

Marcelo Piagentini

DINÂMICA DA INFECÇÃO POR
Neospora caninum EM REBANHOS LEITEIROS DO
MUNICÍPIO DE AVARÉ/SP

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Campus de Botucatu, como requisito para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Área de Clínica Veterinária

Orientador: Prof. Ass. Dr. Izidoro Francisco Sartor

Botucatu - SP

2003

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me ajudado em mais uma conquista.

Ao meu orientador Prof. Izidoro Francisco Sartor, pela oportunidade e confiança em mim depositada.

Ao Prof. Lúcio Benedito Kroll, pelo auxílio nas análises estatísticas.

À pesquisadora Maristela E. Pituco, pela ajuda na realização dos exames sorológicos.

À Professora Marli Gomes O. Néias pela correção gramatical da dissertação.

Ao Prof. Dr. Flávio Oliveira Lima por disponibilizar o seu Laboratório de Anatomia Patológica e Citologia para a sorologia.

Ao grande amigo irmão Aristides Garcia Filho pela ajuda na colheita de material e pelos diálogos sempre valiosos e construtivos.

À amiga Claudia Claro pela sua grande ajuda na elaboração e estrutura da dissertação.

Ao Mauro Sérgio Rodrigues pela ajuda na colheita do material e pelas informações fornecidas.

Ao amigo Jayme Augusto Peres pelas primeiras idéias da dissertação que, com certeza, contribuíram para a sua realização.

À minha querida namorada Luciane, que soube compreender com carinho e atenção os vários momentos que não pudemos estar juntos.

E finalmente, agradeço aos meus pais, Elza e Helly que sempre me deram total apoio para enfrentar com sabedoria e coragem todos os desafios da vida.

SUMÁRIO

	<i>Páginas</i>
RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Conceito e Histórico.....	4
2.2. Taxonomia e Ciclo Biológico.....	5
2.3. Epidemiologia da Neosporose Bovina	6
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1. Local de colheita.....	11
3.2. Amostras.....	11
3.3. Histórico das propriedades.....	12
3.4 Sorologia.....	13
3.5. Análise Estatística.....	14
4. RESULTADOS.....	15
5. DISCUSSÃO.....	19
6. CONCLUSÕES.....	24
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

PIAGENTINI, M. “**Dinâmica da infecção por *Neospora caninum* em rebanhos leiteiros do município de Avaré/SP**”. Botucatu, 2003. 36p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, 2003. Universidade Estadual Paulista – UNESP.

RESUMO

Neospora caninum é considerado um dos mais importantes agentes causadores de abortamentos em muitos países. O estudo objetivou investigar o comportamento desse parasita em propriedades leiteiras do município de Avaré, SP, onde os abortamentos são constantes (pela técnica de ELISA, foram comparadas duas amostragens com um total de 615 animais, cujos testes foram realizados com um intervalo de três anos, 1997 e 2000, nos mesmos rebanhos). Constatou-se que houve um aumento de animais reagentes passando de 21,6% em 1997, para 38,9% em 2000; de um total de 176 animais estudados em ambos os testes, 61,93% mantiveram a condição de não reagente, 15,90% a de reagentes, 19,88% de não reagentes para reagentes e 2,27% de reagentes para não reagentes; de 100 animais com distúrbios na reprodução, em 50% foram constatados anticorpos anti-*Neospora* mostrando a presença marcante desse protozoário nessas entidades patológicas; comparando-se às mães com suas respectivas filhas, observa-se uma predominância de infecção via horizontal, considerando-se este fato mais à percentagem de animais não reagentes no primeiro teste para reagentes no segundo e a presença abundante de cães nos rebanhos, pode-se atribuir aos carnívoros um papel importante na transmissão do *N. caninum*.

Palavras chave: *Neospora caninum*; Soroprevalência; Imunoabsorção enzimática; Bovino; Avaré (SP)

PIAGENTINI, M. "***Neospora caninum* dynamic infection by in dairy cattle in Avaré country, São Paulo State.**" Botucatu, 2003. 36p. A dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements to obtain the Master's Degree in Veterinary Clinical Science. School Veterinary Medicine and Animal Husbandry, São Paulo State University.

ABSTRACT

Neospora caninum is considered one of the most important agents caused of cattle miscarriages in many countries. The study aimed to investigate this parasite behavior in dairy farms belonging to Avaré, country SP where the miscarriages are frequents. By ELISA test it was compared two sero samples, in a total of 615 animals, carried out in space time of three years (1997 and 2000). It was verified that there was an increase of reagent animals passing from 21,6% in 1997 to 38,9% in 2000. In 176 animals analyzed in both tests, 61,93% stayed non-reagents and 15,90% became reagents, 19,88% passed from non-reagent to reagent and 2,27% from reagent to non-reagent. In 100 animals with reproduction disturbances, in 50% was detected antibodies anti - *N. caninum* showing the great presence of this protozoa in these pathological groups. Comparing the mothers with the respective daughters, it was observed an infection predominance by horizontal via. This fact, together with the percentage of non-reagent animals in the first test moving to the reagents condition in the second and, the large number of dogs in these farms should suggest an important role of these carnivorous in the transmission of this disease in the studied region.

Keywords: *Neospora caninum*; Seroprevalence; enzyme-linked immunosorbent; Bovine; Avaré (SP).

1. INTRODUÇÃO

Desde seu reconhecimento em 1990, por Bjerkas et al. (1984) em cães com problemas neurológicos, o *Neospora caninum* tem sido citado como um proeminente parasita formador de cistos nos tecidos, por sua capacidade de induzir doença congênita e abortamento, particularmente em bovinos (Mugridge et al.,1999).

