

AValiação DOS PARâMETROS REPRODUTIVOS E TRANSMISSÃO VERTICAL DE *Neospora caninum* EM CENTRAL DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM GOIÁS

OLIVEIRA, Vanessa Silvestre Ferreira de¹, BOAVENTURA, Cybelly Moreno¹, FERNANDES, Paula Rogério², MELO, Débora Pereira Garcia², GUIMARÃES, Marcelo Sales³, OLIVEIRA, Gabriela Almeida de³, SILVA, Andréa Caetano da⁴.

¹- Aluna do curso de mestrado – Escola de Veterinária- Universidade Federal de Goiás. vansilvestre05@yahoo.com.br . Bolsista CNPq.

²- Aluna do curso de doutorado - Escola de Veterinária- Universidade Federal de Goiás.

³- Aluno de graduação - Escola de Veterinária- Universidade Federal de Goiás.

⁴- Professora - Universidade Federal de Goiás

Palavras-chave: aborto, bovinos, transmissão vertical.

1-INTRODUÇÃO

A neosporose é uma enfermidade parasitária causada pelo protozoário *Neospora caninum*, pertencente ao filo *Apicomplexa*, família *Sarcocystidae*, cujo hospedeiro definitivo é o cão (MCALLISTER et al., 1998). Vários hospedeiros intermediários foram identificados, como ovelhas, cabras, cervos, cavalos, búfalos, raposas, camelos e felídios (DUBBEY 2003) e mais recentemente o coitote também foi considerado hospedeiro definitivo do *N. caninum* (GONDIM et al., 2004). O ciclo biológico do *N. caninum* é caracterizado pela fase assexuada, que se desenvolve tanto no hospedeiro definitivo como no hospedeiro intermediário e a sexuada, que ocorre nos hospedeiros definitivos. Os oocistos não esporulados são liberados nas fezes dos cães e esporulam no ambiente dentro de 24 horas em condições favoráveis; os oocistos esporulados contêm dois esporocistos com quatro esporozoítos cada um (MCALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999).

Entretanto, a transmissão vertical é o principal modo de transmissão em bovinos, responsável pela manutenção e perpetuação da infecção nos rebanhos. (DUBBEY 2003; HALL et al., 2005). A transmissão congênita tem um papel preponderante com percentagens que variam entre 50 e 95% (WOUDA et al., 1997). Em vacas adultas, o aborto é o único sinal clínico observado, podendo ocorrer a partir de três meses de gestação até o final. A maioria dos abortos ocorre entre o quinto e sexto mês de gestação (DUBBEY, 2003). Alguns trabalhos demonstram ainda, um maior número de inseminações por prenhez comparando vacas soropositivas e soronegativas, evidenciando um baixo desempenho reprodutivo em vacas soropositivas para *N. caninum* (HALL et al., 2005; STENLUND et al., 1999).

A neosporose bovina tem sido considerada como uma enfermidade parasitária de distribuição cosmopolita e uma das causas mais frequentes de falhas reprodutivas nos diversos países onde se tem estudado (GONZÁLES et al., 1999; TREES et al., 1999). Desde sua descrição como causa de aborto nos Estados Unidos, a importância da neosporose bovina vem aumentando significativamente. Vários estudos sorológicos realizados demonstram uma elevada prevalência em rebanhos e individual, nas principais zonas produtoras do mundo (DUBBEY & LINDSAY, 1996; DAVISON et al., 1999 a).

No Brasil, *Neospora caninum* foi identificado pela primeira vez em feto abortado proveniente de uma exploração leiteira, por GONDIM et al., (1999). Foram detectadas prevalências de 14,09% entre bovinos leiteiros da Bahia (GONDIM et al., 1999). Também foram realizados estudos que registraram bovinos de leite soropositivos nos estados do Paraná (OGAWA et al., 1999), e São Paulo (HASEGAWA et al., 1999; REZENDE et al., 1999). No Rio Grande do Sul, foi constatado que 23,3% das vacas com histórico de aborto são soropositivas para *Neospora caninum*, enquanto que nas demais, essa prevalência é de 8,3% (CORBELLINI et al., 2002). Em estudo realizado em Goiás foi detectada prevalência variando entre 10,3% e 89,7%, tanto em rebanhos de leite como de corte (GARCIA, 2005). Os resultados sugerem que a neosporose seja uma importante causa de aborto e baixo desempenho reprodutivo em bovinos também no Brasil. Devido ao impacto econômico, torna-se necessário o estudo mais aprofundado da doença no país.

