

## ANTICORPOS ANTI-*Neospora caninum* EM REBANHOS DE BÚFALOS (*Bubalus bubalis*) NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL\*

Gideão da Silva Galvão<sup>1+</sup>, Walter Flausino<sup>2</sup> e Carlos Wilson Gomes Lopes<sup>3</sup>

**ABSTRACT.** Galvão G. da S., Flausino W. & Lopes C.W.G. [Frequency of antibodies anti-*Neospora caninum* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the State of Rio de Janeiro, Brazil]. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em búfalos (*Bubalus bubalis*) no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 35 (Supl.2):13-16, 2013. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Campus Seropédica, BR 465 Km 7, Seropédica, 23897-970, RJ, Brasil. E-mail: galvaovet@gmail.com

This study aimed to determine the presence of antibodies against *Neospora caninum* and the distribution among the different age groups in water buffaloes herds located in the mesoregions that comprise the state of Rio de Janeiro, Brazil. The frequency of seropositive animals in herds was 29.76% (86/ 289). Antibodies against *N. caninum* was detected in 14 (87.5%) of 16 properties, with positive ranging from 3.57 to 100%. Of the 298 animals examined, only 270 water buffaloes could be categorized into four age groups:  $\leq 2$  years, 2 to  $\leq 4$  years, 5-6 years and  $> 6$  years, were subjected to indirect fluorescence antibody test (IFAT), with a cutoff of 1:200, thus presenting 27.41 % of seropositive animals (74/ 270). The Fisher exact test was used with a significance level of 5%. In the present study we observed differences in seropositivity according to different ages ( $p = 0.027$ ), and animals aged more than five years had 2.62 further chances of exposure. The results show the exposure of water buffaloes to *N. caninum* in the regions studied, and should include the parasite in the differential diagnosis of possible cases of water buffaloes abortion, and reveal the need to adopt health measures for the control of infection in water buffaloes herds.

KEY WORDS. Water buffaloes, neosporosis, prevalence.

**RESUMO.** Este estudo teve como objetivo verificar a presença de anticorpos anti-*Neospora caninum* distribuição entre a soropositividade nas diferentes faixas etárias em rebanhos bubalinos localizados nas mesorregiões que compõem o estado do Rio de Janeiro, Brasil. A frequência de animais soropositivos nos rebanhos foi de 29,76% (86/289). Anticorpos contra-*N. caninum* foram detectados em 14 (87,5%) das 16 propriedades, com positividade variando de 3,57 a 100%. Dos 298 animais analisados, apenas 270 bubalinos puderam ser categori-

zados em quatro estratos:  $\leq 2$  anos, 2 a  $\leq 4$  anos, 5-6 anos e  $> 6$  anos e foram submetidas à técnica de reação de imunofluorescência indireta com ponto de corte de 1:200, apresentando assim 27,41% de animais sororreagentes (74/270). O teste exato de Fisher foi utilizado com nível de significância de 5%. No presente estudo observou-se diferenças em relação a soropositividade em função das diferentes idades ( $p=0,027$ ), e animais com idade superior a cinco anos apresentaram 2,62 mais chances de exposição ao agente. Os resultados obtidos evi-

\*Recebido em 1 de outubro de 2013.

Aceito para publicação em 4 de novembro de 2013.

<sup>1</sup> Médico-veterinário. DSc, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Campus Seropédica, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brasil. Autor para correspondência, E-mail: galvaovet@gmail.com - bolsista CAPES

<sup>2</sup> Biólogo. PhD, Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Anexo 1, IV, UFRRJ, Campus Seropédica, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail: flausino@ufrj.br

<sup>3</sup> Médico-veterinário. PhD, LD. DPA, Anexo 1, IV, UFRRJ, Campus Seropédica, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail: gisele.meireles@gmail.com - bolsista CNPq.

denciam a exposição de bubalinos a *N. caninum* nas mesorregiões estudadas, devendo-se incluir o parasito no diagnóstico diferencial nos possíveis casos de abortamento bubalino, bem como evidencia a necessidade de adoção de medidas sanitárias para o controle da infecção nos rebanhos avaliados.

