Zúñiga

Tutor _____

Dr. Omar González

Co-tutor _____

Dra. Jaqueline Bianque de Oliveira

Lectora _____

Fecha: _____

DEDICATORIA

A mi esposo

Mis padres y mis hermanos (Kary, Karla, Leo y Rodri)

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a Dios, a mi esposo Luis Diego que ha sido parte de esta tesis desde el principio, a mis padres que me ayudaron a lo largo de todo el camino, a mis hermanas, por creer en mí, a mis hermanos por ser parte de nuestra familia.

A mis tías, tíos y mi abuelo que siempre me han apoyado.

A mis abuelas que aunque ya no están aquí, han sido parte de este logro.

A la familia de mi esposo que se han preocupado por mí.

Quiero agradecer a la Dra. Jaqueline Bianque de Oliveira, porque sin su apoyo esta tesis no hubiera sido posible, gracias por ser mi tutora, fue una gran guía a lo largo de todo este trabajo de investigación. Al Dr. Omar González la ayuda.

Al Dr. Juan José Romero por su paciencia, dedicación, tiempo y por asumir el papel de tutor, muchas gracias. A Jorgito por tener paciencia y ser parte de esto. Al Dr. Jaime Villalobos que se interesó en el tema y me ayudó.

Al Dr. Alejandro Gómez por la iniciativa. Al Dr. Leonel Navarro por su colaboración.

Al Dr Daniel K. Howe y su personal del MH Gluck Equine Research Center, así como al Dr. Jitender P. Dubey y su personal del Animal Parasitic Diseases Laboratory del USDA por aceptar las muestras para análisis.

A muchos amigos que hicieron que esta tesis fuera posible: Migue, Naty Soto, Raúl, Cris y Eduardo.

A mis compañeros de internado (Rolo, Cynthia, Caro, Mariano, Diego y Andrés) y a toda la gente que contribuyeron de una u otra manera para que este trabajo fuera posible.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE DE CONTENIDOS	V
INDICE DE CUADROS	VII
INDICE DE FIGURAS	VIII
INDICE DE ABREVIATURAS	IX
RESUMEN	X
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Justificación	6
1.3. Objetivos	7
<i>1.3.1. Objetivo general</i>	7
<i>1.3.2. Objetivos específicos</i>	7
2. METODOLOGÍA: MATERIALES Y MÉTODOS	8
2.1. Tipo de estudio y tamaño de la muestra	8
2.2. Población de estudio	8
2.3. Recolección y procesamiento de las muestras de sangre	9
2.4. Análisis de datos	10
3. RESULTADOS	12
3.1. Estudio serológico	12
3.2. Encuestas	13
3.3. Análisis de factores de riesgo	15
4. DISCUSIÓN	17

4.1. Seroprevalencia de <i>S. neurona</i>, <i>T. gondii</i> y <i>N. hughesi</i>	17
4.2. Factores de riesgo asociados a la seroprevalencia de <i>S. neurona</i>	20
5. CONCLUSIONES	24
6. RECOMENDACIONES	25
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
8. ANEXOS.....	37
8.1. Anexo 1. Encuesta para las caballerizas	37

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Seroprevalencia de <i>Sarcocystis neurona</i> en equinos de Costa Rica.....	14
Cuadro 2. Análisis multivariado de los factores asociados con la seropositividad de equinos a <i>Sarcocystis neurona</i>	16

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de los equinos muestreados en Costa Rica.....	9
Figura 2. Western blot de animales seropositivos a <i>Neospora hughesi</i> , con énfasis en las proteínas de 29 y 35 kD.....	13
Figura 3. Distribución de los equinos seropositivos a <i>Sarcocystis neurona</i> en Costa Rica.....	15
Figura 4. Distribución de <i>Didelphis virginiana</i> en Costa Rica.....	22
Figura 5. Distribución de <i>Didelphis marsupialis</i> en Costa Rica.....	23

INDICE DE ABREVIATURAS

EPM: Mieloencefalitis protozoaria equina.

WB: Western blot.

LCR: Líquido cefalorraquídeo.

IFI: Inmunofluorescencia indirecta.

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción enzimático.

rELISA: Ensayo de inmunoabsorción enzimático utilizando antígenos recombinantes.

SnSAG2: Antígeno recombinante para *Sarcocystis neurona*.

NhSAG1: Antígeno recombinantes para *Neospora hughesi*.

MAT: Prueba de aglutinación modificada.

kDa: Kilodaltons.

APDL-USDA: Animal Parasitic Diseases Laboratory – United States Department of Agriculture (Laboratorio de Enfermedades Parasitarias del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos).

RP: Razón de prevalencia.

OR: Odds Ratio.

M.S.N.M.: Metros sobre el nivel del mar.

RESUMEN

Sarcocystis neurona, *Neospora hughesi* y *Toxoplasma gondii* son los protozoarios involucrados en la etiología de la Mieloencefalitis Protozoaria Equina (EPM por su sigla en inglés), enfermedad neurológica más comúnmente diagnosticada en equinos en el continente Americano. Debido a los constantes relatos de diagnóstico clínico de EPM en el país, el objetivo de este estudio fue determinar la seroprevalencia de *S. neurona*, *T. gondii* y *N. hughesi*, utilizando la prueba de ELISA con proteínas recombinantes de *S. neurona* y *N. hughesi*; así como el western blot, prueba de oro para *N. hughesi*. La prueba de aglutinación modificada (MAT) fue utilizada para el diagnóstico de anticuerpos anti-*T. gondii*. En total se recolectaron muestras de sangre de 315 equinos de todo el país, de varias razas, diferentes edades, ambos sexos, en diferentes condiciones de manejo y para diversos fines. Para el análisis de los factores asociados con la seroprevalencia de *S. neurona*, se utilizó una encuesta que fue contestada por los encargados de los animales. Las muestras fueron procesadas en dos laboratorios: el MH Gluck Equine Research Center de la Universidad de Kentucky y el Animal Parasitic Diseases Laboratory del USDA. La seroprevalencia de *S. neurona*, *T. gondii* y *N. hughesi* fueron: 41.3%, 33.3% y 0.3%, respectivamente. Anticuerpos anti-*S. neurona* y *T. gondii* y anti-*N. hughesi* y *T. gondii* fueron detectados en 18.1% y 0.3% de los equinos, respectivamente. Entre los equinos estudiados, sólo uno había sido previamente diagnosticado con EPM con base a los signos clínicos. Dicho animal se presentó seropositivo a *S. neurona*. Los principales factores intrínsecos y extrínsecos asociados a la seroprevalencia fueron: la edad (mayores de 6 años), la raza (razas puras), el manejo (permanencia en potreros), la actividad (deporte y trabajo) y procedencia (Valle central). Fueron detectados animales seropositivos en todas las provincias, excepto en Guanacaste, donde habita el *Didelphis*

virginiana que es el principal hospedero definitivo reconocido de *S. neurona*. Las seroprevalencias obtenidas en este estudio únicamente indican la exposición de los animales a los agentes etiológicos involucrados en la EPM, no así la enfermedad clínica. No obstante, la EPM debe ser considerada en el diagnóstico diferencial de las enfermedades neurológicas de los equinos del país. Más estudios son necesario para el conocimiento de la epidemiología de la EPM en Costa Rica, sobre todo el rol de *D. virginiana* y *D. marsupialis* en la transmisión de *S. neurona*.

ABSTRACT

Sarcocystis neurona, *Neospora hughesi* and *Toxoplasma gondii* are the protozoarian involved in the etiology of Equine Protozoal Myeloencephalitis (EPM), a neurological disease more commonly diagnosed in equines in America. Due to the constant clinical reports of EPM in the country, the objective of this study was to determine the seroprevalence of *S. neurona*, *T. gondii* and *N. hughesi* using the ELISA test with the recombinant protein of *S. neurona* and *N. hughesi*, as well as the most accurate test for *N. hughesi*, the Western blot. The modified agglutination test (MAT) was used to diagnose antibodies of *T. gondii*. In total, 315 equine blood samples from all around the country were collected. The horses were of several breeds, varied ages, both sexes, bred, management and used for different activities. A questionnaire was used in order to analyze the factors associated with the seroprevalence of the *S. neurona*. The samples were processed in two laboratories: the MH Gluck Equine Research Center in the University of Kentucky and the Animal Parasitic Diseases Laboratory of the United States Department of Agriculture (USDA). The seroprevalence of *S. neurona*, *T. gondii* and *N. hughesi* were: 41.3%, 33.3% and 0.3%, respectively. Antibodies of *S. neurona* and *T. gondii*, were detected in 18.1% while antibodies of *N. hughesi* and *T. gondii* were detected in 0.3% of the equines. Among the equines studied, only one had been previously diagnosed with EPM based on clinical signs. This animal was seropositive to *S. neurona*. The main intrinsic and extrinsic factors associated with the seroprevalence were: age (older than 6 years), breed (pure breed), management (time spent in the pasture), activity (sporting and work) and proceeding (Central valley). Seropositive animals were found in all provinces, except in Guanacaste,

where lives the main known definitive host of *S. neurona*, the opossum *Didelphis virginiana*. The seroprevalence obtained in this study only indicates the exposure of these animals to the etiological agents involved in EPM, not the clinical disease. Nevertheless, EPM should be considered in the differential diagnosis of the neurological disease of the equines in the country. Further studies are necessary in order to know the epidemiology of EPM in Costa Rica, especially the role of *D. virginiana* and *D. marsupialis* in the transmission of *S. neurona*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Sarcocystis neurona, *Neospora caninum*, *N. hughesi* y *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa, Sarcocystidae) son los protozoarios involucrados en la etiología de la mieloencefalitis protozoaria equina (EPM por su sigla en inglés), enfermedad neurológica más comúnmente diagnosticada en equinos en Norteamérica (Dubey et al., 1991, 2001b; MacKay, 1997; Marsh et al., 1996, 1998, 1999; Hoane et al., 2005b, 2006; Finno et al., 2007). *S. neurona* es el principal agente etiológico de la EPM, reportada en caballos y ponies del continente americano o importados de América (Dubey et al., 1991, 2001b). Los zorros pelones (*Didelphis virginiana* y *D. albiventris*) son los únicos hospederos definitivos de *S. neurona*, por lo que la distribución geográfica de la EPM coincide con la distribución geográfica de *Didelphis* spp. (Fenger et al., 1997; Dubey et al., 2001c). Al contrario de *S. neurona*, *N. caninum*, *N. hughesi* y *T. gondii* presentan una distribución geográfica más amplia (Vardeleon et al., 2001; Gupta et al., 2002; Pitel et al., 2003).

