



INFORME BREVE

Neosporosis epidémica y endémica: descripción de dos eventos en bovinos para cría

Patricio M. Calandra^{a,b}, José M. Di Matía^{a,b}, Dora B. Cano^a, Ernesto R. Odriozola^a, Juan A. García^a, Ernesto J.A. Späth^a, Anselmo C. Odeón^a, Fernando A. Paolicchi^a, Eleonora L. Morrell^a, Carlos M. Campero^a y Dadín P. Moore^{c,*}

^a Grupo Sanidad Animal, EEA INTA Balcarce, Argentina

^b Residencia interna en Sanidad Animal, EEA INTA Balcarce, Argentina

^c CONICET, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

Recibido el 12 de marzo de 2014; aceptado el 7 de noviembre de 2014

PALABRAS CLAVE

Aborto;
Neosporosis;
Diagnóstico;
Serología;
Bovinos para carne

KEYWORDS

Abortion;
Neosporosis;
Diagnosis;
Serology;
Beef cattle

Resumen

El objetivo de este trabajo es describir dos eventos producidos en la provincia de Buenos Aires en los cuales *Neospora caninum* estuvo asociado a la ocurrencia de abortos en bovinos de cría para carne. En uno de ellos se registraron 11 abortos en 57 vaquillonas durante 45 días, en este evento fue 5 veces más probable que una vaquillona que sufrió un aborto fuera seropositiva a *N. caninum* que una que no lo sufrió (*odds ratio* [OR] = 4,9 IC 1,2-19,9) ($p < 0,05$). En el otro evento se registraron 14 abortos en 140 vacas, y no se observó asociación significativa entre los abortos y la seropositividad frente a *N. caninum* OR = 0,69 (0,06-7,31) ($p > 0,05$). Se analizaron dos fetos de cada evento: estos resultaron negativos a otros patógenos de la reproducción, aunque presentaron anticuerpos específicos y lesiones histopatológicas compatibles con infecciones por *N. caninum*. Estos resultados sugieren dos posibles modalidades de presentación de abortos en bovinos causados por *N. caninum*: una epidémica, como la del primer evento aquí referido, y una endémica, como la del segundo.

© 2014 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Endemic and epidemic bovine neosporosis: description of two events in beef cattle

Abstract

The aim of this study was to describe two events in which *Neospora caninum* was involved in bovine abortions in beef cattle. In the first event, 11 abortions in 57 heifers were recorded in 45 days. One aborted heifer was 5 times more likely to be seropositive than a non-aborted heifer (OR=4.9; IC 1.2-19.9) ($p < 0.05$). In the second event, no association between serological results and abortions were observed (OR= 0,69; 0,06-7,31) ($p > 0.05$).

* Autor para correspondencia

Correo electrónico: moore.dadin@inta.gob.ar (D.P. Moore).

Neither antibodies nor isolation of other pathogens were achieved in any case. On the contrary, antibodies and pathognomonic histopathological lesions were observed in the four fetuses from both cases. Interestingly, the findings in the first event suggest the epidemic behavior of the disease. In contrast, in the second event it appears that few abortions were due to *N. caninum*, suggesting the presence of endemic neosporosis. © 2014 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

La neosporosis bovina es una enfermedad de distribución mundial causada por el protozoo *Neospora caninum* y caracterizada por producir abortos, momificación fetal, partos prematuros y nacimiento de terneros débiles, con ataxia, parálisis e incoordinación⁶. La enfermedad se presenta de forma endémica, a menudo asociada a abortos esporádicos (hasta un 10-12,5 %) en hatos bovinos donde es frecuente la transmisión congénita, o bien de forma epidémica, relacionada con tormentas de abortos (30-57 %) en hatos donde los bovinos adquieren la infección en forma posnatal⁶.

