

NEOSPORA CANINUM: DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA EM FETOS DE BOVINOS SUBMETIDOS AO ABATE

FERNANDES, Paula Rogério¹; OLIVEIRA, Vanessa Silvestre Ferreira¹; MELO, Débora Pereira Garcia¹; GUIMARÃES, Marcelo Sales¹; BOAVENTURA, Cybelli Moreno¹; SILVA, Andréa Caetano¹; OLIVEIRA, Gabriela Almeida¹

1 Universidade Federal de Goiás – UFG
e-mail doutoranda: paularogério@hotmail.com
e-mail orientador: andrea@iptsp.ufg.br

Palavras-chave: *Neospora caninum*, bovinos, transmissão vertical, frigoríficos.

Introdução:

A neosporose bovina é uma enfermidade parasitária causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Neospora caninum*, pertencente ao filo Apicomplexa, família Sarcocystidae, formador de cistos, descrito e caracterizado pela primeira vez em cães nos EUA, sendo considerada, atualmente, uma enfermidade de distribuição cosmopolita e umas das causas mais freqüentes de falhas reprodutivas no mundo (DUBEY et al., 1988). No ciclo biológico de *N. caninum* o hospedeiro definitivo é o cão, tendo sido identificados como hospedeiros intermediários os bovinos, ovinos, caprinos, cervídeos, eqüinos, bubalinos, felinos e outros (MCALLISTER et al., 1998).

Na medicina veterinária o interesse por este protozoário vem crescendo a partir do momento que Thilsted & Dubey, em 1989, identificaram pela primeira vez o *N. caninum* como agente etiológico de aborto bovino, confirmando que a infecção por este protozoário era a primeira causa de aborto no gado leiteiro da Califórnia (ANDERSON et al., 1991; BARR et al., 1991). Além do aborto e nascimento de bezerros com sitomatologia neuro-muscular ou clinicamente sadios, porém cronicamente infectados, causa também morte embrionária e reabsorção, redução na produção de leite, menor taxa de crescimento dos animais jovens e danos indiretos (gastos com assistência especializada, diagnóstico e reposição de vacas que abortaram) (DUBEY & LINDSAY, 1996; THURMOND & HIETALA, 1997; MCALLISTER et al., 1998; HADDAD et al., 2005).

A presença de cães soropositivos para *N. caninum* em fazendas foi correlacionada com a alta soroprevalência do parasito no rebanho bovino, dessa forma o cão parece ter um importante papel epidemiológico na rota da transmissão horizontal da infecção em rebanhos bovinos (DUBEY, 1999a; WOUDA et al., 1999), o que foi recentemente comprovado no México por Sánchez et al (2003). Entretanto, estudos epidemiológicos realizados até o momento indicam que a infecção pós-natal tem menor importância, ocorrendo em níveis inferiores aos verificados para a via transplacentária, que varia entre 50 e 95%, sendo considerada o principal modo de transmissão em bovinos, responsável pela propagação e manutenção da infecção nos rebanhos (SCHARES et al., 1998; HALL et al., 2005).

Pelas características da enfermidade, o diagnóstico da neosporose bovina é dificultado pela inexistência de sinal clínico patognomônico e pelo baixo número de parasitos nos fetos abortados, sendo confirmado pela utilização de mais de uma técnica de diagnóstico (JENKINS et al., 2002). Dentre elas, a técnica de referência para o diagnóstico em fetos abortados é o exame histológico dos tecidos fetais (DUBEY, 2003). Na impossibilidade de envio do feto inteiro, as amostras a serem remetidas seriam cérebro, coração, fígado e placenta, uma vez que são estes os

órgãos afetados por freqüência de aparecimento (DE MEERSCHAM et al., 2002). A imunoistoquímica (IHQ) é uma técnica relativamente pouco sensível para detectar o parasito em tecidos do hospedeiro devido ao baixo número de parasitos, e algumas vezes, à baixa qualidade do tecido fetal, que pode estar autolisado, mumificado ou macerado (BASZLER et al., 1999; DUBEY, 1999b).

