

## COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

## OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-NEOSPORA CANINUM EM FÊMEAS BUBALINAS DA REGIÃO OESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO

C.B. Negrão<sup>1</sup>, D.M. Aguiar<sup>2</sup>, R.C. Orlandelli<sup>3</sup>, I.F. Sartor<sup>1</sup><sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Clínica Médica Veterinária, Distrito Rubião Junior, s/nº, CEP 18618-000, Botucatu, SP, Brasil. E-mail: sartor@fio.edu.br

## RESUMO

Foram testadas 404 amostras de soro de fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) para se verificar a ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em rebanhos oriundos de cinco municípios da região oeste do Estado de São Paulo. Empregou-se a técnica da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), na diluição inicial de 1:100. Foram observados anticorpos anti-*Neospora caninum* em 38,1% (154/404) dos soros testados, com títulos de anticorpos variando de 100 a 12.800. A frequência de animais sororeagentes observada entre os municípios variaram de 16,2 a 61,4% ( $P < 0,05$ ). A faixa etária dos animais soropositivos apresentou diferença significativa no Município de Lucélia, onde as vacas com idade superior a 5 anos apresentaram maior frequência de infecção ( $P < 0,05$ ). Esses resultados alertam para a presença da infecção em bubalinos da região Oeste do Estado de São Paulo.

PALAVRAS-CHAVE: *Neospora caninum*, ocorrência, búfalos, imunofluorescência.

## ABSTRACT

OCCURRENCE OF ANTI-NEOSPORA CANINUM ANTIBODIES IN FEMALE WATER BUFFALOES (*BUBALUS BUBALIS*) IN THE WEST REGION OF SÃO PAULO STATE, BRAZIL. Serum samples from 404 females water buffaloes (*Bubalus bubalis*) were tested to verify the occurrence of anti-*Neospora caninum* antibodies in 5 counties in the west region of São Paulo State, Brazil. The technique used was indirect fluorescence antibody test (IFAT), with initial dilutions of 1:100. Anti-*Neospora caninum* antibodies were observed in 38.1% (154/404) of the samples, and antibody titers ranged from 100 to 12,800. The frequency observed among the counties ranged from 16.2% to 61.4% ( $P < 0.05$ ). Animals from Lucelia County older than 5 years of age presented higher antibody frequencies ( $P < 0.05$ ). These results are a warning signal for *N. caninum* infection in water buffaloes in the west region of São Paulo State.

KEY WORDS: Occurrence, water buffaloes, immune fluorescence.

O protozoário *Neospora caninum* foi primeiramente identificado em cães com encefalite e miosite e atualmente é considerado uma importante causa de abortamentos em bovinos em todo mundo. É descrito também em outras espécies animais, como equinos, caprinos, ovinos e bubalinos (DUBEY *et al.*, 2007). A infecção por *N. caninum* apresenta distribuição mundial e está amplamente descrita na literatura. A enfermidade tem sido relatada com maior frequência em bovinos, gerando forte impacto econômico em decorrência dos abortamentos e perdas neonatais (TREES *et al.*, 1999). As perdas não se limitam apenas aos abortamentos; o descarte prematuro de matrizes e a

diminuição da produção de leite também devem ser incluídos no cálculo do custo da doença (THURMOND; HIETALA, 1996).

Ocasionalmente os bubalinos são criados juntamente com os bovinos sendo que, atualmente, investiga-se a importância dessa espécie na epidemiologia da enfermidade (GENNARI, 2004). Nesse sentido, já foi demonstrado que bubalinos podem ser infectados com isolados de *N. caninum* de bovinos (RODRIGUES *et al.*, 2005). Ao contrário do ocorrido em bovinos, existem poucos estudos sorológicos sobre *N. caninum* em bubalinos, embora tenha sido sugerido que essa infecção também possa provocar prejuízos nessa espécie.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Departamento de Clínica Médica Veterinária, Cuiabá, MT, Brasil.<sup>3</sup>Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Biologia Celular e Genética, Maringá, PR, Brasil.

