



Laboratorio Azul
Diagnóstico S.A.

NEOSPOROSIS BOVINA: Diagnóstico de Laboratorio

Dr. Gustavo M. Combessies

Revista NOTICIAS Número 64 - Vol XVII - Junio 2014 - ISBN 0327-8158 Revista Laboratorio Azul

La Neosporosis bovina es una enfermedad parasitaria identificada en los últimos años como la principal causa de abortos infecciosos en rodeos de leche y carne. Se puede presentar en forma aguda provocando gran cantidad de abortos en corto tiempo o instalarse en forma crónica con abortos esporádicos. El diagnóstico temprano de la infección, de la forma de presentación así como su distribución en las distintas categorías del establecimiento es el paso inicial para iniciar acciones de control de la enfermedad. Existen varios métodos y estrategias para diagnosticar la Neosporosis bovina. El aislamiento del parásito se puede realizar en meriones, ratones endocriados e inmunodeprimidos, inmunodeficientes y en cultivos celulares. Estos métodos no son de uso práctico para el laboratorio de diagnóstico, se utilizan en laboratorios de investigación. La histopatología realizada sobre órganos como cerebro, médula oblonga, corazón, pulmón, hígado, etc., de fetos abortados contribuye al diagnóstico. La presencia del parásito se sospecha cuando se observan lesiones no supurativas con presencia de células mononucleares en todos los órganos. En el SNC, una de las muestras de elección, se observa meningoencefalitis necrotizante multifocal. La confirmación de las lesiones por la presencia del parásito en los tejidos se puede realizar con la técnica de Inmuno histoquímica (IHQ) que utiliza un suero hiperinmune anti-Nesopora caninum. El diagnóstico serológico es el más frecuentemente utilizado en la práctica diaria para la detección de la enfermedad, el estudio de la seroprevalencia de la infección, su distribución en el rodeo, su asociación con los abortos, fase de infección en la que se encuentran los animales y la forma de transmisión predominante. El conocimiento de las situaciones antes mencionadas es necesario para establecer medidas de control de la Neosporosis bovina. La PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) se utiliza actualmente para la detección y amplificación de material genómico del parásito en tejidos de fetos abortados. Se utilizan los primers TgNN1 y TgNN2 que generan una banda de 250 bp en las muestras positivas. La presencia del ADN de la Neospora caninum confirma la transmisión transplacentaria de la infección y la posible causa del aborto.

Las técnicas serológicas para la detección de anticuerpos disponibles son:

1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI) la cual permite trabajar con distintas diluciones del suero, la misma varía en función de la sensibilidad y especificidad deseada del ensayo. Si bien no existe un acuerdo estandarizado sobre la dilución umbral (punto de corte) de suero a utilizar para el diagnóstico, el uso de la dilución 1/100 para el caso de vacas abortadas, 1/25 para la selección de hembras seronegativas para la reproducción (por ej. receptoras) y 1/10 para la detección de anticuerpos en fluidos fetales para el diagnóstico de transmisión transplacentaria son adecuados.
2. La técnica de ELISA indirecto (enzyme-linked immunoassay ó ensayo inmunoenzimático) es el método de elección ya que presenta mayor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico, es una técnica estandarizada que tiene alta reproducibilidad del resultado debido a que la densidad óptica generada en el pocillo de reacción es leída por un equipo automático que genera un valor

numérico. Esto evita la subjetividad del operador como ocurre en la técnica de IFI. Para la interpretación del ensayo se aplica una fórmula que transforma los datos en un valor IRPC (índice relativo x 100). La misma puede ser utilizada en muestras de suero o leche individual o de tanque.

Interpretación de resultados para el ensayo de Elisa CIVTEST de Hipra.

CUADRO 1 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS EN SUERO INDIVIDUAL						
▪ Valor IRPC			▪ Estado inmune frente a <i>Neospora caninum</i>			
Menor o igual a 6,0			Negativo			
Mayor de 6,0 e inferior o igual a 10,0			Sospechoso			
Mayor de 10,0			Positivo			
Sensibilidad y Especificidad del ensayo de ELISA						
Punto de corte (IRPC)	Se	Sp	PPV	NPV	Prevalencia aparente	Prevalencia verdadera
6,0a	100	97,5	91,3	100,0	24,7	22,7
10,0b	94,7	100	100,0	98,0	23,9	23,9

Se: sensibilidad diagnóstica / Sp: especificidad diagnóstica / PPV: valor predictivo del positivo / NPV: valor predictivo del negativo / a: punto de corte seleccionado para la máxima sensibilidad / b: punto de corte seleccionado para la máxima especificidad.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS EN SUERO INDIVIDUAL

CUADRO 2 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS EN LECHE INDIVIDUAL	
▪ Valor IRPC	▪ Estado Inmune frente a <i>Neospora caninum</i>
Menor o igual a 4,74	Negativo
Mayor de 4,74	Positivo

CUADRO 3 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS EN MUESTRA DE TANQUE DE LECHE	
▪ Valor IRPC	▪ Prevalencia de anticuerpos frente a <i>N. caninum</i> en los animales que aportan leche al tanque (orientativa)
Menor o igual a 3,0	Inferior al 5-10%
Mayor de 3,0	Por encima del 10%

