

## Aborto bovino: casuística y optimización del diagnóstico en la DILAVE “Miguel C. Rubino”, Uruguay

Easton C.<sup>1</sup>, Paullier C.<sup>1</sup>, Bañales P.<sup>1</sup>

### RESUMEN

Se presentan los diagnósticos realizados a los fetos bovinos remitidos al Laboratorio “Miguel C. Rubino”, Uruguay, en el período 1996 / 2002. Se estudiaron 255 fetos, en los que se realizaron estudios histopatológicos, bacteriológicos y serológicos.

En un primer período, que va de 1996 a 1998, se estudiaron 51 fetos, habiéndose diagnosticado la etiología en el 50.9 % de los casos: 43.1 % de etiología bacteriana, 5.9 % etiología viral, 1.9 % etiología micótica. En este período no se llegó a un diagnóstico etiológico en el 49.1 % de los casos. En 1998 se fija como objetivo aumentar el porcentaje de abortos en los que se llega a un diagnóstico, planteándose un cambio en el protocolo de trabajo y la incorporación de nuevas técnicas de diagnóstico. A partir de enero de 1999 se incorporan a la rutina diagnóstica técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) para detección de antígeno de *N. caninum* y Diarrea Viral Bovina (BVD), así como técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y de ELISA para detección de anticuerpos anti *N. caninum*. En el período que va de 1999 al 2002 se estudiaron 204 fetos, habiéndose diagnosticado el agente causal en un 61,8 % de los casos: 38.2 % de etiología bacteriana, 0.5 % de etiología micótica, 1 % de etiología vírica y 22 % de etiología parasitaria (*N. caninum*). En un 38.2 % de los casos no se llegó al diagnóstico etiológico.

**Palabras Clave:** Aborto, bovino, etiología, diagnóstico, Uruguay

### SUMMARY

This paper presents the diagnosis of bovine aborted fetuses submitted during 1996/2002 to the DILAVE “Miguel C. Rubino” main laboratory. A total of 255 fetuses were studied by means of histopathological, bacteriological and serological tests.

During a first period from 1996 to 1998, 51 fetuses were studied and an etiological diagnosis was obtained in the 50.9 % of those fetuses: 43.1 % bacteriological, 5.9 % viral, and 1.9 % fungal etiology. During this first period 49.1 % of the abortions submitted remained undiagnosed. In 1998 the decision of improving the diagnosis of the submitted fetuses was taken; changes in the working protocol were done, as well as new diagnostic techniques were included.

Since January 1999 immunohistochemical (IHC) techniques for the detection of *N. caninum* and Bovine Viral Diarrhea antigens as well as an indirect fluorescence antibody test (IFAT) and ELISA test for *N. caninum* became available at the Laboratory. During a second period from 1999 to 2002, 204 fetuses were studied and an etiological diagnosis was obtained in the 61,8 % of the fetuses: 38.2 % bacteriological, 0.5 % fungal, 1 % viral and 22 % parasitic etiology (*N. caninum*). During this second period 38.2 % of the abortions remained undiagnosed.

**Key words:** abortion, bovine, etiology, diagnosis, Uruguay.

### INTRODUCCIÓN

Las pérdidas de la preñez se clasifican como mortalidad embrionaria si ocurren antes del día 42 de gestación (placentación), aborto cuando ocurren entre el día 42 y el 260, y parto prematuro si la pérdida es posterior al día 260 (23).

Los abortos figuran como causantes de las mayores pérdidas económicas en la industria ganadera a nivel mundial, siendo numerosos los agentes etiológicos que los provocan (2, 6, 17). La identificación de las causas sólo se logra en menos de la mitad de los fetos abortados remitidos a los laboratorios de diagnóstico (2, 17, 18). Estudios realizados en USA

sobre las más importantes etiologías diagnosticadas revelan una variedad de causas infecciosas con diferencias regionales. Clima, tipo de producción, alimentación, movimientos de animales, prácticas de manejo, poblaciones de animales silvestres, programas de vacunación, así como la calidad de las muestras remitidas a los laboratorios de diagnóstico y los exámenes que allí se realicen, van a influir en la clasificación de causas de abortos en el área (2).

