

# Eficácia de uma vacina contra *Neospora caninum* em condições de campo no México

José A. Barajas-Rojas<sup>1</sup>, Gabriela Mapes<sup>2</sup>, Iván Yañez<sup>2</sup>, Elizabeth Morales<sup>1</sup>, Gustavo Lastra<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Autónoma Nacional do México. 04510 Cidade do México.

<sup>2</sup>Intervet México, Laboratórios. Pasaje Interlomas No. 16-4º Piso Huixquilucan Edo de México.

<sup>3</sup>Veterinário Particular. Torreon, Coahuila. México.

## SUMÁRIO

O objetivo do estudo foi o de avaliar a eficácia de uma vacina de *Neospora caninum* (Bovilis® NeoGuard) em condições de campo. O estudo foi realizado em um rebanho de bovinos leiteiros no México. As duas variáveis medidas foram a resposta imunológica e a taxa de abortamento em animais vacinados e em animais de controle, não-vacinados. O teste ELISA (IDEXX) foi utilizado para avaliar a soroprevalência de *N. caninum* no rebanho e a resposta sorológica à vacinação.

Uma diferença estatisticamente significativa foi observada com relação às variáveis avaliadas entre os grupos vacinados e não-vacinados. Uma resposta imunológica mensurável foi observada no grupo vacinado aos 30 dias e 60 dias após a vacinação, enquanto nenhuma diferença significativa tenha sido encontrada no grupo não-vacinado.

A vacina também reduziu em 41% a ocorrência do abortamento entre os animais vacinados. Conclui-se que Bovilis® NeoGuard mostrou uma boa imunogenicidade e que a vacina foi efetiva na redução da taxa de abortamentos causada por *N. caninum* em bovinos leiteiros.

## INTRODUÇÃO

*N. caninum* afeta diversas espécies, inclusive bovinos, e ocasiona grandes perdas econômicas (3, 5, 7, 8). Estima-se que *Neospora caninum* gera perdas econômicas de até US\$ 35 milhões na indústria leiteira a cada ano na Califórnia. Em 1985, diferentes laboratórios da Califórnia, E.U.A., reportaram novas lesões em fetos abortados. Em 1989, Thilsted e Dubey, nos E.U.A., estudaram os fatores básicos por detrás do abortamento em bovinos leiteiros. Já em 1991, Conrad et al., (E.U.A.) isolaram um parasita protozoário, o *N. caninum*, de fetos abortados. Em 1996, Dubey et al. (E.U.A.) desenvolveram um teste ELISA que permitia a avaliação sorológica de anticorpos específicos para *N. caninum*.

Para avaliar a eficácia da vacina inativada de *Neospora caninum* (Bovilis® NeoGuard\*) em condições de campo, foi realizado um estudo em um rebanho de bovinos leiteiros no México. Durante o estudo, a resposta sorológica à vacinação e o grau de redução da taxa de abortamento foram avaliados.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Um rebanho leiteiro com um histórico de abortamentos, com uma população de 4.500 vacas e com uma produção média de leite de 30,2 litros por vaca, foi utilizado no estudo. A avaliação da soroprevalência utilizando um ELISA indireto foi realizada para *N. caninum*, Vírus da Diarreia Bovina, Herpesvírus Bovino tipo 1, Vírus da Parainfluenza tipo 3, *Leptospira hardjo* e *Brucella abortus* (2). Vários fetos abortados foram enviados ao laboratório de patologia da Universidade Autónoma Nacional do México para a avaliação da presença de *Neospora caninum* por histopatologia e imunohistoquímica.

