

Aborto bovino por *Neospora caninum* en el Uruguay: primeros diagnósticos

Bañales P¹.; Easton C¹.; Haritani M².; Kashiwazaki Y¹.; Paullier C¹.; y Pizzorno M¹.

RESUMEN

Se presentan diagnósticos de Neosporosis realizados en el Uruguay, por la DILAVE «Miguel C. Rubino» entre abril de 1999 y marzo del 2000. Se estudiaron cinco fetos bovinos abortados (cuatro de raza Holstein y uno de raza Hereford), así como 276 sueros bovinos de rodeos con abortos. Estudios histopatológicos de los cinco fetos bovinos permitieron visualizar en todos ellos necrosis multifocal en el sistema nervioso central (SNC) y en dos de ellos miocarditis con infiltrado no supurativo, lesiones típicas de Neosporosis. Mediante la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) se observaron formas parasitarias a nivel del SNC y miocardio, que resultaron positivas a *Neospora caninum*. Se realizaron estudios serológicos para *Neospora caninum* con las técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI). El 27,7 % de los sueros estudiados fue serológicamente positivo. En el caso de las vacas abortadas de esos rodeos, el 54 % resultó positivo, mientras que de las vacas preñadas solamente lo fue el 6 %. Aborto y sero-positividad están significativamente relacionadas ($p < 0.01$) por el test de Chi-cuadrado. Los sueros de dos de las cinco vacas abortadas cuyos fetos resultaron positivos a la IHQ, fueron serológicamente positivos con títulos en la IFI de 1:12.800 y 1:3.200; los sueros de las restantes tres vacas no fueron remitidos. Estos son los primeros casos de aborto bovino en el Uruguay en los que se ha diagnosticado *Neospora caninum* por técnicas serológicas e inmunohistoquímicas.

Palabras clave: abortos, bovinos, *Neospora*, diagnóstico, Uruguay

SUMMARY

The results of the diagnosis of bovine neosporosis performed between April 1999/March 2000 at the DILAVE «Miguel C. Rubino», Montevideo, Uruguay, are presented in this work. Five bovine foetuses (4 Holstein and 1 Hereford) as well as 276 bovine serum samples from herds with clinical abortion were studied. The histopathological studies of the five foetuses showed multiple foci of necrosis at the central nervous system (CNS) and myocarditis with nonsuppurative infiltration, both of which are typical lesions of neosporosis. By the immunohistochemical staining (IHC) parasitic forms were observed in the CNS and myocardium which were positive to *Neospora caninum*. Serological studies for *Neospora caninum* were performed by the indirect fluorescence antibody test (IFAT). Sera from herds with clinical abortion were examined and 27.7 % of 276 bovine sera were serologically positive. From those herds 54 % of the aborted cows were positive for *Neospora* antibodies while only 6 % of the pregnant cows were positive. The seropositivity to *Neospora caninum* was significantly correlated with abortion by Chi-square test ($p < 0.01$). Only two of the five foetuses were sent together with the dam sera. These two foetuses were positive by the IHC and the sera were also positive with the IFAT titres of 1:12800 and 1:3200. This is the first report of *Neospora caninum* associated bovine abortion in Uruguay by means of serological and immunohistochemical procedures.

Key words: abortion, bovines, *Neospora*, diagnosis, Uruguay

INTRODUCCION

La Neosporosis es una enfermedad del perro y otros animales de reciente reconocimiento a nivel mundial. Fue reportada por primera vez en Noruega(4) y el agente etiológico, *Neospora caninum*, fue descrito en 1988(8, 6). En 1989 se la asocia por primera vez

a abortos en los bovinos(18) en USA y por ejemplo hoy en día se lo responsabiliza del 40 % de los casos de aborto diagnosticados en Nueva Zelanda (16).

Es un protozoario (Apicomplexa., Sarcocystidae) similar a *Toxoplasma gondii*, con quien fuera durante mucho tiempo confundido (6, 13).

El perro es descripto como un huésped definitivo de la *Neospora caninum*(12, 14).

En un trabajo realizado en Gran Bretaña en 1997, utilizando sueros caninos de diversas partes del mundo, se encontró que el 20 % de 414 perros de estancia de Uruguay eran serológicamente positivos a la técnica

¹ DILAVE «Miguel C. Rubino», Casilla de Correos 6577, 11000 Montevideo, Uruguay

² National Institute of Animal Health, Tsukuba, Japón

Aprobado 21/8/00

ca de IFI para *Neospora caninum*(3). En los bovinos normalmente el único signo clínico observado son los abortos a partir del 3er. mes de gestación, generalmente entre el 5° y 6° mes. El porcentaje de aborto en los diferentes rodeos es muy variable. Síntomas clínicos neurológicos sólo han sido reportados en casos individuales de terneros menores de dos meses(9).

