

Determinación de anticuerpos anti *Neospora caninum* en vacas de la provincia de Sugamuxi, Colombia

Verifying presence of anti *Neospora caninum* antibodies in cows in Sugamuxi province, Colombia

Martín Orlando Pulido Medellín^a, Adriana María Díaz Anaya^a, Diego José García^a, Roy José Andrade Becerra^a

RESUMEN

El objetivo fue determinar la presencia de anticuerpos anti *Neospora caninum* en vacas mediante la técnica de ELISA indirecta en el valle de Sugamuxi, Colombia, identificando las variables que influyen en la susceptibilidad de los bovinos al protozoo. Se tomaron muestras de sangre a 400 hembras bovinas y fueron evaluadas por medio de ELISA indirecta. Se determinó una seroprevalencia de *Neospora caninum* del 57.5 %; no se halló relación entre las hembras en gestación y la presencia del parásito; para la presencia de celo se encontró que el 27.7 % de vacas infectadas por el parásito presentaron repetición de éste. La presencia del parásito fue del 100 % en hembras con historial de cinco partos. Los resultados de este estudio muestran la presencia de anticuerpos anti *Neospora caninum* en los animales pertenecientes a fincas lecheras de la provincia de Sugamuxi, y la alta prevalencia muestra el riesgo potencial para este tipo de explotaciones.

PALABRAS CLAVE: Aborto, Bovino, *Neospora*, ELISA indirecta.

ABSTRACT

The purpose of the present study was establishing the presence of anti *Neospora caninum* antibodies in cows in the province of Sugamuxi, Colombia, through indirect ELISA and identifying variables which influence susceptibility of bovines to this protozoan. Blood samples from 400 females were evaluated through indirect ELISA test. A 57.5 % *Neospora caninum* seroprevalence was found. No relationship between pregnancy and presence of parasite was found. Moreover, 27.7 % of infested cows repeated estrus. A 100 % presence of this parasite was determined in females with a history of five parturitions. Results of this study confirm presence of anti *Neospora caninum* antibodies in dairy farm animals in the province of Sugamuxi, and this points out potential risks for this type of farms.

KEY WORDS: Abortion, bovine cattle, *Neospora*, indirect ELISA.

Neospora caninum, causante de la enfermedad denominada neosporosis es un protozoo intracelular obligado perteneciente al phylum Apicomplexa, que ocasiona importantes alteraciones reproductivas como abortos, fetos momificados o expulsados con un grado avanzado de autólisis y reabsorción embrionaria⁽¹⁾. Los terneros infectados en el

Neospora caninum is an obliged intracellular protozoa of the Phylum Apicomplexa which causes neosporosis, an illness characterized by abortions, embryo reabsorption, and mummified or expelled fetuses showing pronounced autolysis⁽¹⁾. Calves infested in uterus can show neurological alterations and low birth weight. This parasite

Recibido el 13 de marzo de 2013. Aceptado el 26 abril de 2013.

^a Grupo de Investigación GIDIMEVETZ, Programa de MVZ, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja, Colombia. mopm1@hotmail.com. Correspondencia al primer autor.

útero pueden tener signos neurológicos y bajo peso al nacimiento, el parásito se transmite a través de la placenta y la mayoría de los becerros infectados en el útero nacen clínicamente sanos⁽²⁾.

La transmisión vertical de madres seropositivas a sus fetos juega un papel muy importante en la epidemiología de la neosporosis⁽³⁾, mientras que la infección post-natal es posible por la ingestión de ooquistes eliminados en el excremento del hospedero definitivo, principalmente el perro, y estos llegan a infectarse por la ingestión de tejidos contaminados como una placenta o un feto abortado⁽⁴⁾.

