

PROPUESTA PARA EL DIAGNÓSTICO DE ABORTOS Y ELABORACIÓN DE SEROPERFILES REPRODUCTIVOS EN EL GANADO VACUNO

EsnaI, A.; Extramiana, A.B. Analítica Veterinaria

1. ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE EL DIAGNÓSTICO

1.1. Serología

Los análisis serológicos para la detección de anticuerpos frente a diversos agentes causantes de patologías reproductivas son demandados a los laboratorios veterinarios de forma generalizada. Sin embargo, en muchas ocasiones estos análisis aportan escasa o nula información, como consecuencia de una elección errónea de los animales a muestrear o en un número insuficiente y no representativo del rebaño. La recogida de sueros de unos pocos animales abortados es la práctica más frecuente, sin tener en cuenta datos relevantes como el estatus vacunal o la edad de los animales.

1.1.1 Limitaciones de la serología

Las principales limitaciones que tienen los análisis serológicos son:

- Tras el contacto del animal con el agente infeccioso, la presencia de anticuerpos no implica necesariamente la existencia de infección, sino que puede responder a diferentes situaciones: infección presente y activa; infección antigua y superada; infección latente.

- Presencia de anticuerpos como consecuencia de vacunaciones anteriores.

- Presencia de anticuerpos de origen calostrado y por tanto de procedencia materna.

Por ello, los animales abortados no son necesariamente los más interesantes para realizar un análisis serológico, o al menos no sólo ellos, sino que puede haber otros (jóvenes, no vacunados, etc.) que ofrezcan mejor información sobre los microorganismos que pueden estar implicados en los abortos o en otras patologías reproductivas del rebaño. Además, el número de animales analizados debe ser el suficiente como para representar con fiabilidad a todo el rebaño. En general, 10

animales (o un 10% en rebaños de más de 100 cabezas) podría ser una cifra orientativa adecuada.

1.1.2 Perfiles serológicos

Se pueden definir como análisis serológicos más o menos sistemáticos de un número representativo de animales seleccionados con criterios diversos y previamente definidos. Siempre y cuando se tengan en cuenta las limitaciones ya comentadas de la serología y la interpretación variable que puede tener un resultado, la realización de perfiles puede ser de gran utilidad para el diagnóstico de patologías reproductivas en el rebaño. De esta manera, el análisis de abortos pasaría a un segundo plano y serviría principalmente para confirmar la implicación en ellos de las patologías ya diagnosticadas, así como para descartar o confirmar otras posibles etiologías no chequeadas serológicamente, principalmente de tipo bacteriano.

La elección de los animales a muestrear puede hacerse en base a diferentes criterios, que pueden buscar asimismo distintos objetivos o conclusiones. Algunos de estos criterios se exponen a continuación:

- En general, deben muestrearse animales no vacunados, salvo cuando se usan vacunas cuya respuesta inmune puede ser diferenciada a nivel analítico de la generada por el microorganismo “de campo” (vacunas marcadoras)

- Chequear tanto animales sanos como enfermos o problemáticos puede servir para observar diferencias significativas de prevalencia entre ambos grupos que permitan sospechar la implicación del agente.

- El estudio de la prevalencia distribuida por edades nos da idea de la evolución que ha seguido la enfermedad a lo largo de los años. Por otro lado, hay que tener en cuenta que los animales jóvenes seropositivos que ya han perdido sus

anticuerpos calostrales indican infección reciente. Estos animales son por lo general los que más información pueden aportar.

- Distribución de prevalencia por líneas familiares del rebaño.

- Distribución de prevalencia por origen de los animales (recría/compra)

- El chequeo serológico de los animales de nueva compra debe ser una práctica sistemática a asumir en la explotación.

