

Soroepidemiologia de *Neospora caninum* em cães de área urbana no município de Porto Alegre-RS

Seroepidemiology of *Neospora caninum* in dogs from urban areas in the municipality of Porto Alegre-RS

Mariana Caetano Teixeira,* Flávio Antônio Pacheco de Araujo,* Rachel Galon da Silva,* Neusa Saltiel Stobbe**

Resumo

Neospora caninum é um protozoário do filo Apicomplexa que causa infecções associadas com aborto, mortalidade neonatal e alterações neurológicas em várias espécies animais. Este estudo, conduzido na área urbana do município de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, teve como objetivos: verificar a prevalência de anticorpos classe IgG para *N. caninum* em cães através da técnica de imunofluorescência indireta (RIFI) e avaliar os fatores de risco relacionados com o manejo e características individuais dos animais, através de questionário epidemiológico. Foram constituídos três grupos de cães: domiciliados (n= 145); errantes (n= 70) e de criatórios comerciais (n=45). A frequência de anticorpos total foi 13,84% (36/260) e entre os grupos foi de 15,8% para domiciliados, 17,1% para errantes e 2,2% para cães de criatório comerciais. Os títulos sorológicos observados variaram de 50 (44%) a 3200 (3%). Observou-se associação entre a soropositividade e os fatores alimentação (p<0.001) e origem dos cães. Este estudo demonstra que o *N. caninum* está presente em cães da área urbana de Porto Alegre, necessitando de mais estudos nessa população para esclarecer de forma mais detalhada os fatores de risco associados a este protozoário.

Palavras-chave: alimentação, caninos, imunofluorescência indireta, sorologia.

Abstract

Neospora caninum is a protozoan belonging to the phylum Apicomplexa that causes infections associated with fetal loss, neonatal mortality and neurological changes in several animal species. This study was conducted in the urban area of Porto Alegre, Rio Grande do Sul and its main objectives were: to assess the prevalence of IgG class antibodies to *N. caninum* in dogs by indirect immunofluorescence (IFI) and evaluate the risk factors related to individual characteristics and management of the animals through an epidemiological questionnaire. Three groups of dogs were constituted: domestic dogs (n = 145); wandering dogs (n = 70) and from commercial breeders (n = 45). The frequency of total antibodies was 13.84% (36/260), in each group was of 15.8% for domestic dogs, 17.1% for wandering ones and 2.2% for commercial breeders' dogs. The serologic titers ranged from 50 (44%) to 3200 (3%). It was observed an association between seropositivity and factors such as food (p < 0.001) and dogs' origin. This study demonstrates that *N. caninum* is present in dogs of the urban area of Porto Alegre-RS, requiring further study with such population in order to understand in detail the risk factors which are associated with this protozoan.

Keywords: Food, Canines, Indirect Immunofluorescence, Serology

Introdução

Neospora caninum é um protozoário do filo Apicomplexa que causa infecções associadas com aborto e mortalidade neonatal em várias espécies animais (Dubey e Lindsey, 1996). Durante muito tempo foi confundido com *Toxoplasma gondii* devido à semelhanças entre os dois protozoários (Dubey, 2003). O cão (McAllister et al., 1998), o coiote (Gondim et al., 2004) e o dingo australiano (King et al., 2010) eliminam oocistos após a ingestão de tecidos ou órgãos dos hospedeiros intermediários e desempenham papel fundamental na epidemiologia da neosporose por serem os hospedeiros definitivos deste parasito.

Este protozoário apresenta um ciclo de vida heteroxeno, onde uma grande variedade de espécies animais podem ser

consideradas como hospedeiros intermediários, entre elas os bovinos, ovinos, caprinos, cães e outros mamíferos (Dubey, 2003).

A transmissão vertical nos cães é responsável pela maioria dos casos clínicos observados (Dubey, 1999). Segundo Dubey (2003), a neosporose clínica em cães pode apresentar as seguintes manifestações: paresia e paralisia progressiva dos membros, hiperextensão flácida ou rígida, contrações espásticas dos membros e distúrbios neurológicos.

A soroprevalência para este protozoário em cães tem sido avaliada em vários países, inclusive no Brasil, onde podemos observar índices variados de acordo com o habitat dos animais, convívio com bovinos e a técnica sorológica empregada (Cañon-

* Laboratório de Protozoologia, Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Bento Gonçalves, 8804, Agronomia, 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

** Setor de Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

Autor para correspondência. E-mail: caetano_teixeira@hotmail.com.

Franco et al., 2003). As frequências em cães no Brasil variam de 2,6% na Bahia a 45% no estado do Mato Grosso (Sicupira et al., 2012; Benetti et al., 2008).

