

vacas con historial de problemas reproductivos como abortos entre otros, procedentes de 6 fincas las cuales se encontraban en producción, negativas a Brucella y otros requisitos indispensables para el estudio.

De las 10 fincas lecheras se escogió un número de 6 predios que son: La fortuna, El Campín, Los Castaños, La Mancha, Minarete y La campiña; hatos lecheros en producción con condiciones de manejo y alimentación similares y donde predomina la explotación semiestabulada, con razas dominantes como: Holsteín, Pardo Suizo, Gyr, Cebú y cruces entre ellas, y que además se encuentran involucradas dentro de un Programa de Saneamiento de hatos certificado como libres de Brucelosis, dirigido por el Instituto Colombiano Agropecuario, descartando así una de las patologías reproductivas prevalentes en la zona.

8. FUENTES: La técnica diagnóstica usada fue la prueba de ELISA Reactivo *Neospora Caninum* Antibody Test Kit (Idexx laboratories, Inc Westbrook Maine USA). Esta técnica de ELISA ofrece una especificidad del 98.9% y una sensibilidad del 98.6% para la detección de anticuerpos contra *Neospora Caninum*.

Los muestreos serológicos se realizaron en la Mesa de los Santos en el municipio de Piedecuesta Santander, en las Veredas La Esperanza, Cacaos, El Duende, Mesitas; con altura aprox. es de 1600 metros SNM, con humedad relativa es del 80% y temperatura promedio es de 18 °C.

9. CONTENIDO

9.1 JUSTIFICACIÓN: perfilándose La Neosporosis como la enfermedad de los Bovinos de mayor impacto económico a nivel mundial. Se clasifica como una enfermedad parasitaria emergente que ha sido identificada como agente causal de abortos, muerte de terneros con anomalías neuromusculares, grandes pérdidas por disminución de la producción de leche y carne en las diferentes razas *Bos taurus* y *Bos Indicos*.

Si bien es cierto que las mayores pérdidas económicas se atribuyen al aborto, se ha confirmado que los animales seropositivos bajan su producción de leche hasta en un 4% en comparación con animales seronegativos (*Hernandez et al 2001*).

9.2 ANTECEDENTES Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA:

La historia de neosporosis se inicia en 1984 con un reporte de Bjerkas en Noruega de un caso de encefalitis y miocarditis en caninos, producido por un protozoario. Dubey y col en 1988 propusieron el nombre de *Neospora caninum* y lograron comprobar los postulados de Koch en esta especie.

La dificultad en el diagnóstico para la detección de agentes causales de problemas reproductivos que cursan entre otras con aborto cada vez es mayor. El número de casos en los que es posible determinar el origen del aborto no supera el 20-30% (Hubber Etal, 1973; Kirkbride,1974); resultando un 70% de tipo desconocido; pero incluso cuando es posible detectar la presencia de un agente infeccioso en el feto o sus envolturas se debe ser cauto al valorar su papel en el proceso. El conjunto de agentes causales de problemas reproductivos (aborto) está enmarcado en dos grandes grupos: De origen no infeccioso y los de origen infeccioso.

9.3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS: La Neosporosis es causada por un parásito intracelular, *Neospora caninum*, que recién en 1989 se identificó en los bovinos. En Colombia aún no es posible determinar las pérdidas económicas al no tenerse datos representativos de gran parte de las explotaciones ganaderas del país.

Para realizar la investigación se estudió el *Neospora caninum*, desde su historia, ciclo biológico, patogénea, cuadro clínico, diagnóstico hasta las indicaciones de las medidas a tomar para su control ya que no existe tratamiento conocido.

El ciclo biológico de *N. caninum* no está aún completamente dilucidado. Parte del ciclo lo realiza en células del intestino del perro, donde producen ooquistes que descarga con la materia fecal. Se piensa que la infección en los bovinos se iniciaría como consecuencia de la ingestión de alimentos y agua contaminados por esos ooquistes.

En vacas gestantes el parásito se localizaría en el útero y la placenta e infectaría al feto (transmisión vertical). El perro se infecta cuando ingiere los fetos, placentas u órganos de bovinos y de otras especies infectados con *N. caninum*.

El único signo clínico observado en las vacas es el aborto, que generalmente ocurre desde los 3 meses de gestación hasta su término, aunque es posible que también ocurran muertes embrionarias. La fertilidad no se ve afectada después del aborto dado que generalmente no deja secuelas. Del 3 al 4 % de las vacas puede abortar durante dos gestaciones consecutivas.

Los terneros hijos de vacas infectadas es posible que sean normales o nacer infectados muertos, enfermos o clínicamente sanos con parálisis progresiva de las extremidades. El diagnóstico de la infección por *N. caninum* en las vacas, se basa en el análisis del suero sanguíneo para detectar la presencia de anticuerpos específicos.

En los casos de aborto, la presencia de anticuerpos en la vaca no indica que *Neospora caninum* haya sido responsable del mismo. Sin embargo, puede considerarse como posible causa cuando se encuentran elevados niveles de anticuerpos en los sueros de las madres o de los fetos abortados después de los 5 meses de edad.

