



ORIGINAL

Comparación de ELISAs comerciales para la detección de anticuerpos en la investigación diagnóstica del aborto asociado a *Neospora caninum* en rodeos lecheros de Uruguay



Caroline da Silva Silveira^{a,*}, Joaquín Ignacio Armendano^b, Dadín Prando Moore^c, Germán José Cantón^d, Melissa Macías-Rioseco^a, Franklin Riet-Correa^a y Federico Giannitti^a

^a Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Plataforma de Investigación en Salud Animal, Estación Experimental La Estanzuela, Colonia, Uruguay

^b Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, Balcarce, Buenos Aires, Argentina

^c Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina

^d Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, Buenos Aires, Argentina

Recibido el 1 de marzo de 2019; aceptado el 24 de junio de 2019

Disponible en Internet el 28 de noviembre de 2019

PALABRAS CLAVE

Aborto;
Bovinos;
Coeficiente Kappa de Cohen;
ELISA;
Epidemiología;
Neospora caninum;
Serología

Resumen A pesar de su importancia, el diagnóstico etiológico del aborto en bovinos representa un desafío técnico para los veterinarios clínicos y laboratoristas, en parte debido a la dificultad de recuperar los fetos abortados en condiciones extensivas de campo. Dicha dificultad limita la posibilidad de detectar tempranamente los vientres abortados y de efectuar la investigación patológica y microbiológica de los abortos. *Neospora caninum* es un protozooario cosmopolita identificado como uno de los principales agentes abortigénicos en bovinos. En este estudio proponemos una aproximación seroepidemiológica para diagnosticar abortos por *N. caninum* en bovinos lecheros usando kits de ELISA comerciales. Se procesaron muestras de entre 12 y 93 vacas y/o vaquillonas con (casos) y sin (controles) historia reciente de aborto en 4 tambos comerciales de Uruguay. La proporción controles:casos analizados varió entre 1:1 y 4,6:1. Las muestras (n=230) fueron analizadas mediante 3 kits comerciales para la detección de anticuerpos IgG anti-*N. caninum*. En los 4 tambos la proporción de vacas y/o vaquillonas seropositivas por cualquier kit fue significativamente mayor en los casos respecto de los controles (*odds ratio*=5,13 a 36; *p*=0,0002 a 0,0485). La concordancia entre los kits varió de débil a fuerte (coeficiente Kappa de Cohen=0,58 a 0,83). Concluimos que, a pesar de la imperfecta concordancia entre estos kits, el empleo de todos ellos permitió arribar a

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: carolsilveira7@hotmail.com (C. da Silva Silveira).

KEYWORDS

Abortion;
Cattle;
Cohen's Kappa
coefficient;
ELISA;
Epidemiology;
Neospora caninum;
Serology

conclusiones similares respecto de la asociación estadísticamente significativa entre seropositividad a *N. caninum* y aborto, lo que demuestra la utilidad de estos kits para la aproximación diagnóstica del aborto a nivel poblacional en condiciones de campo.

© 2019 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

A comparative study of commercial ELISAs for antibody detection in the diagnostic investigation of *Neospora caninum*-associated abortion in dairy cattle herds in Uruguay

Abstract Bovine abortion causes considerable economic losses to the livestock industry worldwide and is of concern for public health and food safety, given that many abortigenic infectious agents of cattle are zoonotic. Despite its importance, the etiological diagnosis of abortion in cattle is challenging both for veterinary practitioners and laboratory technicians, partly due to the difficulty in recovering aborted fetuses under extensive field conditions for pathological and microbiological diagnostic investigation, and in the early identification of aborted dams. *Neospora caninum* is a cosmopolitan protozoon identified as one of the main abortigenic agents in cattle worldwide. In this study we propose a comparative seroepidemiological approach for the diagnosis of abortion by *N. caninum* in dairy cattle. Samples from 12 to 93 cows/heifers with and without recent history of abortion (cases and controls) in four commercial dairy farms were tested. The ratio of controls to cases tested varied from 1:1 to 4.6:1. All samples (n=230) were analyzed by three commercial ELISA kits for the detection of anti-*N. caninum* antibodies. In all four dairy farms, the proportion of seropositive cows and/or heifers per kit was significantly higher in the cases than in the controls (Odds Ratios=5.13 to 36, $p=0.0002$ to 0.0485). The agreement among the three kits varied from weak to strong (Cohen's kappa coefficients=0.58 to 0.83). We conclude that, despite the imperfect agreement between these kits, all of them allowed to arrive at similar conclusions regarding the statistical association between *N. caninum* seropositivity and abortion, thus representing a useful tool for the diagnostic approach at the population level under field conditions.

© 2019 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

Neospora caninum es un protozooario intracelular obligado del filo Apicomplexa y es una de las principales causas identificadas de aborto en bovinos de todo el mundo¹¹. Este parásito tiene un ciclo heteroxeno en el que los hospederos definitivos son los caninos (perros, lobos, coyotes y dingos), que eliminan ooquistes infecciosos en las heces¹², y horizontalmente son transmitidos por vía digestiva a una gran variedad de hospederos intermediarios, como bovinos, venados, ovinos, búfalos, roedores, aves y caballos¹¹. En los bovinos también ocurre frecuentemente la transmisión vertical por vía transplacentaria, con tasas reportadas de 40-95% entre los terneros nacidos de vacas seropositivas³¹, y es esta una de las principales vías de perpetuación transgeneracional del agente en los rodeos. Dado que se carece de tratamientos específicos o vacunas eficaces para la prevención del aborto por neosporosis bovina, el control de la enfermedad está prácticamente restringido a la detección serológica y eliminación de los bovinos infectados de los rodeos, y a evitar el contacto entre el alimento de los bovinos y la materia fecal de los huéspedes definitivos potencialmente eliminadores de ooquistes.

