

## AVALIAÇÃO SOROLÓGICA PARA *Neospora caninum* EM PROPRIEDADES DE BOVINOS LEITEIROS COM ALTERAÇÕES REPRODUTIVAS

Helio Langoni<sup>1</sup>  
Aristeu Vieira da Silva<sup>2</sup>  
Satie Katagiri<sup>3</sup>  
Franki Cagnini<sup>4</sup>  
Claudia Mello Ribeiro<sup>4</sup>

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a frequência de bovinos leiteiros soropositivos para *Neospora caninum* e a associação com alterações reprodutivas. Para isso, foram obtidos soros de 94 fêmeas bovinas de 19 propriedades localizadas na Mesorregião do Sudoeste do Paraná e coletados dados referentes à eficiência reprodutiva. Empregou-se a reação de imunofluorescência indireta para a pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* e utilizaram-se os testes Qui-quadrado e Exato de Fisher para análise dos resultados. Detectou-se que a soroprevalência de *N. caninum* foi de 24%, com 23 animais positivos. Os títulos de anticorpos variaram entre 25 e 400. Dentre os animais positivos, 61% apresentavam problemas reprodutivos. O principal problema reprodutivo apresentado pelas fêmeas bovinas soropositivas foi o retorno ao cio, seguido de abortamento, demonstrando que a neosporose bovina tem implicações sobre os parâmetros reprodutivos em bovinos leiteiros com grande impacto econômico sobre a criação.

**Palavras-chave:** *Neospora caninum*, bovino, abortamento, repetição de cio, investigação diagnóstica.

### SEROLOGICAL EVALUATION FOR *Neospora caninum* IN FARMS WITH DAIRY CATTLE SHOWING REPRODUCTIVE ALTERATIONS

### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the frequency of dairy cattle seropositive to *Neospora caninum* and investigates their association with the reproductive problems. Serum samples were obtained from 94 cows from 19 farms located in the middle region of the Southwest of Paraná and data were collected regarding the reproductive efficiency. Indirect immunofluorescence reaction for the detection of *N. caninum* were applied and used the chi-square and Fisher exact test to analyze the results. Of the total samples, it was obtained a prevalence of 24%, with 23 positive animals. The antibody titers ranged from 25 to 400. Among the positive animals, 61% had reproductive problems. The main reproductive problem presented by the female bovine positive was the return to estrus, followed by abortion, showing that the bovine neosporosis has implications for the reproductive parameters in dairy cattle with great economic impact on the creation.

**Keywords:** *Neospora caninum*, bovine, abortion, return to estrus, diagnostic investigation.

<sup>1</sup> Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública – FMVZ – UNESP/Botucatu - SP

<sup>2</sup> Universidade Estadual de Feira de Santana

<sup>3</sup> Universidade Federal de Sergipe

<sup>4</sup> União do Ensino do Sudoeste do Paraná

## EVALUACIÓN SEROLÓGICA DE *Neospora caninum* EN PROPIEDADES DE BOVINOS LECHEROS CON ALTERACIONES REPRODUCTIVAS

### RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la frecuencia de bovinos lecheros seropositivos a *Neospora caninum* y su asociación con alteraciones reproductivas. Para esto, fueron obtenidos sueros de 94 hembras bovinas de 19 propiedades de la región del suroeste Paranaense y fueron colectados datos referentes a su eficiencia reproductiva. Fue utilizada inmunofluorescencia indirecta para la identificación de anticuerpos anti-*N. caninum* y para el análisis de los resultados, las pruebas de Chi-cuadrado de Fisher. Se detectó una seroprevalencia de 24% para *N. caninum*, con 23 animales positivos. Los títulos de anticuerpos variaron entre 25 y 400. Entre los animales positivos, 61% presentaron problemas reproductivos. El principal problema reproductivo presentado por las hembras bovinas seropositivas fue el retorno al celo, seguido de aborto, lo que demuestra que la neosporosis bovina afecta los parámetros reproductivos en los bovinos lecheros con gran impacto económico sobre la crianza.