Una gran variedad de mamíferos tales como mapaches, caninos y felinos domésticos, visones, zorrillos, cebras, focas y armadillos son los hospederos intermediarios de *S. neurona* (Fenger et al., 1997; Dubey et al., 1991; 2001b). Para la mayoría de los especialistas, los caballos y ponies actúan como hospederos accidentales (Fenger et al., 1997; Dubey et al., 1991; 2001b). No obstante, Mullaney et al. (2005) identificaron la presencia de sarcocistos de *S. neurona* en la musculatura de un potro en los Estados Unidos; lo que caracteriza a los caballos como hospederos intermediarios. El ciclo merogónico de este protozoario ocurre en los tejidos endoteliales de los hospederos intermediarios, mientras la gametogonia sucede en el

epitelio intestinal del hospedero definitivo; el cual excreta esporoquistes infectantes en sus heces (Dubey et al., 2001b; Mullaney et al. 2005). Los hospederos definitivos se infectan al ingerir tejido muscular de los hospederos intermediarios infectados con los sarcocistes de *S. neurona* (Dubey et al., 2001b; Mullaney et al., 2005). Los esporozoítos son liberados e invaden las células del epitelio intestinal donde sufren merogonia (Dubey et al., 2001b; Mullaney et al., 2005). Los merozoítos formados, son capturados por macrófagos y luego invaden las células endoteliales; y así son transportados hacia el sistema nervioso central de los hospederos intermediarios (Dubey et al., 2001b; Mullaney et al., 2005).

En la mayoría de los equinos, el protozooario es destruido por una respuesta inmunológica competente; mientras que en otros, los merozoítos llegan al sistema nervioso central. Algunos estudios han demostrado que la infección se desarrolla tanto en animales inmunocompetentes como inmunodeficientes (Saville et al., 2001; Sellon et al., 2004). La enfermedad es más común en caballos entre 1 y 5 años, aunque puede afectar a caballos de cualquier edad (Fayer et al., 1990; Saville et al., 1997a, 1997b).

Debido a que este protozooario puede infectar cualquier parte del sistema nervioso central, es posible encontrar gran variedad de signos neurológicos (Malikides et al., 2000; Dubey et al., 2001b). La EPM es frecuentemente una enfermedad debilitante progresiva y los signos clínicos pueden variar de agudos a insidiosos, comenzando con signos focales a multifocales de enfermedad neurológica (Dubey et al., 2001b). Los signos clínicos pueden incluir: debilidad, ataxia, pérdida de la propiocepción, incoordinación, atrofia muscular, cambios de comportamiento y muerte (Dubey et al., 2001b; Finno et al., 2007). Para los clínicos, hay tres signos muy típicos que permiten sospechar de EPM: caminar tambaleante, ataxia y atrofia muscular (Caro, 2003; Gómez García, 2007; González, 2009). Sin embargo,

estos signos clínicos son comunes a otras enfermedades del sistema nervioso; por lo que el diagnóstico clínico no es definitivo y necesita ser confirmado por pruebas de laboratorio (Dubey et al., 2001b; Finno et al., 2007; Gómez García, 2007; González, 2009; Oliveira, 2009).

Se han realizado varios estudios de seroprevalencia de *S. neurona* en equinos en el continente americano: Estados Unidos (Bentz et al., 1997; Blythe et al., 1997; Saville et al., 1997; Rossano et al., 2001; Vardeleon et al., 2001; Dubey et al., 2003), Canadá (Dubey et al., 2001b), Brasil (Dubey et al., 1999a; Hoane et al., 2006), Panamá (Granstrom et al., 1992) y Argentina (Dubey et al., 1999b; Caro, 2003). Las pruebas utilizadas para la detección de anticuerpos anti-*S. neurona* en muestras de suero y de líquido cefalorraquídeo (LCR) incluyen: western blot (WB), aglutinación directa, inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ensayos de inmunoabsorción enzimática utilizando antígenos recombinantes (rELISA) (Granstrom et al., 1993; Rossano et al., 2000; Lindsay & Dubey, 2001; Daft et al., 2002; Duarte et al., 2003; Hoane et al., 2005a). De éstos, el western blot es la prueba oro, con 99% de sensibilidad y 98% especificidad (Granstrom et al., 1993; Bernard, 1998; Rossano et al., 2000; Daft et al., 2002). La seropositividad únicamente indica exposición al *S. neurona*, no que esté clínicamente enfermo (Dubey et al., 2001b; Finno et al., 2007). En los Estados Unidos, aproximadamente 50% de los equinos son seropositivos, dependiendo de la zona estudiada (Bentz et al., 1997; Blythe et al., 1997; MacKay, 1997; Rossano et al., 2001; Dubey et al., 2003; Hoane et al., 2005a). Sin embargo, menos del 1% llegan a desarrollar la enfermedad (Clark et al., 1981; Granstrom et al., 1992; Malikides et al., 2000; Katayama et al., 2003). No se conoce a cabalidad los factores involucrados en la diferencia entre infección

inaparente y enfermedad clínica, por lo que esta ambigüedad es el principal obstáculo para el diagnóstico y control de la EPM (Hoane et al., 2005a).

El diagnóstico de la EPM se basa en el examen neurológico y en la detección de anticuerpos anti-*S. neurona* en el LCR, así como en la eliminación de otras posibles enfermedades neurológicas (Granstrom et al., 1993; Bernard, 1998; Rossano et al., 2000; Hoane et al., 2005a). Aunque con frecuencia la presencia de anticuerpos anti-*S. neurona* en el LCR de animales con signos clínicos sea utilizada para diagnosticar la EPM, resultados falso-positivos pueden ocurrir cuando la muestra se contamina con sangre en el momento de la recolecta (Dubey et al., 2001b; Finno et al., 2007). Por lo anterior, el diagnóstico seguro y definitivo de EPM se basa en la histopatología e inmunohistoquímica (Finno et al., 2007).

Los programas de control se basan en el tratamiento de animales enfermos y en la prevención de la enfermedad, lo cual se dificulta ya que el hospedero definitivo es un animal silvestre; por lo que se recomienda que se recojan los desechos de especies muertas (Saville et al., 2002), además de evitar el acceso de los zorros pelones a las áreas de alimentación de los equinos (Rossano et al., 2003; Gómez García, 2007). Atrapar y relocalizar a los zorros puede disminuir la morbilidad de la enfermedad en áreas endémicas (Rossano et al., 2003; Gómez García, 2007).

Existen pocos reportes de neosporosis asociada con enfermedad neurológica en equinos (Lindsay et al., 1996; Marsh et al., 1996; Daft et al., 1997; Cheadle et al., 1999) y la información respecto a la seroprevalencia mundial de anticuerpos anti-*Neospora* spp. en equinos es limitada (Cheadle et al., 1999; Dubey et al., 1999a, 1999b). El perro doméstico y el coyote son los únicos hospederos definitivos conocidos de *N. caninum* (McAllister et al., 1998). Aunque *Neospora* spp. puede ser transmitido congénitamente, la neosporosis congénita

equina es de rara ocurrencia (Dubey & Porterfield, 1990). En 1998, la especie *Neospora hughesi* fue aislada de un caballo con EPM en los Estados Unidos (Marsh et al., 1996, 1998); desde entonces, este protozoario ha sido considerado en la etiología de esta enfermedad (Lindsay et al., 1996; Marsh et al., 1996, 1998; Daft et al., 1997; Cheadle et al., 1999; Dubey et al., 2001a). Sin embargo, la epidemiología de *N. hughesi* y su importancia como agente causal de EPM son poco conocidos (Marsh et al., 1996, 1998; Dubey et al., 2003). La seroprevalencia de *N. hughesi* varía de 0 a 31% en EUA, Brasil, Argentina y Corea del Sur (Vardeleon et al., 2001; Gupta et al., 2002; Dubey et al., 2003; Hoane et al., 2005b, 2006). Según Hoane et al. (2006), la infección por *Neospora* spp. no es común en caballos.