A nivel global se estima que las pérdidas económicas anuales por neosporosis bovina oscilan entre los 633,4 y 2.380,1 millones de dólares³⁰. Los países sudamericanos, con economías agroexportadoras y donde el agente está ampliamente difundido²⁶, no escapan a esta situación. En Argentina y Brasil las pérdidas anuales por neosporosis bovina se han estimado en rangos de 51,8 a 142,9 y 99,4 a 223 millones de dólares, respectivamente³⁰. En Argentina estas pérdidas únicamente en la Pampa Húmeda son de alrededor de 15,62 a 119,35 millones de dólares para la ganadería lechera, y de 1,13 a 42,1 millones de dólares para la ganadería de carne²⁸.

A pesar de que la neosporosis está ampliamente distribuida en rodeos bovinos de Uruguay, las pérdidas económicas a ella asociadas no han sido determinadas. Estudios seroepidemiológicos publicados en Uruguay reportaron prevalencias de anticuerpos anti-*N. caninum* que varían entre 61,3% y 76,8% en distintos predios (prevalencia media de rodeos), y de 13% a 28% a nivel individual, tanto en ganado de carne como de leche^{3,16,21,29,32}. Un estudio más reciente (2015) de representatividad nacional indicó prevalencias prediales de 86,5% y 96% para establecimientos de carne y leche, respectivamente, y prevalencias individuales de 22,3% en ganado lechero y 14,3% en ganado de carne (Dr.

Federico Fernández, MGAP, comunicación personal, 2018). Asimismo, una gran proporción de los abortos bovinos diagnosticados en laboratorios veterinarios del país son causados por este agente^{3,13,21,24}, en forma similar a lo reportado en Argentina^{6,27} y en el Sur de Brasil²³.

El diagnóstico etiológico del aborto bovino es complejo y requiere del examen de laboratorio de fetos y placentas de vacas/vaquillonas abortadas¹⁷, incluyendo el examen patológico macroscópico e histológico y una amplia variedad de pruebas microbiológicas para la detección de los agentes infecciosos abortigénicos⁸. En los laboratorios de diagnóstico veterinario en América del Sur, la posibilidad de realizar algunas de estas pruebas es limitada. El correcto diagnóstico etiológico del aborto es fundamental para controlar y prevenir estas pérdidas, que impactan no solo en la economía del productor, sino también en la salud pública y la seguridad alimentaria, considerando que varios de los microorganismos causales de aborto en bovinos son zoonóticos.

En producciones ganaderas extensivas, como las que existen en la mayoría de los países sudamericanos, la recuperación de fetos y placentas producto de abortos espontáneos antes de que sean depredados o descompuestos representa un desafío adicional para el diagnóstico etiológico⁸. Sin embargo, la identificación de animales que perdieron la gestación suele ser simple a través de un examen visual y/o clínico de campo realizado por veterinarios o productores agropecuarios; esto permite la obtención de muestras de sangre o leche de estos animales para el análisis de laboratorio. Por tal motivo, para el diagnóstico indirecto de infección por *N. caninum*, un enfoque serológico poblacional basado en la detección de anticuerpos en suero, plasma o leche² de vacas/vaquillonas abortadas vs. no abortadas usando ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) puede ser de utilidad para la aproximación diagnóstica de los abortos causados por este agente³³. Las pruebas de ELISA demuestran un alto rendimiento en términos de sensibilidad y especificidad², y se encuentran disponibles comercialmente en Sudamérica a través de una variedad de proveedores que importan kits producidos principalmente

en Europa y EE. UU. Sin embargo, estas pruebas no siempre han sido adecuadamente validadas en nuestra región.

El objetivo de este trabajo es describir y evaluar la utilidad de una estrategia serológica poblacional usando kits comerciales basados en ELISA para la investigación diagnóstica del aborto bovino asociado a *N. caninum*, con el fin último de disponer de una herramienta práctica y fácil de aplicar e interpretar por médicos veterinarios clínicos y laboratoristas, sobre todo, para ser incorporada en rodeos donde no es posible recuperar los fetos abortados para la investigación de laboratorio.

Materiales y métodos

Origen de las muestras

Se evaluaron muestras de suero bovino almacenadas en un banco de sueros congelados (-20°C) en la Plataforma de Investigación en Salud Animal de INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay. Se seleccionaron aquellas muestras provenientes de episodios de aborto espontáneo en tambos, siempre que se contara con sueros de vacas/vaquillonas abortadas recientemente (casos) y sueros de vacas/vaquillonas no abortadas (controles) obtenidos contemporáneamente en un mismo predio. Las muestras que cumplieron con estas condiciones correspondieron a episodios independientes de aborto espontáneo en ganado lechero, ocurridos en 4 establecimientos agropecuarios (aquí denominados tambos A, B, C y D) de Uruguay. Las muestras habían sido obtenidas por los veterinarios asesores de dichos establecimientos y enviadas al laboratorio de INIA, La Estanzuela. La información sobre el número total de animales de cada rodeo y el número de animales analizados, así como las tasas de aborto y otros datos de interés se resumen en la [tabla 1](#).