Ultimamente, uma das técnicas mais utilizadas no diagnóstico de aborto em bovinos, bem como em estudos epidemiológicos e filogenéticos é a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do DNA genômico do parasito no tecidos fetais, devido à sua rapidez e facilidade de execução, além da tolerância com relação à qualidade da amostra enviada (BASZLER et al., 1999; SCHOCK et al., 2000; COLLANTES-FERNANDEZ et al., 2002).

Para a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* no soro ou nos fluidos fetais têm sido utilizadas as técnicas sorológicas, principalmente a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) como prova de referência, mas também o ensaio imunoenzimático (ELISA), que apresentam uma elevada sensibilidade e especificidade, logo, um resultado sorológico positivo identifica um animal adulto infectado, mas um resultado negativo não descarta por completo a infecção porque os anticorpos séricos anti-*N. caninum* podem flutuar com a idade e o estado de gestação (PEREIRA-BUENO et al., 2003).

Quanto à filogenia, a diversidade biológica entre isolados regionais tem sido provada em estudos *in vivo* e *in vitro*. A análise de seqüências por microssatélite tem sido uma ferramenta útil para a análise do código genético de parasitos do Reino Apicomplexa, dentre eles, o parasito *N. caninum*, permitindo estudos de caracterização genética e epidemiologia molecular. No entanto, pouco se sabe sobre a diversidade genética deste parasito no Brasil.

Uma vez constatada a presença da enfermidade numa região, as estratégias de controle devem ser elaboradas com base no conhecimento sobre a real situação epidemiológica da enfermidade e, para tanto, seria necessária a disponibilização de resultados que esclareçam sobre a variabilidade de isolados no Estado de Goiás.

O abortamento é uma das maiores perdas econômicas na indústria pecuária e a neosporose bovina deve ser valorizada no diagnóstico diferencial das causas responsáveis pela mortalidade embrionária e aborto de origem infecciosa, sendo pesquisada junto aos agentes de origem viral, bacteriana e parasitária. Diante do exposto justifica-se o desenvolvimento deste projeto que visa o aprofundamento de estudos sobre a transmissão vertical de *N. caninum*, a patogenia da infecção natural, investigando a carga parasitária e o quadro lesional em fetos de bovinos destinados ao abate. Pretende-se ainda verificar a variabilidade de isolados existentes na região de Goiás, permitindo maior conhecimento, a partir de fetos de bovinos obtidos em frigoríficos, do tropismo do parasito após infecção transplacentária e a virulência dos isolados aqui existentes.

Material e Métodos:

Para a verificação da ocorrência de transmissão vertical de *N. caninum* foram realizadas visitas semanais ao frigorífico para obtenção de fetos e líquidos fetais a partir de vacas abatidas prenhes provenientes do Estado de Goiás por um período de cinco meses (abril a agosto de 2006). O experimento está sendo realizado no Centro de Parasitologia Veterinária do Departamento de Medicina Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (UFG) em um convênio

com a *Universidad Complutense de Madrid*, sob apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Os fetos foram submetidos à necropsia sendo avaliado previamente, o estado geral de cada feto (fresco, mumificado ou autolisado), a presença de lesões macroscópicas e a determinação da idade fetal calculada de acordo com a seguinte fórmula: idade fetal = raiz quadrada de $(2 \times (\text{distância entre a região occipital e a base da cauda} \div 2,54))$, adaptada de Noakes (1986) (COLLANTES-FERNANDÉZ, 2003). Deles foi colhido, para sorologia, o líquido fetal da cavidade abdominal utilizando seringa estéril. As amostras de órgãos (fígado, baço, rins, diafragma, pulmão, coração e cérebro) foram condicionadas em sacos plásticos devidamente identificados e armazenados a -20°C para análise por PCR. A extração de DNA e aplicação da técnica de *nested*-PCR, de acordo com Garcia (2005), foi realizada nos cérebros fetais, cujos resultados positivos foram utilizados, neste trabalho, como critério para a análise do fígado e coração destes respectivos fetos pela mesma técnica.