Algunos estudios sobre neosporosis bovina en Colombia mediante el uso de ELISA indirecta, han mostrado la presencia del parásito en los hatos lecheros con prevalencias que van del 10.2 al 89.0 %, relacionando ésta con la aparición de abortos^(5,6,7). Se considera que la provincia de Sugamuxi es parte del cordón lechero de importancia en Colombia, donde se ha registrado la presencia de *Neospora caninum*, asociándolo a grandes pérdidas económicas en la ganadería lechera como consecuencia de los abortos, disminución de la producción de leche e incremento del porcentaje de desechos por esta causa⁽⁸⁾.

Por lo anterior, se determinó la presencia de *Neospora caninum* en vacas mediante la técnica de ELISA en el valle de Sugamuxi, Colombia, identificando posibles variables que influyen en la susceptibilidad de los bovinos al protozoo.

Sugamuxi, está ubicada en el noroeste del país a 2,500 msnm, con temperatura promedio de 17 °C, y clima en su mayoría frío y húmedo. Los animales incluidos en el estudio fueron bovinos pertenecientes a hatos lecheros en producción, pertenecientes al programa hatos libres de brucelosis, y que a su vez hacían parte del inventario ganadero de la provincia.

El inventario bovino de hembras en la provincia de Sugamuxi es de 75,174 animales, de las cuales 400 se incluyeron en el estudio; la

is transmitted through the placenta and most calves infested in uterus are born clinically healthy⁽²⁾.

Vertical transmission from infested females to their fetuses plays an important part in neosporosis epidemiology⁽³⁾, while postpartum infection is possible through intake of oocytes eliminated in excreta of final hosts, mostly dogs, who get infected through both infested placenta and aborted fetus intake.

Some studies on bovine neosporosis in Colombia using indirect ELISA have detected parasite prevalence between 10.2 and 89.0 % in dairy herds, linked to abortions^(5,6,7). Sugamuxi province is an important section of Colombia's milk belt, and presence of *Neospora caninum* is associated to heavy economic losses due to abortions, decrease in milk output and increase of culls⁽⁸⁾.

Owing to the above, *Neospora caninum* presence was determined through indirect ELISA in the valley of Sugamuxi, and identifying possible variables which influence susceptibility to this protozoan in bovines, too.

Sugamuxi valley is located in NW Colombia, at 2,500 masl, 17 °C average annual temperature, having cool, humid climate. Animals participating in the present study were bovines from dairy herds that participate in the Brucellosis Free Herd program and are included in the animal stock of Sugamuxi province.

The female bovine inventory of Sugamuxi province totals 75,174 head, of which 400 were included in the present study. This sample was estimated taking into account a 95 % confidence level and a 4.89 confidence interval. Blood samples were collected from the coccygeal vein and were duly identified and refrigerated up to their arrival at the Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia laboratory. Samples were then centrifuged and the resulting serum was tested through indirect ELISA using a BioK 192 commercial test kit for *Neospora caninum*

muestra se calculó teniendo en cuenta un nivel de confianza del 95% e intervalo de confianza de 4.89. Se colectaron muestras de sangre por venopunción coccígea, las cuales fueron rotuladas y refrigeradas hasta su llegada al laboratorio clínico de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Luego de obtener los sueros por medio de centrifugación, estos fueron sometidos a la prueba de ELISA indirecta utilizando el kit comercial Bio K 192 para *Neospora caninum* (Bio-X Diagnostics, Bélgica), el cual presentaba una sensibilidad y especificidad de 98 y 96 % respectivamente.

Se diseñó una encuesta por medio de la cual se tomaron datos como edad, gestación y número de celos, con el fin de identificar las variables más importantes en la presentación de *Neospora caninum*. El estudio fue de tipo descriptivo, de corte transversal; el diseño del muestreo fue aleatorio simple y los datos se analizaron por medio del paquete estadístico SPSS 17 para obtener la razón de momios (valor de OR).

En la población de estudio, se encontró una seroprevalencia general del 57.5 % (230/400) de *Neospora caninum*. Se determinó que existía diferencia significativa ($P=0.0027$) entre el número de hembras infectadas y las que no, es decir, la mayoría de las hembras presentaban infección por el parásito. (Cuadro 1).