CRITERIO	OBJETIVO
Requisitos generales	No vacunados. Sólo muestrear animales vacunados si el análisis serológico puede diferenciar anticuerpos vacunales de anticuerpos por virus campo (vacunas IBR marcadoras; vacunas BVD inactivadas, no inductoras de p80). Indicar la fecha exacta del aborto.
Animales jóvenes (6-18 meses)	Su positividad refleja presencia reciente del agente en el rebaño.
Sanos/problemáticos	Diferencias significativas en la seroprevalencia sugieren implicación del agente.
Animales de nueva introducción	Cuarentena y Chequeo serológico sistemático a animales comprados.
Animales expuestos en ferias	Cuarentena y Chequeo serológico sistemático a su regreso.
Diferentes líneas familiares	En el caso de Neospora, para determinar las líneas familiares portadoras.

1.2. Muestras de abortos

Muestras de origen materno	<ul style="list-style-type: none"> - Suero y sangre con anticoagulante (junto con un muestreo serológico más amplio que incluya animales abortados y animales jóvenes no vacunados) - Hisopo vaginal, con raspado energético de la mucosa vaginal (de varias madres recién abortadas)
Muestras de origen fetal	<ul style="list-style-type: none"> - Feto entero: muestra de elección para el diagnóstico de algunas de las causas más frecuentes de aborto como BVD o Neospora. - Placenta; en su defecto, hisopo vaginal de la madre. Fundamental para Chlamydia y Coxiella, así como especies bacterianas. - En caso de que se realice una necropsia del feto, conviene enviar las siguientes muestras: cabeza entera; contenido estomacal en frasco estéril; líquido fetal (exudado torácico/abdominal o sangre fetal); corazón; riñón; pulmón; hígado; piel.
Historial clínico y de manejo	<ul style="list-style-type: none"> - Presentación: incidencia, edad gestacional media - Otras patologías reproductivas: infertilidad, reabsorciones embrionarias, etc. - Información sobre los animales abortados: edades, antecedentes, parentesco, patologías coincidentes con la muerte fetal, etc. - Información sobre el rebaño: alimentación, pastoreo, tipo de estabulación, tipo de inseminación, vacunaciones, entradas de animales, etc.

Estas muestras, por sus particulares características deben llegar refrigeradas al laboratorio y convenientemente envasadas:

- Órganos frescos: envueltos en papel absorbente y dentro de bolsas herméticas.

- Fragmentos de órganos fijados en formol (formaldehído al 40%) al 10%, con un volumen 2,5 veces el de la muestra.

- La placenta y el feto entero lo más limpios posibles.

- Introducir el conjunto en una caja hermética, junto con varios acumuladores de hielo que no permitan el escape de fluidos.

2. DIAGNÓSTICO DE ABORTOS

Un panel diagnóstico de abortos debe incluir:

- Contenido abomasal fetal: cultivo microbiológico del contenido abomasal en medios generales y selectivos (Salmonella,

Campylobacter, Brucella, etc.); examen microscópico (Gram y Stamp).

- Líquido/sangre fetal: detección de antígeno viral de IBR y BVD.

- Órganos en fresco: opcionalmente, detección de antígenos (ELISA/PCR) de otros agentes.

- Hisopo vaginal: cultivo microbiológico; cultivo microbiológico del contenido abomasal en medios generales y selectivos (Salmonella, Campylobacter, Brucella, etc.); examen microscópico (Gram y Stamp) para Chlamydomphila y Coxiella.

- Suero materno: un panel reproductivo completo incluye serología de IBR (Ac totales o Ac gE según vacunación), BVD, Neospora, Chlamydomphila abortus, Coxiella burnetii y Leptospira serovar Hardjo.

- Organos en formol: histopatología, importante para el diagnóstico de aborto protozoario (Neospora).

3. SEROPERFILES REPRODUCTIVOS

3.1. Introducción y objetivos

El objetivo general de los seroperfiles es poner en evidencia la posible de patologías infecciosas y su impacto en los índices reproductivos de las explotaciones.

El éxito diagnóstico y las conclusiones que puedan extraerse son variables en función de varios parámetros: tamaño del rebaño y tipo de muestreo, prevalencia del rebaño, nivel de confianza y precisión que se desee alcanzar, etc.