Em 1998 foi possível seu cultivo *in vitro* e o desenvolvimento de um teste sorológico que o distinguia do *Toxoplasma gondii* (Dubey et al.,1988a ; Dubey et al.,1988b).

Embora estruturalmente semelhantes, *N. caninum* e *T. gondii* são de comportamento biológico distintos (Anderson et al.,1991 ; Anderson et al.,1995). A infecção provocada por esse Apicomplexa possui um curso crônico, provavelmente com longa persistência nos tecidos do indivíduo infectado (Björkman & Uglla, 1999). Atualmente, o *N. caninum* é uma das causas mais freqüentemente diagnosticadas de abortamentos epidêmicos e endêmicos em bovinos (Schares et al.,1999), sendo o cão seu hospedeiro definitivo, o qual elimina oocistos no ambiente (McAllister et al.,1998).

Das vias de transmissão dessa enfermidade, a vertical é citada como a mais importante, onde a maioria das infecções congênitas resultam em nascimento de bezerros aparentemente normais

(Björkman et al.,1996; Davison et al.,1999; Paré et al.,1996; Paré et al.,1997; Thurmond & Hietala, 1997; Hietala & Thurmond, 1999), sendo a via horizontal importante em rebanhos cuja soroprevalência é alta (Dijkstra et al.,2001; Dijkstra et al., 2002; Hietala & Thurmond, 1999; Kashiwazaki et al., 2001; McAllister & Lathan, 2002; Thurmond et al., 1997). Forte correlação com cães soropositivos para *N. caninum* e a alta prevalência de bovinos com anticorpos contra o parasita foi relatada por Wouda et al., (1999). Outras fontes de infecção em potencial na via horizontal incluem o colostro e leite de vacas (Uglla, 1998), assim como placenta ou líquido amniótico de animais infectados (McAllister et al., 1998).

A infecção causada por esse protozoário proporciona uma resposta com anticorpos, detectada por diferentes testes. A presença desses anticorpos indica que o animal foi contaminado em alguma fase de sua vida. O diagnóstico pode ser realizado utilizando-se técnicas histológicas, imunohistoquímicas e a reação em cadeia pela polimerase (PCR), entre outras (Dubey & Lindsay, 1996; Hemphill, 1999).

Um rápido conhecimento da biologia e epidemiologia do parasita não seria possível sem o emprego de ensaios sorológicos. Vários testes são utilizados para a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* como os de ELISA, imunofluorescência indireta (RIFI) e, recentemente, o teste de aglutinação direta (Björkman & Uglla, 1999), sendo os dois primeiros os mais utilizados para essa finalidade. A RIFI é freqüentemente utilizada como referência, embora Schares et al. (1998) constatem maior sensibilidade e es-

pecificidade para o ELISA de antígeno total bruto que para a RIFI. Paré et al. (1995) descreveram 89% de sensibilidade e 97% de especificidade para bovinos em um ELISA com lisado total de taquizoítas, sendo que outros laboratórios relatam sensibilidade de 92-98% e especificidade de 87-100% para esse tipo de ELISA.

O objetivo deste trabalho foi a dinâmica da infecção pelo *N. caninum* e seu efeito em eventos relacionados à reprodução, em bovinos leiteiros do município de Avaré-SP.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Conceito e Histórico

Neosporose: Novo problema reprodutivo na pecuária brasileira

Doença diagnosticada na década de 80 causadora principalmente de abortamentos endêmicos e epidêmicos em bovinos, perdas neonatais provocadas pelo parasita *Neospora caninum*.

A observação de um parasita com estrutura semelhante ao *Toxoplasma gondii* foi realizada por Bjerkas et al. (1984), quando estudaram cães portadores de miosite e encefalite. Dubey et al. (1988a) identificaram e classificaram este parasita, denominando-o *Neospora caninum*, protozoário até então confundido com *Toxoplasma gondii*, também pertencente à Família *Sarcocystidae* (Dubey, 1999; Lopes, 1999). Outro passo importante no conhecimento da biologia desse agente foi dado por McAllister et al. (1998), quando descobriram ser o cão o hospedeiro definitivo.

O *N. caninum*, que se acredita ser cosmopolita, é o agente mais freqüentemente identificado em fetos abortados, em vários países. Gondim et al. (1999a), fizeram o primeiro isolamento do protozoário no Brasil, porém esta enfermidade já havia sido descrita em 1989 nos Estados Unidos, onde pela primeira vez foi relacionada à causa de abortamentos em bovinos, cinco anos após ter sido diferenciada da toxoplasmose em cães,

seu hospedeiro definitivo. Tem ampla distribuição nos países de Primeiro Mundo, onde a doença é considerada a principal causa de abortamentos em bovinos, afetando tanto os rebanhos de corte como de leite.

2.2. Taxonomia e Ciclo Biológico

O *N. caninum* pertence ao Filo *Apicomplexa*, Classe *Sporozoa*, Subclasse *Coccidiasina*, Ordem *Eucoccidiorida*, Família *Sarcocistidae*; esta classificação foi feita através de estudos morfológicos realizados com microscopia eletrônica, e resultados da análise da seqüência de DNA, confirmaram sua classificação, demonstrando ser este um protozoário intracelular obrigatório (Cox, 1991; Ellis et al., 1994).