Diferentes autores estiman como normales variados porcentajes de aborto, promediando un 2-5% de aborto cuando consideramos solamente los abortos obser-

vados y de un 5-8% sumando abortos observados o no observados en un rodeo (16).

Con nuevos conocimientos y mejorando las pruebas diagnósticas, nuevas causas de aborto están emergiendo como significativas en algunas regiones en el mundo, por ejemplo la infección por *Neospora caninum*. En 1989 se describe a este protozoo como causante de aborto en bovinos (22) y dos años más tarde ya es descrita como causando importantes pérdidas (1). Hoy en día es una de las principales etiologías diagnosticadas a nivel mundial (10), existiendo diagnósticos en lo que a la región se refiere, en Brasil (13), Argentina (8, 24) y también en Uruguay (3, 4).

Recibido: 17/03/03 Aprobado: 15/09/03

<sup>1</sup> DILAVE “Miguel C. Rubino, Departamento de Patobiología, Montevideo, Uruguay. Email: reprodilave@adinet.com.uy

En el Laboratorio "Miguel C. Rubino" se ha trabajado, desde su creación, en el diagnóstico etiológico de aborto bovino. En el marco del proyecto JICA/DILAVE (1996/2002), uno de los principales objetivos fue el mejoramiento de las técnicas de diagnóstico de las enfermedades abortivas y cuantificación de la importancia de las mismas. A fin de lograr un diagnóstico más eficaz se cambió el protocolo de trabajo y se incorporaron nuevas técnicas. Dada la importancia que estaba adquiriendo la *N. caninum* como causante de aborto en numerosos países y la evidencia serológica de su presencia en Uruguay (5), existía la presunción de que podía estar causando problemas en nuestros rodeos, por lo que una de las prioridades fue la puesta a punto las técnicas diagnósticas para este agente.

La identificación de los agentes etiológicos del aborto requiere el trabajo de un equipo multidisciplinario con experiencia en una variedad de procedimientos. En la DILAVE y ya desde hace unos años, se ha conformado un equipo así, con técnicos especializados en las distintas áreas diagnósticas, a fin de optimizar el diagnóstico de los casos de aborto.

Se debe confeccionar una historia clínica completa, estudiar los tejidos fetales y placenta, realizar estudios microbiológicos y serológicos, tanto del suero materno como de los fluidos fetales. En algunos casos es necesario contar con muestras de suero pareadas a fin de estudiar seroconversión de la madre frente a determinados patógenos. Sin embargo la serología de una sola muestra de una vaca abortada puede dar valiosa información para determinar exposición o no a determinados patógenos.

La elaboración de un protocolo en donde se recabe siempre toda la información pertinente a este tipo de patología, la toma adecuada de las muestras y su remisión a las diferentes secciones especializadas con que debe contar un laboratorio de diagnóstico (serología, bacteriología, virología, histopatología e inmunohistoquímica), son puntos necesarios para mejorar la respuesta y poder acumular información sobre este grave problema. A partir de ese conocimiento adquirido se pueden establecer diferencias regionales que permitirán mejorar la

calidad y efectividad de las medidas de manejo, así como la adecuación de las estrategias de control.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se presentan las principales etiologías diagnosticadas en la DILAVE "Miguel C. Rubino", en el período 1996/2002. No se trata de un muestreo o de un estudio programado, sino que se estudiaron los fetos bovinos abortados remitidos al Laboratorio.

Se estudiaron 255 fetos bovinos entre los años 1996 y 2002. Según la metodología diagnóstica empleada se distinguen dos períodos.

Durante un primer período, comprendido entre los años 1996 a 1998, la rutina diagnóstica consistía en realizar la autopsia de los fetos bovinos, toma de muestras para realizar estudios histopatológicos (hígado, riñón, pulmón) y bacteriológicos (hígado, contenido de cuajo, pulmón) para descartar *Campylobacter fetus* sp. y *Tritrichomonas foetus*. En caso de sospecha de Leptospirosis se realizaba la técnica de tinción argéntica de Levaditi para visualizar espiroquetas en riñón e hígado y con el suero de la vaca abortada la técnica de micro aglutinación (MAT) para identificación y titulación de anticuerpos. En este período se estudiaron 51 fetos.

