

## ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO SOBRE NEOSPOROSIS EN FETOS BOVINOS PROCEDENTES DE MATADERO

### HISTOPATOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY ON NEOSPOROSIS IN BOVINE FETUSES COMING FROM SLAUGHTERHOUSE

Teresa Oviedo S,\* M.Sc, Gustavo Bustamante G, MVZ, Jorge Mejía L, MVZ.

Universidad de Córdoba, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Ciencias Pecuarias. Montería, Colombia. \*correspondencia: tere\_oviedo@yahoo.com

Recibido: Marzo 12 de 2008; Aceptado: Julio 30 de 2008

#### RESUMEN

**Objetivo.** Determinar la presencia de lesiones, formas evolutivas y antígenos compatibles con *Neospora caninum*, a través de estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos en el sistema nervioso central de fetos bovinos procedentes de matadero. **Materiales y métodos.** Se estudiaron muestras de cerebro, cerebelo y médula de 108 fetos mayores de cinco meses, provenientes de un frigorífico del municipio de Montería – Córdoba. Los estudios histopatológicos se realizaron mediante coloración con hematoxilina - eosina y los estudios inmunohistoquímicos a través de la técnica de peroxidasa anti-peroxidasa. **Resultados.** El estudio estableció que de los 108 fetos examinados por histopatología, el 27,8% presentaron lesiones compatibles con el protozoario. Estas lesiones, fueron observadas principalmente en cerebro (24.1%) y en menor número a nivel medular (3.7%). Las lesiones compatibles observadas consistieron en gliosis, meningitis, congestión y hemorragia focal severa. Los estudios inmunohistoquímicos, utilizados para detectar antígenos tisulares del agente etiológico, resultaron negativos. **Conclusiones.** Con base en los resultados, se puede afirmar que existen alteraciones histopatológicas en el sistema nervioso central de fetos bovinos procedentes de matadero, compatibles con infecciones por el protozoario *N. caninum*. La coloración inmunohistoquímica para detección del parásito fue negativa, no obstante, no se descarta la presencia del agente por lo que se sugiere la realización de técnicas más específicas como PCR.

**Palabras clave:** Neosporosis, bovinos, fetos, inmunohistoquímica.

#### ABSTRACT

**Objective.** To determine the presence of lesions, antigens or evolved forms compatible with *Neospora*, through histopathological and immunohistochemical studies in the central nervous system of bovine fetuses from a slaughterhouse. **Materials and methods.** Samples

of brain, spinal cord and cerebellum of 108 fetuses older than five months from a slaughterhouse in the Montería, Córdoba were studied. Histopathological studies were performed using coloration with hematoxylin and eosin and immunohistochemical studies used the peroxidase anti-peroxidase technique. **Results.** Of 108 fetuses examined histopathologically, 27.8% had injuries consistent with the protozoan. Lesions were observed mainly in brain (24.1%) and to a lesser degree in the spinal cord (3.7%). Compatible lesions consisted of gliosis, meningitis, congestion and severe focal bleeding. Immunohistochemical studies to detect tissue antigens of the etiologic agent were negative. **Conclusions.** We found histopathological alterations in central nervous system of bovine fetuses from the slaughterhouse, compatible with infection by the protozoan *N. caninum*. Immunohistochemical coloring for detection of the parasite was negative, however absence of the agent cannot be conclusively determined. We suggest conducting more specific techniques such as PCR.

**Key words:** Neosporosis, cattle, fetuses, immunohistochemical.

## INTRODUCCIÓN

*Neospora caninum* es un importante causa de aborto bovino alrededor del mundo. Los perros y coyotes, pueden actuar como huéspedes definitivos del agente ya que al consumir fetos abortados o placentas infectadas, liberan ooquistes que producen infección postnatal en el ganado (1,2). En los bovinos, además de la infección oral, es bien conocida la transmisión vertical, que puede mantener la infección en los hatos por varias generaciones, convirtiéndose en una ruta de infección muy importante epidemiológicamente (3).

En el ganado bovino, la enfermedad se manifiesta principalmente por abortos entre el quinto y sexto mes de gestación. No obstante, este signo se puede presentar en cualquier etapa. Para corroborar el diagnóstico de esta enfermedad, se utiliza el examen histopatológico de tejidos fetales principalmente cerebro, así como pruebas inmunohistoquímicas y serológicas (4).

