

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE**  
***Cryptosporidium* spp. EM CORDEIROS NA REGIÃO DE**  
**ARAÇATUBA-SP-BRASIL: AVALIAÇÃO DA**  
**TRANSFÊRENCIA DA IMUNIDADE PASSIVA**

**Flávia Corbari Féres**  
**Médica Veterinária**

**ARAÇATUBA – SP**  
**2008**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE**  
***Cryptosporidium* spp. EM CORDEIROS NA REGIÃO DE**  
**ARAÇATUBA-SP-BRASIL: AVALIAÇÃO DA**  
**TRANSFÊRENCIA DA IMUNIDADE PASSIVA**

**Flávia Corbari Féres**

**Orientador: Prof. Ass. Dr. Francisco Leydson Formiga Feitosa**

Dissertação apresentada à  
Faculdade de Odontologia –  
Unesp, Campus de Araçatuba,  
como parte das exigências para  
obtenção do título de Mestre em  
Ciência Animal (Fisiopatologia  
Médica e Cirúrgica).

**ARAÇATUBA – SP**

**2008**

### **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**Flávia Corbari Féres** - nascida em 23 de Janeiro de 1980, na cidade de São Paulo, formada em Medicina Veterinária pela Universidade Paulista-SP, residência na área de Clínica Médica, Cirúrgica e Reprodução de Grandes Animais pela Universidade Estadual de Londrina - UEL e aluna do curso de Pós Graduação em Ciência Animal da UNESP- Araçatuba.

Se...

"Se eu pudesse deixar algum presente a você,  
deixaria acesso ao sentimento de amar a vida  
A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo afora...  
Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem.  
A capacidade de escolher novos rumos.  
Deixaria para você, se pudesse, o respeito àquilo que é indispensável:  
Além do pão, o trabalho.  
Além do trabalho, a ação.  
E, quando tudo mais faltasse, um segredo:  
O de buscar no interior de si mesmo  
a resposta e a força para encontrar a saída"

Mahatma Gandhi

Gostaria de voltar no tempo quando me sentia protegida e amparada pelo seu  
amor  
Gostaria de voltar no tempo quando dormia segurando sua mão, e o medo de tudo  
passava  
Gostaria de voltar no tempo quando brincava de terra e tomava banho de tanque  
Gostaria de voltar no tempo quando comia bolo na varanda sentindo cheirinho de  
chuva  
Gostaria hoje de te consolar assim como tu me consolou após cada queda,  
derrota ou frustração onde me punha nos braços e tudo passava... só ficava  
aquele calor quente de vó...

Flávia Corbari Féres

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir a convivência com pessoas iluminadas e assim evoluir a cada momento.

Aos meus pais, agradeço pelo ser humano que sou hoje, pelo amor incondicional e verdadeiro, cumplicidade, companheirismo e compreensão pela minha ausência. A Vanessa Féres e o Alexandre Marçola, eterna gratidão pelo apoio e confiança extrema.

A todos os meus tios, tias e primos, incluindo aqui a família Pereira, pela representação do que é a família... amor, conselhos, torcida, força, colaboração, enfim, doação.

As minhas irmãs de república, Adriana Lombardi e Gisele Soares, que compartilharam durante estes dois anos todas as minhas conquistas diárias, mas principalmente por me “agüentar” nos inúmeros dias de problemas.

Aos meus amigos de colégio e faculdade Juliana Dias, Déa Juliana de Oliveira, Érico Souza, Priscila Bento (*in memorian*), Ana Carolina Bueno, Adriana Nabuco, Nataly Lima, Yara Figueira que, mesmo longe, fazem parte da minha vida.

A todos os meus queridos amigos desde a época de infância, colégio, faculdade, residência e mestrado, pela participação na minha formação pessoal e profissional.

Ao meu orientador Prof. Ass. Dr. Francisco Feitosa (Painho) agradeço por ter entrado na minha vida, no início como orientador, hoje como um pai, amigo, companheiro e por ser meu “Tudo”.

Ao meu co-orientador Prof. Ass. Dr. Marcelo Meireles pela dedicação, zelo e ser um exemplo de profissional a ser seguido.

A todos os funcionários e proprietários das fazendas onde foram realizadas as coletas.

