

FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA *TOXOPLASMA GONDII* E *NEOSPORA CANINUM* EM OVINOS DO MUNICÍPIO DE UBERLÂNDIA, MG

ROSSI, G.F.^{1*}; CABRAL, D.D.²; SILVA, D.A.O.³; RIBEIRO, D.P.⁴; PAJUABA, A.C.A.M.⁵; MOREIRA, R.Q.⁶; CORRÊA, R.R.⁷

*¹ Acadêmico do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, rua Ceará s/n°, Uberlândia, MG, CEP: 38402-018, guilhermeufvet@yahoo.com.br ;

² Docente do ICBIM da Universidade Federal de Uberlândia, rua Ceará s/n°, Uberlândia, MG, CEP: 38402-018;

³ Médica Veterinária, Pesquisadora do Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Pará 1720, Campus Umuarama, 38400-902, Uberlândia, MG.

⁴ Médico Veterinário, Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Pará 1720, Campus Umuarama, 38400-902, Uberlândia, MG.

⁵ Médica Veterinária, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Pará 1720, Campus Umuarama, 38400-902, Uberlândia, MG.

⁶ Médico Veterinário, Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia. Av. Pará, 1720, Campus Umuarama Bloco 2T, Uberlândia MG, CEP: 38402-018;⁷ Médico Veterinário, Autônomo formado na Universidade Federal de Uberlândia em 09/03/2007. Rua Marrey Junior n. 92, bairro: Nova Jaboticabal, Jaboticabal, CEP: 14887-034.

INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um parasito protozoário pertencente ao Filo Apicomplexa e Família Sarcocystidae, sendo considerado coccídeo intestinal dos gatos (hospedeiros definitivos) e apresentando uma ampla faixa de hospedeiros intermediários (FORTES et al., 1997). O parasito é descrito como agente de abortamento em ovinos e importante causa de problemas reprodutivos nesta espécie (SILVA et al. 2003). A doença clínica ocorre na forma de problemas perinatais como abortos, natimortos e cordeiros recém nascidos fracos.

Neospora caninum é um protozoário intracelular (DUBEY et al., 1988) muito semelhante a *Toxoplasma gondii*, apresentando também um ciclo de vida heteroxeno, mas com o estágio sexual ocorrendo no intestino de canídeos (hospedeiro definitivo). Pode ser transmitido pela ingestão de água ou alimento contaminado com oocistos eliminados nas fezes de cães, afetando uma variedade de hospedeiros intermediários, incluindo ovinos. A neosporose possui grande importância econômica, principalmente devido às perdas reprodutivas, incluindo retornos ao cio, com intervalos regulares ou irregulares, abortos, nascimento de animais fracos e inviáveis, com sinais neurológicos, ou persistentemente infectados (DUBEY; LINDSAY, 1996).

N. caninum e *T. gondii* são importantes causas de problemas reprodutivos, isolados ou associados a outros agentes (DUBEY; LINDSAY, 1996). Podem ser diferenciados pela detecção de diferentes antígenos por meio de imunohistoquímica e provas sorológicas, assim como pelas diferenças na espessura da parede cística e número de roptrias dos taquizoítas (DUBEY et al., 1988; BARR et al., 1991).

O presente trabalho teve por objetivo principal verificar a frequência de anticorpos contra *N. caninum* e *T. gondii* em soros de ovinos em duas propriedades rurais do município de Uberlândia, MG. Além disso, testes imunoenzimáticos (ELISA) e reações de imunofluorescência indireta (RIFI) para toxoplasmose e neosporose ovina foram padronizados bem como a produção de conjugados imunoenzimáticos e marcados com fluorocromos específicos para cada reação.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 155 ovinos da raça Santa Inês de duas propriedades rurais (A e B) da região de Uberlândia, MG, localizada no Triângulo Mineiro, entre agosto de 2007 e julho de 2008. Foram coletados dados epidemiológicos (idade, sexo, tipo de manejo e de exploração, problemas reprodutivos e presença de cães, gatos ou roedores) e amostras de sangue para sorologia.

Produção de conjugados imunoenzimáticos e marcados com fluorocromos

IgG de carneiro purificada por cromatografia de afinidade em coluna de Proteína G-Sepharose (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) foi utilizada para imunização de coelhos por via subcutânea em 3 doses (250 µg/mL) com adjuvante completo (1^a dose) e incompleto (doses subseqüentes) de Freund, em intervalos de 14 dias. Soroconversão e título de anticorpos anti-IgG carneiro foram analisados por ELISA.

O antisoro produzido em coelho foi purificado em coluna de Proteína G-Sepharose e IgG purificada foi conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou marcada com biotina para posterior utilização nos testes sorológicos.

