

# UN CASO DI NEOSPOROSI CANINA: DIAGNOSI SIEROLOGICA ED IMMUNOISTOCHIMICA NEGLI STADI INIZIALI DELLA MALATTIA

FABRIZIA VERONESI<sup>1</sup>, SILVIA PAVONE<sup>2</sup>, MANUELA DIAFERIA<sup>1</sup>, MARIA TERESA MANDARA<sup>2</sup>

Dipartimento di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle Produzioni Animali e Alimentari,  
<sup>1</sup>Sezione di Parassitologia, <sup>2</sup>Sezione di Patologia e Igiene Veterinaria - Università di Perugia

## Riassunto

La neosporosi canina, pur essendo una patologia spesso sospettata all'esame clinico, necessita di conferme diagnostiche che non possono prescindere dall'utilizzo di esami collaterali diretti ed indiretti. In questo articolo gli autori riportano un caso neurologico di neosporosi in un cane Epagneul Breton di 18 mesi, diagnosticato sin dagli stadi iniziali della malattia mediante indagini istologiche ed immunoistochimiche eseguite su biopsia muscolare e, successivamente, confermato dalla sieroconversione. Il riscontro nella fase acuta della malattia di valori di IgG specifiche molto bassi, al limite del titolo soglia discriminante tra infezione e malattia (1:50), conferma anche nel nostro caso lo scarso valore da attribuire al solo rilevamento di questa classe anticorpale e, tuttavia, ne sottolinea la singolarità se rapportato al grave quadro sintomatologico osservato.

## Summary

*Canine neosporosis is frequently suggested by clinical signs. Nevertheless, its diagnosis needs of direct and indirect special ancillary investigations. This paper reports a clinical case of neurological Neosporosis syndrome in a 18-month-old Epagneul Breton dog whose diagnosis was early made by histological and immunohistochemical investigations carried out on muscle biopsy, and then confirmed by seroconversion. Low specific IgG titer (1:50) observed in the acute stage of the disease, confirmed this antibody titer evaluation alone to be of limited diagnostic weight in this case. Nevertheless, it sounded very uncommon compared to the severe clinical signs.*

## INTRODUZIONE

La neosporosi, infezione protozoaria a diffusione cosmopolita per numerose specie domestiche, è sostenuta da un agente eziologico che, per alcune peculiari similitudini morfologiche, biologiche e patogenetiche, è stato per lungo tempo identificato come *Toxoplasma gondii*-like<sup>1</sup>. L'isolamento del parassita a partire da tessuto nervoso di cani affetti da gravi encefalomieliti e miositi<sup>2</sup> ha dato avvio ad una mole di studi che ne hanno permesso la caratterizzazione tassonomica (Classe Sporozoa, Famiglia *Eimeriida*, Specie *N. caninum*)<sup>3</sup>, la conoscenza del ciclo biologico (il cane è considerato ospite completo in quanto sia unico ospite definitivo<sup>4</sup> che intermedio, al pari di molte altre specie animali) e quella del reale potere patogeno. Le specie animali per cui è stata accertata un'elevata suscettibilità all'infezione e dalle quali derivano la maggior parte dei dati sperimentali ed epidemiologici riportati in bibliografia, sono rappresentate da quella bovina e canina, per le quali il parassita gioca un ruolo di primaria importanza, rispetti-

vamente come agente di aborto<sup>5</sup> e di sindromi neuromuscolari nel cucciolo<sup>6</sup>. Grazie ad una capillare campagna di sensibilizzazione, l'infezione da *N. caninum* viene ormai costantemente inserita nell'elenco delle diagnosi differenziali in corso di sindromi neuromuscolari del cane. L'affezione neuromuscolare indotta da *N. caninum* consiste in una grave poliradiculoneurite e miosite necrotizzante linfomonocitaria, caratterizzata, a volte, dalla presenza di formazioni cistiche muscolari<sup>7</sup> e, più frequentemente, da tachizoiti, elementi liberi e circolanti di forma ovoidale, a volte globulare o a semiluna, delle dimensioni variabili di 3-7 x 1-5 µm in attiva replicazione<sup>1</sup>. Negli animali infetti, i tachizoiti possono ritrovarsi, oltre che nei miociti e nelle cellule dell'endotelio vascolare, in numerose altre tipologie cellulari come neuroni, macrofagi, fibroblasti, cellule dell'epitelio tubulare renale ed epatociti,<sup>8,9</sup> con localizzazione citoplasmatica all'interno di vacuoli parassitofori.<sup>9</sup>