Os primeiros estudos em búfalos foram publicados quase que simultaneamente no Vietnã (HOUNG *et al.*, 1998) e Egito (DUBEY *et al.*, 1998). No Brasil, FUJII *et al.* (2001) verificaram a ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* em 64% das búfalas estudadas no Vale do Ribeira, no Estado de São Paulo. Recentemente, GENNARI *et al.* (2005) detectaram 71% de soropositividade no Estado do Pará; no Rio Grande do Sul em 15% por VOGEL *et al.* (2006) e na Bahia por GONDIM *et al.* (2007) em 35,9% das amostras estudadas.

A região Oeste do Estado de São Paulo tem se destacado na produção bovina do sudeste do Brasil, em ambos os setores de corte e leite. Essa região paulista produz aproximadamente 1/5 da renda total estadual de carne e leite. Em 2005, o Estado de São Paulo capitalizou algo aproximado em 4 bilhões de reais na produção de carne e 1 bilhão de reais na indústria leiteira. Desse total, a região Oeste do Estado foi responsável pela produção de aproximadamente 1,6 bilhões de reais, envolvendo a produção de carne e leite da referida região (INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA, 2006). Considerando a crescente atividade na criação de bubalinos na região e na importância local da atividade agropecuária, o presente trabalho objetivou verificar a ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* em fêmeas bubalinas da região Oeste do Estado de São Paulo.

O estudo foi efetuado em fêmeas bubalinas de propriedades presentes nos Municípios de Adamantina (21° 41' 06" S, 51° 04' 22" O), Emilianópolis (21° 49' 58" S; 51° 28' 58" O), Lucélia (21° 43' 12" S; 51° 01' 08" O), Presidente Bernardes (22° 00' 21" S 51° 33' 10" O) e Teodoro Sampaio (22° 31' 58" S; 52° 10' 04" O), todos situados na região Oeste do Estado de São Paulo.

As amostras foram obtidas por conveniência de 404 fêmeas bubalinas pertencentes a cinco propriedades (uma para cada município estudado) com idade entre 2 a 15 anos, utilizadas na sua maioria para a produção leiteira. Nessas propriedades, observou-se a criação em conjunto com a espécie bovina. As amostras de sangue foram obtidas por venopunção de 10 mL da jugular, em tubos a vácuo com agulhas apropriadas. O sangue total foi centrifugado a velocidade de 1.500 g por minuto durante 10 minutos, onde se procedeu a dessora e retração do coágulo. Os soros foram estocados a 20°C negativos até o momento da realização dos exames.

Os soros foram analisados pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) conforme GENNARI *et al.* (2005), em diluição inicial de 1:100 em tampão fosfato pH 7,2 (0,0084M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,0018M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 0,147M NaCl) acrescentado de soro albumina bovina 1%, utilizando-se conjugado IgG de coelho anti-IgG bovino (SIGMA F-7887) marcado com isotiocianato de

fluoresceína. As amostras consideradas positivas na diluição inicial foram sucessivamente diluídas, na razão dois, para obtenção do título final. Em cada série de lâminas foram incluídos soros controles positivo e negativo previamente conhecidos. O teste do Qui-quadrado ( $P > 0,05$ ) foi efetuado para verificar as possíveis associações entre a frequência de anticorpos em cada município e entre as faixas etárias dos animais.

Todas as propriedades avaliadas apresentaram animais sororeagentes. Quanto a frequência de animais positivos, das 404 amostras de soro sanguíneo testados, 154 foram reagentes à diluição de 1:100, resultando numa frequência de 38,1%. As maiores taxas foram observadas nos Municípios de Presidente Bernardes (61,4%) e Lucélia (52,1%; Tabela 1). Os títulos de anticorpos detectados nos sororeagentes variaram de 100 a 12.800. Não foi detectada diferença estatística entre os sororeagentes por faixa etária (Tabela 2), entretanto, quando se avaliou a diferença entre as faixas etárias por propriedade, observou-se que na propriedade do Município de Lucélia, as vacas com idade superior a 5 anos apresentaram maior frequência de infecção ( $P < 0,05$ ).