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) foi realizada para a detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e IgG anti-*N. caninum* em amostras de soros de ovinos diluídos a partir de 1:64 (*T. gondii*) ou 1:50 (*N. caninum*), de acordo com FIGLIUOLO et al. (2004). As reações foram consideradas positivas somente quando os taquizoítas apresentaram uma completa fluorescência periférica, brilhante e uniforme.

Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) foram realizados para detectar anticorpos IgG anti-*T. gondii* e IgG anti-*N. caninum*, segundo SILVA et al. (2007). As amostras de soros foram diluídas 1:64 (*T. gondii*) ou 1:50 (*N. caninum*). O *cut off* (limite de positividade) foi determinado pela média dos valores de densidade óptica (DO) dos soros controles negativos acrescido de três desvios padrões. Os títulos de anticorpos foram expressos em Índice ELISA (IE), de acordo com a seguinte fórmula: $IE = DO \text{ amostra} / DO \text{ cut off}$ como anteriormente descrito (SILVA et al., 2002). Valores de IE > 1,2 foram considerados positivos.

Análise Estatística

Para comparação entre as proporções encontradas nos resultados sorológicos e epidemiológicos foi aplicado o teste do Qui-quadrado (χ^2), com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da RIFI para *T. gondii* demonstraram que 72/155 (46,4%) amostras de soros ovinos foram positivas, com a seguinte distribuição: 46/95 (48,4%) no rebanho A e 26/60 (43,3%) no rebanho B. Na distribuição por sexo e idade, soropositividade para *T. gondii* foi encontrada em 8/39 (20,5%) fêmeas = 1 ano, 61/109 (55,9%) fêmeas > 1 ano, 3/5 (60,0%) machos = 1 ano e 0/2 (0%) machos > 1 ano.

Para *N. caninum* foram encontradas 73/155 (47,1%) amostras soropositivas, com a seguinte distribuição: 30/95 (31,5%) no rebanho A e 43/60 (71,6%) no rebanho B. A soropositividade de acordo com sexo e idade foi encontrada em 15/39 (38,4%)

fêmeas = 1 ano, 54/109 (49,5%) fêmeas > 1 ano, 2/5 (40,0%) machos = 1 ano e 2/2 (100%) machos > 1 ano.

A Tabela 1 mostra a distribuição dos títulos de anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum* por RIFI. Das 72 amostras soropositivas para *T. gondii*, 80,4% apresentaram títulos entre 512 e 2048. Para *N. caninum*, das 73 amostras soropositivas, 77,9% apresentaram títulos entre 50 e 200. Na comparação entre os dois rebanhos, a soropositividade para *T. gondii* pela RIFI não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os rebanhos A (48,4%) e B (45,0%) ($\chi^2 = 0,3827$; $p = 0,5362$). Entretanto, a soropositividade para *N. caninum* pela RIFI mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os rebanhos A (31,5%) e B (71,6%) ($\chi^2 = 23,72$; $p < 0,0001$).

Tabela 1: Distribuição de títulos de anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum* determinados por RIFI em soros de ovinos de duas propriedades rurais no município de Uberlândia, MG.

Título	<i>Toxoplasma gondii</i>		Título	<i>Neospora caninum</i>	
	Nº de amostras positivas	Prevalência %		Nº de amostras positivas	Prevalência %
128	2	2,7	50	27	36,9
256	11	15,2	100	18	24,6
512	22	30,5	200	12	16,4
1024	17	23,6	400	5	6,8
2048	19	26,3	800	3	4,1
4096	1	1,3	1600	8	10,9
Total	72	46,4	Total	73	47,1%

A frequência de anticorpos para *T. gondii* em soros ovinos por ELISA foi 63,2% (98 amostras soropositivas de 155 soros ovinos), com a seguinte distribuição: 62/95 (65,3%) no rebanho A e 36/60 (60,0%) no rebanho B. Na distribuição por sexo e idade foram encontradas 13/39 (33,3%) fêmeas = 1 ano, 81/109 (74,3%) fêmeas > 1 ano, 4/5 (80,0%) machos = 1 ano e 0/2 (0%) machos > 1 ano.

Para *N. caninum* foram encontradas 57/155 (36,7%) amostras soropositivas, com a seguinte distribuição: 25/95 (26,3%) no rebanho A e 32/60 (53,3%) no rebanho B. A soropositividade de acordo com sexo e idade foi encontrada em 6/39 (15,4%) fêmeas = 1 ano, 49/109 (44,9%) fêmeas > 1 ano, 1/5 (20,0%) machos = 1 ano e 1/2 (50%) machos > 1 ano.

