

Frecuencia de anticuerpos anti-*Neospora caninum* en ovinos del departamento de Córdoba, Colombia

Frequency of antibodies anti-*Neospora caninum* in sheep from the department of Cordoba, Colombia

Joaquin Patarroyo S,^{1*} Ph.D, Marlene Vargas V,² Ph.D, José Cardona Á,^{3,5} M.Sc, Rafael Blanco M,⁴ MVZ, Víctor Gomez L,^{4,5} MVZ.

¹Universidad federal de Viçosa, Departamento de Medicina Veterinaria, Laboratório de biologia, controle de hematozoários e vetores/Bioagro, Viçosa, Brasil. ²Universidad Federal de Viçosa, Departamento de Medicina Veterinaria, Viçosa, Brasil. ³Universidad de Córdoba, Facultad de Medicina Veterinaria, Grupo de Investigaciones en Medicina de Grandes Animales (MEGA), Montería, Colombia. ⁴Universidad Federal de Viçosa, Departamento de Medicina Veterinaria, Laboratório de Biologia, Controle de hematozoários e vetores/Bioagro, Viçosa, Brasil. ⁵Bolsista do Programa Estudantes-Convênio de Pós-Graduação – PEC-PG, da CAPES/CNPq – Brasil. *Correspondencia: jpatarro@ufv.br

Recibido: Enero de 2013; Aceptado: Septiembre de 2013.

RESUMEN

Objetivo. Evaluar la frecuencia de anticuerpos anti-*N. caninum* en dos rebaños de ovinos del departamento de Córdoba-Colombia. **Materiales y métodos.** El estudio fue realizado en el departamento de Córdoba (Colombia) en dos explotaciones de ovinos que presentaron antecedentes de abortos y muerte de animales adultos. Se muestrearon 28 hembras adultas de pelo criollo (Camura), escogidas por muestreo aleatorio simple. Un péptido recombinante de *Neospora caninum* (NcGRA1) fue utilizado para el diagnóstico por DOT-ELISA y el suero fue diluido en 1:200. **Resultados.** Este estudio reporta por primera vez para el departamento y para el país la presencia de anticuerpos anti-*N. caninum* en el 78.6% (22/28) de los ovinos muestreados. **Conclusiones.** Estos resultados confirman la infección por *Neospora caninum* en ovinos y la necesidad de nuevos estudios que asocian la presencia del parásito con manifestaciones clínicas en diferentes regiones del país.

Palabras clave: Aborto, ELISA, parásito (*Fuente: MeSH*).

ABSTRACT

Objective. To evaluate the frequency of anti-*N. Caninum* antibodies in two sheep herds in the department of Córdoba, Colombia. **Materials and methods.** The study was performed in the department of Córdoba (Colombia) in two sheep farms that had a clinical history of abortions and death of adult animals; 28 female adults of creole hair (camura) breed were sampled at random. A recombinant peptide from the parasite (NcGRA1) was used in DOT-ELISA tests and the serum was diluted 1:200. **Results.** This study reports for the first time in this department, and the country the anti-*N. Caninum* in 78.6% (22/28) of the sheep sampled. **Conclusions.** These results confirm the *Neospora caninum* infection in sheep and the need for new studies linking the presence of the parasite with clinical manifestations in different regions of the country.

Keys words: Abortion, ELISA, parasite (*Source: MeSH*).

INTRODUCCIÓN

Neospora caninum es un protozooario intracelular obligatorio, el cual causa reabsorción embrionaria abortos, mortalidad neonatal y nacimiento de crías con deficiencias neuromusculares en bovinos, con un consecuente impacto negativo sobre el desempeño reproductivo de los rebaños (1).

Neospora caninum tiene como hospederos definitivos a perros, coyotes (*Canis latrans*), dingos (*Canis lupus dingo*) y lobos (*Canis lupus*), (2- 3). El parásito presenta tres estadios de infección: taquizoito, bradizoito y ooquiste. Canidos eliminan al medio ambiente ooquistes resistentes (2).

La neosporosis ha sido reportada en varias especies domésticas como Bovinos, caprinos, ovinos, equinos, camélidos sudamericanos e incluso el búfalo de agua (4).

También se han detectado anticuerpos anti-*N. caninum* en pollos (5), gorriones (*Passer domesticus*) (6), urracas (*Pica pica*) y la águila ratonera (*Buteo buteo*) (7), pero no ha sido un parásito aislado de infección natural en aves hasta ahora.