Antes del descubrimiento de *S. neurona* y *Neospora* spp., los casos clínicos de EPM en equinos fueron diagnosticados como toxoplasmosis (Macruz et al., 1975; Dubey & Beattie, 1988; Dubey et al., 1999a). En comparación con *S. neurona* y *N. caninum*, la seroprevalencia de *T. gondii* es baja y no es definitiva la evidencia de que este protozoario cause enfermedad neurológica en equinos (Gupta et al., 2002; Dubey et al., 2003), a pesar del registro de la infección por el protozoario en el SNC de equinos en Brasil (Macruz et al., 1975). La seroprevalencia de *T. gondii* en equinos de los Estados Unidos, Corea del Sur, Argentina y Brasil varía de 0.4% a 15.8% (Dubey et al., 1999a, 1999b, 1999c; Gupta et al., 2002). Los felinos son los hospederos definitivos de *T. gondii* y los mamíferos son sus hospederos intermediarios (Dubey & Beattie, 1988).

Asimismo, aunque las evidencias de que *T. gondii* cause enfermedad neurológica en equinos no sean definitivas (Gupta et al., 2002; Dubey et al., 2003), existen registros de la infección por el protozoario en el SNC de equinos en Brasil (Macruz et al., 1975).

1.2 Justificación

Excepto por un reporte de infección por *S. neurona* en Panamá (Ganstrom et al., 1992) y dos reportes en Brasil (Barros et al., 1986; Masri et al., 1992), los reportes de EPM (incluyendo las infecciones por *Neospora* spp. y *Sarcocystis* spp.) ocurrieron en los Estados Unidos (Dubey et al., 1999).

En Costa Rica, Gómez García (2007) reportó un caso de EPM que fue diagnosticado con base a los signos clínicos y el resultado positivo de la prueba de western blot para *S. neurona*. Asimismo, varios médicos veterinarios reportan que han diagnosticado clínicamente casos de EPM (González, 2009; Oliveira, 2009); lo anterior a pesar que la inespecificidad de los signos clínicos (Malikides et al., 2000; Dubey et al., 2001b; Caro, 2003). El diagnóstico diferencial de EPM es vasto e incluye: mieloencefalopatía degenerativa equina (MDE), mielopatía cervical estenótica equina, mieloencefalopatía equina por virus herpes equino tipo 1, trauma de cordón espinal, neuritis de la cauda equina, encefalitis viral, meningitis, osteomielitis, rabia, absceso cerebral, enfermedad de las neuronas motoras equina, anormalidades congénitas (Malikides et al., 2000; Robinson, 2003).

Por lo anterior, es necesario conocer la prevalencia serológica de *S. neurona*, *N. hughesi* y *T. gondii* en equinos de Costa Rica.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Determinar la seroprevalencia de *Sarcocystis neurona*, *Neospora hughesi* y *Toxoplasma gondii* en equinos de Costa Rica.

1.3.2. Objetivos específicos

- 1.3.2.1. Determinar la seroprevalencia de *S. neurona*, utilizando la prueba de ELISA con la proteína recombinante SnSAG2 (rSnSAG2).
- 1.3.2.2. Determinar la seroprevalencia de *N. hughesi*, utilizando la prueba de ELISA con la proteína recombinante NhSAG1 (rNhSAG1) y el western blot como prueba confirmatoria.
- 1.3.2.3. Determinar la seroprevalencia de *T. gondii*, utilizando la prueba de aglutinación modificada (MAT).
- 1.3.2.4. Identificar la distribución de los animales seropositivos a *S. neurona* en el país.
- 1.3.2.5. Determinar los factores de riesgo, tanto intrínsecos como extrínsecos, asociados a la seropositividad a *S. neurona*.

2. METODOLOGÍA: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Tipo de estudio y tamaño de la muestra

La seroprevalencia de *S. neurona* fue determinada mediante un estudio transversal basado en el muestreo serológico, tomando como parámetros para determinar el tamaño de la muestra una población superior a 50 mil equinos, una seroprevalencia esperada de 1% y un nivel de confianza de 95% (Cannon y Roe, 1982). Así, el tamaño de muestra resultante fue 298.

Tomando como base este cálculo, así como el interés de los propietarios en participar del estudio, en total fueron muestreados 315 equinos.

2.2. Población de estudio

Fueron muestreados caballos de varias razas, entre las que se encuentran: Paso Costarricense, Iberoamericano, Pura Raza Española, Cuarto de Milla, entre otras. Asimismo, fueron tomados en cuenta caballos mayores de 6 meses, de ambos sexos, en diferentes condiciones de crianza (estabulados, semiestabulados y en potrero); así como caballos para diversos fines (equitación, trabajo, tope, exposición, etc.). Las muestras fueron tomadas de forma aleatoria, en distintos eventos y con distintas procedencias (Figura 1), sin tomar en cuenta el estado de salud de los animales.

Para determinar los factores de riesgo, tanto intrínsecos como extrínsecos, se utilizó una encuesta con preguntas cerradas para variables categóricas y continuas, práctica, sencilla y confiable (Anexo 1).

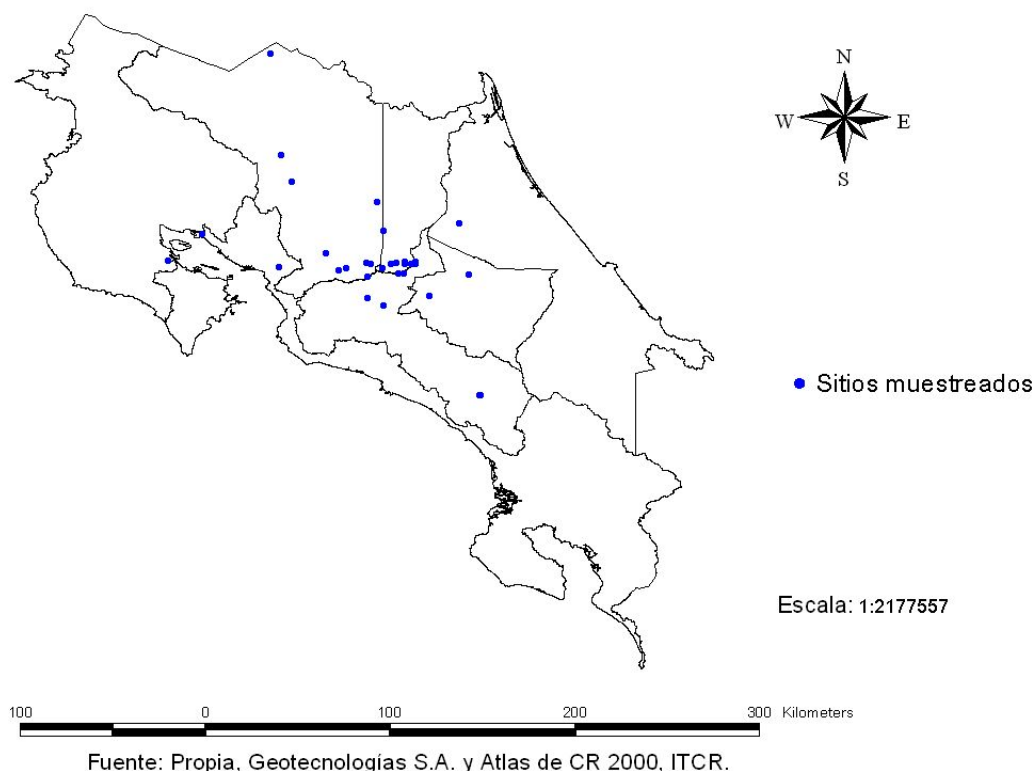


Figura 1. Distribución de los equinos muestreados.

2.3. Recolección y procesamiento de las muestras de sangre

Las muestras de sangre fueron recolectadas por punción de la vena yugular, utilizando agujas desechables estériles y colectadas en tubos vacutainer sin anticoagulante. El material obtenido fue transportado en refrigeración (en una hielera portátil) al Laboratorio de Parasitología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional (EMV-UNA), donde fue centrifugado a 5000 rpm durante 15 minutos. El suero obtenido fue congelado a -20°C hasta su procesamiento.

En el MH Gluck Equine Research Center, Department of Veterinary Science, University of Kentucky, las muestras de suero fueron analizadas mediante la prueba de ELISA

con la proteína recombinante SnSAG2 (rSnSAG2) (sensibilidad 95.5% y especificidad 92.9%) de *S. neurona*, desarrollada en el mencionado centro de investigación y diagnóstico (Hoane et al., 2005a).

Debido a que la etiología de la EPM involucra a varias especies de protozoarios, las muestras de suero fueron también sometidas a la detección de anticuerpos contra *Neospora hughesi* y *Toxoplasma gondii*. La prueba de ELISA con la proteína recombinante NhSAG1 de 29 kDa (rNhSAG1) (sensibilidad 94.4% y especificidad 95.0%) (Hoane et al., 2005b) fue utilizada para la detección de anticuerpos anti-*N. hughesi* en el MH Gluck Equine Research Center, Kentucky. En este mismo laboratorio, las muestras positivas en la prueba de ELISA fueron sometidas a la prueba de western blot (Marsh et al., 1999) para la confirmación del resultado. Las muestras fueron consideradas positivas si ambos antígenos de *N. hughesi* – las proteínas de 29 kDa (NhSAG1) y 35 kDa (NhSRS2) – eran reconocidos (Marsh et al., 1999).