La información que pueden aportar los seroperfiles es la siguiente:

- Existencia o no del patógeno (o de un contacto anterior con él) en el grupo poblacional analizado.

- Estimación de la prevalencia de cada patógeno en dicho grupo poblacional.

- Estimación (con valor estadístico limitado) de la seroprevalencia a nivel de rebaño completo mediante análisis de leche de Tanque.

- Seroconversiones: si el seroperfil se realiza sobre los mismos animales, transcurrido un determinado intervalo de tiempo (por ejemplo 6 meses), las seroconversiones indicarán la

circulación en el momento actual del patógeno en el rebaño.

El valor de este seroperfil es el de establecer un diagnóstico inicial de las posibles patologías infecciosas presentes en la explotación. Si se identifica la existencia de una o varias de ellas, se podrían establecer conclusiones más avanzadas, como la posible correlación entre seropositividad y fracaso reproductivo (aborto, infertilidad, etc.).

3.2. Planificación básica del muestreo

El muestreo puede ser "simple", si consideramos el rebaño como una única población, o "estratificado", si establecemos diferentes subpoblaciones, como por ejemplo diferenciar entre primíparas y múltiparas. En este último caso, el tamaño muestral necesario sería mayor, por lo que se puede ser interesante centrar el estudio en los animales con un mayor valor diagnóstico por edad y circunstancias epidemiológicas, que es el de novillas primerizas. El hecho de chequear animales jóvenes permite acotar en el tiempo la antigüedad de las infecciones que sean detectadas mediante serología.

Una vez concretada la población, la selección de los animales puede ser "aleatoria simple", a través de una randomización a partir del listado de animales, o "aleatoria sistemática", seleccionando al azar el primer animal (en la sala de ordeño o en los amarres) y escogiendo el resto a intervalos regulares. Este último suele ser más operativo a la hora de trabajar en la granja.

Para el seroperfil se trabaja en general con suero sanguíneo, No obstante, en el caso del vacuno lechero se recomienda recoger también una muestra de leche de Tanque, ya que algunos tests permiten trabajar con ella e incluso establecen unas estimaciones de prevalencia en función del resultado (que son orientativas, con un valor estadístico limitado). Además, en la leche de tanque se puede realizar detección directa de algunos patógenos mediante biología molecular (PCR), como es el caso del BVD o Coxiella burnetii, dado que en ambos casos los animales portadores excretan el microorganismo en leche.

Para explotaciones lecheras de hasta 100 animales, el muestreo se podría adaptar a un sistema “9+1”, que incluiría 9 muestras de suero y una muestra de leche de Tanque.

Para la selección de animales una opción básica sería:

- 2-3 animales abortados recientemente (en caso de existir patología abortiva).
- 7-8 animales jóvenes pero que ya hayan tenido contacto con el ganado adulto. Por ejemplo de primer parto. En caso de problemas de infertilidad, un 50% de animales con fallo reproductivo y un 50% de animales sin fallo reproductivo.
- En la ficha clínica se debe indicar especialmente las vacunaciones realizadas (nombre de la vacuna y fechas de últimas aplicaciones) y el historial clínico de la ganadería. Además, en cada animal se debe anotar el crotal, la edad, su estatus vacunal y su historial clínico (aborto, reabsorción, repetición, etc.).

El perfil serológico debe ser diseñado por el veterinario clínico según sus objetivos, proponiéndose las siguientes pruebas serológicas:

- IBR - Ac totales / IBR – Ac gB / IBR-Ac gE
- BVD - Ac p80
- BVD - Antígeno (opcional, para búsqueda de PIs)

- Neospora - Ac IgG (opcionalmente, discriminación entre infección aguda o crónica por test de avidéz)
- Chlamydo-phyla abortus - Ac IgG
- Coxiella burnetii - Ac IgG
- Leptospira serovar Hardjo - Ac IgG

No obstante, si queremos afinar más el número de animales a muestrear, podremos calcularlo mediante una “calculadora epidemiológica” en función del objetivo establecido, como se explica en los apartados siguientes.