Serología

Todas las muestras de suero se descongelaron a temperatura ambiente y se analizaron mediante 3 kits comerciales

Tabla 1 Población animal investigada mediante diferentes kits comerciales basados en ELISA para la detección de anticuerpos contra *N. caninum*

Tambo	Total de bovinos en el rodeo	N.º de bovinos abortados analizados	N.º de bovinos controles analizados	Raza y categoría	Tasa de aborto	Fecha del muestreo	Departamento
A	2.000	31	62	Holstein, Vq	15,5%	Abr, 2017	Colonia Colonia
B	200	6	6	Holstein y cruza Holstein, Vq	3%	Nov, 2017	
C	300	12	55	Holstein, Vc	ND (> 5%)	Dic, 2017	Lavalleja
D	1.505	19	39	Holstein y cruza Holstein x Jersey, Vc	16,3%	Dic, 2018	Florida
Total	4.505	68	162	-	-	-	-

Vc: vaca; Vq: vaquillona; ND: no determinado.

de ELISA indirecto siguiendo las recomendaciones de sus fabricantes. Estos kits, que detectan anticuerpos isotipo IgG específicos contra *N. caninum*, han sido utilizados previamente y comparados con otras pruebas serológicas y serotecas de referencia en varias publicaciones^{1,2,18}, las que reportan un desempeño adecuado. Estos fueron los kits utilizados: 1) LSIVet, Bovine Neosporosis Advanced Serum ELISA Kit, Thermo Fisher Scientific, Lelystad, Países Bajos; 2) Hipra, CIVTEST® BOVIS NEOSPORA, Girona, España; y 3) BioX Diagnostics, NEOSPORA CANINUM ELISA KIT, Rochefort, Bélgica. Para la elaboración de los kits 1 y 2 se utilizan lisados de taquizoitos de *N. caninum* como antígeno, mientras que para el kit 3 se utiliza una proteína recombinante de *N. caninum* (NcSRS2).

Se empleó un espectrofotómetro (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific) para la lectura de la densidad óptica (DO) de cada pocillo de las microplacas, con filtros de 450 nm para los kits 1 y 3, y de 405 nm para el kit 2, como indican las instrucciones de cada kit comercial. Para obtener los resultados, se leyeron las DO de los sueros controles positivos y negativos provistos con cada kit y las DO de las muestras, y se aplicaron las fórmulas recomendadas por los fabricantes. Las muestras de suero analizadas con los kits 1 y 3 fueron clasificadas como negativas o positivas. El kit 2 clasifica sus resultados en 3 categorías: positivo, sospechoso o negativo. Los resultados individuales para cada animal se registraron en una planilla de Microsoft Excel®.

Análisis estadísticos

Se calculó el porcentaje de animales seropositivos para cada tambo con cada kit. Para este cálculo los resultados sospechosos con el kit 2 fueron considerados como no positivos, por lo tanto, el número de animales sospechosos fue incluido en el denominador. Los resultados fueron analizados empleando modelos lineales generalizados mixtos (Proc. GLIMMIX, SAS Studio v3.6, SAS Institute Inc., Cary, NC, EE. UU.). El kit de ELISA empleado, el tambo y la interacción entre esas 2 variables fueron incluidos como efectos fijos, y el animal fue considerado como efecto aleatorio. Se asumió una distribución binomial de la variable respuesta y una función de ligadura *logit*. Cuando fue necesario las comparaciones múltiples se ajustaron utilizando el método de *honestly-significant-difference* de Tukey-Kramer. Los intervalos de confianza (IC) al 95% se calcularon empleando el método de la razón de verosimilitud.

Además, los resultados se evaluaron en el contexto de la historia de aborto de cada bovino analizado, en forma independiente en cada uno de los 4 establecimientos, y se calcularon las razones de probabilidades (*odds ratio* [OR]) para estimar el riesgo de aborto en forma relativa al estatus serológico utilizando un software estadístico de libre acceso, disponible online (MedCalc Free Statistical Calculators, Medcalc Software bvba, Ostend, Bélgica, https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php). Para este cálculo los animales seropositivos con historia reciente de aborto se computaron como expuestos positivos (celda a), los seropositivos sin historia reciente de aborto como positivos controles (celda c), los seronegativos con historia reciente de aborto como expuestos negativos (celda b), y los seronegativos sin historia reciente de aborto como no

expuestos negativos (celda d). Se registró la OR, el IC del 95% y el valor de *p*, considerando $p < 0,05$ para establecer la significación estadística. Los resultados sospechosos para el kit 2 en los 4 tambos fueron desestimados para este análisis estadístico (solo se incluyeron los positivos y los negativos).

Por último, la concordancia entre los 3 kits de ELISA se evaluó sobre la base del porcentaje de acuerdo positivo, negativo y total¹⁰ y mediante el coeficiente kappa (K) de Cohen (Proc. FREQ, SAS Studio v3.6, SAS Institute Inc., Cary, NC, EE. UU.). Los valores de K fueron interpretados según McHugh²⁵, como sigue: K=0-0,20, sin concordancia; K=0,21-0,39, concordancia mínima; K=0,40-0,59, concordancia débil; K=0,60-0,79, concordancia moderada; K=0,80-0,90, concordancia fuerte; y K>0,90, concordancia casi perfecta. Los resultados sospechosos para el kit 2 en los 4 tambos también fueron desestimados para este análisis.

