

Comunicação

[Communication]

Associação entre a presença de anticorpos anti-*Leishmania* sp. e anti-*Neospora caninum* em cães de Bauru, SP

[Association between the presence of anti-*Leishmania* sp. and anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs from Bauru, Brazil]

H. Greca^{1,2}, A.V. Silva^{2,3}, H. Langoni^{2*}

¹FMVZ – UNESP – Botucatu, SP

²Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública – FMVZ-UNESP – Botucatu, SP
Distrito de Rubião Júnior, s/n
18618-000 Botucatu, SP

³Universidade Paranaense UNIPAR – Umuarama, PR

Neospora caninum é um protozoário, parasita intracelular pertencente ao filo *Apicomplexa*, classe *Sporozoa* e família *Sarcocystidae*. O seu ciclo de vida é dividido em três estágios infectantes: taquizoítos, cistos teciduais e oocistos. Os estágios de taquizoítos e cistos teciduais são intracelulares e encontrados nos hospedeiros intermediários. Os cistos teciduais são encontrados em tecidos de bovinos e cães naturalmente infectados, mas não foram descritos em cães infectados experimentalmente (Dittri. *caninum* foi diagnosticada em cães por Dubey et al. (1988), a partir do isolamento do protozoário em cultivo celular em camundongos e em cães inoculados com tecidos provenientes de cães infectados. As principais lesões observadas nos animais inoculados experimentalmente foram encefalomielite, poliradiculoneurite, miosite e meningoencefalite. O isolamento do *N. caninum* permite o desenvolvimento da reação de imunofluorescência indireta, para o diagnóstico sorológico da neosporose, e um teste imunistoquímico, para a identificação do protozoário em tecidos, pela produção de soro específico anti-*N. caninum* (Dittrich, 2002).

O cão doméstico é o único hospedeiro definitivo conhecido até o momento. Os hospedeiros intermediários naturais de *N. caninum* são os bovinos, equinos, caprinos, ovinos e cervos, entre outros animais (Dittrich, 2002).

A infecção induz à produção de anticorpos, e a reação de imunofluorescência indireta é considerada como padrão-ouro. O antígeno utilizado são os taquizoítos, obtidos em histocultura, fixados inteiros nas lâminas. Podem ser obtidos de cepas de *N. caninum* isoladas de cães e bovinos, pois não há evidências de que variações antigênicas entre os isolados alterem a eficácia dos testes (Bjerkas et al., 1994).

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários digenéticos, pertencentes à ordem kinetoplastida, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania*, com diferentes espécies. O curso é crônico, com sinais cutâneos, mucocutâneos e sistêmicos. Há três formas de apresentação; leishmaniose visceral ou calazar, a leishmaniose tegumentar e ainda a leishmaniose mucocutânea (Lainson e Shaw, 1987).

Tarantino et al. (2001) observaram a coinfeção cutânea por *Leishmania infantum* e *N. caninum* em cão jovem, na Itália. Cringoli et al. (2002) descreveram a presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp. e anti-*N. caninum* na região de Campania, no sul da Itália, e observaram que a infecção por um destes protozoários aumenta, aparentemente, a susceptibilidade para o outro. A imunossupressão causada pela leishmaniose visceral americana (LVA) pode promover a ocorrência de coinfeções por outros agentes, tais como *Ehrlichia*, *Babesia* e *Dirofilaria*, em áreas endêmicas (Andreotti et al., 2005).

Recebido em 18 de junho de 2008

Aceito em 28 de dezembro de 2009

*Autor para correspondência (corresponding author)

E-mail: hlangoni@fmvz.unesp.br

Considerando-se a importância desses patógenos para os cães, o presente estudo teve o objetivo de verificar, em área endêmica para leishmaniose visceral canina, a possível coexistência de anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*Leishmania* spp.

Foram coletadas amostras de sangue de cães do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da Prefeitura de Bauru, SP, região endêmica para leishmaniose, independente da suspeita ou não de leishmaniose. Em cada visita ao CCZ, foram obtidas 10 amostras por venopunção da veia jugular, previamente à eutanásia, completando-se 100 amostras em 10 coletas. As amostras foram centrifugadas a 3000 rotações por minuto durante 10 minutos, e o soro distribuído em microtubos identificados e congelados a -80°C até o momento da realização dos exames sorológicos.

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* foi realizada de acordo com Dittrich (2002), considerando-se como ponto de corte o título 25. Para a titulação, foram realizadas diluições em dobro, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800, em casos de positividade na última diluição, e foram avaliadas novas diluições, para obtenção do título final. Para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, utilizou-se também a RIFI de acordo com Camargo (1966). Foram utilizadas amostras de soros controle positivo e controle negativo, e considerou-se como título final a maior diluição do soro que mostrou fluorescência completa na borda de, pelo menos, 50% das promastigotas para leishmaniose, e de taquizoítos para neosporose utilizados com antígenos nas lâminas de imunofluorescência.

Para a associação dos resultados, utilizou-se o teste exato de Fischer, para calcular a probabilidade de associação das características em análise, ou seja, serem independentes quando

o número total de dados é pequeno. Para verificar a existência de correlação entre as frequências absolutas dos títulos para cada uma das doenças, utilizou-se o coeficiente de correlação de Spearman, medida de correlação não paramétrica, que descreve a relação entre duas variáveis. Ao contrário do coeficiente de correlação de Pearson, o coeficiente de Spearman não requer a suposição de que a relação entre as variáveis seja linear (Triola, 2005).

