

HAMMONDIA HEYDORNI, NEOSPORA CANINUM E TOXOPLASMA GONDII EM CAPRINOS ABATIDOS NO ESTADO DA BAHIA, BRASIL

SILVA, M.S.A.¹; UZÊDA, R.S.¹; COSTA, K.S.¹; SANTOS, S.L.¹; MACEDO, A.C.C.¹; ABE-SANDES, K.²; GONDIM, L.F.P.^{1*}.

¹ Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária, Departamento de Patologia e Clínicas, Avenida Ademar de Barros, 500, Ondina, Salvador, Bahia, Brasil 40170-110

² Departamento de Ciências da Vida, Universidade do Estado da Bahia – UNEB, Salvador, Bahia, Brasil

Resumo

Hammondia heydorni, *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* são protozoários coccídios que parasitam diferentes espécies animais domésticas e silvestres. Enquanto a infecção por *H. heydorni* parece ser assintomática, *N. caninum* e *T. gondii* podem provocar alterações reprodutivas em ruminantes. *N. caninum* é um importante causador de abortamentos em bovinos, ao passo que *T. gondii* induz a abortamentos em caprinos e ovinos. O presente trabalho teve como objetivo investigar a frequência desses coccídios em caprinos por meio de uma reação de polimerase em cadeia (PCR) *nested* específica para o espaço interno transcrito 1 (ITS1) do DNA ribossômico da subfamília Toxoplasmatinae. Esses resultados foram comparados com a reação de imunofluorescência indireta (IFI) para anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii* em uma tentativa de investigar reações cruzadas entre esses protozoários. Após sequenciamento das amostras positivas, frequências de 3,92% (4/102), 1,96% (2/102) e 7,84% (8/102) foram obtidas para *H. heydorni*, *N. caninum* e *T. gondii*, respectivamente. Embora anticorpos anti-*N. caninum* tenham sido encontrados em 9,8% (10/102) dos animais e anticorpos anti-*T. gondii* em 21,6% (22/102), não houve evidência de reações sorológicas cruzadas com o soro dos animais positivos na PCR para *H. heydorni*. Essa é a primeira confirmação molecular de *H. heydorni* em tecidos de um hospedeiro intermediário naturalmente infectado pelo parasita.

Palavras-chave – *Hammondia heydorni*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, Caprinos, PCR.

Introdução

Caprinos são hospedeiros intermediários de *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni* e *Toxoplasma gondii*. Enquanto *N. caninum* e *T. gondii* podem causar abortos, natimortalidade, doença neurológica congênita e diminuição da produtividade em rebanhos, a infecção por *H. heydorni* parece não estar associada com nenhum sinal clínico nessa espécie animal (Blagburn et al., 1988; Barr et al., 1992; Dubey et al., 1992; Dubey et al., 1996 Figliuolo et al., 2004). Como a caprinocultura representa uma importante fonte de recursos econômicos para o Brasil, especialmente para o estado da Bahia, que

concentra cerca de 40% de todos os caprinos do país (IBGE, 2008), é importante conhecer e monitorar as doenças que ocorrem nesses animais e estabelecer um diagnóstico diferencial eficiente entre esses coccídios.

Estudos epidemiológicos sobre *H. heydorni* são raros, já que não existem testes sorológicos disponíveis para *Hammondia* sp (Mugridge et al., 1999). O uso de técnicas moleculares de diagnóstico parece ser a melhor forma de diferenciação entre *Hammondia* sp e protozoários relacionados (Slapeta et al., 2002a; Slapeta et al., 2002b; Sreekumar et al., 2003; Eleni et al., 2004; Monteiro et al., 2008). Assim, o objetivo desse trabalho foi investigar *H. heydorni*, *N. caninum* e *T. gondii* em tecidos caprinos por meio de uma reação polimerase em cadeia (PCR) *nested* e comparar esses resultados com a reação de imunofluorescência indireta (IFI) para anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii*.

