

Universidad Nacional
Facultad de Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria

Diagnóstico de la situación de VDVB, HVB-1, VLVB y *Neospora caninum* en una finca lechera ubicada en Zarcero con problemas reproductivos, en el período comprendido entre mayo y agosto del 2012.

Modalidad: Proyecto de Graduación

Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado Académico
De Licenciatura en Medicina Veterinaria

Autor: Oscar Andrés Barquero Morales

Tutor: Dr. Rafael Vindas B.

Lectores:
Dr. Julio Murillo.
Dr. Juan José Romero.
Dr. Rodolfo Rojas B.

Campus Presbítero Benjamín Núñez

2017

TRIBUNAL EXAMINADOR

Felipe Araya Ramírez, PhD



Vicedecano de la Facultad de Ciencias de la Salud

Laura Bouza Mora, MSc.



Subdirectora de la Escuela de Medicina Veterinaria

Rafael Vindas Bolaños, Lic.



Tutor

Julio Murillo Barrantes, MSc.



Lector

Rodolfo Rojas Barrantes, Lic.



Lector

Fecha 2018

DEDICATORIA

A mi padre, mi héroe, quien desde el cielo sigue velando por mí. A mi esposa por su apoyo A mis hijos María José, Manuel Andrés y Oscar Ignacio por ser mi inspiración para terminar y el motor que mueve mi mundo.

AGRADECIMIENTO

Primero a Dios porque sin Él, no soy nadie. A los doctores Rafael Vindas, Juan José Romero y Mauricio Jiménez por su apoyo incondicional, paciencia, tolerancia y constancia para llegar conmigo al final del proyecto. Al personal de la Escuela de Medicina Veterinaria, que durante todos estos años me ayudaron de una u otra forma a terminar esta tarea. Al Señor José Luis Rodríguez por la confianza brindada para realizar este trabajo en su finca.

ÍNDICE

Índice de cuadros	vi
Abreviaturas.....	vii
Resumen	viii
Abstract.....	ix
Introducción.....	1
<i>Antecedentes</i>	1
Justificación	2
Objetivos.....	4
Objetivo General.....	4
Objetivos Específicos	4
Hipótesis	4
Marco teórico.....	5
<i>Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR)</i>	5
<i>Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB)</i>	6
<i>Virus de la Leucosis Viral Bovina (VLVB)</i>	7
<i>Neospora caninum</i>	8
Materiales y métodos.....	12
Resultados.....	15
Discusión	16
Conclusiones.....	17
Recomendaciones	18
Referencias bibliográficas	19

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Análisis de la Razón de Incidencia según el resultado de la serología (ELISA) para, VDVB, HVB-1, VLVB y N. caninum.	15
Cuadro 2. Plan de saneamiento que se utilizó en la finca para disminuir los abortos del hato.	19

LISTA DE ABREVIATURAS

UNA:	Universidad Nacional.
ELISA:	Prueba de inmunoensayo mediado por enzimas.
IBR:	Rinotraqueitis infecciosa bovina.
VDVB:	Virus de la diarrea viral bovina.
VLVB:	Virus de la leucosis viral bovina.
HVB-1:	Herpes virus bovino tipo 1.

RESUMEN

La principal necesidad de ayuda en el sector lechero debe estar orientada a los pequeños y medianos productores, que son los más afectados en términos económicos. Desde este punto de vista la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional tiene dentro de su misión y visión ayudar a mejorar la productividad y salud animal del país, mediante programas dirigidos a los productores de bajos recursos.

Esta investigación se realizó en una finca de ganado lechero en Zarcero, Alajuela, Costa Rica, propiedad del Sr. José Luis Argüello Cubillo. Esta presentó por mucho tiempo problemas de abortos y se tenía la hipótesis por anteriores estudios serológicos de la Dos Pinos en la finca, y se consideró a *N. caninum* como una posible causa de abortos. Se realizó un estudio para tratar de asociar los abortos con la presencia de alguno de los agentes etiológicos (HVB-1, VDVB, VLVB y *N. caninum*) comúnmente asociados a abortos en ganado lechero.

Se realizaron pruebas serológicas (ELISA) para determinar la incidencia de HVB-1, VDVB, VLVB y *N. caninum* en el hato lechero y se determinó una incidencia de 48.6% a VLVB; 19.5% a VDVB y 12.2% a *N. caninum*. No se determinaron animales seropositivos a HVB-1.

Además, se realizó un análisis estadístico de las Razones de Incidencias (RI) como medida de asociación y se determinó una $RI = 0.88$ (IC95%: 0.1-2.48) para VDVB, una $RI = 0.69$ (IC95%: 0.19-2.48) para VLVB y una $RI = 1.2$ (IC95%: 0.37-3.86) para *N. caninum*. El análisis demostró que ninguno de estos agentes etiológicos se pueden asociar a la ocurrencia de abortos en este hato. Por lo tanto, es necesario enfocarse en el estudio de otras causas de abortos y se diseñó un plan de saneamiento para producir un mejor manejo, prevención y control de los problemas de aborto.

ABSTRACT

The main need for aid in the dairy sector should be aimed at small and medium producers, who are the most affected in economic terms. From this point of view, the School of Veterinary Medicine of the Universidad Nacional has within its mission and vision to help improve the productivity and animal health of the country, through programs directed to producers of low resources.