Vários autores vêm estudando a importância dos fatores de riscos na epidemiologia deste protozoário tanto no ambiente urbano como rural. A prevalência da infecção pelo *N. caninum* pode variar muito de região para região e até mesmo dentro de uma mesma região. Cada população de cães pode estar exposta a fatores de risco diferentes como: a ingestão de carne crua ou placenta de animais infectados ou contato com fezes de canídeos domésticos e selvagens infectados (Dijkstra et al., 2002).

O presente trabalho objetivou verificar a ocorrência de anticorpos da classe IgG para *Neospora caninum* em cães da área urbana do município de Porto Alegre- RS, utilizando a técnica de RIFI. Foram avaliados também fatores de risco para a exposição ao agente.

Materiais e métodos

A amostragem foi determinada de acordo com Thrusfield (2004), para uma expectativa de prevalência de 20%, com precisão absoluta de 5%, e nível de confiança de 95%, totalizando 260 amostras de sangue de cães.

A frequência de anticorpos para *N. caninum*, segundo os Grupos Experimentais e os fatores de risco (alimentação, idade, gênero e acesso a rua) foram analisados pelo Teste Exato de Fisher. As amostras de sangue de cães foram obtidas entre agosto de 2008 e junho de 2009, divididas em três grupos de acordo com a origem: animais domiciliados (Grupo A) com um total de 145 amostras; animais de criadores comerciais (Grupo B) com 45 amostras; e animais errantes (Grupo C) com 70 amostras. As amostras de cães domiciliados foram obtidas de animais atendidos em clínicas particulares e *pet shops* da cidade de Porto Alegre; as amostras de cães de criações comerciais obtidas em canis registrados no *Cannel Club* do RS e as amostras de cães errantes foram obtidas no Centro de Controle de Zoonoses do Município de Porto Alegre, RS.

Foi aplicado um questionário epidemiológico sob a forma de entrevista, apresentando perguntas referentes à idade, sexo, tipo de alimentação dos cães (alimentação comercial, caseira ou mista), questões relativas ao manejo dos animais e breve histórico clínico. A aplicação deste foi realizada diretamente com os proprietários ou responsáveis.

O sangue foi coletado através de punção das veias cefálica e/ou jugular, com seringa e agulha descartável, acondicionadas em tubos sem EDTA, identificados individualmente e enviadas sob refrigeração ao Laboratório de Protozoologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. No laboratório as amostras foram centrifugadas, e o soro obtido dividido em alíquotas e mantido a -20°C para posterior análise sorológica.

O antígeno utilizado para a realização da prova sorológica foi composto por taquizoítos de *N. caninum* (cepa NC-1), adquiridos no Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade de São Paulo. Os soros foram submetidos à técnica de RIFI segundo Dubey et al. (1988). Os soros positivos no ponto de corte (1:50) foram diluídos sequencialmente na base dois e testados até a máxima titulação testada que apresentou reação positiva utilizando conjugado de fluoresceína anti-IgG canina (Sigma-Aldrich® - F7884).

Resultados e discussão

Este é o primeiro relato de ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães de zona urbana da cidade de Porto Alegre, RS. Através da RIFI, foram observados anticorpos em 13,84% (36/260) dos cães analisados.

A frequência de anticorpos para *N. caninum* observada no presente estudo vem ao encontro dos resultados encontrados por diferentes autores no Brasil, como Magalhães et al., 2009 (11,8% - BA); Fridlund-Plugge et al., 2008 (12,7% - PR); Jesus et al., 2006 (13,3% - BA) e Moura et al., 2011 (12,3% - SC); todos utilizando a mesma técnica e ponto de corte. Alguns trabalhos, nos quais a amostragem foi superior à deste estudo, apresentam uma frequência mais elevada como Moraes et al., 2008 (25,4% - SP); e Figueiredo et al., 2008 (28,3% - PE), enquanto outros autores obtiveram frequências inferiores às relatadas neste trabalho como Cunha Filho et al., 2008 (5,5% - RS) em cães urbanos.

Das 145 amostras pertencentes ao Grupo A, em 23 (15,9%) foram detectados anticorpos para *N. caninum*. Em relação aos animais do grupo B, das 45 amostras coletadas, apenas uma (2,2%) foi positiva, enquanto os animais pertencentes ao grupo C, do total de 70 amostras coletadas, 12 (17,1%) foram positivas.