A su vez, para la detección de anticuerpos anti-*T. gondii*, las muestras fueron sometidas a la prueba de aglutinación modificada (MAT por su sigla en inglés) (Dubey & Desmonts, 1987) en el Animal Parasitic Diseases Laboratory of the United States Department of Agriculture (APDL- USDA), Maryland. Las muestras fueron consideradas positivas a partir del título 1:25 (Dubey & Desmonts, 1987).

2.4. Análisis de datos

Se realizó un análisis descriptivo calculando el porcentaje global de equinos seropositivos a anticuerpos contra *S. neurona*, *N. hughesi* y *T. gondii*, así como los porcentajes específicos por cada variable evaluada (raza, edad, sexo, condiciones de crianza, presencia de zorros pelones, entre otros) para los seropositivos a *S. neurona*.

El análisis de los factores asociados con la seropositividad fue realizado mediante un análisis bivariado por tablas de 2x2, utilizando el paquete WinEpiScope 2.0. (Thrusfield et al., 2001). Como medidas de efecto, por tratarse de un estudio transversal analítico, se utilizó la razón de posibilidades (OR por su nombre en inglés *Odds Ratio*) con sus respectivos intervalos de confianza al 95%. Fueron interpretados como factores de riesgo aquellos que presentaron un OR superior a 1, esto quiere decir que su intervalo de confianza no incluya el 1. Asimismo, los factores protectores son los que presentaron un OR inferior a 1, o sea, que su intervalo de confianza no supere ni iguale a 1.

3. RESULTADOS

3.1. Estudio serológico

En total, se analizaron 315 muestras de suero, de las cuales 130 (41.3%) fueron positivas a *S. neurona*. El valor predictivo positivo del ELISA con la proteína rSnSAG2 fue de 89.5% y el valor predictivo negativo fue de 97.0%.

De los animales muestreados, solamente un caballo fue reportado previamente con EPM; el cual resultó seropositivo a *S. neurona*.

En el caso del ELISA para *N. hughesi* con las proteínas NhSAG1 y NhSRS2, 11 muestras (3.5%) resultaron positivas (cut-off $\leq 20\%$) y fueron sometidas a la prueba de western blot que es confirmatoria. Asimismo, las muestras 131 y 135 presentaron cut-off cercano al 20% (PP=17.90 y PP=19.92), por lo que también fueron sometidas al western blot. Al final, únicamente la muestra 135 (PP=19.92) reaccionó con los dos antígenos de *N. hughesi*: las proteínas de 29 y 35 kDa (Figura 2). Cinco de las 11 muestras positivas al ELISA, así como la muestra 131 (PP= 17.9), reaccionaron únicamente con el antígeno de 29 kDa (Figura 2); por lo que fueron consideradas como sospechosas (1.6%).

Para *T. gondii*, 105 (33.3%) de las 315 muestras se presentaron positivas a la prueba de MAT. El valor predictivo positivo del MAT fue de 89.7% y el valor predictivo negativo fue de 97.9%.

Los anticuerpos anti-*S. neurona* y anti-*T. gondii* fueron detectados en 57 (18.1%) muestras; mientras los anticuerpos anti-*N. hughesi* (muestra 135 confirmada en el western blot) y anti-*T. gondii* lo fueron en una única muestra (0.3%).

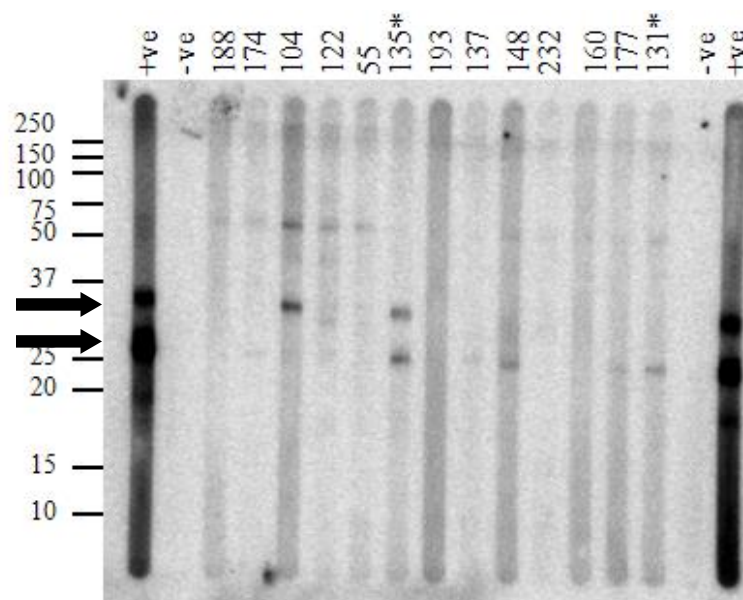


Figura 2. Western blot de *Neospora hughesi*, con énfasis en las proteínas de 29 y 35 kDa.

3.2. Encuestas

Los datos generales de los 315 equinos muestreados son presentados en el cuadro 1.

Al momento de la recolecta de sangre, todos los animales estaban clínicamente sanos. No obstante, sobre uno de los equinos muestreados (N° 173) se nos informó (por medio de la encuesta) que el mismo había sido previamente diagnosticado con EPM con base a los signos clínicos. El animal fue tratado por el médico veterinario después del diagnóstico y los signos clínicos desaparecieron, según el profesional a cargo. Posterior al tratamiento, se hizo la recolecta de sangre para el estudio.

Cuadro 1. Seroprevalencia de *Sarcocystis neurona* en equinos de Costa Rica.

Variable	Estratos	Total	N° infectados	%	IC95%
Edad (años)	< 1	22	2	9.1	2.9-21.1
	1-6	161	49	30.4	23.3-37.5
	> 6	132	69	52.2	43.8-60.8
Sexo	hembra	195	84	43.0	36.1-50.0
	macho	120	46	38.3	29.6-47.0
Raza	Paso Costarricense	175	65	37.1	30.0-44.3
	Pura raza Española	29	10	34.5	17.2-51.8
	Iberoamericano	44	16	36.4	22.2-50.6
	Cuarto de Milla	34	17	50.0	33.2-66.8
	Otras razas puras	14	11	78.6	57.1-100.0
	Razas mixtas	19	11	57.9	35.7-80.1
Manejo	Estabulado	220	84	38.2	31.8-44.6
	Semi-estabulado	53	21	39.6	26.5-52.8
	Potrero	42	25	59.5	44.7-74.4
Actividad	Exposición	165	54	32.7	25.6-39.9
	Deporte	25	17	68.0	49.7-86.3
	Tope	93	40	43.0	32.9-53.1
	Trabajo	32	19	59.4	42.4-59.4
Provincia	San José	69	31	44.9	33.2-56.7
	Alajuela	132	50	37.9	29.6-46.2
	Cartago	12	7	58.3	30.4-86.2
	Heredia	82	36	43.9	33.2-54.6
	Guanacaste	6	0	0	0
	Puntarenas	6	2	33.3	4.4-71.1
	Limón	8	4	50.0	15.4-84.6
Procedencia	Fuera del Valle Central	116	57	49.1	40.0-49.1
	Valle Central	199	73	36.7	29.9-43.4
Presencia de zorro pelón	Si	289	121	41.9	36.2-47.6
	No	26	9	34.6	16.3-53.0

3.3. Análisis de factores de riesgo

Para el análisis de los factores de riesgo asociados a la seropositividad a *S. neurona*, se tomó en consideración los 315 animales, de los cuales se pudo obtener información por medio de la encuesta. La distribución de los animales seropositivos es presentada en la figura 3.

