

LEVANTAMENTO SOROLÓGICO DE *Neospora caninum* EM VACAS DA RAÇA HOLANDESA DA MICRORREGIÃO DE FRANCISCO BELTRÃO

José Xavier Rocha¹
Felipe Lamberti Pivoto²
Adelina Rodrigues Aires³
Ricardo Xavier da Rocha³
Abilio Galvão Trindade Ferreira⁴
Marta Lizandra do Rego Leal²

RESUMO

A bovinocultura de leite é uma das principais atividades econômicas do Brasil. O protozoário *Neospora caninum* acarreta grandes perdas econômicas nessa atividade, as quais podem ser reduzidas por métodos de controle. Para sanar a carência de informações a respeito do *N. caninum* na microrregião de Francisco Beltrão, o objetivo desse estudo foi analisar a soroprevalência de *N. caninum* e salientar a importância do diagnóstico e da adoção de medidas adequadas de manejo. Para isso, foram analisadas 367 amostras de soro de vacas da raça holandesa localizadas na microrregião de Francisco Beltrão no estado do Paraná, Brasil, com idade entre dois e quatro anos pela reação de imunofluorescência indireta, apresentando frequência de IgG anti *N. caninum* de 35,1%. Isso revela que vacas de leite da microrregião de Francisco Beltrão apresentam frequência de IgG anti-*N. caninum* elevadas e independente do método a ser realizado, é de suma importância o diagnóstico dessa enfermidade para que medidas de controle sejam implementadas e as perdas minimizadas.

Palavras-chave: bovinos de leite, controle, epidemiologia, protozoário.

SEROLOGICAL SURVEY OF *Neospora caninum* IN HOLSTEIN COWS IN THE FRANCISCO BELTRÃO REGION OF PARANÁ, BRAZIL

ABSTRACT

Dairy cattle is one of the main economic activities of Brazil. The protozoa *Neospora caninum* causes great economic losses in this activity, which can be reduced through control methods. To minimize the lack of information about the *N. caninum* in the *Francisco Beltrão* region of Paraná, Brazil, the aim of this study was to analyze the seroprevalence of *N. caninum* and emphasize the importance of diagnosis and the adoption of appropriate management measures. For this 367 serum samples from Holstein cows located in the Francisco Beltran region of Paraná, Brazil, aged from two to four years were analyzed by indirect immunofluorescence. It was obtained a prevalence of 35.1%. This reveals that the dairy cattle in the region present high frequency of IgG anti-*N. caninum* and independent of the method to be performed, is of highlight realize the diagnosis of this disease so that control measures may be implemented to minimize the losses.

Keywords: dairy cattle, control, epidemiology, protozoa.

¹ Curso de Medicina Veterinária, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Campus São Miguel do Oeste – SC. Contato principal para correspondência.

² Departamento de Grandes Animais, Clínica e Cirurgia de Grandes Animais Universidade Federal de Santa Maria.

³ Curso de Medicina Veterinária, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Campus Xanxerê – SC.

⁴ Nutre Saúde e Produção animal.

EVALUACIÓN SEROLÓGICA DE *Neospora caninum* EN VACAS DE LA RAZA HOLSTEIN EN LA MICROREGIÓN DE FRANCISCO BELTRÁN, PARANÁ, BRASIL

RESUMEN

El ganado lechero es una de las principales actividades económicas de Brasil con el protozoario *Neospora caninum* que causan grandes pérdidas económicas en esta actividad, que se pueden reducir a través de métodos de control. Para remediar la falta de información sobre la *N. caninum* en la microregión de Francisco Beltrão, el objetivo de este estudio fue analizar la seroprevalencia de *N. caninum* y hacer saber sobre la importancia del diagnóstico y la adopción de medidas de gestión adecuadas. Para esto 367 muestras de suero de vacas Holstein ubicadas en la microregión de Francisco Beltrão, Paraná, Brasil, entre dos y cuatro años, fueron analizadas por inmunofluorescencia indirecta, mostrando la frecuencia de IgG anti-*N. caninum* de 35,1 %. Esto revela que la leche de vacas de esta microregión de Francisco Beltrão frecuencia actual de IgG anti-*N. caninum* elevadas e independiente del método a realizar, es de suma importancia realizar el diagnóstico de esta enfermedad para que medidas de control sean aplicadas y con eso pérdidas minimizadas.

Palabras clave: vacas lecheras, control, epidemiología, protozoario.