Es fundamental para el control de la Neosporosis, el impedir que los perros estén en contacto con los animales y proceder a la destrucción sistemática de fetos abortados, placentas o terneros muertos evitando la infestación del huésped definitivo.

En nuestra región y más específicamente de la Mesa de los Santos del municipio de Piedecuesta, Santander, se realizó un estudio a 184 vacas lecheras de razas como Holstein, Pardo suizo, Gyr, Cebú y cruces entre ellas, que se encontraban en producción y que manifestaron problemas reproductivos, usando la prueba de ELISA como diagnóstica, encontrando resultados con un porcentaje de seropositividad del 32% (equivalente a 58 vacas), dentro del cual 43% (16 vacas) tienen antecedentes de 1 ó más abortos, indicando la presencia del parásito y el posible agente etiológico causante de abortos en los hatos.

9.4 METODOLOGÍA: La recolección de la información fue facilitada por la oficina de Sanidad Animal del ICA donde 20 fincas se encuentran registradas ante esta entidad aportando la ubicación del predio y el nombre del propietario y de los cuales 10 son hatos lecheros con una población aproximada de 300 animales.

Muestra: Ciento ochenta y cuatro vacas que reunían los requisitos necesarios para el estudio

Unidad de análisis: Hembras en edad reproductiva

Universo: Hatos lecheros ubicados en la Mesa de los Santos del municipio de Piedecuesta Santander

Delimitación geográfica: Por el norte con Floridablanca y Tona, por el oriente con Santa Bárbara, por el sur con los municipios de Cepitá, Los Santos y Aratoca, y por el occidente con Girón.

Posición geográfica: Latitud Norte: 6° 59' Longitud O: 73° 13'

Población: Total de la población 72.631

El proceso de recolección de la información se efectuó por medio de encuestas y observación directa en cada uno de los hatos lecheros

Fuentes de datos: Registro único de vacunación del la oficina de Sanidad Animal del Instituto Colombiano Agropecuario ICA

Para la recolección de las muestras y realización de la ELISA se utilizó el siguiente material:

- ✓ 200 tubos para vacutainer tapa roja x 7 ml
- ✓ 200 agujas para vacutainer de 1.1/2"
- ✓ 500 tubos de reacción (viales – Plastibrand) x 1.5 ml
- ✓ 1 galón de solución Yodada
- ✓ 2 guías para vacutainer
- ✓ 2 neveras de Icopor

Al momento de toma de las muestras, los tubos para vacutainer fueron marcados con el número correspondiente al animal y se llenó el formato de toma de serologías diseñado para nuestro registro. (Ver anexo B). Las muestras fueron debidamente refrigeradas hasta el momento de separación y centrifugado para recolección posterior de sueros en los viales. Cada vial fue enumerado con la asignatura correspondiente de la muestra, y clasificados por procedencia. Mientras se realizaba la prueba de laboratorio los sueros fueron puestos en congelación para luego llevarlos a temperatura ambiente y continuar el proceso.

MATERIALES DE LABORATORIO

Para la realización de la prueba se adquirió el Kit de ELISA conformado por:

- ✓ 2 Placas recubiertas con antígeno de Neospora.
- ✓ Conjugado antibovino: HRPO. 30 ml (Peroxidasa de rábano)
- ✓ Control Positivo de Neospora. (Antí Neospora bovino en tampón con estabilizadores proteicos. Con azida de sodio como conservante.

- ✓ Control Negativo de Neospora. Suero bovino no reactivo frente a Neospora en tampón fosfato con estabilizantes proteicos. Con azida de sodio como conservante.
- ✓ Diluyente para la muestra. Tampones con estabilizadores proteicos. Con azida de sodio como conservante.
- ✓ Concentrado para lavado. Lavado de fosfato/tween 10x5.
- ✓ Contiene Gentamicina como conservante.
- ✓ Substrato TMB (Peroxido de Hidrógeno)
- ✓ Solución de Interrupción (Cromógeno tetrametilbecidina)

DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Preparación de las muestras.

Se diluyeron muestras a una razón de 1:100 con el diluyente para muestra. (5*l de muestra con 500 *l de diluyente para muestra. (Tampones con estabilizadores proteicos, con azida de sodio como conservante)

Preparación de la solución de lavado

El concentrado de lavado se diluyó a una razón de 1:10 con agua destilada y desionizada (30 ml de concentrado y 270 ml de agua por cada placa analizada).

Se manejó una solución debidamente homogeneizada con movimientos circulares para asegurarnos de la disolución de las sales precipitadas y a temperatura ambiente.

