

Toxoplasmosis Sistémica en un Canguro Rojo (*Macropus rufus*) Cautivo

Systemic Toxoplasmosis in a Captive Red Kangaroo (*Macropus rufus*)

*Ochoa-Amaya, J. E.; **Ciuderis-Aponte, K. A.; ***A. Lim; ***S. Bolin & ***Langohr, I.

OCHOA-AMAYA, J. E.; CIUDERIS-APONTE, K. A.; LIM, A.; BOLIN, S. & LANGOHR, I. Toxoplasmosis sistémica en un canguro rojo (*Macropus rufus*) cautivo. *Int. J. Morphol.*, 30(1):70-76, 2012.

RESUMEN: Los objetivos del estudio fueron presentar y documentar los hallazgos histopatológicos de toxoplasmosis sistémica en un canguro rojo (*Macropus rufus*) mantenido en cautiverio donde se describen los hallazgos macro y microscópicos encontrados y los análisis adicionales realizados. En el laboratorio de histopatología animal (Universidad de los Llanos) se recibieron muestras de tejidos fijados en formol tamponado, al 10% que procedían de un ejemplar macho de *Macropus rufus*, de ocho años de edad y 50 kg de peso corporal. Las muestras se procesaron mediante métodos rutinarios para microscopía óptica. Los cortes histológicos de 3-4 mm de grosor se colorearon con Hematoxilina-Eosina (H&E) y se realizó en algunos cortes la tinción de Ácido Periódico Schiff (PAS), PCR e IHQ. Al análisis histopatológico se encontró una toxoplasmosis sistémica asociada a quistes de protozoarios con inmunoreactividad positiva para *T. gondii*. La detección de *T. gondii* en tejidos en formalina fue hecha usando dos ensayos de PCR que señalaban segmentos de ADN de diferentes secuencias repetitivas encontradas en *T. gondii* y la IHQ confirmó lo hallado por PCR. Histopatológicamente se diagnosticó infección crónica por protozoarios eucoccideos de la familia Sarcocystidae. El diagnóstico etiológico fue de toxoplasmosis.

PALABRAS CLAVE: Canguro; Toxoplasmosis; Taquizoitos; Bradizoitos.

INTRODUCCIÓN

Las especies de protozoos pertenecientes a la familia Sarcocystidae del orden Eucoccida y filo Apicomplexa se caracterizan por tener un ciclo heteroxeno facultativo que además del parasitismo enteroepitelial presentan formas multiplicativas o zoítos en células parenterales de diversos tejidos, las cuales son de multiplicación “lenta o rápida” (Gállego, 2007). Los géneros más importantes desde el punto de vista sanitario en esta familia incluyen *Toxoplasma*, *Neospora* y *Sarcocystis* (Mehlhorn, 2008).

La toxoplasmosis es el resultado de la infección por el protozoario intracelular obligado *Toxoplasma gondii* (Miller *et al.*, 1992; OIE, 2005). Este es un parásito ubicuo que posee además un amplio rango de hospedadores intermediarios (Hi) como el hombre y otros mamíferos, siendo reconocidos los felinos como los únicos hospedadores definitivos (Jubb, 2007). En animales infectados generalmente la enfermedad clínica ocurre en individuos jóvenes o inmunodeprimidos. Sin embargo, los marsupiales australianos, particularmente los macrópodos, han demostrado una mayor susceptibilidad a TX

con altas morbimortalidades en adultos (Miller *et al.*; Bermúdez *et al.*, 2009; Moré *et al.*, 2010). El *T. gondii* tiene tres estadios infecciosos: los taquizoítos y bradizoítos que se encuentran en tejido nervioso, muscular (OIE; Jubb), bazo, hígado, ojo (Lopez, 2001) diafragma, estomago (Bermúdez, 2009) e intestino delgado (Bermúdez *et al.*; Moré *et al.*) tanto de hospedadores definitivos como intermediarios (OIE; Jubb) y los ooquistes que solo están presentes en las heces de hospedadores definitivos (OIE; Jubb). La transmisión es principalmente orofecal por el consumo de alimento o agua contaminada con ooquistes (Jubb).

El diagnóstico de TX está basado en la demostración microscópica de formas infecciosas en los tejidos (Canfield *et al.*, 1990), ya que las lesiones macroscópicas a la necropsia, incluyendo edema, congestión (Bermúdez *et al.*) y consolidación pulmonar comúnmente no son específicas de la enfermedad (Canfield *et al.*; Jensen *et al.*, 1985). Otras lesiones macroscópicas (observadas con menos frecuencia) incluyen hemorragias miocárdicas, malacia cerebral difusa

* Universidad de los Llanos, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Villavicencio, Meta Colombia.