Os oocistos são excretados nas fezes do cão, enquanto os taquizoítos e bradizoítos estão presentes nos tecidos. Há três estágios conhecidos do parasita: esporozoítos, contidos no oocisto, taquizoítos (estágio de multiplicação intracelular rápida) e bradizoítos (estágio de multiplicação intracelular lenta), contidos no cisto tecidual (Dubey & Lappin, 1988).

Oocistos esporulados no meio ambiente são ingeridos pelo hospedeiro intermediário, no caso o bovino; os esporozoítos contidos nos oocistos são liberados no trato intestinal, e atingem células (células neurais, macrófagos, fibroblastos, células do endotélio vascular, miócitos, células do epitélio tubular renal e hepatócitos) através da corrente sanguínea e linfática,

invadem e transformam-se em taquizoítos por endodiogenia, causando lesões teciduais propagando a infecção em vários tecidos do hospedeiro (Dubey et al., 1988a). No interior das células os taquizoítos podem se transformar em bradizoítos (Dubey et al., 1988a ; Dubey et al.,1988b). Os cistos teciduais são encontrados no cérebro, medula espinhal, nervos e retina (Dubey & Lindsay, 1996). Até o momento, desconhece-se a frequência de eliminação e a resistência dos oocistos no ambiente, e se outros canídeos também são hospedeiros definitivos para *N. caninum* (Dubey, 1999).

2.3. Epidemiologia da Neosporose Bovina.

Os cães domésticos e provavelmente outros canídeos como o Lobo-Guará se contaminam ao ingerir líquido fetal (importante fonte infectante), restos placentários e feto de bovino abortado, bem como carne crua contendo o protozoário. Para que o cão se torne o hospedeiro definitivo é necessário que este ingira o protozoário na forma de cisto ou no estágio de taquizoíto; os oocistos do protozoário são eliminados nas fezes, onde estes podem esporular no ambiente, de 24 a 72 horas. O oocisto esporulado contém dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos (Lindsay et al., 1999). Outras espécies de animais como eqüinos, bovinos, caprinos e veados podem atuar como hospedeiros intermediários, pela ingestão de oocistos do protozoário através de água ou alimento contaminado com fezes de

cães (Dubey, 1999). Anderson et al. (2000), sugerem que ambas as fontes de infecções, horizontal ou pós-natal e vertical ou transplacentária são dignas de investigação, pois formas assexuadas do parasita, taquizoítos e cistos foram identificados em fetos. Além disso, existem trabalhos no meio científico como os de Davison et al., (1999); Paré et al., (1996); Thurmond & Hietala, (1997); Paré et al., (1997); Anderson et al., (1997), que sugerem a via de transmissão vertical como a predominante. Entretanto existem outros pesquisadores que indicam a transmissão horizontal como a principal responsável pela neosporose em bovinos: Thurmond et al., (1997); McAllister & Latham, (2002); Hietala & Thurmond, (1999); Dijkstra et al., (2001); Kashiwasaki et al., (2001); Dijkstra et al., (2002). Em bovinos, segundo Yaeger et al., 1994, os fetos podem morrer no útero, sendo absorvidos, mumificados, autolizados, ou nascerem doentes (ataxia, peso abaixo do normal, diminuição dos reflexos patelares e exoftalmia), o que pode se assemelhar à infecção por *Sarcocystis cruzi* (Sá & Lopes, 1988) ou nascerem clinicamente normais porém congenitamente infectados.

A neosporose pode acometer também outras espécies, causando além de abortamentos, infecções neonatais. Dentre essas espécies, podemos citar ovinos, eqüinos e caprinos (Anderson et al., 1991; Dubey & Porterfield, 1990; Lopes, 1999).

A detecção de anticorpos específicos é rotineiramente utilizada como indicativo da infecção (Paré et al., 1995). Títulos iguais ou superiores a 200 na RIFI, são considerados específicos para a infecção. segundo

Reichel & Drake (1996), sendo que Trees et al. (1994) , associam títulos superiores a 1280 à presença de abortamentos.

No Brasil, Gondim & Sartor (1997) no município de Botucatu SP, detectaram em rebanho bovino leiteiro, onde o abortamento era uma constante, títulos que variaram de 800 a 3200. Em levantamento epidemiológico em município vizinho, vários animais se encontravam com títulos de 200 a 1600 no método de RIFI sendo a soroprevalência de 16,3% e de 30,13% pela técnica de ELISA; esse levantamento visava determinar a ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* comparando os dois métodos (Sartor et al.,1999). Trabalhos como os de Andreotti et al., (1999); Belo et al., (1999); Gondim et al., (1999b); Hasegawa et al., (1999); Melo & Leite, (1999); Ogawa et al., (1999); Pituco et al., (1998); Rezende et al., (1999); Stobbe & Cortes, (1999), mostram a importância que a doença deve ocupar em nossos rebanhos, onde as taxas de infecção superam as de muitos países. Devido ao fato de haver um controle de outras doenças abortivas tais como Brucelose, Leptospirose, IBR e BVD, comuns em nossos rebanhos, seja por descartes ou vacinas, fica evidenciado que o *N. caninum* nessas propriedades é um dos principais agentes etiológicos de abortamentos, embora haja relutância desse reconhecimento por facções do meio técnico, assim como entre proprietários e pessoal que realiza o manejo desses rebanhos.