A bovinocultura de leite é uma das principais atividades econômicas do Brasil com rebanho de aproximadamente 16 milhões de vacas leiteiras. Nessa atividade, destacam-se os estados de Minas Gerais, Goiás e Paraná como os principais produtores de leite. Somente no Paraná, é mais de 1,5 milhões de vacas leiteiras com produção média de 5,8 litros animal dia, o que torna a bovinocultura de leite a principal fonte de renda de inúmeras famílias. Os bovinos, assim como outras espécies, estão expostos a inúmeras enfermidades as quais reduzem a lucratividade e dificultam o manejo animal, como é o caso da neosporose bovina responsável por perdas econômicas na faixa de 51 mil dólares por ano no Brasil (1).

O *Neospora caninum*, agente etiológico da neosporose bovina, dissemina-se pela via horizontal onde os hospedeiros definitivos (Canídeos) contaminam o ambiente com oocistos e as vacas, hospedeiros intermediários, infectam-se ao ingerir esses oocistos. Ou ainda pela via vertical, quando vacas infectadas transmitem o *N. caninum* à sua prole por via transplacentária, dando origem a neonatos infectados ou persistentemente infectados (2).

O diagnóstico da neosporose bovina é realizado principalmente por meio de métodos de detecção de anticorpos, com destaque para a Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) os quais permitem quantificar os níveis de anticorpos presentes no hospedeiro, ou ainda por métodos mais específicos como a Reação em Cadeia de Polimerase, porém os dois primeiros são os métodos de eleição para o diagnóstico da doença.

Para sanar a carência de informações a respeito do *N. caninum* na microrregião de Francisco Beltrão, o objetivo desse estudo foi analisar a soroprevalência de *N. caninum* na microrregião de Francisco Beltrão e salientar a importância do diagnóstico e da adoção de medidas adequadas de manejo.

Amostras de sangue de 367 vacas da raça Holandesa de propriedades localizadas na microrregião de Francisco Beltrão no estado do Paraná, Brasil, com idade entre dois e quatro anos, foram coletadas por meio de punção de veia coccígea por sistema vacuoteiner em tubos sem anticoagulante. O sangue total obtido foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos para obtenção do soro, os quais foram estocados a -20°C até serem analisados pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) buscando detectar a presença de imunoglobulinas da classe G (IgG) anti-*Neospora spp.* (3).

Como antígenos primários, foram utilizados taquizoítas de *N. caninum* da cepa NC-1 cultivados em células da linhagem VERO, e como anticorpo secundário, anti-IgG[®] bovina, conjugado à fluoresceína¹. Amostras de soro bovino sabidamente positiva e negativa quanto à presença de anticorpos anti-*Neospora* spp. foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente. As amostras foram diluídas na titulação de 50 e consideradas positivas quando a fluorescência ocorreu em toda a superfície dos taquizoítas de *N. caninum* e negativas quando a fluorescência foi apical ou ausente (4).

Os dados para quantificação do número de amostras a serem analisadas foi calculado seguindo a fórmula $n = p(1-p) * (Z/E)^2$

Sendo: p = A proporção estimada baseada em estudos prévios

Z = O valor de t de Student para diferentes intervalos de confiança

E = O erro máximo aceito

Admitindo-se um erro de 5% e intervalo de confiança de 95%, com frequência estimada de 16% de acordo com Reichel et al. (1), os resultados da sorologia foram analisados por distribuição de frequência relativa com auxílio do programa GraphPad[®] Prism 5².

A frequência de anticorpos IgG anti-*N. caninum* na microrregião de Francisco Beltrão foi de 35,1% (129/367), valor superior a média nacional em vacas de leite que está relatada em 16,1% (1). Este fato pode ter ocorrido em virtude de que todas as amostras analisadas foram oriundas de animais com idade superior a 24 meses, sendo que segundo o estudo de Guimarães et al. (5) estes apresentam 3,1 vezes mais chance de serem infectados do que animais mais jovens. Além disso, foram utilizadas vacas da raça holandesa, sendo estas mais vulneráveis a infecção por *N. caninum* (*odds ratio* (OR) = 2,13) que raças zebuínas e/ou mestiças (5).

Nessa mesma linha de pensamento, o que pode justificar a presença de 129 animais soropositivos dos 367 analisados em nosso estudo é o fato que todas as propriedades visitadas apresentavam relatos de aborto e presença de cães, sendo esses fatores de risco para a ocorrência de infecção pelo protozoário estudado, com valores de OR de 4,52 e 2,62, respectivamente, segundo estudo realizado na Argélia, onde foram coletados soro de 799 vacas de 87 propriedades (6).

O *N. caninum* está relatado em mais de 10 países como causas de problemas reprodutivos em bovinos, sendo um importante agente causador de perdas econômicas (1), não somente pelo aborto que a neosporose pode causar, como também pela redução na produção de leite (7).

