

AVALIAÇÃO DE UM ÚNICO EXAME SOROLÓGICO NA TRIAGEM DE BOVINOS MESTIÇOS EXPOSTOS À *Neospora caninum**

Vanessa Carvalho Sampaio de Magalhães¹, Sônia Carmen Lopo Costa², Uillians Volkart de Oliveira³, Clebson Pereira de Almeida⁴ e Alexandre Dias Munhoz⁵⁺

ABSTRACT. de Magalhães, V.C.S., Costa, S.C.L., de Oliveira, U.V., de Almeida, C.P. & Munhoz, A.D. [Evaluation of a single serologic test in screening of crossbred dairy herd exposed to *Neospora caninum*]. Avaliação de um único exame sorológico na triagem de bovinos mestiços expostos à *Neospora caninum*. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 34(3):247-250, 2012. Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias, Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Ilhéus-Itabuna, Km 16, Salobrinho, Ilhéus, BA 45662-000, Brasil. Email: munhoz@uesc.br.

Crossbred animals from a dairy property with history of exposure to *Neospora caninum* were investigated in a longitudinal study. This study aimed to determine the relative specificity and sensitivity, positive and negative predictive values and agreement on a single sample detection of exposed and non-exposed animals to *N. caninum*. Blood was collected from 196 animals on three different occasions with a mean interval of 210 days between collections. The samples were examined for *N. caninum* using indirect fluorescent antibody test (cutoff titer 1:200). The serological results of the first sample collection were compared with those of the three consecutive collections. Positive animals were those with two or more reactive samples while negative ones were those with two or more negative samples. The sensitivity and specificity was 90.5% and 99.4%, respectively. The positive predictive value was 97.4% while the negative predictive value was 97.5%. The value of kappa was 0.92. High agreement, sensitivity and specificity suggest that a crossbred animal can be reliably characterized as exposed or non-exposed based on a single sample using a cutoff of 1:200 in the test. It is thus a valid method to determine the prevalence of *N. caninum* in mixed-race herds.

KEY WORDS. *Neospora caninum*, Cattle, Indirect fluorescent antibody test.

RESUMO. Uma propriedade leiteira, constituída por animais mestiços, com histórico de exposição por *Neospora caninum* fez parte de um estudo longitudinal, onde se objetivou determinar a especificidade e sensibilidade relativas, valores preditivos, positivo e negativo e concordância de uma única amostra na detecção de animais expostos e não expostos a *N. caninum*. Foi possível coletar sangue de 196 bovinos em três momentos diferentes, com

intervalo médio de 210 dias entre as coletas. As amostras foram submetidas à Reação de Imunofluorescência Indireta para detecção de anticorpos contra-*Neospora caninum*, utilizando ponte de corte de 1:200. O resultado sorológico da primeira amostra foi comparado com os resultados baseados nas três amostras consecutivas. Considerou-se como positivo o animal em que duas ou mais amostras foram positivas e da mesma forma, um animal foi consi-

*Recebido em 28 de janeiro de 2012.

Aceito para publicação em 29 de fevereiro de 2012.

¹Médica-veterinária, *M.Ci. Anim.*, autônoma. E-mail: vanessacsmagalhaes@gmail.com

²Médica-veterinária, *M.Ci. Anim.*, Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais (DCAA), UESC, Campus Soane Nazaré de Andrade, Rodovia Ilhéus Itabuna, Km 16, Salobrinho, Ilhéus, BA 45662-000, Brasil. E-mail: sonia.lopo@hotmail.com

³Médico-veterinário, *M.Ci. Anim.*, autônomo. E-mail: uvolkart@hotmail.com - bolsista CNPq.

⁴Médico-veterinário, autônomo. E-mail: clebsonj2@yahoo.com.br

⁵ Médico-veterinário, *Dr.CsVs*. Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias, Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Ilhéus-Itabuna, Km 16, Salobrinho, Ilhéus, BA 45662000. +Autor para correspondência. Email: munhoz@uesc.br

derado negativo se duas ou mais amostras foram negativas. A sensibilidade e especificidade foram de 90,5% e 99,4% respectivamente. O valor preditivo positivo foi 97,4%, enquanto que o negativo foi 97,5%. O valor do *kappa* foi 0,92. Os altos valores de concordância, sensibilidade e especificidade permitem concluir que há confiabilidade em caracterizar um animal como exposto ou não exposto, com base em uma única amostra, utilizando 1:200 como ponto de corte do teste, em bovinos mestiços e assim um método válido para se verificar a prevalência de *N. caninum* dentro dos rebanhos mestiços.

PALAVRAS-CHAVE. *Neospora caninum*, Bovinos, Reação de Imunofluorescência Indireta.