** University of Wisconsin-Madison, Department of Pathobiological Sciences, Animal Health and Biomedical Sciences. Wisconsin (EUA).

*** Michigan State University, Diagnostic Center for Population and Animal Health, Michigan (EUA).

o focal, ulceración gastrointestinal (Bermúdez *et al.*; Moré *et al.*), esplenomegalia y linfadenomegalia (Miller *et al.*; Jensen *et al.*; Patton *et al.*, 1986). En macrópodos la muerte súbita sobreviene sin signos premonitorios (Miller *et al.*; Moré *et al.*) y las lesiones histológicas frecuentemente encontradas son necrosis como lesión predominante especialmente en el sistema nervioso central (SNC) (Moré *et al.*), pulmones, nódulos linfáticos, hígado o músculo y se presenta una respuesta inflamatoria variable (Moré *et al.*; Canfield *et al.*; Jensen *et al.*; Patton *et al.*; Garell, 1999). Los parásitos aparecen microscópicamente como pequeños quistes basofílicos (3 a 6µm) que pueden ser encontrados libres en los tejidos afectados o dentro del citoplasma de muchas células epiteliales y macrófagos (López, 2001). Sin embargo, ninguno de estos cambios es específico de toxoplasmosis y otras pruebas diagnosticas específicas (Aker, 1992) como inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales o la reacción en cadena de la polimerasa, son necesarias para confirmar el diagnóstico de toxoplasmosis (Carlyle *et al.*, 1997; Gutiérrez, 2000; Haziroglu *et al.*, 2003).

En este reporte de caso se presenta una toxoplasmosis sistémica en un canguro rojo (*Macropus rufus*) mantenido en cautiverio donde se describen los hallazgos macro y microscópicos encontrados y los análisis adicionales realizados.

MATERIAL Y MÉTODO

Histotecnica. Las muestras de tejidos fijadas en formalina tamponada al 10% fueron procesadas mediante métodos rutinarios para microscopía óptica y los cortes histológicos de 3-4mm de grosor fueron teñidos con la coloración de Hematoxilina-Eosina (H&E). En algunos cortes se realizó la tinción especial de Ácido Periódico Schiff (PAS).

Análisis inmunohistoquímico. Con el fin de confirmar el diagnóstico presuntivo de toxoplasmosis sistémica, fueron realizadas pruebas de inmunohistoquímica. La prueba fue llevada a cabo usando un antisuero policlonal anti-*Toxoplasma gondii* de cabra (210-70-TOXO, VMRD, Pullman, WA) a una dilución de 1:50.000. Adicionalmente se utilizó antisuero policlonal anti-*Neospora caninum* de cabra (210-70-NC, VMRD, Pullman, WA) en una dilución de 1:1000 para descartar que la infección fuese causada por este parásito. Para la inmunotinción de *T. gondii*, fue usado el sistema automático BenchMark de Ventana (Tucson, AZ) acompañado del V-Red kit mejorado para la detección del antígeno después de la recuperación del antígeno con el condicionador celular CC1 (Ventana). La inmunotinción del *N. caninum* fue llevada a cabo usando el autocolorador Bondmax (Leica, Bannockburn, IL), usando el acompañamiento

del kit Define para la detección del antígeno, después de la recuperación del antígeno con la solución recuperadora de enlaces de epítopes 1 (Leica). Todas las laminillas fueron contratituladas con hematoxilina de Mayer. Los controles positivos consistieron de tejidos de un cachorro naturalmente infectado con *T. gondii* y de cultivos celulares infectados con *N. caninum*. Para los controles negativos los anticuerpos primarios fueron reemplazados con soluciones tamponadas. En adición, secciones de múltiples tejidos fijadas en formalina e incrustadas en parafina fueron analizadas mediante PCR para la detección de *T. gondii* and *N. caninum*.

Ensayos de reacción en cadena de polimerasa (PCR) para *Toxoplasma gondii*. Dos ensayos separados fueron realizados para la detección de material genético de *T. gondii* por medio de la reacción en cadena de polimerasa (PCR), usando el ADN obtenido de secciones de tejidos infectados (corazón, hígado, bazo, páncreas, tráquea y cerebro) fijados en formalina e incrustados en parafina y cortados a 20mm de grosor. Brevemente, la extracción y purificación del ADN total a partir de tejidos animales se realizó con el DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen Inc, Valencia, CA) acorde al protocolo descrito por el fabricante y con mínimas modificaciones: los cortes de tejidos parafinados fueron lisados haciendo uso de 180 ml de una solución ATL tamponada, y 20ml de proteinasa K. El tubo fue incubado a 56°C hasta que la parafina se derritió y los tejidos fueron lisados. El tejido lisado fue retirado de la parafina derretida y ubicado en un nuevo tubo estéril (0,5ml). Todos los demás procedimientos fueron acorde a las instrucciones del fabricante. El ADN fue eluido con 50ml de una solución tamponada TAE.

