

LITERATURE REVIEW

***Neospora caninum*: Biological Relationship with *Toxoplasma gondii* and its Potential as Zoonosis**

***Neospora caninum*: Relación Biológica con *Toxoplasma gondii* y su Potencial como Zoonosis**

Laura Robayo-Sánchez¹ MV, Jorge Gómez-Marín² Ph.D, Jesús Cortés-Vecino^{1*} Ph.D.

¹ Universidad Nacional del Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Laboratorio de Parasitología Veterinaria, Grupo Parasitología Veterinaria, Bogotá D.C, Colombia. ²Universidad del Quindío, Facultad de Ciencias de la Salud, Centro de Investigaciones Biomédicas, Grupo Parasitología Molecular (GEPAMOL), Armenia, Colombia. *Correspondencia: jacortesv@unal.edu.co

Received: January 2017; Accepted: April 2017.

ABSTRACT

Objective. To carry out a systematic review of the literature on the zoonotic potential of *Neospora caninum* taking into account its biological relationship with *Toxoplasma gondii*. **Materials and methods.** A systematic review was carried out, using two databases for the collection of information (Science direct and Scielo), a search engine (Google Scholar) and the National University of Colombia Repository, all documents were organized through the bibliographic manager Mendeley for proper review. Key words like Neosporosis, *Neospora caninum*, "Toxoplasmosis", "*Toxoplasma gondii*", "*Neospora humans*", "*Neospora human infection*", "*Neospora zoonotic*" were used. A total of 8 articles were selected that look for the infection in humans. **Results.** Eight documents concerning the subject of *Neospora* in humans were used, whereas these reports show evidence of seropositivity in human samples of anti-*N. caninum* no studies were found that look for the isolation of the parasite in human tissues (by molecular or *in vitro* culture). **Conclusions.** According to the results of these studies, it is not ruled out that the existence of cross-reactions with *T. gondii* and therefore it should not be ruled out that Neosporosis can behave as a zoonosis. In this regard, more research is required to demonstrate exposure, associated clinical signs, or pathologies related to this infection.

Keywords: *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, Serology, Zoonoses, Public Health (Source: MeSH).

RESUMEN

Objetivo. Realizar una revisión sistemática de la literatura sobre el potencial zoonótico de *Neospora caninum* teniendo en cuenta su relación biológica con *Toxoplasma gondii*. **Materiales y métodos.** Se realizó una revisión sistemática, utilizando dos bases de datos para la recopilación de la información (Science direct y Scielo), un buscador (Google Scholar) y el Repositorio de la Universidad Nacional de Colombia, todos los documentos fueron organizados por medio del gestor bibliográfico Mendeley para su correcta revisión. Se emplearon palabras claves como "Neosporosis", "*Neospora caninum*", "Toxoplasmosis", "*Toxoplasma gondii*", "*Neospora humans*", "*Neospora human infection*", "*Neospora zoonotic*". Se encontraron ocho documentos que cumplían el criterio de evaluar la infección en humanos. **Resultado.** Se utilizaron 8 documentos concernientes al tema de *Neospora* en humanos, donde se evidencia en algunos de estos reportes seropositividad en muestras de humanos, empleando diferentes técnicas serológicas para la detección de anticuerpos anti- *N. caninum* y anti-*T. gondii*, pero

ninguna buscó la demostración directa del parásito en tejidos (por técnicas moleculares o cultivo).
Conclusiones. Ningún estudio permite concluir definitivamente si existe infección en humanos, pues se utilizaron pruebas serológicas que tiene el riesgo de reacciones cruzadas con *Toxoplasma gondii*, se requieren estudios que demuestren exposición, signos clínicos asociados o patologías relacionadas con esta infección.

Palabras clave: *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, Serología, Zoonosis, Salud pública (Fuente: DeCS).

INTRODUCTION

Neospora caninum is an apicomplex protozoan, originally identified in the tissue of dogs with paralysis, and first identified in 1984 (1-3), as an important cause of neurological disease in dogs worldwide (4). Neosporosis is one of the diseases that causes abortion in cows, sheep, goats, buffalo and camels; with special importance in bovines worldwide due to the important economic impact on milk and meat production (5).

N. caninum has a wide range of hosts. Natural infection has been evidenced in dogs, cows, sheep, goats, horses and deer. The experimental infection has been induced in mice, rats, dogs, foxes, cats (6), coyotes, pigs, gerbils, rabbits, sheep and cows (7).

Over time, *N. caninum* was confused with *T. gondii*. One of the reasons is that tachyzoites and cysts with bradyzoites, among both protozoa are very similar to light microscopy (8).

Several molecular studies have indicated a close phylogenetic relationship between *N. caninum* and *T. gondii*, both are obligated intracellular pathogens capable of infecting all types of nucleated cells in intermediate hosts, differentiating from each other by the final host being the cat for cases of *T. gondii* and the dog for the case of *N. caninum* (9,10), as shown in Figure 1.

The importance of *T. gondii* infection lies in its impact on public health as an opportunistic pathogen of immunocompromised individuals and in maternal-fetal infections, where children can be born with different neurological problems such as loss of vision or even death. On the other hand, despite its resemblance to *T. gondii*, *N. caninum* is not yet considered a pathogen that affects humans. Likewise, *T. gondii* provides a study model for intracellular parasitism (11,12).

For the diagnosis of *N. caninum* there are several serological tests that can be used to detect

INTRODUCCIÓN

Neospora caninum es un protozoario apicomplejo, identificado originalmente en tejidos de perros con parálisis, y reconocido por primera vez en 1984 (1-3), como una importante causa de enfermedad neurológica en perros en el mundo (4). Neosporosis es una de las enfermedades que causan aborto en vacas, ovejas, cabras, búfalos y camellos; con especial importancia en bovinos a nivel mundial dado el impacto económico importante en producciones de leche y carne(5).