PALAVRAS-CHAVE. Búfalos, neosporose, prevalência.

## INTRODUÇÃO

*Neospora caninum* é um protozoário intracelular obrigatório, originalmente observado em cães e bovinos (Bjerkaset al. 1984, O'Toole & Jeffrey 1987, Parish et al. 1987), e considerado um importante patógeno destas duas espécies (Dubey & Schares 2011). Sendo assim considerada a maior causa de abortamento bovino em todo o mundo (Dubey 2003), porém pouco se sabe quanto à ação da infecção deste agente etiológico em bubalinos, mas especula-se que a neosporose também possa determinar perdas reprodutivas, visto que esse coccídio já foi isolado em bubalinos no Brasil (Rodrigues et al. 2004).

As prevalências de anticorpos anti-*N. caninum* encontradas alguns estudos do Brasil e no mundo variam de 1,5% a 70,9% (Dubey et al. 1998, Huong et al. 1998, Fujii et al. 2001, Souza et al. 2001, Gennari et al. 2005, Voguel et al. 2006, Campero et al. 2007, Crudeli et al. 2007, Hajikolaie et al. 2007, Meenakshi et al. 2007, Negrão et al. 2009, Viana et al. 2009, Silva et al. 2010, Sengupta et al. 2013).

Semelhante ao que ocorre em bovinos, rebanhos bubalinos tendem a ter maior soropositividade em animais mais velhos (Guarino et al. 2000, Fujii et al. 2001, Campero et al. 2007, Sengupta et al. 2013), indicando que a via transplacentária pode não ser o único modo de transmissão nessa espécie; sendo assim, com o passar da idade a possibilidade de risco em adquirir a infecção através do ambiente seria maior também em bubalinos, tal qual ocorre em bovinos. No entanto, a transmissão congênita é o único modo natural de infecção conhecido em rebanhos bovinos e bubalinos, sendo desconhecido se búfalos podem adquirir a infecção por *N. caninum* através da transmissão horizontal, ou seja, pela ingestão de oocistos esporulados, presentes no meio ambiente (Guarino et al. 2000). Desta maneira, o objetivo deste estudo, foi verificar a presença de anticorpos contra *N. caninum* em rebanhos bubalinos no estado do Rio de Janeiro, buscando a associação da soropositividade em função da idade.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado nos municípios que compõem as mesorregiões do Estado do Rio de Janeiro onde existia propriedade de criação de búfalos (IBGE 2006). Foi utilizada uma amostra não probabilística de 270 animais, distribuídos em quatro faixas etárias,  $\leq 2$  anos, 2 a  $\leq 4$  anos, 5-6 anos e  $>6$  anos, provenientes de quinze propriedades criadoras de bubalinos, selecionadas a partir do cadastro de vacinação referentes ao ano de 2007 da Secretaria de estado de agricultura, pecuária, pesca e abastecimento do Estado do Rio de Janeiro, (Núcleo de Defesa Animal - NDA).

A coleta de sangue foi realizada por punção das veias jugular ou mamária, utilizando-se setubo sem anticoagulante. As amostras foram centrifugadas a 350 x g por 10 minutos para obtenção do soro, e posteriormente realizada a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), segundo Yamane et al. (1997), com ponte de corte de 1:200 (Gondim et al. 2007). O processamento das amostras e a análise dos dados obtidos foram realizados no Laboratório de Coccídios e Coccidioses, Anexo 1 do IV (Antigo PSA), Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, UFRRJ, Campus Seropédica, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970.

Após a retração do coágulo, o sangue foi centrifugado a 350 x g por 10 minutos em uma centrífuga refrigerada, para a separação do soro, este foi acondicionado em criotubos de 2 mL, em duplicata, identificados e mantidos sob a temperatura de -20°C até o momento da realização da sorologia.

Uma entrevista semi-estruturada foi realizada, perante os responsáveis das propriedades, para obtenção de dados sobre a idade dos animais e um banco de dados foi montado com dados de 270 animais no programa Epi Info7 (CDC), no qual foi realizado o teste exato de Fisher (Sampaio 1998) com nível de significância estabelecido em 5%, para avaliar a associação da soropositividade em função da idade.