La neosporosis bovina ha sido reportada en África, América, Asia, Europa y Oceanía (8). La enfermedad se inicia después de una parasitemia materna ocasionada como resultado de una infección primaria o como consecuencia de la reactivación de una infección persistente durante la gestación (9). Provocando abortos entre el tercer y noveno mes de gestación, mortinatos, muerte neonatal, muerte fetal temprana y reabsorción embrionaria, provocando un efecto importante en diferentes parámetros reproductivos (10).

Se sabe que la neosporosis en ovinos no representa la misma relevancia que en bovinos. Sin embargo, en propiedades en las que son criados ovinos y bovinos conjuntamente, los ovinos pueden eventualmente participar de la epidemiología de la infección (11).

La presencia del parásito en los rebaños de ovejas se puede verificar mediante la detección de anticuerpos en suero o por el aislamiento y la identificación molecular del parásito (12).

En el 2003 se publicó el primer reporte de aborto en ovejas de la raza White Swiss Alpine por neosporosis (13). En el 2008 se aisló *N. caninum* de ovejas abortadas, lo que sugiere una asociación de este agente con el fracaso reproductivo (14).

Evidencia de infección por *Neospora caninum* fue demostrada en un estudio con infección experimental en ovejas sin lana (*Ovis aries*), originadas de cruzamientos de las razas Santa Inés, Morada Nueva y Africana, en la cual los corderos necropsiados, nacidos de ovejas inoculadas antes o durante la gestación presentaron alteraciones histopatológicas en diferentes tejidos, siendo las más severas observadas en el Sistema Nervioso Central (SNC), caracterizadas por la presencia de formas quísticas del parásito asociadas con infiltrado inflamatorio predominantemente mononuclear, áreas de necrosis y en algunos casos presencia de calcificación. Placentitis, caracterizada por focos de necrosis y calcificación distrófica, fue observada en las placentas de las ovejas (15).

Actualmente en Colombia no existe información reportada acerca de la infección natural por *Neospora caninum* en ovinos, por lo cual el objetivo de este estudio fue evaluar la frecuencia de anticuerpos anti-*N. caninum* en dos rebaños de ovinos del departamento de Córdoba, Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio. El estudio fue realizado en dos explotaciones ovinas que presentaron antecedentes de abortos y muerte de animales adultos, ubicadas en los municipios de Ciénaga de Oro y Sahagún del departamento de Córdoba, Colombia, localizado entre las coordenadas 7°23' y 9°26' de latitud norte y los 74°52' y 76°32' de longitud al oeste del meridiano de Greenwich, a una altura de 30 m.s.n.m, con temperatura promedio anual de 28°C, humedad relativa del 82%, precipitación media anual de 1400 mm y pertenece a la formación climática de bosque tropical lluvioso. Se presentan dos estaciones bien definidas (época de lluvia y época seca), (16).

Recolección de las muestras. Para la recolección de las muestras, los animales fueron inmovilizados teniendo en cuenta las normas técnicas en el manejo y sujeción de animales, enmarcado en el cumplimiento de la Declaración Universal de los Derechos de los Animales, referente a los principios éticos internacionales para la investigación biomédica con animales del CIOMS (Council for International Organizations of Medical Sciences) establecida por la UNESCO (United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization) y la OMS (Organización Mundial

de la Salud) en 1949 y de la Ley 84 de Octubre 27 de 1989 (Estatuto Colombiano de Protección Animal), (17).

Recolección y procesamiento de muestras.

Se eligieron al azar animales para ser muestreados en ambos sistema de producción, obteniendo en total 28 muestras las cuales fueron identificadas de acuerdo con número, edad y raza. Los animales fueron evaluados clínicamente y la recolección de las muestras se hizo por venopunción yugular en tubo Vacutainer® de 5 ml sin anticoagulante y se conservó en refrigeración (Nevera portátil, Imussa 2010, Colombia) de 4 a 6°C para ser posteriormente procesados en el Laboratorio Clínico Veterinario de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Córdoba. Los sueros fueron mantenidos a -20°C, posteriormente liofilizados y transportados al laboratorio de biología, diagnóstico y control de hematozoarios y vectores/Bioagro, de la Universidad Federal de Viçosa, Brasil para su análisis.