N. caninum tiene un amplio rango de hospederos. Se ha evidenciado la infección natural en perros, vacas, ovejas, cabras, caballos y venados. La infección experimental ha sido inducida en ratones, ratas, perros, zorros, gatos (6), coyotes, cerdos, jerbos, conejos, ovejas y vacas (7).

A lo largo del tiempo, *N. caninum* fue confundido con *T. gondii*. Una de las razones es que los taquizoitos y los quistes con bradizoitos, entre ambos protozoarios son muy similares a la microscopía de luz (8).

Varios estudios moleculares han indicado una estrecha relación filogenética entre *N. caninum* y *T. gondii*, ambos son patógenos intracelulares obligados con capacidad de infectar todos los tipos de células nucleadas en los hospederos intermediarios, diferenciándose por el hospedero definitivo siendo el gato en casos de *T. gondii* y el perro en caso de *N. caninum* (9,10), como se muestra en la Figura 1.

La importancia de la infección por *T. gondii* radica en su impacto en salud pública como patógeno oportunista de individuos inmunocomprometidos y en infecciones materno fetales, en donde los niños pueden nacer con diferentes problemas neurológicos como pérdida de visión o incluso la muerte. Por otro lado, a pesar de su semejanza con *T. gondii*, *N. caninum* aún no es considerado un patógeno que afecte al humano. Así mismo, *T. gondii* proporciona un modelo para el estudio de parasitismo intracelular (11,12).

Para el diagnóstico de *N. caninum* existen varias pruebas serológicas que pueden ser usadas para

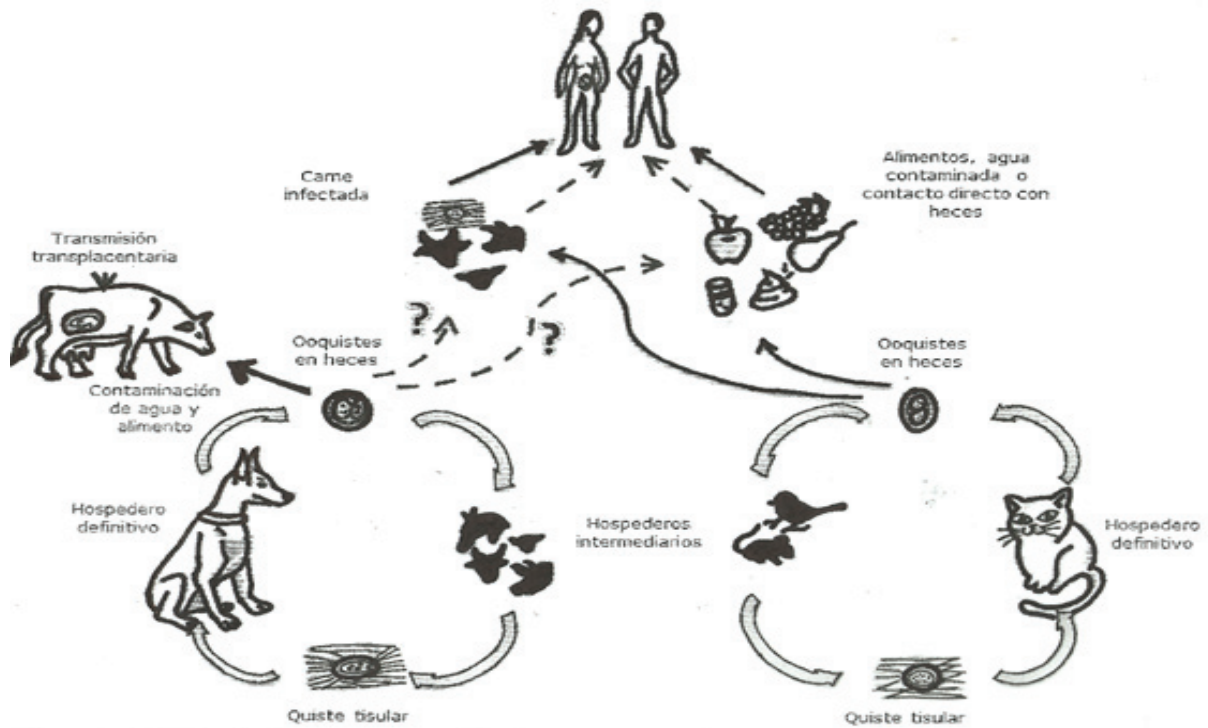


Figure 1. Biological relationship between the cycles of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*

antibodies against this protozoan, including ELISA, IFAT indirect immunofluorescence and direct agglutination tests. The presence of specific antibodies in the serum of cows with abortions indicates an exposure to *N. caninum*. For the final diagnosis, a diagnosis should be made in the aborted fetus using histopathology, immunohistochemistry and polymerase chain reaction (PCR) techniques. Currently there are different techniques to detect *N. caninum* DNA (13), using real-time PCR protocols (qPCR) (14).

Inoculation with *N. caninum* of nonhuman primates in gestation produces the transplacental transmission of the parasite and the induction of fetal encephalitis with lesions similar to those induced by transplacental infections of *T. gondii* in primates (15) There are reports on human exposure to *N. caninum* using IFAT, however, further trials are required to determine the significance of exposure and possible cross-reactions that may affect these results (16).

Currently, there are multiple diseases not etiologically recognized, that cause pathologies in humans due to the lack of diagnostic methods that unequivocally identify them. In the case of *N. caninum*, it is not yet known what effects on human health, it may have, which

detectar anticuerpos contra este protozoo, incluyendo ELISA, Inmunofluorescencia indirecta IFAT y prueba de aglutinación directa. La presencia de anticuerpos específicos en suero de vacas con abortos, indican una exposición a *N. caninum*. Para el diagnóstico final se debe realizar un diagnóstico en el feto abortado mediante técnicas de histopatología, inmunohistoquímica y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Actualmente existen diferentes técnicas para detectar ADN de *N. caninum* (13), utilizando protocolos de PCR en tiempo real (qPCR) (14).

