

# ***Neospora caninum* EN UN REBAÑO LECHERO Y SU ASOCIACIÓN CON EL ABORTO**

## ***Neospora caninum* in a Dairy Cattle Herd and its Association to Abortion**

**César Obando<sup>1\*</sup>, Magaly Bracamonte<sup>1</sup>, Alix Montoya<sup>1</sup> y Vilma Cadenas<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorio de Virología, Sanidad Animal, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Maracay, Venezuela. [cobando@inia.gov.ve](mailto:cobando@inia.gov.ve)

### **RESUMEN**

*Neospora caninum* es uno de los agentes infecciosos que con frecuencia se reportan como causantes de abortos en la ganadería bovina. En Venezuela, apenas existen estudios puntuales sobre su grado de difusión, así como sobre su implicación en la fisiología de la gestación. A fin de contribuir al conocimiento de esta enfermedad, se llevó a cabo una evaluación para determinar su responsabilidad en la ocurrencia de abortos, para lo cual se seleccionó un rebaño con abortos endémicos, 11% en vacas y 20% en novillas, con edad promedio de 4,5 meses de gestación. Una muestra de 169 vacas (10%), 87 y 82 con y sin registros de abortos, respectivamente, fueron analizadas para la detección de anticuerpos específicos contra *N. caninum*, mediante la prueba de ELISA. La prevalencia resultó en 44%, confirmando la infección por el parásito. En el grupo con aborto 47 (54%) resultaron con anticuerpos específicos contra el protozoario, indicativo de infección, mientras que en el grupo sin aborto sólo 28 (34%). Se encontró una asociación importante entre la condición de infección con *Neospora caninum* y la ocurrencia de los abortos ( $P = 0,00934$ ), indicando que *N. caninum* tuvo una elevada implicación en la etiología de los mismos. Los resultados de este trabajo son una contribución al conocimiento de la enfermedad.

**Palabras clave:** *Neospora caninum*, bovinos, neosporosis, aborto.

### **ABSTRACT**

*Neospora caninum* is one of the most frequent infectious organisms causing abortion in cattle. Nevertheless, few detailed studies have been done about this parasite in Venezuela. The present study was designed to assess the importance of bo-

vine neosporosis for causing abortion in an infected herd, which has 11 and 20% of abortion in cows and heifers, respectively, most of them occurred at 4.5 months of gestation. A sample of 169 cows (10%), 87 and 82 with and without abortion, respectively, were tested for specific antibodies to *N. caninum* by ELISA. The prevalence was found to be 44% that confirmed the infection in the herd. A total of 47 of the aborted cows (54%) were seropositive to *N. caninum* indicating that they had been infected with the parasite, while only 28 (34%) of the non-aborted cows resulted infected. It was found a significant association between seropositivity to *N. caninum* and abortion ( $P = 0.00934$ ), which revealed the role of *Neospora caninum* in the occurrence of the abortions. The result of this work is a contribution to the knowledge of the disease.

**Key words:** *Neospora caninum*, bovine, neosporosis, abortion.

### **INTRODUCCIÓN**

La neosporosis bovina, conocida como neosporosis fetal bovina o neosporosis abortiva bovina, es una enfermedad ocasionada por *Neospora caninum*, protozoario perteneciente a la familia *Sarcocystidae*, subfamilia *Toxoplasmatinae* [4]. Esta enfermedad ha sido reportada en países desarrollados, así como en países latinoamericanos, tales como: México [21], Colombia, Brasil, Perú, Chile, Paraguay y Argentina [16]. En las últimas décadas ha sido descrita como una de las principales causas de abortos y de pérdidas económicas de la ganadería bovina (*Bos taurus-indicus*) [8, 12, 22]. Los abortos pueden presentarse desde los tres meses de gestación hasta el final de la misma, aunque la incidencia más alta ocurre entre los cinco y seis meses de gestación [27, 29, 30]. En rebaños lecheros, el impacto económico radica principalmente en la pérdida de los fetos, reemplazo de vacas con registros de abor-

tos, incremento en el intervalo entre partos y disminución en la producción de leche [7].