OBJETIVO

Comprobar la presencia de *Neospora caninum* como agente causal de abortos en rodeos bovinos del Uruguay.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó a partir de 5 fetos bovinos, todos de distintos establecimientos y de 276 sueros bovinos de 20 establecimientos, todos materiales remitidos al Departamento de Patobiología del Laboratorio «Miguel C. Rubino» entre abril de 1999 y marzo del 2000.

Fetos:

Los 5 fetos bovinos se encontraban entre el 5° y 6° mes de gestación, provenían de diferentes establecimientos, cuatro de rodeos Holstein y el restante de un rodeo Hereford. En ninguno de los casos se trataba del primer aborto constatado. No había sido posible diagnosticar el agente causal de los mismos, o habiéndose diagnosticado algún agente, no había sido posible la solución del problema pese a las medidas profilácticas encaradas.

En dos casos se remitió el feto junto al suero de la vaca abortada, en los otros tres casos solamente fue remitido el feto.

Se realizó la necropsia de los fetos, retirándose en todos los casos muestras para realizar estudios bacteriológicos e histopatológicos. Se

tomaron muestras de SNC, hígado, riñón, corazón, pulmón y contenido abomasal. Los materiales para estudios bacteriológicos fueron remitidos al Departamento de Bacteriología y aquellos para histopatología fueron fijados en formol salino tamponado al 10 %.

Para realizar los estudios histopatológicos de los fetos, se incluyeron muestras representativas de los diferentes órganos en parafina y los cortes se estudiaron mediante una coloración de rutina de Hematoxilina-Eosina (H-E).

Estos materiales fueron además procesados con la técnica de Inmunohistoquímica (IHQ) por el método de Inmunoperoxidasa (Complejo Peroxidasa Avidina- Biotina). Para ello se utilizó el «ABC Vectastain Kit» de los Laboratorios Vector (USA) y doble juego de muestras, una de ellas enfrentada al suero específico hiperinmune anti-*Neospora caninum* producido en cabra por el Laboratorio VMRD (USA) y la otra muestra enfrentada a PBS como control negativo(11), siguiendo el protocolo del National Institute of Animal Health (NIAH) del Japón(11), en la técnica de IHQ se incluyeron estudios de especificidad y antigenicidad cruzada para otros protozoarios para el descarte de reacción cruzada hacia *Toxoplasma gondii*, *Sarcosporidio* y *Coccidia* sp..

Sueros:

Se estudiaron 276 sueros bovinos, todos provenientes de rodeos con problemas de aborto.

Se realizó la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para detección de anticuerpos anti-*Neospora caninum*. Se utilizaron láminas con antígeno producidas por el NIAH, Japón. Se utilizaron conjugados para detectar IgG bovina u ovina según fuera el caso. Para el caso de los bovinos, se tomó como positivo un

título a la prueba de IFI igual o mayor a 1:200 (16, 17).

Los sueros fueron chequeados para Toxoplasmosis mediante la prueba de Latex Aglutinación. Se utilizó un kit comercial, Toxocheck-MT, elaborado por Eiken Chemical Co. Ltda, Tokyo, Japón.

Dos de los fetos llegaron acompañados de los sueros de sus madres; los mismos fueron chequeados para Brucelosis (Rosa de Bengala) y Leptospirosis (MAT), no para IBR y BVD por tratarse de animales repetidamente vacunados contra esas dos enfermedades

En el Departamento de Bacteriología se sembraron materiales provenientes de los fetos a fin de descartar la presencia de *Campylobacter fetus*, *Trichomona fetus*, *Salmonella* sp. y *Brucella abortus*.

RESULTADOS:

a.- Estudios serológicos:

a.1.) Vacas madres de los fetos estudiados:

Tal como se indicó anteriormente, sólo pudieron ser estudiados los sueros de dos vacas Holando abortadas, de dos establecimientos lecheros diferentes, al no haber sido remitido los sueros de las madres de los otros tres fetos. Esas dos vacas Holando fueron positivas a la prueba de IFI para Neosporosis, una de ellas con un título al momento del aborto de 1:12800 y la otra de 1:3200.

Los dos sueros resultaron negativos para las pruebas de Toxoplasmosis, Brucelosis y Leptospirosis.

a.2.) Otros sueros:

Del total de 276 sueros bovinos estudiados, todos provenientes de rodeos con problemas de aborto, el 27.7 % resultó positivo a la prueba de IFI para Neosporosis. El 54 % de las vacas abortadas fueron positivas, mientras que de las vacas no abortadas, solamente el 6 % lo fue.