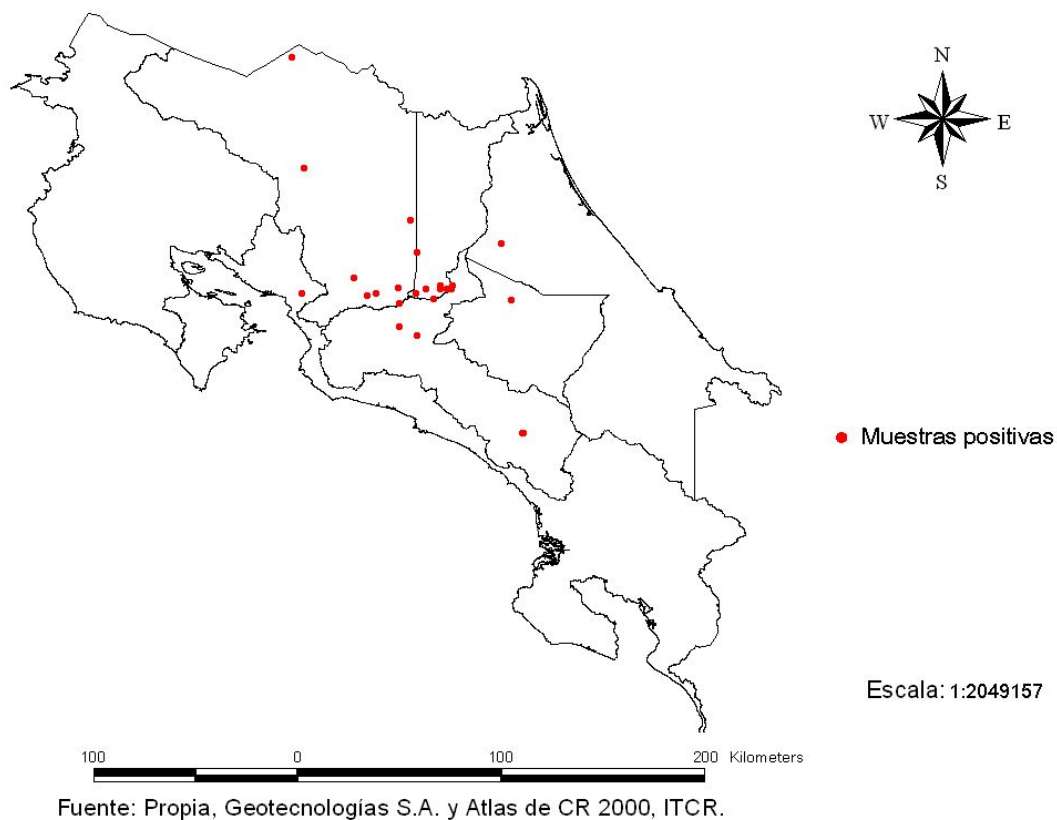


Figura 3. Distribución de los equinos seropositivos a *Sarcocystis neurona*.

Entre los factores que presentaron una clara asociación con el seroestatus se identificó: la edad de los animales (> 6 años), raza (otras razas puras), manejo (potrero), actividad (deporte y trabajo), procedencia (valle central) y presencia del zorro pelón (Cuadro 2).

Cuadro 2. Análisis multivariado de los factores asociados con la seropositividad de equinos a *Sarcocystis neurona*.

Variable	Estratos	OR	IC95%
Edad (años) ^a	1-6	4.04	0.85-26.41
	>6	9.77	2.04-63.99
Sexo ^b	hembra	0.82	0.50-1.34
Raza ^c	Pura Raza Española	0.89	0.36-2.17
	Iberoamericano	0.96	0.45-2.02
	Cuarto de Milla	1.69	0.76-3.77
	Otras razas puras	6.21	1.53-29.21
	Razas mixtas	2.33	0.81-6.74
	Manejo ^d	semi-estabulado	1.06
Actividad ^e	potrero	2.38	1.16-4.93
	deporte	4.37	1.65-11.87
	tope	1.55	0.89-2.71
Provincia ^f	trabajo	3.00	1.29-7.02
	Alajuela	0.74	0.40-1.40
	Cartago	1.71	0.43-7.03
	Heredia	0.96	0.48-1.93
	Puntarenas	0.61	0.07-4.30
Procedencia ^g	Limón	1.23	0.23-6.49
	Valle Central	0.59	0.37-0.98
Presencia de zorro pelón ^h			
	Sí	1.36	0.55-1.36

Estratos de referencia:

^a < 1 año

^b macho

^c Paso Costarricense

^d estabulado

^e exposición

^f San José y Guanacaste

^g fuera del Valle Central

^h no

4. DISCUSIÓN

4.1. Seroprevalencia de *S. neurona*, *T. gondii* y *N. hughesi*

En el presente estudio, se documenta por primera vez en Costa Rica, la seroprevalencia de *S. neurona*, *T. gondii* y *N. hughesi* en equinos clínicamente normales; así como los factores asociados con la seropositividad a *S. neurona*. La seroprevalencia de *S. neurona* en Costa Rica (41.3%) es similar a la reportada en los Estados Unidos (45%-60%) (Bentz et al., 1997; Saville et al., 1997b; Rossano et al., 2001), Argentina (35.5%) (Dubey et al., 1999b) y Brasil (36%-69.6%) (Dubey et al., 1999a; Hoane et al., 2006). Hay una variación evidente entre las seroprevalencias de los distintos países, lo que se atribuye a varios factores, tales como: la prueba serológica utilizada, edad y manejo de los animales, condiciones climáticas y densidad de hospederos de *S. neurona* (Hoane et al., 2006).

La elevada prevalencia de anticuerpos detectada en este estudio es indicativa de la intensa contaminación ambiental así como de la presencia de los hospederos definitivos e intermediarios de *S. neurona*. Zorros pelones del género *Didelphis* son los únicos hospederos definitivos capaces de transmitir *S. neurona* (Fenger et al., 1997; Dubey et al., 2001c; Rosenthal et al., 2001). Las especies *D. virginiana* y *D. marsupialis* son endémicas en Costa Rica (Durán, 2009; Suárez, 2010). Asimismo, los hospederos intermediarios de *S. neurona* no han sido identificados en Costa Rica, aunque el país posee una variedad de animales salvajes tales como perezosos, armadillos, osos hormigueros y mapaches; los cuales ha sido demostrado pueden actuar como hospederos intermediarios de *S. neurona* en Norteamérica (Cheadle et al., 2001). Es importante destacar que los caninos y felinos domésticos también actúan como hospederos intermediarios de *S. neurona* (Fenger et al., 1997; Dubey et al., 1991, 2000, 2001b).

En relación al *T. gondii*, la seroprevalencia obtenida es superior (33.3%) a la reportada en estudios previos (0.4% a 15.8%) realizados en equinos de Brasil, Argentina, Estados Unidos y Corea del Norte (Dubey et al., 1999a, 199b, 1999c, 2003; Gupta et al., 2002). En comparación con *S. neurona*, la seroprevalencia mundial de *T. gondii* en equinos es baja. Asimismo, aunque las evidencias de que *T. gondii* cause enfermedad neurológica en equinos no sean definitivas (Gupta et al., 2002; Dubey et al., 2003), existen registros de la infección por el protozoario en el SNC de equinos en Brasil (Macruz et al., 1975). Antes de la identificación de *S. neurona* la EPM era atribuida al *T. gondii* (Dubey et al., 1999a). Los félidos son los hospederos definitivos de *T. gondii*, mientras que mamíferos y aves son sus hospederos intermediarios (Dubey & Beattie, 1988). La principal forma de transmisión de *T. gondii* es por el consumo de agua y alimentos contaminados.

En contraste con las elevadas seroprevalencias de *S. neurona* y *T. gondii*, 3.5% de los equinos evaluados presentaron anticuerpos anti-*N. hughesi*, similar a lo reportado en los Estados Unidos y Brasil (Hoane et al., 2005b, 2006). No obstante, únicamente uno de los equinos presentó reacción a los dos antígenos de *N. hughesi* en el western blot; lo que descarta la posibilidad de resultados falso-positivos (Hoane et al., 2005b). Reacciones cruzadas entre *N. hughesi* y *N. caninum* son conocidas, ya que ambos parásitos presentan epitopos comunes (Vardeleon et al., 2001; Dubey et al., 2003; Hoane et al., 2005a, 2006); por lo que el western blot es utilizada como prueba de oro (Hoane et al., 2005a, 2006). La información respecto a la seroprevalencia mundial de anticuerpos anti-*Neospora* spp. en equinos es limitada (Cheadle et al., 1999; Dubey et al., 1999a, 1999b). *N. hughesi* fue aislada de un caballo con EPM en los Estados Unidos (Marsh et al., 1996, 1998); desde entonces, este protozoario ha sido considerado en la etiología de esta enfermedad en los Estados Unidos (Lindsay et al., 1996; Marsh et al., 1996,

1998; Daft et al., 1997; Cheadle et al., 1999; Dubey et al., 2001a). Los hospederos de *N. hughesi* así como su importancia como agente causal de EPM son poco conocidos (Marsh et al., 1996, 1998; Dubey et al., 2003); por lo que la presencia de éste protozoario en equinos de Costa Rica debe ser investigada en futuros estudios.

Anticuerpos de *S. neurona*/*T. gondii* y *N. hughesi*/*T. gondii* fueron detectados en 18.1% y 0.3% de los equinos muestreados, respectivamente. Las reacciones cruzadas están descartadas, ya que para la detección de anticuerpos anti-*S. neurona* y anti-*N. hughesi* fueron utilizados antígenos recombinantes en el ELISA, así como el western blot para *N. hughesi*. Lo anterior reduce la posibilidad de resultados falso positivos (Hoane et al., 2005a, 2005b).

Es importante destacar que la detección de anticuerpos en el suero solamente indica exposición y no enfermedad clínica (Dubey et al., 199a y 1999b; Rossano et al., 2001; Grupta et al., 2002). En Costa Rica, se ha reportado un caso de EPM que fue diagnosticado con base a los signos clínicos y el resultado positivo de la prueba de western blot para *S. neurona* con la detección de anticuerpos en suero (Gómez García, 2007). Además, varios casos han sido diagnosticados únicamente con base a los signos clínicos, que son inespecíficos; lo que conlleva errores (González, 2009; Oliveira, 2009). El diagnóstico seguro de EPM se basa en la detección de anticuerpos en el LCR (Dubey et al., 2001b; Finno et al., 2007). No se conoce a cabalidad los factores involucrados en la diferencia entre infección inaparente y enfermedad clínica, por lo que esta ambigüedad es el principal obstáculo para el diagnóstico y control de la EPM (Hoane et al., 2005a). En este estudio, solamente un caballo se reportó previamente con EPM, lo que sugiere que, a pesar de la elevada seroprevalencia, pocos equinos desarrollan la enfermedad clínica (Clark et al., 1981; Granstrom et al., 1992; Dubey et al., 1999b; Malikides et al., 2000; Rossano et al., 2001; Grupta et al., 2002; Katayama et al., 2003).