A partir de 1999 se modificó la metodología en la toma de muestras para histopatología, incluyendo muestras de corazón, lengua, timo y, fundamentalmente, de sistema nervioso central, aun cuando éste se encontrara autolítico. También se incorporaron las técnicas de inmunohistoquímica por el método de complejo peroxidasa avidina-biotina (15). En este segundo período, 1999 / 2002, se estudiaron 204 fetos. El protocolo actual de trabajo comprende:

**Patología e histopatología:** Se realiza la autopsia del feto recibido y se efectúan estudios macro e histopatológicos. Algunos agentes infecciosos provocan lesiones características que permiten un diagnóstico presuntivo, mientras muchas veces sólo se logra orientar el diagnóstico. Se pueden realizar estudios inmunohistoquímicos para detectar o confirmar el agente infeccioso. Por este último método en la Sección Histopatología se reali-

za el diagnóstico de Neospora (20), BVD (7, 12) e IBR (15).

**Bacteriología:** Las muestras retiradas durante la necropsia son remitidas a la Sección Bacteriología, en donde son sembradas en medios específicos para aislamiento e identificación de *Salmonella* sp., *Brucella* sp., *Campylobacter fetus*, *Trichomonas foetus*, *E. coli*, *Actinomyces pyogenes*, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Pasterurella* sp., *Pseudomonas* sp. y *Listeria monocytogenes*.

**Leptospirosis:** En la Sección Leptospirosis se realiza el test de micro aglutinación (MAT) para la determinación de anticuerpos anti *Leptospira* (11).

**Brucelosis:** En la Sección Brucelosis se realiza el test Rosa de Bengala y pruebas complementarias para su diagnóstico serológico.

**Neosporosis:** En el Departamento de Patobiología (Patología Clínica/Reproducción) se realizan dos técnicas para la determinación de anticuerpos anti *N. caninum*: test de inmunofluorescencia indirecta (9, 21, 26) y test de ELISA (19).

**Virología:** En el Departamento de Virología se realizan estudios serológicos para IBR y BVD (tests de ELISA indirecto, Herd Chek, IDEXX, USA), así como la técnica de la reacción de polimerasa en cadena (PCR) para detectar el virus de IBR (25) y de BVD (13) presentes en los tejidos fetales.

Las pruebas serológicas para Leptospirosis, Brucelosis, Neosporosis, IBR y BVD se realizan tanto en suero de la vaca abortada como en fluidos fetales. En lo que refiere a los resultados en fluidos fetales, siempre debe tenerse en cuenta la edad del feto; fetos muy jóvenes pueden no ser inmuno competentes y por lo tanto no producir anticuerpos.

## RESULTADOS

Durante el primer período, que va del año 1996 al 1998, se estudiaron 51 fetos, habiéndose podido establecer la causa de aborto en 26 casos (50.9 %) (Cuadro 1).

Las etiologías diagnosticadas en este período fueron las siguientes:

\*Etiología bacteriana: 22 de los abortos (43.1 %), discriminados de la siguiente

manera: 5 por *Campylobacter fetus* (9.8 %), 13 por *Leptospira* sp. (25.5 %), 1 por *Streptococcus* sp. (1.9 %) y 3 de etiología bacteriana sin identificación del agente (5.9 %).

•Etiología viral: 3 abortos (5.9 %), 2 por IBR (3.9 %) y 1 por BVD (1.9 %).

•Etiología micótica: 1 aborto (1.9 %).

En 25 (49.1 %) de los 51 fetos abortados recibidos, no pudo arribarse a ningún diagnóstico.

En el segundo período, al agregarse nuevas técnicas diagnósticas y modificarse el protocolo de trabajo, mejoró la capa-

cidad de respuesta de la DILAVE, lo que se tradujo en un porcentaje mayor de diagnósticos etiológicos y posiblemente la mayor cantidad de fetos remitidos para su estudio (Gráfica 1).

