

Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em búfalos (*Bubalus bubalis*) criados no estado da Bahia.

Frequency of antibodies anti-Neospora caninum in water buffaloes (Bubalus bubalis) in Bahia State

GONDIM, L.F.P.*; PINHEIRO, A.M.; ALMEIDA, M.A.O.

Departamento de Patologia e Clínicas, Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, Av. Ademar de Barros 500, Ondina, 40170-110, Salvador, Bahia, Brazil.

* Autor para correspondência: pita@ufba.br

RESUMO

Neospora caninum é um parasita protozoário que causa doença em animais domésticos e silvestres. O objetivo do presente trabalho foi investigar a frequência de anticorpos anti-*N. caninum* em búfalos na Bahia, Brasil. Amostras de sangue foram colhidas de 117 animais distribuídos em quatro fazendas. Os soros foram testados, utilizando-se a técnica de imunofluorescência indireta. Anticorpos foram detectados em 35,9% dos animais, empregando-se a diluição de 1:200 como ponto de corte. Os títulos variaram de 1:200 a 1:800. A elevada frequência de anticorpos anti-*N. caninum* detectada em búfalos é sugestiva de que essa espécie animal é altamente exposta ao parasita na Bahia. Outros estudos são necessários para investigar o papel de *N. caninum* como agente abortivo em búfalos.

Palavras chave: anticorpos, búfalos, *Neospora caninum*.

INTRODUÇÃO

A neosporose é uma doença de distribuição mundial que induz abortamentos e alterações neonatais em bovinos, além de acometer um amplo espectro de espécies animais domésticas e silvestres (DUBEY 1999; GONDIM et al. 2004a). O *Neospora caninum*, protozoário coccídeo causador da

SUMMARY

Neospora caninum is a protozoan parasite that causes disease in domestic and wild animals. The purpose of the present work was to investigate the frequency of antibodies anti-*N. caninum* in water buffaloes in Bahia state, Brazil. Blood samples were collected from 117 animals distributed in four farms. The sera were tested using an immunofluorescent antibody technique. Antibodies were detected in 35.9% of the animals using a serum dilution of 1:200 as a cutoff. The titers ranged from 1:200 to 1:800. The high frequency of antibodies anti-*N. caninum* detected in water buffaloes is suggestive that this animal species is highly exposed to the parasite in Bahia. Further studies are necessary to investigate the role of *N. caninum* as an abortive agent in buffaloes.

Key words: antibodies, buffaloes, *Neospora caninum*.

enfermidade, foi observado inicialmente em cães e bezerras (BJERKAS et al. 1984; HILALI et al. 1986; O'TOOLE & JEFFREY 1987; PARISH et al. 1987), sendo classificado, posteriormente, a partir de tecidos de cães (DUBEY et al. 1988). A doença tem sido relatada com maior frequência em bovinos, gerando

forte impacto econômico em decorrência dos abortos e perdas neonatais nessa espécie animal (TREES et al. 1999).

A transmissão de *N. caninum* ocorre por infecção vertical (transplacentária) ou por disseminação horizontal, por meio de oocistos eliminados nas fezes de um hospedeiro definitivo. Até o momento, o cão e o coiote (*Canis latrans*) foram identificados como hospedeiros definitivos do parasita, porém acredita-se que outros canídeos silvestres possam também servir como hospedeiros definitivos (GONDIM et al. 2004b; McALLISTER et al. 1998).

Os primeiros estudos sobre *N. caninum* em búfalos, publicados quase que simultaneamente no Vietnã (HUONG et al. 1998) e Egito (DUBEY et al. 1998), relatam a detecção de anticorpos nessa espécie animal. Na Itália, além da detecção de anticorpos, os autores verificaram cistos semelhantes aos de *N. caninum* em dois de quatro fetos bubalinos abortados, após análise de cortes histológicos corados por hematoxilina e eosina (GUARINO et al. 2000).

No Brasil, a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em búfalos foi relatada no estado de São Paulo (FUJII et al. 2001). Em um outro estudo no mesmo estado, o protozoário foi isolado do cérebro de seis búfalos soropositivos (RODRIGUES et al. 2004). O objetivo do presente trabalho foi investigar a frequência de anticorpos anti-*N. caninum* em búfalos criados no estado da Bahia

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Amostras de sangue foram colhidas de 117 búfalos adultos, entre os anos de

1996 e 1999, provenientes de quatro propriedades situadas em um raio de 500 km da cidade de Salvador, Bahia. Nas quatro propriedades, escolhidas por conveniência, onde se obteve permissão dos criadores para a obtenção das amostras, os proprietários relataram que não havia abortamentos.