La evolución de la preñez en un animal infectado depende de la etapa de preñez en la cual ocurrió la infección fetal. Se ha observado, que la infección en los primeros estadios de gestación tiende a resultar en aborto, y en etapas posteriores de gestación se encuentra asociado al nacimiento de terneros a término, clínicamente normales pero congénitamente infectados (5).

Para confirmar infecciones por *Neospora* en casos de abortos, se requieren muestras de uno o más fetos abortados, placenta y suero o fluido serosanguinolento acumulado en las cavidades del cuerpo. Histológicamente, se pueden observar cambios diseminados en diversos tejidos pero las lesiones más significativas para diagnóstico son las observadas en el cerebro y consisten en focos de infiltrado celular no supurativo, ocasionalmente se pueden observar focos de necrosis (4). Otras lesiones histopatológicas consisten en epicarditis y miocarditis focal no supurativa, miositis y hepatitis portal no supurativa, frecuentemente con focos de necrosis hepática y neumonía intersticial no supurativa (6).

El diagnóstico presuntivo de infección por *Neospora* puede basarse usualmente en las lesiones antes mencionadas, sin embargo, la confirmación del agente se realiza a través de técnicas inmunohistoquímicas, usando anticuerpos para identificar formas evolutivas del parásito como quistes tisulares y taquizoitos en tejidos fetales. La inmunohistoquímica para *Neospora* es más eficiente usando secciones de cerebro fetal, aunque el parásito puede estar presente en pulmón, riñón y músculo esquelético (6).

Las enfermedades reproductivas son una

problemática frecuente en la especie bovina que implican graves pérdidas económicas. Estas patologías, generalmente han sido asociadas a etiologías de origen bacteriano y viral como *Leptospira*, *Brucella*, diarrea viral bovina y rinotraqueitis infecciosa bovina entre otras, no obstante, se debe considerar al protozooario *N. caninum* como una causa poco estudiada en el ámbito ganadero de la Costa Atlántica colombiana.

En Colombia existen estudios que demostraron la presencia de anticuerpos contra *N. caninum* en 54.1% de vacas con antecedentes abortivos procedentes de la Sabana de Bogotá, Nariño y algunas fincas de clima cálido (7). Igualmente, estudios realizados en vacas con antecedentes de trastornos reproductivos en Montería, Córdoba, demostraron la presencia de anticuerpos compatibles en el 10.2% de los animales estudiados (8). Los resultados obtenidos en estas investigaciones, ameritan estudios encaminados a identificar y aislar el agente etiológico, con fines de caracterización. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de lesiones, formas evolutivas y antígenos compatibles con *Neospora caninum*, a través de estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos en el sistema nervioso central de fetos bovinos procedentes de matadero.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Sitio y tipo de estudio.** La investigación planteada correspondió a una evaluación de tipo exploratorio y descriptivo prospectivo, que se realizó en el municipio de Montería – Córdoba. La población de estudio fueron fetos de cinco o más meses de gestación, procedentes de hembras bovinas que llegaron al frigorífico del municipio de Montería.

**Tamaño de la muestra y análisis de datos.** El cálculo de la muestra se hizo teniendo en cuenta el promedio de hembras/mes que entraron a matadero con mas de cinco meses de gestación, lo cual fue estimado en 512 animales, de acuerdo con los registros tomados previos al presente estudio.

Para calcular el tamaño de la muestra (n), se usó un intervalo de confianza del 95% ( $z = 1.96$ ) y un error máximo permisible del 5% ( $e = 0.05$ ). La frecuencia esperada de positivos se hizo con base en el 10% (p), que es el porcentaje de seropositivos al parásito previamente encontrados en el municipio de Montería (8). La frecuencia esperada de negativos 90% (q), en animales con antecedentes de trastornos reproductivos. El tamaño de la muestra correspondió a 108 fetos.