Se fino a qualche anno fa la conferma diagnostica di neosporosi a posteriori era la regola, poiché l'eutanasia era considerata l'unica via percorribile, attualmente la definizione di protocolli terapeutici efficaci ha reso evidente la necessità di avere a disposizione esami di laboratorio da utilizzare *intra-vitam*, sensibili e specifici. I metodi diagnostici attualmente disponibili sono numerosi e distinti in in-

“Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 28/11/2005 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 20/5/2006”.

diretti, quali ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), IFAT (Indirect Fluorescent Antibody Test), EIA (emoagglutinazione diretta), e diretti, quali le indagini istomorfolologiche, immunostochimiche e biomolecolari eseguite su tessuto infetto.

Questo lavoro segnala la singolarità di alcuni rilievi dell'esame sierologico negli stadi iniziali di malattia indotta da *N. caninum* nel cane, confermata da sierconversione e dalle indagini istologiche ed immunostochimiche.

## MATERIALI E METODI

### Anamnesi e rilievi clinici

Il caso in esame riguarda un cane di razza Epagneul Breton maschio di 18 mesi, regolarmente vaccinato, condotto presso una Clinica per piccoli animali per disturbi locomotori.

L'anamnesi riferiva di un problema di deambulazione insorto due settimane prima e caratterizzato al suo esordio da riluttanza al movimento, deambulazione rigida e stentata, accompagnata da debolezza dell'arto posteriore destro, condizione in rapido aggravamento che si era evoluta, nell'arco di breve tempo, in paraparesi bilaterale fino alla tetraplegia, con mialgia ed ipotonicità generalizzata. All'esame neurologico, si osservavano anche opistotono, testa permanentemente deviata verso destra e risposta alla minaccia assente. L'evocazione dei riflessi spinali dell'arto posteriore destro rilevava un'iperreflessia del patellare e del riflesso flessore, mentre l'esame dei nervi cranici mostrava una riduzione del riflesso fotomotore diretto e consensuale in entrambi gli occhi, strabismo ventrolaterale e disfagia. Il cane mostrava anche una grave atrofia dei muscoli masticatori.

Al fine di stabilire la natura dei deficit neurologici osservati, l'animale veniva sottoposto ad una serie di esami collaterali tra cui l'esame del liquido cefalorachidiano (LCR), un'indagine sierologica per la determinazione di anticorpi della classe IgG e IgM nei confronti di *T. gondii* e di *N. caninum* tramite IFAT, l'esame istologico ed immunostochimico su campioni di muscolo tibiale e nervo peroneo, nonché prelievi ematici per la valutazione del profilo ematologico e biochimico.

### Esami sierologici

Campioni sierici sono stati raccolti al momento del ricovero, a distanza di 20 giorni e poi mensilmente per tutto il periodo di convalescenza. I sieri sono stati testati, tramite reazione di Immunofluorescenza Indiretta (IFAT), per la diagnosi sierologica di *Neosporosi* e *Toxoplasmosi*.

La ricerca di IgG e IgM specifiche anti-*N. caninum* è stata eseguita utilizzando, come antigene, tachizoiti coltivati su Cellule Vero e, come coniugato, IgG di coniglio anti-cane (Sigma Immunochemicals, St Luis, MO, USA) e IgM di capra anti-cane (VMRD, Inc. Pullman) legate all' isotiocianato di fluoresceina e diluite rispettivamente 1:32 e 1:10. I campioni sono stati saggiati e titolati, con diluizioni seriali in base due, a partire dalla diluizione 1:50, per le IgG, e 1:10 per le IgM (cut off). Per la ricerca di IgG anti-*T. gon-*

*dii* è stato utilizzato un antigene commerciale (BioMerieux Sa.-FRANCE), fissando il cut-off alla diluizione 1:20.