Se determinó la posible relación entre la presencia de anticuerpos anti *Neospora caninum*

(Bio-X Diagnostica, Belgium), with 98 and 96 % sensibility and specificity, respectively.

A survey was carried out in which age, gestation number and number of estrus was recorded, in order to identify the most important variables for *Neospora caninum* presence. The present study is descriptive, transversal with a simple randomized experimental design. Data were analyzed by means of the SPSS 17 statistical software for obtaining the odds ratio (OR value).

A 57.5 % (230/400) *Neospora caninum* seroprevalence was found. A significant difference ($P=0.027$) between pregnant and non-pregnant females was found, too, that is to say, a majority was infested by the parasite (Table 1).

A possible relationship between presence of anti *Neospora caninum* antibodies and pregnant females was explored, but no significant difference was found ($P=0.1524$), that is to say that the same proportion of antibodies is present in both pregnant and non-pregnant female groups. Estrus presence was probed in both positive and negative cows, and 27.7 % (64/230) of infested animals presented repeat estrus ($P=0.0064$). Within the variables analyzed which could present possible relationships to parasite infestation, parity number was one, and in this case a 100 % presence was detected in cows with 5 or more births ($P=0.0634$).

Negative effects due to *Neospora caninum* in herds are widely known at present, so research

Cuadro 1. Factores asociados a la presencia de anticuerpos anti *Neospora caninum* en vacas de la provincia de Sugamuxi, Colombia

Table 1. Factors associated to presence of anti *Neospora caninum* antibodies in cows in Sagamuxi province, Colombia

| VARIABLES | Chi ² | P | OR | IC low limit | IC high limit |
|---|------------------|--------|---------|--------------|---------------|
| <i>Neospora caninum</i> prevalence | 9 | 0,0027 | - | - | - |
| Gestation (absence-presence) – <i>Neospora caninum</i> (presence-absence) | 2,0484 | 0,1524 | 1,36443 | 0,9165 | 2,0311 |
| Estrus (absence-presence) – <i>Neospora caninum</i> (presence-absence) | 7,4446 | 0,0064 | 0,5552 | 0,3687 | 0,8359 |
| Parities (absence-presence) – <i>Neospora caninum</i> (presence-absence) | 0,0143 | 0,9049 | 1,1595 | 0,0690 | 19,4919 |
| Parities (0, 1, 2, 3, 4, 5) - <i>Neospora caninum</i> (presence-absence) | 11,9365 | 0,0634 | - | - | - |

P=Probability; OR= Odds ratio; IC= 95 % Confidence interval.

y las hembras que se encontraban en gestación, pero no se halló relación entre estas dos ($P=0.1524$), es decir, la presencia de anticuerpos está en igual proporción tanto en el grupo de hembras vacías como en el grupo de gestantes. Se analizó la presencia de celo tanto en vacas positivas como negativas, y se encontró que el 27.7 % (64/230) de vacas infectadas por el parásito presentaron repetición de celo ($P=0.0064$). Dentro de las variables medidas que podrían tener alguna relación con la infección del parásito estuvo el número de partos; para este caso hubo presencia del parásito en el 100 % (14/14) de las hembras con historial de cinco partos ($P=0.0634$).

Se conocen en la actualidad los efectos negativos que implica la presencia de *Neospora caninum* en los hatos, motivo por el cual se han realizado investigaciones alrededor del mundo acerca de la presencia de éste y su impacto^(2,3,9). En Colombia se conocen pocos estudios acerca de la presencia de dicho parásito en hatos lecheros^(6,7,10), mientras que en el mundo diversos estudios realizados registran prevalencias que van desde 2.7 a 44.0 %^(7,11,12).

