



UTILIZAÇÃO DE PCR NA IDENTIFICAÇÃO DE *NEOSPORA CANINUM* EM BOVINOS DA FRONTEIRA OESTE DO RIO GRANDE DO SUL

Raíssa Gasparetto, discente de graduação, Universidade Federal do Pampa,
Campus Uruguaiana

José Conrado dos Santos Jardim, discente Programa de Pós Graduação em Ciência
Animal PPGCA, Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana

Mário Celso Sperotto Brum, docente, Universidade Federal do Pampa

Paula Fonseca Finger, docente, Universidade Federal do Pampa

raissagasparetto.aluno@unipampa.edu.br

Neospora caninum é um protozoário responsável pela doença infecciosa denominada neosporose, na qual os bovinos são os principais hospedeiros intermediários e os cães os hospedeiros definitivos. Em bovinos, essa enfermidade leva a perdas reprodutivas gerando um impacto econômico negativo sobre a cadeia pecuária de produção, principalmente na região da fronteira oeste, onde essa atividade tem grande relevância. Os bovinos infectam-se a partir da ingestão de água ou alimentos contaminados com os oocistos do protozoário eliminados pelos cães e, ainda, pode ocorrer a transmissão vertical, sendo considerada a mais importante, pois mantém a infecção na propriedade. Sabendo-se desse panorama, o diagnóstico da neosporose se torna indispensável para o controle da disseminação da infecção. A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) vem sendo uma alternativa no correto diagnóstico dos animais infectados. O presente trabalho objetivou, então, padronizar uma técnica de PCR para posterior utilização no diagnóstico de *Neospora caninum* em bovinos da fronteira oeste do Rio Grande do Sul. Primeiramente, para a padronização, foram sintetizados os *primers* a partir de referências de artigos científicos. Optou-se por utilizar duas regiões do protozoário como alvo de amplificação, a região Nc5 e ITS1. Para a região Nc5, duas reações de PCR foram padronizadas, a partir dos oligonucleotídeos Np4-F (5'-CCTCCCAATGCGAACGAAA-3') e Np7-R (5'-CCTCCCAATGCGAACGAAA-3') para a primeira reação, além dos *primers* Np21plus-F (5'-CCCAGTGCGTCCAATCTGTAAC-3') e Np6plus-R (5'-CTCGCCAGTCAACCTACGTCTTCT-3') para a segunda reação. Para a região ITS1, utilizou-se a técnica de Nested-PCR, obtendo-se os *primers* NN1-F (5'-TCAACCTTTGAATCCCAA-3'), NN2-R (5'-CGAGCCAAGACATCCATT-3') para o primeiro *round* e NP1-F (5'-TACTACTCCCTGTGAGTTG-3') e NP2-R (5'-TCTCTTCCCTCAAACGCT-3') para o segundo *round* da reação. Após obtenção dos iniciadores, os mesmos foram suspensos em água ultra pura e fracionados para posterior uso nas reações. Como controle positivo para a padronização de todas as reações foi utilizado o DNA do protozoário contendo 200 ng/ul de DNA total. Todas as reações de PCR foram feitas em fluxo laminar estéril e os materiais utilizados livres de DNA e RNA. Para a primeira reação da região Nc5 as condições da reação foram, para um volume de 25 µL, 1X de Buffer 10X, 200 µM de dNTP, 2 mM de MgCl, 10 pmol de cada *primer* (Np4-F e Np7-R), 2 U de Taq DNA Polimerase e 150 ng de DNA. Para a segunda reação, da região Nc5, com os *primers* Np21plus-F e Np6plus-R utilizou-se 1X de Buffer 10X, 200 µM de dNTP, 1,5 mM de MgCl, 20 pmol de cada *primer*, 1,25 U de Taq DNA polimerase e 150 ng de DNA. A terceira reação, foi a PCR Nested para amplificar a região ITS1, com os *primers* NN1-F e NN2-R em uma reação de 25 µL sob as condições de 1X de Buffer 10X, 200 µM de dNTP, 1,5 mM de MgCl, 15 pmol de cada *primer*, 1U de Taq DNA Polimerase e 150 ng de DNA para o primeiro *round*. O segundo *round* utilizou os *primers* NP1-F e NP2-R, mas mesmas condições da reação 1, porém com 20 pmol de cada *primer*. Ao final da preparação, as reações foram colocadas em termociclador com temperatura e tempo de acordo com referências consultadas. Após, para verificação das amplificações, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1,5%. Como resultado da visualização do gel, todas as reações mostraram um

Raíssa Gasparetto;
José Conrado dos Santos Jardim;
Mário Celso Sperotto Brum;
Paula Fonseca Finger

amplicon com tamanho esperado e as amostras foram preparadas para o sequenciamento. Após o resultado do sequenciamento enviado pela empresa ACTGene (Alvorada-RS), as sequências foram analisadas através do BLASTn (NCBI) para verificar a identidade gênica. Através dos resultados da eletroforese, a primeira reação apresentou um produto de 275 pb, a segunda reação um produto de 337 pb e a terceira 213 pb, sendo todos do tamanho esperado e corroborando com as referências consultadas. Além disso, a confirmação das sequências por BLASTn demonstrou identidade com o genoma do parasito. A partir desses resultados, podemos determinar que esses dois alvos podem ser utilizados para o diagnóstico de neosporose bovina por PCR. Atualmente, a técnica mais utilizada como diagnóstico é a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) que se baseia na pesquisa de anticorpos contra o *Neospora caninum*, porém não confirma a presença do protozoário naquele momento. Por outro lado, a técnica de PCR amplifica um segmento do DNA do protozoário a partir de amostras de tecidos do feto abortado e placenta, sendo capaz de identificar a presença do antígeno, confirmando a enfermidade no momento do diagnóstico. Dessa forma, a PCR apresenta-se como uma técnica de alta especificidade e sensibilidade, tornando-se uma excelente alternativa para diagnóstico da neosporose. Por fim, a padronização da técnica ocorreu de forma satisfatória, podendo ser utilizada como ferramenta diagnóstica e, também, como controle e prevenção de *Neospora caninum* em rebanhos bovinos na fronteira oeste do RS.

Agradecimentos: Agradeço à instituição de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e à Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA)

Palavras-chave: Diagnóstico; Neosporose; Molecular;