## Esame istologico e immunostochimico

Il campione biotico di muscolo tibiale è stato prontamente fissato in parte mediante criostato e in parte in formalina al 10%, mentre il campione biotico di nervo periferico è stato adeguatamente campionato per una doppia fissazione in glutaraldeide al 2,5% e formalina al 10%.

Per il campione muscolare sono state allestite sezioni di 5 µm colorate con ematossilina-eosina (E-E), colorazione tricromica di Gomori modificata e PAS. Sezioni di 5 µm, allestite dal campione muscolare e di nervo periferico inclusi in paraffina, sono state sottoposte successivamente ad indagini di immunostochimica (IHC) con antisiero policlonale anti-*N. caninum* di capra (VMRD Inc.-Pullman, WA 99163 USA, 1:4000), allo scopo di evidenziare l'eventuale presenza di cisti e/o tachizoiti liberi od intracellulari.

I campioni di nervo periferico fissati in glutaraldeide al 2,5% sono stati processati per l'allestimento di sezioni semifini, colorate con blu di Metilene.

## RISULTATI

Gli elementi emersi nel corso dell'esame clinico e neurologico, associati ad un aumento della Creatin-Fosfochinasi (CPK) (379 IU/l) e alla presenza nel LCR di una spiccata pleocitosi mista (365 cell/µl), con aumento della concentrazione proteica (50 mg/dl), supportavano l'ipotesi di un'affezione neuromuscolare e neurologica centrale di natura infiammatoria.

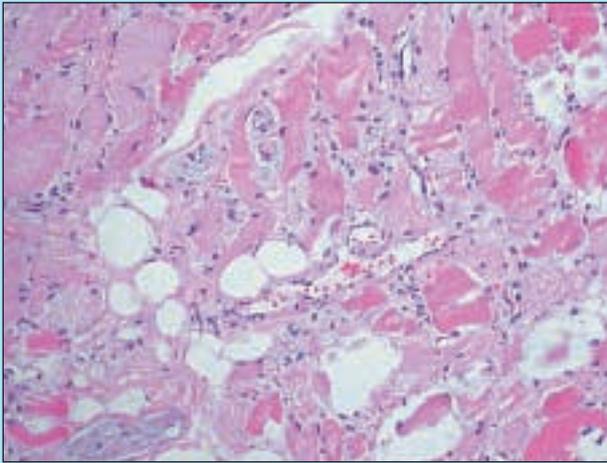
## Sierologia

La prima valutazione sierologica eseguita al momento del ricovero, avvenuto 15 giorni dopo l'insorgenza dei primi segni clinici, ha permesso di accertare un titolo IgG nei confronti di *N. caninum* pari a 1: 50 e di IgM pari ad 1: 80 ed una totale negatività per *T. gondii*. A distanza di 20 giorni è stata osservata una sierconversione fino ad un titolo di IgG pari a 1:400. Tale titolo si è mantenuto costante nei tre mesi successivi di convalescenza, senza subire rialzi in occasione della recrudescenza dell'infezione.