3.3. Detección de la enfermedad en un rebaño

Para saber si en la población ha existido un contacto con cierto patógeno, será necesario determinar el número mínimo de animales a chequear necesario para detectar al menos un individuo positivo. Dicho número dependerá del tamaño del grupo, de la seroprevalencia que exista en él y del nivel de confianza que deseemos alcanzar en el cálculo.

Para ello se puede utilizar una “calculadora epidemiológica”. A continuación se exponen las tablas con el tamaño muestral necesario para detectar al menos un animal positivo, en función del tamaño poblacional y de la prevalencia estimada, para un grado de confianza del 95% (Tabla 1) y del 90% (Tabla 2).

Tabla 1. Tamaño muestral mínimo, en función de la prevalencia y el tamaño del rebaño, para detectar al menos un animal positivo con un nivel de confianza del 95%.

		Tamaño de la población							
		Prevalencia	10	25	50	100	150	200	300
Prevalencia	5	11	23	35	45	49	51	53	56
	10	10	17	22	25	26	27	28	28
	20	8	11	12	13	13	13	14	14
	30	6	8	8	9	9	9	9	9
	40	5	6	6	6	6	6	6	6
	50	4	5	5	5	5	5	5	5
	60	3	4	4	4	4	4	4	4
	70	3	3	3	3	3	3	3	3
	80	2	3	3	3	3	3	3	3
	90	2	2	2	2	2	2	2	2
100	2	2	2	2	2	2	2	2	

Tabla 2. Tamaño muestral mínimo, en función de la prevalencia y el tamaño del rebaño, para detectar al menos un animal positivo con un nivel de confianza del 90 %.

		Tamaño de la población							
Prevalencia	Prevalencia	10	25	50	100	150	200	300	500
	5	11	21	30	37	39	41	42	43
	10	9	15	18	20	21	21	22	22
	20	7	9	10	10	10	11	11	11
	30	5	6	7	7	7	7	7	7
	40	4	5	5	5	5	5	5	5
	50	3	4	4	4	4	4	4	4
	60	3	3	3	3	3	3	3	3
	70	2	3	3	3	3	3	3	3
	80	2	2	2	2	2	2	2	2
	90	2	2	2	2	2	2	2	2
100	2	2	2	2	2	2	2	2	

En base a ello, podemos afirmar que con un chequeo de 9 animales, tendremos entre un 90 y un 95% de probabilidad de encontrar un animal positivo siempre que la prevalencia en la población sea de al menos el 20-30%. Para prevalencias más bajas, habría que incrementar el tamaño muestral o se considerará un nivel de confianza inferior.

3.4. Determinación de la prevalencia

El tamaño muestral necesario para establecer la seroprevalencia de la población es sustancialmente mayor que para determinar la presencia o ausencia de la enfermedad. No obstante, considerando un nivel de confianza del 90% y un discreto grado de precisión del 20%, en la Tabla 3 se indican los tamaños muestrales necesarios en función del tamaño poblacional y la prevalencia.

Tabla 3. Tamaño muestral mínimo, en función de la prevalencia y el tamaño del rebaño, para estimar la prevalencia con un nivel de confianza del 90 % y un grado de precisión del 20%.

		Tamaño de la población							
Prevalencia	Prevalencia	10	25	50	100	150	200	300	500
	5	3	3	3	4	4	4	4	4
	10	4	5	6	6	6	6	6	6
	20	6	8	9	10	11	11	11	11
	30	6	10	12	13	13	14	14	14
	40	7	10	13	14	15	15	16	16
	50	7	11	13	15	16	16	16	17
	60	7	10	13	14	15	15	16	16
	70	6	10	12	13	13	14	14	14
	80	6	8	9	10	11	11	11	11
	90	4	5	6	6	6	6	6	6

Por ejemplo, para tres rebaños A, B y C, con un número de novillas primerizas de 10, 25 y 50 respectivamente, analizando 7 animales en el rebaño A, 11 animales en el rebaño B y 13 animales en el rebaño C,

podremos establecer con un 90% de fiabilidad la prevalencia de cada uno de ellos con un margen de error de $\pm 20\%$.