## RESULTADO E DISCUSSÃO

No presente estudo, foram testados 289 soros, onde destes 29,76% (86/289) foram positivos para anticorpos contra *N. caninum*, com 87,5% (14/16) das propriedades apresentando ao menos um animal positivo (Tabela 1), o que evidencia uma ampla exposição dos rebanhos analisados a este agente etiológico.

Os resultados de prevalência no presente estudo, foram próximos aos observados por Guarino et al. (2000) na Itália, e por Gondim et al. (2007) no nordeste brasileiro, encontrando uma soropositividade de 34,6% (477/1377) e 35,9% (42/117) respectivamente. Resultados próximos a estes também foram relatados no oeste de São Paulo com 38,1% (154/404) de soropositividade, contudo o ponto de corte adotado para o teste foi de 1:100 (Negrão et al. 2009). Resultados superiores a estes foram relatados também em São Paulo por Fujii et al. (2001) com 64% dos 222 búfalos analisados soropositivos, entretanto o ponto de corte adotado para diluição foi

Tabela 1. Frequência de bubalinos soropositivos para *Neospora caninum*, distribuídos por propriedades presentes nas mesorregiões do Estado do Rio de Janeiro.

Fazenda	Número de Bubalinos examinados	Positivos (%)
1	30	6 (20)
2	18	7(38,89)
3	11	7(63,64)
4	4	0 (0)
5	14	4(28,57)
6	4	2(50,0)
7	19	5(26,32)
8	19	12(63,16)
9	2	1(50)
10	14	2(14,29)
11	24	0 (0)
12	28	1(3,57)
13	9	4(44,44)
14	24	10(41,67)
15	65	21(32,31)
16	4	4(100)
Total	289	86(29,76)

de 1:25, fator que promove assim mais sensibilidade do teste com menor especificidade, justificando assim a alta prevalência encontrada, por outro lado caso fosse adotado o ponto de corte 1:200 nesse mesmo estudo a frequência seria de 7,2%.

As prevalências de anticorpos contra *N. caninum* encontradas em alguns estudos do Brasil e no mundo variaram de 1,5% a 70,9% (Dubey et al. 1998, Huong et al. 1998, Fujii et al. 2001, Souza et al. 2001, Gennari et al. 2005, Voguel et al. 2006, Campero et al. 2007, Crudeli et al. 2007, Hajikolaie et al. 2007, Meenakshi et al. 2007, Negrão et al. 2009, Viana et al. 2009, Silva et al. 2010, Nasiret al. 2011, Sengupta et al. 2013). Embora o processo de amostragem e o tamanho de amostra devam ser considerados, tal diferença pode ser atribuída principalmente às diferentes técnicas adotadas, devendo-se também levar em consideração as diferenças de habitat das regiões estudadas. Tais fatos apresentados justificam assim as diferenças nos resultados observados, o que dificultou a comparação direta dos resultados.

Como não foi possível ter acesso aos registros de todos os bubalinos analisados, apenas 270 animais compuseram o banco de dados, distribuídos em 15 propriedades, apresentando desta maneira 27,41% (74/270) de positividade, sendo 178 com idade de até 2 anos, 55 com idade de 2 a 4 anos, 10 com idade de 5-6 anos e 27 com idade superior a 6 anos (Tabela 2). Destes 178 animais com idade até 2 anos, 48 tinham idade inferior a 8 meses, sendo destes, 17 positivos para anticorpos contra-*N. caninum*. Contudo, não foi possível fazer pareamento vaca/bezerro para assim fazer uma inferência quanto a possibilidade de origem da infecção, uma vez que

Tabela 2. Distribuição de positividade a *Neospora caninum* nos búfalos em função da faixa etária.