Los hospedadores definitivos de *Neospora caninum* conocidos hasta ahora son el perro¹² (*Canis familiaris*), el coyote⁹ (*Canis latrans*), el dingo australiano¹⁰ (*Canis lupus dingo*) y el lobo gris⁴ (*Canis lupus lupus*). El primer aislamiento de este microorganismo en Argentina se obtuvo de heces de un perro naturalmente infectado² (cepa NC-6 Argentina). Aunque el papel del zorro gris pampeano (*Pseudalopex gymnocercus*) o de los zorros de la Patagonia (*Dusicyon culpaeus* y *Dusicyon griseus*) en la epidemiología de la enfermedad no ha sido aún establecido, se ha comprobado la presencia de anticuerpos específicos contra este parásito en las citadas especies^{8,11}. También se encontró un 11,4 % de sueros positivos frente a *N. caninum* en un grupo de 44 liebres europeas (*Lepus europaeus*) analizadas¹.

En un estudio epidemiológico basado en la serología que fue realizado en la provincia de La Pampa (Argentina) se analizaron factores asociados al riesgo de infección por *N. caninum*⁷. En esa investigación se observó que la explotación lechera, la mayor carga animal, la compra frecuente de animales, la entrada de nuevos perros y la utilización de silos estuvieron asociadas a una mayor proporción de animales seropositivos⁷. Aunque la industria de la carne tiene gran importancia socioeconómica en la Argentina, la neosporosis bovina ha sido caracterizada solo parcialmente, y es escasa la información disponible respecto de bovinos de razas cárnicas¹³.

El nacimiento de terneros clínicamente sanos pero congénitamente infectados suele ser un evento común en ganado bovino afectado por neosporosis⁶. Un interesante trabajo muestra que vacas para leche con elevado título de anticuerpos tienden a parir terneros con títulos elevados de anticuerpos antes de la ingesta del calostro¹⁴. Más aún, *N. caninum* tiene tal adaptación al hospedador que más de 80 % de las hembras infectadas transmiten la enfermedad en forma congénita sin sufrir aborto⁶.

La determinación del título final de anticuerpos maternos no es una herramienta adecuada para el diagnóstico de aborto por *N. caninum* porque vacas que paren normalmente presentan una gran fluctuación en los niveles de inmunoglobulinas específicas⁶. Por esta razón, la comparación de las proporciones de animales seropositivos entre ani-

males que han abortado y animales que no han abortado se ha sugerido como una metodología más adecuada para asociar las pérdidas reproductivas con los resultados serológicos frente a *N. caninum*¹⁵.

Aunque se ha avanzado notablemente en el desarrollo de técnicas para el diagnóstico de la neosporosis bovina, es importante resaltar y reforzar los criterios clínicos y epidemiológicos para asociar la infección por *N. caninum* con la ocurrencia de abortos epidémicos o endémicos⁶. La presencia de anticuerpos en una hembra bovina que sufrió un aborto y, más aún, la sola presencia de anticuerpos en su feto lo único que demuestran es una infección en la madre y la transmisión congénita del parásito, pero estos no son elementos definitivos para concluir que la pérdida reproductiva estuvo causada por *N. caninum*⁶. Sin embargo, la existencia de graves lesiones histopatológicas (encefalitis multifocal necrotizante, miocarditis, miositis, hepatitis no supurativas, etc.) características de las infecciones por este protozoo resultan relevantes, por demostrar un desequilibrio en la relación parásito-huésped a favor de primero⁶.

Este trabajo tiene como objetivo describir dos eventos de abortos en hatos bovinos para producción de carne donde la enfermedad se presentó de forma epidémica y endémica, respectivamente.

La ubicación geográfica precisa donde el episodio tuvo lugar, la categoría de los animales afectados (vaquillona o vaca) y algunas especificaciones relativas al manejo reproductivo se presentan en la tabla 1. La población bovina en estudio comprendió ejemplares para cría de las razas británicas Angus, Hereford y sus cruces. El diagnóstico diferencial para establecer las causas de aborto fue solicitado por veterinarios de la actividad privada, quienes enviaron las muestras al Servicio de Diagnóstico Veterinario Especializado (SDVE) del INTA Balcarce durante los años 2011 y 2012. Los hatos bovinos estaban libres de brucelosis. Las muestras de sangre sin anticoagulante para serología se obtuvieron por punción de la vena yugular.