### Recolección y procesamiento de muestras.

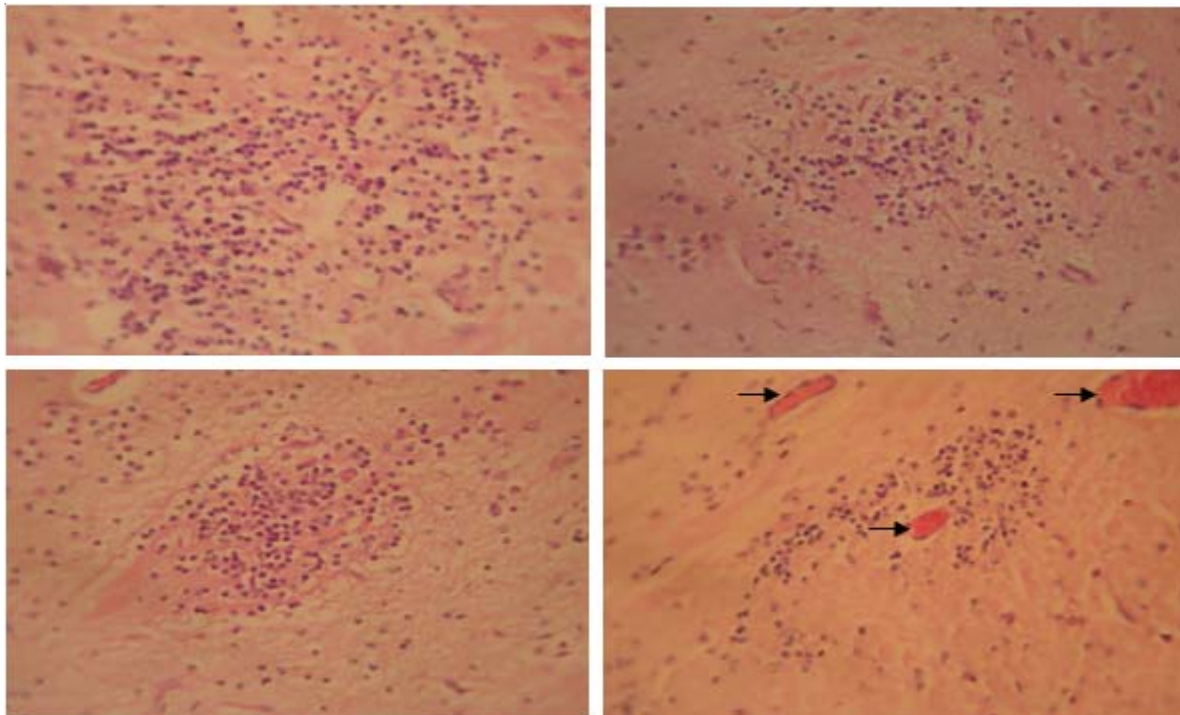
**Histopatología.** Se recolectaron tejidos de: cerebro, cerebelo y médula, que son los lugares donde con mayor frecuencia se reportan lesiones por *N. caninum* (9). Estos tejidos fueron fijados en formalina al 10% tamponada. Posteriormente, las muestras fueron procesadas, cortadas y coloreadas con Hematoxilina – eosina, según los procedimientos histológicos de rutina descritos por Luna (10).

### Técnica de inmunoperoxidasa para la detección de antígenos de *N. caninum*.

En muestras de tejido que presentaron alteraciones histopatológicas compatibles con neosporosis, se realizó la técnica inmunohistoquímica de inmunoperoxidasa para identificación de antígenos del parásito en tejidos. La técnica fue desarrollada en el Centro de diagnóstico – CEISA, Laboratorio de Virología – Bovina, el cual sigue los protocolos de Morales et al (11).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Histopatología.** De los 108 fetos examinados el 27.8% presentó lesiones en los tejidos estudiados compatibles con infección por *N. caninum*. Estas lesiones fueron observadas principalmente en cerebro, donde 24.1% de los fetos presentaron algún tipo de lesión (Figura. 1), mientras que 3.7% presentaron lesiones medulares. En ninguno de los casos se observó lesión en el cerebelo. La tabla 1 muestra el número y porcentaje de fetos que presentaron lesiones en los tejidos estudiados.



**Figura 1.** Cortes histopatológicos de cerebro de fetos bovinos provenientes de matadero. A, B y C se observa gliosis a nivel de cerebro, D. además de un foco de gliosis se observan vasos sanguíneos congestionados (flechas).