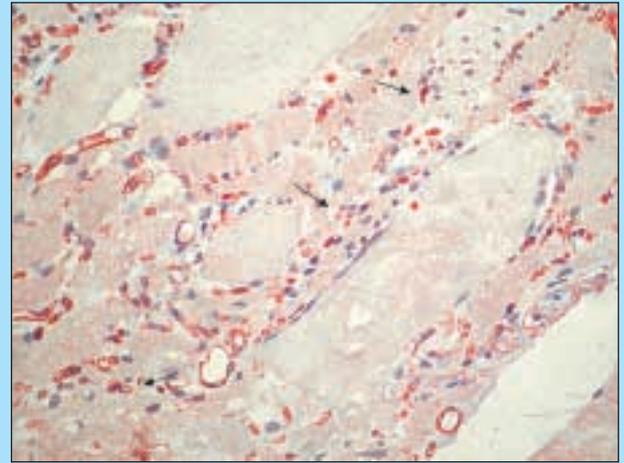
## Istologia e Immunostochimica

### Muscolo tibiale

L'indagine istologica ha evidenziato la presenza di una miosite linfomonocitaria, prevalentemente macrofagica, con segni di necrosi coagulativa e raddomolisi (Fig. 1). Isolate fibre muscolari mostravano un aspetto target-simile, caratterizzato da una zona centrale non strutturata quasi incolore, circondata da una zona apparentemente normale ("targetoid-fibres")<sup>10</sup>. Erano presenti, inoltre, isolate fibre muscolari atrofiche di aspetto angolare, ac-



**FIGURA 1** - Muscolo tibiale. Focale disarchitettura del tessuto muscolare, in cui si apprezzano alcune fibrocellule necrotiche in associazione ad una evidente reazione macrofagica. Sulla sinistra una iniziale sostituzione di fibre muscolari con tessuto adiposo (lipomatosi). (EE, 20x).



**FIGURA 2** - Muscolo tibiale. Gli endoteli e numerose cellule interstiziali mostrano una evidente reattività anti-*N. caninum*. Liberi nell'interstizio, sono presenti anche numerosi elementi corpuscolati, riferibili a tachizoiti (freccie). (ABC, 1:4000, 40x).

canto a evidenti fibre muscolari ipertrofiche che tendevano a comprimere le prime. Alla periferia del campione, si evidenziavano solo esigui tentativi di sostituzione delle fibre atrofiche con tessuto adiposo (lipomatosi) (Fig. 1). Non erano evidenti processi rigenerativi, né formazioni cistiche parassitarie.

L'indagine istologica eseguita con la colorazione tricromica di Gomori, mostrava una modica fibrosi peri-endomisiale. L'indagine immunohistochimica per *N. caninum*, invece, ha mostrato una diffusa positività endoteliale e macrofagica/fibroblastica, evidenziando altresì numerosi elementi extracellulari di forma ovoidale o a semiluna, riferibili a tachizoiti liberi (Fig. 2).

### Nervo peroneo

L'esame microscopico su sezioni semifini di nervo peroneo ha mostrato una modica riduzione delle fibre mielinizzate di piccolo calibro (SMF). Alcuni assoni apparivano atrofici e rivestiti di guaina mielinica frammentata, mentre erano del tutto assenti le cellule infiammatorie. L'indagine immunohistochimica anti-*N. caninum* ha dato esito negativo.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel caso clinico da noi riportato, la tecnica IFAT applicata alla determinazione della classe IgG, ritenuta il gold standard dei test per la diagnosi sierologica di neosporosi, ha mostrato come nel cane sia ancora associata a numerose problematiche legate soprattutto all'interpretazione clinica dei risultati ottenuti. Il limite maggiore è rappresentato dalla impossibilità a definire titoli anticorpali soglia, che discriminino inequivocabilmente lo stato attivo dell'infezione. Infatti, dati bibliografici riferiscono di cuccioli affetti da forme conclamate di neosporosi sia con titoli sierici deboli, addirittura negativi, che con valori di IgG pari a 1:12.800<sup>11</sup>, e ancora di soggetti asintomatici con titoli di 1:800<sup>9</sup>. La tendenza attuale è quella di considerare

come titoli IgG indicativi di malattia quelli superiori a 1:400<sup>12</sup> e come titolo minimo quello di 1:50<sup>13</sup>, espressione solo di uno stato di infezione senza alcun riferimento allo stadio evolutivo.