Las etiologías diagnosticadas en este segundo período fueron las siguientes (Cuadro 2):

•Etiología bacteriana: 78 de los abortos (38,2%), discriminados de la siguiente manera: 22 por *Campylobacter fetus* (11%), 3 por *Brucella abortus* (1,5%), 48 por *Leptospira* sp. (24%) y 5 de etiología bacteriana sin identificación del agente (2,5%).

•Etiología viral (BVD): 2 abortos (1%)

•Etiología micótica: 1 aborto (0.5%).

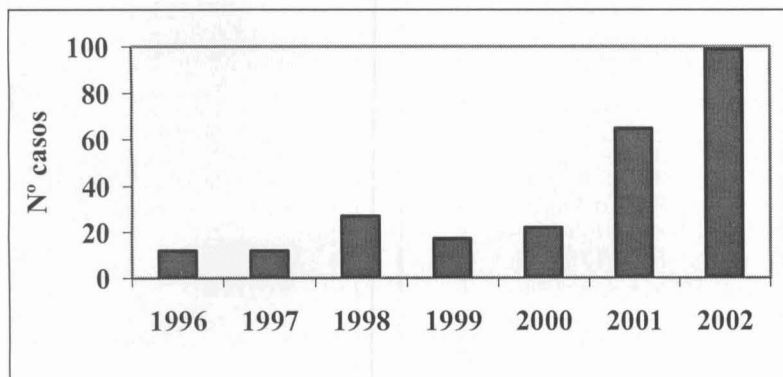
•Etiología parasitaria, *Neospora caninum*, 45 abortos (22%).

En 78 (38,2 %) de los 204 fetos abortados recibidos, no pudo arribarse a ningún diagnóstico.

Se han encontrado varios patógenos presentes en un mismo feto abortado. Así por ejemplo se han visto asociaciones de *N. caninum* con *Campylobacter* sp.; *N. caninum* con *Leptospira* sp. y *Campylobacter* sp. con *Leptospira* sp.

Cuadro 1. Etiologías diagnosticadas en el período 1996 – 1998.

Etiología diagnosticada	Nº de fetos (n)	Porcentaje sobre el total estudiado
<b>BACTERIANA</b>	22	43.1 %
<i>Campylobacter fetus</i> sp.	5	9.8 %
<i>Brucella abortus</i>	0	0 %
<i>Leptospira</i> sp.	13	25.5 %
<i>Streptococcus</i> sp.	1	1.9 %
Sin identificar	3	5.9 %
<b>VIRAL</b>	3	5.9 %
IBR	2	3.9 %
BVD	1	1.9 %
<b>MICOTICA</b>	1	1.9 %
<b>SIN DIAGNOSTICO</b>	25	49.0 %
<b>TOTAL</b>	51	100 %



Gráfica 1. Fetos abortados estudiados por año.

## CONCLUSIONES

Lo primero que surge del estudio de ambos períodos considerados es la mayor efectividad diagnóstica del Laboratorio en el segundo período considerado en este trabajo, es decir, a partir de 1999. Varios factores influyeron en esa mejora: cambios en el protocolo que se sigue en todos los casos, incorporación de nuevas técnicas y equipos, entrenamiento del personal, y por sobre todo, el establecimiento de mejores comunicaciones entre el laboratorio y el veterinario en ejercicio liberal.

Resulta imprescindible seguir sistemáticamente el protocolo de trabajo; de esta manera fue posible diagnosticar la presencia de más de un patógeno en un mis-

