

E. Ciências Agrárias - 5. Medicina Veterinária - 6. Medicina Veterinária

SEMI-NESTED PCR APLICADA EM PARTE DA REGIÃO RIBOSSOMAL ITS-1 DE NEOSPORA CANINUM, PARA DIAGNÓSTICO DA NEOSPOROSE BOVINA CONGÊNITA

Raquel de Lima¹

Michele Placedino Andrade²

Domingos Sávio dos Santos³

Christian Hirsch⁴

Mary Suzan Varaschin⁵

Antônio Marcos Guimarães⁶

1. 9º módulo de Medicina veterinária/UFLA
2. 8º módulo de Medicina veterinária/UFLA
3. mestre pelo curso de Ciências Veterinárias da UFLA
4. Orientador – DMV/UFLA
5. Professora do Curso de Medicina Veterinária da UFLA
6. Orientador – DMV/UFLA

RESUMO:

O protozoário *Neospora caninum* é considerado uma das principais causas de aborto em gado de leite, pode também provocar morte embrionária e reabsorção, redução na produção de leite, nascimento de bezerras com anormalidades congênicas e menor taxa de crescimento dos animais jovens. O diagnóstico acurado é um dos desafios no controle desta doença, onde técnicas moleculares se tornaram muito úteis, justamente por possibilitarem elevada sensibilidade e especificidade analítica. A semi nested - PCR é capaz de aumentar a sensibilidade analítica da PCR em até 100 vezes, por ser preparada a partir de uma segunda reação em cadeia com base nos produtos de amplificação da primeira reação. Esta propriedade é desejável na análise de amostras de fetos, neonatos, placenta e outros materiais clínicos que, por sua natureza, podem apresentar pouco DNA do parasito. O objetivo deste trabalho foi padronizar uma semi-nested PCR como técnica complementar no diagnóstico de neosporose congênita bovina. Para isso, amostras de tecidos de encéfalo e coração foram coletadas de 24 conceptos bovinos oriundos de propriedades rurais da região do Sul de Minas Gerais. A região alvo de amplificação contemplou parte de ITS-1, com a produção de um amplificado de 362pb. Este fragmento se estende da posição 4 a posição 365 na seqüência de referência L49389 (Genbank). O DNA molde empregado foi o produto de PCR com 588pb descrito em publicações anteriores, compreendido entre o DNA ribossomal 18S e o 5.8S, que se estende da posição 4 a posição 592 na seqüência de referência. Para a semi-nested PCR foi empregado um par de iniciadores denominados de LAV1 e LAV2, ambos desenhados especificamente para este trabalho, sendo LAV1 também empregado na PCR de geração do DNA molde. A reação foi padronizada em volume final de 20 micro litros, com MgCl₂ a 2,5 mM e temperatura de alinhamento a 60°C durante 30 segundos. O controle negativo de contaminação empregado foi DNA genômico total extraído de cultura de células MDBK. Nas amostras clínicas analisadas, obteve-se um incremento de 70% nos resultados positivos com a semi-nested PCR, em relação a PCR original. Pode-se concluir que a semi-nested PCR foi mais sensível que a PCR, em concordância com os resultados apresentados por outros autores. Tais técnicas devem ser consideradas conjuntamente com outras metodologias de diagnóstico, a

fim de se elevar a chance de identificação do agente etiológico de aborto bovino.
Instituição de Fomento: FAPEMIG

Palavras-chave: Neospora caninum, semi nested - PCR, bovinos.

XXIII CIUFLA