Hay establecimientos de los cuales solamente fueron remitidos sueros de vacas abortadas. (ver cuadro 1)

b.- Estudios Histopatológicos:

Todos los fetos estudiados presentaron múltiples focos de necrosis en las muestras de sistema nervioso central (SNC), con escaso compromiso meníngeo. En ninguno de los casos se

dos de los fetos se observaron además escasas formas quísticas con pared fina (no más de 2 micras), que no se encontraban asociadas con los focos de necrosis. Uno sólo de los fetos presentó agregados de taquizoitos asociados a las fibras miocárdicas. Ni en hígado ni en riñón se observaron formas parasitarias con esta técnica en éstas muestras. Las pruebas de

ninguno de estos microorganismos en los medios de cultivo específicos para cada uno de ellos.

DISCUSION y CONCLUSIONES

Si bien la Neosporosis no había sido confirmada hasta el presente año por IHQ en el Uruguay, existían resulta-

Cuadro 1. Resultados serológicos (IFI)

Nº DE ESTABLECIMIENTOS	TIPO GANADO	VACAS ABORTADAS		VACAS PREÑADAS	
		IFI +	IFI -	IFI +	IFI -
1	Leche	5	3	0	9
2	Leche	8	9	3	9
3	Leche	5	7	1	62
4	Leche	4	5	0	0
5	Leche	2	4	0	0
6	Carne	5	0	0	7
7	Carne	3	3	0	7
8	Carne	3	4	0	0
9	Carne	4	3	0	0
10	Carne	2	8	0	0
11	Leche	3	0	2	14
12	Leche	3	5	2	6
13	Leche	6	0	0	0
14	Carne	4	0	0	7
15	Leche	3	1	0	0
16	Carne	2	2	0	0
17	Carne	7	0	0	0
18	Leche	3	2	0	0
19	S/datos	0	4	0	0
20	Carne	4	5	0	6
TOTALES		76	65	8	127
%		54 %	46 %	6 %	94 %

observaron formas parasitarias con H-E. En dos de los cinco casos se visualizó una moderada miocarditis mononuclear difusa.

Con la técnica de IHQ descrita anteriormente, se observaron taquizoitos libres en las muestras de sistema nervioso de los cinco fetos estudiados. En

antigenicidad cruzada para *Toxoplasma gondii*, Sarcosporidio y *Coccidia* sp. resultaron negativas.

Los materiales fueron procesados por el Departamento de Bacteriología para investigar *Campylobacter fetus*, *Trichomona fetus*, *Salmonella* sp. y *Brucella abortus*, no desarrollando

dos serológicos que indicaban su posible presencia, tanto en caninos como en bovinos. (3)

En un trabajo realizado en Gran Bretaña en 1997 se encontró que el 20 % de 414 perros de estancia del Uruguay eran positivos a la técnica de IFI para *Neospora caninum*(3). Siendo el pe-

rro un huésped definitivo, estos resultados permitían suponer la presencia de la enfermedad, tanto en caninos como en otras especies. A nivel regional también hay antecedentes, habiendo sido diagnosticada en la Argentina(5.01) y Brasil(10).

En el caso de los fetos bovinos objeto del presente estudio, todos ellos presentaron lesiones histopatológicas típicas de Neosporosis, habiéndose claramente identificado las formas parasitarias por IHQ. Este hecho, sumado al resultado serológico con altos títulos finales para *Neospora caninum* en dos de las vacas que abortaron esos fetos y sin evidencias serológicas o por cultivo de la presencia de otros agentes causales, nos permiten concluir que en estos casos el aborto se debió a la Neosporosis. Referente al diagnóstico serológico, debe mencionarse que no siempre las vacas positivas abortan su feto o, aún siendo serológicamente positivas a Neosporosis, pueden abortar por otro agente causal, siendo muy difícil en el bovino establecer la causalidad de un aborto por medio del estudio serológico(16). Hay vacas que seroconvierten a una infección por *Neospora* que es insuficiente para provocar el aborto y se sabe que infecciones en gestación tardía pueden no ser fetopáticas(15). La IFI, como toda técnica serológica, es una muy valiosa técnica para estudios epidemiológicos en un rodeo, para determinar si el mismo ha estado expuesto al agente causal, siendo también una herramienta de ayuda al diagnóstico. El hallazgo de altos títulos serológicos a *Neospora caninum* resultó altamente significativo en las vacas cuyos fetos resultaron positivos a la IHQ para este agente, así como el alto porcentaje de vacas serológicamente positivas entre el grupo de las abortadas (54 %) y bajo porcentaje (6 %) entre las no abortadas de esos mismos rodeos. Estos son

los primeros casos en el Uruguay en que ha sido posible confirmar la presencia de *Neospora caninum* por medio de una técnica de referencia a nivel internacional para el diagnóstico de esta enfermedad, como lo es la IHQ(8,11,21)

Por los estudios serológicos e inmunohistoquímicos detallados en el presente trabajo, queda definitivamente confirmada la presencia de la Neosporosis en el Uruguay. Consideramos que esta enfermedad, de ahora en más, debe ser siempre incluida en el diagnóstico diferencial en los casos de aborto bovino.