**Cuadro 2.** Etiologías diagnosticadas en el período 1999 – 2002.

Etiología diagnosticada	Nº de fetos (n)	Porcentaje sobre el total estudiado
<b>BACTERIANA</b>	78	38.2 %
<i>Campylobacter fetus</i> sp.	22	10.8 %
<i>Brucella abortus</i>	3	1.5 %
<i>Leptospira</i> sp.	48	23.5 %
Sin identificar	5	2.4 %
<b>VIRAL - BVD</b>	2	1 %
<b>MICOTICA</b>	1	0.5 %
<b>PARASITARIA (N. caninum)</b>	45	22 %
<b>SIN DIAGNOSTICO</b>	78	38.2 %
<b>TOTAL</b>	204	100 %

mo feto. No es fácil determinar en esos casos cuál fue el microorganismo causante de la muerte del feto; para ello es necesario considerar la edad del feto, la historia del rodeo, otros síntomas clínicos en el mismo y la extensión de las lesiones en el feto producidas por cada uno de los microorganismos actuantes. Hay microorganismos que actúan en forma crónica y otros en forma aguda, pudiendo ser estos últimos los desencadenantes del aborto, mientras los primeros podrían estar actuando como predisponentes.

Es necesario aclarar aquí nuevamente que los datos presentados no provienen de un muestreo o de un estudio programado; son los datos obtenidos a partir de los fetos bovinos remitidos al Laboratorio. Esto lleva a que la mayoría de los fetos estudiados tengan un desarrollo de 4-5 meses o más, los fetos de menos desarrollo son difíciles de encontrar. Por esto mismo es posible que algunas etio-

logías pueden aparecer en bajos porcentajes, por ejemplo las etiologías víricas. Esto se debe a que estas últimas muchas veces producen mortalidad embrionaria y aborto temprano, no remitiéndose al Laboratorio feto alguno en esos casos.

En el primer período se llegó a un diagnóstico en el 50.9 % de los casos, pasándose a un 61.8 % en el segundo período. Se debe remarcar el impacto de la incorporación de técnicas diagnósticas. Es quizás éste el camino a seguir para mejorar el diagnóstico de otros agentes como los de etiología viral, que muy posiblemente estén subestimados debido a la complejidad de su detección.

Se destaca la importancia que tuvo el trabajo en un equipo multidisciplinario, conformado por técnicos con experiencia en técnicas histopatológicas, inmunohistoquímicas, bacteriológicas, virológicas y serológicas, para estudiar y llegar a un diagnóstico en un problema tan

complejo como es el aborto bovino. El trabajo coordinado de todas las secciones especializadas del área diagnóstica de la DILAVE es fundamental para llegar a un diagnóstico etiológico en los casos de aborto.

La actualización permanente de las técnicas es imprescindible; ya hemos visto en este trabajo como recién a partir de 1999 fue posible diagnosticar a la *Neospora caninum* como causa de aborto, cuando muy probablemente este agente ha estado actuando en el medio con bastante anterioridad a esa fecha.

#### Agradecimientos

Nuestro agradecimiento a quienes integran el equipo multidisciplinario que hizo posible este trabajo: los colegas María V. Repiso, María A. Olivera, Blanca Herrera, Mariela Silva, Helena Guarino, Néstor D'Anatro y Milton Pizzorno, así como también a sus ayudantes técnicos.

#### Referencias Bibliográficas

- Anderson, M.L.; Blanchard, P.C.; Barr, B.C.; Dubey, J.P.; Hoffman, R.L.; Conrad, P.A. (1991). Neospora-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc., 198: 241-244.
- Anderson, M. (2000) Fetal infection and abortion in cattle. Proceedings XXI World Buiatrics Congress, Punta del Este, Uruguay.
- Bañales, P.; Easton C.; Haritani, M.; Kashiwazaki, Y.; Paullier C.; Pizzorno, M. (2000) Bovine Abortion in Uruguay caused by *Neospora caninum*: First Diagnosis. Proceedings XXI World Buiatrics Congress., Punta del Este, Uruguay.
- Bañales, P.; Easton, C.; Paullier, C.; Pizzorno, M. (1999). Aborto bovino por *Neospora caninum* en el Uruguay: primeros diagnósticos. Veterinaria 34 (139-140): 28-32.
- Barber, J.S.; Glasser, R.D.; Ellis, J. (1997). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. J Parasitol 83 (6): 1056-1058.
- Barr, B.C. et al. (1993) Infectious diseases causing bovine abortion and fetal loss. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, volume 9, Number 2, July 1993.