Resultados

Del total de animales analizados (n=230), 112 (48,7%) fueron positivos con el kit 1, 110 (47,8%) con el kit 2 y 138 (60,0%) con el kit 3 (tabla 2). La proporción de animales seropositivos difirió significativamente entre kits ($p < 0,01$), pero no entre tambos ($p = 0,43$). El porcentaje de seropositividad fue significativamente mayor con el kit 3 respecto de los kits 1 y 2 ($p < 0,01$), mientras que este no difirió entre los kits 1 y 2 ($p = 0,97$). Las diferencias apreciadas entre kits no fueron afectadas significativamente por el tambo (efecto tambo \times kit; $p = 0,78$). Los resultados en la categoría «sospechoso» para el kit 2 incluyeron en total 11/230 animales (4,8%), distribuidos de la siguiente manera: 2/93 animales (2,2%) para el tambo A, 0/12 animales (0%) para el tambo B, 4/67 animales (6%) para el tambo C y 5/58 animales (8,6%) para el tambo D.

Los porcentajes de animales seropositivos abortados y no abortados en cada tambo, y los resultados del análisis estadístico para establecer asociación entre seropositividad e historia de aborto para cada uno de los kits de ELISA evaluados (OR, IC y valores de *p*) se resumen en la tabla 3. Independientemente del kit de ELISA utilizado, en los 4 establecimientos estudiados las vacas/vaquillonas seropositivas tuvieron una posibilidad significativamente mayor de pertenecer al grupo de animales con un historial reciente de aborto respecto de las vacas/vaquillonas seronegativas. El kit empleado no afectó significativamente la asociación entre el estatus serológico y la ocurrencia de aborto en ninguno de los tambos. Las concordancias entre los 3 kits evaluados se presentan en la tabla 4.

Discusión

El diagnóstico de exposición a *N. caninum* en bovinos se realiza principalmente por serología, detectando anticuerpos en suero, plasma sanguíneo o leche de animales a nivel individual o colectivamente en vacas en lactancia mediante análisis de muestras del tanque de leche^{2,35}. En este estudio el diagnóstico fue realizado en suero sanguíneo de vacas/vaquillonas con el propósito de buscar asociación con el aborto, ya que no fue posible obtener fetos o

Tabla 2 Seropositividad diagnosticada mediante diferentes kits comerciales basados en ELISA para la detección de anticuerpos contra *N. caninum*

Kit ELISA	Tambo (total de bovinos analizados)	Seropositividad			
		N	Porcentaje (%)	Error estándar	IC 95%
1	A (n = 93)	42	45,2	5,2	35,3-55,3
	B (n = 12)	6	50,0	14,4	23,8-76,2
	C (n = 67)	33	49,3	6,1	37,5-61,1
	D (n = 58)	31	53,5	6,6	40,7-65,7
	Total (n = 230)	112	48,7 ^a	3,3	42,3-55,1
2	A (n = 93)	41	44,1	5,2	34,3-54,2
	B (n = 12)	6	50,0	14,4	23,8-76,2
	C (n = 67)	32	47,8	6,1	36,1-59,5
	D (n = 58)	31	53,5	6,6	40,7-65,7
	Total (n = 230)	110	47,8 ^a	3,3	41,4-54,3
3	A (n = 93)	48	51,6	5,2	41,5-61,6
	B (n = 12)	6	50,0	14,4	23,8-76,2
	C (n = 67)	44	65,7	5,8	53,9-76,3
	D (n = 58)	40	69,0	6,1	56,4-79,9
	Total (n = 230)	138	60,0 ^b	3,2	53,6-66,2

Kit 1: LSIVet; kit 2: Hipra; kit 3: BioX.

IC: intervalo de confianza.

^{a,b}Porcentajes seguidos de superíndices distintos difieren significativamente ($p < 0,05$; con ajuste de Tukey-Kramer).

Tabla 3 Asociación entre seropositividad diagnosticada mediante diferentes kits comerciales basados en ELISA para la detección de anticuerpos contra *N. caninum* y aborto bovino

Tambo	Kit ELISA	% de bovinos abortados seropositivos	% de bovinos controles seropositivos	OR; IC 95%; valor de <i>p</i>
A	1	70,1 (22/31)	32,3 (20/62)	5,13; 2,13-15; 0,0007
	2	73,3 (22/30)	31,3 (19/61)	6,07; 2,2-16,09; 0,0003
	3	80,6 (25/31)	37,09 (23/62)	7,06; 2,5-19,77; 0,0002
B	1	83,3 (5/6)	16,7 (1/6)	25; 1,2-520,76; 0,0377
	2	83,3 (5/6)	16,7 (1/6)	25; 1,2-520,76; 0,0377
	3	83,3 (5/6)	16,7 (1/6)	25; 1,2-520,76; 0,0377
C	1	91,7 (11/12)	40,0 (22/55)	17; 2,05-141,1; 0,0087
	2	91,7 (11/12)	41,2 (21/51)	17,7; 1,8-131,14; 0,0109
	3	100 (12/12)	58,2 (32/55)	18,07; 1,02-320,79; 0,0485
D	1	94,7 (18/19)	33,3 (13/39)	36; 4,31-300,1; 0,0009
	2	94,7 (18/19)	38,2 (13/34)	29,07; 3,45-244,48; 0,0019
	3	100 (19/19)	53,8 (21/39)	33,5; 1,89-594,92; 0,0166

Kit 1: LSIVet; kit 2: Hipra; kit 3: BioX; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confianza.