Materiais e Métodos

Amostras de sangue, cérebro, língua e coração foram coletadas de 102 caprinos, imediatamente após o abate, na cidade de Feira de Santana, Bahia, entre Janeiro de 2007 e Fevereiro de 2008.

A reação de imunofluorescência indireta (IFI) foi conduzida para a detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum*, empregando-se como pontos de corte, 1:16 e 1:50, respectivamente. Foram utilizados taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH mantida em camundongos e de *N. caninum* da cepa NC-1 mantida em cultivo de células VERO, além de um anticorpo secundário IgG de caprino conjugado com isotiocianato de fluoresceína (Sigma, St. Louis, MO, USA). Todas as reações positivas foram testadas até a máxima diluição possível.

DNA foi extraído das amostras de tecido por meio de um kit comercial (Easy-DNA™, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Em seguida, uma PCR *nested* foi conduzida usando-se dois pares de primers específicos para as seqüências conservadas do espaço interno transcrito 1 (ITS1) de *Hammondia* sp, *N. caninum* e *T. gondii*. Na primeira reação foram usados os primers externos JS4 (Slapeta et al., 2002a), e CT2b (Monteiro et al., 2007), e na segunda amplificação, os primers CT1 e CT2 (Sreekumar et al., 2003). As amplificações foram realizadas em volume total de 25 µl com um mix comercial (Master Mix, Promega, Madison, WI). A programação do termociclador foi de 40 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min na primeira amplificação e 40 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min na segunda amplificação, ambos precedidos por um passo de desnaturação inicial de 94°C por 5 min e seguidos por uma extensão final a 72°C por 7 min. O tamanho esperado do amplicon foi de aproximadamente 500 pares de bases (pb) na primeira reação e de 400 pb na segunda.

Foram utilizados como controles positivos DNA de oocistos de *H. heydorni* obtidos a partir de cão naturalmente infectado (Monteiro et al., 2007), taquizoítos de *N. caninum* (cepa NC-1) e de *T. gondii* (cepa RH), e como controle negativo, água ultra-pura. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% e depois corados com brometo de etídio para visualização sob luz ultravioleta. As amostras positivas foram extraídas do

gel com kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA).

Os produtos de PCR purificados foram sequenciados utilizando-se o *Big Dye terminator system*, versão 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) em sequenciador ABI 3100 (AME Bioscience). Os cromatogramas foram editados com o programa BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.0.9.0 (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA) e utilizados em pesquisas no BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) para a comparação das seqüências com aquelas depositadas no banco de dados público.

Resultados e Discussão

Infecções por *H. heydorni*, *N. caninum* e *T. gondii* foram confirmadas em caprinos por meio de uma PCR nested seguida pelo sequenciamento da região ITS1 do rDNA dos parasitos (Tabela 1). A maior parte dos estudos epidemiológicos disponíveis sobre a infecção por *N. caninum* ou *T. gondii* em caprinos foi conduzida por meio de testes sorológicos; estudos moleculares foram realizados, mas geralmente com análise de natimortos ou fetos abortados (Dubey & Schares, 2006; Dubey et al., 2007). Até a realização do presente estudo, não foram observados dados epidemiológicos sobre a prevalência/freqüência molecular desses coccídios em tecidos de caprinos.

Estágios teciduais de *N. caninum* e *T. gondii* são encontrados com maior freqüência no sistema nervoso central, mas têm sido registrados também em outros tecidos como músculo esquelético e cardíaco, pulmão e rins (Dubey et al., 2002a; Dubey & Schares, 2006). No presente trabalho, embora todas as amostras positivas na PCR para *N. caninum* tenham sido oriundas de cérebro, 50% (4/8) das amostras positivas para *T. gondii* e 75% (3/4) das amostras positivas para *H. heydorni* consistiram de amostras de língua ou de coração. Não se sabe quais os tecidos de predileção para cistos teciduais de *H. heydorni* (Mohammed et al., 2003), mas nesse estudo, DNA de *H. heydorni* foi encontrado principalmente no coração, sugerindo que estudos posteriores sobre esse parasito devem incluir esse tecido.