Faixa etária (Anos)	Animais	Positivos	Negativos
≤2	178 (65,93)	44 (24,72)	134 (75,28)
2 a ≤4	55 (20,37)	13 (23,64)	42 (76,36)
5-6	10 (3,70)	3 (30)	7 (70)
>6	27 (10)	14 (48,15)	13 (51,85)
Total	270 (100)	74 (27,41)	196 (72,59)

$p=0,027$ .

Tabela 3. Associação da idade em búfalos sororreagentes para *Neospora caninum* nos rebanhos distribuídos por propriedades presentes nas mesorregiões do Estado do Rio de Janeiro.

Características	Animais		Valor de p	OR <sup>b</sup>	IC 95% <sup>c</sup>
	Sorologia <sup>a</sup>	Valores			
>5 anos	Positiva: 17 (6) <sup>d</sup> Negativa: 20 (7)		0,0095	2,6246	1,2875- 5,3503
<5 anos	Positiva: 57 (21) Negativa: 176 (65) Total 270 (100)				

<sup>a</sup> RIFI; <sup>b</sup> Razão de Chances; <sup>c</sup> Usando aproximação de Woolf; <sup>d</sup> Valores relativos em percentagem.

anticorpos adquiridos via colostro em bezerros búfalos podem persistir em alguns animais por até 7 meses como o relatado por Rodrigues et al. (2005).

Apesar de altas prevalências já mencionadas nessa espécie, até o momento não existe a confirmação de que *N. caninum* seja abortiva para búfalas, apesar de existir um relato na Itália da observação de cisto semelhante a *N. caninum* em um feto bubalino abortado, contudo, não houve confirmação por meio de exame imunohistoquímico ou teste molecular (Guarino et al. 2000).

A frequência de ocorrência de anticorpos contra *N. caninum* torna-se maior em função do aumento da idade nos bubalinos (Guarino et al. 2000, Fujii et al. 2001, Campero et al. 2007, Sengupta et al. 2013), e no presente estudo uma associação significativa entre idade e soroprevalência de *N. caninum* foi observada, com animais com idade superior a cinco anos apresentando 2,62 mais chances de exposição a este agente etiológico. Na Itália, Guarino et al. (2000) verificaram que a prevalência de *N. caninum* aumentou com a idade dos animais, indicando assim a exposição a oocistos no ambiente.

Logo, mediante a possibilidade de exposição de bubalinos a *N. caninum* e pela ampla distribuição nos rebanhos estudados, tais resultados remetem o desafio de inclusão deste parasito no diagnóstico diferencial em casos de abortamento nos rebanhos bubalinos da região. Um outro aspecto também deve ser levado em consideração, que é o contro-

le quanto a presença de cães ou canídeos silvestres nas proximidades das instalações, uma vez que até o momento ainda não é relatado a infecção horizontal em bubalinos, mas por saber que canídeos desempenham papel importante no ciclo biológico de *N. caninum*, os resultados encontrados no presente estudo, bem como nos encontrados por Guarino et al. (2000), Fujii et al. (2001) e Negrão et al. (2009) evidenciaram a necessidade de cuidados quanto a prevenção da presença de cães ou outros canídeos silvestres nas proximidades das instalações de bubalinos, semelhantemente as medidas adotadas em rebanhos bovinos, para a prevenção da transmissão horizontal do agente etiológico, uma vez que, animais mais velhos teriam assim maior chance de se tornarem infectados pela maior possibilidade de exposição a *N. caninum* com o passar da idade.