A prevenção a esse modo de transmissão pode ser feita por meio do descarte de novilhas nascidas de vacas soropositivas, porém podendo resultar em perda de animais de alto valor genético e comercial (LANDMANN et al., 2002). Recentemente, o uso da transferência de embriões foi considerado um método seguro e eficiente de prevenir a transmissão vertical de *N. caninum* (BAILLARGEON et al., 2001; LANDMANN et al., 2002; CAMPERO et al., 2003). Dessa maneira, o uso intensivo da transferência de embriões sem exame prévio das receptoras, representa um risco substancial para a introdução do *N. caninum* no rebanho, enquanto que o uso de receptoras negativas, mesmo quando doadoras são positivas, previne a transmissão vertical, evitando assim a infecção em crias de alto valor genético (BAILLARGEON et al., 2001).

Assim, o objetivo deste trabalho é verificar casos de *N. caninum* em doadoras e receptoras de embriões em uma Central de Transferência de Embriões em Nerópolis, Goiás. Será averiguada a ocorrência de transmissão congênita entre as receptoras e suas crias, a relação entre a titulação de anticorpos maternos durante a gestação e a capacidade de transmissão congênita. Serão avaliados parâmetros reprodutivos, como repetição de cio, dose de sêmem/prenhez, quantidade de inovulação/receptora, intervalo entre partos, presença de abortos e/ou reabsorção embrionária e quantidade de embriões produzidos. As receptoras são mestiças (sem raça definida) e as doadoras são todas da raça Nelore.

2-METODOLOGIA

Foi colhido sangue venoso na veia coccígea em tubos vacutainer sem anticoagulante para obtenção de soro, que foi acondicionado em eppendorf e mantido a -20°C até o momento do exame. O sangue foi colhido mensalmente após a confirmação de prenhez das receptoras durante toda a gestação e do bezerro ao nascimento, antes da ingestão do colostro. Nas doadoras o sangue foi colhido antes de cada programa de transferência de embriões. Para a verificação da ocorrência de transmissão vertical de *Neospora* e da relação entre a transmissão vertical e a titulação de anticorpos maternos, a propriedade foi acompanhada por um período de quinze meses (abril de 2005 a julho de 2006).

A técnica de Imunofluorescência indireta (IFI) está sendo utilizada para a verificação da presença de anticorpos e titulação dos mesmos. Esta técnica é específica para o parasito em questão, não havendo reações cruzadas com outros parasitos que causam problemas reprodutivos em bovinos. O resultado é

considerado positivo quando se observa a fluorescência em toda parte do taquizoíto (ALVAREZ-GARCIA, 2003). O antígeno foi preparado através da multiplicação de taquizoítos de *N. caninum* (amostra Nc-1) em cultivos de célula Marc 145, da seguinte maneira:

a) cultivo de células (manutenção): Células Marc 145, foram mantidas em frascos para cultivo celular, com meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO®), suplementado com solução antibiótica e antimicótica (GIBCO®), tampão HEPES (GIBCO®, 20mM) e soro fetal bovino (GIBCO®) a 5%, em estufa bacteriológica, a 37° C. Após a observação de uma monocamada celular íntegra e com capacidade de multiplicação, o cultivo foi lavado com solução salina tamponada (PBS- pH 7,4). O sobrenadante foi eliminado, solução de tripsina-EDTA (GIBCO®) foi adicionada e o frasco foi incubado a 37° C, por 2 minutos para permitir que as células se despreguem. O número de células por mL foi contado em Câmara de Neubauer e foi feito o repasse para outros frascos utilizando-se o mesmo meio.

b) cultivo de *Neospora*: Taquizoítos de *N. caninum* pertencentes à amostra Nc- 1, foram mantidos "in vitro", em cultivos de células Marc 145, com repasses semanais. Os repasses foram realizados quando a maioria (>90%) das células do frasco de cultivo estiver lisada e houver um grande número de parasitos flutuando no meio. As células serão raspadas para despregá-las da superfície do frasco. O sobrenadante resultante do raspado foi transferido a um frasco estéril e colhidos 100µl, que foram adicionados a 900µl de azul de tripam em um eppendorf, para contagem do número de taquizoítos presentes e verificação da viabilidade dos mesmos, em câmara de Neubauer. Os frascos de cultivo celular nos quais foram feitos o repasse de células no dia anterior foram infectados com os taquizoítos resultantes do raspado em uma proporção de 2:1.

3-RESULTADOS PARCIAIS

Até o momento, foi colhido sangue de 103 receptoras (nos meses de maio de 2005 a abril de 2006), 55 doadoras e 96 bezerros. Foi feita sorologia pela técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI) de todas as receptoras, encontrando-se titulações variando de 1:50 até 1:6400, sendo que 45 (42,4%) foram positivas a IFI. Ainda não foram feitos os exames das doadoras e dos bezerros, não sendo possível ainda determinar o índice de transmissão congênita e a relação com a titulação de anticorpos e a avaliação dos parâmetros reprodutivos em geral.