This research was carried out in a dairy cattle farm in Zarcero, Alajuela, Costa Rica, property of Mr. José Luis Argüello Cubillo. This farm has presented abortion issues for a very long time and because previous studies carried out by Dos Pinos, they had considered *N. caninum* as a possible cause of those abortions. A study was carried out trying to associate those abortions with the presence of some of the etiological agent (BHV-1, BDV, BLV and *N. caninum*) mostly associated with abortions in dairy cattle.

Serological tests (ELISA) were carried out to determine the incidence of BHV-1, BDV, BLV and *N. caninum*. It was determined a 48.6% incidence for BLV, 19.51% for BDV and 12.20% for *N. caninum*. There were no seropositivity for BHV-1.

Also, it was carried out an statistical analysis of the Risk Ratio as the association measure. It was determined a RR= 0.88 (CI95%: 0.1-2.48) for VDVB, a RR = 0.69 (CI95%: 0.19-2.48) for VDVB and a RR = 1.2 (CI95%: 0.37-3.86) for *N. caninum*. The analysis showed that none of the etiological agents studied could be associated with the occurrence of abortions in this herd. Therefore, it is necessary to focus on the study of other causes of abortion and a sanitation plan that leads to a better management, prevention and control of the abortion problems was designed.

Diagnóstico de la situación de VDVB, HVB-1, VLVB y *Neospora caninum* en una finca lechera ubicada en Zarcerro con problemas reproductivos, en el período comprendido entre mayo y agosto del 2012.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

Las causas de aborto son múltiples en hatos lecheros, pero comúnmente, son atribuidos a varios agentes etiológicos infecciosos como bacterias, virus y protozoarios. Dentro de las bacterias mayormente asociadas a abortos se reconoce a *Actinomyces pyogenes*, *Streptococcus* spp. *Brucella abortus* y *Leptospira hardjo*. Dentro de los agentes virales que se asocian como causa importante de aborto en bovinos, están el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) y herpesvirus bovino tipo-1 (HVB-1) causante de la enfermedad conocido como rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), También existen grupos de hongos y protozoarios (*Neospora caninum*), que provocan abortos (Hovingh, 2002).

El VDVB tiene una distribución mundial (Robert *et al.*, 2004). En Costa Rica, Raizman *et al.* (2011) estudiaron la seroprevalencia de VDVB, determinando 27% de VDVB tipo 1 y de 19% de VDVB tipo 2 esto en hatos de ganado en la región Pacífica. También, Raizman *et al.* (2011) determinaron 48% de seroprevalencia de HVB-1 en este mismo estudio.

El VLVB, se encuentra distribuido a nivel mundial, pero con marcadas diferencias de prevalencia en distintas regiones (Venables y Lucas, 2004). En Costa Rica, los problemas más frecuentes en los hatos lecheros del país son los abortos producidos por enfermedades infecciosas, descritos en la zona de Poás por Murillo (2005). Jiménez *et al.* (1995) presentaron la distribución y el aislamiento del virus de leucosis bovina en Costa Rica, principalmente, en

las regiones más altas del Valle Central. Romero *et al.* (2015) lograron determinar una incidencia global de leucosis de 21,8%, pero con fincas donde tenían incidencias mayores al 40%, además con incidencias mayores en vacas de 1 a 2 lactancias y de cruces entre Holstein y Jersey. *N. caninum* fue reportado por primera vez por Bjerkås (1984) en Noruega. Romero (2005) demostró cómo la neosporosis es una enfermedad importante a considerar en Costa Rica como causa de aborto. Sin embargo, dentro de un gran número de enfermedades abortivas, la Neosporosis debe ser diferenciada de la Diarrea Viral Bovina, Rinotraqueitis Bovina Infecciosa (IBR), Leptospirosis y Leucosis (Bjorkman, 2003).

En la finca de producción láctea, objeto de este estudio, situada en Zarcero de Alajuela, existía un problema de aborto persistente. Según muestreos realizados por la Dos Pinos en el año 2011, los abortos tenían relación con la presencia de *N. caninum*. Por esta razón, se decidió, establecer el perfil serológico de VDVB, HVB-1, VLVB y *N. caninum* para realizar un programa de manejo, prevención y control de las enfermedades infecciosas identificadas en la finca.

1.2. Justificación

El presente proyecto surge debido a la necesidad de establecer estrategias de control de abortos y otros problemas reproductivos, que se generan en las fincas lecheras. Se considera necesario establecer protocolos que detecten, evalúen y traten estos problemas y establecer medidas preventivas mediante un adecuado manejo para evitar pérdidas económicas en la producción de los animales. Muchas fincas aledañas de la misma zona han manifestado problemas similares reportados a los médicos veterinarios de la Dos Pinos de Zarcero, por lo

que un programa de saneamiento para esta finca podría ser de gran utilidad para otras fincas aledañas asociadas a problemas similares.

Por ello, este trabajo se concentró en un caso concreto, atendiendo una solicitud de colaboración al equipo de Cirugía y Medicina Ambulatoria de Especies Mayores de la Universidad Nacional en el que 26 vacas de una finca lechera en Zarcero presentaban abortos que afectaban la producción. Se pretendió tratar el problema de forma integral, diagnosticando la situación, para después ofrecer estrategias de control de abortos.

La importancia de este trabajo radica no solo en el hecho de analizar y solucionar un caso particular de una finca lechera pequeña, sino también de establecer un protocolo que facilite el control de las posibles causas de aborto a manera de prevención. Es decir, que las estrategias empleadas en este proyecto funcionen como guía para futuros casos similares. Al seguir las medidas de control y manejo animal apropiadas, se evitará el contagio de animales, y se proporcionará un ambiente sano para el hato.