**Agradecimentos.** Ao CNPq, CAPES, FAPERJ e UFRRJ pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bjerkas I., Mohn S.F. & Presthus J.J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z. Parasitenkunde*, 70:271-274, 1984.
- Campero C.M., Pérez A., Moore D.P., Crudeli G., Benitez D., Draghi M.G., Cano D., Konrad J.L. & Odeón A.C. Occurrence of antibodies against *Neospora caninum* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) on four ranches in Corrientes province, Argentina. *Vet. Parasitol.*, 150:155-158, 2007.
- Crudeli G., Campero C.M., Moore D.P., Benitez D., Draghi G., Polich D., Konrad J., Cano D., Leunda M.R., Arzeno M. & Odeón A. High prevalence of *Neospora caninum* antibodies in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in ranches of Corrientes, Chaco and Formosa provinces, Argentina. *Italian J. Anim. Sci.*, 6:945-947, 2007.
- Dubey J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J. Parasitol.*, 41:1-16, 2003.
- Dubey J.P., Romand S., Hilali M., Kwok O.C.H. & Thulliez P. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Egypt. *Int. J. Parasitol.*, 28:527-529, 1998.
- Dubey J.P. & Schares G.N. Neosporosis in animals-the last five years. *Vet. Parasitol.*, 180:90-108, 2011.
- 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. *Vet. Parasitol.*, 99:331-334, 2001.
- Gennari S.M., Rodrigues A.A.R., Viana R.B. & Cardoso E.C. Occurrence of anti-*Neospora caninum* antibodies in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the Northern region of Brazil. *Vet. Parasitol.*, 134:169-171, 2005.
- Guarino A., Fusco G. & Savini G., Di Francesco G. & Cringoli G. Neosporosis in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in southern Italy. *Vet. Parasitol.*, 91:15-21, 2000.
- Hajikolaei M.R.H., Goraninejad S., Hamidinejat H., Ghorbanpour M. & Paryab R. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the south-western region of Iran. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 51:233-235, 2007.
- Houng L.T.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. *Vet. Parasitol.*, 75:53-57, 1998.
- Meenakshi K.S.S., Ball M.S., Kumar H., Sharma S., Sidhu P.K., Sreekumar C. & Dubey J.P. Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies in cattle and water buffaloes in India. *J. Parasitol.*, 93:1374-1377, 2007.
- Nasir A., Ashraf M., Khan M.S., Yaqub T., Javeed, A., Avais M. & Akhtar F. Seroprevalence of *Neospora caninum* in Dairy Buffaloes in Lahore District, Pakistan. *J. Parasitol.*, 97:541-543, 2011.
- Negrão C.B., Aguiar D.M., Orlandelli R.C. & Sartor I.F. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em fêmeas bubalinas da região oeste do estado de São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, 76:685-688, 2009.
- O'toole D. & Jeffrey M. Congenital sporozoan encephalomyelitis in a calf. *Vet. Rec.*, 121:563-566, 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. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 191:1599-1600, 1987.
- 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. *Vet. Parasitol.*, 124:139-150, 2004.
- Sengupta P.P., Balumahendiran M., Raghavendra A.G., Honnappa T.G., Gajendragad M.R. & Prabhudas K. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dairy cattle and water buffaloes and associated abortions in plateau of Southern Peninsular India. *Trop. Anim. Health Prod.*, 45:205-210, 2013.
- Silva S.P., Mota R.A., Faria E.B., Fernandes E.F.T.S., Neto O.L.S., Albuquerque P.P.F. & Dias H.L.T. Anticorpos IgG anti-*Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em búfalos (*Bubalus bubalis*) criados no estado do Pará. *Pesq. Vet. Bras.*, 30:443-446, 2010.
- Souza L.M., Nascimento A.A., Furuta P.I., Basso L.M.S., Silveira D.M. & Costa A.J. Detecção de anticorpos contra *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em soros de bubalinos (*Bubalus bubalis*) no Estado de São Paulo, Brasil. *Semina: Cienc. Agra.*, 22:39-48, 2001.
- Viana R.B., Del Fava C., Moura A.C.B., Cardoso E.C., Araújo C.V., Monteiro B.M., Pituco E.M. & Vasconcellos S.A. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum*, *Brucella* sp. e *Leptospira* spp. em búfalos (*Bubalus bubalis*) criados na Amazônia. *Arq. Inst. Biol.*, 76:453-457, 2009.
- 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. *Cienc. Rur.*, 36:1948-1951, 2006.
- Yamane I., Kokuho T., Shimura K., Eto M., Shibahara T., Haritani M., Ouchi Y., Sverlow K. & Conrad P.A. *In vitro* isolation and characterization of a bovine *Neospora* species in Japan. *Res. Vet. Sci.*, 63:77-80, 1997.