En el primer ensayo de PCR la mezcla consistió de 2ml de ADN purificado, 12,5 ml de la enzima Amplitaq Gold® PCR Master Mix (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA), 9,9ml de agua de grado biológico, y 0,3ml (25 pmolar por ml) de cada cebador (Directo y Reverso). El par de cebadores utilizados fue descrito previamente por Bretagne *et al.* (1993), cebador directo 5'-ACGGGCGAGTAGCAC CTGAGGAGA-3' y cebador reverso 5'-TGGGTCTACG TCGATGGCATGACAAC-3', estos cebadores estaban dirigidos a la copia repetitiva número 35 del gen B1 de *T. gondii* produciendo un amplicon o fragmento de 115-pb en tamaño. Las condiciones de la reacción para el primer ensayo de PCR fueron: desnaturalización y activación de la polimerasa 1 ciclo de 95°C durante 5 min, desnaturalización 40 ciclos de 95°C durante 30 segundos, anidamiento 65°C durante 30 segundos, extensión 72°C durante 30 segundos; y una extensión final 1 ciclo de 72°C durante 5 minutos.

El Segundo ensayo de PCR para *T. Gondii* fue hecho para confirmar los resultados del primer ensayo. La mezcla reactiva para el segundo ensayo PCR consistía de 2ml de

ADN, 12.5ml de enzima GoTaq® Green Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI), 9,7 ml de agua de grado biológico molecular y 0,4 ml (25 pmolar por ml) de cada cebador PCR (directo y reverso). Los cebadores usados fueron descritos previamente por Homan *et al.* (2000), cebador directo 5'-GACGCTTTCCTCGTGGTGAT-3' y cebador reverso 5'-CAGACACAGTGCATCTGGATTC-3' que estaban dirigidos para los plegamientos repetitivos 200 a 300 en una secuencia de 529 bp de ADN de *T. gondii* produciendo un fragmento o amplicon de 126bp en tamaño. Las condiciones de reacción para el segundo ensayo fueron 1 ciclo de 95°C por 5 minutos; 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos; y 1 ciclo de 72°C por 5 minutos.

Para descartar la presencia de *Neospora caninum* se realizó un ensayo de PCR adicional. La mezcla reactiva consistía de 2ml AND extraído, 12,5ml de enzima Ampliqa Gold® PCR mezcla base (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA), 9,7ml agua de grado molecular, y 0,4 ml (25 pmolar por ml) de cada cebador PCR (directo y reverso). Los cebadores usados fueron 5'-AATCAGCCTGCGTCAGGGTG-3' y 5'-TCGTCCGCTTGCTCCCTATG-3'. Estos cebadores estaban dirigidos al gen Nc5 de *N. caninum* y producía una amplificación de un fragmento de 126-bp de tamaño. Los primeros fueron diseñados basándose en el reporte del gen Nc-5 gene de *N. caninum* (N ascensión GenBank AY459289). Las condiciones de reacción para este ensayo de PCR fueron 1 ciclo de 95°C durante 5 min; 40 ciclos de 95°C durante 30 sec, 65°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos; y un ciclo de 72°C durante 5 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV.

RESULTADOS

El caso del animal estudiado correspondía a un canguro rojo (*Macropus rufus*) macho, de ocho años y 50 kg de peso corporal, que procedía de un circo y que rutinariamente era sometido a entrenamiento físico. La alimentación consistía en concentrado y frutas sin suplementación vitamínica o mineral. El animal murió súbitamente sin signos premonitorios y el veterinario a cargo realizó la necropsia y toma de muestras de tejidos, las cuales se remitieron al laboratorio de histopatología veterinaria de la Universidad de los Llanos.

Examen post mortem y resultados de necropsia. Hallazgos macroscópicos. Los principales hallazgos macroscópicos

reportados por el veterinario fueron abscesación periapical premolar, enfermedad periodontal con necrosis y osteomielitis en maxilar superior; edema, congestión severa y cambios de coloración multilobular en pulmones; congestión en hígado junto con vesícula biliar pletórica; páncreas y bazo con irregularidades en el parénquima; sistema nervioso central con congestión severa y hemorragias focales.

Hallazgos microscópicos. Al análisis histopatológico bajo tinción de H&E se diagnosticaron tanto en el hígado, como en el bazo respectivamente, una hepatitis necrótica multifocal con presencia de quistes de protozoarios con bradizoítos y una esplenitis supurativa fibrosa con metaplasia ósea asociada a quistes de protozoarios. En el Sistema Nervioso Central (SNC) se diagnosticó una meningoencefalitis no supurativa necrótica asociada a quistes de protozoarios y fueron hallados en el miocardio múltiples bradizoítos e igualmente el páncreas también estuvo afectado por el parasitismo.