Para a análise por histologia e imunoistoquímica, a fim de identificar e definir as lesões mais características e a seleção de órgãos mais adequados para este diagnóstico de aborto, foram tomadas partes de cada órgão, fixados em formol a 10%, devidamente acondicionados em recipientes identificados e armazenados à temperatura ambiente. A seleção de órgãos a serem emblocados em parafina se deu a partir do resultado positivo ao PCR do respectivo cérebro. A técnica histológica com coloração hematoxilina e eosina a partir destes blocos será realizada no Laboratório da *Universidad Complutense de Madrid*. Onde também os cortes que apresentarem lesões sugestivas de infecção por *N. caninum* na avaliação histológica, serão submetidos ao exame de imunoistoquímica como descrito por Collantes-Fernandez (2003).

Com os líquidos placentários obtidos, será realizada uma prova de triagem - a técnica de ensaio imunoenzimático indireto (ELISA indireto) para a detecção de anticorpos específicos desenvolvidos frente à *N. caninum* nos animais com idade fetal superior a quatro meses. Para a titulação das amostras positivas será utilizada a reação de imunofluorescência indireta (IFI) de acordo com Álvarez-Garcia et al. (2002). O antígeno será preparado através da multiplicação de taquizoítos de *N. caninum* (amostra Nc-1) em cultivos de célula MARC 145 (provenientes de rins de macaco).

Os DNAs genômicos dos cérebros positivos serão levados para a *Universidad Complutense de Madrid* para caracterização genética através da utilização de microssatélites, com fins de estudo da complexidade genética do *N. caninum* e da epidemiologia molecular da enfermidade (CERRILLO, 2005).

Resultados Parciais:

Até o momento, foi realizada somente a técnica de PCR com os DNAs genômicos extraídos de cérebros fetais.

Do total de 195 cérebros, 21 apresentaram-se positivos à reação de *nested*-PCR, demonstrando uma ocorrência em torno de 10,77%, concordando com os dados soroepidemiológicos de Garcia (2005) que obteve uma prevalência variando entre 10,3% e 89,7%, tanto em rebanhos de leite como de corte das microrregiões de Goiânia e Anápolis, apresentando um feto positivo aos nove meses (4,76 %), outro aos oito meses (4,76 %), nove fetos positivos de sete meses (42,86 %), seis

de seis meses (28,57 %), três de cinco meses (14,28 %) e um de quatro meses (4,76 %).

Conclusões:

Até o momento, os resultados parciais obtidos ainda não permitem conclusões que atendam os objetivos propostos.

Referências Bibliográficas:

1. ÁLVAREZ-GARCIA, G.; PEREIRA-BUENO, J.; GÓMES-BAUTISTA, M.; ORTEGA-MORA, L.M. Pattern of recognition of *Neospora caninum* tachyzoite antigens by naturally infected pregnant cattle and aborted fetuses. **Veterinary Parasitology**, v. 107, p. 15-27, 2002.
2. ANDERSON, M. L.; BLANCHARD, P. C.; BARR, B. C.; DUBEY, J. P.; HOFFMAN, R. L.; CONRAD, P. A. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 198, n. 2, p. 241-244, jan. 1991.
3. BARR, B. C.; ANDERSON, M. L.; DUBEY, J. P.; CONRAD, P. A. *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. **Veterinary Pathology**, v. 28, n.2, p. 110-116, mar. 1991.
4. BASZLER, T. V.; LAWRENCE, J. C.; MAUREENT, T. L.; MATHISON, B. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 12, p. 4059-4064, dez. 1999.
5. CERRILLO, J. R.; DÍAZ, S. P.; BAUTISTA, M. G.; ORTEGA-MORA, L. M. Multilocus microsatellite analysis reveals extensive genetic diversity in *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**, 2005. (In Press.)
6. COLLANTES FERNÁNDEZ, E.; ZABALLOS, A.; ÁLVAREZ-GARCIA, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1194-1198, abr. 2002.
7. COLLANTES-FERNÁNDEZ, E. **Patogenia de la neosporosis en el feto bovino y en un modelo murino experimental**. 2003. 277 f. Tese (Doutorado) – Departamanto de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2003.
8. DE MEERSCHMAN, F.; RETTIGNER, C.; FOCANT, C.; BOREUX, R.; PINSET, C.; LECLIPTEUX, T.; LOSSON, B. Use of a serum-free medium to produce in vitro *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* tachyzoites on Vero cells. **Veterinary Research**, Paris, v. 33, n. 2, p. 159-168, mar.-abr. 2002.
9. DUBEY, J. P.; HATTEL, A. L.; LINDSAY, D. S.; TOPPER, M. J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 193, n. 10, p. 1259-1263, nov. 1988.
10. DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 67, n. 1-2, p. 1-59, dez. 1996.
11. DUBEY, J. P. Neosporosis in cattle, biology and economic impact. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 214, n. 8, p. 1160-1163, abr. 1999a.

12. DUBEY, J. P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 84, n. 3-4, p. 349-367, ago. 1999b.
13. DUBEY, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 41, n. 1, p. 1-16, mar. 2003.
14. GARCIA, D. P. **Neosporose bovina: prevalência, transmissão e diagnóstico em fetos abortados, nas microrregiões de Anápolis e Goiânia-Goiás**. 2005. 39 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2005.
15. HADDAD, J. P.; DOHOO, I. R.; VANLEEWEN, J. A. A review of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle – a Canadian perspective. **Canadian Veterinary Journal**, v. 46, p. 230-243, mar. 2005.
16. HALL, C. A.; REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. *Neospora* abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. **Veterinary Parasitology**, Australia, v. 128, n. 3-4, p. 231-241, mar. 2005.
17. JENKINS, M.; BASZLER, T.; BJÖRKMAN, C.; SCHARES, G.; WILLIAMS, D. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 5, p. 631-636, maio 2002.
18. 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, Australia**, v. 28, n. 9, p. 1473-1478, set. 1998.
19. PEREIRA-BUENO, J.; QUINTANILLA-GONZALO, A.; PÉREZ-PÉREZ, V.; ESPI-FELGUEROSO, A.; ÁLVAREZ-GARCIA, G.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; ORTEGA-MORA, L.M. Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 111, n. 2-3, p. 143-152, fev. 2003.
20. SANCHEZ, G. F.; MORALES, S. E.; MARTINEZ, M. J.; TRIGO, J. F. Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Canadá, v. 67, n. 2, p. 142-145, maio 2003.
21. SCHARES, G.; PETERS, M.; WURM, R.; BÄRWALD, A.; CONRATHS, F. J. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analyzed by serological techniques. **Veterinary Parasitology**, v. 80, n. 2, p. 87-98, dez. 1998.
22. SCHOCK, A.; BUXTON, D.; SPENCE, J.A.; LOW, J.C.; BAIRD, A. Histopathological survey of aborted bovine fetuses in Scotland with special reference to *Neospora caninum*. **Veterinary Record**, v. 147, n. 24, p. 687-688, dez. 2000.
23. THILSTED, J. P.; J. P. DUBEY. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 1, n. 3, p. 205-209, jul. 1989.
24. THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. **American Journal Veterinary Research**, v. 58, n. 12, p. 1381-1385, dez. 1997.
25. WOUDA, W.; DIJKSTRA, T. H.; KRAMER, A. M. H.; MAANEN, C.; BRINKHOF, J. M. A. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1677-1682, out. 1999.

* Apoio financeiro da CAPES e FINEP.