

## Seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos de Lima y comparación entre ELISA e IFI

### SEROPREVALENCE *NEOSPORA CANINUM* IN BOVINES OF LIMA AND COMPARISON BETWEEN ELISA AND IFAT

Enrique Serrano-Martínez<sup>1,2</sup>, Roberto Evaristo R.<sup>1</sup>, Marco Quispe H.<sup>1</sup>, Elizabeth Hinostroza M.<sup>1</sup>

#### RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar la prevalencia de anticuerpos frente a *Neospora caninum* en bovinos de establos de la cuenca lechera del departamento de Lima, Perú, y la concordancia entre dos técnicas diagnósticas empleadas para la detección de anticuerpos en suero: ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) e inmunofluorescencia indirecta (IFI). El estudio se realizó entre junio de 2015 y diciembre de 2016 en muestras de suero de 3407 bovinos lecheros provenientes de 101 establos de Lima (Barranca, Huaura, Huaral, Canta, Lima, Huarochirí, Cañete y Yauyos). La prevalencia de la infección a *N. caninum* fue de 31.0% (1023/3407) obtenida por ELISA y 29.9% (1018/3407) por IFI. La concordancia entre ambas técnicas diagnósticas fue buena ( $K=0.98$ ) y estadísticamente significativa ( $p<0.001$ ). Asimismo, 69 de los 101 establos resultaron positivos (68.3%). Los resultados demostraron que los bovinos de establos lecheros de Lima tienen prevalencia individual moderada y alta prevalencia intra-rebaño frente a *N. caninum*.

**Palabras clave:** neosporosis; producción láctea; epidemiología; IFI; ELISA

#### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the prevalence of antibodies against *Neospora caninum* in dairy cattle farms of the department of Lima, Peru, and the concordance between two diagnostic techniques used for the detection of antibodies in serum: enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunofluorescence antibody test (IFAT). The study was conducted between June 2015 and December 2016

<sup>1</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

<sup>2</sup> E-mail: enrique.serrano@upch.pe

Recibido: 26 de octubre de 2017

Aceptado para publicación: 15 de marzo de 2018

in serum samples of 3407 dairy cattle from 101 farms in Lima (Barranca, Huaura, Huaral, Canta, Lima, Huarochirí, Cañete and Yauyos). The prevalence of infection to *N. caninum* was 31.0% (1023/3407) by ELISA and 29.9% (1018/3407) by IFAT. The concordance between both diagnostic techniques was good ( $K=0.98$ ) and statistically significant ( $p<0.001$ ). Likewise, 69 of the 101 farms were positive (68.3%). The results showed that cattle from Lima dairy farms have moderate individual prevalence and high intra-herd prevalence against *N. caninum*.

**Key words:** neosporosis; milk production; epidemiology, IFAT; ELISA

## INTRODUCCIÓN

La neosporosis es una enfermedad cosmopolita que ocasiona importantes pérdidas económicas, afectando a una gran variedad de animales, principalmente a bovinos y es considerada como una de las principales causas de abortos a nivel mundial (Dubey, 2003). *Neospora caninum* es un parásito intracelular obligado que pertenece a la familia Apicomplexa, donde también se hallan los géneros *Toxoplasma*, *Isospora* y *Sarcosystis*, los cuales se diferencian por el tipo de huéspedes que intervienen durante su ciclo evolutivo (Dubey *et al.*, 2007). La neosporosis es considerada una enfermedad importante debido a las infecciones reportadas en varios países, incluyendo Perú (Rivera *et al.*, 2000).

El ciclo biológico se terminó de describir en 1998 al comprobarse que el perro era el hospedero definitivo (McAllister *et al.*, 1998), siendo más susceptibles de presentar patologías neuromusculares los perros jóvenes (Knowler y Wheeler, 1995; Dubey y Lindsay, 1996). Por ello, la cercanía de estos con bovinos estabulados condiciona a la transmisión. La infección en caninos y bovinos ha sido reportada en varios países, pero con escasa manifestación neurológica (Dubey, 2003; Dubey *et al.*, 2007; Dubey y Shares, 2011). En los estudios epidemiológicos realizados por Basso *et al.* (2001) se demostraron

prevalencias variadas, donde los caninos de zonas urbanas presentaron menor infección comparado con aquellos de establos; asimismo refiere que la prevalencia aumenta cuando los canes proceden de establos con mayor casuística de abortos bovinos.