Tabla 4 Acuerdo y concordancia de resultados entre pares de kits comerciales basados en ELISA para detección de anticuerpos contra *N. caninum*

Pares de kits ELISA	N.º de muestras	Porcentaje de acuerdo			Concordancia		
		Negativo	Positivo	Total	Kappa	IC 95%	Interpretación
1 vs. 2	219	91,3	91,3	91,3	0,83	0,75-0,90	Moderada a fuerte
1 vs. 3	230	77,1	80,8	79,1	0,58	0,48-0,69	Débil a moderada
2 vs. 3	219	83,7	86,8	85,4	0,71	0,62-0,80	Moderada a fuerte

Kit 1: LSIVet; kit 2: Hipra; kit 3: BioX; IC: intervalo de confianza.

placentas de vacas abortadas debido al manejo pastoril extensivo de los rodeos, situación muy frecuente en los tambos de Sudamérica.

La serología es un indicador que permite evaluar la posibilidad de que las vacas aborten³³; sin embargo, la

atribución de causalidad en vacas abortadas no puede realizarse por serología a nivel individual, ya que un número importante de vacas expuestas a *N. caninum* (y, por lo tanto, seropositivas) no abortan. Por este motivo, es necesario realizar estudios serológicos comparativos poblacionales.

En este estudio, cuando comparamos los resultados entre los 3 kits ELISA utilizados a nivel general sobre las 230 muestras disponibles, se observó que con el kit 3 (BioX), el porcentaje de seropositividad fue significativamente mayor que con los kits 1 y 2, entre los cuales no se apreciaron diferencias. Considerando los establecimientos por separado, el porcentaje de animales seropositivos con el kit 3 fue superior al obtenido con los kits 1 y 2 en 3 tambos y fue igual en el tambo restante, pero el riesgo de aborto y la significación del análisis estadístico se mantuvieron en valores similares en los 4 predios, independientemente del kit utilizado.

En Uruguay la asociación entre seropositividad a *N. caninum* y aborto se había documentado previamente en un solo tambo, utilizando inmunofluorescencia indirecta (IFI)²¹. Varios autores reportan que el riesgo de aborto observado en vacas serológicamente positivas fue 2 a 26 veces más alto que en las serológicamente negativas^{22,38}, datos muy semejantes a los observados en este estudio, donde los bovinos seropositivos a *N. caninum* tuvieron entre 5,13 y 36 veces más oportunidades de tener una historia reciente de aborto que los seronegativos a este agente.

Para la investigación diagnóstica del aborto asociado a la infección por *N. caninum* debe tenerse en cuenta cuándo y cómo realizar el muestreo de suero sanguíneo. Las muestras de este estudio fueron tomadas cerca de la ocurrencia de los abortos, cuando existe la mayor probabilidad de detectar anticuerpos anti-*N. caninum* y menores posibilidades de detectar animales falsos negativos²⁰. Es necesario identificar individual e inequívocamente las vacas/vaquillonas abortadas (casos) y, a efectos de la comparación, se debe contar con un grupo de animales en riesgo de abortar (hembras preñadas), pero no abortados (controles), con similares características de los casos (pareados por edad, período de lactancia, período de gestación, origen, tipo de alimentación, etc.)¹⁹. Idealmente, la cantidad de casos debe ser suficientemente alta como para representar la situación clínica que se desea investigar. El número de controles que se debe seleccionar por cada caso en un estudio de casos y controles es definido de acuerdo al poder estadístico, en función de la prevalencia estimada de infección. Seleccionando hasta 4 controles por cada caso se aumenta el poder estadístico^{19,36}; sin embargo, esto también aumenta los costos analíticos y, en ocasiones, con una proporción menor se alcanza un poder estadístico adecuado.

En nuestro estudio el número mínimo de casos fue de 6 (tambo B) y la proporción controles:casos fue de 1:1 para el tambo B, de 2:1 para los tambos A y D y de 4,6:1 para el tambo C. En el tambo B se pudo establecer una asociación estadística significativa entre seropositividad e historia de aborto con cualquiera de los 3 kits utilizados, pese a la baja cantidad de casos analizados y a la reducida proporción controles:casos (1:1). No obstante, es recomendable que el número de casos sea superior y que dicha proporción sea de al menos 2:1, pero no mayor de 4:1 para lograr una potencia estadística adecuada⁴.

Los estudios de casos y controles no permiten definir la prevalencia de la enfermedad en la población en estudio, sino que se realizan para analizar la posible asociación entre un evento (en este caso el aborto) y la exposición a un agente o enfermedad (en este caso *N. caninum*)¹⁹, con el objetivo de hacer una aproximación al diagnóstico. En nuestro estudio, a pesar de que no pudimos estimar la seroprevalencia

en los 4 tambos analizados, el porcentaje de seropositividad a nivel predial estuvo comprendido entre 45,2% y 53,5% (kit 1), 44,1% y 53,5% (kit 2) y 51,6% y 69,9% (kit 3). El porcentaje de seropositividad fue significativamente superior cuando se utilizó el kit 3, motivo por el cual sería recomendable realizar estudios de validación regional de este kit, para ajustar el punto de corte, si fuera a usarse en futuros estudios epidemiológicos en nuestra región.

El mayor porcentaje de seropositividad observado con el kit 3 podría deberse a que este utiliza como antígeno una proteína recombinante de *N. caninum* (NcSRS2) que se expresa tanto en los bradizoítos como en los taquizoítos del parásito¹⁵, por lo que podría estar detectando anticuerpos antibradizoítos (animales con exposición crónica) y antitaquizoítos (exposición más reciente). Además, Alvarez-García et al.² reportaron que este kit presentó mayor número de reacciones cruzadas en relación con otros kits evaluados, lo que también podría explicar la mayor frecuencia relativa de resultados positivos.