Al análisis histopatológico bajo tinción de PAS se revelaron bradizoítos y taquizoítos en los cortes histológicos de hígado, corazón, cerebro, páncreas y bazo.

Inmunohistoquímica. La detección de antígenos de *T. gondii* por el análisis inmunohistoquímico en los tejidos fijados en formalina se realizó usando un anticuerpo policlonal anti-*Toxoplasma gondii*, donde se confirmó la presencia del parásito en las secciones de tejidos teñidas (Figs. 1-3). La inmunoreactividad demostró la presencia de bradizoítos de *Toxoplasma gondii*, y de igual forma se evidenció la tinción de agregados antigénicos del parásito destruido.

Ensayos de reacción en cadena de polimerasa. La detección de *T. gondii* en los tejidos fijados en formalina fue hecha usando dos ensayos de PCR que estaban dirigidos hacia el ADN de diferentes secuencias repetitivas encontradas en el genoma de *T. gondii*. Los resultados para los ensayos de PCR demostraron que las bandas de los amplicones esperados alinearon en tamaño () con la banda del DNA del control positivo utilizado (Figs. 4 y 5). Asimismo el ensayo de PCR para *N. caninum* fue negativo (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

La toxoplasmosis (TX) es una de las zoonosis más difundidas en el mundo y es una enfermedad que varía desde una infección inaparente hasta aguda fatal (Quinn, 1994). Los hallazgos histopatológicos encontrados en el paciente, incluida la evidencia de taquizoítos, bradizoítos, además de la meningoencefalitis no supurativa y la hepatitis necrótica multifocal son algunas de las lesiones características que

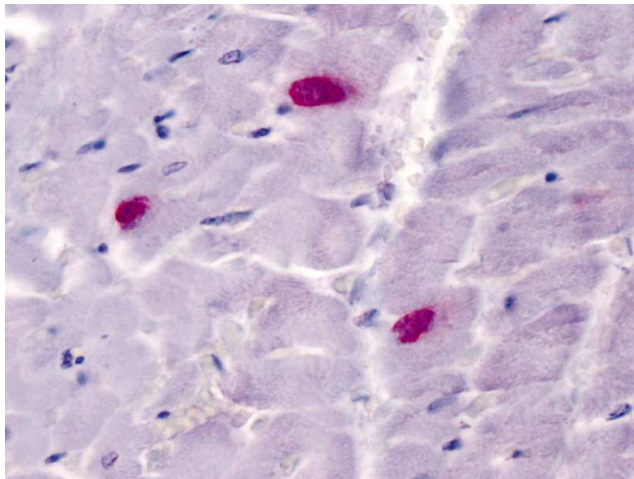


Fig. 1. Corazón, bradizoitos de *T. gondii* con inmunoreactividad. La reacción positiva es mostrada como color púrpura fuerte (40x).

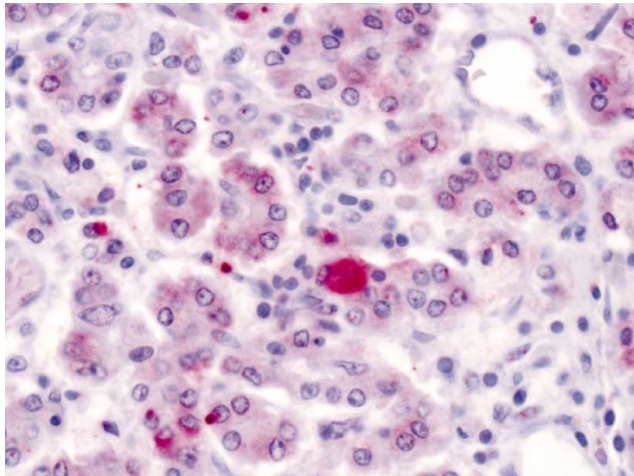


Fig. 2. Páncreas, bradizoitos de *T. gondii* con inmunoreactividad. La reacción positiva es mostrada como color púrpura fuerte (40x).