De esta forma, el éxito del programa, dependerá del protocolo a seguir para el control de las enfermedades. Por esto, se inicia con la realización de un análisis serológico con el fin de determinar si los agentes están presentes o no, y así determinar las posibles patologías reproductivas causadas por VDVB, HVB-1, VLVB y *N. caninum* en esta finca.

Se pretende demostrar, de acuerdo con los resultados obtenidos, la importancia de determinar un programa de saneamiento, y dentro de este, valorar la eliminación gradual de animales seropositivos. También, como indican Williams *et al.* (2003), resulta necesario el control de la transmisión.

Asimismo, cabe mencionar que, como principales beneficiados con la realización de este proyecto, se encuentran el señor Luis Argüello, dueño de la finca, así como la Cooperativa Dos

Pinos, y los animales por los cuales se velará su bienestar. De esta forma, se pretende solventar una problemática social y económica presente en una finca pequeña que es el sustento económico para una familia y que por sus condiciones es comparable con otras fincas pequeñas y medianas de la zona, de tal forma que el producto obtenido pueda ser utilizado como ejemplo para situaciones similares.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

1. Establecer el perfil serológico para el VDVB, HVB-1, VLVB y *N. caninum*, en un hato lechero de Zarcero con alta incidencia de abortos.

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Establecer el status serológico contra VDVB, HVB-1, VLVB y *N. caninum* en suero de todos los animales de la finca.
2. Diseñar un programa de manejo, prevención y control para las enfermedades más frecuentes identificadas en esta finca.

1.4. Hipótesis

H_0 = Existe asociación entre los agentes VDVB, HVB-1, VLVB y *N. caninum* y la ocurrencia de abortos en la finca analizada.

H_1 = No existe asociación entre los agentes VDVB, HVB-1, VLVB y *N. caninum* y la ocurrencia de abortos en la finca analizada.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. *Rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR)*

El agente causal del IBR es el HVB-1, el cual es un virus ADN que se clasifica como un alfa herpes virus, en la familia Herpesviridae (Seguin y Troedson, 2002).

Como un herpesvirus típico, este agente presenta el fenómeno de latencia, lo cual significa que este agente puede persistir, principalmente en el ganglio sacral y en el ganglio trigémino, sin causar enfermedad, pero puede ser activado y excretado en respuesta a varios factores estresantes, como lo son: el parto, transporte y otras enfermedades (Pritchard *et al.*, 2003). Los signos clínicos producidos por el HVB-1, que afectan la reproducción en vacas son: vulvovaginitis, muerte embrionaria, aborto, nacimiento de terneros prematuros y débiles.

El aborto generado por este herpesvirus ocurre por lo general en el cuarto mes de gestación, además puede existir una historia de infertilidad en el hato. En algunas ocasiones, aunque no es lo más frecuente, los fetos infectados con HVB-1, llegan al término de la gestación, pero son animales que mueren en las primeras semanas de vida (Seguin y Troedson, 2002).

El diagnóstico se realiza aislando el virus de la placenta, identificando los cuerpos de inclusión intranucleares en los tejidos fetales o mediante una prueba de neutralización del suero. Si se aplica esta última se recomiendan dos muestreos con unos días de separación. La primera debe ser negativa y la segunda positiva o bien la primera positiva y la segunda haberse cuadruplicado. Las pruebas serológicas no ayudan cuando la madre se ha infectado meses antes del aborto, ya que el título después del aborto puede estar disminuido (Smith, 2010).

2.2. *Virus de la diarrea viral bovina (VDVB)*

La DVB es causada por un virus ARN, género Pertivirus, familia Flaviviridae (Seguin y Troedson, 2002). La DVB tiene una distribución mundial (Robert *et al.*, 2004). La infección de ganado susceptible con el VDVB puede producir una infección subclínica y transitoria, fallas reproductivas hasta enfermedad fatal, además de provocar cuadros de inmunosupresión, que abren las puertas a otros agentes patógenos.

Se ha comprobado que se puede dar infección transplacentaria. Si la infección se presenta entre el día cincuenta al día cien de gestación, ocasiona muerte fetal. La expulsión del feto puede ocurrir en días o hasta meses después de la infección. En general las infecciones con este virus en gestaciones avanzadas no generan aborto (Seguin y Troedson, 2002). Si la infección transplacentaria se presenta cerca de los cien días de gestación y no se da la muerte fetal, esto conllevará al nacimiento de animales persistentemente infectados (PI) e inmunotolerantes (Robert *et al.*, 2004).

El ganado PI con el VDVB representa la mayor fuente de infección para la transmisión dentro de un hato y también para la transmisión de un hato a otro. Los PI son aquellos animales que son inmunotolerantes al virus causal de la patología, con serología negativa, pero que continuamente esparcen grandes cantidades de virus al medio ambiente en el que viven. Una forma de identificar a los animales PI con el VDVB, es mediante la utilización de VDVB en el ELISA indirecto (Robert *et al.*, 2004).

2.3. *Virus de la leucosis viral bovina (VLVB)*

La LVB es causada por un virus ARN, que pertenece a la familia Retroviridae. Estos virus tienen la capacidad de integrarse en el ADN de los linfocitos B del hospedador y provocar una infección de por vida en ese animal. (Venables y Lucas, 2004).