Il caso da noi descritto testimonia una forma di neosporosi canina clinicamente manifesta associata a bassi valori di IgG (1:50) e fornisce un'ulteriore conferma<sup>12</sup> sui limiti che la sola determinazione di questa classe anticorpale ha nel definire precocemente lo stato di malattia. A sostegno della diagnosi di una forma evolutiva dell'infezione, è stato pertanto necessario valutare a distanza di 20 giorni il tasso di sierconversione di questa classe anticorpale e ricercare contemporaneamente anche la presenza di IgM specifiche, saggio che, nell'approccio diagnostico routinario, viene spesso tralasciato a motivo dei possibili fenomeni di interferenza con le IgG di origine colostrale presenti nei giovani soggetti<sup>13, 14</sup>.

Il titolo della classe anticorpale IgG, inoltre, valutato più volte, non ha mai superato il valore di 1:400, limite sotto il quale non si associano generalmente segni clinici di neosporosi, ma che risulta comunque basso se rapportato al grave quadro sintomatologico descritto. Pertanto, se la valutazione delle IgG attraverso IFAT può essere considerata un ottimo strumento da utilizzare nel corso di indagini epidemiologiche su larga scala, come testimoniano i numerosi studi di sieroprevalenza condotti sulla popolazione canina<sup>15</sup>, in un approccio medico precoce alla malattia e in previsione di una terapia, essa potrebbe non essere l'unica discriminante su cui basare la conferma di neosporosi clinica. Nel nostro caso, infatti, i risultati ottenuti con le indagini immunohistochimiche e la valutazione delle IgM hanno permesso di definire più precocemente lo stato evolutivo dell'infezione, rispetto alla ricerca delle sole IgG.

Le comuni indagini istologiche eseguite su campioni muscolari colpiti da *N. caninum*, non sempre riescono a evidenziare elementi corpuscolati riferibili a tachizoiti e/o cisti. Solo l'indagine immunohistochimica con anticorpi anti-*N. caninum* dimostra con certezza la presenza degli elementi parassitari.<sup>16</sup> Inoltre, l'infiltrato infiammatorio che

caratterizza le infezioni da *N. caninum* è generalmente così ricco da separare le fibre muscolari, fino a determinare la perdita della normale architettura del tessuto muscolare. Dal canto suo, la degenerazione delle cellule muscolari, che termina in fenomeni di necrosi e raddiomolisi, viene attribuita o all'azione distruttiva esercitata dal parassita nella fase di penetrazione e di replicazione nella cellula muscolare, o alla liberazione locale di radicali liberi da parte delle cellule infiammatorie attivate<sup>17</sup> o, ancora, ad una espressione anomala del Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC)<sup>18</sup>.

Nel nostro caso, l'esame istologico del campione di muscolo ha mostrato, oltre ad una modesta fibrosi e ad un'atrofia delle fibre muscolari, giudicata secondaria ad un danno dell'assone preterminale, diffusi eventi di raddiomolisi che, sebbene associati solo a esigui infiltrati linfomonocitari, si sono dimostrati prodotti da *N. caninum* grazie alle indagini immunocistochimiche. Pertanto, l'applicazione rapida di indagini di immunocistochimica e i suoi risultati, associati alla presenza di lesioni istologiche compatibili con una miosite protozoaria e alla valutazione delle IgM, hanno permesso di definire più precocemente, rispetto alla sola determinazione delle IgG, lo stato evolutivo dell'infezione e di ottenere così delle utili indicazioni prognostiche. Infatti, in questo caso, la presenza istologica di una modesta fibrosi, associata all'assenza di una grave iperestensione degli arti posteriori, deponeva per una buona possibilità di recupero del danno neuromuscolare, confermata poi dal decorso e dalla completa remissione dell'intero quadro sintomatologico.

## Ringraziamenti

Gli autori ringraziano il Dr. Massimo Floris e tutto lo staff della Clinica EuroVeterinaria (Bettona-Perugia) per il caso fornito, il Dr. Giovanni Ricci e la Dr.ssa Silvia Capuccini per il supporto tecnico fornito nel Laboratorio di Neuropatologia.

## Parole chiave

Neosporosi canina, Immunofluorescenza Indiretta, IgG, IgM, Immunocistochimica, Miosite necrotizzante.