Como se ve, la capacidad de estimación de la prevalencia con solamente 9 animales es bastante limitada. No obstante, una vez detectada la existencia de un patógeno concreto, se podría plantear en una segunda fase un cálculo de prevalencia más fiable mediante un chequeo serológico más amplio frente al patógeno concreto.

3.5. Informe de resultados

En el informe de resultados del laboratorio se puede incluir la siguiente información:

- El resultado de cada animal para cada patología, incluyendo los valores numéricos de ELISA obtenidos.
- La probabilidad de presencia/ausencia de cada patógeno en el grupo poblacional investigado.
- La prevalencia estimada, advirtiendo del nivel de confianza, grado de precisión y otros parámetros estadísticos que se consideren de interés.
- A nivel de rebaño completo, el resultado del análisis de leche de Tanque y su interpretación.
- Posibles medidas de actuación complementarias desde el punto de vista diagnóstico.

4. EJEMPLO DE SEROPERFIL REPRODUCTIVO

Resultados serológicos

* *IBR (ELISA-Ac gE)* ; *BVD (ELISA-Ac p80)*; *Leptospira serovar hardjo(ELISA-Ac IgG)*; *Neospora (ELISA-Ac IgG)*; *Chlamydomphila abortus (ELISA-Ac IgG)*; *Fiebre Q (ELISA-Ac IgG)*

Muestra	IBR gE	I	BVD p80	I	Leptospira	I	Neospora	I
Vaca 1	Negativo	2,04	Positivo	4,40	Negativo	3,0	Negativo	2,9
Vaca 2	Negativo	1,01	Positivo	4,49	Negativo	6,6	Negativo	3,2
Vaca 3	Negativo	0,99	Positivo	4,66	Negativo	12,0	Negativo	-1,2
Vaca 4	Negativo	0,86	Positivo	4,23	Negativo	15,5	Negativo	0,0
Vaca 5	Negativo	0,98	Positivo	27,7	Negativo	10,5	Negativo	-0,6
Vaca 6	Negativo	1,19	Positivo	4,84	Negativo	15,7	Negativo	-0,7
Vaca 7	Positivo	0,11	Positivo	5,53	Negativo	8,6	Negativo	4,3
Vaca 8	Positivo	0,09	Positivo	15,5	Negativo	8,6	Negativo	-0,5
Vaca 9	Positivo	0,43	Positivo	5,87	Negativo	5,9	Negativo	4,8
Leche tanque	Positivo	0,80	Positivo	39,32	Positivo	76,3	Positivo	3,6

Muestra	Chlamydomphila	I	Fiebre Q	I
Vaca 1	Negativo	1,80	Negativo	12,60
Vaca 2	Negativo	3,95	Positivo	50,27
Vaca 3	Negativo	5,42	Positivo	111,1
Vaca 4	Negativo	5,89	Negativo	23,88
Vaca 5	Negativo	3,68	Negativo	4,38
Vaca 6	Negativo	3,08	Positivo	46,72
Vaca 7	Negativo	0,53	Positivo	109,1
Vaca 8	Negativo	2,27	Positivo	64,97
Vaca 9	Negativo	4,55	Negativo	-1,39

IBR-gE (suero): Negativo: Índice-Ac > 0,7; Positivo: Índice-Ac < 0,6.

IBR-gE (leche): Negativo: Índice-Ac > 0,8; Positivo: Índice-Ac < 0,8.

BVD-Ac (suero): Negativo: Índice-Ac > 50; Positivo : Índice-Ac < 40.

BVD-Ac (leche): Negativo: Índice-Ac > 80; Positivo : Índice-Ac < 80. Estimación orientativa de seroprevalencia: Índice-Ac >80: seroprevalencia <10%; Índice-Ac entre 45 y 80: seroprevalencia entre 10 y 30%; Índice-Ac <45: seroprevalencia >30%.