A análise estatística não detectou haver diferença significativa entre os grupos A e C, porém foi detectada diferença significativa ($p < 0,0001$) entre os grupos A e B; e entre B e C. Em relação aos animais do grupo B, estes possuíam controle mais rigoroso em relação ao acesso à rua, alimentação e cuidados veterinários, o que refletiu um valor de frequência de anticorpos abaixo dos obtidos nos outros grupos. Os autores observaram que um grande número de animais domiciliados (grupo A) não permaneciam restritos aos limites das residências e recebiam alimentação mista (73,8%), aproximando estes animais das características observadas nos cães errantes (grupo C).

De acordo com Brinker (2012), a origem e condições de vida dos cães são fatores de risco importantes para a infecção por este protozoário, uma vez que é maior a chance de exposição dos animais errantes ou de baixas condições de manejo à carne ou vísceras contaminadas, além de oocistos esporulados, quando comparados aos animais domiciliados ou de melhores condições de manejo.

Jesus et al. (2006) em trabalho realizado no estado da Bahia também não detectaram uma diferença significativa em relação à procedência dos animais quando comparado animais domiciliados e errantes. Esta observação pode estar relacionada com a maior probabilidade de ingestão de roedores, pássaros e outros animais que podem servir de reservatórios para o protozoário, e desta forma servir de fonte de infecção para cães de rua e domiciliados conforme relatado por Hemphil e Gottstein (2000).

Após análise dos resultados e do questionário epidemiológico, foi constatado um fator de risco que contribuiu para a soropositividade dos animais, que foi a alimentação (Tabela 1). Em relação a esta variável, 35/36 animais soropositivos recebiam comida caseira parcial ou totalmente na dieta ($p < 0,0001$). Bresciani et al. (2007), em estudo realizado com cães urbanos no município de Araçatuba-SP, observaram diferença significativa entre os animais que recebiam dieta caseira, quando comparados aos que recebiam dieta comercial, visto que nas formulações de alimentação caseira é frequente a utilização de carne crua ou malcozida.

Tabela 1: Frequência de amostras de cães soropositivos¹ para *Neospora caninum* segundo fatores de risco avaliados, no município de Porto Alegre, RS

Variáveis		Frequência (positivo/n total)	Estatística ²
Idade	Menos de 1 ano	3% (9/260)	p = 0,1385 Odds Ratio: 0,5349
	Mais de 1 ano	11% (27/260)	
Gênero	Fêmea	6% (15/260)	p = 0,2107 Odds Ratio: 1,615
	Macho	8% (21/260)	
Alimentação	Ração comercial	0,34% (1/260)	p < 0,0001** Odds Ratio: 0,05910
	Mista*	13% (35/260)	
Acesso à rua***	Acesso livre	14% (21/145)	p = 0,7385 Odds Ratio: 1,700
	Sem acesso	2% (2/145)	

¹Reação de Imunofluorescência Indireta com anti-imunoglobulina G ao título 50.

²Teste Exato de Fisher, através do pacote estatístico de Graphad Instat.

* (ração comercial +comida caseira) ** Significativo *** Referente grupo A.

No presente estudo, a idade dos animais avaliados não influenciou na soropositividade para *N. caninum*, o que pode estar relacionado com a baixa idade média observada de 2,4 anos (amplitude de 2 meses a 8 anos) nos animais coletados. Moraes et al. (2008) obtiveram um percentual crescente em relação à idade dos cães, sendo observada maior positividade em cães de um a quatro anos. Outros autores utilizando a mesma técnica de diagnóstico também observaram essa característica em estudos no Brasil (Souza et al. 2002; Cañon-Franco et al. 2003; Oliveira et al. 2004). Varandas et al. (2001), em estudo realizado no estado de São Paulo, não observaram relação de positividade com a idade dos animais ao analisarem 295 amostras de soro de cães utilizando a técnica de RIFI, mesmo sendo a infecção pós-natal de grande importância para este

protozoário. Barber e Trees (1998) demonstram que a transmissão vertical da neosporose em cães não é muito significativa, o que aumenta a importância da infecção pós-natal nesta espécie.

A variável gênero não foi associada à ocorrência de soropositividade para *N. caninum*, assim como em trabalhos realizados em Uberlândia (Fernandes et al., 2004) e na Paraíba (Azevedo et al., 2005); ambos utilizando o mesmo método de diagnóstico. Acredita-se que cães de ambos os sexos são expostos aos mesmos fatores de riscos na cidade de Porto Alegre.