Produção de antígeno

Taquizoítos da cepa JPA-1 (YAMANE et al. 1997) foram inoculados em frascos de 25cm² contendo monocamadas de células COS-1 (células renais de macaco) e mantidos em incubadora com 5% de CO₂ a 37°C, segundo método descrito por Yamane et al., (1997). Quando mais de 80% da monocamada de células estava infectada, as células foram retiradas do frasco através de raspagem e a suspensão de taquizoítos purificada em colunas de Sephadex G10 (Pharmacia). Os taquizoítos foram lavados e diluídos em PBS, ajustados para uma concentração final de 500-1000 taquizoítos/μl de PBS. Lâminas de vidro forradas com teflon, contendo 12 poços de 4mm cada, foram sensibilizadas com taquizoítos, secadas em estufa a 37°C e mantidas a -20°C para posterior utilização no teste de imunofluorescência indireta (IFI).

Teste de imunofluorescência indireta (IFI)

As amostras de soro foram diluídas em uma concentração de 1:200 em PBS e testadas para anticorpos anti-*N. caninum* em lâminas sensibilizadas com taquizoítos da cepa JPA-1, como descrito previamente (GONDIM et al. 1999b). O Anti-IgG bovino conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (anti-bovine FITC IgG conjugate, SIGMA) foi

utilizado como anticorpo secundário. As amostras positivas foram testadas em diluições dobradas a partir de 1:200 para a determinação dos títulos de anticorpos. Controles positivos e negativos de origem bovina foram empregados em cada lâmina.

RESULTADOS

Anticorpos IgG anti-*N. caninum* foram detectados em 35,9% (42/117) das amostras de soro de búfalos testadas pela IFI. O número e percentual de animais positivos em cada propriedade está disposto na Tabela 1. Foram observados títulos de anticorpos entre 1:200 e 1:800 nos animais, com a seguinte distribuição: 1:200 (20 animais), 1:400 (17 animais) e 1:800 (cinco animais).

Tabela 1. Frequência de anticorpos IgG anti-*Neospora caninum* em amostras séricas de búfalos em quatro rebanhos dos municípios de no estado da Bahia, Brasil.

Rebanhos	Número de animais	Teste de imunofluorescência indireta	
		Positivos	(%)
1	40	21	52,50
2	32	05	15,62
3	32	13	40,62
4	13	03	23,08
Total	117	42	35,90

DISCUSSÃO

A frequência de anticorpos anti-*N. caninum* (35,9%) observada nos rebanhos bubalinos foi alta, sendo superior à frequência de anticorpos (14,09%) observada por Gondim et al., (1999b) em 447 vacas leiteiras de 14 rebanhos no mesmo estado. Resultados superiores foram verificados em São Paulo, onde, em 64% de 222 búfalos, foram detectados anticorpos anti-*N. caninum* (FUJII et al. 2001), contudo, esses autores utilizaram como ponto de corte uma diluição de 1:25 e, nesse mesmo estudo, considerando-se como positivos animais com títulos \geq 1:200, a frequência de anticorpos cai para 7,2%. Diferentes frequências de soropositividade para *N. caninum* em búfalos foram observadas em estudos realizados no Egito (68%) e Vietnam

(1,5%) (DUBEY et al. 1998; HUONG et al. 1998). Tais diferenças parecem resultar das técnicas empregadas na detecção de anticorpos, assim como de variações de *habitat* onde os animais eram mantidos.

Parte das amostras séricas de búfalos do presente trabalho (n=104) havia sido utilizada em um estudo anterior para detecção de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii*, em que foram encontradas 3,85% de reações positivas (GONDIM et al. 1999a), sugerindo-se que uma possível reatividade cruzada entre *N. caninum* e *T. gondii* não interferiu nos resultados para *N. caninum* do presente inquérito sorológico.

Em bovinos, os animais soropositivos para *N. caninum* têm maiores chances de abortar do que animais soronegativos

(WOUDA et al. 1998). Porém, as elevadas taxas de anticorpos anti-*N. caninum* encontradas em búfalos nas quatro propriedades estudadas parecem não estar relacionadas com a ocorrência de abortamentos, uma vez que não foram relatados casos de abortamentos entre os animais estudados.