Tablela 1. Parasitos toxoplasmatíneos em tecidos de caprinos detectados por meio de uma PCR *nested* seguida pelo sequenciamento dos produtos de PCR

| | Freqüência (%) | Nº de cérebros positivos (%) | Nº de corações positivos (%) | Nº de línguas positivas (%) |
|---------------------------|----------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| <i>Hammondia heydorni</i> | 4/102 (3,92) | 1 (0,98) | 3 (2,94) | 0 |
| <i>Neospora caninum</i> | 2/102 (1,96) | 2 (1,96) | 0 | 0 |
| <i>Toxoplasma gondii</i> | 8/102 (7,84) | 4 (3,92) | 1 (0,98) | 3 (2,94) |
| Total | 14/102 (13,72) | 7/102 (6,86) | 4/102 (3,92) | 3/102 (2,94) |

Anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii* foram encontrados em 9,8% (10/102) e 21,6% (22/102) dos caprinos. Pela comparação dos resultados da PCR nested e sequenciamento, com as freqüências de anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii* (Tabela 2), não foi possível inferir sobre a possibilidade de reações cruzadas entre os coccídios analisados. Apenas um animal positivo na PCR para *H. heydorni* apresentou evidência sorológica de

infecção por *T. gondii* e, como os animais analisados foram infectados naturalmente, deve-se considerar a possibilidade de infecções múltiplas (Slapeta et al., 2002b; Monteiro et al., 2007). A análise de amostras de soro anti-*H. heydorni* de animais infectados experimentalmente deve ser conduzida no futuro para o esclarecimento da possibilidade de reatividade cruzada entre *H. heydorni* e coccídios relacionados.

Tabela 2. Resultados da PCR nested e sequenciamento para detecção de parasitos toxoplasmatíneos e IFI para detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii*

| Amostra | Tecido | IFI para <i>N. caninum</i> | IFI para <i>T. gondii</i> | Resultado do sequenciamento |
|---------|---------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| 53 | Coração | Negativo | Negativo | <i>Hammondia heydorni</i> |
| 54 | Coração | Negativo | Negativo | <i>Hammondia heydorni</i> |
| 64 | Cérebro | Negativo | 1/16 | <i>Hammondia heydorni</i> |
| 137 | Coração | Negativo | Negativo | <i>Hammondia heydorni</i> |
| 59 | Cérebro | Negativo | Negativo | <i>Neospora caninum</i> |
| 91 | Cérebro | 1/3200 | Negativo | <i>Neospora caninum</i> |
| 66 | Cérebro | Negativo | Negativo | <i>Toxoplasma gondii</i> |
| 83 | Coração | Negativo | Negativo | <i>Toxoplasma gondii</i> |
| 87 | Língua | Negativo | Negativo | <i>Toxoplasma gondii</i> |
| 88 | Cérebro | Negativo | Negativo | <i>Toxoplasma gondii</i> |
| 89 | Língua | Negativo | Negativo | <i>Toxoplasma gondii</i> |
| 111 | Língua | Negativo | Negativo | <i>Toxoplasma gondii</i> |
| 127 | Cérebro | Negativo | Negativo | <i>Toxoplasma gondii</i> |
| 139 | Cérebro | Negativo | 1/16 | <i>Toxoplasma gondii</i> |

H. heydorni e *N. caninum* compartilham uma série de características biológicas e morfológicas e são considerados próximos filogeneticamente (Ellis et al., 1999b). Foi sugerido que poderiam representar uma única espécie (Heydorn & Mehlhorn, 2002a), mas estudos conduzidos com o emprego de técnicas moleculares provaram o contrário (Ellis et al., 1999b; Mugridge et al., 1999; Monteiro et al., 2007). Muitas informações foram publicadas sobre *H. heydorni*, mas na maioria das vezes não é possível ter certeza sobre a identidade do parasito, pois não há confirmação molecular (Dubey et al., 2002a).