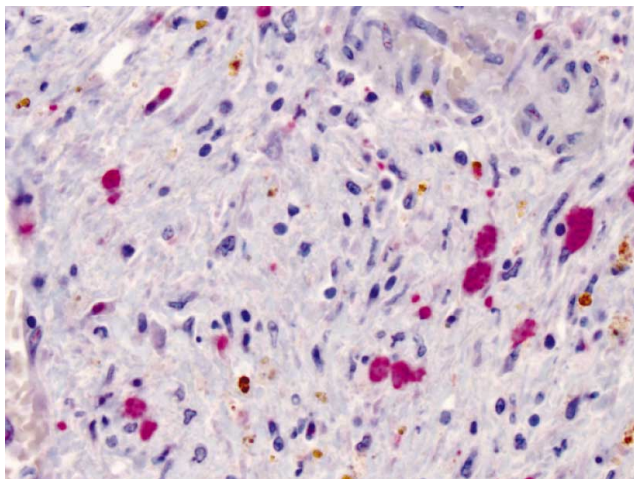


Fig. 3. Bazo con múltiples quistes (bradizoitos) de *T. gondii* con inmunoreactividad. La reacción positiva es mostrada como color púrpura fuerte (40x).

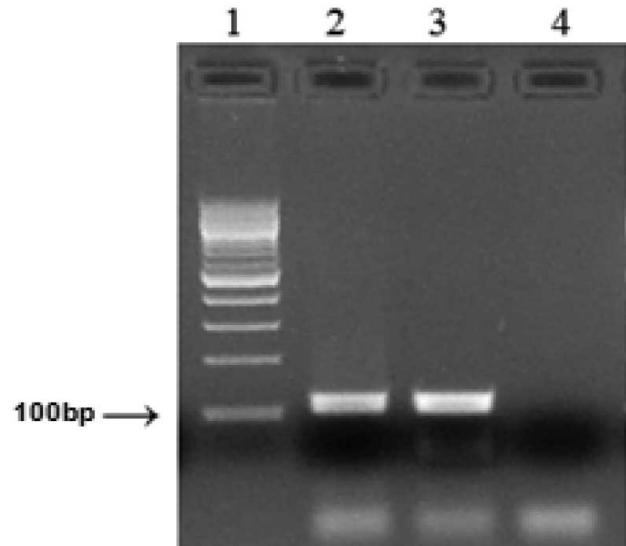


Fig. 4. Amplificación por PCR del ADN repetitivo de la región B1 encontrada en *T. gondii*. (1) Marcador de peso molecular, la flecha indica 100 pb. (2) Amplicon de 115-pb producido del ADN extraído de un pool de tejidos parafinados-formalinizados del caso de estudio. (3) Amplicon del ADN del control. (4) Control negativo, agua grado biología molecular.

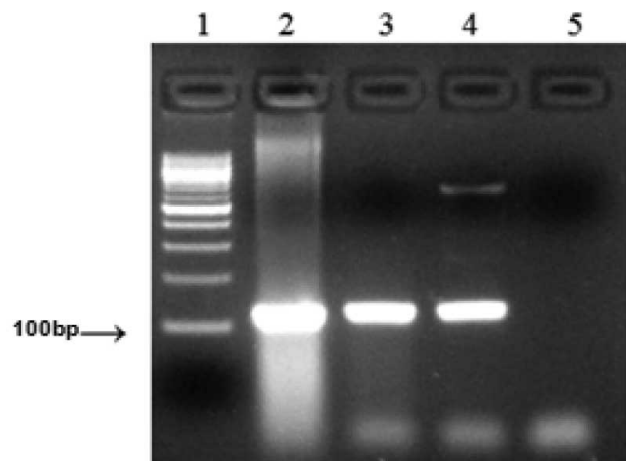


Fig. 5. Amplificación por PCR del ADN repetitivo de la región 529-pb encontrada en *T. gondii*. (1) Marcador de peso molecular, la flecha indica 100 pb. (2) Amplicon de 126-pb producido del ADN extraído de un pool de tejidos parafinados-formalinizados de un caso con diagnóstico sospechoso de toxoplasmosis no relacionado con este estudio (usado como control del procedimiento). (3) Amplicon de 126-pb producido del ADN extraído de un pool de tejidos parafinados-formalinizados del caso de estudio (4) Amplicon del ADN del control. (5) Control negativo, agua grado biología molecular.

han sido descritas en TX para macrópodos (Moré *et al.*; Lopez, 2001; Canfield *et al.*; Jensen *et al.*; Patton *et al.*; Garell; Montoya *et al.*, 2000) lo cual sugiere un diagnóstico compatible con una infección crónica por *Toxoplasma*

gondii en el animal estudiado. Sin embargo, es importante argumentar que el diagnóstico de infección por protozoarios eucoccideos de la familia Sarcocystidae basado solamente en la histopatología no llega a confirmar finalmente la etiología de la enfermedad (Carlyle *et al.*; Haziroglu *et al.*), debido a lo anterior, se realizaron pruebas complementarias específicas, entre estas la IHQ y la PCR, que permitieron la identificación efectiva del agente causal siendo este *Toxoplasma gondii*.

