

# Valores hematológicos en vacas de raza Holstein-Friesian seropositivas a *Neospora caninum* de la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo, México\*

## Hematological values in Holstein-Friesian *Neospora caninum* seropositive cows from the dairy cattle region of Tizayuca in the State of Hidalgo in Mexico

Pablo Calzada Calzada\*\*  
Elizabeth Morales Salinas\*\*\*  
Gerardo F. Quiroz-Rocha\*\*\*  
Frida Salmerón Sosa†  
Carlos García Ortiz\*\*  
Javier Hernández Balderas‡

### Abstract

Since bovine neosporosis has only recently been recognized in Mexico, not sufficient clinical or pathological analyses have been carried out upon this parasite. The aim of this study was to find out if there were variations in hematological values of cows found to be positive to anti-*Neospora caninum* antibodies which could carry latent tachyzoites in tissues, as compared with cows found to be negative to anti-*Neospora caninum* antibodies. Cows from the Centro Agropecuario Industrial de Tizayuca in Mexico were selected and divided into two groups. The first group (n = 30) included cows positive to anti-*Neospora caninum* antibodies, but that had not presented abortions. The second group (n = 10) included cows which were negative to anti-*Neospora caninum* antibodies. For the detection of antibodies, an indirect ELISA technique was used. Hemograms were carried out on blood samples taken from each cow collected in vacuum tubes containing EDTA. Hematological values obtained were compared between both groups, and with their reference values. Mean values for hematocrit were significantly different between groups ( $P < 0.05$ ). The mean value for hematocrit was lower in animals positive to anti-*Neospora caninum* antibodies (0.31 L/L) than in animals negative to anti-*Neospora caninum* antibodies (0.36 L/L) but corresponded to the reference value. Other hematological values did not show statistical difference ( $P > 0.05$ ), and corresponded to the reference value. It was concluded that cows positive to anti-*Neospora caninum* antibodies that had not aborted did not present changes in the hemogram.

**Key words:** HEMATOLOGICAL VALUES, *NEOSPORA CANINUM*, NEOSPOROSIS, DAIRY CATTLE, BOVINE.

Recibido el 13 de agosto de 2001 y aceptado el 16 de noviembre de 2001.

\* Este trabajo fue presentado como requisito de informe de servicio social del primer autor para obtener el grado de licenciatura en la Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

\*\* Centro Agropecuario Industrial de Tizayuca, S.A. (CAITSA), Parque Industrial, Tizayuca, Hidalgo, México.

\*\*\* Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

† Departamento de Genética y Bioestadística, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

‡ Departamento de Ciencias Pecuarias, Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Carretera Cuautitlán-Teoloyucan km 2.5, Apartado Postal 25, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México.

Responsable de la correspondencia y solicitudes de los sobretiros: Elizabeth Morales Salinas, Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F. Teléfono y Fax (55) 56 22 58 88 y 56 16 67 95. E-mail: morales@servidor.unam.mx

Debido a que la neosporosis bovina constituye una enfermedad de reciente reconocimiento en México, no se han realizado suficientes análisis clínico-patológicos de esta entidad. El objetivo del trabajo fue conocer si existen variaciones de los valores hematológicos de vacas positivas a anticuerpos anti-*Neospora caninum*, quienes pudieran tener taquizoitos latentes en los tejidos con respecto a vacas negativas a anticuerpos anti-*Neospora caninum*. Se seleccionaron vacas pertenecientes a establos del Centro Agropecuario Industrial de Tizayuca, Hidalgo, México, que se dividieron en dos grupos. El primer grupo (n = 30) eran vacas positivas a anticuerpos anti-*Neospora caninum* (*N. caninum*) sin presentaciones de abortos. El segundo grupo (n = 10) fueron vacas negativas a anticuerpos anti-*N. caninum*. Para la determinación de anticuerpos anti-*N. caninum*, se utilizó la técnica indirecta de ELISA. A cada vaca se le tomó una muestra de sangre en tubos con EDTA con la que se realizó el hemograma. Obtenidos los resultados, se compararon ambos grupos entre sí y con los valores de referencia. Se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los valores de hematócrito entre ambos grupos, siendo menor el valor medio de hematócrito (0.31 L/L) en animales positivos a anticuerpos anti-*N. caninum* con respecto al valor de los animales negativos a anticuerpos anti-*N. caninum* (0.36 L/L); sin embargo, coincidieron con los valores de referencia para este analito. El resto de valores hematológicos no mostraron diferencia estadística ( $P > 0.05$ ) y también coincidieron con los valores de referencia. Se concluye que vacas con títulos altos de anticuerpos anti-*N. caninum* que no han abortado no manifiestan cambios en el hemograma.