Os títulos de anticorpos detectados através da Técnica de RIFI, em todas as amostras positivas, variaram de 1:50 a 1:3200. A titulação máxima encontrada neste estudo ocorreu em 3% das amostras positivas, e as titulações de maior frequência foram as de 1:50 (44%), 1:100 (19%) e 1:800 (14%). Em muitos trabalhos realizados no Brasil com cães de área urbana, não foi possível observar uma correlação positiva entre altos níveis de anticorpos e sinais clínicos nos cães (Varandas et al. 2001; Brinker, J., 2012). Os autores, Souza et al. (2002), Cañon-Franco et al. (2003) e Cunha Filho et al. (2008) obtiveram resultados semelhantes ao obtido neste estudo, com relação à titulação dos soros dos cães, utilizando a mesma técnica sorológica e antígeno.

Conclusões

Após analisar os resultados obtidos neste estudo, podemos relacionar a variável alimentação como fator de risco que influencia positivamente maior ocorrência de anticorpos para *N. caninum* em cães de área urbana no município de Porto Alegre, RS. Não foram detectadas influência das variáveis idade, gênero e acesso a rua. A exposição de cães ao protozoário neste município torna necessária a inclusão deste agente no diagnóstico diferencial de desordens, principalmente as neuromusculares.

Agradecimento

Os autores agradecem ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde – UFRGS pela execução da técnica de Imunofluorescência indireta.

Referências

- AZEVEDO, S.S.; BATISTA, C.S.A.; VASCONCELLOS, S.A.; AGUIAR, D.M.; RAGOZO, A.M.A.; RODRIGUES, A.A.R.; ALVES, C.J.; GENNARI, S.M. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Paraíba, Northeast region of Brazil. *Research in Veterinary Science*. v. 79, p. 51-56, 2005.
- BARBER, J.S.; TREES, A.J. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *International Journal Parasitology*. v. 28, p. 57-64, 1998.
- BENETTI, A.H.; TONIOLLO, G.H.; SANTOS, T.R.; GENNARI, S.M.; COSTA, A.J.; DIAS, R.A. Ocorrência de anticorpos anti-*Neosporacanium* em cães no município de Cuiabá, Mato Grosso. *Ciência Animal Brasileira*. v. 9, n.1, p. 177-180, 2008.
- BRESCIANI, K.D.S.; COSTA, A.J.; NUNES, C.M.; SERRANO, A.C.M.; MOURA, A.B.; STOBBE, N.S.; PERRI, S.H.V.; DIAS, R.A.; GENNARI, S.M. Ocorrência de anticorpos contra *Neosporacanium* e *Toxoplasma gondii* e estudos de fatores de risco em cães de Araçatuba-SP. *ARS Veterinária*. v. 23, p. 40-46, 2007.
- BRINKER, J.C. Prevalência de anticorpos para *Neosporacanium* em cães das áreas urbanas e rural do município de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul. 2012. 74 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
- CAÑON-FRANCO, W.A.; BERGAMASCHI, D.P.; LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.A.; SOUZA, S.L.P.; SILVA, J.C.R.; PINTER, A.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of antibodies anti-*Neosporacanium* in dogs from Amazon, Brazil. *Veterinary Parasitology*. v. 115, p.71-74, 2003.
- CUNHA FILHO, N.C.; LUCAS, A.S.; PAPPEN, F.G.; RAGOZO, A.M.; GENNARI, S.M.; JUNIOR, T.L.; FARIAS, N.A.R. Fatores de risco e prevalência de anticorpos anti-*Neosporacanium* em cães urbanos e rurais do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v. 17, n1. p. 301-306, 2008.
- DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H.W.; EYSKER, M.; HESSELINK, J.W.; WOUDE, W. Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. *Veterinary Parasitology*. v.105, p. 99-104, 2002.