La inoculación de primates no humanos en gestación con *N. caninum* produce la transmisión transplacentaria del parásito y la inducción de encefalitis fetal con lesiones similares a las inducidas por las infecciones transplacentarias de *T. gondii* en primates (15) Existen reportes sobre la exposición de humanos a *N. caninum* utilizando IFAT, sin embargo se requieren mayores ensayos para determinar el significado de la exposición y las posibles reacciones cruzadas que puedan afectar estos resultados (16).

En la actualidad existen múltiples enfermedades no reconocidas etiológicamente, causando patologías en humanos por falta de métodos diagnósticos que las identifiquen de manera inequívoca. En el caso de *N. caninum* aún no se conoce que efectos en la salud humana pueda

specific group affects, or which characteristic signs are likely to show up. Studies carried out in humans have focused on searching for similar signs of those known for *T. gondii* due to their biological closeness, such as abortion, symptoms in immunocompromised patients or in population with exposure factors to the agent (veterinarians, breeders). The signs may not be those considered a priori, but could be the same presented in their final host. Therefore, it should be studied under different circumstances and with other implications. Such as in humans with epidemiological risk factors conducting studies between exposed and not exposed to the infection.

It is necessary to have more clarity about the state of *N. caninum* in Colombia, and to carry out investigations that involve the animal species in its cycle with the possibility of adding human beings, considering the link between both species.

Therefore, the objective of this review is to analyze the zoonotic potential of *Neospora caninum* taking into account its biological relationship with *T. gondii*.

METHODOLOGY

A systematic review was carried out, using two databases for the collection of information (Science direct and Scielo), a search engine (Google Scholar) and the Repository of the Universidad Nacional de Colombia, all documents were organized by means of the bibliographic manager Mendeley for proper review. The search keywords used in Spanish in DeCS, BIREME were "Neosporosis", "Neospora caninum", "Toxoplasmosis", "Toxoplasma gondii", "Neospora humans" and in English in MeSH, NLM they were "Neospora human infection", "Neospora zoonotic". This search, turned around 3,000 results for *N. caninum* and an average of 17,000 for *T. gondii*. Among the results, those related to diagnosis and studies in humans were selected. Forty documents were found that met these criteria and were divided into review articles, research and summaries. Of these, 24 were used for the introduction and discussion. Finally, 8 were selected for evaluating the infection in humans. The time period of the data collection was from 1998 to 2017.

tener o que grupo específico afecte o que signos característicos probablemente muestre. Los estudios realizados en humanos se han enfocado en buscar con signos semejantes de los conocidos para *T. gondii* por su cercanía biológica, tales como abortos, síntomas en pacientes inmunocomprometidos o en población con factores de exposición al agente (veterinarios, ganaderos). Se debe tener en cuenta que los signos pueden no ser los considerados a priori, sino que podrían ser los mismos presentados en su hospedero definitivo. Por esto, se debería estudiar en diferentes circunstancias y con otras implicaciones. Tales como en humanos con factores de riesgo epidemiológico realizando estudios entre expuestos y no expuestos a esta infección.

Es necesario tener más claridad en qué estado se encuentra *N. caninum* en Colombia, y realizar investigaciones que impliquen las especies animales involucradas en su ciclo con la posibilidad de adicionar al ser humano teniendo en cuenta el vínculo con ambas especies.

Por lo tanto, el objetivo de esta revisión es analizar el potencial zoonótico de *Neospora caninum* teniendo en cuenta su relación biológica con *T. gondii*.

METODOLOGÍA

Se realizó una revisión sistemática, utilizando dos bases de datos para la recopilación de la información (Science direct y Scielo), un buscador (Google Scholar) y el Repositorio de la Universidad Nacional de Colombia, todos los documentos fueron organizados por medio del gestor bibliográfico Mendeley para su correcta revisión. Para la búsqueda se emplearon palabras claves en español presentes en DeCS, BIREME como "Neosporosis", "Neospora caninum", "Toxoplasmosis", "Toxoplasma gondii", "Neospora humans" y en inglés presentes en MeSH, NLM como "Neospora human infection", "Neospora zoonotic". En esta búsqueda, se obtuvieron alrededor de 3.000 resultados para *N. caninum* y un promedio de 17.000 para *T. gondii* en la búsqueda. Dentro de ellos se seleccionaron aquellos relacionados con diagnóstico y estudios en humanos. Se encontraron 40 documentos que cumplían estos criterios y fueron divididos en artículos de revisión, investigación y resúmenes. De estos, 24 fueron utilizados para la introducción y discusión. Finalmente, 8 fueron seleccionados por evaluar la infección en humanos. El periodo de tiempo de la recopilación de datos fue de 1998 a 2017.

RESULTS

8 documents, which are indicated in Table 1, met the inclusion requirements for the purpose of this study (studies that analyzed the infection in human samples). In these works, tests were performed to look for antibodies against *N. caninum* in humans, but none used methods to isolate or cultivate the parasite.

Ho-Woo (17), detected anti-*N. caninum* antibodies in positive and negative human sera against *Toxoplasma gondii* by ELISA, Western blot and IFAT. Twelve sera of 172 (6.7%) positive for *T. gondii* cross-reacted with *N. caninum* antigens, and one of 110 negative sera for *T. gondii* (0.9%) reacted with *N. caninum* antigens by ELISA. By western blot, the 12 sera reacted against *T. gondii* with several band patterns 30kDa (SAG1) and 22 kDa (SAG2), but with *N. caninum* the number of reactive bands decreased. At 43 kDa (SAG), three cases of the *T. gondii* positive group and one of the *T. gondii* negative group reacted. By IFAT all sera from the *T. gondii* positive group marked the membrane surface for *T. gondii*, whereas for *N. caninum* the fluorescence was detected at the membrane surface, cellular organelles, or both. The group of *T. gondii* negative also reacted strongly for *N. caninum* in cellular organelles; suggesting that antibodies against

RESULTADOS

Se encontraron 8 documentos, que se indican en el Tabla 1, los cuales cumplieron los requisitos de inclusión para el objetivo de este estudio (estudios que analizaron la infección en muestras humanas). En estos trabajos se realizaron análisis para buscar anticuerpos contra *N. caninum* en humanos pero ninguno utilizó métodos para aislar o cultivar el parásito.