Os critérios de inclusão para o estudo foram: a presença de cães na fazenda durante os últimos três anos, problemas de abortamento, soroprevalência positiva de *Neospora caninum* e diagnóstico confirmado de abortamento por *N. caninum* através de histopatologia e imunohistoquímica fetal. No total, 200 vacas foram selecionadas aleatoriamente no terceiro mês de prenhez e divididas em dois grupos formados por 100 animais cada (vacinados com Bovilis® NeoGuard e o grupo não-vacinado que recebeu uma solução salina). A confirmação da prenhez foi verificada após a primeira vacinação por palpação retal. Amostras de sangue foram coletadas de vacas de cada grupo antes da primeira vacinação. Essa coleta foi seguida por uma segunda amostragem quatro semanas mais tarde (antes da segunda vacinação) e uma terceira amostragem foi feita quatro semanas depois. As amostras de sangue foram centrifugadas e os soros separados e armazenados a -20 °C, até serem avaliados através do teste indireto de ELISA.

A Análise de Variação e o Teste Qui-quadrado Chi foram utilizados para identificar a significância das diferenças ( $P < 0,05$ ) dentro de e entre os grupos, bem como entre os resultados observados e esperados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) na soroprevalência de *Neospora caninum* entre os grupos vacinado e não-vacinado na primeira amostragem (Dia 0 - antes da primeira vacinação), confirmando a distribuição uniforme da soroprevalência na população. Uma resposta imunológica foi observada no grupo vacinado aos 30 dias e 60 dias após a vacinação. Uma diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,5$ ) foi encontrada entre os resultados obtidos na amostragem dos animais vacinados, realizada nos dias 0 e 30 e 30 e 60 dias após a vacinação. Nenhuma diferença significativa ( $P > 0,05$ ) foi vista no grupo não-vacinado. Uma diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) foi encontrada nos níveis específicos de *N. caninum* aos 30 dias e 60 dias após a vacinação entre o grupo vacinado e não-vacinado. Fig. 1. Os resultados obtidos estavam de acordo com as descobertas reportadas anteriormente (4).

Não foi encontrada diferença estatística ( $P > 0,05$ ) entre o grupo vacinado e não-vacinado para os outros cinco agentes infecciosos.

Uma taxa de abortamento de 12% foi observada nas vacas do grupo vacinado com uma idade média de prenhez de 98 dias. No grupo não-vacinado, a taxa de abortamento de 29% apresentou uma diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,5$ ) Fig. 2, com uma idade média de prenhez de 80 dias. A média geral de dias de abortamento para ambos os grupos foi 89 dias [P2]. A diferença na taxa de abortamento entre os grupos vacinado e não-vacinado foi de 41%.

Cinco de 9 fetos (55%) com lesões histopatológicas de microgliose e necrose multifocal, hepatite periportal linfocitária, encefalite necrótica, miosite linfocitária ou necrótica e nefrite intersticial sugere o diagnóstico de *N. caninum* confirmado por imunohistoquímica (1).

A vacina Bovilis® NeoGuard produziu uma resposta sorológica significativa em vacas vacinadas em comparação com o grupo não-vacinado ( $P < 0,5$ ) e reduziu a taxa de abortamento em 41% entre os animais vacinados. Conclui-se que a vacina foi efetiva na redução da taxa de abortamento causada por *N. caninum* em bovinos.

Com um custo estimado de abortamento de US\$ 800 (6), a implementação de um programa de vacinação com Bovilis® NeoGuard resultou em uma economia estimada em US\$ 13.000.

\* Bovilis® NeoGuard. Intervet México.

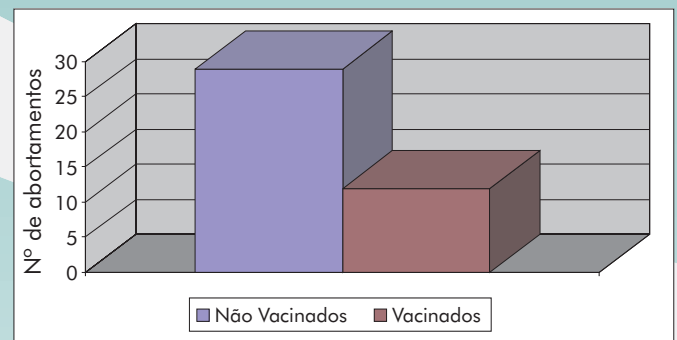


Fig. 1 Abortamentos em vacas vacinadas e não vacinadas. ( $P < 0,05$ )