**Palabras claves:** *Neospora caninum*, bovino, aborto, repetición de celo, diagnóstico.

### INTRODUÇÃO

A neosporose bovina é uma enfermidade amplamente disseminada pelo mundo e que tem sido associada a casos de abortamento esporádico, endêmico e epidêmico em bovinos, causando perdas econômicas consideráveis (1, 2). Não há estudos estimando as reais perdas da pecuária bovina leiteira sobre os danos agregados à neosporose. O impacto econômico depende, além do valor dos fetos abortados, dos custos indiretos com assistência veterinária e testes diagnósticos, aumento do tempo de lactação e do intervalo entre partos, queda na produção de leite e descarte de animais (3, 4).

A transmissão vertical é a principal forma de disseminação de *N. caninum* em bovinos e o abortamento é o sinal clínico mais evidente. Porém, a patogenia desta enfermidade nos bovinos é complexa e ainda não é totalmente esclarecida uma vez que alguns animais têm abortamento e outros não (1). Nos animais infectados naturalmente, a imunidade adquirida contra a infecção antes da gestação não é suficiente para prevenir a transmissão transplacentária de *N. caninum* para o feto. Vários estudos usando testes sorológicos demonstraram que fêmeas soropositivas abortam mais do que as fêmeas soronegativas (3, 4). De grande importância epidemiológica são as fêmeas infectadas verticalmente, pois estas possuem um risco maior de apresentar abortamento comparado àquelas nascidas de mães soronegativas, mantendo o agente no rebanho por gerações (5).

Dentre os métodos diagnósticos que têm sido empregados para detecção da infecção por *N. caninum*, estão os testes sorológicos que têm contribuído para prover informações sobre a epidemiologia da neosporose bovina. No Brasil, foi relatada uma relação entre a presença de anticorpos contra *N. caninum* e o histórico de abortamento no Estado de Pernambuco (6) e no Noroeste do Estado do Paraná (7). Entretanto, Ogawa et al. (8) não observaram nenhuma associação entre soropositividade e abortamentos em rebanhos leiteiros oriundos também da região Noroeste do Paraná. Diante do exposto, verifica-se a importância de mais estudos epidemiológicos que permitam conhecer melhor a patogenia da neosporose bovina, principalmente suas implicações na performance reprodutiva de bovinos leiteiros. O objetivo deste estudo foi avaliar a soroprevalência de anticorpos para *N. caninum* e verificar a associação desta enfermidade com parâmetros reprodutivos em fêmeas bovinas.

## MATERIAL E MÉTODOS

No período de agosto a novembro de 2010 foram amostradas aleatoriamente dezenove propriedades leiteiras, com sistema semi-intensivo, situadas no Município de Verê, Mesorregião do Sudoeste do Paraná, Brasil para coleta de amostras de sangue e pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum*. Em cada propriedade foram coletadas amostras de sangue de 10% das vacas em produção. Os animais foram amostrados ao acaso, totalizando 94 fêmeas bovinas da raça holandesa, girolanda ou jersey. As amostras foram centrifugadas a 1650g por 10 minutos, congeladas a - 20°C e em seguida foram encaminhadas para o Laboratório do Núcleo de Pesquisa em Zoonoses (NUPEZO) do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu, São Paulo. Empregou-se a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para a pesquisa de anticorpos anti- *N. caninum*, segundo Dittrich (9). A cepa NC-1 de *N. caninum* mantida *in vitro* foi usada como antígeno. O conjugado usado foi um anti-IgG bovino e o ponto de corte utilizado foi a diluição 1:25. Para a titulação, foram realizadas diluições em dobro: 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800. Nos casos de ocorrência de reação na última diluição testada, as amostras foram submetidas a novas diluições, para obtenção do título final. Os resultados foram analisados pelo teste de Qui-quadrado e o teste Exato de Fisher.

As propriedades utilizavam o sistema de monta natural como forma de reprodução e, segundo os proprietários, mantinham programa de vacinação contra leptospirose, rinotraqueíte infecciosa bovina, diarreia viral bovina e brucelose. Em cada propriedade foi aplicado um questionário para obter informações sobre parâmetros reprodutivos dos animais avaliados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Anticorpos contra *N. caninum* foram encontrados em 24% das fêmeas bovinas, pertencentes a treze das dezenove propriedades estudadas (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência absoluta, frequência relativa e intervalo de confiança dos resultados da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros de bovinos.

| RIFI      | Frequência absoluta | Frequência relativa | Intervalo de Confiança 95% |
|-----------|---------------------|---------------------|----------------------------|
| Negativos | 71                  | 75,50               | 65,50 – 83,80              |
| Positivos | 23                  | 24,50               | 16,20 – 34,40              |
| Total     | 94                  | 100,00              | -                          |

Nesse estudo, utilizou-se a RIFI para detectar a presença de anticorpos para *N. caninum* em bovinos, pois estudos epidemiológicos em diversos hospedeiros têm demonstrado que este teste apresenta uma alta sensibilidade para *N. caninum* e uma baixa ocorrência de reação cruzada entre *N. caninum* e *Toxoplasma gondii* (10, 11). Os títulos de anticorpos variaram entre 25 e 400 (Tabela 2).

