



Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
U R U G U A Y

Estudio epidemiológico y económico de las principales enfermedades infecciosas causantes de pérdidas reproductivas en los rodeos de cría

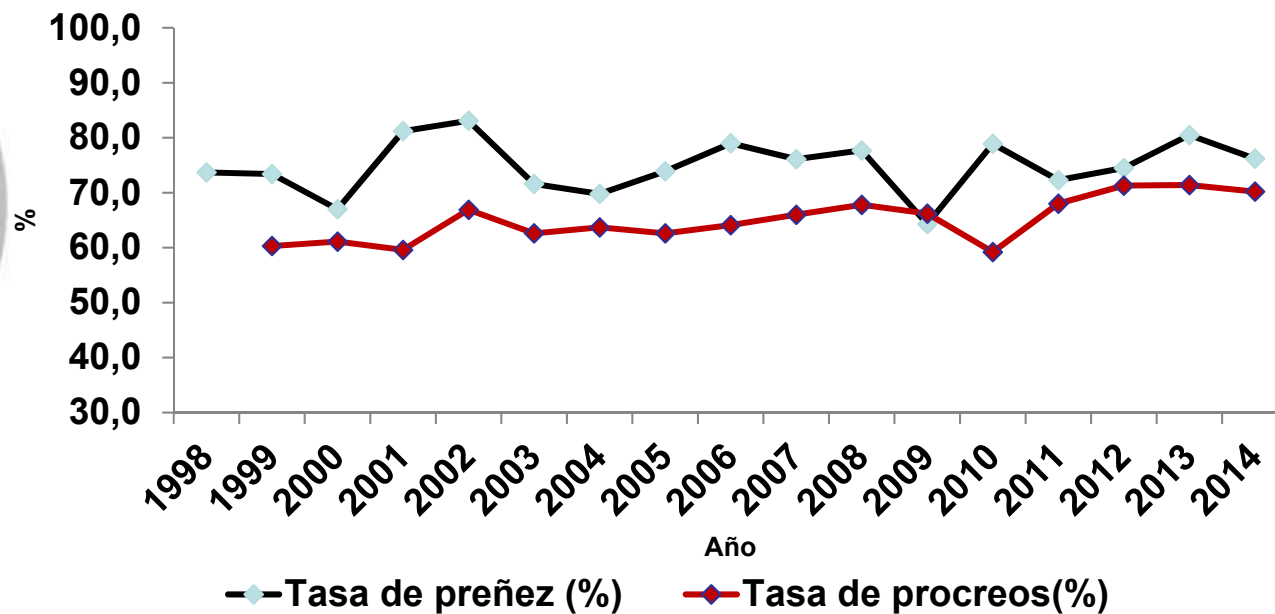
**Dres. América E Mederos; Carolina Briano;
Fernando Dutra Quintela; Ma. Cristina Easton**

**Tercer Seminario de avances en investigación
en Salud Animal**

**25 de octubre, 2018
Facultad de Veterinaria/UdelaR**

MOTIVACION

✓ Índices reproductivos en ganadería vacuna para carne considerados bajos...



Fuente; Adaptado de Anuario Estadístico Agropecuario 2014

MOTIVACION cont.

✓ Estudio epidemiológico de enfermedades reproductivas 2000-2001 (Repisso y col., 2005, FPTA INIA)

Demostró presencia de varias agente infecciosos capaces de causar enfermedades responsables de problemas reproductivos:

- Campylobacteriosis genital bovina (raspados prepuciales)
- Leptospirosis (serologia)
- Neosporosis bovina (serologia)
- Diarrea viral bovina (serologia)
- Rinotracheitis viral bovina (serologia)

MOTIVACION cont.