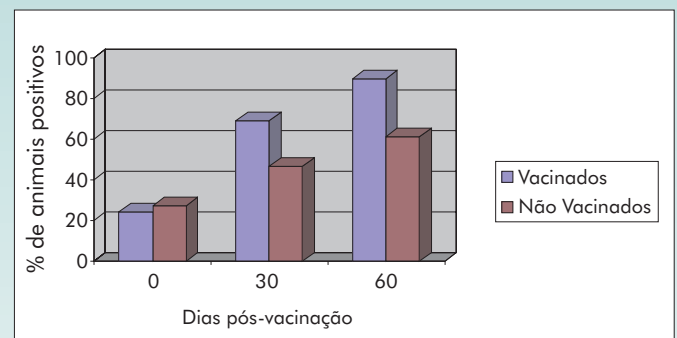


Fig. 2 Avaliação da resposta imunológica contra *N. caninum*. ( $P < 0,05$ )

## Referências

- Anderson ML, Adrianarivo AG, Conrad PA. Neosporosis in Cattle. American Reproduction Science. 60-61:417-431.2000.
- Barajas Rojas JA, Riemann H.P. and Franti C.E. Application of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for epidemiological studies of diseases of livestock in the tropics of México. Rev.Sci. Tech. Off. Int. Epiz., v.12(3), p.717-732
- Barr BC, Anderson ML, Dubey JP and Conrad PA. Neospora-Like protozoal Infections Associated with Bovine Abortions. Vet Pathology. 28: 110-16 (1991)
- Choromanski L and Vaughn M. Performance of the first commercial neospora vaccine in the laboratory and field trials. Congreso Mundial de Buiatria. Punta del Este Uruguay. 2000.
- Hernandez J, Risco C. and Donovan A. Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. JAVMA 219:5:632-635.2001
- Lindsay DS and Dubey JP. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. Am J Vet Res. Vol 50. No. 11.11.1999.
- Martin SW, Meek AH and Willeberg P. Veterinary Epidemiology. Ames Iowa. Iowa State University Press. 1987: 130-132.
- Thurmond MC, Hietala SK. Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first-lactation dairy cows. JAVMA. Vol 210. No.5 672-674, march 1997.

# Eficácia de uma vacina contra abortamentos relacionados a *Neospora caninum* em rebanhos leiteiros da Nova Zelândia

Heuer, C.\* , Nicholson, C.# , Muñoz Bielsa, J. § & Weston, J.\*

\*Epicentre, Wool Building, Private Bag 11222, Palmerston North, New Zealand, Fone: (06) 350 5948, Fax (06) 350 5716, c.heuer@massey.ac.nz; #Intervet New Zealand Ltd.; § Intervet International BV, Holanda

## INTRODUÇÃO

O *Neospora caninum* é um parasita protozoário identificado como uma das principais causas de abortamento de bovinos em todo o mundo. O abortamento é reportado com maior frequência durante o segundo trimestre da gestação (Dubey, 2003), porém estudos experimentais de desafio mostraram a alta patogenicidade de infecções de *N. caninum* durante o primeiro trimestre (Williams et al, 2000).

O objetivo deste estudo foi o de avaliar a eficácia de uma vacina inativada de *N. caninum* (Bovilis® Neoguard, Intervet International BV) na redução da taxa geral de abortamento em bovinos infectados por *N. caninum*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Cinco rebanhos leiteiros (281 a 716 vacas) foram incluídos no estudo (Figura 1). No total, 2.240 vacas com 25-45 dias de prenhez foram alocadas aleatoriamente para receber a vacinação com Bovilis® Neoguard ou uma injeção de uma solução de NaCl a 0,9% (placebo). Os tratamentos foram repetidos após 3-4 semanas, mas não posteriormente aos 3 meses de gestação. Amostras de soro foram examinadas quanto à presença de anticorpos específicos contra *N. caninum* (IFAT) antes da primeira vacinação, após 4 semanas do reforço e 4 a 8 semanas após qualquer abortamento. Todas as informações eram triplo cegas para os fazendeiros, médicos veterinários e para o pessoal do laboratório.