Tabela 2. Frequência absoluta, frequência relativa e intervalo de confiança dos resultados da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), segundo o título, para detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros de bovinos.

| Títulos de anticorpos | Frequência absoluta | Frequência relativa | Intervalo de confiança 95% |
|-----------------------|---------------------|---------------------|----------------------------|
| Negativos             | 71                  | 75,5                | 65,5 – 83,8                |
| 25                    | 6                   | 6,4                 | 2,4 – 13,4                 |
| 50                    | 10                  | 10,6                | 5,2 – 18,7                 |
| 100                   | 4                   | 4,3                 | 1,2 – 10,5                 |
| 200                   | 2                   | 2,1                 | 0,3 – 7,5                  |
| 400                   | 1                   | 1,1                 | 0,0 – 5,8                  |
| Total                 | 94                  | 100,0               | -                          |

Estes resultados corroboram com os encontrados por Camillo et al. (12) que constataram uma prevalência de 24% de neosporose bovina na Mesorregião do Sudoeste Paranaense, isto é, na mesma região onde se realizou este estudo.

Entretanto, resultados de outros dois estudos realizados, também no Estado do Paraná, divergem dos reportados aqui. Em um desses estudos, Santos et al. (7) constataram uma prevalência bem menor de fêmeas infectadas (14%). Os autores utilizaram a RIFI para detecção de anticorpos contra *N. caninum*, porém estipularam um ponto de corte  $\geq 200$ . No segundo estudo, Marques et al. (13) observaram que 15% das fêmeas bovinas de corte estudadas eram soropositivas para *N. caninum*, mas a detecção dos anticorpos foi feita por outra técnica sorológica, o teste ELISA.

Outro fator importante que deve ser considerado na análise dos estudos de prevalência da neosporose bovina é que existem evidências de que essa enfermidade é mais prevalente nos bovinos leiteiros do que nos bovinos de corte (14). Isso justifica a maior prevalência da neosporose bovina encontrada neste estudo quando comparada com a prevalência obtida por Marques et al. (13). Portanto, para a avaliação de estudos sobre a soroprevalência de *N. caninum* deve-se ter cautela, levando em consideração a raça, o teste sorológico empregado e o ponto de corte usado para se estimar a prevalência da neosporose bovina.

Alterações reprodutivas foram observadas nos animais soropositivos para *N. caninum* (Tabela 3). As principais alterações foram retorno ao cio (Tabela 4) e abortamento (Tabela 5).

Tabela 3. Associação entre os resultados da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros de bovinos, e o relato de problemas reprodutivos.

| Ocorrência de problemas reprodutivos | Negativo |      | Positivo |      | Total |       |
|--------------------------------------|----------|------|----------|------|-------|-------|
|                                      | N        | %    | N        | %    | N     | %     |
| Não                                  | 59       | 95,2 | 3        | 4,8  | 62    | 66,7  |
| Sim                                  | 12       | 38,7 | 19       | 61,3 | 31    | 33,3  |
| Total                                | 71       | 76,3 | 22       | 23,7 | 93    | 100,0 |

N= Número; %=Porcentagem

Alterações reprodutivas têm sido associadas à neosporose bovina em vários estudos. O abortamento é considerado o principal sinal clínico desta enfermidade, mas morte embrionária e mumificação fetal também foram reportadas (15, 16). O abortamento é definido como a interrupção da gestação durante o período fetal, que se inicia após 42 dias de gestação e se encerra no término da gestação dos bovinos. Antecedendo este período, ocorre o período embrionário que se inicia na concepção e termina nos estágios finais da diferenciação sexual, por volta de 42 dias na espécie bovina (5). A morte que ocorre no período embrionário

ocasiona a regressão funcional e estrutural do corpo lúteo. Esse evento fisiológico determina o início de um novo ciclo estral, e o animal manifesta o cio novamente (17).