El VLVB, se encuentra distribuido a nivel mundial, pero con marcadas diferencias de prevalencia en distintas regiones. (Venables y Lucas, 2004).

En lo que respecta a la transmisión, cualquier secreción o excreción que contenga linfocitos B infectados representan una fuente de infección para otros animales, en el calostro y en la leche, en secreciones traqueales, bronquiales y en algunas ocasiones, en secreciones nasales o saliva de animales infectados. El virus también es encontrado en la fracción celular de la sangre, pero no en el plasma o en el suero, incluso cuando haya sucedido hemólisis. Sin embargo, el virus no ha sido encontrado en heces u orina y probablemente no está en el semen de la mayoría de los toros infectados. La transmisión del virus por contacto de un animal infectado a otro sano, es una de las formas más importantes de diseminación dentro de un hato. El grado en que se disemina el virus depende en gran medida de la forma en que se maneje el hato y las medidas sanitarias que se realicen. (Venables y Lucas, 2004).

Debido a que el virus no logra sobrevivir mucho tiempo fuera del hospedador y que su capacidad de infectar está asociada con la celularidad de las secreciones, se asume que la transmisión ocurre con el intercambio directo de linfocitos infectados presentes en secreciones nasales, bronquiales, traqueales, saliva o descargas vaginales. El consumo de leche de los terneros, no parece ser una vía importante de transmisión; la presencia de anticuerpos específicos inhibe la transmisión del virus. Los signos clínicos más reportados son depresión,

indigestión, sangrado crónico, desplazamiento de abomaso, laminitis, mastitis y una disminución en la capacidad reproductiva (Venables y Lucas, 2004).

El diagnóstico se realiza mediante técnicas serológicas (inmunodifusión, ELISA). También, se puede diagnosticar el antígeno mediante la prueba de reacción en cadena de polimerasa (PCR) (Venables y Lucas, 2004).

2.4. *Neospora caninum*

En medicina veterinaria, se conoce la neosporosis como una enfermedad de tipo reproductivo, causada por el protozooario *N. caninum*, enfermedad que tiene como hospedador definitivo el perro, y hospedadores intermediarios los felinos, ovinos, bovinos, caprinos, búfalos, ciervos y equinos (Baszler *et al.*, 1996).

La *N. caninum* pertenece a la familia Api complexa, donde están agrupados también los géneros Toxoplasma, Isospora y Sarcosystis que difieren por los huéspedes que utilizan en su ciclo de vida, algunas características morfológicas, las enfermedades que producen, pero ante todo por su estructura genética que determina su clasificación en diferentes géneros y especies (Jones T.C., 1997).

Todo parece indicar que el perro actúa como huésped definitivo, que al ingerir fetos, placenta y carne de animales portadores se da la oportunidad para que el parásito cumpla la fase sexuada de su reproducción a nivel intestinal, produciendo ooquistes que se eliminan por heces, contaminando pastos y aguas con la posibilidad de infestar bovinos (Muñoz *et al.*, 2001).

No se descarta que otras especies de carnívoros como zorros y mapaches puedan jugar el mismo papel del perro. En los felinos cada día se confirma su exclusión de esta participación manteniendo la característica de huésped definitivo para *Toxoplasma* (Wouda, *et al.*, 1999).

La importancia de la neosporosis inició en 1984, con un reporte de Bjerkas en Noruega, de un caso de encefalitis y miocarditis en caninos producido por un protozooario (Valenzuela, 2005).

En el ciclo de vida de *N. caninum* se presentan cuatro fases, a saber: taquizoítos, bradizoítos, quistes y ooquistes (Dubey *et al.*, 2007).

El microorganismo fue identificado por primera vez en 1988, como una de las causas del aborto en los perros, y poco después, como causante de abortos en vacas lecheras (Stenlund, 2000).

El ciclo inicia cuando el hospedador intermediario (bovinos), ingiere los ooquistes que se encuentran en potreros y en aguas contaminadas, éstos se liberan en el tracto intestinal del animal y pasan a infectar como taquizoítos diferentes células de los bovinos. Los taquizoítos se han encontrado en células nerviosas, células endoteliales, hepatocitos, células musculares y en placenta de vacas preñadas. Los taquizoítos pueden transmitirse verticalmente de la vaca al feto a través de la placenta y se convierten en bradizoítos. Los bradizoítos, como medida de protección forman quistes tisulares a su alrededor, ahí permanecen latentes, hasta que el sistema inmune del hospedador intermediario se suprime, permitiéndoles activarse. Los quistes tisulares se han encontrado en cerebro, médula espinal y retina, usualmente son de forma redonda u ovalada y miden hasta 107 μm de largo. (Dubey y Lindsay, 1996; Lindsay y Dubey, 2000).

En la transmisión transplacentaria (paso de taquizoítos de madre a feto por placenta) se ha demostrado que ocurre naturalmente en vacas y perros, siendo ésta la principal ruta de transmisión. (Anderson *et al.*, 2000).

La infección en vacas de carne y de leche ocasiona abortos, estos pueden ocurrir desde los tres meses hasta el final de la gestación. La infección natural con *N. caninum* no protege para prevenir otros abortos, ya que las vacas pueden abortar varias veces (Maley *et al.*, 2003).