Tabela 1 - Número e frequência de amostras de soro bubalino, testadas e positivas para *Neospora caninum* na região Oeste do Estado de São Paulo, segundo os municípios estudados.

Municípios	Amostras testadas	Amostras positivas	%*
Adamantina	111	18	16,2 <sup>a</sup>
Emilianópolis	50	18	36,0 <sup>b,e</sup>
Lucélia	140	73	52,1 <sup>b,c</sup>
Presidente Bernardes	44	27	61,4 <sup>c</sup>
Teodoro Sampaio	59	18	30,5 <sup>e</sup>
Total	404	154	38,1

\*Letras iguais nas colunas indicam  $P > 0,05$ .

O presente estudo avaliou a frequência de anticorpos anti-*N. caninum* em fêmeas bubalinas da região Oeste do Estado de São Paulo. A técnica utilizada para o sorodiagnóstico (RIFI) tem sido frequentemente utilizada para a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* nos animais, sendo que a diluição inicial empregada como ponte corte (1:100) é baseada em estudo efetuado por RODRIGUES *et al.* (2004), onde de seis bubalinos soropositivos testados nessa diluição, cinco obtiveram o isolamento *in vitro* de *N. caninum*.

\*NAT = Neospora agglutination test

Tabela 2 - Número e frequência de fêmeas bubalinas soropositivas para *Neospora caninum* de acordo com a faixa etária e município estudado.

Município	Número de animais por faixa etária (%)*		
	≤ 2 anos pos/n	2 a 5 anos pos/n	> 5 anos pos/n
Adamantina	3/12 (25,0%)	6/38 (15,7%)	9/61 (14,7%)
Emilianópolis	2/6 (33,3%)	7/18 (38,8%)	9/26 (34,6%)
Lucélia	10/25 (40,0%)	23/52 (44,2%)	40/63 (63,5%)*
Presidente Bernardes	7/12 (58,3%)	13/23 (56,5%)	7/9 (77,7)
Teodoro Sampaio	1/5 (20,0%)	6/24 (25,0%)	11/30 (36,6%)
Total	23/60 (38,3)	55/155 (35,4)	76/189 (40,2)

\*Frequência apresentando diferença significativa;  $P > 0,05$ .

Pos = número de vacas soropositivas.

$n$  = número de vacas amostradas.

No Brasil, estudos enfocando a frequência de anticorpos anti-*N. caninum* em búfalos foram realizados nas regiões Norte (GENNARI *et al.*, 2005), Sudeste (FUJII *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2001) e Sul (VOGEL *et al.*, 2006), utilizando diferentes pontos de corte e métodos diagnósticos. A frequência observada no presente estudo (38%) está dentro dos valores detectados nessas regiões, que variaram de 14,6 a 70,9%. SOUZA *et al.* (2001), na região Central do Estado de São Paulo, e FUJII *et al.* (2001), no Vale do Ribeira (Estado de São Paulo), observaram frequências de anticorpos em aproximadamente 50% dos animais estudados, utilizando a RIFI (1:200) e NAT\* (1:40), respectivamente. Além das diferenças existentes entre o delineamento amostral, testes e diluições empregadas de cada inquérito publicado, devem-se considerar também as peculiaridades regionais entre as diferentes regiões, já que a região oeste possui renomada tradição na pecuária de corte, enquanto que as outras regiões citadas do Estado de São Paulo exploram com mais frequência a pecuária leiteira e bubalinos (Vale do Ribeira).