Las primeras evidencias serológicas de la presencia de este protozooario en rebaños de Venezuela fueron obtenidas por Lista y col. [15], y estudios posteriores son indicativos de que el parásito se encuentra presente en la mayoría de los estados, aunque la seropositividad en los rebaños pareciera variar entre 5 y 21% [10, 15]. Por ser una enfermedad poco conocida en el país, se planteó realizar un estudio en un rebaño infectado con *N. caninum* y con problemas de aborto, para contribuir a conocer las implicaciones de este agente en la ocurrencia de los mismos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Rebaño de ensayo

Para la realización de este trabajo se utilizó una finca ubicada en el municipio Torres del estado Lara, área de clima semiárido, a una altura de 507 m. s. n. m; a 10° 10' 60" LN y 70° 4' 60" LO, con una temperatura media anual de 28°C y precipitaciones promedio de 338 mm al año [19]. Se seleccionó un rebaño de 4.000 bovinos mestizos Holstein de alta producción, sometido a manejo intensivo, servidos mediante inseminación artificial, y caracterizado por presentar abortos anualmente durante los últimos cinco años, alrededor de 11% en vacas y 20% en novillas, siendo la edad promedio de 4,5 meses de gestación [datos inéditos]. La selección del rebaño se fundamentó en una encuesta serológica realizada sobre *N. caninum*, mediante la técnica de ELISA, que identificó 37% de vacas con presencia de anticuerpos específicos, lo cual fue indicativo de una infección considerable en el rebaño [15], que además generó la hipótesis de que este parásito pudiese ser la principal causa de la ocurrencia de los abortos.

La hipótesis fue fortalecida con base a los registros sanitarios sobre los agentes abortificantes más frecuentes, los cuales mostraron que en el rebaño no habían animales reactivos a *Brucella* spp, además de que mantenían un plan de vacunación con RB-51. Sobre leptospirosis, los animales eran vacunados cada seis meses, y en una evaluación de 12 vacas recién abortadas, sólo 3 (25%) resultaron con anticuerpos específicos contra *Leptospira* spp, con títulos de 1/100 y 1/200, indicativo de que esta bacteria no estaba involucrada en los abortos. En cuanto a los virus abortificantes del complejo respiratorio reproductivo de los bovinos (CRRB), es decir: rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) y diarrea viral bovina (DVB), el rebaño era sometido a una vacunación sistemática, cada cuatro meses, lo que limita la acción de ellos por generar una fuerte presión inmunológica que contribuye a controlar la reactivación, reexcreción y diseminación del virus de IBR, procedimiento recomendado en programas para su erradicación [26], además de favorecer la efectividad de la repuesta inmune ge-

nerada por la vacuna inactivada contra el virus de DVB, la cual es de corta duración [18].

### Diseño experimental

Se seleccionó una muestra al azar de 169 vacas, equivalente al 10% del total de ellas en etapa reproductiva (1.690), de las cuales 87 tenían registros de haber abortado (Grupo con Aborto) y 82 de no haber tenido interrupción de la gestación (Grupo sin Aborto). Se determinó las proporciones de animales seropositivos a *N. caninum* en cada grupo, y se analizó la asociación entre la ocurrencia de aborto y la presencia de anticuerpos específicos contra este protozooario, mediante la prueba de Ji-cuadrado [17].

Se utilizó una muestra de 10%, con base al 37% de seropositividad a *N. caninum* reportada en el rebaño previamente por Lista y col. [15], ya que de acuerdo a ello, cerca de la mitad de los animales seleccionados resultarían seropositivos y, en consecuencia, los grupos de animales infectados y no infectados serían suficientemente grandes para la ejecución del estudio a realizar.

### Recolección de muestras y detección de anticuerpos contra *N. caninum*

Se recolectaron muestras de sangre de los animales de cada grupo, mediante el uso de tubos con vacío, se extrajeron estérilmente los sueros correspondientes a cada una de ellas y se conservaron en crioviales, Neptune 3445, CLP-México, a -20°C, hasta su procesamiento. Se detectó en cada uno de ellos la presencia o no de anticuerpos específicos contra *N. caninum*, mediante el uso del kit de ELISA comercial HerdCheck Anti-Neospora, marca IDEXX, fabricado en los EUA, siguiendo las especificaciones del fabricante. En resumen, las muestras de suero, por duplicado, se incubaron en placas de microtécnica en las cuales antígenos de *N. caninum* habían sido fijados en los pozos, para la formación del complejo antígeno-anticuerpo. Después de lavar las placas con fosfato/tween 10X se agregó el conjugado (Anti IgG bovina conjugada con peroxidasa) y se incubaron nuevamente en estufa marca Precisión-Scientific, modelo 002, EUA. Finalmente, después de un nuevo lavado para eliminar el conjugado no fijado, se agregó la solución sustrato (3,3', 5,5' tetrametilbenzidina). La reacción se detuvo después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente con solución de frenado, procediéndose a la lectura de la prueba en un espectrofotómetro ELx 800 (Biotek Instruments, Inc. EUA), utilizando un filtro de 650 nm. Se utilizaron controles positivos y negativos provistos por el kit.