Proyecto INIA PEI 2011-2015: CL_12: Componente “Sanidad en Ganadería Extensiva”:

- Proyecto interinstitucional y multidisciplinario
 1. Puesta a punto de técnicas fenotípicas y moleculares para diagnóstico de:
 - o *Campylobacter fetus venerealis*
 - o *Neospora caninum* (colaboración CYTED, Universidad Complutense de Madrid)
 - o IBR y DVB Colaboración con Laboratorio de Virología, CENUR, Salto

2. Muestreos de toros para diagnóstico de *Campylobacter fetus venerealis*

Resultados de toros para carne muestreados durante 2013-2014 en el norte de Uruguay

Prueba	N° TOROS POSITIVOS (n=104)
IFD	36 (34,6%)
PCR	49 (47,1%)
Total positivos (cualquiera de las pruebas)	55 (52,9%)

IFD=Inmunofluorescencia directa

PCR= reacción en cadena de la polimerasa tanto convencional como en tiempo real

Fuente: Datos de tesis de Maestría de la Dra. Denise Galarraga

MOTIVACION cont.

✓ Esto llevo al desarrollo del Proyecto
FSSA_2014_1_105894 “Estudio epidemiológico y
económico de las principales enfermedades
infecciosas y reproductivas en los rodeos de cría del
Norte y Este del Uruguay”

INSTITUCIONES PARTICIPANTES:

INIA

DI.LA.VE CENTRAL Y REGIONAL ESTE

FAC. VETERINARIA, UDELAR

FAC. VETERINARIA, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

EQUIPO TÉCNICO

Responsables Técnico-Científico:

América MEDEROS SILVEIRA, INIA Tacuarembó

Fernando DUTRA QUINTELA (DILAVE, T y Tres)

Carolina VIÑOLES GIL (INIA Tacuarembó)

Cristina EASTON (DILAVE, Mdeo)

Investigadores

Carla FALIVENI (Fac. Vet., Opasur, Practicantado Región Este),

Leticia MAYA y Matías Salvo (Virología, UdelaR, Salto)

Agustín ROMERO (DILAVE T y Tres)

Juan M Soares de Lima (Agro-Economía, INIA Tacuarembó)

Lic. Pablo Peraza (INIA Las Brujas)

Becarios PhD y MSc

Carolina BRIANO (DILAVE T y Tres)

Sebastián CHARAMELO

Técnicos de apoyo:

Juan Martín DA FONSECA y Jimena FERREIRA (T y Tres)

Andrea Alvez y Ximena Gonzáles (Tacuarembó)

Consultor

Javier REGIDOR Universidad Complutense de Madrid

OBJETIVOS

- 1) Diseñar y conducir estudios longitudinales para el monitoreo de las enfermedades infecciosas que están relacionadas con la eficiencia reproductiva y conocer el efecto de las mismas en la performance reproductiva en los rodeos de cría del Este y Norte del país.**
- 2) Poner a punto y estandarizar las diferentes técnicas de diagnóstico necesarias para la conducción del proyecto, en los diferentes laboratorios participantes del mismo.**

OBJETIVOS cont.

- 3) Estudio de las causas infecciosas de los materiales de abortos enviados a los laboratorios participantes del proyecto.**
- 4) Evaluación de potenciales pérdidas productivas y económicas producidas por las enfermedades infecciosas a ser estudiadas**
- 5) Diseño y aplicación de estrategias de control de acuerdo a la ecuación costo/beneficio esperada.**

RRHH – (además de los proponentes) 1 estudiante de doctorado con sede en DILAVE Treinta y Tres y 1 estudiante de maestría con sede en INIA Tacuarembó becarios de ANII

ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

El proyecto plantea una estrategia experimental de 2 fases:

- 1. Fase de campo**, que permita determinar el momento en que ocurren las pérdidas reproductivas tempranas en predios de las principales zonas de cría de Uruguay (Este y Norte) y evaluar los aspectos sanitarios y de manejo del predio
- 2. Fase de Laboratorio**, que permita realizar el correcto diagnóstico de las causas infecciosas de dichas pérdidas y estimar su verdadera importancia:
 - ✓ Campylobacteriosis genital bovina (vibriosis) (INIA y Dilave Mdeo)
 - ✓ Trichomoniasis bovina (Lab. Denise Galarraga, Tacuarembó)
 - ✓ Neosporosis bovina (Dilave, Tesis C. Briano),
 - ✓ Rinotraqueítis Infecciosa bovina (IBR), Matías Salvo (Virología, Salto)
 - ✓ Diarrea Viral Bovina (BVD) (Leticia MAYA, Virología, Salto)
 - ✓ Leptospira: se investigan predios problemas en otro proyecto.