7. **Baszler, T.V.; Evermann, J.F.; Kaylor, P.S.; Byington, T.C.; Dilbeck, P.M.** (1995). Diagnosis of Naturally Occurring Bovine Viral Diarrhea Virus Infections in Ruminants Using Monoclonal Antibody- based Immunohistochemistry. *Vet. Pathol.* 32: 609-618.
8. **Campero, C.M.; Anderson, M.L.; Conosciuto, G.; Odriozola, H.; Bretschneider, G.; Poso M.A.** (1998) *Neospora caninum* associated abortion in a dairy herd in Argentina. *Veterinary Record* 143: 228-229.
9. **Dubey, J.P.; Lindsay, D.S.; Adams, D.S.; Gay, J.M.; Baszler, T.V.; Blagburn, B.L.; Thulliez, P.** (1996). Serological responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. *A.J.V.R.*, 57 (3), 329-336.
10. **Dubey, J.P.; Lindsay, D.S.** (1996) A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*, 67: 1-59
11. **Faine, S.; Adler, B.; Bolin, C.; Perolat, P.** (1999). *Leptospira* and *Leptospirosis*, 2<sup>nd</sup> Edition. MediSci, Melbourne, Australia, pp 164-189.
12. **Haines, D.M.; Clark, E.G.; Dubovi, E.J.** (1992). Monoclonal Antibody-based Immunohistochemical Detection of Bovine Viral Diarrhea Virus in Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissues. *Vet Pathol.* 29: 27-32.
13. **Hyndman, L.; Vilcek S.; Conner J.; Nettleton P.C.** (1998). A novel nested reverse transcription PCR detects bovine viral diarrhea virus in fluid from aborted fetuses. *J. Virol. Methods*, 71:69-76.
14. **Gondim, L.F.P.; Sartor, I.F.; Hasegawa, M.; Yamane I.** (1999). Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil, *Veterinary Parasitology* 86:71-75.
15. **Hsu, S.M.; Raine, L.; Fanger, H.** (1981). Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem* 29: 577-580.
16. **Kinsel, M.L.** (1999). An epidemiologic approach to investigating abortion problems in dairy herds. *The Bovine Proceedings* 32:132-155.
17. **Kirkbride, C.A.** (1992) Etiologic agents detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. *J.Vet.Diagn.Invest.* 4:175-180 .
18. **Murray, R.D.** (1990). A field investigation of causes of abortion in dairy cattle. *Vet. Rec.* 127: 543-547.
19. **Osawa, T.; Wastling, J.; Maley, S.; Buxton, D.; Innes, E.A.** (1998) A multiple antigen ELISA to detect *Neospora*-specific antibodies in bovine sera, bovine foetal fluids, ovine and caprine sera. *Veterinary Parasitology*, 79:19-34.
20. **Otter, A.; Jeffrey, M.; Scholes, S.F.E. et al.** (1997). Comparison of histology with maternal and fetal serology for the diagnosis of abortion due to bovine neosporosis, *Veterinary Record*, 141: 487-489.
21. **Reichel, M.P.; Drake, J.M.** (1996). The diagnosis of *Neospora* abortions in cattle, *New Zealand Veterinary Journal*, 44: 151-154.
22. **Thilsted, J.P.; Dubey, J.P.** (1989). Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle, *J Vet Diagn Invest*, 1: 205-209.
23. **Thurmond, M.C.; Picanso, J.P.; Jameson, C.M.** (1990). Considerations for use of descriptive epidemiology to investigate fetal loss in dairy cows. *JAVMA*, 197:1305-1312.
24. **Venturini, M.C.; Venturini, L.; Bacigalupe, D. et al.** (1999). *Neospora caninum* infections in bovine fetuses and dairy cows with abortions in Argentina, *International Journal of Parasitology* 29: 1705-1708.
25. **Vilcek, S.; Nettleton, P.F.; Herring, J.A.; Herring, A.J.** (1994). Rapid detection of bovine herpesvirus 1 (BHV 1) using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol* 42 (1): 53-64.
26. **Wouda, W.; Dubey, J.P.; Jenkins, C.** (1997). Serological Diagnosis of Bovine Fetal Neosporosis. *J. Parasitol.* 83 (2): 545-547.