Ho-Woo (17), detectaron anticuerpos anti-*N. caninum* en sueros humanos positivos y negativos contra *Toxoplasma gondii* por ELISA, Western blot e IFAT. Doce sueros de 172 (6.7%) positivos a *T. gondii* tuvieron reacción cruzada con antígenos de *N. caninum*, y uno de 110 sueros negativos para *T. gondii* (0.9%) reaccionó con antígenos de *N. caninum* por ELISA. Por western blot, los 12 sueros reaccionaron contra *T. gondii* con varios patrones de banda 30kDa (SAG1) y 22 kDa (SAG2), pero con *N. caninum* el número de bandas reactivas disminuyeron. A 43 kDa (SAG) reaccionaron tres casos del grupo de *T. gondii* positivo y uno del grupo *T. gondii* negativo. Por IFAT todos los sueros del grupo *T. gondii* positivos marcaron la superficie de membrana para *T. gondii*, mientras que para *N. caninum* la fluorescencia fue detectada en la superficie de membrana, organelos celulares, o ambos. El grupo de *T. gondii* negativo también

Table 1. Studies for the detection of anti-*N. caninum* antibodies in sera and cell lines in humans.

Authors	Method	Number human samples	% positivity
Ho-Woo et al (17) 1998	ELISA, Western blot and IFAT.	172 sera (+) <i>T. gondii</i> 110 sera (-) <i>T. gondii</i>	6.7% cross reaction, 3/172 (1.7%) and 1/110 (0.9%) for <i>N. caninum</i>
Petersen et al (18) 1999	ELISA, Western blot and IFAT.	76 sera of women with repeated miscarriages	1.3%
Tranas et al (19) 1999	IFAT and Western blot.	1029 serum samples	6.7% 1:100
Lobato et al (20) 2006	IFAT, ELISA, Western blot.	256 serum samples: 61 VIH (+), 50 patients with neurological signs, 91 newborns, 54 healthy	38%, 18%, 5% and 6%, respectively
McCann et al (21) 2008	ELISA, IFAT.	3232 samples of general population serum and 518 high risk group	21.38% and 5.56% >20% ELISA inhibition
Gangneux et al (22) 2009	IFAT and ELISA	500 sera in healthy women and 400 VIH (+)sera	8% healthy, 4% VIH (+) => 1:20; 0.7%=> 1:80; 0.2%=> 1:160
Benetti et al (23) 2010	IFAT, Western blot	1036 samples of serum : 932 bovine dairy females, 37 dogs 67 humans	(53.5%), (67.6%) (10.5%), respectively,
Carvalho et al (24) 2010	LDH and MTT, ELISA	Cell lines BeWo and HeLa	Susceptibility of infection in both cell lines

N. caninum may be present in human sera, however, the rate of positives to infection was very low 3/172 (1.7%) and 1/110 (0.9%).

Petersen (18), determined whether *N. caninum*, known to cause repeated miscarriages and stillbirths in cattle, also causes repeated abortions in women. To do so, they retrospectively examined serum samples from 76 women with an average age of 30.8 years, with a history of repeated miscarriages and intrauterine fetal death for probable evidence of *N. caninum* infection. In this study, no antibodies against the parasite were detected by ELISA, IFAT or western blot.

Tranas (19) searched for evidence of human exposure to *N. caninum* by detecting antibodies in blood donors by IFAT and western blot. Of the 1,029 samples examined, 69 (6.7%) had 1: 100 titres through IFA tests. Fifty of the 69 (72%) sera that were positive for *N. caninum* were negative for *T. gondii*. Immunoblot analysis confirmed the specificity of sera positive for *N. caninum* antigens with several sera recognizing multiple *N. caninum* antigens with molecular masses similar to those of antigens recognized for serum with antigens against *N. caninum* in non-human primates. An immunodominant antigen of approximately 35 kDa was observed in 12 sera. These data provide evidence of human exposure to *N. caninum* although antibody titers in healthy donors were low, ignoring the significance of human exposure and possible infection with this parasite.

Lobato (20), investigated the presence of *N. caninum* antibodies in seronegative individuals and seropositive to *T. gondii* by means of IFAT, ELISA and Western blot. A total of 256 serum samples divided into four groups were evaluated: 61 samples of HIV-positive patients, 50 samples of patients with neurological disorders, 91 samples of newborns and 54 samples of individuals. Immunoglobulin G *N. caninum* antibodies were predominantly detected in HIV-infected patients (38%) and patients with neurological disorders (18%), while newborns and healthy individuals showed lower percentages of seropositivity (5 and 6%, respectively). Seropositivity to *N. caninum* was significantly associated with seropositivity to *T. gondii* both in patients infected with HIV and in patients with neurological disorders. Seroreactivity to *N. caninum* was confirmed by Western blot, with positive sera predominantly recognizing the 29 kDa antigen of *N. caninum*. The results of this study indicate the presence of infection or exposure of *N. caninum* in humans, particularly in HIV-infected patients

reaccionó fuertemente para *N. caninum* en organelos celulares; sugiriendo que anticuerpos contra *N. caninum* pueden estar presentes en sueros humanos, sin embargo, la tasa de positivos a la infección fue muy baja 3/172 (1.7%) y 1/110 (0.9%).