RESULTADOS PRELIMINARES

Capacitaciones....

- Curso entrenamiento en ecografías para diagnóstico de actividad ovárica. Responsable Dra. Carolina Viñoles

▪ 7 Médicos Veterinarios capacitados



- Entrenamiento en Pruebas moleculares *Neospora caninum* en Universidad Complutense de Madrid

▪ 2 participantes capacitados

Predios evaluados en la zona Norte

ID PREDIO	Departamento	n Rodeo (Vaquillonas)	nToros	% Preñez	Base forrajera
1	Tacuarembó	420 (110)	13	80	CN, MC
2	Tacuarembó	625 (85)	26	45	CN, Verdeos
3	Tacua	# Ecografías realizadas Zona Norte = 2700			CN, Verdeos
4	Tacua				CN
5	Riv				CN, MC
6	Salto	291 (98)	11	92	CN, MC
7	Salto	229 (25)	4	78	CN
8	Tacuarembó	1300 (200)	35	78	CN, MC, Pradera, Verdeo

CN=Campo natural; MC=Mejoramiento de campo;

Ecografías realizadas

Ecografías realizadas

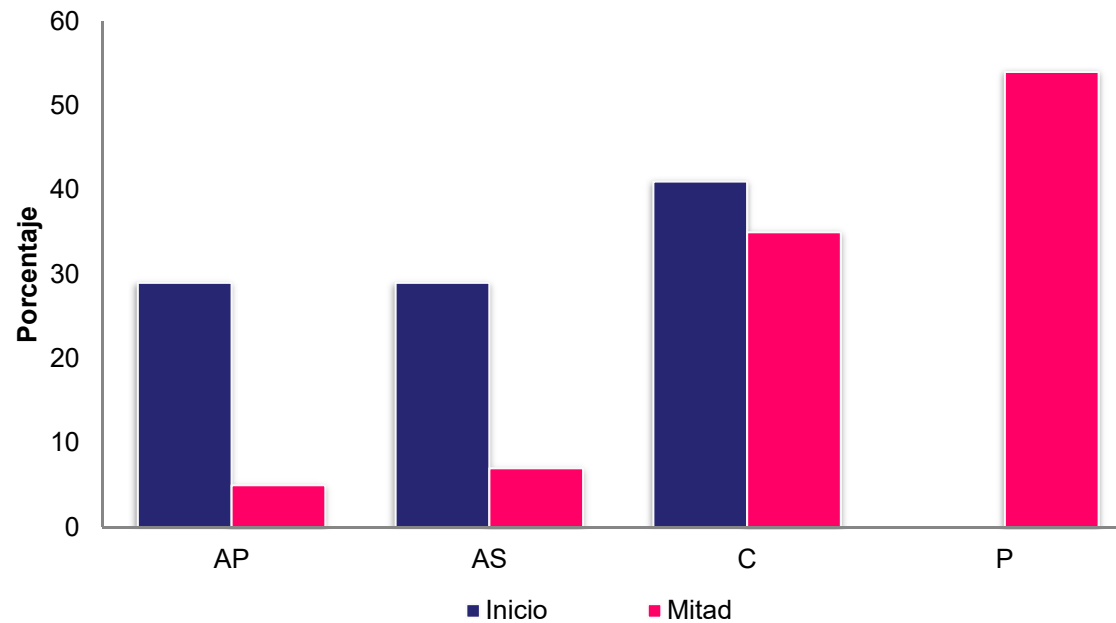
- Zona Norte = 2700
- Zona Este = 2400

Resultados Preñez Vaquillonas ...