Los fetos pueden morir dentro del útero, sufrir reabsorción, momificación, autólisis, pueden nacer vivos con signos clínicos o pueden ser clínicamente normales, pero persistentemente infectados (Odin y Dubey, 1993; Buxton *et al.*, 2002; Dubey, 2003a). También se pueden encontrar lesiones características en los fetos abortados que consisten en encefalitis no supurativas con focos de necrosis y gliosis, miositis no supurativa, hepatitis y en la mayoría de casos, miocarditis (Smith, 2010).

Varios estudios han indicado parámetros asociados con aborto en hatos bovinos causados por el *N. caninum*, como por ejemplo vacas seropositivas a *N. caninum*, número de membranas fetales retenidas anualmente en bovinos, número total de perros de la finca y frecuencias de defecación de los perros en comederos bovinos (Hobson *et al.*, 2005).

La literatura mundial es cada día más abundante y coincidente sobre la importancia que tiene *N. caninum* como causa de aborto en bovinos (Romero y Frankena, 2004). Prácticamente en todos los países donde se ha investigado, se ha demostrado su presencia ya sea por identificación del microorganismo con pruebas como cultivo, PCR, inmunohistoquímica, lesiones histopatológicas y pruebas serológicas (Gonbim *et al.*, 2004).

Es importante recalcar el hecho que no toda vaca infectada sufre aborto por esta causa, y esta es la razón por la cual se generan diferencias de opinión sobre el impacto en salud y producción que se le atribuye (Dubey *et al.*, 1993).

El diagnóstico se basa en las lesiones características de los fetos abortados, y en el estudio seroepidemiológico de un número equivalente de vacas de la explotación con o sin historia de abortos, si la proporción de animales seropositivos es estadísticamente mayor entre los que han abortado (Smith, 2010).

3. METODOLOGÍA: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Población analizada

Para desarrollar esta práctica, se eligió una finca de altura ubicada en Zarcero de Alajuela, debido a que presenta problemas graves de aborto.

El personal de Dos Pinos de Zarcero, descartó la presencia de Brucelosis y confirmó la existencia de altos niveles serológicos a *N. caninum* en la mayoría del hato. Debido a que el dueño no posee los recursos económicos necesarios y con el fin de confirmar la incidencia de *N. caninum*, así como otros posibles agentes involucrados tales como VDVB, IBR y VLVB como causa de problemas reproductivos y abortos, se decide colaborar mediante diagnóstico de situación para establecer un programa de saneamiento integral.

De acuerdo a las recomendaciones del Dr. Rafael Vindas y el Dr. Carlos Jiménez, se realizaron con financiamiento de la UNA, las pruebas serológicas comparativas de *N. caninum*, VDVB, HVB-1 y VDLV. Se descartó la posibilidad de incorporar estudios de otras enfermedades como por ejemplo leptospirosis por falta de financiamiento.

3.2. Serología

Se realizaron dos muestreos de sangre de todos los animales mayores de seis meses (41 animales), para detectar los seropositivos a *N. caninum*, VDVB, IBR y VLVB, mediante la técnica de ELISA (Técnica de ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas).

Los animales se sangraron de la cola mediante la técnica con tubos al vacío Vacutainer®, la sangre se transportó de la finca a la Escuela de Medicina Veterinaria para su análisis y determinación de anticuerpos contra *N. caninum*, VDVB, HVB-1 y VLVB.

Se utilizaron los estándares del laboratorio de Entomología de la Escuela de Medicina Veterinaria, donde se consideró un animal seropositivo a *N. caninum*, aquel cuya muestra de sangre produjo una inhibición igual o mayor al treinta por ciento, mediante el Kit Vrrrd c Elisa código 5N05.20 (Fabricante, País) y en el caso de VLVB igual o mayor a un 20% utilizando un kit IDvet BLUC-10P (IDVet, Francia). El Laboratorio de Virología colaboró con el diagnóstico serológico de los animales para VDVB utilizando un Kit de Elisa comercial IDvet p80 antibody (IDVet, Francia), detectando los seropositivos por reacciones calibradas que cambian de coloración; así como la detección de HVB-1 mediante la técnica de seroneutralización con diluciones de 1:2 hasta 1:256, considerando positivas aquellas muestras donde **no** hubo efecto citopático.

3.3. Análisis estadístico

Se calcularon las incidencias de abortos en la finca por grupo de exposición a cada agente. Se realizó un análisis utilizando la Razón de Incidencia como medida de asociación. Esta compara el riesgo del evento (incidencia del evento) o aborto entre el grupo de los expuestos al agente etiológico con la incidencia del evento dentro del grupo no expuesto al agente etiológico.

Una Razón de Incidencia de 1.0 indica un riesgo idéntico entre los dos grupos. Una Razón de Incidencia mayor a 1.0 indica un incremento del riesgo entre el grupo de los expuestos al factor, convirtiéndolo en un factor de riesgo, mientras que una Razón de Incidencia menor a 1.0 indica un decrecimiento de la incidencia en el grupo expuesto con respecto al no expuesto, haciendo de este un factor protector.

3.4. Diseño del programa de manejo, prevención y control

Con el apoyo serológico, estadístico y de campo, se analizaron las posibles causas de transmisión y se identificaron los animales seropositivos en las diferentes enfermedades mencionadas y su relación con la problemática reproductiva, con el fin someter a un plan de reemplazo que no debe ser mayor a un año a aquellos animales que se considere necesario. Dentro de este plan de control y saneamiento del hato respecto a las enfermedades mencionadas, se estudiaron las condiciones específicas de la finca relacionadas con el agente etiológico, el manejo del hato y el medio ambiente, para considerar las medidas de control que ayuden a evitar la propagación de la enfermedad a los animales sanos; por ejemplo, tener un corral específico para manejo de los partos, control de roedores de la finca y desecho adecuado de las placentas en los partos y otras variables que se puedan detectar durante la elaboración del estudio.