Petersen (18), determinaron si *N. caninum*, conocido por causar repetidos abortos y mortinatos en bovinos, también causa abortos repetidos en mujeres. Para ello, se examinaron retrospectivamente muestras de suero de 76 mujeres con un promedio de edad de 30.8 años, con antecedentes de abortos repetidos y muerte fetal intrauterina para probable evidencia de infección por *N. caninum*. En este estudio no se detectaron anticuerpos contra el parásito mediante ELISA, IFAT o western blot.

Tranas (19), buscaron la evidencia de la exposición humana a *N. caninum* mediante la detección de anticuerpos en donantes de sangre mediante IFAT y western blot. De las 1.029 muestras examinadas, 69 (6.7%) tuvieron títulos de 1: 100 mediante pruebas IFA. Cincuenta de los 69 (72%) sueros que fueron positivos para *N. caninum*, fueron negativos para *T. gondii*. El análisis por inmunotransferencia confirmó la especificidad de los sueros positivos para los antígenos de *N. caninum* con varios sueros que reconocían múltiples antígenos de *N. caninum* con masas moleculares similares a las de los antígenos reconocidos para el suero con antígenos contra *N. caninum* de primates no humanos. Se observó un antígeno inmunodominante de aproximadamente 35 kDa en 12 sueros. Estos datos proporcionan evidencia de exposición humana a *N. caninum* aunque los títulos de anticuerpos en donantes sanos eran bajos, desconociendo el significado de la exposición humana y la posible infección con este parásito.

Lobato (20), investigaron la presencia de anticuerpos contra *N. caninum* en individuos seronegativos y seropositivos a *T. gondii* mediante IFAT, ELISA y Western blot. Se evaluaron un total de 256 muestras de suero divididas en cuatro grupos 61 muestras de pacientes positivos a VIH, 50 muestras de pacientes con trastornos neurológicos, 91 muestras de recién nacidos y 54 muestras de individuos. Los anticuerpos de inmunoglobulina G contra *N. caninum* se detectaron predominantemente en pacientes infectados por el VIH (38%) y pacientes con trastornos neurológicos (18%), mientras que los recién nacidos e individuos sanos mostraron porcentajes de seropositividad más bajas (5 y 6%, respectivamente). La seropositividad a *N. caninum* se asoció significativamente con la seropositividad a *T. gondii* tanto en pacientes

or patients with neurological disorders, who could have opportunistic and concurrent infections with *T. gondii*.

McCann (21), in England, performed retrospective tests of 3232 serum samples from the general population and 518 serum samples from a high-risk group using IFAT and ELISA to analyze the frequency distribution. There was no evidence of human exposure to *N. caninum*.

Gangneux (22) investigated the seroprevalence of *N. caninum* in humans in France, where the seroprevalence for *T. gondii* is high. They used 500 sera from healthy women and 400 serum samples from patients infected with HIV. All serum samples were subjected to antibody tests against *T. gondii* by IFAT and ELISA. In 40 samples (8%) of immunocompetent persons and in 21 samples (4%) of immunocompromised persons, a weak fluorescence was observed at a 1:20 dilution. None of the 500 samples from immunocompetent patients was positive for anti-caninum antibodies when evaluated at a dilution of 1:80. Within the group of immunocompromised people, 3 were seropositive for *N. caninum* at a titer of 1:80 and one sample was positive with a titer of 1:160. No evidence of infection or exposure of *N. caninum* was found in immunocompetent persons, but possible infection by *N. caninum* could not be excluded.

Benetti (23), evaluated the frequency of antibodies against *N. caninum* in dairy cattle of the southwestern region of the state of Mato Grosso, Brazil, in addition to serum samples obtained from dogs and humans living on farms. 1036 serum samples were analyzed, of which 932 (89.9%) were from dairy bovine females, 37 (3.57%) from dogs and 67 (6.46%) from humans, who lived in 24 farms and were examined by IFAT. The reactive samples of human serum were again analyzed by Western blot to confirm the results. Antibodies against *N. caninum* were found in 499 cattle sera (53.5%), with at least one positive in each farm, 25 dog sera (67.6%) and seven human sera (10.5%). There were no significant differences in the number of positive bovine sera according to age group.

Carvalho (24), verified the susceptibility of human trophoblastic cells (BeWo) in comparison with cervical uterine cell lines (HeLa) before infection with *N. caninum*. BeWo and HeLa cells were infected with different concentrations of the parasite: *N. caninum* tachyzoites and analyzed at different times

infectados con VIH como en pacientes con trastornos neurológicos. La serorreactividad a *N. caninum* fue confirmada por Western blot, con sueros positivos predominantemente reconociendo el antígeno de 29 kDa de *N. caninum*. Los resultados de este estudio indican la presencia de infección o exposición de *N. caninum* en seres humanos, particularmente en pacientes infectados por VIH o pacientes con trastornos neurológicos, que podrían tener infecciones oportunistas y concurrentes con *T. gondii*.

McCann (21), en Inglaterra, realizaron pruebas retrospectivas de 3232 muestras de suero de la población general y 518 muestras de suero de un grupo de alto riesgo empleando IFAT y ELISA para analizar la distribución de frecuencias. No hubo evidencia de exposición humana a *N. caninum*.

Gangneux (22), investigaron la seroprevalencia de *N. caninum* en humanos en Francia, donde la seroprevalencia para *T. gondii* es alta. Utilizaron 500 sueros de mujeres sanas y 400 muestras de suero de pacientes infectadas con VIH. Todas las muestras de suero se sometieron a pruebas de anticuerpos contra *T. gondii* mediante IFAT y ELISA. En 40 muestras (8%) de personas inmunocompetentes y en 21 muestras (4%) de personas inmunocomprometidas, se observó una débil fluorescencia a una dilución 1:20. Ninguna de las 500 muestras de pacientes inmunocompetentes fue positiva para anticuerpos anti- *N. caninum* cuando se evaluaron a una dilución de 1:80. Dentro del grupo de personas inmunocomprometidas, 3 fueron seropositivas para *N. caninum* a un título de 1:80 y una muestra fue positiva con un título de 1:160. No se encontró evidencia de infección o exposición de *N. caninum* en personas inmunocompetentes, pero no se pudo excluir posible infección por *N. caninum*.