Se evaluó la presencia de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la diarrea viral bovina (vDVB) y el herpesvirus bovino tipo 1 (HVB-1) siguiendo protocolos disponibles en el SDVE antes citado y metodología previamente descrita³. Asimismo, se determinaron anticuerpos contra *Leptospira* spp. mediante microaglutinación.

Tras realizar diluciones séricas al doble, el aumento del título serológico en al menos 3 veces fue considerado como seroconversión. La presencia de anticuerpos contra *N. caninum* se evaluó mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando una dilución sérica de 1:100⁵ y anti-IgG bovina conjugada con FITC (SIGMA, Cat. N.º F7887). Para todas las técnicas se utilizaron controles apropiados tanto positivos

Tabla 1 Detalle de los animales y del manejo general y reproductivo de los hatos bovinos involucrados en los dos eventos de abortos examinados

Evento	Localidad, provincia	Total de animales	Carga animal	Categoría	Manejo reproductivo	Vacunas reproductivas ^a	Abortos registrados (n)	Sueros analizados (n)	Fetos recuperados (n)
	Coordenadas geográficas								
1	Balcarce, Bs. As. -37 -58	57	0,8 Vaq/ha	Vaq	IA	No	11	57	2
2	Necochea, Bs. As. -38 -59	140	0,6 V/ha	V	IA	Sí	14	44	2

V: vaca; Vaq: vaquillona; IA: inseminación artificial.

^a Vacunas reproductivas aplicadas de acuerdo con la recomendación del laboratorio elaborador.

(inoculaciones experimentales) como negativos, disponibles en INTA EEA Balcarce.

Se efectuó la necropsia y se estimó la edad aproximada de los fetos por la cobertura pilosa, el peso y la longitud. Se obtuvieron muestras de pulmón y líquido de abomaso para cultivo bacteriológico de organismos aerobios y microaerófilos; y de bazo para aislamiento viral³. El fluido abomasal se utilizó, además, para el cultivo de *Tritrichomonas foetus* y para el diagnóstico de *Campylobacter fetus* por inmunofluorescencia directa³ (IFD). No se intentó en forma rutinaria el aislamiento de microorganismos anaerobios, hongos, *Leptospira* spp., *Chlamydia* spp., ni de micoplasmas. Además, se obtuvieron fluidos de cavidad abdominal y torácica para detección de anticuerpos específicos contra *N. caninum* (título positivo $\geq 1:25$) por IFI³.

Se recolectaron muestras de múltiples tejidos, las que se fijaron en formol tamponado al 10 % y se procesaron en forma rutinaria para su análisis histopatológico. El diagnóstico de aborto por *N. caninum* se basó en la presencia de lesiones histopatológicas específicas en los fetos (encefalitis multifocal no supurativa, miocarditis, miositis no supurativa, hepatitis, etc.) y la serología fetal, con el eventual empleo de inmunohistoquímica (IHQ). El diagnóstico fue indeterminado cuando no se pudo establecer su etiología por ninguna de las técnicas señaladas.

Para evaluar la asociación entre la presencia de anticuerpos específicos contra *N. caninum* y el estado reproductivo

(con abortos/sin abortos) se calculó el chi cuadrado y la razón de las proporciones (*odds ratio*, OR) con su intervalo de confianza¹⁵. Se realizaron los cálculos con el programa EPIDAT (<http://dxsp.sergas.es>). Valores de OR mayores de 1 indican asociación entre el evento (aborto) y el factor de riesgo (serología). Además se consideraron los resultados del laboratorio para el diagnóstico diferencial en eventos de pérdidas reproductivas.

En ninguno de los dos sucesos hubo seroconversión respecto de vDVB, HVB-1 o *Leptospira* spp. En la tabla 2 se detalla la distribución de la seroreactividad frente a *N. caninum* en los dos grupos de hembras bovinas estudiadas.