Por las dificultades anteriormente enunciadas para el diagnóstico, es que deberían utilizarse conjuntamente la técnicas serológicas y la histopatología. Deben realizarse estudios serológicos de la vacas abortadas y de otras vacas del rodeo, así como la histopatología del feto y confirmación de los hallazgos por IHQ.

Agradecimientos

A JICA (Japanese International Cooperation Agency) por aportar los diversos materiales y reactivos que hicieron posible el diagnóstico de laboratorio en la DILAVE.

Al Dr. I. Yamane, del NIAH de Japón, por facilitarnos las láminas con antígeno para la realización de las pruebas de IFI.

A los ayudantes de laboratorio, Sras. Daysi Piñeiro, Irma Muniz y Sr. Mario Betancur por colaborar en la realización de las pruebas de laboratorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Anderson M.L., Blanchard P.C., Barr B.C., Dubey J.P., Hoffman R.L. and Conrad P.A. (1991). *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *JAVMA*

198, vol. 2: 241-244

2. Barber J.S., Payne-Johnson C.E. and Trees A.J. (1996). Distribution of *Neospora caninum* within the central nervous system and other tissues of six dogs with clinical Neosporosis. *Journal of Small Animal Practice*, 37: 568-574

3. Barber J.S., Glasser R.D., Ellis J., Reichel M.P., McMillan D. and Trees A.J. (1997). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. *J. Parasitol.*, 83 (6): 1056-1058

4. Bjerckäs I., Mohn S.F. and Presthus J. (1984). Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z. Parasitenkd.*, 70:271-274

5. Campero C.M. et al. (1997), *Therios*, 26(137).

6. Dubey J.P., Carpenter J.L., Speer C.A., Topper M.J. and Uggla A. (1988). Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *JAVMA*, Vol. 192, (9), 1269-1285.

7. Dubey J.P., Koestner A., Piper R.C. (1990). Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs. *JAVMA*, 197 (7):857-860

8. Dubey J.P. and Lindsay D.S. (1996). Review: A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology* (67) 1-59

9. Dubey J.P. (1999). Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Veterinary Parasitology* 84:349-367

10. Gondim L.F.P., Sartor I.F., Hasegawa M., Yamane I. (1999). Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. *Veterinary Parasitology* 86:71-75

11. Haritani, M., Hirogari, Y., Kubo, M., et al.(2000) Effect of antigen retrieval pretreatment for immunohistochemical detection of Akabane virus antigen. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12:361 - 363

12. Lindsay D.S., Dubey J.P. and Duncan R.B. (1999) Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology* 82 (1999): 327-333

13. Marsh A.E., Barr B.C., Packham A.E. and Conrad P.A. (1998). Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). *J. Parasitology*, 84 (5): 983-991

14. McAllister M.M., Dubey J.P.,

Lindsay D.S., Jolley W.R., Wills R.A. and McGuire A.M. (1998). Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal of Parasitology* 28: 1473-1478

15. Otter A., Jeffrey M., Scholes S.F.E., Helmick B, Wilesmith J.W. and Trees A.,J. (1997). Comparison of histology with maternal and fetal serology for the diagnosis of abortion due to bovine neosporosis. *Veterinary Record* 141: 487-489

16. Reichel M.P. and Drake J.M. (1996). The diagnosis of *Neospora* abortions in cattle. *New Zeland Veterinary Journal* 44: 151-154

17. Suteeraparp P., Pholpark S., Pholpark M., Charoenchai A., Chompoochan T., Yamane I. and Kashiwazaki Y. (1999). Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* and associated abortions to dairy cattle from central Thailand. *Veterinary Parasitolog* 86 (1): 49-57

18. Thilsted J.P. and Dubey J.P. (1989). Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle *J.Vet. Diagn.Invest.* 1: 205-209

19. Umemura T., Shiraki K., Morita T., Shimada A., Haritani M., Kobayashi M. and Yamagata S. (1992). Neosporosis in a dog: the first case report in Japan. *J.Med.Vet.Sci.* 54 (1): 157-159

20. Venturini MC, Venturini L, Bacigalupe D, Machuca M, Echaide I, Basso w, Unzaga JM, Di Lorenzo C, Guglielmone A, Jenkins MC and Dubey JP. (1999). *Neospora caninum* infections in bovine foetuses and dairy cows with abortions in Argentina. *International Journal of Parasitology* 29: 1705-1708

21. Wouda W., Moen A.R., Visser I.J.R., and van Knapen F (1997). 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.* 9:180-185