Benetti (23), evaluaron la frecuencia de anticuerpos contra *N. caninum* en ganado lechero de la región suroeste del estado de Mato Grosso, Brasil, además de muestras de suero obtenidas de perros y seres humanos que viven en las granjas. Se analizaron 1036 muestras de suero, de las cuales 932 (89.9%) fueron de hembras bovinas lecheras, 37 (3.57%) de perros y 67 (6.46%) de seres humanos, que habitaban en 24 granjas y se examinaron mediante IFAT. Las muestras reactivas de suero humano fueron nuevamente analizadas por Western blot para confirmar los resultados. Se encontraron anticuerpos contra *N. caninum* en 499 sueros de ganado vacuno (53.5%), con al menos un positivo en cada finca, 25 sueros de perros (67.6%) y siete sueros humanos (10.5%).

after infection to observe cell viability. Both cell lines were also evaluated for cytokine production and parasite infection / replication assays when pre-treated or not with *N. caninum* lysate antigen (NLA) or recombinant human IFN- γ . Cell viability increased up to 48 h post-infection in both cell types, suggesting that the infection could inhibit early cell death and / or induce cell proliferation. The HeLa cells were more susceptible to infection by *N. caninum* than the BeWo cells and the previous treatment with IFN- γ showed a reduced infection index in both cell lines. It was concluded that BeWo and HeLa cells were infected by *N. caninum*, although they show differences in susceptibility to infection, cytokine production and cell viability.

DISCUSSION

Zoonoses continue to register high incidence rates in countries causing significant morbidity and mortality. Cattle infections and parasitosis alter organic functioning and reduce their productive index. Humans become infected through food, water, soil and close contact with animals. These diseases are also an obstacle to international trade, as well as a serious economic deficit for livestock industries and, in general, for the economy of a community or country, which can have wide repercussions for public health in a society (25) .

Highlighting the very close morphological and biological phylogenetic relationship that exists between *T. gondii* and *N. caninum* (9), and that in the beginning, cases in animals such as cattle and canines infected with *N. caninum* clinically and pathologically could be misdiagnosed as infected by *T. gondii* (19), the possibility of *N. caninum* infection in humans should be considered, given its biological similarity with *T. gondii* and considering its clinical importance.

Three studies so far show exposure of *N. caninum* in humans; serologically positive samples by means of ELISA, IFAT and western blot in patients with HIV, with neurological signs or with predisposing factors such as a direct link with bovine production and contact with dogs in rural areas (19,20,23).

Research should continue to search for *N. caninum* infection in humans by serological tests or alternatively, using tissue obtained from biopsy to be processed by PCR or immunohistochemistry (17).

No hubo diferencias significativas en el número de sueros de bovinos positivos según el grupo de edad.

Carvalho (24), verificaron la susceptibilidad de células trofoblásticas humanas (BeWo) en comparación con las líneas celulares cervicales uterinas (HeLa) ante la infección por *N. caninum*. Las células BeWo y HeLa fueron infectadas con diferentes concentraciones del parásito: taquizoitos de *N. caninum* y analizadas en diferentes momentos después de la infección para observar la viabilidad celular. Ambas líneas celulares también se evaluaron para la producción de citoquinas y los ensayos de infección / replicación de parásitos cuando se pre-trataron o no con antígeno de lisado de *N. caninum* (NLA) o IFN- γ recombinante humano. La viabilidad celular se incrementó hasta 48 h post-infección en ambos tipos de células, lo que sugiere que la infección podría inhibir la muerte celular temprana y / o inducir la proliferación celular. Las células HeLa fueron más susceptibles a la infección por *N. caninum* que las células BeWo y el tratamiento previo con IFN- γ mostró como resultado índice de infección reducido en ambas líneas celulares. Se concluyó que las células BeWo y HeLa fueron infectadas por *N. caninum*, aunque presentan diferencias en la susceptibilidad a la infección, la producción de citoquinas y la viabilidad celular.

DISCUSIÓN

Las zoonosis continúan registrando altas tasas de incidencia en los países y causando significativa morbidad y mortalidad. Las infecciones y las parasitosis del ganado son capaces de alterar su funcionamiento orgánico y reducir su índice productivo. Los seres humanos se infectan a través de la comida, el agua, el suelo y el contacto cercano con los animales. Estas enfermedades son también un obstáculo para el comercio internacional, así como un grave déficit económico para las industrias ganaderas y en general, para la economía de una comunidad o país, lo que puede tener amplias repercusiones para la salud pública en una sociedad (25).

Reiterando la relación filogenética tan estrecha morfológica y biológica que existe entre *T. gondii* y *N. caninum* (9), y que en un principio los casos en animales como bovinos y caninos infectados por *N. caninum* clínicamente y patológicamente pudieron ser mal diagnosticados como infectados por *T. gondii* (19), se pensaría la posibilidad de infección por *N. caninum* en humanos, dada la semejanza biológica con *T. gondii* y teniendo en cuenta la importancia clínica de este.

Large-scale studies involving different countries are needed to more accurately determine the potential role of this parasite in immunocompetent humans with defined and immunodeficient risk factors to isolate the parasite or detect *N. caninum* DNA in these patients.

It is also convenient to carry out more studies to identify the surface proteins of *N. caninum* and thus avoid possible cross-reactions with surface proteins of *T. gondii*.

The lack of evidence of *N. caninum* infection in women who had repeated spontaneous abortions does not rule out the possibility that the infection could occur in humans. The predominant effects of neosporosis in dogs are mainly progressive neurological signs that include paralysis. Therefore, it may be useful to examine human patients with clinical symptoms other than abortions, for example, neurological disorders of unknown etiology (18). In this regard, the human being could be exposed to *N. caninum* as an infectious form or simply an antigenic form.