En un estudio realizado en Europa, Alvarez-García et al.² evaluaron el rendimiento de kits comerciales de ELISA para el diagnóstico serológico de exposición a *N. caninum* y observaron que, en términos de especificidad y sensibilidad, todos los kits son aptos para el diagnóstico, información que resulta esencial para los laboratorios veterinarios que ofrecen estas determinaciones a veterinarios clínicos y productores agropecuarios. Otro estudio en el mismo continente realizó una evaluación bayesiana de 2 kits comerciales para el diagnóstico serológico en vacas abortadas y no abortadas, así como de bovinos comprados de otros orígenes; los resultados demostraron una alta eficacia de ambos kits³³. En EE. UU. también fueron realizados estudios comparativos con kits de ELISA comerciales, que reportaron que es una técnica útil en la detección de anticuerpos anti-*N. caninum*³⁷.

En Argentina se desarrolló experimentalmente un kit de ELISA (ELISA p-38) con un antígeno nativo de 38 kDa de *N. caninum*. Este kit fue evaluado y comparado con IFI e inmunoblot (IB), determinándose que el ELISA-p38 es altamente preciso, con sensibilidad y especificidad relativas de 97,8% y 99,5%, respectivamente, y una concordancia excelente/casi perfecta ($K = 0,93-0,99$), tanto con IFI como con IB⁷. En nuestro trabajo los resultados no difieren de los reportados en la literatura para kits de ELISA comerciales^{2,33,36}, observándose una concordancia moderada a fuerte entre los kits 1 y 2 y 2 y 3, y débil a moderada entre los kits 1 y 3. Los porcentajes de acuerdo entre los kits fueron buenos, y todos ellos fueron igualmente aplicables a la aproximación del diagnóstico de abortos por *N. caninum* a través de la estimación de riesgo en casos y controles. Desafortunadamente, el kit de ELISA desarrollado en Argentina no está disponible comercialmente, razón por la cual no pudo ser evaluado comparativamente con los otros kits en nuestro estudio.

Es fundamental que las pruebas diagnósticas desarrolladas y validadas en otros países sean evaluadas con un banco de muestras locales y de referencia, y que los puntos de corte recomendados por los fabricantes sean chequeados regionalmente, porque el desempeño de estas pruebas puede estar basado en una región específica, un panel pequeño de muestras o en muestras originadas solo de infecciones experimentales con una única cepa. Alvarez-García et al.² reportaron que los valores de corte sugeridos por los

kits de ELISA no siempre son adaptables a la región de la investigación. En dicho estudio, realizado con un banco de sueros de referencia, las pruebas que presentaron una sensibilidad y especificidad < 95% fueron analizadas y ajustadas mediante curvas *receiver operating characteristics* (ROC), y se observó que los puntos de corte que determinaban un resultado positivo o negativo eran distintos a los recomendados por los fabricantes.

La IFI fue considerada por muchos años el método de referencia para el diagnóstico serológico de *N. caninum*. Sin embargo, suele presentar inconvenientes de baja sensibilidad y discrepancias entre ensayos, por lo que su uso con este fin se ha dejado de lado^{9,14}. Entre otras desventajas que se le atribuyen se menciona que es una técnica demandante de tiempo, que requiere de experiencia del técnico observador, y que la interpretación tiene cierto grado de subjetividad y puede haber variaciones importantes entre laboratorios y entre operarios^{9,20}. Por el contrario, el ELISA permite el procesamiento de una gran cantidad de muestras en un tiempo relativamente corto y prácticamente no hay interferencia técnica³⁴, variabilidad entre operarios o dificultades en la interpretación de los resultados. Por estos motivos los ELISA comerciales han ido desplazando a las pruebas de IFI en el diagnóstico de rutina.

Un ensayo interlaboratorial ciego, en el que participaron 8 laboratorios iberoamericanos con representantes de Argentina, Brasil, España, México y Perú evaluó el desempeño de 10 pruebas serológicas para la detección de anticuerpos específicos contra *N. caninum*, incluyendo 7 pruebas no comerciales de IFI y 3 kits de ELISA, 2 experimentales y uno comercial⁹; este último es el kit 2 usado en nuestro estudio. Dicho trabajo indicó que 6 de las pruebas evaluadas tenían valores de sensibilidad o especificidad < 90%, y solo una de las pruebas de IFI tuvo un buen desempeño en términos de sensibilidad, especificidad y área bajo la curva ROC, similar al de 2 de los ELISA evaluados, incluyendo el ELISA comercial⁹.

En Uruguay no se dispone de kits ELISA para detección de anticuerpos contra *N. caninum* desarrollados y producidos en el país. Los kits disponibles son importados, con costos de adquisición relativamente altos, que varían entre los 2,8 y 3,5 dólares por muestra, a los que hay que sumarles los costos operativos. Estos altos costos muchas veces son inaccesibles para los productores bovinos y desalientan la práctica de evaluar el estatus de infección de sus rodeos. Sin embargo, Uruguay cuenta con el aparato científico-tecnológico y empresarial necesario para el desarrollo, la producción y la validación de kits de ELISA a escala comercial, lo cual podría realizarse considerando que varias cepas locales de *N. caninum* fueron recientemente aisladas en este país⁵ y podrían usarse como fuente de antígenos.

