

RAFAEL CARNEIRO COSTA

**The Study of pathogenicity of two *Neospora caninum* strains
isolated from goats and its genetic correlation with other strains by
multilocus microsatellite genotyping**

**São Paulo
2020**

Resumo

Costa, R. C. **Estudo de patogenicidade de duas cepas de *Neospora caninum* isoladas de caprinos e sua correlação genética com outras cepas por genotipagem de microssatélites.** [The Study of pathogenicity of two *Neospora caninum* strains isolated from goats and its genetic correlation with other strains by multilocus microsatellite genotyping] 2020. 74p. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

O presente trabalho compreende o Estudo de diferentes cepas de *Neospora caninum* do Brasil e da Escócia quanto às suas características genéticas, avaliação de patogenicidade, virulência e possibilidade de isolamento. O primeiro capítulo, consiste de um artigo publicado no periódico internacional *Veterinary Parasitology* e descreve uma tentativa de isolamento de cepas do parasito utilizando tecido placentário de cabras naturalmente infectadas, em um bioensaio utilizando gerbis. Apesar dos gerbis serem descritos na literatura como sendo altamente susceptíveis à infecção por *N. caninum*, somente foi obtido sucesso na infecção de animais após imunossupressão com altas doses de metilprednisolona. Animais imunossuprimidos apresentaram sinais clínicos de emagrecimento, pelos arrepiados e alterações de propriocepção como *Head tilt*. Análises histopatológicas revelaram reações inflamatórias no encéfalo, consistindo de infiltrados inflamatórios mononucleares multifocais associados à manguitos perivascularares e estruturas parasitárias semelhantes a cistos e taquizoítos, juntamente com áreas de necrose associadas à infiltrado inflamatório de macrófagos e reação de cicatrização em musculatura esquelética. Apesar do sucesso na infecção dos gerbis, não foi possível obter o isolamento do parasito em cultivo celular em uma primeira tentativa, o que levou à segunda parte do trabalho. O capítulo dois consiste de um artigo publicado no periódico internacional *Experimental Parasitology*. Foram utilizados tecidos dos gerbis infectados descritos anteriormente e novas amostras de sistema nervoso central de caprinos naturalmente infectados em um bioensaio em camundongos C57BL6 Knockout para o gene Interferon gamma (camundongos knockout- KO). Os camundongos Knockout por serem incapazes de desenvolver uma resposta imune adequada ao *N. caninum*, permitiram a rápida replicação de taquizoítos principalmente em macrófagos peritoneais, os camundongos apresentaram acentuada perda de peso, letargia e ascite 15 a 30 dias após inoculação, quando foram eutanasiados e o líquido peritoneal utilizado para infecção de monocamadas de células VERO. A grande quantidade de taquizoítos no líquido

peritoneal de camundongos KO permitiu uma rápida adaptação e crescimento dos mesmos em cultura de células, dando origem a dois isolados de cabras nomeados NC-Goat1 e NC-Goat2. Os dois isolados foram testados quanto à sua Patogenicidade em um modelo de infecção experimental em camundongos BALB/c, amplamente utilizado na literatura. As cepas não apresentaram alta patogenicidade e virulência no modelo de infecção de camundongos, apesar das duas cepas terem sido associadas a doença clínica em caprinos, com abortos, natimortos e encefalite em caprinos jovens e adultos. O terceiro capítulo apresenta resultados de um estudo genético de genotipagem dos isolados NC-Goat1 e NC-Goat2, amostras clínicas de caprinos e bovinos do sul de Minas Gerais e amostras de bovinos da região de Dumfries e Galloway na Escócia. Utilizando a técnica de genotipagem por microssatélites, análises filogenéticas evidenciaram que as cepas de *N. caninum* presentes nos isolados e nas amostras clínicas de caprinos tinha relação próxima com os isolados brasileiros NC-SP1, NC-Bahia e NC-Goiás, enquanto que as amostras de bovinos de Minas Gerais não se correlacionaram proximamente às outras. Analisando as amostras provenientes de rebanhos escoceses, todos tenderam a se relacionar proximamente entre elas e com outras amostras escocesas descritas anteriormente na literatura. Análises adicionais utilizando marcadores microssatélites descritos pelo grupo de pesquisa do Instituto Moredun, evidenciaram genótipos mistos associados ao isolado padrão de *N. caninum* (NC-1), sugerindo que o isolado poderia ter sido composto por múltiplos genótipos ao isolamento e à medida que foi replicado em cultura celular convergiu em uma população mais homogênea de parasitos.