## Key words

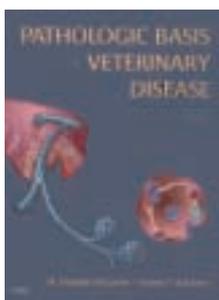
Canine Neosporosis, Indirect Fluorescent Antibody Test, IgG, IgM, Immunohistochemistry, Necrotizing Myositis

## Bibliografia

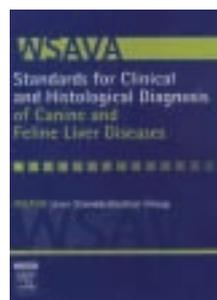
1. Bjerkås I, Presthus J: The neuropathology in toxoplasmosis-like infection caused by a newly recognised cyst-forming sporozoan in dogs. *Acta Pathologica Microbiologica Immunologica Scandinavica* 97: 459-468, 1989.
2. Bjerkås I, Mohn SF, Presthus J: Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z Parasitenkd* 70: 271-274, 1984.
3. Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, et al: Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *JAMVA* 192: 1269-1285, 1988.
4. McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, et al: Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 28: 1473-1478, 1998.
5. Caldow GL: Bovine abortion outbreak associated with *Neospora* and other infectious agents. *Vet Rec* 142: 118-119, 1998.
6. Lindsay DS, Dubey JP: A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol* 67: 1-59, 1996.
7. Peters M, Wagner F, Schares G: Canine neosporosis: clinical and pathological findings and first isolation of *Neospora caninum* in Germany. *Parasitol Res* (86):1-7, 2000.
8. Dubay JP, Lindsay DS: Neosporosis. *Parasitol Today* 9(12):452-458, 1993.
9. Dubay JP, Hatte AL, Lindsay DS, Topper MJ: Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J Am Vet Assoc* 193(10):1259-1263, 1988.
10. Poirier J, Gray F, Escourrolle R: Neuromuscular Pathology. In: Manual of basic Neuropathology. Third Ed. Poirier J, Gray F, Escourrolle R. W. B. Saunders Co, 1990, pp. 218-219.
11. Barber J.S, Trees A.J.: Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *Int. J. Parasitol.* 28: 57-64, 1998.
12. Dubey JP, Dorrough JR, Jenkins MC, et al: Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. *Int J Parasitol.* 28: 1093- 1304, 1996.
13. Biorkman C, Uggla A: Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Int J Parasitol.* 29: 1497- 1507, 1999.
14. Araujo F.G., Remington J.S.: IgG antibody suppression of the IgM antibody response to *Toxoplasma gondii* in newborn rabbits. *Journal of Immunol.* 115: 335-338, 1975.
15. Barber JS, Gasser RB, Ellis J, Reichel MP, Mc Millan D, et al: Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. *J of Parasitol* 83: 1056-1058, 1997.
16. Pasquali P, Mandara MT, Adamo F, Ricci G, Polidori GA, Dubey JP: Neosporosis in a dog in Italy. *Veterinary Parasitology* (77):297-299, 1998.
17. Thomas J Hulland: Myositis. In: Pathology of Domestic Animals. Ed. by Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N. Accademic Press, 1993, pp. 259-260.
18. Paciello O, D'Orazi A, Borzacchiello G, Martano M, Restucci B, Maiolino P, Papparella S: Expression of Major Histocompatibility Complex Class I and II in a case of *Neospora caninum* myositis in a dog. *Acta Myologica* (23):151-153, 2004.

# EDIZIONI VETERINARIE

Per ordini e informazioni: Tel. 0372/403507 - Fax 0372/457091 E-mail editoria@evsrl.it - www.evsrl.it



McGAVIN-ZACHARY  
**"Pathologic Basis  
of Veterinary Disease"**  
4<sup>a</sup> ed. 2006 Mosby-Elsevier  
Listino € 96,99  
Scontato € 82,00



**"WSAVA Standards for clinical and histological diagnosis of canine and feline liver diseases"**  
WSAVA Liver Standardization Group  
Listino € 82,95  
Scontato € 71,00