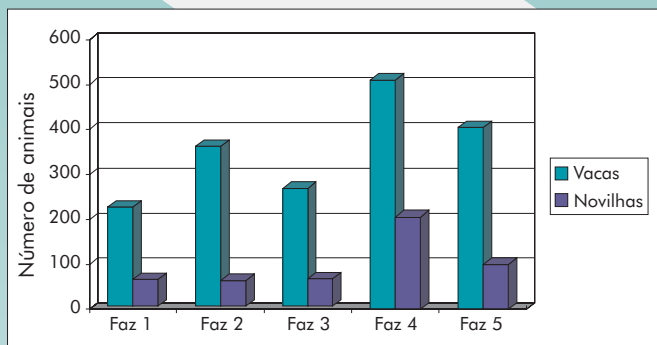


Fig. 1 Distribuição dos animais

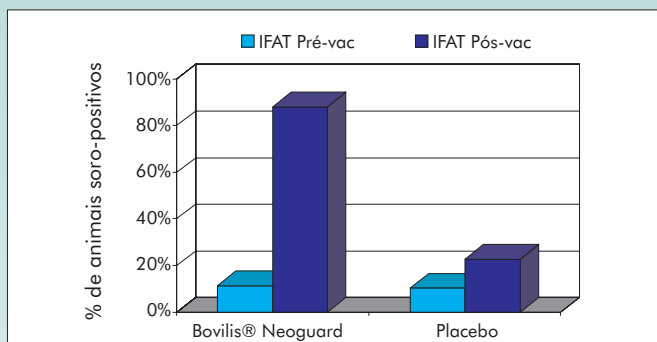


Fig. 2 Resposta sorológica

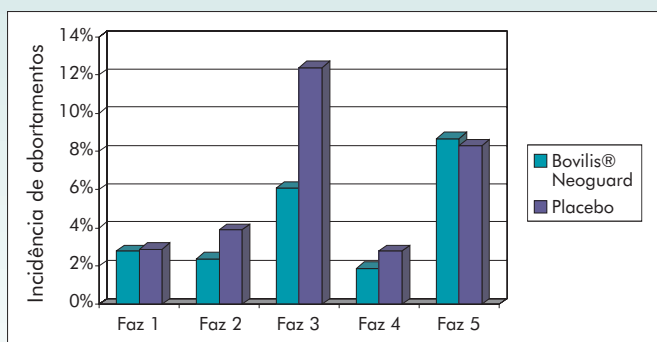


Fig. 3 Incidência de abortamento

## RESULTADOS

A vacinação foi associada a uma reação observável no local da injeção em apenas quatro vacas vacinadas dois dias após a segunda administração. A soroprevalência IFAT (em títulos < 1/100) aumentou de 12 para 88% nos animais vacinados com Bovilis® Neoguard, enquanto o grupo vacinado com placebo apresentou um aumento de 11% para 23%, seja devido a um desafio natural, por causa da recrudescência da infecção de *N. caninum*, ou devido à resposta imunológica modificada durante a gestação (Figura 2).

As taxas de abortamento e os efeitos da vacina foram marcadamente diferentes nas cinco fazendas do estudo: a vacinação foi eficaz em uma das cinco fazendas com uma taxa de abortamento de 12,4% no grupo vacinado com placebo (eficácia de 54%,  $p < 0,05$ ). Isto significa que 54% de todos os abortamentos de vacas não-vacinadas poderiam ter sido prevenidos pela vacinação. A eficácia foi 31% e 39%, mas não significante em duas fazendas onde havia uma baixa taxa de abortamento entre os grupos vacinados com placebo (2,8% e 3,9%, respectivamente), enquanto nenhuma eficácia havia sido observada em duas fazendas (2,9% e 8,5% de abortamentos) (Figura 3). O poder estatístico do estudo foi suficiente para gerar 40% de eficácia significativa quando a taxa de abortamento entre as vacas vacinadas com placebo era 8% ou mais (Figura 3).