El aislamiento viral y bacteriológico a partir de fetos resultó, asimismo, negativo. Los 4 fetos examinados (2 correspondientes a cada suceso) resultaron seropositivos por IFI y mostraron lesiones histopatológicas compatibles con aquellas causadas por *N. caninum*; sin embargo, los tejidos resultaron negativos por IHQ.

Recientemente, las pérdidas económicas causadas por *N. caninum* en rodeos de cría de la pampa húmeda se han estimado en 12 903 440 dólares estadounidenses¹³. Aunque este parásito ha sido involucrado como la quinta causa de abortos en hatos bovinos para producción de carne, con una participación del 6,7 % de los abortos¹³, existe una tendencia a sobredimensionar los resultados serológicos cuando se pretende establecer un diagnóstico de aborto. La presencia de anticuerpos contra *N. caninum* en una hembra bovina

Tabla 2 Distribución de la seroreactividad frente a *N. caninum* en dos hatos bovinos afectados por episodios de aborto

Evento	IFI	Hembras bovinas con abortos (n)	Hembras bovinas sin abortos (n)	OR (IC 95 %)	χ^2 , p
1	(+)	7	12	4,96 (1,23-19,97)	< 0,05
	(-)	4	34		
2	(+)	2	3	0,69 (0,06-7,31)	> 0,05
	(-)	12	27		

IFI: inmunofluorescencia indirecta; OR: *odds ratio*.

que ha abortado no necesariamente significa que esa fue la causa del aborto, y puede ser simplemente un reflejo de la infección presente en el rodeo. La asociación entre el estatus serológico y el aborto ya ha sido descrita por otros autores en relación con el diagnóstico seroepidemiológico poblacional¹⁵.

Cuando se presenta un problema de abortos, se sugiere obtener para su evaluación serológica muestras de sangre no solo de las hembras que han abortado, sino también de aquellas pertenecientes al mismo rodeo que gestan normalmente. La comparación de las proporciones de animales seropositivos en ambos grupos permite inferir la participación de *N. caninum* en los abortos observados, más aún en los eventos epidémicos, como el observado en este trabajo en la localidad de Balcarce. Esta comparación podría ser más exacta si se implementaran técnicas de ELISA, que tienen mayor sensibilidad y especificidad que la IFI, o si se utilizara ELISA de avidéz, que ofrece información adicional, ya que permite diferenciar animales crónicamente infectados (endemia) de aquellos infectados recientemente⁶ (epidemia).

La detección de anticuerpos en fluidos fetales demuestra la infección congénita, pero no es *per se* un elemento suficiente para afirmar que el aborto fue causado por *N. caninum*⁶. Por otro lado y como se describió en el caso registrado en Necochea, la presencia de anticuerpos en fluidos fetales acompañada de lesiones histopatológicas características en solo un feto puede indicar también la ocurrencia de abortos esporádicos por *N. caninum* en hatos bovinos con infección endémica⁶. Es decir, la presencia de anticuerpos específicos ya sea en la madre o en el feto, sumada a la presencia de lesiones histológicas fetales, generan la presunción de que *N. caninum* pudo haber ocasionado ese aborto, pero no el brote de abortos observado en el rodeo. En este sentido, en ganado lechero se ha descrito que 49 vacas con título serológico $\geq 1:200$ parieron con normalidad, aunque terneros congénitamente infectados¹⁴. Al parecer, el evento de Necochea correspondería a la ocurrencia de abortos esporádicos en una situación endémica, porque no existió asociación entre los abortos y el seroestatus. Solo 2 fetos resultaron seropositivos y tuvieron lesiones compatibles, aunque la IHQ resultó negativa. Para confirmar el diagnóstico presuntivo de neosporosis hubiese sido necesario aplicar técnicas moleculares más sensibles en los tejidos fetales⁶.