En el presente estudio se encontró una seroprevalencia del 57.5 % mediante la utilización de ELISA indirecta, siendo ésta una cifra importante con respecto a otros registros hechos en Colombia^(5,10), en los cuales se observaron valores del 10.2 y 34.6 %, respectivamente. Un factor que puede influir en la presentación de la enfermedad es la contaminación transplacentaria en los bovinos, motivo por el cual se transmite la infección a la descendencia, el no descarte de los animales positivos con enfermedad postnatal perpetúa la presencia del parásito en los hatos, convirtiendo fincas enteras en seropositivas a *Neospora caninum*^(3,13).

La importancia de la prevalencia encontrada en la provincia de Sugamuxi durante este estudio radica en el hecho de que a mayor seropositividad de animales en el hato, mayor serán los niveles de transmisión vertical, tal

on its presence and impact has been carried out in different countries^(2,3,9). In Colombia few papers on *Neospora caninum* presence in dairy herds have been published^(6,7,10), while worldwide several studies report 2.7 to 44.0 % seroprevalence^(7,11,12).

As already specified, a 57.5 % seroprevalence was found in the present study using indirect ELISA, higher than in other studies performed in Colombia^(5,10), which report 10.2 and 34.6 % seroprevalence, respectively. A factor which could influence neosporosis presence is placenta contamination in bovines, through which infestation is transmitted to progeny, so non-culling of animals positive to postnatal illness perpetuates presence of the parasite in herds, thus whole farms become seropositive to *Neospora caninum*^(3,13).

The importance of the prevalence degree found in Sagamuxi province in the present study lies in the fact that with greater seroprevalence in herds, greater shall be the levels of vertical transmission, as shown in a study carried out in Brazil, where a high correlation between vertical transmission rate and seroprevalence in animals was found⁽¹³⁾. In a study performed recently in southern Australia, a 2.5 % seroprevalence was found⁽¹¹⁾. This is considerably lower than those reported in other papers published in that country and to those found in the present study, most probably due to regional differences in Australia relative to parasite distribution, climate and herd management, factors which influence parasite presence^(14,15).

An important feature is parasite presence and its relationship to pregnant females. *Neospora caninum* can be found in both pregnant and non-pregnant females and at any time during gestation. This can be due to the fact that most infested cows display normal gestations, however, cows positive to *Neospora caninum* are more prone to abortions, especially if infested in the first third of the gestation period⁽¹⁶⁾. Most possibly this variable does not show a direct relationship to parasite presence,

como fue demostrado en un estudio hecho en Brasil, donde se describió un alto grado de correlación entre la tasa de transmisión vertical y la prevalencia de animales seropositivos⁽¹³⁾. Recientemente un estudio realizado en el sur de Australia encontró una prevalencia del 2.5 %⁽¹¹⁾; este porcentaje fue bajo con respecto a otros reportados en el mismo país, y a los resultados de este trabajo, debido posiblemente a las diferencias regionales en la distribución del parásito, contrastes climáticos y diferente manejo en los sistemas de producción, factores relevantes para la presencia del parásito^(14,15).

Un aspecto importante fue la presencia del parásito y su relación con vacas en gestación; se encontró que *Neospora caninum* puede estar presente en una hembra vacía o gestante, y no hubo relación con el estado de gestación. Lo anterior podría deberse a que la mayoría de vacas infectadas tienen gestaciones normales; sin embargo las vacas positivas tienen mayor probabilidad de abortar que aquellas negativas, especialmente si se infectan en el primer tercio de la gestación⁽¹⁶⁾. Es posible que esta variable no posea relación directa con la presencia del parásito, pero sí tiene relación con el principal evento reportado en vacas infectadas, que es el aborto^(2,17).

Se encontró que el 27.7 % de vacas seropositivas presentaron repetición de celo, siendo éste un efecto adverso importante en la producción de los hatos, debido al mayor número de inseminaciones necesarias para llegar a una gestación y por ende baja en la producción de leche^(18,19). De forma similar en Montería, Colombia⁽⁵⁾, se encontró una posible asociación en la repetición de celos debido a que representa un evento común en las explotaciones, y en dicho estudio especialmente las vacas seropositivas al protozooario presentaron esta alteración.