4.2. Factores de riesgo asociados a la seroprevalencia de *S. neurona*

La edad, raza y actividad estuvieron positivamente asociadas con el seroestatus. Según la literatura, a mayor edad del animal, mayores son las posibilidades de exposición al *S. neurona* (Bentz et al., 1997; Blythe et al., 1997; Saville et al., 1997a, 1997b; Dubey et al., 2001; Rossano et al., 2001; Hoane et al., 2006). Los casos clínicos de EPM son más frecuentes en equinos con edad entre 1 y 5 años, aunque puede afectar a animales de cualquier edad (Fayer et al., 1990; Saville et al., 1997a, 1997b). Quizás por ser animales de alto valor económico, los equinos de razas puras reciben más cuidados sanitarios y con más frecuencia son sometidos a pruebas de diagnóstico para confirmar sospechas clínicas; por lo que los casos de EPM son reportados con más frecuencia en estos animales (Saville et al., 2000). Asimismo, los equinos de razas puras con frecuencia son utilizados en actividades deportivas en ambiente abiertos, probablemente contaminados por *S. neurona* (Fayer et al., 1990). Según Saville et al. (2000), el riesgo ocupacional de los equinos puede estar relacionado con la edad, intensidad de ejercicios o quizás con el valor económico. Es importante destacar que muchos equinos utilizados en actividades deportivas en Costa Rica son importados de países como Estados Unidos, Panamá y Argentina, donde se han realizado estudios sobre la prevalencia de *S. neurona* y la ocurrencia de EPM ha sido demostrada (Ganstrom et al., 1992; Saville et al., 1997b; Dubey et al., 1999b; Rossano et al., 2001; Vardeleon et al., 2001; Caro, 2003; Dubey et al., 2003).

Fue evidente la asociación de la seroprevalencia con el manejo extensivo, igual a lo reportado por Rossano et al. (2001) en Michigan, Estados Unidos. A su vez, Blythe et al. (1997) no encontraron asociación entre la seroprevalencia y la crianza en régimen estabulado o semi-estabulado en Oregón, Estados Unidos. Aunque los equinos que se encuentran en potrero o semi-estabulados presenten un riesgo mayor de exposición al parásito (Dubey et al., 1999a; Dubey et

al., 2001b; Saville et al., 2001; Vardeleon et al., 2001; Sellon et al., 2004), la infección por *S. neurona* puede ser oriunda de múltiples orígenes en las áreas de gran abundancia de zorros pelones (Rossano et al., 2001, 2003), lo cual es importante especialmente en caballos de trabajo. Las pacas de heno representan una importante fuente de contaminación para los equinos mantenidos en estabulación constante o en los potreros de propiedades en las que los ooquistes de *S. neurona* están ausentes (Rossano et al., 2001, 2003). Los equinos mantenidos en potreros tienen menos problemas de cólicos y se ejercitan constantemente, entre otros beneficios; por lo que cualquier recomendación de restringir el acceso al pasto como forma de prevenir la EPM puede no ser efectiva, además debe tomar en cuenta la pérdida de los mencionados beneficios (Rossano et al., 2001).

Fueron detectados equinos seropositivos en todas las provincias del país, excepto en Guanacaste. La zona del valle central presentó OR más elevada en comparación con los equinos que provenían fuera del Valle Central. Las especies *D. virginiana* y *D. albiventris* son los únicos hospederos definitivos capaces de transmitir *S. neurona* (Fenger et al., 1997; Dubey et al., 2001c; Rosenthal et al., 2001). No obstante, *D. marsupialis* reúne condiciones para participar de la epidemiología de la EPM (Hoane et al., 2006).

D. virginiana habita el norte del país (desde el nivel del mar hasta los 400 M.S.N.M), siendo Cañas el límite sur de su distribución (Durán, 2009; Suárez, 2010) (Figura 4). A su vez, *D. marsupialis* se distribuye desde México hasta Brasil, estando ampliamente distribuido en Costa Rica, desde el nivel del mar hasta los 1.500 M.N.S.M. (Durán, 2009; Suárez, 2010) (Figura 5). Una de las posibles explicaciones para la presencia de animales seropositivos fuera del área de distribución de *D. virginiana* puede ser la contaminación de heno con ooquistes esporulados de *S. neurona*; lo anterior debido a que la provincia de Guanacaste se destaca por ser la principal zona

de producción de pacas de heno del país. No obstante, es importante destacar que la seroprevalencia a *S. neurona* fue más elevada en equinos mantenidos en potreros. Asimismo, algunos de los animales de este estudio fueron importados de los Estados Unidos, Panamá y Argentina; por lo que la exposición al *S. neurona* pudo haber ocurrido en los mencionados países. Los resultados obtenidos indican la necesidad de identificar los hospederos definitivos de *S. neurona* en Costa Rica, con énfasis al rol de *D. marsupialis* en la transmisión.

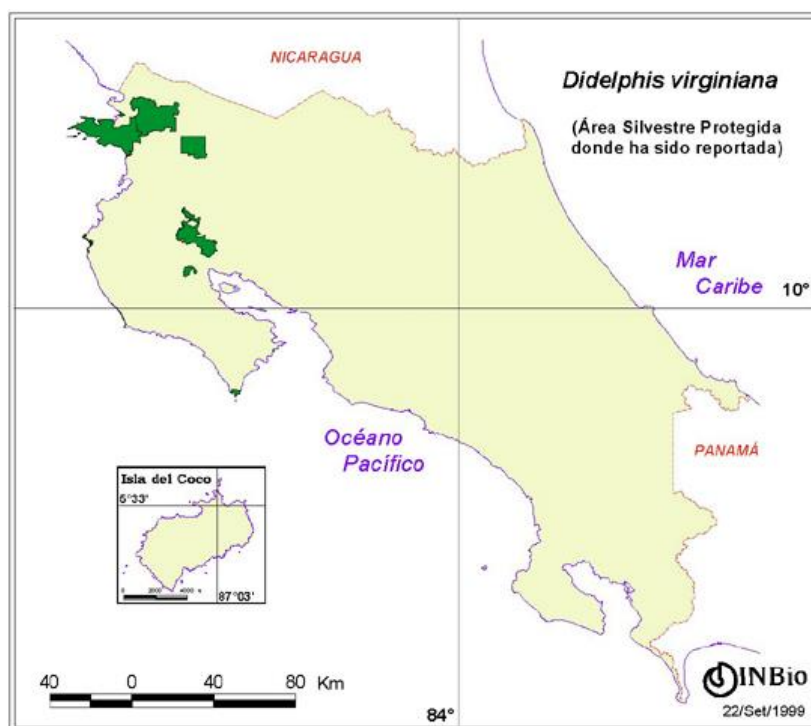


Figura 4. Distribución de *Didelphis virginiana* en Costa Rica (Suárez, 2010).

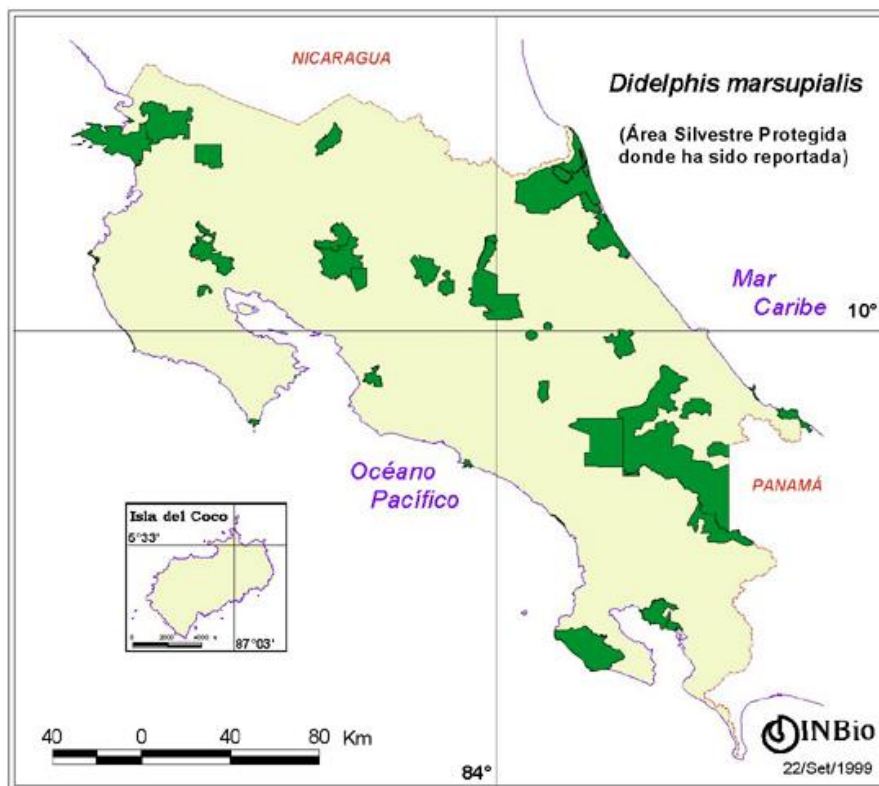


Figura 5. Distribución de *Didelphis marsupialis* en Costa Rica (Suárez, 2010).