Os níveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum* estão demonstrados nas Figuras 1 e 2, respectivamente. Na comparação entre os dois rebanhos, a soropositividade para *T. gondii* por ELISA não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os rebanhos A (65,3%) e B (60,0%) ($\chi^2 = 0,438$; $p = 0,5080$). Entretanto, a soropositividade para *N. caninum* por ELISA mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os rebanhos A (26,3%) e B (53,3%) ($\chi^2 = 11,55$; $p = 0,0007$).

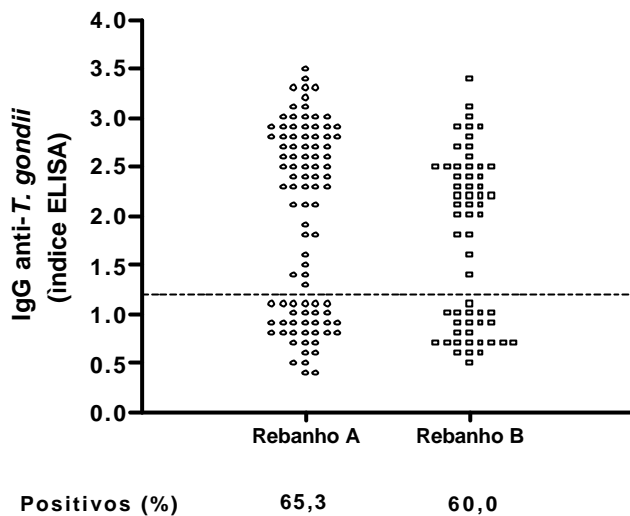


Figura 1: Níveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii* determinados por ELISA em 155 amostras de soros de ovinos de dois rebanhos (A, n = 95; B, n = 60) do município de Uberlândia, MG.

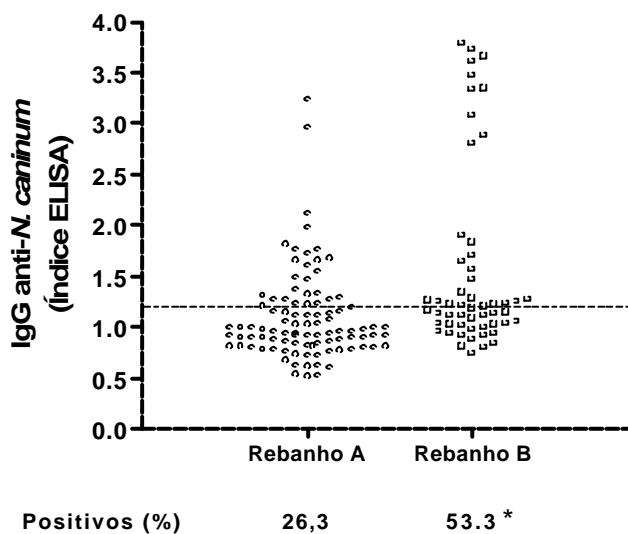


Figura 2: Níveis de anticorpos IgG anti-*N. caninum* determinados por ELISA em 155 amostras de soros de ovinos de dois rebanhos (A, n = 95; B, n = 60) do município de Uberlândia, MG. * $P < 0,05$.

A Tabela 2 mostra a comparação entre os resultados dos testes ELISA e RIFI para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* e *N. caninum* em soros ovinos. Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre esses dois testes para toxoplasmose ($\chi^2 = 8,805$; $p = 0,0030$), mostrando uma maior soropositividade detectada por ELISA. Para neosporose, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os testes ($\chi^2 = 3,391$; $p = 0,0655$), embora maior soropositividade foi detectada pela RIFI.

Tabela 2: Comparação entre os testes ELISA e RIFI para *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em ovinos, Uberlândia, MG.

Resultados	<i>Toxoplasma gondii</i>		<i>Neospora caninum</i>	
		Prevalência (%)		Prevalência (%)
ELISA	98	63,22	57	36,7
RIFI	72	46,45	73	47,1
ELISA + /RIFI -	26	16,77	8	5,16
ELISA - /RIFI +	0	0	24	15,48
ELISA + /RIFI +	72	46,45	49	31,61
Total	155		155	

A soropositividade para *T. gondii* utilizando a RIFI (46,4%) foi mais elevada que a detectada por OLIVEIRA-SEQUEIRA et al. (1993) em ovinos (22,5%) na região central do estado de São Paulo, porém mais baixa do que aquelas encontradas por GARCIA et al. (1999) no norte do país (51,8%) e ROMANELLI (2002) na parte central do Estado do Paraná (51,4%). No entanto, FREIRE et al. (1995) obtiveram em 360 amostras de soro de ovinos na região de Londrina, soropositividade de 47,8%, semelhante a obtida neste estudo.