INTRODUÇÃO

Neospora caninum é um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa (Dijkstra et al. 2001), sendo uma importante causa de aborto em bovinos em todo o mundo (Dijkstra et al. 2002; Kul et al. 2009). Nestes animais a transmissão vertical é a principal rota de transmissão chegando a taxas de até 95% (Davison et al. 1999), contudo a infecção horizontal é importante para a manutenção da parasitose no rebanho (French et al. 1999).

Vários testes sorológicos têm sido utilizados para detecção de anticorpos anti- *N. caninum* incluindo ensaios imunoenzimáticos indiretos (ELISAs), Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) e testes de aglutinação (NAT) (Dubey 2003). Em bovinos, a sensibilidade dos testes pode ser influenciada por flutuações nas titulações de animais cronicamente infectados, principalmente em gestantes, pelas variações nos níveis de anticorpos observadas (Paré et al. 1997, Guy et al. 2001, Adrianarivo et al. 2005, Kyaw et al. 2005, Nogareda et al. 2007) e em animais jovens, uma vez que apresentam uma maior instabilidade nas titulações que em animais adultos (Jensen et al. 1999).

Pouco se sabe sobre a flutuação de anticorpos em bovinos mestiços, e se a mestiçagem pode influenciar nos resultados da sorologia. É fato que bovinos leiteiros são mais susceptíveis à infecção do que bovinos de corte (Moore et al. 2002), o que pode ser um indício de que animais de origem indiana possam ter um controle mais eficiente contra o parasito.

Diante do exposto objetivou-se neste estudo determinar a especificidade e sensibilidade relativas, valores preditivos, positivo e negativo e concordância de uma única amostra em relação a três na de-

tecção de bovinos mestiços expostos e não expostos a *N. caninum*.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido entre fevereiro de 2009 a maio de 2010 em uma propriedade com histórico de exposição por *N. caninum* (Galvão et al. 2011). A propriedade selecionada adota um sistema semi-intensivo de criação e possui um total de 350 bovinos, em média, destes, 110 são vacas em lactação com uma produção leiteira de 1.200 litros de leite ao dia. A alimentação era composta por rotação de pasto, sais minerais *ad libitum* e uma suplementação concentrada a base de milho, soja e uréia. As vacas eram ordenhadas duas vezes ao dia através de ordenhadeira mecânica em sistema fechado. O rebanho presente na propriedade é constituído por animais mestiços de ¼ Zebu, ¾ Europeu à ¼ Europeu, ¾ Zebu.

Foram coletadas amostras de sangue de todos os bovinos presentes na propriedade, em três momentos com intervalo médio de 210 dias entre as coletas. Ao final, 196 bovinos tiveram seu sangue amostrado nas três coletas e fizeram parte deste estudo.

O sangue, coletado sem anticoagulante, foi obtido por punção das veias, jugular ou coccígea. Após a retração do coágulo, as amostras foram centrifugadas a 350 x g por 10 minutos, e o soro obtido foi acondicionado à temperatura de -20°C até o momento da realização da sorologia.

A RIFI foi realizada de acordo com Yamane et al. (1997). O ponto de corte utilizado foi de 1:200 (Dubey & Lindsay 1996). As lâminas foram sensibilizadas com taquizoítos da cepa NC-BA (Gondim et al. 2001) e o conjugado utilizado foi o anti-IgG bovino (Sigma®-Aldrich F4387 inc., EUA). Os controles, negativo e positivo, foram obtidos de bovinos naturalmente infectados e de bovinos negativos (Galvão et al. 2011).

O resultado da primeira triagem foi confrontado com os resultados baseados nas três amostras obtidas dos mesmos animais e desta forma determinou-se a sensibilidade e especificidade relativa. Os valores preditivos, positivos e negativos, proporção de concordância e o valor do *kappa* foram feitos através do programa OpenEpi, versão 2.3.1. (Dean et al. 2012). Considerou-se como positivo o animal em que duas ou mais amostras foram positivas, da mesma forma, um animal foi considerado negativo se duas ou mais amostras foram negativas de acordo com o estudo de Dijkstra et al. (2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em apenas cinco animais observou-se alteração do resultado da primeira em relação às três amostras. Destes, em quatro houve mudanças no status sorológico de negativo na primeira amostra para positivo nas outras duas e em apenas um, houve mudança de positivo na primeira amostra para negativo nas duas últimas (Tabela 1). Trinta e nove (19,9%) de 196 animais foram considerados soropositivos para *N. caninum* baseados na primeira amostra, enquanto que 21,4% (42/196) dos animais foram considerados soropositivos baseados em três amostras consecutivas (Tabela 1). A sensibilidade relativa foi de 90,5% (IC 95%: 77.93 - 96.23%), e a especificidade relativa foi de 99,4% (IC 95%: 96.41- 99.89%). Os valores preditivos, positivo e negativo foram respectivamente de 97,4% (95% IC: 86.82 - 99.55%) e 97,5% (95%IC: 93.63 - 99%). A proporção de concordância observada foi de 97,5% e o valor de *kappa* foi de 0,92 (95% IC: 0.7824 - 1.062).