**Interpretación.** Muestras de suero con cocientes S/P menores de 0,5 se consideraron negativas y con cocientes igual o mayores a 0,5 como positivas.

- S: Densidad óptica corregida de la muestra
- P: Densidad óptica del control positivo corregido.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como resultado de las pruebas serológicas realizadas para la detección de anticuerpos específicos contra *N. caninum*, 75 de las 169 muestras resultaron positivas, lo que indica que la prevalencia de reactores en el rebaño experimental está alrededor del 44% (TABLA I), cifra que se corresponde con el resultado de la muestra piloto del rebaño reportada previamente [15]. Este nivel de seropositividad está por encima de otros reportes, tales como: 24% en algunas zonas de Estados Unidos, 18% en España, [18], 14% en el estado de Bahía-Brasil [11] y 6% en Tailandia [25], lo que pudiera explicarse por tratarse de un rebaño en confinamiento y con manejo intensivo, ya que en ganado lechero criado a pastoreo y en ganado de carne las prevalencias generalmente son bajas [3]. Es por ello que este resultado se corresponde con lo reportado en zonas endémicas de California-EUA, donde la prevalencia de los rebaños lecheros varía entre 20 y 40% [2].

Las pruebas serológicas de los grupos experimentales mostraron que, en el Grupo con Aborto 47 vacas (54%) resultaron con anticuerpos específicos contra el protozoario, lo que fue indicativo de que dichos animales estaban infectados, mientras que en el Grupo sin Aborto 28 resultaron seropositivas (34%), es decir 20% menos que en el grupo anterior (TABLA I), con una asociación significativa entre la condición de infección con *N. caninum* y la ocurrencia de abortos ( $P = 0,00934$ ), indicando que *N. caninum* tuvo una elevada implicación en la etiología de los mismos, lo cual ha sido reportado en rebaños infectados [5, 29]. El hecho que 40/87 (46%) de las vacas que abortaron resultaron sin anticuerpos contra *N. caninum*, no necesariamente quiere decir que dichos animales estaban libres de infección con el parásito, ya que vacas seronegativas han abortado fetos infectados con el parásito, detectados por la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa [20]. Adicionalmente, es posible que otras causas pudieran haber contribuido con la ocurrencia siendo conocido que el aborto puede ser ocasionado por muchos factores, infecciosos y no infecciosos [9].

Por tratarse de un rebaño libre de brucelosis y donde sólo 3 de 12 vacas recién abortadas mostraron anticuerpos contra *Leptospira* spp, con títulos apenas de 1/100 y 1/200, aún bajo un programa de vacunación sistemática contra esta bacteria, es indicativo de que ambos patógenos no hayan tenido implicación en la incidencia elevada de los abortos.

Si bien es cierto que *Campylobacter* spp y *Trichomona foetus* son también agentes abortigénicos, su posible implicación es muy difícil de aceptar, por tratarse de un rebaño cuyo manejo reproductivo se fundamenta exclusivamente en la inseminación artificial y, en consecuencia, no están dadas las condiciones para que ocurra infección y persistencia de estos agentes en el tracto genital de las vacas [1, 13]. Es conocido, desde hace muchos años, que el uso de la inseminación artificial por dos años consecutivos garantiza la eliminación del *Campylobacter* spp del rebaño [6].

En relación con los agentes virales, particularmente los virus de rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) y diarrea viral bovina (DVB), por ser los virus mayormente aceptados como causantes de abortos [14, 24], su contribución en alguno de dichos eventos pudo haber sido posible, ya que es conocido que el aborto ocasionado por estos virus puede ocurrir aún en animales vacunados [23, 28], además ha sido demostrado que el virus de DVB tiene la particularidad de potenciar el efecto abortigénico de *N. caninum* [5], así como de otros agentes infecciosos [18]. Sin embargo, los animales de ambos grupos estuvieron sometidos al mismo programa de vacunación contra estos virus, por lo que la diferencia significativa observada entre las proporciones de abortos ocurridos en las hembras infectadas y no infectadas con *N. caninum*, no puede ser relacionada directamente con la acción de dichos virus.