Palavras-chave: Apicomplexa, Abortos, Bioensaio, Microssatélites

Abstract

Costa, RC. **The Study of pathogenicity of two *Neospora caninum* strains isolated from goats and its genetic correlation with other strains by multilocus microsatellite genotyping.** [Estudo de patogenicidade de duas cepas de *Neospora caninum* isoladas de caprinos e sua correlação genética com outras cepas por genotipagem de microssatélites]. 2020. 74p. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

The present work comprises the study of different strains of *Neospora caninum*, from Brazil and Scotland, regarding their genetic characteristics, pathogenicity, virulence and attempts at isolation. The first chapter consists of an article published in the journal *Veterinary Parasitology* and describes an attempt to isolate parasite strains using placental tissue from naturally infected goats in a bioassay using gerbils. Although gerbils are described in the literature as highly susceptible to *N. caninum* infection, successful infection of animals has only been achieved after immunosuppression with high doses of methylprednisolone. Immunosuppressed animals showed clinical signs of weight loss, fur and proprioception changes such as Head tilt. Histopathological analysis revealed inflammatory reactions in the brain consisting of multifocal mononuclear inflammatory infiltrates associated with perivascular cuffs, cyst-like and tachyzoite-like parasitic structures, along with areas of necrosis associated with macrophage inflammatory infiltrate and skeletal muscle scar formation. Despite the success in gerbil infection, it was not possible to obtain isolation of the parasite in cell culture in a first attempt, which led to the second part of the work. The chapter two consists of an article published in the journal *Experimental Parasitology*. Tissues from the previously described infected gerbils and new samples from the central nervous system of naturally infected goats were used in a bioassay using C57BL6 interferon gamma Knockout mouse (KO mice). Knockout mice, being unable to develop an adequate immune response to *N. caninum*, allowed the rapid replication of tachyzoites mainly in peritoneal macrophages, showing marked weight loss, lethargy and ascites 15 to 30 days after inoculation, when they were euthanized, and the peritoneal fluid used for infection of VERO cell monolayers. The large amount of tachyzoites in the peritoneal fluid of KO mice allowed their rapid adaptation and growth in cell culture, resulting in two goat isolates named NC-Goat1 and NC-Goat2. Both isolates were tested for pathogenicity in a widely used experimental BALB/c mouse infection model.

The strains did not show high pathogenicity and virulence in the mouse infection model, although both strains were associated with clinical disease in goats, with abortions, stillbirths and encephalitis in young and adult goats. The third chapter presents the results of a genetic genotyping study of the isolates NC-Goat1 and NC-Goat2, clinical samples from goats and cattle from southern Minas Gerais and samples from cattle from the Dumfries and Galloway region of Scotland. Using the microsatellite genotyping technique, phylogenetic analyzes showed that *N. caninum* strains present in the isolates and clinical samples of goats had a close relationship with the Brazilian isolates NC-SP1, NC-Bahia and NC-Goiás, while the samples from Minas Gerais cattle did not correlate closely to the others. Analysing samples from Scottish herds, all tended to relate closely to each other and to other Scottish samples previously described in the literature. Additional analyses using microsatellite markers described by the Moredun Institute research group showed mixed genotypes associated with the standard *N. caninum* isolate (NC-1), suggesting that the isolate could have been composed of multiple genotypes on isolation and as it was replicated in cell culture they converged to a more homogeneous population of parasites.

Keywords: Apicomplexa, Abortions, Bioassay, Encephalitis

This work was funded by: São Paulo funding agency protocols 2016/05010-2 and 2018/16546-6.