5. CONCLUSIONES

- ✓ Por primera vez se reporta la seroprevalencia de *S. neurona* (41.3%), *T. gondii* (33.3%) y *N. hughesi* (0.3%) en equinos de Costa Rica. Estos protozoarios, principalmente *S. neurona*, están asociados con la ocurrencia de la EPM en el continente americano.

- ✓ Los animales evaluados estaban clínicamente sanos, por lo que la presencia de anticuerpos en el suero es sólo un indicativo de exposición a los agentes etiológicos de la EPM. No obstante, la EPM debe ser considerada en el diagnóstico diferencial de las enfermedades neurológicas de los equinos del país.

- ✓ Los factores de riesgo asociados con la seroprevalencia de *S. neurona* son: edad (mayores de 6 años), raza (razas puras), actividad (deporte y trabajo), manejo (potrero) y procedencia (valle central).

- ✓ Fueron detectados equinos seropositivos en todas las provincias del país, excepto en Guanacaste donde habita el *Didelphis virginiana*, principal hospedero definitivo reconocido de *S. neurona*. Es necesario investigar la participación del *D. marsupialis* en la transmisión de *S. neurona*, ya que este mamífero está ampliamente distribuido en las áreas donde fueron detectados animales seropositivos.

6. RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar estudios sobre la participación de las especies *D. virginiana* y *D. marsupialis* en la transmisión de *S. neurona*, para elucidar la epidemiología de la EPM en Costa Rica.

- ✓ Realizar estudios de seroprevalencia de *N. hughesi* y *N. caninum* para verificar la ocurrencia de estos protozoarios en equinos del país.

- ✓ Por medio de actividades de educación continua, concientizar a los médicos veterinarios oficiales y privados sobre la importancia de incluir la EPM en el diagnóstico diferencial de alteraciones neurológicas en equinos.

- ✓ Asimismo, los médicos veterinarios especialista en equinos deben ser orientados a confirmar el diagnóstico clínico de la EPM a partir de la detección de anticuerpos en el LCR de los animales sospechosos. Para esto, los profesionales deben recibir orientación especializada sobre la recolecta de LCR para evitar la contaminación con sangre, y por ende, resultados falso-positivos.

- ✓ Verificar la factibilidad de realizar las pruebas diagnósticas de EPM en el país.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barros, C.S., S.S. Barros & M.N. Santos. 1986. Equine protozoal myeloencephalitis in southern Brazil . Vet. Rec. 119:283-284.
- Bentz, B.G., D.E. Granstrom & S. Stamper. 1997. Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in horses residing in a country of southeastern Pennsylvania. J. Am. Vet. Med. Assoc. 210: 517-518.
- Bernard, W.V. 1998. *S. neurona* antibodies in equine cerebrospinal fluid. [en línea]. AAEP. E.E.U.U. www.ivis.org/proceedings/AAEP/1998/Bernard.pdf (Consulta: 20 jul, 2008).
- Blythe, L.L., D.E. Granstrom, D.E. Hansen, L.L. Walker, J. Barlett & S. Stamper. 1997. Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in horses residing in Oregon. J. Am. Vet. Med. Assoc 210:525-527.
- Cannon, R.M. & R.T. Roe. 1982. Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians. Australian Government Publishing Service.
- Caro, R. 2003. Diagnóstico de enfermedades infecciosas en equinos de la república de Argentina. [en línea]. Campo de Mayo. Argentina. [www.produccionbovina.com/produccion_ equinos/ curso_equinos_I/00curso_produccion_equina.htm](http://www.produccionbovina.com/produccion_equinos/curso_equinos_I/00curso_produccion_equina.htm) (Consulta: 30 jul, 2008).

- 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. Rolsma, B.L. Blagburn. 1999. Prevalence of antibodies to *Neospora* sp. in horses from Alabama and characterization of an isolate recovered from a naturally infected horse. *Int. J. Parasitol.* 29: 1537–1543.
- Cheadle, M.A., S.M. Tanhauser, J.B. Dame, D.C. Sellon, M. Hines, P.E. Ginn, R.J. MacKay, E.C. Greiner. 2001. The ninebanded armadillo (*Dasypus novemcinctus*) is an intermediate host for *Sarcocystis neurona*. *Int. J. Parasitol.* 31:330–335.
- Clark, E.G., H.G.G. Townsend & N.T. McKenzie. 1981. Equine protozoal myeloencephalitis: a report of two cases from western Canada. *Can. Vet. J.* 22:140-144.
- Daft, B.M., B.C. Barr, N. Collins & K. Sverlow. 1997. *Neospora* encephalomyelitis and polyradiculoneuritis in an aged mare with Cushing's disease. *Equine Vet. J.* 29:240–243.
- Daft, B.M., B.C. Barr, I.A. Gardner, D. Read, W. Bell, K.G. Peyser, A. Ardans, H. Kinde & J.K. Morrow. 2002. Sensitivity and specificity of western blot testing of cerebrospinal fluid and serum for diagnosis of equine protozoal myeloencephalitis in horses with and without neurologic abnormalities. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 221:1007-1013.
- Duarte, P.C., B.M. Daft, P.A. Conrad, A.E. Packham & I.A. Gardner. 2003. Comparison of serum indirect fluorescent antibody test with two western blot tests for the diagnosis of equine protozoal myeloencephalitis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15:8–13.

- Dubey, J.P. & G. Desmouts. 1987. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Equine Vet. J.* 19:337–339.
- Dubey, J.P. & C.P. Beattie. 1988. *Toxoplasmosis of animals and man*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 220 p.
- Dubey, J.P. & M.L. Porterfield. 1990. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an aborted equine fetus. *J. Parasitol.* 76: 732–734.
- Dubey, J.P., S.W. Davis, C.A. Speer, D.D. Bowman, A. de Lahunta, D.E. Granstrom, M.J. Topper, A.N. Hamir, J.F. Cummings & M.M. Suter. 1991. *Sarcocystis neurona* n. sp. (protozoa: Apicomplexa), the etiologic agent of equine protozoal myeloencephalitis. *J. Parasitol.* 77:212-218.
- Dubey, J.P., C.E. Kerber & D.E. Granstrom. 1999a. Serologic prevalence of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses in Brazil. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 215:910-972.
- Dubey, J.P., M.C. Venturini, L. Venturini, J. Mckinney & M. Pecoraro. 1999b. Prevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses from Argentina. *Vet. Parasitol.* 86:59-62.

- Dubey, J.P., P. Thulliez, S. Romand, O.C.H. Kwok, S.K. Shen & H.R. Gamble. 1999c. Serologic prevalence of *Toxoplasma gondii* in horses slaughtered for food in North America. *Vet. Parasitol.* 86:235-238.
- Dubey, J.P., W.J. Saville, D.S. Lindsay, R.W. Stich, J.F. Stanek, C.A. Speert, B.M Rosenthal, C.J. Njoku, O.C. Kwok, S.K. Shen, S.M. Reed. 2000. Completion of the life cycle of *Sarcocystis neurona*. *J. Parasitol.* 86:1276–1280.
- Dubey J.P., S. Liddell, D. Mattson, C.A. Speer, D.K. Howe, M.C. Jenkins. 2001a. Characterization of the Oregon isolate of *Neospora hughesi* from a horse. *J. Parasitol.* 87: 345–353.
- Dubey, J.P., D.S. Lindsay, W.J.A. Saville, S.M. Reed, D.E. Granstrom & C.A. Speer. 2001b. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). *Vet. Parasitol.* 95:89-131.
- Dubey, J.P., D.S. Lindsay, C.E. Kerber, N. Kasai, H.F. Pena, S.M. Gennari, O.C. Kwok, S.K. Shen, B.M. Rosenthal. 2001c. First isolation of *Sarcocystis neurona* from the South American opossum, *Didelphis albiventris*, from Brazil. *Vet. Parasitol.* 95:295–304.
- Dubey, J.P., S.M. Mitchell, J.K. Morrow, J.C. Rhyhan, L.M. Stewart, D.E. Granstrom, S. Romand, P. Thulliez, W.J. Saville, D. S. Lindsay. 2003. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum*,

Sarcocystis neurona, and *Toxoplasma gondii* in wild horses from central Wyoming. J. Parasitol. 89:716–720.

Durán, F. 2009. Zorros pelones-zarigueyas americanas. [en línea]. Museo Nacional de Costa Rica. Costa Rica. www.museocostarica.go.cr/es_cr/ent-rese-./zorros-pelones-zarig-eyas-americanas.html?Itemid=62 (Consulta: 29 set, 2009)

Fayer, R., I.G. Mayhew, J.D. Baird, S.G. Dill, J.H. Foreman, J.C. Fox, R.J. Higgins, S.M. Reed, W.W. Ruoff, R.W. Sweeney, P. Turtle. 1990. Epidemiology of equine protozoal myeloencephalitis in North America based on histologically confirmed cases. J. Vet. Intern. Med. 4:54-57.