Dos quatro animais em que a soroconversão para positivo foi observada em relação à primeira amostra, dois eram bezerros com a mesma faixa etária, faziam parte de um mesmo agrupamento, possuíam mães soronegativas, sendo provavelmente infectados após a primeira colheita de sangue, indicando transmissão horizontal como observado por Dijkstra et al. (2003), e não um erro do teste.

Embora, o surgimento da mudança do *status* sorológico, de negativo para positivo, seja indicativo de uma fonte externa de exposição (Dijkstra et al. 2002) não se pode descartar a possibilidade da existência de resultados falsos positivos (Pfeiffer et al. 2002, Frossling et al. 2005, Chalun et al. 2007) ou até mesmo a recrudescência de uma infecção crônica (Waldner et al. 2001, Chalun et al. 2007), como foi o caso de uma vaca que soroconverteu para positivo. Este animal durante a primeira coleta estava em lactação e vazia, e durante a segunda e terceira coleta gestante, logo este animal ou foi infectado

Tabela 1. Comparação do *status* sorológico para *Neospora caninum*, entre uma amostra e três amostras consecutivas, de um rebanho leiteiro constituído por animais mestiços.

Resultado da 1ª amostra	Resultado baseado em três amostras consecutivas (%)		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	38 (97,44)	01 (2,56)	39 (19,90)
Negativo	04 (2,55)	153 (97,45)	157(80,10)
Total	42 (21,43)	154 (78,57)	196 (100)

Kappa = 0,92.

após a primeira amostra, ou já possuía anticorpos contra-*N. caninum*, porem abaixo do ponto de corte. Neste caso, é possível que a gestação possa ter influenciado uma recrudescência de uma infecção latente, com aumento nos níveis de anticorpos. Fato semelhante ocorreu com animal que soroconverteu para negativo, pois era uma vaca que na primeira amostra encontrava-se gestante e apresentou um título de 800, titulação esta que descarta a possibilidade de haver ocorrido um resultado falso positivo. Por fim houve um touro que soroconverteu para positivo, sendo que o mesmo ou foi infectado após a primeira colheita ou recebeu resultado falso negativo no primeiro exame.

Desta forma, ao considerarmos os dois bezerros que soroconverteram para positivo em função de uma infecção horizontal, como realmente negativos na primeira amostra obtêm-se os resultados encontrados na tabela 2. Neste caso, têm-se a sen-

Tabela 2. Comparação do *status* sorológico para *Neospora caninum*, entre uma amostra e três amostras consecutivas, de um rebanho leiteiro constituído por animais mestiços, considerando-se animais que soroconverteram em função de uma infecção horizontal como soronegativos

Resultado da 1ª amostra	Resultado baseado em três amostras consecutivas (%)		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	38 (97,44)	01(2,56)	39 (19,90)
Negativo	02 (1,27)	155 (98,73)	157(80,10)
Total	40 (20,41)	156(79,59)	196 (100)

Kappa= 0,95.

sibilidade relativa de 95% (95% IC: 83,5 - 98,6%). A especificidade relativa de 99,4% (95% IC:96,5-99,9%), os valores preditivos positivo e negativo de 97,4% (95%IC: 86,8-99,5%) e 98,7% (95%IC: 95,5- 99,6%), respectivamente. A proporção de concordância 98,5% e o valor de *Kappa* de 0,95 (95%IC: 0,812-1.092).