Comparando-se as frequências de soropositivos entre as faixas etárias avaliadas em cada propriedade, verificou-se que apenas no Município de Lucélia houve associação ( $P > 0,05$ ) entre a idade dos animais, observando maior ocorrência de soropositivos em vacas com idade superior a cinco anos. De acordo com FUJII *et al.* (2001), animais mais velhos teriam maior chance de estarem infectados, em virtude da exposição acumulativa à infecção durante a vida do animal.

Os resultados do presente estudo apontam para a presença da infecção em bubalinos da região Oeste do Estado de São Paulo. Alertar-se para a realização de futuras pesquisas a fim de melhor explorar possíveis prejuízos que a infecção por *N. caninum* possa estar ocasionando na espécie bubalina na região estudada.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos às Faculdades Integradas de Ourinhos (FIO) e à Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Polo Alta Sorocabana, pela disponibilização dos materiais, reagentes e dependência física necessárias para a realização deste projeto. Ao professor Dr. Sergio Kronka pela valiosa contribuição nas análises estatísticas.

## REFERÊNCIAS

- DUBEY, J.P.; ROMAND, S.; HILALI, M.; KWOK, O.C.H.; THULLIES, P. Soroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Egypt. *International Journal of Parasitology*, v.28, p.527-529, 1998.
- DUBEY, J.P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L.M. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Reviews*, v.20, n.2, p.323-367, 2007.
- 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.331-334, 2001.
- GENNARI, S.M. *Neospora caninum* no Brasil: situação atual da pesquisa. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.13, n.1, p.23-28, 2004.
- GENNARI, S.M.; RODRIGUES, A.A.R.; VIANA, R.B.; CARDOSO, E.C. Occurrence of antibodies anti *Neospora caninum* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from north region of Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.134, n.1/2, p.169-171, 2005.
- GONDIM, L.F.P.; PINHEIRO, A.M.; ALMEIDA, M.A.O. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em

búfalos (*Bubalus bubalis*) criados no estado da Bahia. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.8, n.2, p.92-96, 2007.

HUONG, L.T.T.; LJUNGSTRÖM, B.L.; UGGLA, A.; BJÖRKMAN, C. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes in southern Vietnam. *Veterinary Parasitology*, v.75, p.53-57, 1998.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA (São Paulo). Área, produção e valor dos principais produtos da agropecuária do Estado de São Paulo. In: INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA (São Paulo). *Banco de Dados*, São Paulo: IEA, 2006., Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/banco/menu.php>>. Acesso em: 31 jul. 2006.

RODRIGUES, A.A.R.; GENNARI, S.M.; AGUIAR, D.M.; SREEKUMAR, C.; HILL, D.E.; MISKA, K.B.; VIANNA, M.C.B.; 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, n.3/4, p.139-150, 2004.

RODRIGUES, A.A.R.; GENNARI, S.M.; PAULA, V.S.O.; AGUIAR, D.M.; FUJII, T.U.; STARKE-BUZETI, W.; MACHADO, R.Z.; DUBEY, J.P. Serological responses to

*Neospora caninum* in experimentally and naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Veterinary Parasitology*, v.129, n.1/2, p.21-24, 2005.

SOUZA, L.M.; NASCIMENTO, A.A.; FURUTA, L.I.; BASSO, L.M.; SILVEIRA, D.M.; COSTA, A.J. Detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em soros de bubalinos (*Bubalus bubalis*) no estado de São Paulo, Brasil. *Semina*, v.22, p.39-48, 2001.

THURMOND, M.C.; HIETALA, S.K. Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. *American Journal Veterinary Research*, v.57, n.11, p.1559-1262, 1996.

TREES, A.J.; DAVINSON, H.C.; INNES, E.A.; WASTLING, J.M. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. *International Journal of Parasitology*, v.29, p.1195-1200, 1999.

VOGEL, F.S.F.; ARENHART, S.; BAUERMANN, F.V. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos, ovinos e bubalinos no Estado do Rio Grande do Sul. *Ciência Rural*, v.36, n.6, p.1948-1951, 2006.

Recebido em 18/8/08

Aceito em 3/8/09