Fenger, C.K., D.E. Granstrom, A.A. Gajadhar, N.M. Williams, S.A. McCrillis, S. Stamper, J.L. Langemeier & J.P. Dubey. 1997. Experimental induction of equine protozoal myeloencephalitis in horses using *Sarcocystis* sp. sporocyst from opossum (*Didelphis virginiana*). Vet. Parasitol. 68:199-213.

Finno, C.J., A.E. Packham, W.D. Wilson, I.A. Gardner, P.A. Conrad & N. Pusterla. 2007. Effects of blood contamination of cerebrospinal fluid on results of indirect fluorescent antibody tests for detection of antibodies against *Sarcocystis neurona* and *Neospora hughesi*. J. Vet. Diagn. Invest. 19:286–289.

Gómez García, A. 2007. Medicina ambulatoria equina. Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado Académico de Licenciatura en Medicina Veterinaria, Heredia, Costa Rica: Universidad Nacional.

González, O. 2009. Entrevista con el Dr Omar González, médico veterinario especialista en equinos. San José, C.R. 28 Jul.

Granstrom, D.E, O.J. Alvarez, J.P. Dubey, P.F. Corner & N.M. Williams.1992. Equine protozoal myelitis in Panamanian horses and isolation of *Sarcocystis neurona*. J. Parasitol. 78:909-912.

Granstrom, D.E., J.P. Dubey, S.W. Davis, R. Fayer, J.C. Fox, K.B. Poonacha, R.C. Giles, & P.F. Comer. 1993. Equine protozoal myeloencephalitis: antigen analysis of cultured *Sarcocystis neurona* merozoites. J. Vet. Diagn. Invest. 5:88–90.

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.

Hoane, J.S., J.K. Morrow, W.J. Saville, J.P. Dubey, D.E. Granstrom, D.K. Howe1. 2005a. Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of equine antibodies specific to *Sarcocystis neurona* surface antigens. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12:1050-1056.

- Hoane, J.S., M.R. Yeargan, S. Stamper, W.J. Saville, J.K. Morrow, D.S. Lindsay, D.K. Howe. 2005b. Recombinant NhSAG1 Elisa: a sensitive and specific assay for detecting antibodies against *Neospora hughesi* in equine serum. *J. Parasitol.* 91:446-452.
- Hoane, J.S., S.M. Gennari, J.P. Dubey, M.G. Ribeiro, A.S. Borges, L.E. Yai, D.M. Aguiar, G.T. Cavalcante, G.L. Bonesi, D.K. Howe. 2006. Prevalence of *Sarcocystis neurona* and *Neospora* spp. infection in horses from Brazil based on presence of serum antibodies to parasite surface antigen. *Vet. Parasitol.* 136:155-159.
- Katayama, Y., R. Wada, T. Kanemaru, T. Sasagawa, T. Uchiyama, T. Matsumura & T. Anzai. 2003. First case report of *Sarcocystis neurona*-induced equine protozoal myeloencephalitis in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 65:757-759.
- Lindsay, D.S. & J.P. Dubey. 2001. Direct agglutination test for the detection of antibodies to *Sarcocystis neurona* in experimentally infected animals. *Vet. Parasitol.* 95:179–186.
- 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.
- Mackay, R.J. 1997. Equine protozoal myeloencephalitis. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* **13**: 79–96.

- Macruz, R., O. Lenci & M.M. Ishizuka. 1975. Toxoplasmosse em equinos PSI: estudo serológico. Rev. Fac. Med.Vet. Zootec. Universidade de São Paulo 12:2777–2782.
- Malikides, N., D.R. Hodson & R.J. Rose. 2000. Neurology. Pp. 502-575. In R. J.Rose & D.R. Hodgson, (eds). Manual of equine practice. 2nd.ed. Saunders, Pennsylvania.
- Masri, M.D., J. Lopez de Alda & J.P. Dubey. 1992. *Sarcocystis neurona* associated ataxia in horses in Brazil. Vet. Parasitol. 44:311-314.
- Marsh, A.E., B.C. Barr, J. Madigan, J. Lakritz, R. Nordhausen, P.A. Conrad. 1996. Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 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., D.K. Howe, G. Wang, B.C. Barr, N. Cannon & P.A. Conrad. 1999. Differentiation of *Neospora hughesi* from *Neospora caninum* based on their immunodominant surface antigen, SAG1 and SRS2. Int. J. Parasitol. 29:1575–1582.
- McAllister, M.M., J.P. Dubey, D.S. Lindsay, W.R. Jolley, R.A. Wills, A.M. McGuire. 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int. J. Parasitol. 28:1473–1478.

Mullaney, T., A.J. Murphy, M. Kiupel, J.A. Bell, M.G. Rossano & L.S. Mansfield. 2005. Evidence to support horses as natural intermediate host for *Sarcocystis neurona*. *Vet. Parasitol.* 133:27-36.

Oliveira, J.B. 2009. Entrevista con la Dra Jaqueline Bianque de Oliveira, profesora de la Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias de la Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional. Heredia, C.R. 10 Ago.

Pitel, P.H., D.S. Lindsay, S. Caure, S. Romand, S. Prosnost, G. Gargala, S.M. Mitchell, C. Hary, P. Thulliez, G. Fortier, J.J. Ballet. 2003. Reactivity against *Sarcocystis neurona* and *Neospora* by serum antibodies in healthy French horses from two farms with previous equine protozoal myeloencephalitis-like cases. *Vet. Parasitol.* 111:1-7.

Rosenthal, B.M., D.S. Lindsay & J.P. Dubey. 2001. Relationships among *Sarcocystis* species transmitted by New World opossums (*Didelphis* spp.). *Vet Parasitol.* 95:133-42.

Rossano, M.G., L.S. Mansfield, J.B. Kaneene, A.J. Murphy, C.M. Brown, H.C. Schott II & J.C. Fox. 2000. Improvement of western blot test specificity for detecting equine serum antibodies to *Sarcocystis neurona*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12:28-32.

Rossano, M.G., J.B. Kaneene, J.V. Marteniuk, B.D. Banks, H.C. Schott & L.S. Mansfield. 2001. The seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in Michigan equids. *Prev. Vet. Med* 48: 113-128.

Rossano, M.G., J.B. Kaneene, J.V. Marteniuk, B.D. Banks, H.C. Schott & L.S. Mansfield. 2003.

A herd-level analysis of risk factors for antibodies to *Sarcocystis neurona* in Michigan equids. *Prev. Vet. Med* 15:7-13.

Saville, W.J.A, D.E. Granstrom, S.M. Reed & P.S. Morley. 1997a. Some epidemiologic aspects of equine protozoal myeloencephalitis. [en linea]. AAEP. E.E.U.U www.ivis.org/proceedings/AAEP/1997/Saville.pdf (Consulta: 20 jul, 2008).

Saville, W.J.A., S.M. Reed, D.E Granstrom, K.W. Hinchcliff, C.W Kohn, T.E. Wittum & S. Stamper. 1997b. Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in horses residing in Ohio. *J. Am. Vet. Med. Assoc* 210: 519-524.

Saville, W.J.A., P.S. Morley, S.M. Reed, D.E. Granstrom, S.M. Kohn, C.W. Hinchcliff, T.E. Wittum. 2000. Evaluation of risk factors with clinical improvement and survival of horses with equine protozoal myeloencephalitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 217:1181-1185.

Saville, W.J.A., R.W. Stich, S.M. Reed, C.J. Njoku, M.J. Oglesbee, A. Wunschmann, D.L. Grover, A.L. Larew-Naughton, J.F. Stanek, D.E. Granstrom & J.P. Dubey. 2001. Utilization of stress in the development of an equine model for equine protozoal myeloencephalitis. *Vet. Parasitol.* 95:211-222.

Saville, W.J.A, S.M. Reed & J.P. Dubey. 2002. Prevention of equine protozoal myeloencephalitis (EPM). [en línea]. AAEP. E.E.U.U. www.ivis.org/proceedings/AAEP/2002/910102000181. PDF (Consulta: 18 jul, 2008).

Sellon, D.C., D.P. Knowles, E.C. Greiner, M.T. Long, M.T. Hines. T. Hochstatter, A.Tibary & J.B. Dame. 2004. Infection of immunodeficient horses with *Sarcocystis neurona* does not result in neurologic disease. Clin. Diagn. Lab. Immunol 11:1134-1139.

Suárez, A. 2010. *Didelphis virginiana* y *D. marsupialis*. <http://darnis.inbio.ac.cr/ubis> (Consulta: 10 ago, 2010)

Thrusfield, M., C. Ortega., I. De Blas. J.P. Noordhuizen & K. Frankena. 2001. Win EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. Vet. Rec. 148:567-572.

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.

2. Tipo de establecimiento:

Escuela de equitación Cuadras de alquiler Cuadras propias

Otro: _____

3. Número total de caballos: _____

4. El caballo se encuentra:

En potrero Estabulado Semiestabulado

5. ¿Tiene asistencia veterinaria planificada?

Si No

6. ¿Hay caballos importados?

Si ¿Hace cuánto se importaron? _____

No

7. País de donde proviene

8. ¿Se ha diagnosticado enfermedad neurológica en alguno de los caballos?

Si ¿Cuál? _____

No

9. ¿Han observado la presencia de zorros pelones en los alrededores?

Si No