**Palabras clave:** VALORES HEMATOLÓGICOS, *NEOSPORA CANINUM*, NEOSPOROSIS, VACAS, BOVINOS.

## Introduction

**N**eosporosis produced by *Neospora caninum* (*N. caninum*) is a disease which was first identified in dogs, these being the definite hosts of this agent and those who discharge oocysts of the parasite through feces.

This disease was diagnosed as toxoplasmosis until 1988 due to structural and biological similarities between *N. caninum* and *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*).<sup>1-4</sup> It was later identified in ruminants, horses and deer, which act as intermediary hosts getting infected while drinking or eating water and/or feed contaminated with dogs' feces.<sup>2-4</sup> Tachyzoites in dogs are principally found in muscle tissue, liver and the central nervous system (CNS), and cysts with bradyzoites only in the CNS.

The only clinical sign found in bovine cattle is abortion principally during the 4<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> month of gestation. The only proven transmission in this species is vertical. Abortion can be presented in various occasions due to congenital infection of the fetus.<sup>2-4</sup> Abortion mechanisms have not been established with precision yet, nevertheless, tachyzoites present latently in the tissues of cows are supposedly capable multiplying actively in the placenta and the tissues of the fetus causing abortion.

This parasite was recently identified in the brain and spinal cord, principally in cows positive to anti *N. caninum* antibodies with a chronic latent infection,

## Introducción

**L**a neosporosis producida por *Neospora caninum* (*N. caninum*) es una enfermedad que se identificó por primera vez en perros siendo los huéspedes definitivos de este agente y quienes excretan ooquistes del parásito a través de las heces.

Hasta 1988 la enfermedad fue diagnosticada como toxoplasmosis debido a las similitudes estructurales y biológicas entre *N. caninum* y *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*).<sup>1-4</sup> Posteriormente se identificó en rumiantes, caballos y venados, quienes actúan como huéspedes intermediarios infectándose al consumir agua o alimento contaminado con heces de perros.<sup>2-4</sup> En estas especies se encuentran taquizoitos principalmente en el tejido muscular, hígado y sistema nervioso central (SNC) y quistes con bradizoitos sólo en el SNC.

El único signo clínico en el ganado bovino es el aborto, el cual se presenta principalmente entre el cuarto y sexto mes de gestación. La única vía de transmisión comprobada en esta especie es la vertical. El aborto se puede presentar en repetidas ocasiones por infección congénita de los fetos.<sup>2-4</sup> Hasta el momento no se conoce con precisión el mecanismo del aborto; sin embargo, se ha supuesto que los taquizoitos presentes en forma latente en los tejidos de las vacas, son capaces de multiplicarse activamente en la placenta y los tejidos de los fetos provocando el aborto.

Recientemente, se logró identificar al parásito principalmente en el cerebro y médula espinal de vacas posi-

through PCR.<sup>5</sup> Bovine neosporosis is a recently identified disease in Mexico,<sup>6,7</sup> and has been recognized as one of the principal causes of abortion worldwide. It was isolated for the first time in fetus in 1993.<sup>8,9</sup>

The economic loss in the State of California in the US, associated with bovine abortion due to this disease, is estimated annually in 35 million dollars.<sup>8-10</sup> A serological study undertaken in Mexico revealed a seroprevalence of 72% in cows from a herd which had presented annual abortion rates from 13% and 30% in the last three years (epizootic abortion), and of 36% in cows from herds with an abortion rate of up to 12% annually during the last three years (enzootic abortion). With the information mentioned above, this disease has been considered as a widespread disease in mexican milking herds.<sup>7</sup>

As neosporosis has been recently recognized in Mexico, clinical and pathological aspects such as hematological chemistry values and blood are still unknown. The objective of this study was to find out if there are variations in the hematological values in cows positive to anti-*Neospora caninum* antibodies, which could have latent tachyzoites in the tissues when compared to cows negative to anti-*Neospora caninum* antibodies.

## Material and methods

Forty healthy Holstein-Friesian cows from the Centro Agropecuario Industrial de Tizayuca, S.A. (CAITSA) in the State of Hidalgo in Mexico, which did not have a history of any disease, were selected and divided in two groups. The first group was formed with 30 cows positive to anti-*Neospora caninum* with no abortions when the samples were taken, and from herds where neosporosis had been identified in previous studies through serology in their mothers, and histopathology and immuno-histochemistry in the fetus.

