

ANÁLISE MOLECULAR DE PROTOZOÁRIOS EM MAMÍFEROS SILVESTRES NO SUL DO RIO GRANDE DO SUL

SIMONE SCHEER¹; MÁRCIA PEGORARO DE MACEDO²; TATIELE DE AGUIAR
LOPES SOARES²; GERTRUD MULLER³

¹Universidade Federal de Pelotas – sissi_sls@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – tatielelopes@hotmail.com; mrpmbio@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – gertrud.muller40@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O filo Apicomplexa é dividido em quatro grupos principais: Coccidia, Gregarinasina (gregarinas), Haemospororida (haemosporídios) e o Piroplasmorida (piroplasmídios) (ADL et al., 2012). São caracterizados por apresentarem um complexo apical na extremidade anterior do corpo, responsável pela fixação e penetração na célula hospedeira (ADL et al., 2012). Piroplasmorida compreende dois gêneros importantes, *Babesia* e *Theileria*, com ampla distribuição geográfica, responsáveis por doenças que podem acometer animais domésticos e silvestres e também causar inúmeras perdas econômicas (CONRAD et al., 2006; GRAY e WEISS, 2008). *Neospora caninum* protozoário é o agente etiológico da neosporose, uma doença infecciosa devastadora considerada uma das principais causas de perda reprodutiva em bovinos e doença neuromuscular em cães de todo o mundo (DONAHOE et al., 2015). Roedores e pequenos mamíferos são considerados possíveis fontes de infecção de *N. caninum* em cães e coiotes. (MCALLISTER, 2016). Portanto a fauna silvestre corresponde a um grupo importante na atuação como reservatórios e hospedeiros intermediários para vários grupos de protozoários e outros parasitos causadores de doenças (ANDRÉ, 2011). O objetivo desse estudo foi investigar a presença de *Neospora*, *Babesia* e *Theileria* em mamíferos silvestres no sul do Rio Grande do Sul.

2. METODOLOGIA

Foram coletados 14 mamíferos silvestres (10 *Cavia aperea*, e 4 *Galictis cuja*) atropelados em rodovias do Rio Grande do Sul de acordo com licença concedida pelo ICMBio/SISBIO (nº 38913-5 e CEEA nº 8876) oriundos dos municípios de Capão do Leão, Pelotas e Arroio Grande. Após foram levados ao Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres (LAPASIL) da Universidade Federal de Pelotas para a coleta de tecidos, que foi realizada durante a necropsia dos animais.

Para extração de DNA foi utilizado o baço dos mamíferos. A extração foi realizada com o kit Invisorb® Spin Tissue, seguindo as instruções do fabricante. O DNA foi quantificado e teve sua pureza conhecida através de espectrofotometria. Para controle de qualidade da extração de DNA, foram utilizadas cepas de linhagens conhecidas como controles positivos, e amostras com água e reagentes como controles negativos.

Para o diagnóstico por PCR de *Neospora caninum* utilizou-se os primers NSP6PLUS (5'-CTGGCCAGTCAACCTACGTCTTCT-3') e NSP21PLUS (5'-CCCAGTGCGTCCAATCCTGTAA-3') (Romano et al., 2009), da região 18S do

DNA. As condições de amplificação consistiram de um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 1min, 63°C por 1min, 72°C por 1min, e uma extensão final a 72°C por 5min, seguido por um resfriamento a 4°C.

O diagnóstico de *Babesia* spp. e *Theileria* spp. foi realizada seminested PCR. Na primeira reação foram utilizados os primers RLB-F2 (5'-GACACAGGGAGGTAGTGACAAG-3') e RLB-R2 (5'-CTAAGAATTTACCTCTGACAGT-3') (GUBBELS et al., 1999). A amplificação incluiu uma etapa de desnaturação de 5 min a 95°C seguida por 25 repetições de 30s a 95°C, 45 s a 50°C e 1,5 min a 72°C e uma extensão final a 72°C por 10 min. Para a segunda reação de PCR foi utilizado 1µl do produto de PCR da primeira reação e o primer interno RLB-FINT (5'-GACAAGAAATAACAATACRGGGC-3') juntamente com RLB-R2. A mistura de reação foi realizada em um volume final de 25µl, usando Promega PCRMaster Mix (Promega Corporation, WI, EUA), 20 pM de cada primer e 100 ng de DNA. Os programas de ciclagem foram idênticos à amplificação direta de RLB-F2 / RLB-R2, mas o número de ciclos aumentou para 40, enquanto a temperatura de anelamento foi de 50°C e 55°C na primeira e na segunda PCR, respectivamente. Uma amostra de controle positivo e negativo foram incluídas na reação.