## CONCLUSIONES

*N. caninum* tuvo una elevada implicación en la ocurrencia de los abortos del rebaño experimental, sin que ello quiera decir que otros agentes abortigénicos no hayan podido contribuir en la etiología de algunos de ellos.

## RECOMENDACIONES

En razón a que en la actualidad no existen vacunas o fármacos de comprobada eficiencia que garanticen el control de esta parasitosis, es importante evaluar programas de erradicación del parásito, mediante la eliminación progresiva de las hembras infectadas y, con particular énfasis, de las becerras nacidas infectadas (transmisión vertical), como medida para luchar contra esta enfermedad. El programa deberá incluir el control de los perros existentes en las explotaciones, considerados hospedadores definitivos en el ciclo evolutivo de

TABLA I

### RELACIÓN ENTRE LA SEROPOSITIVIDAD A *Neospora caninum* Y ABORTOS EN HEMBRAS BOVINAS DE UN REBAÑO CON ABORTOS ENDÉMICOS / RELATION BETWEEN SEROPOSITIVITY TO *Neospora caninum* AND ABORTION IN COWS WITH ENDEMIC ABORTION

Desempeño reproductivo	N° de animales	Seropositivas	Seronegativas
Con aborto	87	47 (54%)	40 (46%)
Sin aborto	82	28 (34%)	54 (66%)
Total	169	75 (44%)	94 (56%)