The indirect ELISA technique, using anti-*Neospora caninum*\* reactivities and the Herdchek method, was used in order to detect antibodies and for result interpretation, where the cutting point (CP) was of 0.50. The second group included 10 cows negative to anti-*Neospora caninum* antibodies from the same herds. Blood samples were taken from the coccigeal vein in glass vacuumed tubes with EDTA (Vacutainer®\*\*) from all 40 cows. A clinical exploration including: attitude, aspect, body condition, behavior and physiological constants, was recorded when blood sampling took place. Samples were analyzed in the Laboratory of Clinical Pathology at the College of Veterinary Medicine at the National Autonomous University of Mexico.

The hemogram, done by manual methods,<sup>11</sup> deter-

tivas a anticuerpos anti-*Neospora caninum* con infección crónica latente a través de PCR.<sup>5</sup> La neosporosis bovina es una enfermedad identificada recientemente en México<sup>6,7</sup> y ha sido reconocida como una de las principales causas de aborto en el ámbito mundial, aislándose el agente por primera vez en fetos en 1993.<sup>8,9</sup>

En California, Estados Unidos de América, las pérdidas económicas asociadas con el aborto bovino, por esta enfermedad, se estiman en 35 millones de dólares anuales.<sup>8-10</sup> En un estudio serológico realizado en México, se encontró una seroprevalencia de 72% en vacas pertenecientes a hatos con tasas anuales de aborto entre 13% y 30% en los últimos tres años (aborto epizootico), y de 36% en vacas pertenecientes a hatos con tasas de aborto hasta de 12% anual en los últimos tres años (aborto enzoótico), por lo que se consideró que la enfermedad se encuentra difundida en los principales hatos lecheros mexicanos.<sup>7</sup>

Debido a que la neosporosis bovina se reconoció recientemente en México, no se conocen varios aspectos clínico-patológicos de la enfermedad tales como valores hematológicos y de química sanguínea. El objetivo del trabajo fue conocer si existen variaciones de los valores hematológicos de vacas positivas a anticuerpos anti-*Neospora caninum*, quienes pudieran tener taquizoitos latentes en los tejidos con respecto a vacas negativas a anticuerpos anti-*Neospora caninum*.

## Material y métodos

Se seleccionaron 40 vacas de raza Holstein-Friesian, clínicamente sanas, pertenecientes a establos del Centro Agropecuario Industrial de Tizayuca, S.A. (CAITSA), que no tenían antecedentes de enfermedades; se dividieron en dos grupos. El primer grupo se formó con 30 vacas positivas a anticuerpos anti-*N. caninum* sin presentaciones de abortos al momento de la toma de muestras y provenientes de establos con neosporosis identificada en estudios previos a través de serología en las madres e histopatología e inmunohistoquímica en los fetos.

Para la detección de anticuerpos e interpretación de los resultados, se realizó la técnica indirecta de ELISA, utilizando los reactivos y el método Herdchek anti-*Neospora caninum*,\* en donde el punto de corte (PC) fue de 0.50. El segundo grupo lo conformaron diez vacas negativas a anticuerpos anti-*N. caninum* de los mismos establos. A las 40 vacas se les tomaron muestras sanguíneas de la vena coccígea en tubos de vidrio con vacío y EDTA (Vacutainer®\*\*). Al momento de tomar las muestras sanguíneas, se les practicó

\* Laboratorios IDEXX, Westbrook Maine 04092, USA.

\*\* Becton Dickinson & Co. Franklin Lakes, NJ, USA.

**Cuadro 1**

VALORES HEMATOLÓGICOS MEDIOS DE VACAS ADULTAS POSITIVAS Y NEGATIVAS A ANTICUERPOS ANTI-*Neospora caninum*  
 MEAN HEMATOLOGICAL VALUES OF ADULT COWS POSITIVE AND NEGATIVE TO ANTI-*Neospora caninum* ANTIBODIES