**Tabla 1.** Número y porcentaje de fetos con lesiones en cerebro, cerebelo y médula.

	<b>Cerebro</b>	<b>%</b>	<b>Cerebelo</b>	<b>%</b>	<b>Médula</b>	<b>%</b>
<b>Con lesiones</b>	26	24.1	0	0	4	3.7
<b>Sin lesiones</b>	82	75.9	108	100	104	96,3
<b>Total</b>	<b>108</b>	<b>100</b>	<b>108</b>	<b>100</b>	<b>108</b>	<b>100</b>

Al observar detalladamente las lesiones encontradas en los tejidos estudiados se encontraron los siguientes cambios histológicos: gliosis focal 10.52%, gliosis difusa 2.63%, gliosis multifocal 0.87%, gliosis focal nodular 3.5%, hemorragias focales

severas 1.74%, meningitis 0.87%, congestión 5.26% y encefalitis supurativa 0.87%. En la tabla 2 se resumen las alteraciones microscópicas observadas en los tejidos estudiados.

**Tabla 2.** Hallazgos histopatológicos, tenido en cuenta el tipo de tejido, lesión histológica observada y porcentaje de fetos que presentaron lesiones.

<b>Lesión</b>	<b>Cerebro</b>	<b>Cerebelo</b>	<b>Medula</b>	<b>%</b>
Gliosis focal	12	0	0	11.1
Gliosis difusa	3	0	0	2.8
Gliosis multifocal	1	0	0	0.93
Gliosis focal nodular	4	0	0	3.7
Encefalitis supurativa	1	0	0	0.93
Meningitis	1	0	0	0.93
Congestión	4	0	2	5.55
Hemorragia focal severa	0	0	2	1.85

Algunos hallazgos histopatológicos con coloración básica de hematoxilina - eosina, están de acuerdo con lo que se ha informado en varias especies animales infectadas natural o experimentalmente por *N. caninum*. Las lesiones fueron observadas principalmente en cerebro lo cual coincide con diferentes autores quienes afirman que es el órgano mas afectado en casos de neosporosis (9, 12, 13).

Al realizar estudios histopatológicos en el sistema nervioso central en fetos bovinos abortados y encontrar lesiones como encefalitis necrotizante multifocal no purulenta, gliosis y presencia de estructuras quísticas entre otras alteraciones, hay que considerar necesariamente un diagnóstico presuntivo compatible con *N. caninum* (12)

Diversos autores (12-16) afirman que el diagnóstico presuntivo de infección por *N. caninum* puede basarse en las lesiones histológicas de diversos tejidos, principalmente SNC. La lesión mas frecuentemente reportada en trabajos de investigación sobre neosporosis, es la encefalitis o encefalomiелitis multifocal no supurativa. Este tipo de lesión no fue observada en los hallazgos histopatológicos del presente estudio, en cual, uno de los animales presentó lesiones de encefalitis pero, de tipo supurativo. Lesiones como gliosis focal, gliosis difusa, gliosis multifocal, meningitis, congestión y hemorragia focal severa observadas en la mayoría de los tejidos estudiados en este trabajo, son reportadas permanentemente como hallazgos histopatológicos en casos confirmados de neosporosis bovina (4, 9, 12, 17). Por otra parte, en este trabajo se reportan cuatro casos con lesiones de gliosis focal nodular lo cual es típico de infecciones virales sin ser específico de ello.

**Inmunohistoquímica.** Con respecto a los estudios inmunohistoquímicos, las muestras de tejido que presentaron alteraciones histopatológicas compatibles con neosporosis resultaron con inmunomarcación negativa para antígenos del protozoario.

De Meerschman et al (16) y Wouda et al (18) afirmaron que el diagnóstico presuntivo de la infección por *Neospora* puede ser realizado, en las lesiones histológicas; sin embargo, la inmunohistoquímica usando anticuerpos contra *Neospora* es un método más eficiente para la detección de estadios quísticos y taquizoitos en tejidos fetales. La inmunohistoquímica para *Neospora* es exitosa en secciones de cerebro y otros tejidos fetales, no obstante, autores como Baszler et al (19) y Van Maanen et al (20) afirmaron que los exámenes histológicos e inmunohistoquímicos para reportar neosporosis en los tejidos del huésped podrían tener pobre sensibilidad para detectar el parásito, la mayoría de las veces, por un bajo número de antígeno en tejidos y otras debido a la baja calidad de la muestra fetal por procesos autolíticos, momificación o maceración, lo cual fue corroborado por Anderson et al (6). Por lo anterior, se puede afirmar que si bien se observó inmunomarcación negativa para el antígeno, no se puede descartar la asociación de *N. caninum* a las lesiones en los tejidos estudiados. Es indispensable realizar pruebas más sensibles como PCR con el fin de detectar pequeñas cantidades de antígenos en los tejidos estudiados.