Ainda em relação à soroprevalência da neosporose em bovinos, foram realizados vários estudos epidemiológicos utilizando testes so-

rológicos para pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* por diversos autores. Belo et al., (1999) no estado de São Paulo utilizando a técnica de RIFI em vinte e oito amostras com histórico de abortamento obtiveram uma prevalência de 67,85%. No mesmo ano, Stobbe & Cortes também em São Paulo, utilizando a mesma técnica RIFI em oitenta e quatro amostras de soro de rebanhos com histórico de abortamento, obtiveram uma taxa de 53,60%. Sartor et al., (1999) pela RIFI, em 521 amostras de soros de animais sem histórico de abortamento obtiveram 16,30%. Ainda Andreotti et al., (1999) no Mato Grosso do Sul, utilizando a técnica de ELISA, em 91 amostra sem histórico de abortamento, detectaram uma taxa de 7,70%. Já Melo et al., (2001) examinaram 359 amostras sem histórico de abortamento, também pela ELISA, obteve uma taxa de 18,66%.

A ocorrência de abortamento por *N. caninum* tem alta prevalência também na Califórnia, onde foi descrita por Anderson, et al.,1995, que detectaram a ocorrência de 133 animais portadores de neosporose, dos 266 estudados, tendo um resultado de 42,5% em um rebanho leiteiro, com histórico de abortamento. Na Argentina, além de casos de abortamento estudados por meio da imunofluorescência, observou-se também a ocorrência de alterações teciduais pela técnica de imunohistoquímica, com encefalites não supurativas, hepatite e miocardite (Campero et al., 1998). O mesmo estudo foi aplicado na Pensilvânia, onde os autores observaram lesões teciduais em animais submetidos a exames necroscópicos com a presença de le-

sões sugestivas do parasita, confirmadas pelo exame de imunohistoquímica (Hattel et al.,1998).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de colheita

O trabalho foi realizado no município de Avaré-SP localizado no Sudoeste do estado de São Paulo, compreendendo uma área de 1.219,6 Km², com altitude de 766m, latitude de 23 05` 55” S e longitude de 48 55’ 33” O . O clima da região é quente, com temperaturas máximas de 33,9 °C, media de 17,95°C e mínima de 2°C.

3.2. Amostras

Em outubro de 1997 e outubro de 2000 foram analisadas sorologicamente 615 (245 em 1997 e 370 em 2000) amostras de soro de vacas da raça *Bos taurus*, pertencentes a três propriedades do município de Avaré-SP. Todos os animais estavam prenhes ou estiveram nessa condição fisiológica pelo menos uma vez.

Desse total, 176 ainda permaneciam nos rebanhos no ano de 2000, o que propiciou o acompanhamento sorológico comparativo entre ambos os exames visando o *N. caninum*.

Foi realizado um levantamento, onde 100 animais foram testados em 1997 e/ou em 2000 quanto ao seu estado sorológico anti-*Nesopora*, associando-o a distúrbios da reprodução por eles apresentados.

Em um dos rebanhos, encontravam-se 60 vacas examinadas em 1997 e ou em 2000, sendo suas filhas também analisadas nesses anos. Este rebanho foi utilizado para o acompanhamento do estado sorológico entre mães e filhas.

3.3.Histórico das propriedades

Propriedade I - Foram analisadas 156 amostras de soro em 1997 e 236 em 2000. O rebanho era constituído exclusivamente de animais da raça Holandesa. A reposição era feita com novilhas do próprio plantel e novos animais não foram adquiridos no período. Houve descarte de animais, inclusive muitos examinados em 1997. O sistema de criação era quase que exclusivamente intensivo e os animais recebiam silagem, feno e concentrado, permanecendo em piquetes. Todo sistema de vacinação, principalmente de doenças abortivas como IBR/BVD, Brucelose e Leptospirose, era rigorosamente elaborado de acordo com o preconizado pela literatura.

Além dos cães da propriedade, cães errantes ou de vizinhos conviviam livremente com o rebanho, pois a propriedade situava-se próxima a limites com área urbana.

Propriedade II - Foram analisadas 34 amostras de soro em 1997 e 47 em 2000. Todo sistema de manejo e característica racial equivalia-se ao anteriormente descrito. À semelhança da propriedade anterior, alguns animais examinados em 1997 já haviam sido descartados.

Propriedade III - Foram analisadas 55 amostras de soro em 1997 e 87 em 2000. Essa propriedade foi utilizada por ter adquirido, durante o período, animais das propriedades I e II. Todo o manejo e característica racial era semelhante aos utilizados nos rebanhos anteriores.

3.4.Sorologia

Para a detecção de anticorpos anti- *Neospora*, foi utilizado o teste imunoenzimático (ELISA)* que é confeccionado por taquizoítas rompidos e originalmente descrito por Paré et al (1995).

Os procedimentos laboratoriais foram de acordo com as instruções do fabricante e os resultados expressos como na relação S/P < 0,50 foram classificados como negativos e > 0,50 como positivos.

3.5. Análise estatística

Como se trata de duas grandes amostras ($n_1 = 245$ e $n_2 = 370$), foi aplicado o teste usando a curva normal para duas proporções (Hosmer, 1981), segundo o método:

$$Z_0 = \frac{\hat{p}_1 - \hat{p}_2}{\sqrt{\hat{p} \cdot \hat{q} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \quad , \text{ onde:}$$

Z_0 = valor crítico a ser comparado com o tabelado ($\pm 1,96$);

\hat{P} é a estimativa da proporção das ocorrências;

q é o complemento de p para 1.00;

n é o tamanho das amostras.

4.RESULTADOS

1- Soroprevalência

Os resultados mostram que a soroprevalência para *N. caninum* em propriedades do município de Avaré- SP foi de 21,6% em outubro de 1997, e de 38,9% em outubro de 2000 (Tabela 1).

