

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CASOS SUSPEITOS DE NEOSPOROSE EM BOVINOS E OVINOS DA FRONTEIRA OESTE DO RIO GRANDE DO SUL

Isabella Grazini Capelin Ramos Rodrigues, discente de graduação, Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiiana

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

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

Mário Celso Sperotto Brum, docente, Universidade Federal do Pampa

Paula Fonseca Finger, docente, Universidade Federal do Pampa

isabellarodrigues.aluno@unipampa.edu.br

A Neosporose é uma doença causada pelo protozoário *Neospora caninum*, o qual possui como hospedeiro definitivo os caninos e intermediário os bovinos. A infecção em caninos, é subclínica, podendo passar despercebida. Já a infecção em bovinos e ovinos possui grande importância, principalmente pelas perdas reprodutivas causadas pela presença do protozoário. A infecção nesses animais ocorre por meio da ingestão de pasto ou água contaminados pelos oocistos liberados nas fezes dos caninos, que irão se infectar ao se alimentarem, geralmente, das vísceras de abortos ou natimortos. Grande preocupação se dá pela infecção vertical de bovinos, em que o protozoário irá se disseminar e se perpetuar dentro do rebanho, por meio da infecção transplacentária. Um estudo sorológico realizado no Rio Grande do Sul, estado caracterizado pela criação extensiva e consorciada de bovinos e ovinos onde cães são utilizados no manejo desses animais, demonstrou a presença de anticorpos em 11,4 % bovinos 3,2 % em ovinos. Uma alternativa ao diagnóstico sorológico do protozoário nos rebanhos é a utilização de técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), técnica capaz de identificar o material genético do agente em amostras de tecido e sangue. Desta forma, o objetivo do trabalho foi realizar o diagnóstico molecular de suspeitas de neosporose em amostras oriundas de abortos e natimortos. Durante os meses de junho a agosto de 2022, três casos suspeitos foram encaminhados para diagnóstico, sendo elas: um feto bovino abortado, um bezerro que veio a óbito após trinta dias de vida e um ovino natimorto, todos da região de Uruguaiiana, RS. Todas as amostras foram armazenadas e processadas no Laboratório de Virologia da Unipampa, Campus Uruguaiiana. Para a realização do teste, foram coletados fragmentos de pulmão, baço, fígado, coração e cerebelo, órgãos considerados de eleição para identificação do protozoário. A extração do material genético foi realizada pela técnica de fenol-clorofórmio. O DNA total foi utilizado como *template* em uma concentração aproximada de 500 ng/μl. Para o preparo do mix de PCR foram utilizados: água ultra pura, *Buffer* 10x, *primers* NpF4 - F e NpF7 - R na concentração de 0,5 μM, 200 μM de dNTPs e 1,25 U da TAQ DNA polimerase. Essas concentrações seguiram o protocolo já padronizado para o fragmento do gene Nc5 do protozoário, que resulta em um amplicon de 275 pb. Controles positivos e negativos foram utilizados em todas as reações. A amplificação foi realizada em termociclador, com um total de 40 ciclos, seguindo as condições de desnaturação

a 95 °C por 45 segundos, seguida do anelamento dos *primers* a 62 °C por 1 minuto e a extensão a 72 °C por 1 minuto. Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 1,5% corados com *syber green* e o resultado revelado em transiluminador de luz ultravioleta. Como resultado das amostras testadas, nenhuma delas foi positiva para a presença do gene correspondente ao protozoário *Neospora caninum*. Como validação do teste, foi confirmada a presença de banda esperada no controle positivo e ausência no controle negativo. Apesar dos relevantes indícios sorológicos de neosporose na região da fronteira oeste do Rio Grande do Sul, casos de aborto, natimortos ou falecimento prematuro podem não estar relacionados com a doença, mas a outras patologias que cursam com problemas reprodutivos. Devem ser consideradas pelo proprietário, junto a um médico veterinário, doenças causadas por outros protozoários, como a Tricomonose, doenças de etiologia viral, como por exemplo o vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) e Alphaherpesvirus Bovino Tipo 1 (BoHV-1), bem como as bacterianas, Campilobacteriose e Leptospirose. Ainda, pode ser considerado que o número de amostras enviadas ao laboratório foi pequeno em razão do sistema extensivo de criação em que, muitas vezes, o produtor ou o médico veterinário responsável não identifica o feto abortado a tempo de realizar a coleta de material para diagnóstico. Como existem diversas as possibilidades de causas de problemas reprodutivos em bovinos e ovinos, o diagnóstico negativo é um facilitador para o produtor investigar outras causas possíveis para as perdas produtivas de seu rebanho. Dessa forma, pode-se concluir que, mesmo com estes resultados, os cuidados para evitar a disseminação e perpetuação do *Neospora caninum* não devem ser flexibilizados, para que não ocorra uma perda produtiva em massa. Uma vez que é controlada a disseminação do parasito nestes ruminantes, é possível, de forma indireta, impedir a infecção nos cães.

Agradecimentos: Agradeço à Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA)

Palavras-chave: PCR; *Neospora caninum*; aborto;