Na fazenda que estava apresentando uma alta incidência de abortamento e não estava respondendo à vacinação (Fazenda 5), o percentual de vacas soropositivas antes da vacinação no grupo que apresentou abortamento precoce foi mais alto do que no grupo de vacas que apresentou abortamento tardio (6/27 (22,2%) vs. 10/16 (62,5%);  $p = 0,012$ ). Houve uma tendência maior de abortamentos em novilhas do que em vacas ( $p = 0,098$ ).

Um ano após o estudo, a fazenda 5 (que não apresentou resposta à vacinação) novamente apresentou abortamentos precoces em 24 vacas com aproximadamente 8-12 semanas de gestação. Uma amostra de soro coletada após o abortamento dessas vacas e de 22 vacas prenhes selecionadas aleatoriamente revelou que as vacas que abortaram apresentavam probabilidade bem mais significativa de serem soropositivas para *N. caninum* do que as que não abortaram, sugerindo que os abortamentos estavam associados à infecção por *N. caninum*.

## DISCUSSÃO

A dinâmica da transmissão de *N. caninum* entre vacas e a conseqüente infecção ainda são pouco entendidas. Enquanto a transmissão horizontal (pós-natal) decorrente da presença de cães infectados que eliminam oocistos parece ocorrer em muitos rebanhos leiteiros infectados, com taxas de abortamento consistentemente altas (Dijkstra et al., 2002), a transmissão vertical (transplacentar) aparentemente é muito mais freqüente do que a transmissão pós-natal (Davison et al., 1999). Ambas as vias podem estar presentes e esse presumidamente foi o caso dos rebanhos do estudo. A transmissão vertical foi indicada por um histórico de infecções crônicas em todos os rebanhos. O aumento da prevalência de vacas sorologicamente positivas durante o primeiro trimestre da gestação no grupo vacinado com placebo sugeriu que a transmissão horizontal ou a recrudescência no início da gestação também ocorreu.

Está claro que a neosporose é uma doença fatorial sendo que uma variedade de causas contribuidoras pode levar à infecção oral e à recrudescência. Assim, a resposta variável à vacinação nas diferentes fazendas não é surpreendente. Inferiu-se que a eficácia da vacina dependia de condições específicas nas fazendas, por exemplo taxas gerais de abortamento, nível de desafio natural, presença de outros microorganismos causadores de abortamento e a possibilidade de outros fatores de estresse relacionados à recrudescência à infecção por *N. caninum*.

Entre 111 vacas que abortaram, 38 não estavam prenhes no momento esperado de parturição. Supondo que os abortamentos dessas vacas ocorreram no início da gestação e a descoberta de que a soroprevalência de *N. caninum* antes da vacinação era mais alta neste grupo do que nas outras 73 que abortaram, deu origem à hipótese de que o *N. caninum* pode causar abortamentos já durante o primeiro trimestre da gestação durante o qual a vacina ainda não era totalmente protetora. A exclusão de tais vacas revela que o efeito geral da vacinação é altamente significativo (eficácia de 59%;  $p = 0,007$ ).

## Referências

- Davison HC, Oter A, and Trees AJ. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *International Journal for Parasitology* 1999, Vol. 29(10): 1683-1689.
- Dubey JP. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean Journal of Parasitology* 2003, Vol 41, No. 1: 1-16
- Dijkstra T, Barkema HW, Eysker M., Hesselink JW, Wouda W. Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. *Veterinary Parasitology* 2002, Vol. 105(2): 99-104
- Williams DJL, Guy CS, McGarry JW, Guy F, Tasker L, Smith RE, Crisp PJ, Mac Eachern K, Kelly DF, Tress AJ. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology* 2000, 121, 347-358