Tabela 4. Associação entre os resultados da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros de bovinos, e o relato de retorno ao cio.

| Repetição de cio | Negativo |      | Positivo |      | Total |      |
|------------------|----------|------|----------|------|-------|------|
|                  | N        | %    | N        | %    | N     | %    |
| Não              | 64       | 91,4 | 6        | 8,6  | 70    | 75,3 |
| Sim              | 7        | 30,4 | 16       | 69,6 | 23    | 24,7 |
| Total            | 71       | 76,3 | 22       | 23,7 | 93    | 100  |

N= Número; %=Porcentagem

Tabela 5. Associação entre os resultados da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros de bovinos, e o relato de abortamentos.

| Ocorrência de abortamento | Negativos |      | Positivos |      | Total |      |
|---------------------------|-----------|------|-----------|------|-------|------|
|                           | N         | %    | N         | %    | N     | %    |
| Não                       | 66        | 80,5 | 16        | 19,5 | 82    | 88,2 |
| Sim                       | 5         | 45,5 | 6         | 54,5 | 11    | 11,8 |
| Total                     | 71        | 76,3 | 22        | 23,7 | 93    | 100  |

N= Número; %=Porcentagem

De acordo com os resultados obtidos neste estudo estão Andreotti et al. (16) que concluíram que há uma significativa correlação entre não-concepção e a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos. Macaldowie et al. (18) relataram que *N. caninum* pode ser responsável pela morte embrionária na fase inicial da gestação, causando um aumento do índice de retorno ao cio nos animais. Além disso, Kamga-Waladjo et al. (2) verificaram que vacas infectadas por *N. caninum* requerem um número maior de inseminações para conceberem do que as soronegativas, indicando que a morte embrionária pode ocorrer em fêmeas bovinas infectadas por *N. caninum*.

Neste estudo, constatou-se também uma associação entre soropositividade e o histórico de abortamento. Dentre as seis fêmeas soropositivas que apresentaram abortamento, quatro delas apresentaram no primeiro trimestre de gestação e outras duas, no segundo trimestre. López-Gatius, Pabón e Almería (5) relataram que a probabilidade de ocorrer o abortamento em fêmeas soropositivas é 19% maior em relação àquelas soronegativas, contudo, verificaram que o abortamento ocorreu principalmente no segundo trimestre de gestação.

Semelhante ao que ocorre com *Toxoplasma gondii*, a chance de ocorrer a transmissão de *N. caninum* para o feto aumenta com o tempo da gestação, mas *N. caninum* pode também ser responsável pela morte fetal no início da gestação resultando em problemas de fertilidade e retorno ao cio nas fêmeas bovinas (19). No primeiro trimestre da gestação o feto bovino é incapaz de responder imunologicamente contra *N. caninum* e por esta razão ele é vulnerável a infecção pelo parasita e sua sobrevivência pode tornar improvável (20), o que justifica o retorno ao cio e o abortamento observado nas quatro fêmeas bovinas estudadas.

Em torno de 100-150 dias, o feto começa a tornar capaz de reconhecer antígenos e produzir uma resposta imunológica contra *N. caninum*, no entanto, esta resposta pode não ser efetiva contra o parasita e o feto pode morrer durante a infecção, resultando em abortamento neste período, como verificado nas duas fêmeas analisadas. Somente no terceiro trimestre da gestação o feto é capaz de produzir uma resposta efetiva contra o parasita. Desta forma, a

maioria das transmissões neste período resulta no nascimento de bezerros clinicamente saudáveis, mas persistentemente infectados (19).

Outro fator importante que pode ter contribuído para o maior número de abortamentos no primeiro trimestre observado neste estudo é que durante o primeiro trimestre de gestação, a fêmea bovina produz baixos níveis de progesterona. Altos níveis de progesterona são detectados após 150 dias de gestação e estão relacionados à indução de uma resposta imune Th2 com produção de citocinas, como interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5) e interleucina-10 (IL-10) que garantem o desenvolvimento do feto e a manutenção da gestação (19, 20).

Conclui-se que a neosporose bovina pode ter implicações negativas sobre os parâmetros reprodutivos de bovinos leiteiros causando retorno ao cio e abortamento, principalmente no primeiro trimestre da gestação. Porém, é necessário realizar uma triagem sorológica nas propriedades avaliadas para as outras enfermidades como leptospirose, rinotraqueíte infecciosa bovina, diarreia viral bovina e brucelose, pois estas também causam alterações reprodutivas em bovinos, para que se possa inferir corretamente sobre a participação de *N. caninum* em alterações reprodutivas da população estudada.