Análisis de los sueros. Para el análisis de los sueros, se utilizó el péptido recombinante (NcGRA1), siendo el gen diseñado con base en la metodología de genética reversa de epitopos antigénicos originados de *Neospora caninum*, sintetizado en GenScript (USA) y producido por fermentación de Levaduras *Pichia pastoris* KM71 en el Laboratorio de Biología e Controle de Hematozoarios e Vetores (LBCHV/DVT/BIOAGRO) del Departamento de Veterinaria de la Universidad Federal de Viçosa.

La técnica serológica empleada fue el Dot-ELISA para la detección de IgG específicos contra *N. caninum* en la cual membranas de nitrocelulosa de 0.22 µ fueron sensibilizadas con 1µl del antígeno y posteriormente; los sueros fueron diluidos a 1:200 en solución de lavado e incubados durante 1 hora. La revelación fue realizada a través de la adición de Proteína G marcada con peroxidase por 30 minutos, seguido de la solución reveladora a base de 3,3'-Diaminobenzidina (DAB). El procedimiento fue realizado a temperatura ambiente en agitación constante.

RESULTADOS

Se consideraron positivos todos aquellos sueros que fueron reactivos a una dilución de 1:200. Se reporta por la primera vez, en ovejas naturalmente infectadas, en el departamento de Córdoba y en Colombia la presencia de anticuerpos anti-*N. caninum* en el 78.6% (22/28) de los animales muestreados.

DISCUSIÓN

Los estudios serológicos para detección de anticuerpos anti-*N. caninum* más usados son inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA, el uso de Dot-ELISA para diagnóstico ha demostrado ser eficiente mostrando concordancia entre los resultados obtenidos por dot-ELISA y ELISA comercial en sueros bovinos con una sensibilidad relativa y la especificidad de dot-ELISA del 71% y 100%, respectivamente (18).

El uso de un péptido recombinante en lugar de una proteína completa elimina la posibilidad de reacciones cruzadas con otros apicomplexos. Usando suero bovino de vacas positivas para *N. caninum* por IFI el péptido usado en este reporte presentó una sensibilidad y una especificidad de 97% comparado con el test patrón oro que es la IFI.

Diferentes trabajos han sido realizados donde se evidencia la presencia de anticuerpos anti-*N. caninum* en ovinos en diversas partes del mundo. En Brasil existen diversos reportes; en Uberlandia-MG donde un estudio realizado en 334 muestras reportó una prevalencia de anticuerpos del 8.1% en ovejas de las razas Santa Ines, Dorper y cruces de estas (19); en el estado de São Paulo de 597 muestras de suero de ovejas analizadas el 92% fueron positivas (20); en el estado de Paraná y específicamente en el municipio de Guarapuzva también 9.5% de ovejas de las razas Ile de France, Texel, Corriedale y Hampshire presentaron anticuerpos anti-*N. Caninum* (21); por otro lado en Brasilia de 1028 ovejas el 8.81% fueron seropositivas (22) y para el estado de Rondônia se reportó el 29% de los 141 sueros ovinos como positivos para la presencia de anticuerpos anti-*N. Caninum* (23).

Además de Brasil, también en la República Checa se han reportado estudios de seroprevalencia anti-*N. caninum* en ovinos, trabajo en el cual fueron evaluados 547 sueros de ovejas de los cuales el 12% presentó anticuerpos (24) y para Eslovaquia se detectó una prevalencia de 3.8% de un total de 382 sueros de ovejas evaluados (12).

Teniendo en cuenta que se ha reportado anticuerpos anti - *Neospora caninum* en ovinos deslanados, se hacen necesarios estudios que asocien la presentación de la infección en diferentes regiones del país con el fin de diagnosticar este parásito en otras explotaciones ovinas, además, de tomar las medidas necesarias para evitar la infección ya sea controlando la población de caninos, mejorando la eliminación de residuos placentario o abortos y manejo alimenticio con el fin de evitar el consumo de quistes de tejidos o de ooquistes esporulados.