Para adotar medidas para a redução de perdas ocasionadas por esse protozoário, é de suma importância a realização do diagnóstico na propriedade, seja pela coleta de sangue do animal (3) ou ainda por análise individual de leite, que tem como principal vantagem ser de fácil coleta, além de ocasionar menor estresse ao animal se comparado com a coleta de sangue (8).

Com a frequência de anticorpos anti *N. caninum* encontrados nesse estudo (35,1%), é possível adotar estratégias de controle do agente como os descritos por Häsler et al. (9): (i) descarte de animais soropositivos, (ii) tratamento quimioterápico dos neonatos nascidos de vacas soropositivas e (iii) vacinação de todos o rebanho ou ainda (iv) utilização de reprodutores de raças com aptidão a carne.

Todas essas estratégias de controle apresentando vantagens e desvantagens, onde no (i) o fator positivo é eliminar animais que apresentam maior probabilidade de apresentar problemas reprodutivos, tal como aborto, retenção de placenta e metrite (10) e como negativo o descarte, muitas vezes, de animais com bom potencial produtivo e/ou valor agregado. No

¹ Anti-IgG bovina conjugada com a fluoresceína (FITC): *Affinity Purified Antibody Fluorescein*. Clopper Road 910, Gaithersburg, MD 20878 USA. www.kpl.com.

² GraphPad Software, San Diego, USA.

(ii) e (iii), o principal fator que torna inviável a utilização é a baixa eficácia desses controles, e que atualmente não há vacina comercial anti-*N. caninum* (2). E o (iv) que, em estudos anteriores, apresentou melhores resultados quando comparados a outros sistemas de controle, com índices de custo benefício na faixa de 1,29 (9). Isso em virtude de que o principal mecanismo de disseminação do *N. caninum* em vacas de leite é a via vertical, onde neonatos filhos de vacas soropositivas nascem persistentemente infectados (PI), com possível reativação do protozoário no momento da gestação desses animais PI, e conseqüentemente casos de aborto (2).

Por fim, fica evidente que vacas de leite da microrregião de Francisco Beltrão apresentam frequências de IgG anti-*N. caninum* elevadas e independente do método a ser realizado, é de suma importância o diagnóstico dessa enfermidade para que medidas de controle sejam implementadas e as perdas minimizadas.

REFERÊNCIAS

1. Reichel MP, Alejandra Ayanegui-Alcérreca M, Gondim LFP, Ellis JT. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – The billion dollar question. *Int J Parasitol.* 2013;43(2):133-42.
2. Goodswen SJ, Kennedy PJ, Ellis JT. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present. *Infect Genet Evol.* 2013;13:133-50.
3. McInnes LM, Ryan UM, O’Handley R, Sager H, Forshaw D, Palmer DG. Diagnostic significance of *Neospora caninum* DNA detected by PCR in cattle serum. *Vet Parasitol.* 2006;142(3-4):207-13.
4. Pare J, Hietala SK, Thurmond MC. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *J Vet Diagn Invest.* 1995;7(2):273-5.
5. Guimarães Jr JS, Souza SLP, Bergamaschi DP, Gennari SM. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. *Vet Parasitol.* 2004;124(1-2):1-8.
6. Ghalmi F, China B, Ghalmi A, Hammitouche D, Losson B. Study of the risk factors associated with *Neospora caninum* seroprevalence in Algerian cattle populations. *Res Vet Sci.* 2012;93(2):655-61.
7. González-Warleta M, Castro-Hermida JA, Carro-Corral C, Mezo M. Anti-*Neospora caninum* antibodies in milk in relation to production losses in dairy cattle. *Prev Vet Med.* 2011;101(1-2):58-64.
8. Camillo G, Cezar AS, Antonello AM, Sangioni LA, Flores EF, Pereira GR, et al. Detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em amostras individuais e coletivas de leite de bovinos pela reação de imunofluorescência indireta. *Pesqui Vet Bras.* 2011;31(6):482-6.
9. Häsler B, Regula G, Stärk KDC, Sager H, Gottstein B, Reist M. Financial analysis of various strategies for the control of *Neospora caninum* in dairy cattle in Switzerland. *Prev Vet Med.* 2006;77(3-4):230-53.
10. Asmare K, Regassa F, Robertson LJ, Skjerve E. Seroprevalence of *Neospora caninum* and associated risk factors in intensive or semi-intensively managed dairy and breeding cattle of Ethiopia. *Vet Parasitol.* 2013;193(1-3):85-94.

Recebido em: 21/01/2014

Aceito em: 17/08/2015