Una clave para que el protocolo de abordaje de enfermedades infectocontagiosas fuera exitoso, fue poner en práctica las medidas de control y manejo necesarias para evitar que se infecten más animales. La importancia de la bioseguridad en una lechería, para controlar las enfermedades infectocontagiosas en los hatos, ha adquirido mucha relevancia en los últimos años a nivel mundial y se tuvo en cuenta la aplicación de la mayor cantidad de medidas posibles con el fin de alcanzar el ambiente más seguro.

4. RESULTADOS

La serología determinó un 48.6% positivos al VLVB, un 19.51% seropositivos a diarrea viral bovina y 12.20% seropositivos a *N. caninum*. No se determinaron animales seropositivos a HVB tipo 1.

Los resultados de los análisis serológicos reflejaron que el 50% de los animales con aborto fueron seropositivos a ninguno de los agentes infecciosos estudiados. Del 50% restante, dos tuvieron infección mixta (VBVD + VLVB en el primer caso y VLVB + *N. caninum* en el segundo caso). De los 14 animales con aborto, 3 tuvieron al menos dos abortos, y ninguno de ellos se asoció con algún agente.

Se determinó una razón de incidencias para VDVB de 0.88 (IC95%: 0.19-2.48) y una razón de incidencias para VDVB de 0.69 (IC95%: 0.19-2.48) y una razón de incidencias para *N. caninum* de 1.2 (IC95%: 0.37-3.86). El resumen de los resultados del análisis de las incidencias se puede observar en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Análisis de la Razón de Incidencia según el resultado de la serología (ELISA) para, VDVB, HVB-1, VLVB y *N. caninum*.

Agente	Resultado	Presencia de abortos			Incidencia	Razón de Incidencias	IC 95%	
		Sí	No	Total			LI	LS
HVB-1	+	0	0	0	0.00	0.00		
	-	14	27	41	34.15			
	Total	14	27	41	34.15			
VDVB	+	2	6	8	25.00	0.69	0.19	2.48
	-	12	21	33	36.36			
	Total	14	27	41	34.15			
VLVB	+	5	13	18	27.78	0.88	0.32	2.38
	-	6	13	19	31.58			
	Total	11	26	37	29.73			
<i>N. caninum</i>	+	2	3	5	40.00	1.20	0.37	3.86
	-	12	24	36	33.33			
	Total	14	27	41	34.15			

HVB-1: Herpesvirus bovino tipo 1 **VDVB:** Virus de la diarrea viral bovina **VLVB:** Virus de la leucosis viral bovina **N. caninum:** *Neospora caninum* +: Positivo -: Negativo **IC95%:** Intervalo de confianza 95% **LI:** Límite inferior **LS:** Límite superior

5. DISCUSIÓN

Las enfermedades reproductivas fueron la causa principal de consulta clínica, esto demuestra la importancia de la eficiencia en la reproducción del hato en la finca, así como la necesidad de visitas frecuentes programadas del médico veterinario.

La incidencia de 48.6% positivos para VLVB, se puede asociar con altas prevalencias reportadas por Romero *et al.* (2015) quienes determinaron incidencias en ciertas fincas superiores al 40%. La incidencia de 19.51% de VDVB está en **concordancia o discordancia** con lo reportado por _____ quienes determinaron **incidencias de VDVB de %**. La incidencia de 12.0% determinada para *N. caninum* **concordancia o discordancia** con lo reportado por _____ quienes determinaron **incidencias de *N. caninum* del %**. No se determinaron animales seropositivos a HVB tipo 1, esto es **inesperado** según las **incidencias reportadas por _____** y las seroprevalencias que se han reportado en otros estudios como el de Raizman *et al.* (2011) donde se ha reportado seroprevalencias en fincas de hasta 48%.

Como la hipótesis nula planteada en esta investigación era que los agentes etiológicos estaban asociados a la ocurrencia de abortos y no fue posible asociar a ninguno de los agentes etiológicos analizados con la ocurrencia de abortos en la finca investigada, existe evidencia científica para rechazarla ya que los intervalos de confianza de cada una de estas medidas de asociación pasan por el 1, lo que indica que los resultados no son estadísticamente significativos.

Debido a lo anterior, es que es necesario contemplar el futuro estudio de otros agentes etiológicos importantes asociados con abortos en ganado lechero como *Tritrichomonas foetus*, *Campylobacter fetus venerealis*, *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia abortus*, *Salmonella*, *Mycoplasma* *Actinomyces pyogenes*, *Streptococcus spp* y *Leptospira hardjo*. Las buenas prácticas de bioseguridad y manejo

empleadas en una finca pueden disminuir estos agentes etiológicos, mediante protocolos de saneamiento, manteniendo una buena salud y adecuado sistema inmunológico (hatos libres de estrés con menor posibilidad de contacto con los agentes), por lo que hay que hacer énfasis en las buenas prácticas de las fincas para obtener medidas de control y preventivas muy eficientes y a un bajo costo. A pesar que los resultados no son estadísticamente representativos, se debe considerar que la muestra es muy pequeña. Sin embargo, se logró demostrar la seropositividad de la mayoría de los agentes infecciosos estudiados y se implementaron medidas mediante un plan de saneamiento paulatino, que a mediano plazo lograron disminuir considerablemente los abortos de la finca.