esta parasitosis, para evitar que ingieran restos de placenta y fetos productos de abortos, por ser ellos los responsables de la transmisión horizontal.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABBITT, B. Trichomoniasis in cattle. In: Morrow D.A (Ed.): **Current Therapy in Theriogenology**. WB Saunders Company. Philadelphia, London, Toronto. 482-488 pp. 1980.
- [2] ANDERSON, M.L.; BLANCHARD, P.C.; BARR, B.C.; DUBEY, J.P.; HOFFMAN, R.L.; CONRAD, P.A. *Neospora*-like protozoan infection as a mayor cause of abortion in California dairy cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 198; 241-244. 1991.
- [3] BARR, B.C.; BJERKAS, I.; BUXTON, D.; CONRAD, P.; DUBEY, J. P.; ELLIS, J.; JENKINS, M.; JOHNSTON, S.; LINDSAY, D.; SIBLEY, L.; TREES, A.; WOUDA, W. Neosporosis Report the international *Neospora* workshop. **The Compend. Parasitol.** 4 (19): 120-127. 1997.
- [4] BARTA, J. Molecular Approaches for inferring evolutionary relationships among protistan parasites. **Vet. Parasitol.** 101:175-186. 2001.
- [5] BJORKMAN, C.; ALENIUS, S.; EMANUELSSON, U.; UGLAS, A. *Neospora caninum* and bovine virus diarrhea virus infections in Swedish dairy cows in relation to abortion. **Vet. J.** 159: 201-206. 2000.
- [6] CLARK, B.L.; NEWSAN, J.D.; MONSBOURGH, M.J.; DUFTY, J.H. Experimental vibrio fetus infection in cows. **Aust. Vet. J.** 43 (9): 341-345. 1967.
- [7] DUBEY, J.P. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. **J.A.V.M.A.** 8 (214): 1160-1163. 1999.
- [8] DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and Neosporosis in animals. **Korean J. of Parasitol.** 126: 1-16. 2003.
- [9] EVERMANN, J.F. Advances in the diagnosis of infectious bovine abortion. **The Bov. Pract.** 17: 36-38. 1982.
- [10] FERNÁNDEZ, J.G. Seroprevalencia de Neosporosis Bovina en el municipio Silva del estado Falcón. Universidad Central de Venezuela. Tesis de Maestría 1-71 pp. 2004.
- [11] GONDIM, L.; SARTOR, I.; HASEGAWA, M.; YAMANE, I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Vet. Parasitol.** 86: 71-75. 1999.
- [12] HERNÁNDEZ, J.; RISCO, C.; DONOVAN, A. Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 219: 623-635. 2001.
- [13] HORLEIN, A.B. Bovine Genital Vibriosis. In: Morrow D. A (Ed.): **Current Therapy in Theriogenology**. WB Saunders Company. Philadelphia, London, Toronto. 479-482 pp. 1980.
- [14] KIRBRIDE, C.A. Viral agents and associated lesions detected in 10 years study of bovine abortions and stillbirths. **J. Vet. Diagn. Invest.** 4: 374-379. 1992.
- [15] LISTA-ALVES, D.; PALOMARES-NAVEDA, R.; GARCÍA, F.; OBANDO, C.; ARRIETA, D.; HOET, A.E.; Serological evidence of *Neospora caninum* in dual-purpose cattle herds in Venezuela. **Vet. Parasitol.** 136: 347-349. 2006.
- [16] LOZADA, E. Determinación de la presencia de anticuerpos a *Neospora caninum* en hatos lecheros de la sierra centro norte del Ecuador, por prueba inmunoenzimática. Universidad Central del Ecuador. Tesis de Doctorado. 1-83. pp. 2004.
- [17] MORALES, G.; PINO, L. Prueba de Ji Cuadrado. **Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la salud**. Universidad Católica Andrés Bello, Caracas, 1-102. pp. 2009.
- [18] POTGIETER, L.N.D. Immunology of bovine viral diarrhea virus. In: Baker, L and Houe, H (Eds). **The Vet. Clin. of North Ame: Food Anim. Pract.** Vol 11. 3rd Ed. W B Saunders Company, Philadelphia. 501-520 pp. 1995.
- [19] RAMÍREZ, A.; BLANCO, M.; GARCÍA, E. Biogeografía de *Nocardia*: Estudio de la población edáfica de *Nocardia* en diversas zonas climáticas del Estado Lara. **Rev. Soc. Ven. Microbiol.** 23: 1-7. 2003.
- [20] SAGER, H.; FISHER, I.; FURRER, K.; STRASSER, M.; WALDVOGEL, A.; BOERLIN, P.; AUDIGE, L.; GOTSTEIN, B. A Swiss case control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histology and serology. **Vet. Parasit.** 102: 1-15. 2001.
- [21] SALINAS, J.; MORA, J.; ZARATÉ, J.; RIOJAS, V.; HERNÁNDEZ, G.; DÁVALOS, G.; RAMÍREZ, R.; GALÁN, L.; ÁVALOS, R. Frecuencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* en ganado bovino del noreste de México. **Vet. Mex.** 36 (3): 303-311. 2005.
- [22] SANDERSON, M.; GAY, J.; BAZZLER, T. *Neospora caninum* seroprevalence and risk factors in beef cattle in the northwest United Stated. **Vet. Parasitol.** 90: 15-24. 2000.
- [23] SCHULTZ, R. Certain factors to consider when designing a bovine vaccination program. **Bov. Pract.** 26: 19-26. 1994.
- [24] SMITH, C.K. Herpesviral abortion in domestic animals. **Vet. J.** 153: 253-268. 1997.
- [25] SUTEERAPARP, P.; PHOLPARK, S.; PHOLPARK, M.; CHAROENCHAI, A.; CHOMPOOCHAN, T.; YAMANE, I.; KASHIWASAKI, Y. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dairy cattle in Thailand. **Vet. Parasitol.** 136: 347-349. 2006.

- spora caninum* and associated abortion in dairy cattle from central Thailand. **Vet. Parasitol.** 86: 49-57. 1999.
- [26] TANYI, J.; VARGA, J. Guidelines for the eradication of infectious bovine rhinotracheitis in Hungary. **Acta Vet. Hungarica.** 40 (3): 165-169. 1992.
- [27] THURMOND, M.C.; HIETALA, S.K. Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. **Am. J. Vet. Res.** 57: 1559-1562. 1996.
- [28] VAN OIRSCHOT, J.T.; KAASHEK, M.J.; RIJSEWIJK. Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. **Vet. Microbiol.** 53: 43-54. 1996.
- [29] WOUDA, W.; MOEN, A.R.; SCHUKKEN, Y.H. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. **Theriogenol.** 49: 1311-1316. 1998.
- [30] WOUDA, W.; DIJKSTRA, T.; KRAMER, A.M.H.; VAN MAANEN, C.; BRINKHOF, J.M.A. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. **Int. J. for Parasitol.** 29: 1677-1682. 1999.