Se determinó la presencia de anticuerpos anti *Neospora caninum* en vacas con diferente número de partos; sin embargo, se evidenció

but undoubtedly is positively related to the main reported event in infested cows, abortion^(2,17).

As mentioned before, 27.7 % of seropositive cows showed repeat estrus, with negative effect on herd productivity, due to the greater number of inseminations necessary for a successful conception, therefore depressing milk output^(18,19). In similar fashion, in Montería, Córdoba, Colombia⁽⁵⁾ a possible association to estrus repeat was found because it is a common event in dairy farms, and in that same study, seropositive cows to the protozoan presented this ailment.

Anti *Neospora caninum* antibodies were found in cows with different number of parities, but a higher rate was detected in cows with a history of 5 or more successful gestations (14/14). These results are most possibly due to the fact that infested animals are considered as positive throughout their whole lifetime, persisting with high *Neospora caninum* antibody titles for many years^(20,21). Besides this, recent exposition to the parasite is evidenced in seroconversion and in an increase in antibody count, but this does not necessarily result in an increase in the abortion rate. This supports the hypothesis that besides parasite infestation, other factors can increase abortion risk, such as bacteria (*Leptospira* spp, *Campylobacter* spp) and viral infections (IBR, DVB)⁽²²⁾.

Results of the present study confirm the presence of anti *Neospora caninum* antibodies in Sagamuxi province dairy farms. The high seroprevalence found corroborates the potential risk for these farms, and due to this, it was deemed necessary to identify risk factors, and through assessment of the different variables it was possible to get hold of data of great usefulness for different production systems. However, it is not possible that the sole presence of anti *Neospora caninum* antibodies is the only cause of reproductive problems.

End of english version

una mayor presentación de anticuerpos en hembras con historial de cinco partos (14/14). Estos resultados se deben posiblemente a que los animales infectados son considerados positivos toda su vida, persistiendo también títulos altos de anticuerpos contra *Neospora caninum* durante años, e incluso durante toda su vida^(20,21). Además de esto, recientemente la exposición al parásito se puede evidenciar en la seroconversión y el aumento de anticuerpos, pero esto no necesariamente resulta en un aumento de la tasa de abortos. Esto apoya la hipótesis de que además de la infección, existen otros factores que pueden influir en el riesgo de aborto como bacterias (*Leptospira* spp, *Campylobacter* spp) y enfermedades virales (IBR, DVB)⁽²²⁾.

Los resultados de este estudio mostraron la presencia de anticuerpos anti *Neospora caninum* en los animales pertenecientes a fincas lecheras de la provincia de Sugamuxi. La alta prevalencia muestra el riesgo potencial para este tipo de explotaciones; por este motivo fue necesaria la identificación de factores de riesgo, y mediante la evaluación de las diferentes variables se logró obtener información de gran utilidad para los sistemas de explotación; sin embargo, no es posible indicar que la sola presencia de anticuerpos contra este parásito, representen la causa de los problemas reproductivos.