De esta forma se logra comprender que los resultados no solo dependen de la interpretación de los análisis de laboratorio que como se puede ver en este estudio, en muestreos de una sola finca pequeña con pocos animales no siempre tiene una representación estadística significativa; sino más bien hay que hacer énfasis en el papel integral del médico veterinario y la forma de abordar el problema, considerando que un buen manejo de la finca puede disminuir considerablemente la mayor parte de trastornos asociados a la reproducción y producción del ganado.

6. CONCLUSIONES

- Se estableció el perfil serológico para, VDVB, HVB-1, VLVB y *N. caninum*, en el hato lechero de una finca de Zarcero. Se determinó un 48.6% de animales mayores de seis meses seropositivos al VLVB, un 19.51% seropositivos a diarrea viral bovina y 12.20% seropositivos a *N. caninum*. No se determinaron animales seropositivos a HVB tipo 1.
- Se determinó que no hay asociación entre los agentes analizados y los abortos.
- Es necesario estudiar a profundidad otros factores de riesgo dentro del hato para poder reducir la incidencia de los abortos.

- Se diseñó un programa de manejo, mediante un plan de saneamiento, prevención y control asociado a las enfermedades en estudio, alcanzándose a mediano plazo una reducción considerable en los abortos de las vacas de la finca.

7. RECOMENDACIONES

- Reemplazar paulatinamente los animales reincidentes a abortos y seropositivos de las enfermedades estudiadas, hasta tener un hato completamente sano.
- Los animales nuevos que se deseen ingresar, deberán someterse a muestreos de las enfermedades estudiadas.
- Los animales de nuevo ingreso deben someterse a un período de cuarentena para evitar el contagio al estar cerca de animales infectados.
- Como acción preventiva urgente, se recomienda habilitar un área específica para animales que estén por parir, con el propósito de recoger placentas y desechos después del parto. Con esto esperamos evitar que otros animales, ya sean coyotes, perros u otros, puedan llegar al lugar y esparcir los residuos de material contaminado por la finca, originando nuevas infecciones.
- Los residuos que se encuentren de placenta deberán ser enterrados inmediatamente después del parto del animal, como norma preventiva a corto plazo.
- Se recomienda no traer toros de fincas vecinas para reproducción, debido a que pueden portar otras enfermedades. En este caso es mejor la inseminación artificial en su hato o un toro certificado.

- Se estableció un programa de control de roedores y de manejo del alimento para evitar la contaminación del mismo con posibles agentes infecciosos.
- Se recomendó un adecuado uso de guantes y agujas estériles (uno por animal).

Animales seropositivos y con incidencia de abortos	Animales negativos y sin incidencia de abortos
1. Se descartan paulatinamente. 2. Se examinan hijas y se descartan positivas. 3. Se evita la toma de calostro a terneros hijos de vacas sospechosas o positivas.	1. Se mantienen y se examinan regularmente. 2. se examinan hijas de vacas negativas para mantener negatividad y evitar re- infestación. 3. Las vacas que van a parir se colocan en una cuadra o potrero de partos para poder recoger los desechos de la placenta y descartarlos. 4. Las placentas y sus desechos se recogen y se entierran 5. Si se va a usar un toro se examina para estar seguro que esté negativo y se evita prestarlo para saltos de otras fincas o usarlo en vacas positivas. Se recomienda preferiblemente usar inseminación artificial.

- El resumen del plan de saneamiento se puede ver en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Plan de saneamiento que se utilizó en la finca para disminuir los abortos del hato.

6. Se hacen cercas más seguras para evitar la mezcla de ganados.
 7. Se recomienda evitar el ingreso de perros y coyotes.
 8. Se recomienda un preludio para limpiar las botas al entrar y salir a la finca o a lechería.
 9. El ganado nuevo se sangra 30 días antes y se vuelve a sangrar dos meses después, no se compran animales sin examen previo de las enfermedades estudiadas.
 10. Se revisa la higiene, desinfección, esterilidad y uso de las herramientas a usar tales como Jeringas, guantes desechables e instrumentos de inseminación.
 11. Si hay abortos o partos distócicos se hacen exámenes inmediatos.
 12. Se recomienda la inseminación artificial.
 13. Se estableció un programa de control de roedores y de manejo del alimento para evitar la contaminación del mismo con posibles agentes infecciosos
 14. Se recomendó un período de cuarentena para animales de nuevo ingreso.
-

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson M, Andrianarivo A, & Conrad P. 2000. Neosporosis in cattle. *Anim Reprod Sci.* 61: 417-431
- Baszler, T.V., Knowles, D.P., Dubey, D.P., Gay, J.M., Mathison, B.A. McElwain, T.F. 1996. Serological diagnostic of bovine neosporosis by *Neospora caninum* monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1423-1428.
- Bjerkås, I., Mohn, S.F., Presthus, J. 1984. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z Parasitenk.* 70:271–274.
- Bjorkman C. 2003. *Neospora caninum* infection in cattle. p8-11 *In* proceedings from a symposium at the Faculty of Veterinary Medicine. Veterinary Academy of Lithuania, Kaunas. Jan 22-23. Jelgava, Latvia.
- Buxton, D., McAllister, M. y Dubey, J.P. 2002. The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends Parasitol.* 18(2):546-552.
- Dubey & Lindsay, 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet. Parasitol.* 67:1-59.
- Dubey, J.P. 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J. Parasitol.* 41(1): 1–16.
- Dubey, J.P., Schares, G. y Ortega-Mora, L.M. 2007. Epidemiology and control of Neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin. Microbiol. Rev.* 20(2): 323-67.