- DUBEY, J.P.; HATTEL, A.L.; LINDSAY, D.S.; TOPPER, M.J. Neonatal *Neosporacanium* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission *Neospora*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*.v. 193, n.10, p.1259-1263, 1988.
- DUBEY, J.P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*. v. 84, p. 349-367, 1999.
- DUBEY, J.P. Review of *Neosporacanium* and neosporosis in animals. *The Korean Journal of Parasitology*. v. 41, n.1, p.1-16, 2003.
- DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.A review of *Neosporacanium* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*.v.67, p. 1-59, 1996
- FERNANDES, B.C.T.M.; GENNARI, S.M.; SOUZA, S.L.P.; CARVALHO, J.M.; OLIVEIRA, W.G.; CURY, M.C. Prevalence of anti-*N.caninum* antibodies in dogs from urban, periurban and rural areas of the city Uberlandia, MinasGerais – Brazil. *Veterinary Parasitology*. v. 123, p. 33-40, 2004.
- FIGUEREDO, L.A.; DANTAS-TORRES, F.; FARIA, E.B.; GONDIM, L.F.P.; SIMÕES-MATTOS, L.; BRNDÃO-FILHO, S.P.; MOTA, R.A. Ocurrence of antibodies to *Neosporacanium* and *Toxoplasma gondii* in dogs from Pernambuco, Northeast Brazil. *Veterinary Parasitology*. v. 157, p. 9-13, 2008.
- FRIDLUND-PLUGGE, N.; MONTIANI-FERREIRA, F.; RICHARTZ, R.R.T.B.; PIZZOL, J.D.; MACHADO, P.C.; PATRICIO, L.F.L.; ROSINELLI, A.; LOCATELLI-DITTRICH, R. Frequency of antibodies against *Neosporacanium* in stray and domiciled dogs from urban, periurban and rural areas from Paraná state, Southern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v. 17, n. 4, p. 222-226, 2008.
- GONDIM, L.F.P.; McALLISTER, M.M.; PITT, W.C.; ZEMLICKA, D.E. Coyotes (*Canislatrans*) are definitive hosts of *Neosporacanium*. *International Journal Parasitology*. v. 34, p. 159-161, 2004.
- HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, A european perspective on *Neosporacanium*. *International Journal for Parasitology*. v. 30, p. 877-924, 2000.
- JESUS, E.E.V.; SANTOS, P.O.M.; BARBOSA, M.V.F.; PNHEIRO, A.M.; GONDIM, L.F.P.; GUIMARÃES, J.E.; ALMEIDA, M.A.O. Frequência de anticorpos anti- *Neosporacanium* em cães nos municípios de Salvador e Lauro de Freitas, Estado da Bahia – Brasil. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Sciences*. v. 43, n. 1, p. 5-10, 2006.
- KING, J.S; SLAPETA, J.; JENKINS, D.J; AL-QASSAB, S.E.; ELLIS, J.T; WINDSOR, P.A. Australian dingoes are definitive hosts of *Neosporacanium*. *International Journal Parasitology*.v. 40, n.8, p.945-950, 2010.
- MAGALHÃES, V.C.S.; SICUPIRA, P.M.L.; GONDIM, L.F.P.; MUNHOZ, A.D. Frequência de anticorpos contra *Neosporacanium* em cães do município de Ilhéus, Bahia. *Ciência Animal Brasileira*. v. 10, n. 1, p. 306-311, 2009.
- McALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; JOLLEY, W.R.; WILLS, R.A.;
- McGUIRE, A.M. Dogs are definitive hosts of *Neosporacanium*. *International Journal of Parasitology*, v. 28, p. 1473-1478, 1998.
- MORAES, C.C.G.; MEGID, J.; PITUCO, E.M.; OKUDA, L.H.; FAVA, C.D.; STEFANO, E.; CROCCI, A.J. Ocorrência de anticorpos anti-*Neosporacanium* em cães da microrregião da serra de Botucatu, estado de São Paulo, BR. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, n. 1, p. 1-6, 2008.
- MOURA, A.B.; SOUZA, A.P.; SARTOR, A.A.; BELLATO, V.; PISETTA, G.M.; TEIXEIRA, E.B.; HEUSSER JUNIOR, A. *Neosporacanium* antibodies and risk factors in dogs from Lages and Balneário Camboriú, SC. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*.v. 63, n. 1, p. 262-265, 2011.
- OLIVEIRA, M.J.; MATOS, M.F.C.; OSHIRO, L.M.; ANDREOTTI, R. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs in the urban área of Campo Grande, MS, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*.v.13, p.155-158, 2004.
- SICUPIRA, P.M.L.; MAGALHÃES, V.C.S.; GALVÃO, G.S.; PEREIRA, M.J.S.; GONDIM, L.F.P.; MUNHOZ, A.D. Factors associated with infection by *Neospora caninum* in dogs in Brazil. *Veterinary Parasitology*. v.185, p. 305-308, 2012.
- SOUZA, S.L.P.; GUIMARÃES Jr, J.S.; FERREIRA, F.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of *Neosporacanium* antibodies in dogs from dairy cattle farms in Paraná, Brazil. *Journal of Parasitology*, v.88, p. 408-409, 2002.
- THRUSFIELD, M. *Epidemiologia Veterinária*. 2. ed. São Paulo: Roca, 2004. 556 p.
- VARANDAS, N.P., RACHED, P.A., COSTA, G.H.N., SOUZA, L.M., CASTAGNOLLI, K.C., COSTA, A.J. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti- *Toxoplasma gondii* em cães da região nordeste do estado de São Paulo: correlação com neuropatias. *Semina: Ciências Agrárias* 22, p.105-111, 2001.