### Agradecimientos

A la Universidad de Córdoba por la financiación del estudio. A la empresa FRIGOSINÚ, por permitir el muestreo de los animales.

## REFERENCIAS

1. McAllister M, Dubey J, Lindsay D, Jolley W, Wills R, McGuire A. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int J Parasitol 1998; 28(9): 1473-8.
2. Gondim L, McAllister M, Pitt W, Zemlicka D. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int J Parasitol 2004; 34(2): 159-61.



3. Wouda W, Moen A, Schukken Y. Abortion risk in progeny of cows after a *N. caninum* epidermic. *Theriogenology* 1998; 49(7): 1311-6.
4. Anderson M, Andrianarivo A, Conrad P. *Neosporosis* in cattle. *Anim Reprod Sci* 2000; 60: 417-31.
5. Toolan D. *Neospora caninum* abortion in cattle - a clinical perspective. *Ir Vet J* 2003; 56(8): 404-12
6. Anderson M, Barr B, Conrad P. Protozoal causes of reproductive failure in domestic ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1994; 10(3): 439-61.
7. Zambrano J, Cotrino V, Jimenez C, Romero M, Guerrero B. Evaluación serológica de *Neospora caninum* en bovinos en Colombia. *Revista Acovez* 2001; 26: 5-10.
8. Oviedo T, Betancur C, Mestra A, González M, Reza L, Calonge K. Estudio serológico sobre neosporosis en bovinos con problemas reproductivos en Montería, Córdoba, Colombia. *Rev.MVZ Córdoba* 2007; 12(1): 929-933.
9. Dubey J, Lindsay D. A review of *Neospora caninum* and *Neosporosis*. *Vet Parasitol* 1996; 67(1): 1-59.
10. Luna L. *Manual of histopathology staining methods of the armed forces institute of pathology* 3th ed. E.U: Mc.Graw Hill; 1968.
11. Morales E, Trigo F, Ibarra F, Puente E, Santacruz M. *Neosporosis* in Mexican dairy herds: lesions and immunohistochemical detection of *Neospora caninum* in fetuses. *J Comp Pathology* 2001; 125(1): 58-63.
12. Lértora W, Burna A, Catuogno M. Diagnóstico histopatológico de aborto bovino por *Neospora caninum*. *Revista veterinaria de la Universidad Nacional del Nordeste - Argentina* 2004; 15(2): 85-88. URL Disponible: [http://vet.unne.edu.ar/revista/15-2/revet15-2-2004-00\\_Lert.pdf](http://vet.unne.edu.ar/revista/15-2/revet15-2-2004-00_Lert.pdf)
13. Collantes-Fernández E, Rodríguez-Bertos A, Arnáiz-Seco I, Moreno B, Aduriz G, Ortega-Mora L. Influence of the stage of pregnancy on *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions in aborted bovine fetuses. *Theriogenology* 2006; 65(3): 629-641.
14. Barr B, Anderson M, Dubey J, Conrad P. *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. *Vet Pathology* 1991; 28(2): 110-116.
15. González L, Buxton D, Atxaerandio R, Aduriz G, Maley S, Marco J, et al. Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain. *Vet Rec* 1999; 144(6): 145-50.
16. De Meerschman F, Speybroeck N, Berkvens D, Rettignera C, Focant C, Leclipteux T, et al. Fetal infection with *Neospora caninum* in dairy and beef cattle in Belgium. *Theriogenology* 2002; 58(5): 933-45.
17. McAllister M, Huffman E, Hietala S, Corand P, Anderson M, Salman M. Evidence suggesting a point source exposure in an outbreak of bovine abortion due to neosporosis. *J Vet Diagn Invest* 1996; 8(3): 355-357.
18. Wouda W, Moen A, Visser I, Van Knapen F. Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver. *J Vet Diagn Invest* 1997; 9(2): 180-185.
19. Baszler T, Gay L, Long M, Mathison B. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. *J Clin Microbiol* 1999; 37(12): 4059-64.
20. Van Maanen C, Wouda W, Schares G, Von Blumroder D, Conraths F, Norton R, et al. An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. *Vet Parasitol* 2004; 126(4): 351-364.