Tabela 1 - Número e porcentagem relativa de animais examinados e reagentes para *Neospora caninum*, pela técnica de ELISA, em 1997 e 2000, em animais de raças *Bos taurus* da região de Avaré-SP.

Animais	1997	2000	Total
Nº de animais examinados	245	370	615
Nº de animais reagentes	53 (21,6%)	144 (38,9%)	197 (32%)

Na análise estatística destes resultados, o teste de diferenças de duas proporções, verificou-se diferença significativa entre as proporções de ocorrências estudadas ($P=0,22$ e $P=0,39$), ou seja, a proporção de animais reagentes no ano 2000 foi superior à encontrada em 1997.

2- Condição sorológica dos rebanhos no período

Dos 176 animais comparados em dois testes de ELISA, em 1997 e em 2000, 35 animais não reagentes (19,88%) passaram a possuir anticorpos no segundo teste; 4 passaram de reagentes a não reagentes (2,27%); 109 permaneceram no estado não reagente (61,93%) e 28 foram reagentes em ambos os testes (15,90%) (Tabela 2).

Tabela 2 - Condições sorológicas para *Neospora caninum* utilizando-se a técnica de ELISA, constatadas em 1997 e 2000, quantidade e percentagem de animais de raças *Bos taurus* da região de Avaré-SP. Reagentes (R), Não Reagentes (NR).

1997	2000	Nº de animais	Porcentagem(%)
NR	R	35	19,88
R	NR	4	2,27
NR	NR	109	61,93
R	R	28	15,90
Total		176	100,00

3- Relação entre distúrbios reprodutivos e estado sorológico

Na população analisada (176 animais), em 100 animais constataram-se eventos patológicos relacionados à reprodução. Destes, 14 (14%) que eram soronegativos em 1997 foram soropositivos no segundo

teste; 26 (26%) não apresentaram anticorpos anti-*Neospora* em nenhum dos testes; nove foram sororeagentes em ambas as análises; 24 (24%) não eram sororeagentes e 27 (27%) sororeagentes, com a ressalva que os dois últimos grupos foram testados apenas no ano de 2000. (Tabela 3)

Tabela 3 – Relação do número de animais de raças *Bos taurus*, com distúrbios na reprodução e sua condição sorológica, em um ou dois exames de ELISA (1997 e 2000), para *Neospora caninum* . Reagentes (R) e Não Reagente (NR).

Condição sorológica	Nº de animais	Porcentagem(%)
NR em 1997 e R em 2000	14	14
NR em 1997 e NR em 2000	26	26
R em 1997 e R em 2000	9	9
NR em 2000	24	24
R em 2000	27	27
Total	100	100

Aplicando-se o teste da distribuição binomial entre 50% de animais reagentes com distúrbios da reprodução e os 50% não reagentes também com distúrbios, rejeita-se a hipótese H_0 (Hoel, 1981) sendo, portanto, diferentes as duas ocorrências.

4- Estado sorológico entre mães e filhas

Sessenta animais, mães com suas respectivas filhas, foram examinadas no ano de 1997e/ ou em 2000. Destas, nove filhas soropositivas nasceram de mães soropositivas; nove soronegativas de mães soropositivas; 15 soropositivas de mães soronegativas e 27 filhas soronegativas de mães soronegativas. (Tabela 4).

Tabela 4: Tabulação cruzada do estado sorológico, visando o *Neospora caninum*, de mães e suas filhas, de raças *Bos taurus*, resultante de uma ou duas análises pelo ELISA (1997 e/ou 2000) em uma propriedade do município de Avaré, SP.

	Mãe soropositiva	Mãe soronegativa
Filha soropositiva	9	15
Filha soronegativa	9	27
Total	18	42

5. DISCUSSÃO

Para monitorar o comportamento do *N.caninum* em rebanhos do município de Avaré, SP, o estudo utilizou-se do levantamento da soroprevalência contra o protozoário, da comparação do estado imunológico em um mesmo animal em dois períodos, da condição sorológica dos animais e sua associação com distúrbios da reprodução e do confronto da condição sorológica entre mãe e filha.

A sorologia foi a ferramenta utilizada pela praticidade em um levantamento epidemiológico, sendo o método de ELISA o escolhido para essa análise devido a sua sensibilidade e especificidade. Esse tipo de teste é constituído de lisado total de taquizoítas.

No período de 1997 a 2000, foi analisado um total de 615 soros de vacas e novilhas da raça *Bos taurus*, prenhes ou que estiveram neste estado fisiológico em pelo menos uma vez.

Nas três propriedades estudadas houve um acréscimo significativo de animais infectados passando de 21,6% em 1997 para 38,9% em 2000 (tabela 1). Este último resultado, considerado uma soroprevalência alta, foi superior aos encontrados por Andreotti et al., (1999), Cox et al., (1998), Gondim et al., (1999c) e Hasegawa et al., (1999) em gado de corte; Melo et al., (2001), Ogawa et al., (1999), Pituco et al., (1998), Rezende et al.,

(1999), Sartor et al., (1999) e Stobbe & Cortes., (1999) em gado de leite. Ressalta-se que Pituco et al., (1998) e Cox et al., (1998) trabalharam em propriedades com histórico declarado de abortamentos. No entanto nossos resultados foram inferiores aos achados de Corbellini et al., (2001), Belo et al., (1999) e Stobbe & Cortes, (1999) estes todos com histórico de abortamento nos rebanhos.