ID PREDIO	% Preñez (CC) Año 2015-2016	% Preñez (CC) Año 2016-2017	% Preñez (CC) Año 2017-2018	Pérdidas Embrionarias (%)
1	-	93.0 (4.5)	97.0 (3.8)	SD
2	68.7 (4.9)	63.2 (3.9)	92.0 (3.9)	SD
3	-	59.0 (4.7)	94.0 (4.3)	3.7 (2 y 3 eco)
4	40.0 (4.4)	74.0 (4.5)	NR (4.0)	SD
5	47.0 (4.1)	42.0 (4.0)	27.0 (4.0)	SD
6	85.0 (4.6)	89.0 (4.1)	62.5 (3.8)	SD
7	88.0 (4.9)	100 (4.7)	93.0 (4.7)	SD
8	-	94.0 (5.0)	47.3 (3.7)	SD

SD=Sin detectar; NR= no realizada

Registros de actividad ovárica (Promedio de todos los predios)



AP= anestro profundo
AS= anestro superficial
C= Ciclando
P= Preñada

Examen toros Año 1

ID PREDIO	Toros N ^a	Examen reproductivo	<i>Campylobacter fetus venerealis</i>	Comentarios
1	9	Aptos	Negativo	IA vaquillonas
2	25	Aptos	3 Positivos	Descarte Positivos
3	14	Aptos	Negativos	
4	3	2 Aptos	Negativos	1 toro con defectos heredable
5	3	Aptos	2 Positivos	Tratamiento toros; IA Vaq.
6	11	Aptos	NR	Control toros realizados en 2013-14
7	3	Aptos	Negativos	Vacunación rodeo
8	22	Aptos	10 Positivos	Tratamiento toros y vacunación