Ha sido descrito que *T. gondii* tiene capacidad de infectar numerosas especies, causando esporádicamente enfermedad en un amplio rango de animales tanto domésticos como silvestres (Bermúdez *et al.*; Tizard, 2002; Quiroz, 1996). El ciclo evolutivo de *T. gondii* es muy complejo y en animales herbívoros se ha sospechado que la principal ruta de transmisión del mismo es mediante el consumo de alimentos contaminados con ooquistes (Patton *et al.*). Para el caso particular se sugiere que al provenir de un circo, el animal se pudo infectar a través de material contaminado con ooquistes procedentes de las heces de gatos (Bermúdez *et al.*; Moré *et al.*; Montoya *et al.*), animales comúnmente encontrado en estos lugares.

La toxoplasmosis ha sido una de las enfermedades más comunes que afecta a los macrópodos australianos en condiciones de cautiverio (Montoya *et al.*) y ha sido reportada igualmente en muchos otros marsupiales bajo condiciones de cautiverio en diversos zoológicos del mundo (Bermúdez *et al.*; Moré *et al.*; Canfield *et al.*; Jensen *et al.*). Las lesiones invasivas de *T. gondii* en cerebro, corazón, bazo, hígado y páncreas descritas en el estudio coinciden con las referidas previamente por More *et al.* y Aker *et al.* para el caso de marsupiales experimentalmente infectados, sin embargo estas mismas corresponden con el reporte dado por Bermúdez *et al.* para el caso de marsupiales infectados en forma natural.

Los taquizoítos del parásito se multiplican en el interior de las células y cuando su número es excesivo rompen las células infectadas liberando las formas infecciosas o taquizoítos e invadiendo otras células por mecanismos similares a la fagocitosis. Cuando ellos invaden macrófagos normales no son destruidos puesto que bloquean la fusión fagosoma lisosoma, de modo que suprimen la producción de radicales tóxicos o citocinas y decrecen la inmunoreacción humoral y celular (Frenkel & Escajadillo, 1987). Sin embargo, en fases crónicas los taquizoítos pueden transformarse en quistes tisulares conteniendo bradizoítos no inmunógenos y no estimulantes de la reacción inflamatoria (Frenkel & Escajadillo; Frenkel, 1985). Cuando se produce desintegración de la membrana quística que recubre estos bradizoítos se desencadena una reacción de hipersensibili-

dad inmunológica tipo IV que contribuye a la patogenia, pues causa necrosis tisular del tejido adyacente (Frenkel & Escajadillo; Frenkel; Owen *et al.*, 2004). Mientras que los taquizoítos se multiplican rápidamente y destruyen las células, los bradizoítos de multiplicación lenta coexisten con las células del hospedero por semanas incluso hasta años (Aker; Hoff & Davis, 1986). En el paciente estudiado se observó la presencia múltiple de quistes conteniendo bradizoítos así como necrosis tisular en diferentes órganos, lo cual sugiere que el animal tenía una infección crónica con *T. gondii* en estados latentes que por algún detonante se reagudizó. No obstante, las infecciones latentes no se ven comúnmente en macrópodos debido a la alta tasa de mortalidad causado por esta enfermedad en estas especies (Bermúdez *et al.*). Probablemente en este paciente la infección se reactivó debido a múltiples situaciones que pudieron presentarse de forma aislada o a un mismo tiempo, entre estas cabe citar: el estrés inducido por el desplazamiento continuo del circo, y el estrés debido al mismo ambiente del circo, que incluye un ambiente ruidoso (Young & Akill) y las condiciones del cautiverio (Terio *et al.*, 2004). Una posible explicación para esta teoría dada podría ser que debido a la manipulación rutinaria y constante se provocó un estrés crónico por repetidas circunstancias estresoras que pudo llevar a una adaptación del organismo (Munson *et al.*, 2005). Sin embargo, como es sabido, ciertas especies silvestres pueden mal adaptarse al estrés por cautiverio lo que resulta en una respuesta adrenocortical persistente (Wells *et al.*, 2004). Se ha visto que muchos mamíferos silvestres cautivos sometidos a estrés crónico presentan lesiones hiperplásicas adrenales corticales y depleción linfocítica esplénica (Jayo *et al.*, 1993) coincidiendo este último reporte con los hallazgos encontrados en el canguro rojo estudiado. Aunque las respuestas individuales en los animales difieren en carácter, muchos presentan elevación significativa de los niveles basales de corticosteroides fecales que persisten por varios meses, particularmente en animales movidos de áreas de descanso hacia lugares de exhibición al público o que cambian frecuentemente de ubicación (Wells *et al.*), tal como sucede frecuentemente con los animales de circo. Del mismo modo se ha demostrado que los corticosteroides liberados en respuesta al estrés, promueven la lipogénesis (Jayo *et al.*), conllevando a lipomatosis hepática, sobre todo en animales que han sido sometidos a situaciones de estrés crónico (Munson *et al.*).