Os produtos de amplificação foram analisados por electroforese em gel de agarose (2%) por coloração Blue Green Loading Dye I (LGC Bio), em solução de TBE 0,5X (Tris-base 0,4M; ácido bórico 0,20M, solução de EDTA 0,5M, pH 8,0), após visualizados no transiluminador.

Os amplicons positivos foram purificados com o kit Products Purification Mebep Bioscience e submetidas a sequenciamento no Laboratório de Genômica do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas. As sequências resultantes foram comparadas com o banco de dados do Genbank usando a ferramenta BLAST (Local Alignment Search Tool), e o software Clustal X (<http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo>) foi usado para a construção de alinhamentos de múltiplas sequências.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neospora caninum, apresentou 100% de identidade com as sequências (GU300774.1; KX683873.1; KF649848.1; MG973172.1) obtidas através de pesquisa por BLAST. E com *Babesia microti* 93,26% com similaridades as sequências (AB242176.1; AB190287.1) em *C. aperea*. No Brasil, Yai et al. (2008) verificaram a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em *Hydrochoerus hydrochaeris* (Caviidae: Rodentia) (n= 213 soros) de 11 localidades do estado de São Paulo, pela RIFI, com anticorpos em 20 (9,4%) dos roedores. Truppel et al. (2010) relataram no estado do Pará, através da amplificação molecular da região Nc5 ou ITS1, 23% (6/26) de positividade para DNA de *N. caninum*, o protozoário foi encontrado nos gânglios linfáticos, coração, fígado e sangue. Apesar deste estudo relatar *N. caninum* em outro hospedeiro e em outros tecidos, pode-se observar semelhanças quanto aos dados de ocorrência do protozoário (Tabela 1). Em um estudo realizado no Japão, com 247 roedores (162 *Apodemus speciosus*: Muridae, 63 *Apodemus argenteus*, *Eothenomys andersoni*: Cricetidae, 11, 3 *Eothenomys smithii*, 4 *Microtus montebelli*: Cricetidae, 3 *Clethrionomys rufocanus*: Cricetidae e 1 *Urotrichus talpoides*: Talpidae), Saito-Ito et al. (2007) relataram *Babesia microti* em 36 roedores (24 *A. speciosus*, 7 *A. argenteus* e 5 *E. andersoni*) por detecção de PCR, e 27 destes 36 foram confirmados como

positivos para esfregaços de sangue. O relato apresenta 93,26% de identidade com sequências deste estudo.

Theileria equi foi encontrada com 100% de identidade com as sequências (MG052902.1; MF510479.1; KY952226.1; KX722520.1; KY464024.1; KX227629.1; KX227623.1) em *G. cuja*. No Brasil, através de estudos moleculares, Braga et al. (2017) registraram *T. equi* em burros, cavalos e mulas da Ilha de São Luís, estado do Maranhão com 2/10 (20%), 15/39 (38.5%), 13/90 (14.4%), respectivamente. Apesar de referirem-se a um grupo de hospedeiros distintos ao do presente estudo, pode-se observar semelhanças quanto aos dados de prevalência obtidos.

Tabela 1- Prevalência de *Neospora*, *Babesia* e *Theileria* em mamíferos silvestres do Sul do Rio Grande do Sul.