<i>Análito</i> <i>Analyte</i>	<i>Seropositivas (n = 30)</i> <i>Seropositive (n = 30)</i>	<i>Seronegativas (n = 10)</i> <i>Seronegative (n=10)</i>	<i>Valores de Referencia*</i> <i>Reference values*</i>
Hematócrito (L/L)	0.31 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.24 - 0.40
Eritrocitos × 10 <sup>12</sup> /l	6.9 ± 1.26	7.6 ± 0.46	5.0 - 10.0
Hemoglobina, g/L	109.3 ± 21.4	113 ± 0.37	80 - 150
Proteínas plasmáticas, g/l	75.1 ± 14.0	78 ± 2.65	60 - 80
Fibrinógeno, g/l	3.6 ± 1.9	3.3 ± 1.5	2 - 8
VGM, ft	47.1 ± 7.8	46.2 ± 2.82	40 - 60
HGM, pg	16.2 ± 3.8	15.7 ± 0.95	11 - 17
CMHG, g/l	355.9 ± 18.61	349 ± 0.74	300 - 360
Leucocitos × 10 <sup>9</sup> /l	11.18 ± 3.17	8.0 ± 1.73	4.0 - 12.0
Linfocitos × 10 <sup>9</sup> /l	6.74 ± 2.47	5.97 ± 1.51	2.5 - 7.5
N. Segmentados × 10 <sup>9</sup> /l	3.70 ± 1.33	2.2 ± 1.23	0.6 - 4.0
N. Banda × 10 <sup>9</sup> /l	0**	0** 0.0 -	0.1
Eosinófilos × 10 <sup>9</sup> /l	0.35 ± 0.28	0.4 ± 0.31	0 - 2.4
Basófilos × 10 <sup>9</sup> /l	0**	0** 0 -	0.2
Monocitos × 10 <sup>9</sup> /l	0.38 ± 0.38	0.2 ± 0.14	0 - 0.8

\* Values used at the Department of Clinical Pathology, College of Veterinary Medicine, National Autonomous University of Mexico

\*\* No cells were found in the 40 blood smears studied.

N = Neutrophils

<sup>a,b</sup> Different superscripts mean different statistical values (P < 0.5)

mined hematocrit, hemoglobin, erythrocyte and leucocyte total count, plasmatic proteins, fibrinogen and leucocyte differential counting. Once results from the 40 hemograms were obtained, both groups were compared through the “t” Hotelling test using the SAS software.\* These results were also compared to the reference values used in the laboratory where the samples were analyzed.

## Results

Results are presented in Table 1, and were obtained with the “t” Hotelling test. Significant differences (P < 0.05) were found between the hematocrit values among both groups with a mean value of a lower hematocrit (0.31 L/L) in animals positive to anti *N. caninum* antibodies, when compared to the mean value of the hematocrit (0.36 L/L) in animals negative to anti *N. caninum* antibodies. The rest of the values did not show significant differences (P > 0.05). All observed values were within the range of reference values established for adult cows.

exploración clínica, tomando en cuenta actitud, aspecto, condición corporal, comportamiento y constantes fisiológicas. Las muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Patología Clínica del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El hemograma se realizó mediante métodos manuales<sup>11</sup> y se hicieron las determinaciones: Hematocrito, hemoglobina, conteo total de eritrocitos y leucocitos, proteínas plasmáticas, fibrinógeno y conteo diferencial leucocitario. Una vez obtenidos los resultados de los 40 hemogramas, se compararon ambos grupos de animales mediante la prueba “t” de Hotelling, utilizando para ello el software SAS.\* Además los resultados se compararon con los valores de referencia empleados en el laboratorio donde se analizaron las muestras.

\* Paquete estadístico SAS, versión 1992.



## Discussion

In spite of finding statistic differences between the mean values among groups, these are irrelevant as they were found within the reference values for adult cows. The fact that there were no cases of leukocytosis nor neutrofilia in animals positive to anti-*Neospora caninum* antibodies, reinforces the hypotheses that tachyzoites, which are the fast multiplication phases of the parasite, and which are present in cows infected chronically, are located in their tissues in a latent form without causing any inflammatory response reflected in the hemogram.

At present, the cause and the factors of which liberate liberation of the tachyzoites from the tissues into the bloodstream, and their movilization in pregnant cows as well as their active multiplication in the placenta and in the fetus, causing necrosis and inflammation of the CNS, liver and kidney principally,<sup>2,4</sup> are still unknown.

There is a hypothesis that cows infected with *N. caninum* are probably also invaded by other virus such as bovine viral diarrhea or a micotoxiosis which could cause immunological depression, and therefore, contribute to an active multiplication of the tachyzoites in the placenta and fetus provoking abortion.<sup>12,13</sup> It is concluded that in non-pregnant animals positive to anti-*Neospora caninum* antibodies, which are infected or have had at least some contact with the agent, there are apparently no changes in the hematological values, principally in leukocytes. Nevertheless, there is still the possibility that the hematological values of infected cows are indeed altered in pregnant cows at the multiplication stage of the tachyzoites in the placenta and fetus; this hypothesis could be studied in further research.