Desarrollo del test

- ✓ Los reactivos y sueros deben estar a temperatura ambiente y homogenizados con movimientos circulares.
- ✓ Se tomó las placas recubiertas con antígeno y registró la posición de las muestras en la hoja de trabajo como patrón de ubicación del suero. (ver anexo C)
- ✓ Se vertieron 100 *l de control negativo sin diluir en los pozos A1 y A2.
- ✓ Igualmente vertimos 100 *l de control positivo sin diluir en los pozos A3 y A4.
- ✓ Se sirvieron 100 □l de muestra diluida en los pozos apropiados o restantes.
- ✓ Se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- ✓ Se aspiró el líquido de todos los pozos y desechó en un recipiente.
- ✓ Se lavaron los pozos 4 veces con aproximadamente 300 *l de solución de lavado tamponada con fosfato. Aspiramos el líquido de los pozos después de cada lavado. Sacudimos la placa.
- ✓ Se vertió 100 *l de conjugado antibovino: HRPO en cada pozo.
- ✓ Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.

- ✓ Se aspiró el líquido y se procedió a lavar los pozos 4 veces con líquido de lavado.
- ✓ Se agregó 100 *l de solución de sustrato TMB en cada pozo de la placa.
- ✓ Incubamos a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- ✓ Se vertió 100 *l de solución de interrupción en cada pozo de la placa.
- ✓ Se preparó en blanco el espectrofotómetro para recibir la placa.
- ✓ Se midió y registro la absorbancia a 650 nm. Se leyó los resultados.
- ✓ Para obtención de los resultados se tuvo en cuenta que las muestras de sueros con cocientes s/p menores que 0,50 son Negativas hacia los anticuerpos contra Neospora y los coeficiente s/p mayores o iguales a 0.50 se clasifican como Positivos hacia los anticuerpos contra Neospora.

9.6 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- ✓ Por medio de este estudio se pudo establecer un 31.5% de presencia de animales reactivos positivos a Neospora *Caninum* en los hatos lecheros evaluados.
- ✓ Debemos considerar como un factor de riesgo en la diseminación de la enfermedad, la movilización de animales seropositivos introducidos al hato para mejoramiento genético ó como hembras de reemplazo.
- ✓ El diagnostico etiológico en la casuística de abortos y la implementación de técnicas diagnosticas rápidas y oportunas nos permitirán mantener la información actualizada sobre el nivel sanitario de nuestros hatos ganaderos importante herramienta en la prevención y control de enfermedades.
- ✓ Se deben realizar estudios acerca del impacto económico de esta patología (Neosporosis Bovina) en las zonas ganaderas de la región.
- ✓ Este estudio abre una importante perspectiva de investigación en la casuística de abortos haciendo énfasis en el diagnóstico etiológico, lo cual implica realizar un trabajo más arduo en las técnicas de aislamiento viral, inmunohistoquímico y serológico, pero también obliga a la implementación de estudios de corte epidemiológicos en esta área.
- ✓ La Neosporosis debe ser incluida dentro de las patologías de la reproducción de importancia sanitaria y económica.
- ✓ Considerar el control de la circulación de perros en las fincas debido a la importancia que tienen como fuente de diseminación de la enfermedad.
- ✓ Al existir reportes sobre seropositividad en humanos a Neospora *caninum* detectados por inmunofluorescencia indirecta, se requiere de estudios

específicos para determinar el significado de esta exposición, la posible infección y diagnósticos herrados con agentes etiológicos como el *Toxoplasma gondii*.

- ✓ Los porcentajes de abortos entre animales positivos y negativos son diferentes estadísticamente; por consiguiente la presencia de la enfermedad esta relacionada con el alto porcentaje de abortos causados por la Neosporosis bovina, en comparación con los animales que no la padecen.

RECOMENDACIONES

- ✓ Puesto que no existe tratamiento conocido para la enfermedad, el control se basa en evitar la transmisión y eliminar a los animales infectados.
- ✓ La eliminación gradual de animales seropositivos, iniciando por las vacas que ya han abortado anteriormente.

Control de la transmisión vertical:

- ✓ Control serológico de las hembras de reemplazo. Para hembras de reemplazo sólo descendencia de hembras seronegativas.
- ✓ Si se emplea el transplante de embriones comprobar que las receptoras son seronegativas.

Control de la transmisión horizontal:

- ✓ Evitar el acceso de perros y otros carnívoros a los recintos de ganado especialmente almacenes de alimento para evitar la contaminación fecal.
- ✓ Eliminación rápida de placentas, fetos abortados y animales muertos para evitando así la ingestión por los carnívoros.
- ✓ Desinfección de los materiales contaminados por el aborto.
- ✓ Existe una gran expectativa acerca del resultado que arrojen las pruebas de campo que actualmente realiza la división de insumos pecuarios del ICA en su laboratorio (LANIP) sobre la eficacia de la vacuna *Neoguard* del laboratorio Intervet preparada a base de taquizoítos inactivados y recomendada su aplicación en animales entre los 45 y 75 días de gestación como medida de prevención y control de la enfermedad.

10. LUGAR: Hatos lecheros ubicados en la Mesa de los Santos, municipio de Piedecuesta y Laboratorio Clínico ICA.