A associação dos resultados da pesquisa de anticorpos para as duas enfermidades encontra-se na Tab. 1, e, de acordo com o teste exato de Fischer, $P=0,41$, há indicação de não haver associação entre os resultados da pesquisa de anticorpos para *Leishmania* spp. e *N. caninum*, com $\alpha=0,05$. Quanto à frequência absoluta dos resultados da RIFI para leishmaniose e neosporose, estas são encontradas na Tab. 2. De acordo com o valor do coeficiente de correlação de Spearman entre os títulos de anticorpos anti-*Leishmania* spp. e anti-*N. caninum*, $r=0,0975$, e $P=0,33$, não houve correlação entre os títulos de anticorpos para os dois patógenos.

Das 100 amostras de soros, 65% foram positivas para anticorpos anti-*Leishmania* spp. e 14% para anticorpos anti-*N. caninum*, com 10% de positividade para ambos os parasitas. Não se observou associação entre os resultados, indicando que a presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp. não aumenta a probabilidade de coinfeção por *N. caninum*. A soroprevalência de *Leishmania* spp. é maior quando comparada com a de neosporose. Ressalta-se que as amostras foram obtidas de cães capturados pelo CCZ de Bauru, que desenvolve um serviço de vigilância com a captura de cães errantes, como atividade do programa de controle da leishmaniose adotado no município.

Tabela 1. Associação entre presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp. e anti-*Neospora caninum* em soros de cães de Bauru, SP, pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

RIFI - <i>Neospora</i>	RIFI – <i>Leishmania</i> spp.		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	10	4	14
Negativo	55	31	86
Total	65	35	100

Tabela 2. Frequência absoluta de resultados da reação de imunofluorescência indireta na detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Leishmania* spp. em soros de cães de Bauru, SP

<i>Leishmania</i> spp.		<i>Neospora caninum</i>	
Título	Número de amostras	Título	Número de amostras
<40	35	<25	86
40	11	25	7
80	5	50	2
160	16	100	3
320	14	200	1
640	15	400	-
1280	3	800	1
2560	1	1600	-

N+100

Andreotti et al. (2005), na área urbana de Campo Grande, MS, encontraram soroprevalência de 29% para *Leishmania* spp. e 27,2% para *N. caninum*, indicando que ambas as infecções são comuns nos cães da região, embora a infecção por *Leishmania* spp. não tenha aumentado significativamente a susceptibilidade para a infecção simultânea por *N. caninum*.

Os cães representam papel importante no ciclo epidemiológico de ambas as doenças. Em áreas não endêmicas, é importante manter a vigilância sorológica dos cães e entomológica dos vetores, para detectar precocemente alterações epidemiológicas locais. Savani et al. (2005)

relataram coinfeção por *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* e *Trypanosoma* (*Trypanozoon*) *evansi* em um cão, fato que desperta o interesse para as reações cruzadas, que geram resultados sorológicos não confiáveis, o que reforça a hipótese de que a imunossupressão na leishmaniose pode predispor o animal a outras infecções. Independente de não se ter encontrado associação entre as duas enfermidades, elas devem ser consideradas como importantes do ponto de vista de saúde animal e de saúde pública.

Palavras-chave: cão, *Neospora caninum*, *Leishmania* spp., anticorpo

ABSTRACT

The survey analyzed 100 samples of serum collected from dogs at the Center for Zoonoses Control of Bauru, randomly chosen. In the study, 65% of the samples were positive for leishmaniasis and 14% for neosporosis. The association between the presence of antibodies by the reaction of indirect immunofluorescent antibody test (IFAT) in the detection of anti-*Leishmania* and anti-*Neospora* antibodies was examined by the Fischer Exact Test ($P=0.41$), indicating no association between the results for *Leishmania* sp. and *Neospora caninum* ($\alpha=0.05$). The absolute frequencies of the IFAT in the detection of antibodies anti-*Leishmania* and anti-*Neospora caninum* were analyzed using the Spearman correlation coefficient for *Leishmania* and *N. caninum* titers, $r=0.0975$ and $P=0.33$, which did not indicate significant correlation between the titers for both pathogens.

Keywords: dog, *Neospora caninum*, *Leishmania* spp., antibodies

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREOTTI, R.; OLIVEIRA, J.M.; SILVA, E.A. et al. Occurrence of *Neospora caninum* in dogs and its correlation with visceral leishmaniasis in the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.135, p.375-379, 2005.
- BJERKAS, I.; JENKINS, M.C.; DUBEY, J.P. Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis

of neosporosis. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, v.16, p.214-221, 1994.

CAMARGO, M.E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev. Int. Med. Trop. São Paulo*, v.8, p.227-234, 1966.

CRINGOLI, G.; RINALDI, L.; CAPUANO, F. et al. Serological survey of *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* co-infection in dogs. *Vet. Parasitol.*, v.106, p.307-313, 2002.

DITTRICH, R.L. *Diagnóstico sorológico, isolamento, cultivo e caracterização molecular de Neospora caninum em bovinos leiteiros e equinos no estado do Paraná, Brasil*. 2002. 184f. Tese (Doutorado) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

DUBEY, J.P.; HATTEL, A.L.; LINDSAY, D.S. et al. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.193, p.1259-1263, 1988.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution, In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Eds). *The leishmaniases in biology and medicine*. Londres: Academic, 1987. v.1, p.1-120.

TARANTINO, C.; ROSSI, G.; KRAMER, L.H. et al. *Leishmania infantum* and *Neospora caninum*: simultaneous skin infection in a young dog in Italy. *Vet. Parasitol.*, v.102, p.77-83, 2001.

TRIOLA, M.F. *Introdução à estatística*. 9.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. 682p.

SAVANI, E.S.M.M.; NUNES, V.L.; GALATI, E.A.B. et al. Occurrence of coinfection by *Leishmania (Leishmania) chagasi* and *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* in a dog in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.100, p.730-741, 2005.