La infección por *N. caninum* se ha presentado en establos bovinos del Perú (Horna *et al.*, 2003; Quevedo *et al.*, 2003). La cuenca lechera de Lima no es ajena a los problemas reproductivos y la presencia de *N. caninum*, ya que ha sido demostrada en varios establos de Lima (Silva *et al.*, 2002) desconociéndose la fuente de infección. Por otro lado, Rivera *et al.* (2000) reportaron que 62.1% de las vacas en Lima con antecedentes de aborto tenían anticuerpos anti-*Neospora caninum*. Asimismo, Rivera (2001) reportó que 40% de los fetos bovinos abortados fueron positivos a este parásito.

Dubey *et al.* (1996) menciona que las técnicas serológicas de diagnóstico usadas para la detección de anticuerpos frente a este parásito son el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunofluorescencia indirecta (IFI), test de aglutinación para *Neospora* y Western Blot. El presente estudio tuvo como objetivo determinar la seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos de establos lecheros de Lima, Perú, mediante las técnicas de ELISA e IFI, así como determinar la concordancia entre ambas técnicas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue realizado en bovinos lecheros estabulados del valle de Lima, ubicado en la costa central del Perú. La zona se encuentra ubicada entre los 0 y los 500 msnm, de clima templado, con alta nubosidad en el invierno y humedad relativa de 75-80% (SENAMHI, 2016). El tamaño muestral fue calculado con base al censo del Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI, 2012).

Entre junio de 2015 y diciembre de 2016 fueron muestreados 3407 bovinos provenientes de 101 establos lecheros ubicados en el valle de Lima: Barranca (103), Huaura (581), Huaral (412), Canta (263), Lima (570), Huarochirí (446), Cañete (450) y Yauyos (582). Las muestras de sangre se extrajeron por punción de la vena yugular y se llevaron al Laboratorio de Parasitología Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, donde fueron centrifugadas a 1500 g por 5 minutos. El suero obtenido se colocó en microtubos de 1.5 ml y se les mantuvo en congelación hasta su procesamiento.

La presencia de anticuerpos frente a *N. caninum* se determinó mediante la técnica de ELISA utilizando el kit comercial *Neospora* Ab Test (IDEXX, EEUU), considerando el protocolo del fabricante. La sensibilidad y especificidad de las pruebas es de 100 y 99.2%, respectivamente. Los valores de la densidad óptica se midieron usando un espectrofotómetro de 650 nm.

La detección de anticuerpos de *N. caninum* en suero se determinó, además, mediante la técnica del IFI. Se utilizó el antígeno de *N. caninum* ( $10^7$ /ml taquizoitos formolados, cepa NcSp7), Anti IgG bovino marcado con isotiocianato de fluoresceína (VMRD, EEUU), en una dilución de 1:200. Asimismo, se utilizaron suero bovino control

positivo y negativo a anticuerpos contra *N. caninum*. Para la interpretación se consideraron como muestras positivas al observarse el color fluorescente total del taquizoito y negativas al carecer de fluorescencia o presentar fluorescencia parcial.

Los resultados de prevalencia se expresaron en forma porcentual. Se estimó la sensibilidad ( $S = \text{VPI}/(\text{VPI} + \text{FPI}) * 100$ ), especificidad ( $E = \text{VNI}/(\text{FNI} + \text{VNI}) * 100$ ), valor predictivo positivo ( $\text{VPP} = \text{VPI}/(\text{VPI} + \text{FPI}) * 100$ ) y valor predictivo negativo ( $\text{VPN} = \text{VNI}/(\text{FNI} + \text{VNI}) * 100$ ) de ambas técnicas, donde VPI y VNI = verdaderos positivos y negativos a IFI, respectivamente, y FPI y FNI = Falsos positivos y negativos a IFI, respectivamente. Los resultados fueron categorizados como positivos y negativos en tabulación cruzada, y comparados por posibilidades de ser positivos mediante el test de kappa de Cohen (concordancia) con un nivel de significancia de 95%. La técnica de ELISA fue considerada como «gold standard».