Several *in vitro* studies where human cells have been used as host cells, such as fibroblasts (26), human foreskin (27) human colon tumor cells (28) and human mammary gland (29), may be evidence of infection with *N. caninum*. These results support the notion that *N. caninum* can invade a variety of cell types from different hosts, including cattle, dogs, cats, mice, sheep, monkeys and human cells.

With the evidence obtained so far, the role of *N. caninum* as a human pathogen is unclear. Serological data from humans only suggest that infection could occur. Studies would be required, for example, with molecular techniques that allow the species to be sequenced and confirmed, since immunological techniques will always have the possibility of cross-reaction. (30)

It is necessary to carry out more epidemiological studies of the disease, obtaining seroprevalences in different farms, evaluating all the predisposing factors altogether, obtaining samples of cattle, dogs and humans as in the study done by Benedetti (23) and thus getting a general perspective of the disease in the country and worldwide. Considering that dogs are both the intermediate host and the definitive host of *N. caninum*, these could represent a potential threat for humans due to their close relationship (31,32).

Tres estudios son los que hasta el momento evidencian exposición de *N. caninum* en humanos; muestras positivas serológicamente mediante ELISA, IFAT y western blot de pacientes con VIH, con signos neurológicos o con factores predisponentes como es el vínculo directo con producciones bovinas y contacto con caninos en zonas rurales (19,20,23).

Las investigaciones deben continuar la búsqueda de infección por *N. caninum* en humanos mediante pruebas serológicas o alternativamente, utilizando tejidos obtenidos de biopsia para ser procesados por PCR o inmunohistoquímica (17).

Se necesitan estudios a gran escala involucrando diferentes países para determinar con mayor precisión el papel potencial de este parásito en los seres humanos inmunocompetentes con factores de riesgo definidos e inmunodeficientes para aislar el parásito o detectar el ADN de *N. caninum* en estos pacientes.

Además es conveniente realizar más estudios para identificar las proteínas superficiales de *N. caninum* y así evitar las posibles reacciones cruzadas con las proteínas superficiales de *T. gondii*.

La no evidencia de infección por *N. caninum* en mujeres que habían repetido abortos espontáneos, no descarta la posibilidad de que la infección pueda ocurrir en humanos. Los efectos predominantes de la neosporosis en perros son principalmente signos neurológicos progresivos incluyendo parálisis. Por lo tanto, podría ser útil examinar pacientes humanos con síntomas clínicos distintos de los abortos, por ejemplo, trastornos neurológicos de etiología desconocida (18). Al respecto, el ser humano podría estar expuesto a *N. caninum* como una forma infecciosa o una forma antigénica simplemente.

En varios estudios *in vitro* se han utilizado células humanas como células hospederas, tales como fibroblastos (26), de prepucio humano (27) células tumorales de colon humano (28) y de glándula mamaria humana (29), que puede ser una evidencia de la infección de *N. caninum*. Estos resultados apoyan la noción de que *N. caninum* tiene la capacidad de invadir una variedad de tipos de células de diferentes hospederos, incluyendo bovinos, perros, gatos, ratones, ovinos, monos y células humanas.

Con la evidencia obtenida hasta ahora, el papel de *N. caninum* como patógeno humano no está claro. Los datos serológicos de los seres humanos sólo sugieren que la infección podría ocurrir. Se requeriría estudios por ejemplo con técnicas moleculares que permitan secuenciar y confirmar la especie, pues las técnicas inmunológicas van a tener siempre la posibilidad de reacción cruzada. (30)

It is necessary to carry out more epidemiological studies, obtaining seroprevalence figures at different regions and to evaluating all the possible risk factors involved, as well as obtaining samples from humans, bovine and dogs as performed previously by Benedetti (23). In this way it would be obtained a general perspective of the situation of this infection in Colombia and the rest of the world. It should be taken into account that dogs are the definitive host and because its near relation with humans, represent a potential zoonotic risk (31,32).

N. caninum is an intracellular protozoan closely related to *T. gondii*, as demonstrated by the comparison of the genomes of both organisms (11). It is not ruled out that the probability of zoonosis due to *N. caninum* infection may exist, but more research is required to demonstrate the level of exposure, risk factors and associated clinical signs or pathologies.

Es necesario realizar más estudios epidemiológicos de la enfermedad, obteniendo seroprevalencias en diferentes predios, evaluando todos los factores predisponentes conjuntamente, obtener muestras de bovinos, caninos y humanos como el estudio hecho por Benedetti (23) y así tener una perspectiva general de la enfermedad en el país y a nivel mundial. Teniendo en cuenta que los perros son tanto el hospedero intermedio como el definitivo de *N. caninum*, estos podrían representar una amenaza potencial para el ser humano debido a su estrecha relación (31,32).

N. caninum es un protozoario intracelular estrechamente relacionado con *T. gondii*, tal como se ha demostrado por la comparación de genomas de ambos organismos (11). No se descarta que pueda existir la probabilidad de zoonosis debido a la infección por *N. caninum*, pero se requieren más investigaciones que demuestren el nivel de exposición, los factores de riesgo y los signos clínicos asociados o patologías.