- Farin, P.W. 2001. Maintaining Reproductive Efficiency in Dairy Cattle. P. 255-290 In Herd Health. Food Animal Production Medicine. O. M. Radostits, ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, US.
- Gonbim, L., Mcallister, M., Pitt, W. y Zemlicka, D. 2004. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int. J. Parasitol. 34(2):159-161.
- Hobson, J.C., T.F. Duffield, D. Kelton, K. Lissemark, S.K.Hietela, K.E. Leslie, B. McEwen, 2005. Holstein dairy herds. Vet. Parasitol. 127: 177-88.
- Hoving, E. 2002. Abortions in dairy cattle- I, Common causes of abortions. Virginia Cooperative Extension. Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine, Virginia Tech. Publication 404-288.
- Jiménez, C., Bonilla, J.A., Dolz, G., Rodríguez, L.R., Herrero, L., Bolaños, E., Cortéz, M.R. y Moreno, E. 1995. Bovine leukaemia-virus infection in Costa Rica. Zentralbl Veterinarmed B. 42(7):385-90.
- Jones, T.C. 1997. Veterinary Pathology. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins. U.S.
- Lindsay & Dubey. 2000. Canine neosporosis. J. Vet. Parasitol. 14:1-11.
- Maley, S., Bucton, D., Rae, A., Wright, S., Schock A, Bartley, P., Esteban-Redondo, I., Swales, C., Hamilton, C., Sales, J. y Innes, E. 2003. The pathogenesis of Neosporosis in pregnant cattle: inoculation at midgestation. J. Comp. Path. 129(2-3):186-195.
- Muñoz, M.R., Murillo, M.A. y Córdova, I.A. 2001. Neosporosis, Un problema reproductivo en ganado lechero. Med. Vet. 18 (4): 376-381.
- Murillo, J. 2005. Abordaje de patologías Reproductivas ocasionadas por los agentes infecciosos HVB-1, VDVB, VLVB y *N. caninum*. Trabajo final de graduación. Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

- Odin & Dubey .1993. Sudden death associated with *Neospora caninum* myocarditis in a dog. JAWMA. 203: 831-833.
- Palavicini, P. 2006. Detección de *Neospora caninum* en perros de fincas lecheras en Poás de Alajuela. Tesis de Grado. Licenciatura. Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.
- Pritchard,G.C, M. Banks & R. E. Vernon. 2003. Subclinical breakdown with infectious bovine rhinotracheitis virus in dairy herd of high health status. Vet. Rec. 153: 113-117.
- Raizman, E.A., Pogranichniy, R., Negron, M., Schnur, M. y Tobar-Lopez, D.E. 2011. Seroprevalence of infectious bovine rhinotracheitis and bovine viral diarrhea virus type 1 and type 2 in non-vaccinated cattle herds in the Pacific Region of Central Costa Rica. Trop Anim Health Prod. 43(4):773-8.
- Robert, A., F. Beaudreau, H. Seegers, A. Joly, J.M Philipot. 2004. Large scale assessment of the effects associated with bovine viral diarrhea virus infection on fertility of dairy cows in 6149 dairy herds in Brittany (Western France). Theriogenology. 61 117-127.
- Romero, J.J. 2005. Appraisal of the epidemiology of *Neospora caninum* infection in Costa Rican dairy cattle. Tesis de Doctorado. Wageningen Institute of Animal Sciences, Holanda.
- Romero, J.J., Dávila, G., Beita, G., Dolz, G. 2015. Relación entre el estado serológico a leucosis bovina enzoótica y parámetros reproductivos en hatos lecheros especializados de Costa Rica. Agron. Costarricense 39(2):7-18.
- Seguin, B. H.T Troedson. 2002. Diseases of the reproductive system. P 1292-1343 In Large animal internal medicine. B.P. Smith, ed Mosby, Saint Louis Missouri, US.

Smith, B.P. 2010. Medicina interna de grandes animales. 4^{ta} Ed. Elsevier S.A., España.

Páginas 1868.

Stenlund, S. 2000. *Neospora caninum* in cattle in Sweden. Thesis doctoral. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. Suecia.

Valenzuela, P.2005. Neosporosis en bovinos y caninos. Mon. Electr. Patol. Vet; 2:1-12.

Veneables, C, M.H. Lucas. 2004. Enzootic Bovine Leucosis. Pages 693-695 In Bovine Medicine diseases and husbandry of cattle. A.H. Andrews, R.W Blowey, H. Boyd & R.G Eddy. 2th ed. Blackwell Publishing Oxford, Iowa, US.

Williams, D., Guy, C., Smith, R., Guy, F., Mcgarry, J., Mckay, J. y Trees, A. 2003. First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. Int. J. Parasitol. 33(10):1059-1065.

Wouda W, Bartels C & Moen A. 1999. Characteristics of *Neospora caninum* associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995 to 1997). Theriogenology 52: 233-245

Universidad Nacional Del Centro. 2002. Encuentro de veterinarios endoparasitólogos rioplatenses. Tandil 22 al 24 de Mayo del 2002.