## RESULTADOS

La seropositividad de anticuerpos frente a *N. caninum* en bovinos provenientes del valle lechero de Lima fue de 31.0% (1023/3407) mediante la técnica de ELISA y 29.9% (1018/3407) mediante IFI (Cuadro 1). De los 101 establos evaluados, 69 de ellos (68.3%) presentaron bovinos con anticuerpos contra el parásito detectados por ambas pruebas serológicas. La concordancia entre las dos técnicas diagnósticas fue buena ( $K=0.98$ ) y estadísticamente significativa ( $p<0.001$ ) (Cuadro 2).

La sensibilidad de IFI fue 98.1% y la especificidad de 99.4%. Los cálculos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) con 95% de intervalo de confianza se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 1. Presencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* en muestras de suero de bovinos del valle de Lima mediante las técnicas de ELISA e inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Provincias	Muestras (n)	ELISA		IFI	
		Muestras positivas		Muestras positivas	
		n	% ± IC 95%	n	% ± IC 95%
Barranca	103	19	18.5 ± 7.5	17	16.5 ± 7.2
Huaura	581	109	18.8 ± 3.2	103	17.7 ± 3.1
Huaral	412	104	25.2 ± 4.2	102	24.8 ± 4.2
Canta	264	84	31.8 ± 5.6	81	30.7 ± 5.6
Lima	570	184	32.3 ± 7.5	182	31.9 ± 7.5
Huarocharí	446	144	32.3 ± 4.3	146	32.7 ± 4.4
Cañete	450	186	41.3 ± 4.6	191	42.4 ± 4.6
Yauyos	582	193	33.2 ± 3.8	196	33.7 ± 3.8
Total	3407	1023	31.0 ± 1.5	1018	29.9 ± 1.5

Cuadro 2. Comparación de resultados positivos a *N. caninum* de muestras de suero de bovinos del valle de Lima, mediante las técnicas de ELISA e inmunofluorescencia indirecta (IFI)

ELISA	IFI		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	1003	20	1023
Negativo	15	2369	2384
Total	1018	2389	3407

(K=0.98)

## DISCUSIÓN

La seroprevalencia del protozoario *Neospora caninum* en ganado bovino lechero ha sido estudiado en diversas partes del mundo (Huong *et al.*, 1998; Bae *et al.*, 2000; Ooi *et al.* 2000), así como su importancia como agente causal de abortos en bovinos (Gondim

*et al.*, 1999; Atkinson *et al.* 2000). La cuenca lechera de Lima es una de las principales fuentes de abastecimiento de productos lácteos del Perú, y el presente estudio reveló una prevalencia anti-*N. caninum* de 31.0% (1023/3407) en sueros bovinos provenientes de 101 establos lecheros mediante la prueba de ELISA y 29.8% (1018/3407) mediante la técnica de IFI, además de una seroprevalencia intra-rebaño de 68.3% (69/101) mediante ambas técnicas. Estos resultados demuestran que la seroprevalencia frente a *N. caninum* en los establos lecheros de Lima es moderada de manera individual y alta a nivel intra-rebaño.

Davison *et al.* (1999) evaluaron en el Reino Unido mediante la prueba de ELISA a 372 vacas con terneros neonatos previos a la ingesta de calostro, encontrando 124 vacas y 188 terneros seropositivos a *N. caninum*, dando una probabilidad de transmisión vertical de 95.2%. Estos resultados revelan que las vacas seropositivas tienen mayor probabilidad de producir terneros infectados y perpetuar la infección del hato.

Cuadro 3. Resultados de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo mediante las técnicas de ELISA como *gold standard* e inmunofluorescencia indirecta (IFI) en muestras de bovino del valle de Lima

Técnicas	Seroprevalencia (95% IC)	Sensibilidad (%) (95% IC)	Especificidad (%) (95% IC)	VPP <sup>1</sup> (%) (95% IC)	VPN <sup>2</sup> (%) (95% IC)
ELISA	31.0 (29.5-32.6)	100	100	100	100
IFI	29.9 (28.3-31.4)	98.1 (96.5-99.6)	99.4 (97.8-100)	98.5 (97.0-100)	99.2 (97.6-100)

<sup>1</sup> Valor predictivo positivo

<sup>2</sup> Valor predictivo negativo

Los resultados confirman la presencia continuada de *N. caninum* en el departamento de Lima. En estudios en otras localidades, como en Chachapoyas en bovinos lecheros de crianza extensiva mayores de dos años se encontró 40.4% (107/265) de seropositividad a este parásito mediante IFI (Quevedo *et al.*, 2003), mientras en Junín, utilizando la misma técnica, se encontró 12.8±3.5% (45/347) de prevalencia (Puray *et al.*, 2006).