IA=Inseminación artificial; Vaq=Vaquillonas

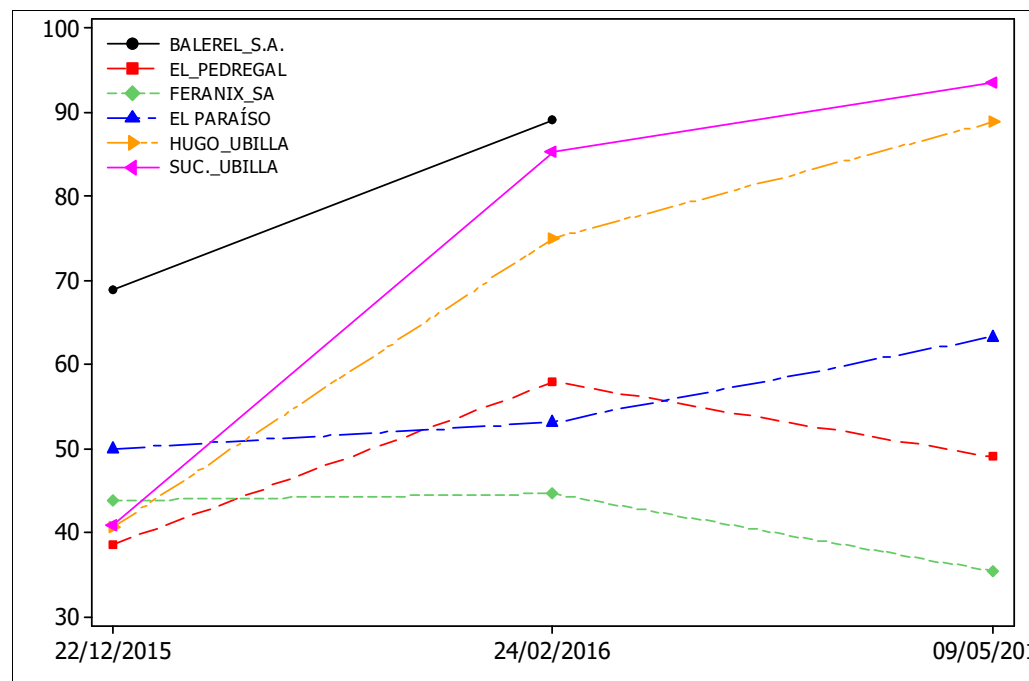


Predios evaluados en la zona Este

ID-PREDIO	DEPARTAMENTO	SECC	ZONA	GIRO DE PRODUCCIÓN
36	Treinta y Tres	# Ecografías realizadas Zona Este = 2400		Agrícola Ganadero
37	Treinta y Tres			Ganadero
38	Treinta y Tres			Ganadero
39	Cerro Largo	10	Alta	Ganadero
40	Treinta y Tres	7	Baja	Agrícola Ganadero
41	Rocha	6	Baja	Ganadero

Preñez periódica por predio-Año 1

(fechas promedios)



36	68,9%	89,1%	
37	38,6%	57,9%	49,0%
38	43,8%	44,6%	35,4%
39	50,0%	53,1%	63,3%
40	40,7%	75,0%	88,9%
41	40,8%	85,4%	93,5%

Mortalidad embrionaria/fetal

(entre 3ª y 4ª ecografía)

PREDIO	3a ECO	4a ECO	DÍAS	PREÑEZ	Mort Embr (P→V)	Mort Embr Período	Mort Embr global %
37	18/02/2016	05/05/2016	77	28	5	17,9%	10,2%
38	15/02/2016	25/05/2016	100	20	7	35,0%	14,9%
39	17/02/2016	29/04/2016	72	25	4	16,0%	8,5%
40	18/02/2016	10/05/2016	82	17	0	0,0%	0,0%
41	18/02/2016	10/05/2016	82	39	2	5,1%	4,3%

**ECO=Ecografía; Mort Embr=Mortalidad Embrionaria;
P=Preñada; V=Vacía**

Resultados *Campylobacter fetus venerealis*

PREDIO	FECHA	Raspajes toros (ID)	PCR	IFD*
36				
37	20/11/15	040 041	+	-
			-	-
38	20/11/15	103 s/c 129	-	-
			-	-
			-	-
39	6/11/15			
40	30/10/15	230 6438 6707	-	-
			-	-
			-	-
41	6/11/15	3937 6528 0965 3812	+	-
			+	-
			+	-
			-	+

*IFD: inmunofluorescencia directa

Resultados otras enfermedades

- **Diarrea viral bovina:**
 - **Negativos a ELISA para Antígeno viral**
- **Rinotraqueitis viral bovina:**
 - **Negativos a PCR para virus circulante**
- **Neospora caninum:**
 - **Muestras en análisis**

Algunas Conclusiones Preliminares

- **Datos de campo costosos de obtener y de análisis difícil**
- **Resultados de laboratorio costosos y de resultados inciertos y poco útiles para explicar los bajos resultados de preñez.**
- **En predios del Este, la mortalidad embrionaria y fetal temprana explican gran parte de las pérdida de preñez.**

Algunas Conclusiones Preliminares

- En predios del Norte, pérdidas embrionarias no se detectaron como importantes, pero si fallas en concepción.
- El principal problema sanitario detectado fue Campylobacteriosis genital bovina y algunas patologías del aparato reproductivo en toros.
- Son necesarios varios años para poder evaluar los datos con mayor exactitud.

Agradecimientos

- oA los productores participantes del proyecto
- oANII e INIA por la financiación
- oDres. Javier Regidor y Luis Ortega por el apoyo en las capacitaciones.
- oMédicos veterinarios que realizaron ecografías
- oA la Dra. Sabrina Pimentel y Ing. Lorena Luna por trabajos de PCR.

MUCHAS GRACIAS!