No presente trabalho é confirmada, pela primeira vez, a presença de *H. heydorni* em tecidos de animais naturalmente infectados, além de ser o primeiro estudo epidemiológico com confirmação molecular da frequência de *N. caninum* e *T. gondii* em caprinos. A frequência molecular registrada da infecção por *H. heydorni* em caprinos foi maior do que por *N. caninum*, o que é sugestivo de uma maior susceptibilidade desses animais à infecção por *H. heydorni*.

Os animais analisados pertenciam a uma região de clima quente e seco do Brasil, a Caatinga, associada com frequências menores de infecção por *T. gondii*, provavelmente devido a um ambiente menos contaminado com oocistos (Gondim et al., 1999b). Um clima moderado e úmido pode favorecer a esporulação e sobrevivência de oocistos de coccídios (Dubey et al., 2007) e é possível, assim, que outras regiões do país, com climas mais apropriados para

o desenvolvimento de oocistos, possam apresentar freqüências ainda maiores por *H. heydorni*.

Poucas informações estão disponíveis sobre a infecção por *H. heydorni* em hospedeiros intermediários e definitivos e, embora algumas investigações epidemiológicas tenham sido realizadas pela detecção de oocistos em fezes de hospedeiros definitivos (Slapeta et al., 2002a; Schares et al., 2005), muitos aspectos da biologia, epidemiologia e ciclo de vida de *H. heydorni* ainda são desconhecidos. Mais estudos devem ser conduzidos com caprinos e outras espécies animais, especialmente com o uso de técnicas moleculares, para aquisição de mais informações sobre esse parasito e para investigar a possibilidade de reatividade cruzada entre coccídios relacionados.

Agradecimentos

Ao Dr. Rodrigo Soares pela concessão do DNA de *H. heydorni* e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa de mestrado de SILVA, M.S.A.

Referências Bibliográficas

- BARR, B.C.; ANDERSON, M.L.; WOODS, L.W.; DUBEY, J.P.; CONRAD, P.A. *Neospora*-like protozoal infections associated with abortion in goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigations**, v.4, p.365-367, 1992.
- BLAGBURN, B.L.; LINDSAY, D.S.; SWANGO, L.J.; PIDGEON, G.L.; BRAUND, K.G. Further characterization of the biology of *Hammondia heydorni*. **Veterinary Parasitology**, v.27, p.193-198, 1988.
- DUBEY, J.P.; ACLAND, H.M.; HAMIR, A.N. *Neospora caninum* in a stillborn goat. **The Journal of Parasitology**, v.78, n.3, p.532-534, 1992.
- DUBEY, J.P.; BARR, B.C.; BARTA, J.R.; BJERKA, I.; BJÖRKMAN, C.; BLAGBURN, B.L.; BOWMAN, D.D.; BUXTON, D.; ELLIS, J.T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D.E.; HOWE, D.K.; JENKINS, M.C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A.E.; MATTSSON, J.G.; MCALLISTER, M.M.; MODRÝ, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L.D.; SPEER, C.A.; TREES, A.J.; UGGLA, A.; UPTON, S.J.; WILLIAMS, D.J.L.; LINDSAY, D.S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidian. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 929–946, 2002a.
- DUBEY, J.P.; MORALES, J.A.; VILLALOBOS, P.; LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L.; TOPPER, M.J. Neosporosis-associated abortion in a dairy goat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.208, n.2, p.263-265, 1996.
- DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.240, p.1-34, 2006.
- DUBEY, J.P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L.M. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, n.2, p.323-367, 2007.
- ELENI, C.; CROTTI, S.; MANUALI, E.; COSTARELLI, S.; FILIPPINI, G.; MOSCATI, L.; MAGNINO, S. Detection of *Neospora caninum* in an aborted goat foetus. **Veterinary Parasitology**, v.123, p.271–274, 2004.