Además de la aplicabilidad del ELISA para la aproximación diagnóstica del aborto bovino, esta herramienta también es útil para la monitorización y control de la enfermedad en los rodeos, ya que permite la detección de los animales infectados, lo que ayuda a la toma de decisiones respecto de su permanencia o introducción en el rodeo de hembras destinadas a reproducción. Contar con una prueba de ELISA desarrollada y validada regionalmente ayudaría a reducir los costos y, posiblemente, más productores bovinos se embarcarían en la realización de estudios serológicos,

para establecer un diagnóstico de situación de sus rodeos o implementar medidas de control y prevención de la neosporosis bovina.

La aplicabilidad eficiente del ELISA en la aproximación del diagnóstico de infección por *N. caninum* en asociación con el aborto en vacas debe alentar a los grupos de investigación y laboratorios de Sudamérica a desarrollar kits que lleguen a la etapa de comercialización a un costo significativamente menor que los importados. Estas pruebas deberían pasar por etapas de validación, usando bancos de sueros bovinos con estatus conocido de infección obtenidos regionalmente. De esta manera, se podrá evaluar la reproducibilidad local, con resultados más confiables para la población de estudio.

Conclusión

El enfoque serológico poblacional descrito aquí representa una herramienta útil y práctica para establecer asociaciones estadísticas entre seropositividad a *N. caninum* y aborto en rodeos de bovinos lecheros, sobre todo frente a brotes de aborto presuntamente causados por *N. caninum*, cuando no se pueden obtener fetos abortados para estudios de patología y microbiología. El acuerdo observado entre los 3 kits evaluados en este estudio permitió llegar a similares conclusiones seroepidemiológicas.

Financiación

La investigación que da origen a los resultados presentados en la presente publicación recibió fondos de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) de Uruguay, bajo los códigos FSSA X 2014 1 105696 y POS FSSA 2015 1 1005321.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los veterinarios que enviaron las muestras de suero e información adicional de los rodeos estudiados al laboratorio de la Plataforma de Investigación en Salud Animal de INIA La Estanzuela.

Bibliografía

1. Álvarez-García G, Collantes-Fernández E, Costas E, Rebordosa X, Ortega-Mora LM. Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods in bovine neosporosis. *Vet Res.* 2003;34:341–52.
2. Álvarez-García G, García-Culebras A, Gutiérrez-Expósito D, Navarro-Lozano V, Pastor-Fernández I, Ortega-Mora LM. Serological diagnosis of bovine neosporosis: A comparative study of commercially available ELISA tests. *Vet Parasitol.* 2013;198:85–95.
3. Bañales P, Fernandez L, Repiso MV, Gil A, Dargatz DA, Osawa T. A nationwide survey on seroprevalence of *Neospora caninum* infection in beef cattle in Uruguay. *Vet Parasitol.* 2006;139:15–20.