Aunque en Argentina los rodeos para carne son manejados en condiciones extensivas, los sistemas de producción intensiva podrían aumentar la prevalencia de *N. caninum*. Es interesante mencionar que en el evento donde *N. caninum* fue responsable de la tormenta de abortos (epidemia), los animales eran vaquillonas en su primera gestación y la carga animal era alta, ambos son factores de riesgo para que se manifieste la enfermedad⁶. El posible impacto económico por *N. caninum* en sistemas productivos para carne intensivos no debería desestimarse como factor de riesgo posible¹³.

Para avalar el diagnóstico de neosporosis resulta necesario un diagnóstico serológico integral y diferencial (que en los eventos aquí estudiados fueron dados por la ausencia de seroconversión asociada a enfermedades virales o a *Leptospira* spp.). Los resultados del presente trabajo des-

tañan la importancia del criterio del veterinario clínico frente a la presentación de abortos, circunstancia que exige no solo una adecuada obtención de muestras para realizar un diagnóstico integral y diferencial sobre las posibles causas del aborto, sino también un análisis clínico-epidemiológico criterioso.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Financiación

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Proyecto Nacional del INTA: 1115053.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los integrantes del Grupo de Sanidad Animal por su asistencia técnica y a la Dra. Bibiana Brihuega del Instituto de Patobiología del INTA Castelar por el análisis serológico para leptospirosis. También agradecen la labor de los veterinarios de la actividad privada.

Bibliografía

- Baldone V, Fuchs L, Rojas M, Fort M, Venturini C, Giménez H. Infectious diseases and reproductive status in european hare (*Lepus europaeus*) in La Pampa province (Argentina). Acta Bioquímica Clín Latinoam. 2009;43:633-6.
- Basso W, Venturini L, Venturini MC, Hill DE, Kwok OC, Shen SK, Kwok OC, Shen SK, Dubey JP. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. J Parasitol. 2001;87:612-8.
- Campero CM, Moore DP, Odeón AC, Cipolla AL, Odriozola E. Aetiology of bovine abortion in Argentina. Vet Res Commun. 2003;27:359-69.
- Dubey JP, Buxton D, Wouda W. Gray wolf is a natural definitive hosts for *Neospora caninum*. Int J Parasitol. 2011;181:382-7.
- 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.
- Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. Clin Microbiol Rev. 2007;20:323-67.

7. Fort M. *Neospora caninum*: estudio seroepidemiológico en bovinos de la provincia de La Pampa. Boletín de Extensión de INTA Anguil; 2007.
8. Fuchs L, Baldone V, Rojas M, Fort M, Bedotti D, Venturini M, Giménez H. Prevalencia serológica a toxoplasmosis y neosporosis en el zorro gris pampeano (*Pseudalopex gymnocercus*) en la provincia de La Pampa. Argentina, Sitio Argentino de Producción Animal; 2007. p. 122-8.
9. Gondim LF, McAllister MM, Pitt WC, Zemlicka DE. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int J Parasitol. 2004;34:159-61.
10. King JS, Slapeta J, Jenkins DJ, Al-Qassab SE, Ellis JT, Windsor PA. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int J Parasitol. 2010;40:945-50.
11. Martino PE, Montenegro JL, Preziosi JÁ, Venturini C, Bacigalupe D, Stanchi NO, Bautista EL. Serological survey of selected pathogens of free-ranging foxes in southern Argentina, 1998-2001. Rev Sci Tech. 2004;23:801-6.
12. McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire AM. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int J Parasitol. 1998;28:1473-8.
13. Moore D, Reichel M, Spath E, Campero C. *Neospora caninum* causes severe economic losses in cattle in the humid pampa region of Argentina. Trop Anim Health Prod. 2013;45:1237-41.
14. Moré G, Bacigalupe D, Basso W, Rambeaud M, Beltrame F, Ramirez B, Venturini MC, Venturini L. Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* in dairy cattle. Vet Parasitol. 2009;160:51-4.
15. Thurmond MC, Hietala SK. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. Am J Vet Res. 1997;58:1381-5.