Os resultados do presente estudo evidenciam uma alta confiabilidade em caracterizar um animal como exposto ou não exposto, com base em uma única amostra, em bovinos mestiços, utilizando um ponto de corte de 1:200, visto a alta concordância e demais parâmetros analisados, o que se assemelham aos observados por Dijkstra et al. (2003) em animais da raça holandesa e utilizando o teste ELISA, neste contexto a utilização de pontos de corte inferiores à 1:200 (Dubey 2003) devem ser reavaliados, visto a possibilidade de detecção de um maior número de animais falso-positivos, do que animais negativos ao ponto de corte de 1:200.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrianarivo A.G., Anderson M.L., Rowe J.D., Gardner I.A., Reynolds J.P., Choromanski L. & Conrad P.A. Immune responses during pregnancy in heifers naturally infected with *Neospora caninum* with and without immunization. *Parasitol. Res.*, 96:24-31, 2005.
- Chanlun A., Emanuelson U., Frössling J., Aiumlamai S. & Björkman C. A longitudinal study of seroprevalence and seroconversion of *Neospora caninum* infection in dairy cattle in northeast Thailand. *Vet. Parasitol.*, 146:242-248, 2007.
- Davison H.C., Otter A. & Trees A.J. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *Int. J. Parasitol.*, 29:1683-1689, 1999.
- Dean A.G., Sullivan K.M. & Soe M.M. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Version 2.3.1. Disponível em: < www.OpenEpi.com >. Acesso em: 4 set. 2012.
- Dijkstra Th., Barkema H.W., Eysker M. & Wouda W. Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. *Int. J. Parasitol.*, 31:209-215, 2001.
- Dijkstra Th., Barkema H.W., Björkman C. & Wouda W. A high rate of seroconversion for *Neospora caninum* in a dairy herd without an obvious increased incidence of abortions. *Vet. Parasitol.*, 109:203-211, 2002.
- Dijkstra Th., Barkema H.W., Eysker M., Beiboer M.L. & Wouda W. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. *Vet. Parasitol.*, 100:161-169, 2003.
- Dubey J.P. & Lindsay D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet. Parasitol.*, 67:1-59, 1996.
- Dubey J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J. Parasitol.*, 41:1-16, 2003.
- French N.P., Clancy D., Davisson H.C. & Tree A.J. Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control. *Int. J. Parasitol.*, 29:1691-1704, 1999.
- Frössling J., Uggla A. & Björkman C. Prevalence and transmission of *Neospora caninum* within infected Swedish dairy herds. *Vet. Parasitol.*, 128:209-218, 2005.
- Galvão G. da S., Gondim L.F.P., Pereira M.J.S., de Oliveira U.V. & Munhoz A.D. Soropositividade para *Neospora caninum* e associação ao abortamento e natimortos em rebanhos leiteiros do sudeste da Bahia, Brasil. *Rev. Bras. Med. Vet.*, 33:234-237, 2011.
- Guy C.S., Williams D.J.L., Kelly D.F., McGarry J.W., Guy F., Björkman C., Smith R.F. & Trees A.J. *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. *Vet. Rec.*, 149:443-449, 2001.
- Gondim L.F.P., Pinheiro A.M., Santos P.O.M., Jesus E.E.V., Ribeiro M.B., Fernandes H.S., Almeida M.A.O., Freire S.M., Meyer R. & McAllister M.M. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. *Vet. Parasitol.*, 101:1-7, 2001.
- Jensen A.M., Björkman C., Kjeldsen A.M., Wedderkopp A., Willadsen C., Uggla A. & Lind P. Associations of *Neospora caninum* seropositivity with gestation number and pregnancy outcome in Danish dairy herd. *Prev. Vet. Med.*, 40:151-163, 1999.
- Kul O., Kabakci N., Yildiz K., O'Cal N., Kalender H. & I Lkme N. A. *Neospora caninum* associated with epidemic abortions in dairy cattle: the first clinical neosporosis report in Turkey. *Vet. Parasitol.*, 159:69-72, 2009.
- Kyaw T., Suwimonterabutr J., Viraku P., Lohachit C. & Kalpravidh W. Seronegative conversion in four *Neospora caninum*-infected cows, with a low rate of transplacental transmission. *Vet. Parasitol.*, 131:145-150, 2005.
- Moore D.P., Campero C.M., Odeol N.A.C., Posso M.A., Cano D., Leunda M.R., Basso W., Venturini M.C. & Späth E. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. *Vet. Parasitol.*, 107:303-316, 2002.
- Nogareda C., López-gatius F., Santolaria P., García-ispierito I., Bech-sabat G., Pabón, M., Mezo, M., Gonzalez-warleta M., Castro-Hermida J. A., Yániz J. & Almaria S. Dynamics of anti-*Neospora caninum* antibodies during gestation in chronically infected dairy cows. *Vet. Parasitol.*, 148:193-199, 2007.
- Pare J., Thurmond M.C. & Hietala S.K. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J. Parasitol.*, 83:82-87, 1997.
- Pfeiffer D.U., Williamson N.B., Reichel M.P., Wichtel J.J. & Teague W.R. A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on a dairy farm in New Zealand. *Prev. Vet. Med.*, 54:11-24, 2002.
- Waldner C.L., Henderson J., Wu J.T.Y., Breker K. & Chow E.Y.W. Reproductive performance of a cow-calf herd following a *Neospora caninum*-associated abortion epidemic. *Can. Vet. J.*, 42:355-360, 2001.
- Yamane I., Kokuho, T., Shimura K., Eto M., Shibahara T. & Haritani M. In vitro isolation and characterization of a bovine *Neospora* species in Japan. *Res. Vet. Sci.*, 63:77-80, 1997.