REFERENCIAS

1. Dubey, J. Neosporosis in cattle. *J Parasitol* 2003; 89(Suppl):S42-S56.
2. King J, Slapeta J, Jenkins D, Al-qassab S, Ellis J, Windsor P. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Inter J Parasitol* 2010; 40:945-950
3. Dubey J, Jenkins M, Rajendran C, Miska K, Ferreira L, Martins J, et al. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* 2011; 181:382-387.
4. Chávez A, Serrano E, Casas E, Ortega L. *Neospora caninum* en camélidos sudamericanos peruanos. *Rev Inv Vet* 2002; 13(2):92-93.
5. Costa K, Santos S, Uzeda R, Pinheiro A, Almeida M, Araujo F, et al. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 2008; 38:157-159.
6. Gondim L, Abe-Sandes K, Uzeda R, Silva M, Santos S, Mota R, et al. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the North east of Brazil. *Vet Parasitol* 2010; 168:121-124.
7. Darwich L, Cabezon O, Echeverria I, Pabon M, Marco I, Molina-Lopez R, et al. Presence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* DNA in the brain of wild birds. *Vet Parasitol* 2012; 183:377-381.
8. Dubey J. Review of *Neospora caninum*. *Korean J Parasitol* 2003; 41(1):1-16
9. Dubey J, Buxton D, Wouda W. Pathogenesis of bovine neosporosis. *J Comp Pathol* 2006; 134:267-289.
10. Dubey J, Schares G, Ortega-Mora L. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20:323-367.
11. Vogel F, Arenhart S, Bauermann F. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos, ovinos e bubalinos no estado do Rio Grande do Sul. *Ciencia Rural* 2006; 36(6):1948-1951.
12. Špilovská S, Reiterová P, Kováčová D, Bobáková M, Dubinský P. The first finding of *Neospora caninum* and the occurrence of other abortifacient agents in sheep in Slovakia. *Vet Parasitol* 2009; 164(2-4):320-323.
13. Hässiga H, Sagerc K, Reittb D, Zieglerb D, Strabela B. Gottstein *Neospora caninum* in sheep: a herd case report. *Vet Parasitol* 2003; 117(3):213-220.
14. Howe L, West D, Collett M, Tattersfield G, Pattison R, Pomroy W, et al. The role of *Neospora caninum* in three cases of unexplained ewe abortions in the southern North Island of New Zealand. *Small Rumin Res* 2008; 75(2-3):115-122.
15. Oviedo T, Goretti R, Vargas M, Patarroyo J. Histopatología de la infección experimental de ovejas sin lana *Ovis aries* por *Neospora caninum*. *Rev MVZ Córdoba* 2003; 8(1):261-264.
16. Calonge B, Vela-Vargas I, Pérez-Torres J. Murciélagos asociados a una finca ganadera en Córdoba (Colombia). *Rev MVZ Córdoba* 2010; 15(1):1938-1943.
17. MRAD A. Ética en la investigación con modelos animales experimentales. Alternativas y las 3 RS de Russel. Una responsabilidad y un compromiso ético que nos compete a todos. *Rev Col Bioética*, 2006; 1(1):163-184.
18. Ahmad N, Jozani J, Neda Z. Adaptation of Dot-Elisa for Serodiagnosis of *Neospora caninum* Infestation in Aborted Cows. *Global Veterinaria* 2011; 7(2):149-152.
19. Salaberry S, Okuda L, Nassar A, De Castro J, Lima-Ribeiro A. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in sheep flocks of Uberlandia county, MG. *Rev Bras Parasitol Vet Jaboticabal* 2010; 19(3):148-151.
20. Figliuolo L, Kasai N, Ragozo A, De Paula V, Dias R, Souza S, et al. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol* 2004; 123(3-4):161-166.

21. Romanelli P, Freire R, Vidotto O, Marana E, Ogawa L, De Paula V, et al. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Paraná State, Brazil. *Res Vet Sci* 2007; 82(2):202-207.
22. Ueno T, Gonçalves V, Heinemann M, Dilli T, Akimoto B, De Souza S, et al. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from Federal District, central region of Brazil. *Trop Anim Health Prod* 2009; 41(4):547-552.
23. Aguiar D, Chiebao D, Rodrigues A, Cavalcante G, Labruna M, Gennari S. Prevalencia de anticorpos anti-*Neospora caninum* em ovinos do Município de Monte Negro, RO, Amazonia Ocidental Brasileira. *Arq Inst Biol* 2004; 71:616-618.
24. Bártová E, Sedlák K, Literák I. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in sheep in the Czech Republic. *Vet Parasitol* 2009; 161(1):131-132.