En conclusión, para este reporte de caso se evidenció histopatológicamente lesiones multiorgánicas atribuibles a una infección crónica por protozoarios eucoccideos de la familia Sarcocystidae confirmada por técnicas diagnósticas específicas, entre estas técnicas moleculares e inmunohistoquímicas que la etiología de la patología encontrada en este animal era un proceso concomitante con toxoplasmosis.

AGRADECIMIENTOS

Muy especialmente a los doctores Francisco Uzal, Fabio Del Piero, Aniceto Méndez Sánchez, por su ayuda

incondicional en la revisión y evaluación del artículo, al Doctor Matti Kiupel, Jefe del Laboratorio de Histología e Inmunohistoquímica del Centro Diagnóstico de Salud y Población Animal de la Universidad estatal de Michigan por la realización de las pruebas de IHQ.

OCHOA-AMAYA, J. E.; CIUDERIS-APONTE, K. A.; LIM, A.; BOLIN, S. & LANGOHR, I. Systemic Toxoplasmosis in a captive red kangaroo (*Macropus rufus*). *Int. J. Morphol.*, 30(1):70-76, 2012.

SUMMARY: The objectives of this study were to present and document the histopathological findings of systemic toxoplasmosis in a captive red kangaroo (*Macropus rufus*) which described macro and microscopic findings of the histopathological analysis. In the laboratory of animal histopathology (Universidad de los Llanos) formalin fixed tissue specimens were received, from a captive male *Macropus rufus*, who was eight years old and weighed 50 kg. The samples were processed by usual methods for optical microscopy. The histological sections of 3-4 mm thick were colored with Hematoxylin-Eosin (H&E) and then some samples stained with Periodic Acid Schiff (PAS), and processed by PCR and IHQ. Once the histopathological analysis was performed systemic toxoplasmosis was associated to protozoa cysts immunoreactive to *T. gondii*. The molecular detection of *T. gondii* in formalin fixed tissues was made using two PCR tests and confirmed by IHQ. Histopathologically a chronic infection by an eucoccideo protozoa from the Sarcocystidae family was diagnosed. The etiologic diagnosis was toxoplasmosis.

KEY WORDS: Kangaroo; Toxoplasmosis; Tachyzoites; Bradyzoites.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aker, H. The significance of histopathological diagnosis of toxoplasmosis (Experimental acute acquired toxoplasmosis in mice). *Turk. Klin. Tip Bilim.*, 10:314-20, 1992.
- Bermúdez, R.; Faílde, L. D.; Losada, A. P.; Nieto, J. M. & Quiroga, M. I. Toxoplasmosis in Bennett's wallabies (*Macropus rufogriseus*) in Spain. *Vet. Parasitol.*, 160:155-8, 2009.
- Bretagne, S.; Costa, J. M.; Vidaud, M.; Tran, J.; Nhieu, V. & Fleury-Feith, J. Detection of *Toxoplasma gondii* by Competitive DNA Amplification of Bronchoalveolar Lavage Samples. *J. Infect. Dis.*, 168:1585-8, 1993.
- Canfield, P. J.; Hartley, W. J. & Dubey, J. P. Lesions of toxoplasmosis in Australian marsupials. *J. Comp. Pathol.*, 103:159-67, 1990.
- Carlyle, T.; Hunt, R. D. & King, N. W. *Veterinary pathology. Diseases due to protozoa - Toxoplasmosis*. 6th Ed. Baltimore, Wiley-Blackwell, 1997. pp.560-1.
- Frenkel, J. K. Toxoplasmosis. *Pediatr. Clin. North Am.*, 32:917-31, 1985.
- Frenkel, J. K. & Escajadillo, A. Cyst rupture as a pathogenic mechanism of toxoplasmic encephalitis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 36:517-22, 1987.
- Gállego, J. *Manual de Parasitología: Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario*. 2 ed. Barcelona, Universitat Barcelona, 2007. pp.181-3.
- Garell, D. M. *Toxoplasmosis in zoo animals*. In: Zoo and wild animal medicine, current therapy. Fowler, M. & Miller, R. E. 4th ed. Philadelphia, Saunders C.O., 1999. pp.131-5.
- Gutierrez, Y. *Tissue Apicomplexa*. In: Diagnostic pathology of parasitic infections with clinical correlations. 2nd Ed. New York, Oxford University Press, 2000. pp.223-8.
- Haziroglu, R.; Altintas, K.; Atasever, A.; Gulbahar, M. & Tunca, O. Pathological and Immunohistochemical Studies in Rabbits Experimentally Infected with *Toxoplasma gondii*. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 27:285-93, 2003.
- Hoff, G. L. & Davis, J. W. *Noninfectious diseases of wildlife*. Iowa, The State University Press, 1982. pp.58-73.
- Homan, W. L.; Vercammen, M.; De Braekeleer, J. & Verschuere, H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int. J. Parasitol.*, 30:69-75, 2000.
- Jayo, J. M.; Shively, C. A.; Kaplan, J. R. & Manuck, S. B. Effects of exercise and stress on body fat distribution in male cynomolgus monkeys. *Int. J. Obstet. Metab. Dis.*, 17:597-604, 1993.
- Jensen, J. M.; Patton, S.; Wright, B. G. & Loeffler, D. G. Toxoplasmosis in marsupials in a zoological collection. *J. Zoo. An. Med.*, 16(4):129-31, 1985.
- Jubb, K. Inflammation in the central nervous system. En: Grant M.; Jubb, K & Palmer's Pathology of Domestic Animals. 5th ed. Vol II. Philadelphia, Elsevier Saunders, 2007. p.437.