Entretanto, como foi verificado que uma grande quantidade de receptoras (42,4%) está positiva, este fato poderá se constituir em risco para a transmissão vertical de *N. caninum* para os animais, comprometendo assim o processo de transferência de embriões.

5-REFERÊNCIAS

ÁLVAREZ-GARCIA G. **Identificación y caracterización de antígenos de *Neospora caninum* con interés inmunodiagnóstico en bovinos.** 2003. 279p. Tese (Doutorado) – Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2003.

BAILLARGEON, P.; FECTEAU, G.; PARÉ, J.; LAMOTHE, P.; SAUVEÉ, R. Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo

Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, **218**: 1803-1806, 2001.

DAVISON, H.C., OTTER, A., TREES, A.J. Significance of *Neospora caninum* in British dairy cattle determined by estimation of seroprevalence in normally calving cattle and aborting cattle. **Int. J. Parasitol.**, **29**: 1189-1194, 1999a.

DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitol.**, **41**, nº1: 1-16, 2003.

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

CAMPERO, C.M.; MOORE, D.P.; LAGOMARSINO, H.; ODEÓN, A.C.; CASTRO, M.; VISCA, H. Serological status and abortion rate in progeny obtained by natural service or embryo transfer from *Neospora caninum*-seropositive cows. **J. Vet. Med. B.50**: 458-460, 2003.

CORBELLINI, L.G., DRIEMEIER, D., CRUZ, C.F.E., GONDIM, L.F.P., WALD, W. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Vet. Parasitol.**, **103**: 192-202, 2002.

GARCIA, D.P. **Neosporose bovina: prevalência, transmissão e diagnóstico em fetos abortados, nas microrregiões de Anápolis e Goiânia-Goiás**. 2005. 39 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

GONDIN, L.F.; MCALLISTER, M.M.; PITT, W.C.; ZEMLICKA D.E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int. J. Parasitol.**:**34**, 159-161, 2004.

HALL, C.A.; REICHEL, M.P.; ELLIS, J.T. *Neospora* Obortion in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. **Vet. Parasitol.** **128**: 231-241, 2005.

HASEGAWA, M.Y.; SARTOR, I.F.; GONDIM, L.F.; PIAGENTINI, M. Ocorrência de anticorpos contra *Neospora caninum* em vacas de corte na região de Avaré, SP – Resultados preliminares. In: XI SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA., **Anais...** p.227, Salvador-BA, 1999.

GONZÁLEZ, L., BUXTON, D., ATXAERANDIO, R., ADURIZ, S., MALEY, S.W., MARCO, J.C., CUERVO, L.A. Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain. **Vet. Rec.**, **144**: 145-150, 1999.

LANDMANN, J.K.; JILLELLA, D.; O'DONOGHUE, P.J.; MCGOWAN, M.R. Confirmation of the prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle by the use of embryo transfer. **Aus. Vet. J.**, **80**: 502-503, 2002.

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

MCALLISTER, M.M; DUBEY, J.P; LINDSAY, D.S; JOLLEY, W.R; WILLS, R.A; MCGUIRE, A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int. J. Parasitol.**, **v.28**, p.1473-1478, 1998.

OGAWA, L.; NAVARRO, I.T.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R.L.; GONDIM, L.F.P.; MARANA, E.R.M.; SILVA, E.H.; SEDEMAKA, T.M.; DAMAS, A.C.; MATTOS, M.R.; PRUDENCIO, L.B.; TSUITSUI, V.S.; SANTOS, V.S. Avaliação sorológica do *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em bovinos de leite da região do norte do Paraná. In: XI SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, **Anais...** p.225, Salvador, BA 1999.

REZENDE, P.C.B.; BELLO, M.A.A.; SOUZA, L.M.; SILVEIRA, D.M.; COSTA, A.J. Anticorpos anti- *Neospora caninum* em bovinos leiteiros da região nordeste do estado de São Paulo. In: XI SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, **Anais...** p.229, Salvador, BA 1999.

STENLUND, S.; KINDAHI, H.; MAGNUSSON, U.; UGGLA, A.; BJORKMAN. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. **Vet. Parasitol.**, **85**: 227-234, 1999.

TREES, A.J., DAVISON, H.C., INNES, E.A., WASTLING, J.M. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. **Int. J. Parasitol.**, **29**:1195-2000, 1999.

WOUDA, W; DUBEY, J.P; JENKINS, M.C. Serological diagnose of bovine fetal neosporosis. **J. Parasitol.**, **v.83**, p.545-547, 1997.