## REFERÊNCIAS

1. Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. Clin Microbiol Rev. 2007;20:323-67.
2. Kamga-Waladjo AR, Gbati OB, Kone P, Lapo RA, Chatagnon G, Bakou SN, et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies and its consequences for reproductive parameters in dairy cows from Dakar-Senegal, West Africa. Trop Anim Health Prod. 2010;42:953-9.
3. Thurmond MC, Hietala SK. Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. Am J Vet Res. 1996;57:1559-62.
4. Hernández J, Risco C, Donovan A. Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. J Am Vet Med Assoc. 2001;219:632-5.
5. López-Gatius F, Pabón M, Almería S. *Neospora caninum* infection does not affect early pregnancy in dairy cattle. Theriogenology. 2004;62:606-13.
6. Silva MIS, Almeida MAO, Mota RA, Pinheiro Junior JW, Rabelo SSA. Fatores de riscos associados à infecção por *Neospora caninum* em matrizes bovinas leiteiras em Pernambuco. Cienc Anim Bras. 2008;9:455-61.
7. Santos APME, Navarro LT, Bracarense APFRL, Freire RL, Marana ERM, Logawa L, et al. Dairy cow abortion associated with *Neospora caninum* and other infectious agents. Arq Bras Med Vet Zootec. 2005;57:545-7.
8. Ogawa L, Freire RL, Vidotto O, Gondim LFP, Navarro IT. Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dairy cattle from the northern region of the Paraná State, Brazil. Arq Bras Med Vet Zootec. 2005;57:312-6.
9. Dittrich RL. Diagnóstico sorológico, isolamento, cultivo e caracterização molecular de *Neospora caninum* em bovinos leiteiros e equinos no estado do Paraná – Brasil [tese]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2002.

10. De Souza LM, Nascimento AA, Furuta PI, Basso LMS, Silveira DM, Costa AJ. Antibodies for *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in water buffaloes from São Paulo State, Brazil. *Semin Cienc Agrar*. 2001;22:39-48.
11. Haddad JP, Dohoo IR, Vanleewen JA. A review of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle-a Canadian perspective. *Can Vet J*. 2005;46:230-43.
12. Camillo G, Cadore G, Cezar AS, Toscan G, Bräunig P, Sangioni LA, et al. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos de leite do sudoeste do estado do Paraná. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2010;62:1511-3.
13. Marques FA, Headley AS, Figueredo-Pereira V, Taroda A, Barros LD, Cunha IA, et al. *Neospora caninum*: evaluation of vertical transmission in slaughtered beef cows (*Bos indicus*). *Parasitol Res*. 2011;108:1015-9.
14. Sartor IF, Garcia Filho A, Vianna LC, Pituco EM, Dal Pai V, Sartor R. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros e de corte da região de Presidente Prudente, SP. *Arq Inst Biol*. 2005;72:413-8.
15. Ghanem ME, Suzuki T, Akita M, Nishibori M. *Neospora caninum* and complex vertebral malformation as possible causes of bovine fetal mummification. *Can Vet J*. 2009;50:389-92.
16. Andreotti R, Barros JC, Pereira AR, Oshiro LM, Cunha RC, Figueiredo Neto LF. Associação entre soropositividade para *Neospora caninum* e o desempenho reprodutivo de novilhas de corte no Pantanal Sul-Mato-Grossense, Brasil. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2010;19:119-23.
17. Marques VB, Bertan CM, Almeida AB, Meirelles FV, Papa PC, Binelli M. Interferon-tau and pregnancy recognition in cattle. *Rev Bras Reprod Anim*. 2007;31:479-88.
18. Macaldowie C, Maley SW, Wright S, Bartley P, Esteban-Redondo I, Buxton D, et al. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. *J Comp Pathol*. 2004;131:142-56.
19. Innes EA, Wright S, Bartley P, Maley S, Macaldowie C, Esteban-Redondo I, et al. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005;108:29-36.
20. Dubey JP, Buxton D, Wouda W. Pathogenesis of bovine neosporosis. *J Comp Pathol*. 2006;134:267-89.

**Recebido em: 09/09/12**

**Aceito em: 10/12/12**