*N. caninum* tiene un gran impacto a nivel mundial. Gondim *et al.* (1999) reportaron una prevalencia de 14.1% en 447 bovinos en Bahía, Brasil; Campero *et al.* (1998) encontró una seroprevalencia de 56.9% en Argentina; Buxton *et al.* (1997) señalaron una seroprevalencia de 59% en vacas con historias de abortos en Escocia; Ooi *et al.* (2000) encontraron 44.9% de anticuerpos positivos a *N. caninum* en Taiwán; y Atkinson *et al.* (2000) reportaron 24% de seroprevalencia en 266 bovinos lecheros en Australia tras un periodo de abortos. Todos los resultados mencionados fueron determinados a través de IFI. Por otro lado, estudios realizados mediante la técnica de ELISA por Kowalczyk *et al.* (2016) en 97 hatos lecheros en Polonia reportaron una prevalencia de 56.7% (56/97) frente a *N. caninum*; en tanto que Enachescu *et al.* (2014) reportaron en el sur de Rumanía

seroprevalencias de *N. caninum* de 45 y 56.8%, utilizando dos kits comerciales de ELISA. Estos resultados demuestran que el parásito es cosmopolita y la prevalencia es mayor en el ganado lechero por el propósito y tiempo de vida.

## CONCLUSIONES

- Se encontró una prevalencia individual moderada de anticuerpos frente a *N. caninum* de 31.0 ± 1.5% mediante la técnica de ELISA y 29.8 ± 1.5% mediante la técnica de IFI en 3407 bovinos de propósito lechero de Lima, Perú.
- La concordancia diagnóstica entre las técnicas serológicas ELISA e IFI frente a *N. caninum* en bovinos es buena (K=0.98).
- Se encontró una prevalencia intra-rebaño alta de anticuerpos frente a *N. caninum* (68.3%; 69/101) mediante las técnicas de ELISA e IFI.

## Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento del estudio al Fondo para la Innovación, Ciencia y Tecnología (FINCyT-Innovate Perú),

Proyecto «Obtención y caracterización del primer aislado de *Neospora caninum* causante de abortos y mortalidad neonatal en la producción bovina lechera del Perú, con fines inmunodiagnóstico y vacunal» (Contrato 167-PNICP-PIAP-2015 FINCYT); al Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) por el apoyo financiero brindado a la Red Temática 113RT0469 PROTOZOOVAC: «Diagnóstico y control de las protozoosis reproductivas del ganado bovino» que permitió la capacitación técnica de los investigadores para la ejecución del estudio. Del mismo modo, al Dr. Luis Miguel Ortega-Mora y al Grupo SALUVET de la Universidad Complutense de Madrid, España, por la donación de la cepa de *Neospora caninum* (NcSp7).