## Resultados

Los resultados se presentan en el Cuadro 1. Con la prueba "t" de Hotelling, los resultados obtenidos en el análisis fueron los siguientes: Se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los valores de hematócrito entre ambos grupos, siendo un valor medio de hematócrito menor (0.31 L/L) en animales positivos a anticuerpos anti-*N. caninum* con respecto al valor medio de hematócrito (0.36 L/L) en animales negativos a anticuerpos anti-*N. caninum*. El resto de los valores no tuvieron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ). Todos los valores observados se encontraron dentro de los valores de referencia indicados para vacas adultas.

## Discusión

Aunque existieron diferencias estadísticas entre los valores medios de hematócrito entre ambos grupos, se considera irrelevante ya que estos valores se encontraron dentro de los rangos de referencia para vacas adultas. El hecho de no presentarse casos de leucocitosis o neutrofilia en los animales positivos a anticuerpos anti-*Neospora caninum*, refuerza la hipótesis de que en las vacas posiblemente infectadas en forma crónica, los taquizoitos que son las fases de multiplicación rápida del parásito se encuentran en sus tejidos en forma latente sin provocar alguna respuesta inflamatoria que pudiera verse reflejada en el hemograma.

En la actualidad no se conocen la causa o los factores por los cuales en la vaca gestante los taquizoitos se liberan de sus tejidos hacia la circulación sanguínea, se dirigen y se multipliquen en forma activa en la placenta y en los fetos provocándoles necrosis e inflamación en el SNC, músculos, hígado y riñón, principalmente.<sup>2,4</sup>

Al respecto se ha propuesto que probablemente las vacas infectadas con *N. caninum*, además estén infectadas por otros virus como el de diarrea viral bovina o tuvieran alguna micotoxiosis que pudieran provocar inmunodepresión, y de esta manera contribuir a la multiplicación activa de los taquizoitos en la placenta y los fetos provocándose el aborto.<sup>12,13</sup> Se concluye que, aparentemente, en animales no gestantes y positivos a anticuerpos anti-*N. caninum* que están infectados o por lo menos han tenido algún contacto con el agente, no hay cambios en los valores hematológicos principalmente en los leucocitos. Sin embargo, cabe la posibilidad de que los valores hematológicos de vacas infectadas sí se vean alterados en las vacas gestantes sobre todo al momento de la multiplicación de los taquizoitos en la placenta y los fetos, hipótesis que podría estudiarse en trabajos posteriores.

## References

1. Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Uggla A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1988;192:1269-85.
2. Dubey JP, Lindsay DS. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol* 1996;67:1-59.
3. Dubey JP. Neosporosis - the first decade of research. *Int J Parasitol* 1999;29:1485-1488.
4. Dubey JP. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Vet Parasitol* 1999;84:349-367.
5. Ho MSY, Barr BC, Rowe JD, Anderson ML, Sverlow KW, Packham A *et al*. Detection of *Neospora* sp from infected bovine tissues by PCR and probe hybridization. *J Parasitol* 1997;83:508-514.
6. Morales SE, Ramírez LJ, Trigo TF, Ibarra VF, Puente CE, Santacruz M. Descripción de un caso de aborto bovino asociado a infección por *Neospora* sp en México. *Vet Méx* 1997;28:353-357.
7. Morales SE, Trigo TF, Ibarra VF, Puente CE, Santacruz M. Seroprevalence study of bovine neosporosis in Mexico. *J Vet Diagn Invest* 2001;13:413-415.
8. Anderson ML, Blanchard PC, Barr BC, Dubey JP, Hoffman RL, Conrad PA. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1991;198:241-244.
9. Wouda W. Diagnosis and epidemiology of bovine neosporosis: a review. *Vet Q* 1999;22:71-74.
10. Barr BC, Dubey JP, Lindsay DS, Reynolds JP, Wells SJ. Neosporosis: its prevalence and economic impact. *Suppl Comp Cont Educ Pract Vet* 1998;20:1-16.
11. Voigt GL. Hematology techniques and concepts for veterinary technicians. Ames (Io): Iowa State University Press, 2000.
12. Parish SM, Magg-Miller L, Besser TE, Weidner JP, McElwain T, Knowles DP, Leathers CW. Myelitis associated with protozoal infection in new born calves. *J Am Vet Med Assoc* 1987;191:1599-1600.
13. Corrier DE. Mycotoxicosis: mechanisms of immunosuppression. *Vet Immunol Immunopathol* 1991;30:73-87.