REFERENCES

1. Bjerkas I, Mohn SF, Presthus J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z Parasitenk* 1984; 70:271–274.
2. Baszler T V, Knowles DP, Dubey JP, Gay JM, Mathison B a, McElwain TF. Serological diagnosis of bovine neosporosis by *Neospora caninum* monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1996; 34(6):1423–1428.
3. Goodswen SJ, Kennedy PJ, Ellis JT. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present. *Infect Genet Evol* 2013; 13:133–150. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2012.08.012>
4. Dubey J, Dorough K, Jenkins M, Liddell S, Speer C, Kwok OC, et al. Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. *Int J Parasitol* 1998; 28(8):1293–304.
5. Shaapan RM. The common zoonotic protozoal diseases causing abortion. *J Parasit Dis* 2015; 40(4):1116–29.
6. Dubey JP, Lindsay DS, Lipscomb TP. Neosporosis in cats. *Vet Pathol* 1990; 27(5):335–9.
7. Dubey JP, Lindsay DS. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol* 1996; 67(1):1-59.
8. Bjerkas I, Jenkins MC, Dubey JP. Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1994; 1(2):214–21.
9. Monteiro RM, Richtzenhain LJ, Pena HF, Souza SL, Funada MR, Gennari SM., et al. Molecular phylogenetic analysis in *Hammondia*-like organisms based on partial Hsp70 coding sequences. *Parasitology* 2007; 134(Pt9):1195–203. doi:[10.1017/S0031182007002612](https://doi.org/10.1017/S0031182007002612)
10. Howe DK, Sibley LD. Development of molecular genetics for *Neospora caninum*: A complementary system to *Toxoplasma gondii*. *Methods* 1997; 13(2):123–33.
11. Howe DK, Mercier C, Messina M, Sibley LD. Expression of *Toxoplasma gondii* genes in the closely-related apicomplexan parasite *Neospora caninum*. *Mol Biochem Parasitol* 1997; 86(1):29–36.
12. Dubey J. Neosporosis—the first decade of research. *Int J Parasitol* 1999; 29(10):1485–8.
13. Dubey JP. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Vet Parasitol* 1999; 84(3):349–67.

14. Okeoma CM, Stowell KM, Williamson NB, Pomroy WE. *Neospora caninum*: quantification of DNA in the blood of naturally infected aborted and pregnant cows using real-time PCR. *Exp Parasitol* 2005; 110(1):48-55. doi:10.1016/j.exppara.2005.01.008
15. Barr BC, Conrad PA, Sverlow KW, Tarantal AF, Hendrickx AG. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. *Lab Invest* 1994; 71(2):236-42.
16. Vargas JJ, Cortés JA. 2001. *Neospora caninum*, ¿Una Zoonosis Potencial?. *Rev Salud Pública* 2001; 3(1):89-93
17. Ho-Woo N, Seung-Wong K, Won-Young C. Antibody reaction of human anti-*Toxoplasma gondii* positive and negative sera with *Neospora caninum* antigens. *Korean J Parasitol* 1998; 36(4):269-75
18. Petersen E, Lebech M, Jensen L, Lind P, Rask M, Bagger P, Björkman C, Uggla A. *Neospora caninum* Infection and Repeated Abortions in Humans. *Emerg Infect Dis* 1999; 5(2):278-80.
19. Tranas J, Heinzen RA, Weiss LM, McAllister MM. Serological Evidence of Human Infection with the Protozoan *Neospora caninum*. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6(5):765-67.
20. Lobato J, Silva DAO, Tiago WPM, Amaral JDHF, Silva-Segundo GR, Costa-Cruz JM, Ferreira MS, Borges AS, Mineo JR. Detection of Immunoglobulin G Antibodies to *Neospora caninum* in Humans: High Seropositivity Rates in Patients Who Are Infected by Human Immunodeficiency Virus or Have Neurological Disorders. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13(1):84-89. doi:10.1128/CVI.13.1.84-89.2006
21. McCann CM, Vyse AJ, Salmon RL, Thomas D, Williams DJL, Mc Garry JW, Pebody R, Trees AJ. Lack of Serologic Evidence of *Neospora caninum* in Humans England. *Emerg Infect Dis* 2008; 14(6):978-980.
22. Gangneux FR, Klein F. Serologic Screening for *Neospora caninum*, France. *Emerg Infect Dis* 2009; 15(6):987. doi: 10.3201/eid1506.081414
23. Benetti AH, Schein FB, Dos Santos TR, Toniollo GH, Da Costa AJ, Mineo JR, Lobato J, De Oliveira Silva A, Gennari SM. Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros, cães e trabalhadores rurais da região Sudoeste do Estado de Mato Grosso. *Rev Bras Parasitol Vet* 2009; 18(1):29-33. doi:10.4322/rbpv.018e1005
24. Carvalho JV, Alves CMOS, Cardoso MRD, Motaa CM, Barbosa BF, Ferro EAV, Silva NM, Mineo TWP, Silva DAO. Differential susceptibility of human trophoblastic (BeWo) and uterine cervical (HeLa) cells to *Neospora caninum* infection. *Int J Parasitol* 2010; 40:1629-1637.
25. Torgerson PR, Macpherson CNL. The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: Global trends. *Vet Parasitol* 2011; 182:79-95. doi:10.1016/j.vetpar.2011.07.017
26. Weiss LM, Ma YF, Halonen S, McAllister MM, Zhang YW. The in vitro development of *Neospora caninum* bradyzoites. *Int J Parasitol* 1999; 29:1713-23.
27. Sundermann CA, Estridge BH. Growth of and competition between *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in vitro. *Int J Parasitol* 1999; 29:1725-32.
28. Omata Y, Kano R, Masukata Y, Kobayashi Y, Igarashi M, Maeda R, et al. Development of *Neospora caninum* cultured with human serum in vitro and in vivo. *J Parasitol* 2005; 91:222-25.
29. Lv Q, Li J, Gong P, Xing S, Zhang X. *Neospora caninum*: In vitro culture of tachyzoites in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Exp Parasitol* 2010; 126:536-39
30. Gondim LF1, Mineo JR2, Schares G3. Importance of serological cross-reactivity among *Toxoplasma gondii*, *Hammondia* spp., *Neospora* spp., *Sarcocystis* spp. and *Besnoitia besnoiti*. *Parasitology* 2017; 28:1-18. doi: 10.1017/S0031182017000063.
31. McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire, AM. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 1998; 28:1473-78.
32. Dubey JP. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J Parasitol* 2003; 41:1-16.