Estudio epidemiológico y económico de las principales enfermedades infecciosas causantes de pérdidas reproductivas en los rodeos de cría

Becarios PhD

Carolina BRIANO (DILAVE T y Tres)

OBJETIVO:

2) Poner a punto y estandarizar las diferentes técnicas de diagnóstico necesarias para la conducción del proyecto, en los diferentes laboratorios participantes del mismo.

Neospora caninum

- Principal causa de aborto en el mundo

Estudios Serológicos:

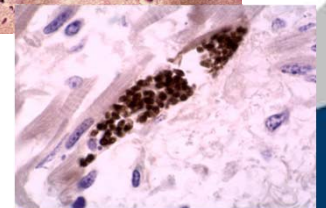
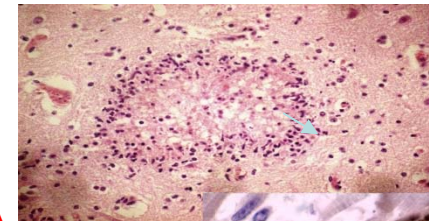
Alta prevalencia peridial 77 a 92%

Alta prevalencia individual 22%

- Repisso y col.
- Piaggio y Macchi (comunicación oral Robello 2018)

DIAGNOSTICO:

- Patología e **HISTOPATOLOGIA**
- Inmunohistoquímicos (IHQ)
- Aislamiento por inoculación y citocultivo
- **PCR específica, sensible y rápida**



Tachyzoitos de *N. caninum* en miocardio (IHQ). Feto bovino.
Foto cedida por las Dras Cristina Estense y Cecilia Pailler, DILAVE, Montevideo.



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

Caracterización genética de *Neospora caninum* en fetos bovinos abortados en Uruguay.

PROYECTO DE TESIS DOCTORADO
Carolina Mercedes Briano Rodriguez

DIRECTOR DE TESIS Y CO-DIRECTOR: America Mederos,
Cristina Easton y Fernando Dutra

ORIENTACIÓN: Salud Animal



OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. **Implementar una PCR anidada para la detección de *N. caninum*** a partir de abortos espontáneos de bovinos (casos nuevos y de archivo) y **establecer su utilidad** en la detección de la infección por *N. caninum* en dichos tejidos así como la correlacionar con el diagnóstico clásico: histología, inmunohistoquímicos y/o inmunofluorescencia indirecta.

Estudiar la población genética: mediante análisis de microsatélites de todos fetos diagnosticados positivos a *Neospora* por histología e inmunofluorescencia indirecta.

2. Realizar un **análisis de relación genética** entre nuestra/s cepa/s y las reportadas a nivel internacional.
3. **Investigar el patrón geográfico y espacio temporal** de todos los casos diagnosticados en DILAVE como *N. caninum* y determinar su asociación con los sistemas productivos. De existir diversidad genética, **analizar la relación existente a nivel de distribución geográfica y temporal, tipo de sistema productivo y tipo de brote.**

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1. Implementar una PCR anidada para la detección de *N. caninum*** a partir de abortos espontáneos de bovinos (casos nuevos y de archivo) y **establecer su utilidad** en la detección de la infección por *N. caninum* en dichos tejidos así como la correlacionar con el diagnostico clásico: histología, inmunohistoquímicos y/o inmunofluorescencia indirecta.
- 2. Estudiar la población genética: mediante análisis de microsatélites** de todos fetos diagnosticados positivos a *Neospora* por histología e inmunofluorescencia indirecta.
- 3. Realizar un análisis de relación genética** entre nuestra/s cepa/s y las reportadas a nivel internacional.
- 3. Investigar el patrón geográfico y espacio temporal** de todos los casos diagnosticados en DILAVE como *N. caninum* y determinar su asociación con los sistemas productivos. De existir diversidad genética, **analizar la relación existente a nivel de distribución geográfica y temporal, tipo de sistema productivo y tipo de brote.**

Puesta punto de PCR a tiempo final para la identificación de *N. caninum*

- Se ha utilizado una serie de genes blancos:

» ADN ribosomal 18S

» ADN ribosomal 28S

- ✓ Nested en un solo tubo
- ✓ + alta sensibilidad y especificidad reportada
- ✓ 0,1 a 0,01 taquizoito
- ✓ +usado

» La región interna del espaciador transcrito 1 del gen ARNr (ITS 1)

» gen 14-3-3

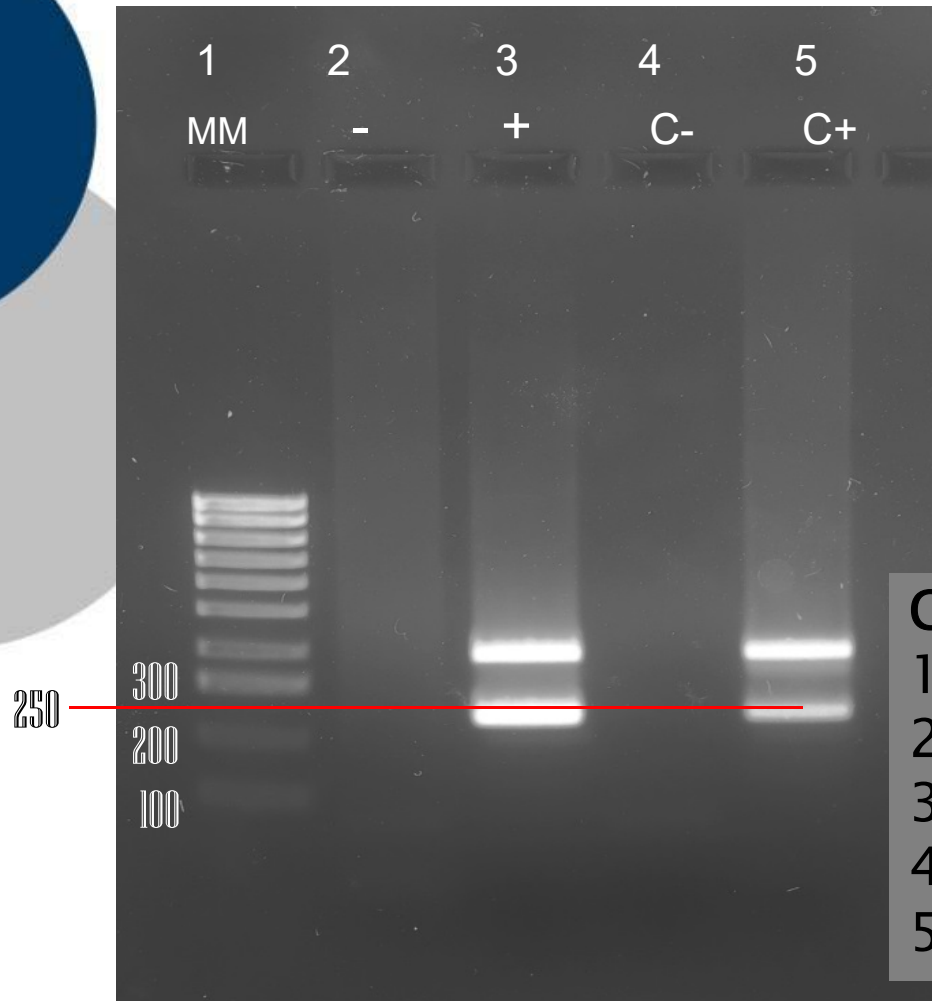
» gen pNc5

- ✓ no existe en el genoma de *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis cruzi* o *Hammondia hammondi*
- ✓ 1 taquizoito en 2mg
- ✓ alta sensibilidad y especificidad
- ✓ muy usado

PCR Neospora - DILAVE

Se VALIDO con la
colaboración de UCM
(Laboratorio de
referencia)

Ya está integrada en la
rutina de diagnostico



Carril

- 1: Marcador molecular
- 2: Muestra problema negativa
- 3: Muestra problema positiva
- 4: Control negativo
- 5: Control Positivo

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Implementar una PCR anidada para la detección de *N. caninum* a partir de abortos espontáneos de bovinos (casos nuevos y de archivo) y **establecer su utilidad** en la detección de la infección por *N. caninum* en dichos tejidos así como la correlacionar con el diagnostico clásico: histología, inmunohistoquímicos y/o inmunofluorescencia indirecta.