#### LITERATURA CITADA

1. **Atkinson RA, Cook RW, Reddacliff LA, Rothwell J, Broady KW, Harper P, Ellis JT. 2000.** Seroprevalence of *Neospora caninum* infection following an abortion outbreak in dairy cattle herd. *Aust Vet J* 78: 262-266. doi: 10.1111/j.1751-0813.2000.tb11752.x
2. **Bae JS, Kim DY, Hwang WS, Kim JH, Lee NS, Nam HW. 2000.** Detection of IgG antibody against *Neospora caninum* in cattle in Korea. *Korean J Parasitol* 38: 245-249.
3. **Basso W, Venturini L, Venturini C, Moore P, Rambeau M, Unzaga J.M, Campero C, et al. 2001.** Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef-cattle farms, dairy farms, and urban areas of Argentina. *J Parasitol* 87: 906-907. doi: 10.1645/0022-3395(2001)-087[0906:PONCII]2.0.CO;2
4. **Davison HC, Otter A, Trees AJ. 1999.** Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *Int J Parasitol* 29: 1683-1689.
5. **Dubey J, Lindsay DS. 1996.** A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol* 67: 1-59. doi: 0.1016/S0304-4017(96)01035-7
6. **Dubey J, Schares G, Ortega-Mora L. 2007.** Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Rev* 20: 323-367. doi: 10.1128/CMR.00031-06
7. **Dubey J. 2003.** Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J Parasitol* 41: 1-16. doi: 10.3347/kjp.2003.41.1.1
8. **Enachescu V, Ionita M, Miltrea L. 2014.** Comparative study for the detection of antibodies to *Neospora caninum* in mild and sera in dairy cattle in southern Romania. *Acta Parasitol* 59: 5-10. doi: 10.2478/s11686-014-0202-x
9. **Gondim LF, Sartor IF, Hasegawa M, Yamane I. 1999.** Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. *Vet Parasitol* 86: 71-75.
10. **Horna S, Chávez A, Casas E, Serrano-Martínez E. 2003.** Seroprevalencia de *Neospora caninum* en caninos de dos distritos de la provincia de Chachapoyas. *Rev Inv Vet Perú* 14: 150-154. doi: 10.15381/rivep.v14i2.1620
11. **Huong LT, Ljungstrom BL, Uggla A, Bjorkman C. 1998.** Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes in southern Vietnam. *Vet Parasitol* 75: 53-57. doi: 10.1016/S0304-4017(97)00178-7
12. **[INEI] Instituto Nacional de Estadística e Informática. 2012.** IV Censo Nacional Agropecuario 2012. [Internet]. Disponible en: <http://censos.inei.gob.pe/cenagro/tabulados/?id=Censos Nacionales>
13. **Knowler C, Wheeler S. 1995.** *Neospora caninum* infection in three dogs. *J Small Anim Pract* 36: 172-177. doi: 10.1111/j.1748-5827.1995.tb02875.x
14. **Kowalczyk S, Czopowicz M, Weber C, Müller E, Witkowski E, Kaba J. 2016.** Herd-level seroprevalence of *Neospora*

- caninum* infection in dairy cattle in central and northeastern Poland. *Acta Parasitol* 61: 63-65. doi: 10.1515/ap-2016-0006
15. **McAllister M, Dubey J, Lindsay D, Jolley WR, Wills R, McGuire A. 1998.** Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 28: 1473-1478. doi: 10.1016/S0020-7519(98)00138-6
  16. **Ooi HK, Huang CH, Yang S, Lee H. 2000.** Serological survey and first finding of *Neospora caninum* in Taiwan, and the detection of this antibodies in various body fluids of cattle. *Vet Parasitol* 90: 47-55. doi: 10.1016/S0304-4017(00)-00211-9
  17. **Puray N, Chávez A, Casas E, Falcón N, Casas G. 2006.** Prevalencia de *Neospora caninum* en bovinos de una empresa ganadera de la sierra central del Perú. *Rev Inv Vet Perú* 17: 189-194. doi: 10.15381/rivep.v17i2.1542
  18. **Quevedo J, Chávez A.; Rivera H, Casas E, Serrano-Martínez E. 2003.** Neosporosis en bovinos lecheros en dos distritos de la provincia de Chachapoyas. *Rev Inv Vet Perú* 14: 33-37. doi: 10.15381/rivep.v14i1.1594
  19. **Rivera H, Nelson D, Tabacchi L. 2000.** *Neospora caninum* y otros agentes en fetos abortados de bovinos lecheros del valle de Lima. *Rev Inv Vet Perú* 11(1): 1-7. doi: 10.15381/rivep.v11i1.6766
  20. **Rivera H. 2001.** Causas frecuentes de aborto bovino. *Rev Inv Perú* 12(2):117-122.
  21. **[SENAMHI] Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú. 2016.** Pronósticos climáticos. [Internet]. Disponible en: [http://www.senamhi.gob.pe/main\\_mapa.php?t=dHi](http://www.senamhi.gob.pe/main_mapa.php?t=dHi)
  22. **Silva P, Chávez A, Rivera H, Casas E. 2002.** Seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos lecheros del valle de Lima. *Rev Inv Vet Perú* 13(2): 51-55. doi: 10.15381/rivep.v13i2.7330