ELLIS, J.T.; MORRISON, D.A.; LIDDELL, S.; JENKINS, M.C.; MOHAMMED, O.B.; RYCE, C.; DUBEY, J.P. The genus *Hammondia* is paraphyletic. **Parasitology**, v.118, p.357-362, 1999b.

FIGLIUOLO, L.P.C.; RODRIGUES, A.A.R.; VIANA, R.B.; AGUIAR, D.M.; KASAI, N.; GENNARI, S.M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goat from São Paulo State, Brazil. **Small Ruminant Research**, v.55, p.29-32, 2004.

GONDIM, L.F.P.; BARBOSA Jr., H.V.; RIBEIRO-FILHO, C.H.A.; SAEKI, H. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in goats, sheep and water buffaloes in Bahia State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.82, p.273-276, 1999b.

HEYDORN, A.O.; MEHLHORN, H. *Neospora caninum* is an invalid species name: an evaluation of facts and statements. **Parasitology Research**, v.88, p.174-184, 2002a.

IBGE. Banco de Dados Agregados – SIDRA, Sistema IBGE de Recuperação Automática, 2006. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/>>. Acessado em: 02 jul. 2008.

MOHAMMED, O.; DAVIES, A.J.; HUSSEIN, H.S.; DASZAK, P.; ELLIS, J.T. *Hammondia heydorni* from the arabian mountain gazelle and red fox in Saudi Arabia. **The Journal of Parasitology**, v.89, n.3, p.535-539, 2003.

MONTEIRO, R.M.; PENA, H.F.J.; GENNARI, S.M.; SOUZA, S.O.; RICHTZENHAIN, L.J.; SOARES, R.M. Differential diagnosis of oocysts of *Hammondia*-like organisms of dogs and cats by PCR-RFLP analysis of 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. **Parasitology Research**, v.103, P.235-238, 2008.

MONTEIRO, R.M.; RICHTZENHAIN, L.J.; PENA, H.F.J.; SOUZA, S.L.P.; FUNADA, M.R.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; SREEKUMAR, C.; KEID, L.B.; SOARES, R.M. Molecular phylogenetic analysis in *Hammondia*-like organisms based on partial Hsp70 coding sequences. **Parasitology**, v. 134, p.1195–1203, 2007.

MUGRIDGE, N.B.; MORRISON, D.A.; HECKEROTH, A.R.; JOHNSON, A.M.; **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1545-1556, 1999.

SCHARES, G.; PANTCHEV, N.; BARUTZKI, D.; HEYDORN, A.O.; BAUER, C.; CONRATHS, F.J. Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. **International Journal for Parasitology**, v.35, p.1535-1537, 2005.

SLAPETA, J.P.; KOUDELA, B.; VOTYPKA, J.; MODRÝ, D.; HOREJS, R.; LUKES, J. Coprodiagnosis of *Hammondia heydorni* in dogs by PCR based amplification of ITS 1 rRNA: differentiation from morphologically indistinguishable oocysts of *Neospora caninum*. **The Veterinary Journal**, v.163, p.147-154, 2002a.

SLAPETA, J.R.; MODRÝ, D.; KYSELOVÁ, I.; HOREJS, R.; LUKES, J.; KOUDELA, B. Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. **Veterinary Parasitology**, v.109, p.157–167, 2002b.

SREEKUMAR, C.; HILL, D.E.; FOURNET, V.M.; ROSENTHAL, B.M.; LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P. Detection of *Hammondia heydorni*-like organisms and their differentiation from *Neospora caninum* using random-amplified polymorphic DNA- polymerase chain reaction. **The Journal of Parasitology**, v.89, n.5, p.1082-1085, 2003.