Hospedeiros	Nº de hospedeiros positivos			Prevalência
	Protozoários			
	<i>Neospora</i>	<i>Babesia</i>	<i>Theileria equi</i>	
<i>Cavia aperea</i> Erleben, 1777	1	1	Negativos	20%
<i>Galictis cuja</i> (Molina, 1782)	Negativos	Negativos	1	25%

4. CONCLUSÕES

É importante ressaltar que este é o primeiro relato de *Neospora caninum* e *Babesia microti* em *C. Aperea*, e *Theileria equi* em *G.cuja* através de análises moleculares de tecidos no Brasil. Estudos moleculares atuam auxiliando na identificando de potenciais reservatórios e vetores causadores de enfermidades.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADL, S.M.; SIMPSON, A.G.; LANE, C.E.; LUKEŠ, J.; BASS, D.; BOWSER, S.S. The revised classification of eukaryotes. **Journal Eukaryot. Microbiology**, v. 59, p. 429-493, 2012.
- ANDRÉ, M. R.; ADANIA, C. H.; Teixeira, R. H. F.; ALLEGRETTI, S. M.; MACHADO, R. Z. . Molecular and serological detection of *Babesia* spp. in neotropical and exotic carnivores in Brazilian zoos. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 42, n. 1, p. 139-143, 2011.
- BRAGA, M. D. S.C.D.; COSTA, F. N.; GOMES, D.R. M.; XAVIER, D.R.; ANDRÉ, M. R.; GONÇALVES, L. R.; MACHADO, R. Z. Genetic diversity of piroplasmids species in equids from island of São Luís, northeastern Brazil. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 3, p. 331-339, 2017.
- CONRAD, P.A.; KJEMTRUP, A.M.; CARRENO, R.A.; THOFORD, J., WAINWRIGHT, K.; EBERHARD, M.; QUICK, R.; TELFORD III, S.R.; HERWALDT, B.L. Description of *Babesia duncani* n. sp. (Apicomplexa: Babesiidae) from

humans and its differentiation from other piroplasms. **International Journal Parasitology**, v. 36, p. 779–789, 2006.

DONAHOE, S. L.; LINDSAY, S. A.; KROCKENBERGER, M.; PHALEN, D.; ŠLAPETA, J. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, n. 2, p. 216-238, 2015.

GUBBELS, J.M; DE VOS, A.P, VAN DER WEIDE .M; VISERAS .J, SCHOULS L.M, DE VRIES. E, JONGEJAN. F: Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. **Journal Clin Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1782 –1789, 1999.

GRAY, J.S.; WEISS, L.M. *Babesia microti*. In: Khan, N. (Ed.), Emerging Protozoan Pathogens. Taylor and Francis, Abingdon, UK, pp. 303–349, 2008.

MC ALLISTER, M. M. Diagnosis and control of bovine neosporosis. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 32, n. 2, p. 443-463, 2016.

ROMANO, A.; TRISCIUOGGIO, A.; GRANDE, D.; FERROGLIO, E. Comparison of two PCR protocols for the detection of *Neospora caninum* DNA in rodents. **Veterinária Parasitology**, v. 159, p.159–161, 2009.

SAITO-ITO, A.; KASAHARA ,M.; KASAI, M.; DANTRAKOOL, A.; KAWAI, A.; FUJITA, H.; TAKADA, N. Survey of *Babesia microti* Infection in Field Rodents in Japan: Records of the Kobe-Type in New Foci and Findings of a New Type Related to the Otsu-Type. **Microbiol Immunol**, v. 51,n. 1,p.15-24, 2007.

TRUPPEL, J. H.; MONTIANI-FERREIRA, F.; LANGE, R. R.; DE CASTRO, R. G. D. O.; REIFUR, L.; BOERGER, W.; THOMAZ-SOCCOL, V. Detection of *Neospora caninum* DNA in capybaras and phylogenetic analysis. **Parasitology international**, v. 59, n. 3, p. 376-379, 2010.

YAI, L. O., RAGOZO, A. A., CAÑÓN-FRANCO, W. A., DUBEY, J. P., GENNARI, S. M. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from São Paulo State, Brazil. **Journal of parasitology**, v. 94, n. 3, p. 766-767, 2008.