LITERATURA CITADA

- Escalona J, García F, Mosquera O, Vargas F, Corro A. Factores de riesgo asociados a la prevalencia de Neosporosis bovina en el municipio Bolívar del estado Yaracuy, Venezuela. *Zoot Trop* 2010;28(2):201-211.
- Dubey JP, Schares G. Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet Parasitol* 2006;140:1-34.
- Kul O, Kabakci N, Yıldız K, O' Cal N, Kalender H, İlkme N. *Neospora caninum* associated with epidemic abortions in dairy cattle: The first clinical neosporosis report in Turkey. *Vet Parasitol* 2009;159:69-72.
- Hall CA, Reichel MP, Ellis JT. Neospora abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. *Vet Parasitol* 2005;128:231-241.
- Oviedo T, Betancur C, Mestra A, González M; Reza L, Calonge K. Estudio serológico sobre neosporosis en bovinos con problemas reproductivos en Montería, Córdoba, Colombia. *Rev MVZ Córdoba* 2007;12(1):929-933.
- Cedeño D, Benavides B. Seroprevalence and risk factors associated to *Neospora caninum* in dairy cattle herds in the municipality of Pasto, Colombia. *Rev MVZ Córdoba* 2013;18(1):3311-3316.
- Peña LF, Araujo AV, Rubio DE, Mojica CP, Falquez JJ, Avendaño KE. Estudio serológico de DVB, IBR y *Neospora* en bovinos de la microrregión del Valle del Cesar. *Rev Col Microb Trop* 2012;2(2):35-40.
- Obando C, Bracamonte M, Montoya A, Cadenas V. *Neospora caninum* en un rebaño lechero y su asociación con el aborto. *Rev cient FCV-LUZ* 2010;20(3):235-239.
- Ghalmi F, China, B, Ghalmi A, Hammitouche D, Losson B. Study of the risk factors associated with *Neospora caninum* seroprevalence in Algerian cattle populations. *Res Vet Sci* 2012;93:655-661.
- López G, Restrepo B, Restrepo M, Lotero M, Murillo V, Chica A, Cano J, Giraldo J. Estudio para evidenciar la presencia de *Neospora caninum* en bovinos de la hacienda San Pedro en el municipio de Fredonia. *Rev MVZ CES* 2007;2(1):7-20.
- Nasir A, Lanyon S, Schares G, Anderson M, Reichel M. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Besnoitia besnoiti* in South Australian beef and dairy cattle. *Vet Parasitol* 2012;186:480-485.
- Puray N, Chávez A, Casas E, Falcón N, Casas G. Prevalencia de *Neospora caninum* en bovinos de una empresa ganadera de la sierra central del Perú. *Rev Inv Vet Perú* 2008;17(2):189-194.
- Sbruzzi JM, Amaku M, Urias-dos-Santos AJ, Gennari SM. A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on three dairy farms in Brazil. *Vet Parasitol* 2012;187:553-557.
- Frossling J, Nodtvedt A, Lindberg A, Bjorkman C. Spatial analysis of *Neospora caninum* distribution in dairy cattle from Sweden. *Geospatial Health* 2008;3:39-45.
- Ghanem M, Suzuki T, Akita M, Nishibori M. *Neospora caninum* and complex vertebral malformation as possible causes of bovine fetal mummification. *Can Vet J* 2009;50:389-392.
- Goodswen S, Kennedy P, Ellis J. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present. *Infect Genet Evol* 2013;13:133-150.
- Georgieva D, Prelezov P, Koinarski V. *Neospora caninum* and neosporosis in animals. A review. *Bulg J Vet Med* 2006;9:1-26.
- García-Vázquez Z, Rosario-Cruz R, Ramos-Aragón A, Cruz-Vázquez C, Mapes-Sánchez G. *Neospora caninum* seropositivity and association with abortions in dairy cows in Mexico. *Vet Parasitol* 2005;134:61-65.
- Quevedo V, Chavez V, Rivera G. Neosporosis en bovinos lecheros en dos distritos de la provincia de Chachapoyas. *Rev Invest Vet Perú* 2003;14(1):33-37.
- Pabon M, Lopez-Gatius F, Garcia-Ispuerto I, Bech-Sabat G, Nogareda C, Almeria S. Chronic *Neospora caninum* infection and repeat abortion in dairy cows: A 3-year study. *Vet Parasitol* 2007;147:40-46.
- Reiterova K, Sipilovska S, Antolova D, Dubinsky P. *Neospora caninum*, potential cause of abortions in dairy cows: The current serological follow-up in Slovakia. *Vet Parasitol* 2009;159:1-6.
- Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora L. Epidemiology and control of Neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Rev* 2007;323-367.