Neospora (suero): Negativo: Índice-Ac <6; Dudoso: 6 < Índice-Ac <10; Positivo: Índice-Ac >10

Neospora (leche): Negativo: Índice-Ac<3,0 (seroprevalencia inferior al 5-10%); Positivo: Índice-Ac >3,0 (seroprevalencia superior al 10%).

Leptospira serovar Hardjo (suero): Negativo: Índice-Ac<20; Dudoso: 20< Índice-Ac <45; Positivo: Índice-Ac >45.

Leptospira serovar Hardjo (leche): Negativo: Índice-Ac<40; Dudoso: 40< Índice-Ac <60; Positivo: Índice-Ac>60

Chlamydomphila: Negativo: Índice-Ac<90; Dudoso: 90< Índice-Ac <100; Positivo: Índice-Ac >100.

Fiebre Q: Negativo: Índice-Ac<30; Dudoso: 30< Índice-Ac <40; Positivo: Índice-Ac>40

Valoración de resultados

IBR	Presencia de infección en tres de los animales analizados. Estimación de seroprevalencia en novillas: 33% (estadísticamente: nivel de confianza del 90% y grado de precisión del 20%). Presencia de anticuerpos en la muestra de leche de Tanque, confirmando la existencia de animales portadores en el rebaño.
BVD	Estimación de seroprevalencia en novillas: 100% (estadísticamente: nivel de confianza del 90% y grado de precisión del 20%). Resultado en leche de Tanque: seroprevalencia a nivel de rebaño superior al 30%.
Leptospira	Ausencia de infección en todos los animales analizados. Se estima que la seroprevalencia poblacional en novillas es inferior al 30% (nivel de confianza estadística: 95%). Presencia de anticuerpos en leche de Tanque. Probable contacto del ganado adulto con el patógeno.
Neospora	Ausencia de infección en todos los animales analizados. Se estima que la seroprevalencia poblacional en novillas es inferior al 30% (nivel de confianza estadística: 95%). Resultado en leche de Tanque: seroprevalencia a nivel de rebaño superior al 10%.
Chlamydomphila	Ausencia de infección en todos los animales analizados. Se estima que la seroprevalencia poblacional en novillas es inferior al 30% (nivel de confianza estadística: 95%).
Coxiella	Estimación de seroprevalencia en novillas: 55% (estadísticamente: nivel de confianza del 90% y grado de precisión del 20%).
Brucella	Ausencia de infección en todos los animales analizados. Se estima que la seroprevalencia poblacional en novillas es inferior al 30% (nivel de confianza estadística: 95%).

Conclusiones

* Asumiendo la aplicación exclusivamente de vacunas marcadas, los resultados indican la infección en varias novillas por IBR. Aunque pueden haberse infectado en el centro de recría, teniendo en cuenta el carácter de infectante de por vida de este virus, se debe asumir el carácter de infectado del rebaño. Se aconseja un programa de control/erradicación

* Activa circulación del virus BVD. Los contagios pueden haberse producido en el Centro de recría y el rebaño estar libre, pero se aconseja vigilancia epidemiológica: estudio de seroconversiones sobre población negativa, análisis de la recría antes de incorporarla al rebaño e investigación de animales sospechosos de viremia persistente (animales PIs).

* Ninguna de las novillas analizadas es portadora de Neospora. No obstante, el resultado de leche de Tanque sí sugiere la presencia de animales infectados en el rebaño. Se aconseja un seguimiento analítico del rebaño. Un plan de erradicación pasaría por el análisis e identificación de seropositivos en todo el rebaño.

* Anterior circulación de Leptospira en el rebaño. La negatividad en todas las novillas sugiere que actualmente puede no estar presente el patógeno. Se aconseja un seguimiento analítico del rebaño.

* Probable no circulación actual de Chlamydomphila en el rebaño.

* Contacto anterior de varias novillas con Coxiella (Fiebre Q). Aunque pueden haberse contagiado en el Centro de recría, los animales pueden quedar como portadores excretores, por lo que el rebaño está en riesgo.