Em um estudo realizado no Brasil, *N. caninum* foi isolado pela primeira vez de tecidos de búfalos (RODRIGUES et al. 2004). Os autores identificaram seis cepas oriundas de seis animais soropositivos, o que indica que búfalos são importantes hospedeiros intermediários de *N. caninum*, portanto com potencial para infectar carnívoros que venham a consumir tecidos infectados.

Até o momento, não existe a confirmação de que *N. caninum* induz abortamento em búfalos. Em um relato na Itália, foi observado um cisto semelhante a *N. caninum* em um feto bubalino abortado, entretanto, a identidade do cisto não foi confirmada por meio de exame imunoistoquímico ou testes moleculares (GUARINO et al. 2000). É necessário investigar a associação de *N. caninum* à indução de abortamentos em bubalinos.

Foi elevada a frequência de anticorpos anti-*N. caninum* verificada neste estudo, demonstrando-se a necessidade de mais investigação sobre o coccídio e seu possível envolvimento em casos de abortos em bubalinos na Bahia.

REFERÊNCIAS

BJERKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift Parasitenkund**, v.70, p.271-4, 1984.

DUBEY, J. P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.84, p.349-67, 1999.

DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.192, p.1269-85, 1988.

DUBEY, J. P.; ROMAND, S.; HILALI, M.; KWOK, O. C.; THULLIEZ, P. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Egypt. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.527-9, 1998.

FUJII, T. U.; KASAI, N.; NISHI, S. M.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Seroprevalence of *Neospora caninum* in female water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the southeastern region of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.99, p.331-4, 2001.

GONDIM, L. F. P.; BARBOSA, H. V., JR.; RIBEIRO FILHO, C. H.; SAEKI, H. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in goats, sheep, cattle and water buffaloes in Bahia State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.82, p.273-6, 1999a.

GONDIM, L. F. P.; MCALILSTER, M. M.; MATEUS-PINILLA, N. E.; PITT, W. C.; MECH, L. D.; NELSON, M. E. Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. **Journal of Parasitology**, v. 90, p.1361-1365, 2004.

GONDIM, L. F. P.; MCALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMLICKA, D. E. Coyotes

(*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.34, p.159-61, 2004.
GONDIM, L. F. P.; SARTOR, I. F.; HASEGAWA, M.; YAMANE, I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.86, p.71-5., 1999b.

GUARINO, A.; FUSCO, G.; SAVINI, G.; DI FRANCESCO, G.; CRINGOLI, G. Neosporosis in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Southern Italy. **Veterinary Parasitology**, v.91, p.15-21, 2000.

HILALI, M.; LINDBERG, R.; WALLER, T.; WALLIN, B. Enigmatic cyst-forming sporozoan in the spinal cord of a dog. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.27, p.623-5, 1986.

HUONG, L. T.; LJUNGSTROM, B. L.; UGGLA, A.; BJORKMAN, C. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes in southern Vietnam. **Veterinary Parasitology**, v.75, p.53-7, 1998.

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*. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.1473-8, 1998.

O'TOOLE, D. & JEFFREY, M.: Congenital sporozoan encephalomyelitis in a calf. **The Veterinary Record**, v.121, p.563-6, 1987.
PARISH, S. M.; MAAG-MILLER, L.; BESSER, T. E.; WEIDNER, J. P.; MCELWAIN, T.; KNOWLES, D. P.; LEATHERS, C. W. Myelitis associated with protozoal infection in newborn calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.191, p.1599-600, 1987.

RODRIGUES, A. A.; GENNARI, S. M.; AGUIAR, D. M.; SREEKUMAR, C.; HILL, D. E.; MISKA, K. B.; VIANNA, M. C.; DUBEY, J. P. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.124, p.139-50, 2004.

TREES, A. J.; DAVISON, H. C.; INNES, E. A.; WASTLING, J. M. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1195-200, 1999.

WOUDA, W.; MOEN, A. R.; SCHUKKEN, Y. H. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. **Theriogenology**, v.49, p.1311-6, 1998.

YAMANE, I.; KOKUHO, T.; SHIMURA, K.; ETO, M.; SHIBAHARA, T.; HARITANI, M.; OUCHI, Y.; SVERLOW, K.; CONRAD, P. A. In vitro isolation and characterisation of a bovine *Neospora* species in Japan. **Research in Veterinary Science**, v.63, p.77-80, 1997.