- Lopez, A. *Respiratory System, Thoracic Cavity, and Pleura*. In: McGavin, M. D.; Carlton, W. W. & Zachary, J. F. Thomson's Special Veterinary Pathology. 3rd ed. Philadelphia, Elsevier Saunders, 2001. p.185.
- Mehlhorn, H. *Encyclopedia of Parasitology*. 3rd ed. Berlin, Springer, 2008. pp.260-5.
- Miller, M. A.; Ehlers, K.; Dubey, J. P. & Van Steenberg, K. Outbreak of toxoplasmosis in wallabies on an exotic animal farm. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 4:480-3, 1992.
- Montoya, E.; Ique, C.; Samamé, H. & Romaina, A. Seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en *Aotus vociferans* (Primates: Cebidae) en cautiverio. *Rev. Cienc. Vet. Perú*, 16(3-4):22-4, 2000.
- Moré, G.; Pardini, L.; Basso, W.; Machuca, M.; Bacigalupe, D.; Villanueva, M. C.; Schares, G.; Venturini, M. C. & Venturini, L. Toxoplasmosis and genotyping of *Toxoplasma gondii* in *Macropus rufus* and *Macropus giganteus* in Argentina. *Vet. Parasitol.*, 169(1-2):57-61, 2010.
- Munson, L.; Terio, K. A.; Worley, M.; Jago, M.; Bagot-Smith, A. & Marker, L. Extrinsic factors significantly affect patterns of disease in free-ranging and captive cheetah (*Acinonyx jubatus*) populations. *J. Wildl. Dis.*, 41:542-8, 2005.
- OIE – Organización mundial de sanidad animal. *Toxoplasmosis. Animal Disease Factsheets*. The Center for Food Security & Public Health. Ames, Iowa State University, 2005. pp.1-6.
- Owen, M. A.; Swaisgood, R. R.; Czekala, N. M.; Steinman, K. & Lindburg, D. G. Monitoring stress in captive giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*): behavioral and hormonal responses to ambient noise. *Zoo. Biol.*, 23:147-64, 2004.
- Patton, S.; Johnson, S. L.; Loeffler, D. G; Wright, B. G. & Jensen, J. M. Epizootic of toxoplasmosis in Kangaroos, Wallabies, Potaroos: Possible transmission via domestic cats. *J. An. Vet. Med. Assoc.*, 189:1166-9, 1986.
- Quinn, P. J. *Clinical veterinary microbiology*. Dublin, Elsevier Health Sciences, 1994. p.463.
- Quiroz, H. *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. México D.F., Limusa, 1996. p 149.
- Terio, K. A.; Marker, L. & Munson, L. Evidence for chronic stress in captive but not freeranging cheetahs (*Acinonyx jubatus*) based on adrenal morphology and function. *J. Wildl. Dis.*, 40:259-66, 2004.
- Tizard, I. *Inmunología veterinaria*. 6^a ed. México D.F., McGraw Hill Interamericana, 2002.
- Wells, A.; Terio, K. A.; Ziccardi, M. H. & Munson, L. The stress response to environmental change in captive cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *J. Zoo. Wildl. Med.*, 35:8-14, 2004.
- Young, E. A. & Akill, H. Corticotropin-releasing factor stimulation of adrenocorticotropin and b endorphin release: effects of acute and chronic stress. *Endocrinology*, 117:23-30, 1985.

Dirección para correspondencia:
Julieta Ochoa-Amaya
Universidad de los Llanos
Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales
Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Villavicencio, Meta
COLOMBIA

Email: julietaechoa@yahoo.es

Recibido : 01-07-2011

Aceptado: 02-11-2011