Do número total de animais estudados em 1997 (primeira amostragem), 176 ainda permaneciam nos mesmos rebanhos, fato que propiciou uma análise comparativa do estado imunológico entre ambos os períodos. Desse total, 35 (19,88%), passaram de não reagentes no primeiro teste para sororeagentes no segundo; 28 (15,9%) sororeagentes no primeiro teste, continuaram nessa condição no segundo; 109 (61,0%) foram não reagentes em ambas as mensurações e apenas 4 (2,27%) fizeram soroconversão para negativo (Tabela 2). Se compararmos essa pequena percentagem aos 15,9% que permaneceram sororeagentes desde o primeiro teste, podemos inferir que este fato pode ter ocorrido devido à flutuação de anticorpos, passível de ocorrer em um animal infectado (Dannat, 1998; Schares et al., 1999).

Confrontando-se o estado imunológico dos animais contra *N. caninum* e distúrbios da reprodução, representados quase que exclusivamente por abortamentos, constata-se que 50 (50%) dos distúrbios podem estar associados ao *N. caninum* sendo que 14 (14%) dos animais passaram de não reagentes para sororeagentes, nove (9%) foram sororeagentes no

primeiro teste, permanecendo nesse estado também no segundo, 27 (27%) examinados somente no ano de 2000, foram reagentes e em 50 (50%) animais não foram detectados anticorpos anti *N. caninum* (Tabela 3). Nesse grupo é pouco provável que os distúrbios reprodutivos estejam relacionados a esse protozoário, uma vez que o agente possui persistência vitalícia (Hietala & Thurmond, 1999) e que a taxa de soroconversão é baixa (Davison et al., 1999).

Transmissão vertical x horizontal

Uma grande controvérsia domina essa questão. Hietala & Thurmond (1999), constataram em vários rebanhos com alta prevalência de *N. caninum* e com presença de cães entre eles, taxa de infecção pós-natal inferior 1% ano. Björkman et al., (1996); Paré et al., (1996); Schares et al., (1998) também citam a via de transmissão vertical como a de maior importância.

Ensaio têm mostrado que 81 a 85% de vacas infectadas por *N. caninum* podem transmitir essa doença para seus descendentes (Davison et al., 1999; Paré et al., 1996; Paré et al., 1997). Em contrapartida, Thurmond et al., (1997b), constataram em uma epidemia de abortamentos que a maioria das vacas que abortaram havia sido infectada no período pós-natal. Dijkstra et al., (2001) também verificaram em rebanhos com alta soroprevalência uma forte presença da infecção pela via horizontal. Achados semelhantes foram obtidos por Kashiwazaki et al., (2001).

Nesse tipo de transmissão, o cão como hospedeiro definitivo, é um alto fator de risco infectando-se com fluídos fetais e placenta de bovinos doentes(Dijkstra et al., 2002).

Neste estudo, das 18 mães que apresentaram anticorpos para *N. caninum*, nove de suas filhas foram soropositivas e nove soronegativas e das 42 mães soronegativas, 15 filhas apresentaram anticorpos anti-*Neospora* e 27 continuaram não reagentes, o mesmo estado imunológico de suas mães (tabela 4). Essas constatações propiciam um forte indício que a infecção pós-natal prevaleceu nos rebanhos estudados. Não se pode garantir também que as nove filhas soropositivas adquiriram a infecção de suas mães, também soropositivas, pois deve-se levar em consideração que o teste foi realizado com os animais já adultos e que poderiam ter se infectado pela via horizontal.

Por se tratar de uma propriedade localizada no perímetro urbano (propriedade I), onde cães eram problemas, por circular livremente em toda sua extensão, inclusive nos depósitos de reservas de alimentos, credita-se a esses carnívoros serem a maior fonte de infecção, pela eliminação de oocistos. Levantamento epidemiológico, em soro de cães rurais da mesma região, concomitante ao estudo, constatou que 58,9% de cães de propriedades desse município eram infectados por *Neospora caninum* (Hasegawa, 1999). Outro fator que leva a essa tendência é demonstrado na Tabela 2 onde, dos 63 animais reagentes no ano de 2000, pelo menos 35 (19,88%) provavelmente adquiriram a infecção pela via hori-

zontal.

O *N. caninum* afeta negativamente os índices reprodutivos (Andreotti, 2001; Lopes, 1999; Yaeger et al., 1994).

No presente estudo verificou-se que alguns animais apresentaram até quatro abortamentos no período. Dos 14 animais que passaram de não reagentes em 1997 para reagentes em 2000, 12 apresentaram distúrbios reprodutivos (morte embrionária, repetição de cio) no período compreendido entre essas datas. Do total 100 de animais que soroconverteram, 50% apresentaram comportamento patológico (Tabela 3).

6. CONCLUSÕES

Houve, nos rebanhos estudados, um aumento significativo de animais infectados com *N. caninum*, quando comparados os exames dos anos de 1997 e de 2000.

Testando-se o mesmo bovino em dois períodos, 1997 e 2000, constatou-se uma quantidade significativamente maior de animais que passaram de não reagentes para reagentes, em relação aos reagentes que passaram a não sororeagir e que desse total de 176 entre vacas e novilhas, 67 (38,05%) estavam ou contaminaram-se no período.

De uma amostragem de 100 bovinos, em 50% dos animais com distúrbios reprodutivos encontraram-se anticorpos anti-*Neospora*.