Estudiar la población genética mediante el análisis de microsatélites de todos los fetos diagnosticados positivos a *Neospora* por histología e inmunofluorescencia indirecta, y positivos a por PCR.

3. Realizar un **análisis de relación genética** entre nuestra/s cepa/s y las reportadas a nivel internacional.
4. Investigar el **patrón geográfico y espacio temporal** de todos los casos diagnosticados en DILAVE como *N. caninum* y determinar su asociación con los sistemas productivos. De existir diversidad genética, **analizar la relación existente a nivel de distribución geográfica y temporal, tipo de sistema productivo y tipo de brote.**

Análisis de los microsatélites (marcador) será por

- ❖ Los microsatélites seleccionados fueron MS4, MS5, MS6A, MS6B, MS7, MS8, MS10, MS12 y MS21
- ❖ Se realizó un entrenamiento en la UCM
- ❖ Se analizaron 45 muestras proveniente de abortos:
 - Varias zonas de nuestro país
 - Sistema productivos: leche y Carne
 - Casos endémicos y epidémicos
 - Periodo de 10 años

Marker

MS1A

MS1B

MS2

MS3

MS4

MS5

MS6A

le no.

1
2
3
4
1
2
3
4
1
2
3
4
5
6
1
2
3
4
5
6
7
8
9
1
2
3
1

Resumen de Resultados preliminares

• **Análisis de Base de datos**

- + de 2000 abortos
 - Bovinos de todo el país
 - Sistema productivos:
 - Ganado de carne extensivo
 - Ganado de leche
 - Casos endémicos y 1er caso epidémico
- Se ha extraído ADN exitosamente **de 120 muestras congeladas**
 - Se cuenta con PCR VALIDADO e incorporado a la rutina de diagnostico.
 - Se cuenta con 45 perfiles de MS para estudio de DIVERSIDAD GENETICA

Camino a seguir...

- Seguir adelante con la Tesis...
 - Continuar con el análisis de MS
 - Realizar un **análisis de relación genética** entre nuestra/s cepa/s y las reportadas a nivel internacional.
 - **Investigar el patrón geográfico y espacio temporal , analizar la relación existente a nivel de distribución geográfica y temporal, tipo de sistema productivo y tipo de brote.**
- Nueva línea...

Contamos con herramientas adecuadas para realizar un adecuado y eficiente diagnostico

Siguiente paso...**conocer modo de transmisión**
clave para desarrollar un plan de control adecuado en los predios afectados

Formas de transmisión

Endógena o
VERTICAL

Exógena u
HORIZONTAL

Se asocia
principalmente:

Endémico

**DETERMINA PLAN DE
CONTROL**

Epidémico

**TERNERO
CRONICAMENTE
INFECTADO**

ABORTO

INMUNE

Adaptado de : Florencia Pieruccioni

INIA

Nuevas líneas de trabajo....

Evaluar y diferenciar la transmisión horizontal y vertical en la presentación de brotes de abortos por *Neospora caninum* en sistemas de cría bovina de Uruguay

ORGAZACIONES PARTIPANTES:

- DILAVE “Miguel C Rubino”
- INIA
- Universidad Complutense de Madrid
- Centros Médicos Veterinarios de Treinta y Tres
- Centros Médicos Veterinarios Cerro Largo
- Centros Médicos Veterinarios Lavalleja
- Centros Médicos Veterinarios San José
- Plan Agropecuario
- SALUVET-innova



CENTRO MÉDICO VETERINARIO DE CERRO LARGO



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID



MUCHAS GRACIAS!