No teste ELISA, o percentual de soropositividade para *T. gondii* (63,2%) foi superior aos encontrados por GONDIM et al. (1999) na Bahia (18,75%), FIGLIUOLO et al. (2004) em São Paulo (34,7%) e LARSSON et al. (1980) no Rio Grande do Sul (39%). As diferenças em soroprevalência podem ser devido a vários fatores, incluindo, a freqüência de felinos presentes nos diferentes locais, diferenças no manejo, idade dos animais, variações climáticas entre as regiões, bem como características intrínsecas dos testes sorológicos utilizados, como sensibilidade, especificidade e valores de *cut off* utilizados (DUBEY, 1990; SAWADOGO et al., 2005).

Em relação a *N. caninum*, sabe-se pouco sobre sua prevalência em ovinos. HELMICK et al. (2002) no Reino Unido detectaram apenas 3 animais soropositivos de um total de 660 ovelhas com histórico de abortamento. No Brasil, ROMANELLI (2002) em estudo sorológico no Estado do Paraná, encontrou 9,5% de animais reagentes. Na Bahia, OTERO et al. (2003) estudando 282 amostras de soro de ovinos provenientes de 10 propriedades, detectaram freqüência de 7,4% para anticorpos anti-*N. caninum* e FIGLIUOLO (2003), no Estado de São Paulo, estimaram prevalência de 9,2% de anticorpos anti-*N. caninum* em ovinos. Neste estudo, foi encontrado um percentual de positividade de 47,1% pela RIFI e 36,7% por ELISA que foi muito superior aos encontrados nos estudos citados anteriormente.

CONCLUSÃO

A toxoplasmose está largamente distribuída no rebanho ovino das duas propriedades rurais analisadas na região de Uberlândia, MG, como demonstrado por altos títulos de anticorpos anti-*T. gondii* encontrados por dois testes sorológicos nessas propriedades. Isto pode ser devido à presença de gatos nessas propriedades, ao manejo precário e também ao tipo de água (de superfície) oferecida aos animais.

Nas duas propriedades rurais ressalta a prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* em ovinos acima da encontrada em outras regiões do Brasil e do mundo. Isto pode ser devido a um manejo deficitário, fonte de água inadequada e a presença de cães nos rebanhos. No Brasil, educação sanitária com o objetivo de informar criadores sobre a doença e a presença de *N. caninum* em tecidos e fluidos fetais será importante para um melhor controle do protozoário envolvido em abortos.

REFERÊNCIAS

- ANDREW, S.M.; TITUS, J.A. Purification and fragmentation of antibodies. In: Current Protocols in Immunology (J.E. Colligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach, W. Strober, eds). pp. 2.7.1. – 2.7.12. **John Wiley & Sons, Inc.**, N. Y. 1994.
- CLARK, H. F., SHEPARD, C.C.S. dialysis technique for preparing fluorescent antibody. **Virology** 20, 642-644, 1963.
- BARR, B.C.; CONRAD, P.A.; DUBEY, J.P.; ANDERSON, M.L. Neospora-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. **J Vet Diagn Invest, Columbia**, v.03, p. 39-46, 1991.
- DUBEY, J.P.; CARPENTER, J.L.; SPEER, C.A.; TOPPER, M.J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **J Am Vet Med Assoc**, v.192, p.1269-1285, 1988.
- DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Vet Parasitology, Amsterdam**, v.67, p.1-59, 1996.
- FIGLIUOLO, L.P.C., N. KASAI, A.M.A. RAGOZO, V.S.O. DE PAULA, R.A. DIAS, S.L.P. SOUZA, S.M.GENNARI, 2004. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. **Vet. Parasitology** 123:161–166, 2004.
- FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 3ª ed. São Paulo: Ícone, 1997.
- SIEGEL, S. **Estatística não-paramétrica, para as ciências do comportamento**. Ed. McGraw-Hill do Brasil. São Paulo, p. 350, 1975.
- SILVA, D.A.O; SILVA, N.M.; MINEO, T.W.P.; PAJUABA NETO, A.A.; FERRO, A.V.; MINEO, J.R. Heterologous antibodies to evaluate the kinetics of the humoral immune response in dogs experimentally infected with *Toxoplasma gondii* RH strain. **Veterinary Parasitology.**, v.107., p.181-195, 2002.
- SILVA, A. V. da., CUNHA, E. L. P., MEIRELES, L. R., GOTTSCHALK, S., MOTA, R. A., LANGONI, H. Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudo soropidemiológico em duas regiões do Estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência Rural**, v.33, n.1, p.115-119, fevereiro, 2003.
- SILVA, D.A.; LOBATO, J.; MINEO T.W.; MINEO, J.R. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. **Vet Parasitol.** 2007 Feb 28;143(3-4):234-44. Epub 2006 Sep 12.