Houve claras evidências de que a transmissão horizontal predominou nos rebanhos estudados.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ANDERSON, M.L.M. ; ANDRIANARIVO, A.G. ; CONRAD, P.A. Neosporosis in cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.60-61, p.417-431, 2000.

ANDERSON, M.L. et al. Evidence of vertical transmission of *Neospora sp* infection in dairy cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Oxford, v.210, p.1169-1172,1997.

ANDERSON, M.L. et al. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.198, p.241-244,1991.

ANDERSON, M.L. et al. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.207, n. 9, p.1206-1210,1995.

ANDREOTTI, R. **Neosporose**: um possível problema reprodutivo para o rebanho bovino. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. 14p.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2000. 22p.
BIOSIS. **Serial sources for de BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

ANDREOTTI, R. ; PINCKNEY, R. ; GOMES, A. Diagnóstico sorológico de *Neospora caninum* em rebanho bovino de corte de Mato Grosso do Sul. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA , 11., SEMINÁRIO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA DOS PAÍSES DO MERCOSUL, 2., 1999, Salvador. **Anais...** Salvador,1999.p.226.

BELO, M.A.A. et al. Presença de anticorpos contra *Neospora caninum* em bovinos com histórico de abortos não diagnosticados etiológicamente. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11., SEMINÁRIO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA DOS PAÍSES DO MERCOSUL,2., 1999, Salvador. **Anais...** Salvador,1999.p.229.

BJERKAS, I. ; MOHN, S.F. ; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Z. Parasitenkd.**, Berlin, v.70, p.271-274,1984.

BJORKMAN, C. ; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **Int. J. Parasitol.**,Oxford, v.29, p.1497-1507,1999.

BJORKMAN, C. et al. *Neospora* species infection in herd of dairy cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.208, p.1441-1444, 1996.

CAMPERO, C.M. et al. *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in Argentina. **Vet. Rec.**, London, v.143, p.228-229,1998.

CORBELLINI, L.G. et al. Avaliação de um surto de aborto causado por *Neospora caninum* em uma propriedade leiteira no Estado de Santa Catarina. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.25, p.258-259, 2001.

COX, F.E.G. Systematics of parasitic protozoa. In: KRIER, J.P. **Parasitic Protozoa**. 2. ed. New York: Academic Press, v.1, p.55-67,1991.

COX, B.T. ; REICHEL, M.P. ; GRIFFITHS, L.M. Serology of a *Neospora* abortion outbreak on a dairy farm in New Zeland: a cause study. **N. Z. Vet. J.**, Wellington, v.46, p.28-31,1998.

DANNATT, L. *Neospora caninum* antibody levels in an endemically infected dairy herd. **Compend. Cont. Educ. Pract. Vet.**, Princeton Junction, v.51, p.200-201,1998.

DAVISON, H.C. ; OTTER, A. ; TRES, A.J. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. **Int. J. Parasitol.**,Oxford, v.29, p.1683-1689,1999.

DIJKSTRA, Th. et al. Evidence of postnatal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. **Int. J. Parasitol.**, Oxford, v.31, p.209-215, 2001.

DIJKSTRA, Th. et al. Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.105, p.99-104, 2002.

DUBEY, J. P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.84, p.349-367, 1999.

DUBEY, J.P. ; LAPPIN, M. Toxoplasmosis and neosporosis. In: GREENE, G.E. **Infectious diseases of the dogs and cat**. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1988.p.439-509.

DUBEY, J.P. ; LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.67,p.1-59,1996.

DUBEY, J. P. ; PORTERFIELD, M. I. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in na aborted equine fetus. **J. Parasitol.**, Lawrence, v.76, p.732-734, 1990.

DUBEY J.P. et al. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.193, p.1259-1263,1988b.

DUBEY J.P. et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.192, p.1269-1285,1988a.

ELLIS, J. et al. The phylogeny of *Neospora caninum*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v.64, p.303-311,1994.

GONDIM, L.F.P.; SARTOR, I.F. Detecção de anticorpos contra *Neospora caninum* em vacas leiteiras de uma propriedade com histórico de aborto. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, São Paulo, v.6, p.346,1997.

GONDIM, L.F.P. et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.86, p.71-75,1999c.

GONDIM, L.F.P. et al. *Neospora caninum* infection in an aborted bovine foetus in Brazil. **N. Z. Vet. J.**, Wellington, v.47, p.35,1999a.

GONDIM, L.F.P. et al. Associação entre ocorrências de abortos e soropositividade para *Neospora caninum* em bovinos leiteiros em Cachoeira – Bahia. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11., SEMINÁRIO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA DOS PAÍSES DO MERCOSUL, 2., 1999, Salvador. **Anais...** Salvador, 1999b.p.228.

HASEGAWA, M.Y. ; et al. Ocorrência de anticorpos contra *Neospora caninum* em vacas de corte na região de Avaré – São Paulo: Resultados preliminares. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11., SEMINÁRIO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA DOS PAÍSES DO MERCOSUL, 2., 1999, Salvador. **Anais...** Salvador, 1999. p.227.

HATTEL, A.L. et al. Neosporosis-associated bovine abortion in Pensilvânia. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.74, p.307-313,1998.

HEMPHIL, A. The host parasite relationship in neosporosis. **Adv. Parasitol.**, London, v.43, p.48-104,1999.

HIETALA, S.K. ; THURMOND, M.C.. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. **Int. J. Parasitol.**, Oxford, v.29, p.1669-1676,1999.

HOEL, P.G. Estatística Elementar, São Paulo, Ed. Atlas, p.430, 1981.