4. Breslow NE. Case-control studies. En: Ahrens W, Pigeot I, editores. *Handbook of Epidemiology*. 2.º ed. New York, EE. UU.: Springer; 2014. p. 293–323.
5. Cabrera A, Berná L, Fresia P, Silveira CS, Macías-Rioseco M, Pritsch O, Riet-Correa F, Giannitti F, Francia ME, Robello C. Aislamiento y caracterización genética de cuatro nuevas cepas de *Neospora caninum* en Uruguay. Montevideo, Uruguay: Primer Encuentro Bienal de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular; 2018.
6. Calandra PM, Di Matia JM, Cano DB, Odriozola ER, García JA, Späth EJ, Odeón AC, Paolicchi FA, Morrell EL, Campero CM, Moore DP. Endemic and epidemic bovine neosporosis: description of two events in beef cattle. *Rev Argent Microbiol*. 2014;46:315–9.
7. Campero LM, Minke L, Moré G, Rambeaud M, Bacigalupe D, Moore DP, Hecker Y, Campero CM, Schares G, Venturini MC. Evaluation and comparison of serological methods for the detection of bovine neosporosis in Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2015;47:295–301.
8. Campero CM, Moore DP, Odeón AC, Cipolla AL, Odriozola E. Aetiology of bovine abortion in Argentina. *Vet Res Commun*. 2003;27:359–69.
9. Campero LM, Moreno-Gonzalo J, Venturini MC, Moré G, Dellarupe A, Rambeaud M, Echaide IE, Valentini B, Campero CM, Moore DP, Cano DB, Fort M, Mota RA, Serrano-Martínez ME, Cruz-Vázquez CC, Ortega-Mora LM, Álvarez-García G. An Iber-American inter-laboratory trial to evaluate serological tests for the detection of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle. *Trop Anim Health Prod*. 2018;50:75–84.
10. Cicchetti DV, Feinstein AR. High agreement but low kappa: II Resolving the paradoxes. *J Clin Epidemiol*. 1990;43:551–8.
11. Dubey JP, Schares G. Neosporosis in animals-The last five years. *Vet Parasitol*. 2011;180:90–108.
12. Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20:323–67.
13. Easton C. Estudio patológico de las principales causas infecciosas en el aborto bovino en Uruguay. Uruguay: Tesis de Maestría Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo; 2006.
14. Frösling J, Bonnett B, Lindberg A, Björkman C. Validation of a *Neospora caninum* iscom ELISA without a gold standard. *Prev Vet Med*. 2003;57:141–53.
15. Fuchs N, Sonda S, Gottstein B, Hemphill A. Differential expression of cell surface-and dense granule-associated *Neospora caninum* proteins in tachyzoites and bradyzoites. *J Parasitol*. 1998;84:753–8.
16. Furtado A, Rosadilla D, Cattáneo M, Bermúdez J, Puentes R. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em pequenas propriedades leiteiras do Uruguai. *Cienc Rural*. 2011;41:673–5.
17. Gädickea P, Montib G. Aspectos epidemiológicos y de análisis del síndrome de aborto bovino. *Arch Med Vet*. 2008;40:223–34.
18. Ghalmi F, China B, Kaidi R, Losson B. Evaluation of a SRS2 sandwich commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of anti-*Neospora caninum* antibodies in bovine and canine sera. *J Vet Diagn Invest*. 2009;21:108–11.
19. Gordis L. Estudios de casos y controles y otros diseños de estudio. En: Gordis L, editor. *Epidemiología*. 5.º ed. Barcelona: ES, ELSEVIER; 2015. p. 189–214.
20. Guido S, Katzer F, Nanjiani I, Milne E, Innes EA. Serology-based diagnostics for the control of bovine neosporosis. *Trends Parasitol*. 2016;32:131–43.
21. Kashiwazaki Y, Giannechini RE, Lust M, Gil J. Seroepidemiology of neosporosis in dairy cattle in Uruguay. *Vet Parasitol*. 2004;120:139–44.
22. Lopez-Gatius F, López-Béjar M, Murugavel K, Pabón M, Ferrer D, Almería S. Neospora-associated abortion episode over a 1-year period in a dairy herd in north-east Spain. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2004;51:348–52.
23. Macedo CAB, Macedo MFSB, Miura AC, Taroda A, Cardim ST, Innes EA, Katzer F, Cantón GJ, Chianini F, Headley SA, Garcia JL. Occurrence of abortions induced by *Neospora caninum* in dairy cattle from Santa Catarina, southern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2017;26:292–8.
24. Macías-Rioseco M, da Silva Silveira C, Cabrera A, Mirazo S, Fraga M, Uzal F, Giannitti F, Riet-Correa F. Diagnóstico de aborto em bovinos leiteiros no Uruguai. Recife, Pernambuco, Brasil: X Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinário (ENDIVET); 2018.
25. McHugh ML. Interrater reliability: The kappa statistic. *Biochem Med (Zagreb)*. 2012;22:276–82.
26. Moore DP. Neosporosis in South America. *Vet Parasitol*. 2005;127:87–97.
27. Moore DP, Regidor-Cerrillo J, Morrell E, Poso MA, Cano DB, Leunda MR, Linschinky L, Odeón AC, Odriozola E, Ortega-Mora LM, Campero CM. The role of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in spontaneous bovine abortion in Argentina. *Vet Parasitol*. 2008;156:163–7.
28. Moore D, Reichel M, Spath E, Campero C. *Neospora caninum* causes severe economic losses in cattle in the humid pampa region of Argentina. *Trop Anim Health Prod*. 2013;45:1237–41.
29. Piaggio J, Núñez A, Sienra R, Gil A. Cross-sectional study of *Neospora caninum* in Uruguayan dairy cattle. XXIII World Buiatrics Congress. 2004:40. Québec, Canada.
30. Reichel MP, Alejandra Ayanegui-Alcérrecia M, Gondim LF, Ellis JT. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle-the billion dollar question. *Int J Parasitol*. 2013;43:133–42.
31. Reichel MP, Pomroy WE, Campero C, Ortega-Mora LM, Ellis JT. Control options for *Neospora caninum*—is there anything new or are we going backwards? *Parasitology*. 2014;141:1455–70.
32. Repiso M, Gil A, Bañales P, D'Anatro N, Fernández L, Guarino H, Herrera B, Núñez A, Olivera M, Osawa T, Silva M. Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas que afectan el comportamiento reproductivo en la ganadería de carne y caracterización de los establecimientos de cría del Uruguay. Montevideo (Uruguay). INIA-FPTA. 2005:42.
33. Roelandt S, Van der Stede Y, Czaplicki G, Van Loo H, Van Driessche E, Dewulf J, Hooyberghs J, Faes C. Serological diagnosis of bovine neosporosis: A Bayesian evaluation of two antibody ELISA tests for *in vivo* diagnosis in purchased and abortion cattle. *Vet Rec*. 2015;176:598.
34. Sartor IF, Hasegawa MY, Canavessi AMO, Pinckney RD. Ocorrência de anticorpos de *Neospora caninum* em vacas leiteiras avaliados pelos métodos ELISA e RIFI no município de Avaré SP. *Semina: Ciências Agrárias*. 2003;24:3–10.
35. Sekiya M, Zintl A, Doherty ML. Bulk milk ELISA and the diagnosis of parasite infections in dairy herds: A review. *Ir Vet J*. 2013;66:14.
36. Ury HK. Efficiency of case-control studies with multiple controls per case: Continuous or dichotomous data. *Biometrics*. 1975;31:643–9.
37. Wapenaar W, Barkema HW, VanLeeuwen JA, McClure JT, O'Handley RM, Kwok OC, Thulliez P, Dubey JP, Jenkins MC. Comparison of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle. *Vet Parasitol*. 2007;143:166–73.
38. Weston JF, Williamson NB, Pomroy WE. Associations between pregnancy outcome and serological response to *Neospora caninum* among a group of dairy heifers. *N Z Vet J*. 2005;53:142–8.