Como complemento de la técnica de Elisa indirecto se puede utilizar el suplemento Avidex el cual nos permite identificar las infecciones agudas y crónicas, al estimar la avidex de las IgG anti-Neospora caninum del suero. La respuesta inmune del animal se hace más específica a medida que pasa el tiempo, debido al repetido contacto del sistema inmune con el antígeno, a esto se lo denomina maduración de la afinidad, por lo tanto la valoración de la afinidad de la respuesta inmune nos permite identificar las infecciones recientes (asociada a la transmisión horizontal) y las infecciones crónicas (asociada a la transmisión vertical). Esto tiene importancia debido a que las consecuencias de una infección vía transmisión horizontal se dan en la gestación presente, con presentación de abortos y TT vertical en determinada cantidad de hembras según su edad de gestación, y no en las gestaciones futuras, por lo tanto esas hembras pueden quedar en el establecimiento ya que presentan muy bajo riesgo de repetir el aborto y de transmitir la infección vía transplacentaria.

Para la interpretación del ensayo se aplica una fórmula que transforma los datos en un valor Rz

Valor Rz	Avidex del suero	Estado de la infección
Menor o igual a 1,0	Alta	Crónica
Mayor de 1,0 y menor de 2,0	Intermedia	
Mayor o igual a 2,0	Baja	Aguda

Test de asociación

Para el análisis de los resultados de la serología de Neospora caninum de vacas abortadas y no abortadas en el momento de la presentación de los abortos en el establecimiento, se utiliza el método estadístico de la tabla de 2x2 que nos permite asociar las variables vaca seropositiva o seronegativa (factor de exposición) con vaca abortada y no abortada (Enfermos/ casos y Sanos/controles). El resultado del método estadístico se expresa en un valor OR (odds ratio = razón de las proporciones) que se interpreta de la siguiente manera:

Valor Rz	Vc Abortada (casos)	Vc No abortada (controles)
Seropositivas	a	b
Seronegativas	c	d

OR = 1: no existe asociación entre las variables analizadas.

OR > 1: existe asociación entre el factor de exposición y la enfermedad.

OR < 1: la variable analizada se asocia con la NO ocurrencia, factor protector.

Finalmente se debe analizar si la asociación es estadísticamente significativa y para esto se estima el intervalo de confianza (IC):

1. Si el límite inferior del IC es mayor que 1, entonces el factor representa un riesgo significativo para la enfermedad.

2. Si el límite superior del IC es inferior a 1, entonces el factor representa una protección significativa para la enfermedad.
3. Si el IC incluye al 1, entonces no podemos concluir que el factor presente un riesgo.

De acuerdo a la formula estadística empleada se interpreta el IC con un 95% de confianza y un $p < 0,05$.

Diagnóstico de Neosporosis en el Laboratorio Azul

Frecuentemente el primer diagnóstico de la enfermedad se realiza ante la presencia de abortos. Las muestras que se utilizan son sueros de vacas abortadas y no abortadas para el diagnóstico serológico y su asociación con el aborto y muestras de fetos abortados para detectar la presencia del parásito y anticuerpos en los fluidos fetales. La cantidad de sueros a enviar depende del número de vacas abortadas, cuanto mayor número de muestras se envíen al laboratorio mayor exactitud tendrá el análisis de la enfermedad. Una vez confirmada la infección se recomienda realizar estudios exhaustivos para conocer el grado de diseminación de la infección y la forma de transmisión de la misma. Esta información permitirá evaluar y tomar las acciones de control adecuadas. La herramienta de diagnóstico recomendada en este caso es el Elisa de avidéz. También se puede determinar la relación de seropositividad entre madres e hijas y estratificación por edades, para lo cual hay que sangrar las dos categorías y realizar el diagnóstico serológico mediante Elisa indirecto u IFI. Una vez establecido el plan de control el diagnóstico se utiliza para seleccionar hembras de reposición negativas, no sólo de animales que ingresen al rodeo sino las terneras nacidas en el establecimiento. Para las últimas se recomienda tomar la muestra de sangre precalostro ó a los 6 meses de edad. Selección de receptoras seronegativas cuando se implementa la transferencia de embriones de hembras de alto valor genético seropositivas.

Resultados de Neosporosis Bovina: Laboratorio Azul

Año 1999-2013 - Diagnóstico serológico Síndrome de la Vaca Vacía 2 <i>(vacas con problemas reproductivos)</i>	
Rodeos analizados	Rodeos con animales positivos
1087	441 (41%)
Hembras analizadas	Hembras positivas
7617	1267 (17%)

Año 2013 - Diagnóstico serológico Síndrome de la Vaca Vacía 2 <i>(vacas con problemas reproductivos)</i>	
Rodeos analizados	Rodeos con animales positivos
139	85 (61%)
Hembras analizadas	Hembras positivas
774	189 (24%)

Diagnóstico serológico de Nc en fluidos fetales			
Año	Fetos	(+)	%
2004	93	12	13
2005	92	7	7,6
2006	114	11	9,6
2007	91	8	8,8
2008	67	4	6
2009	52	4	7,7
2010	68	2	3
2011	83	19	23
2012	104	12	11,5
2013	78	12	15,3
Total:	1248	93	7,5

Para más información, comunicarse con:
 MV Gustavo M. Combessies - gcombessies@laboratorioazul.com.ar