KASHIWAZAKI, Y. et al. Postnatal neosporosis in dairy cattle northeast Thailand. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.94, p.217-220, 2001.

LINDSAY, D.S. ; DUBEY, J.P. ; DUNCAN, R.B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.82,p.327-333,1999.

LOPES, C. W. G. Neosporose – uma nova doença responsável por abortos em bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte,v. 23, n.4, p. 502-504,1999.

McALLISTER, D. ; LATHAM, S. *Neospora* 2001. **Trends Parasitol.**, Oxford, v.18, p.4-5, 2002.

McALLISTER, M.M. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*.**Int. J. Parasitol.**, Oxford, v. 28, p 1473-1478,1998.

MELO, C.B. ; LEITE, R.C. *Neospora caninum* em Minas Gerais: Dados

preliminares. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11., SEMINÁRIO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA DOS PAÍSES DO MERCOSUL, 2.,1999, Salvador. **Anais...** Salvador,1999. p.225-226.

MELO, C.B.C. et al. *Neospora caninum*: Distribuição de anticorpos em três faixas etárias de rebanhos bovinos de leite em Minas Gerais. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.25, p. 250-251, 2001.

MUGRIDGE, N.B. et al. Phylogenetic analysis based on full-length large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveals that *Neospora caninum* is more closely related to *Hammondia heydoni* than to *Toxoplasma gondii*. **Int. J. Parasitol.**, Oxford, v.29, p.1545-1546,1991.

OGAWA, L. et al. Avaliação sorológica do *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em bovinos de leite da Região do Norte do Paraná. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA,11., SEMINÁRIO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA DOS PAÍSES DO MERCOSUL, 2., 1999, Salvador. **Anais...**Salvador,1999 .p.225.

PARÉ, J. ; HIETALA, S.K. ; THURMOND, M.C. An enzyme-linked immu-

nosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* sp. Infection in cattle. **J. Vet. Diagn. Invest.**, USA ,v.7, p.352-359,1995.

PARÉ, J., THURMOND, M.C., HIETALA, S.K. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle an associated calfhoo mortality. **Can J. Vet. Res.**, Ottawa, v.60, p.133-139,1996.

PARÉ, J. ; THURMOND, M.C. ; HIETALA, S.K. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as predictor of congenital infection and abortation. **J. Parasitol.**, Lawrence, v.83, p.82-87,1997.

PITUCO, E.M. et al. Ocorrência de neosporose bovina em rebanhos com histórico de abortamento no Brasil. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 2, 1998, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto Biológico, 1998.p.70.

REICHEL, M.P. ; DRAKE, J.M. The diagnosis of *Neospora* abortions in cattle. **N. Z. Vet. J.**, Wellington, v.44, p.151-554,1996.

REZENDE, P.C.B. et al. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros da região nordeste do Estado de São Paulo – Brasil. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA,11., SEMINÁRIO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA DOS PAÍSES DO

MERCOSUL,2., 1999, Salvador. **Anais...**Salvador,1999.p.229.

SÁ, W. F. ; LOPES, C. W. G. Sarcocistose bovina: aborto e outras alterações clínicas em vacas mestiças infectadas experimentalmente com *Sarcocystis cruzi*. **Arq. Flumin. Med. Vet.**, Rio de Janeiro, p.75-80,1988.

SARTOR, I.F. et al. Prevalência de anticorpos contra *Neospora caninum* em rebanhos leiteiros do município de Avaré,SP. Resultados preliminares. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA,11., SEMINÁRIO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA DOS PAÍSES DO MERCOSUL,2.,1999,Salvador. **Anais...**Salvador,1999.p.225.

SCHARES, G. ; CONRATHS, F.J. ; REICHEL, M.P., Bovine neosporosis: Comparison of serological methods using outbreak sera from a dairy herd in New Zeland. **Int. J. Parasitol.**,Oxford, v.29, p.1659-1667,1999.

SCHARES, G. et al. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techiques. **Vet Parasitol.**, Amsterdam, v.80, p.87-98,1998.

STOBBE, N.S. ; CÔRTEZ, J.A. Estudo interativo entre a presença de anticorpos anti-*Neospora caninum* e a ocorrência de abortamentos em bovinos no noroeste do Estado de São Paulo – Brasil. In: SEMINÁRIO

BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA,11., SEMINÁRIO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA DOS PAÍSES DO MERCOSUL,2., 1999, Salvador. **Anais...**Salvador,1999.p.226-227.

THUMOND, M.C. ; HIETALA, S.K. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortion in dairy cattle. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v.58, p.1381-1385,1997.

THUMOND, M.C. ; HIETALA, S.K., BLANCHARD, P.C. Herd based diagnosis of *Neospora caninum* induced endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and postnatal transmission. **J. Vet. Diagn. Invest.**,USA, v.9, p.44-49,1997

TRESS, A.J. et al. Prevalência of antibodies to *Neospora caninum* in a population of urban dogs in England. **Vet. Rec.**, London, v.6, p.125-156,1993.

UGGLA A. et al. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. **Int. J. Parasitol.**,Oxford, v.28, p.1467-1472,1998.

WOUDA W. et al. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. **Int. J. Parasitol.**,Oxford, v.29, p.1677-1682,1999.

YAEGER, M.J. ; SHAWD-WESSELS, S. ; LESLIE-STEEN, P. *Neospora* abortion storm in a midwestern dairy. **J. Vet. Diagn. Invest.**,USA, v.6, p. 506-508, 1994.