Ao Núcleo de Criadores de Ovinos de Araçatuba.

Todos os amigos que se aventuram nas fazendas, durante as coletas de material.

A Adriana Nogueira do Instituto biológico de Araçatuba, pela companhia e colaboração nas coletas.

A Samantha Miyashiro da Universidade de São Paulo pelos seus ensinamentos sobre eletroforese.

A Renata Jorge da UNESP-Jaboticabal pela ajuda na parte bioquímica deste projeto.

A amiga Tatiana Barbosa pelos conselhos e auxílio no laboratório.

A FAPESP- Fundação de Amparo a pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro a esta pesquisa e as bolsas concedidas.

Aos professores de clínica médica e cirúrgica de grandes animais da Unesp Araçatuba Dr. Celso Antônio Rodrigues, Dr. Fabiano Antonio Cadioli, Dra. Juliana Regina Peiró e Dr. Luiz Cláudio Nogueira Mendes.

A Dra. Flávia Eugênio por corrigir a tese.

A Dra. Juliana Regina Peiró pela confecção dos abstracts.

Aos meus professores da graduação Dr. Maurício Garcia e Dra. Alice Maria Della Libera Paiva que sempre serão meus Mestres.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xii
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	1
Referências .....	14
CAPÍTULO 2 – TÍTULO DO TRABALHO .....	23
OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>Cryptosporidium</i> spp EM CORDEIROS NA REGIÃO DE ARAÇATUBA- SÃO PAULO- BRASIL.....	23
Resumo .....	23
Introdução .....	25
Material e Métodos .....	27
Resultados e Discussão .....	30
Conclusão .....	33
Referências .....	36
CAPÍTULO 3 – TÍTULO DO TRABALHO.....	41
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES SÉRICAS DE GAMA GLUTAMILTRANSFERASE E FOSFATASE ALCALINA E DAS CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNA TOTAL, IMUNOGLOBULINA G E DA FRAÇÃO $\gamma$ GLOBULINA NO SORO SANGUINEO DE CORDEIROS .....	41
Resumo .....	41
Introdução .....	43
Material e Métodos .....	46
Resultados e Discussão .....	48
Conclusão .....	52
Referências .....	55

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp. EM CORDEIROS NA REGIÃO DE ARAÇATUBA-SP-BRASIL: AVALIAÇÃO DA TRANSFÊRENCIA DA IMUNIDADE PASSIVA**

**RESUMO** – Foram coletadas 460 amostras de fezes de cordeiros com até 30 dias de vida com o objetivo de determinar a ocorrência de *Cryptosporidium* na região de Araçatuba, assim como as espécies envolvidas nesta parasitose. Realizou-se análise microscópica pela técnica de coloração negativa com verde malaquita em todas as amostras de fezes. Para a identificação molecular de *Cryptosporidium*, nas amostras positivas à microscopia, utilizou-se a reação de *nested* PCR, com amplificação de fragmentos da subunidade 18S do gene do RNA ribossômico ou do gene da actina. Encontraram-se 6,73% dos animais eliminando oocistos de *Cryptosporidium* nas fezes. A espécie e genótipo envolvidos foram: *Cryptosporidium parvum* e genótipo cervídeo que representam potencial zoonótico e *Cryptosporidium parvum* tipo B. Foram coletadas também 191 amostras de sangue de cordeiros com até 30 dias de vida com o objetivo de determinar as concentrações séricas de imunoglobulina G, PT,  $\gamma$  globulina, GGT e FA, assim como determinar a associação entre estas variáveis. Foi avaliada se a atividade sérica das enzimas GGT e FA pode ser utilizada indiretamente como indicadora de transferência de imunidade passiva. Para tanto, foram realizados os testes de imunodifusão radial, espectrofotometria e eletroforese respectivamente. Para os valores de GGT e FA, foram utilizados *kits* comerciais. Houve correlação estatística significativa entre a FA e GGT; fato também observado com relação a PT, a IgG e a GGT. A  $\gamma$  globulina mostrou-se correlacionada com GGT, IgG e PT. A atividade de FA demonstrou-se ineficaz para uso como indicadora de transferência de imunidade passiva.

**Palavras-chave:** caracterização molecular, cordeiros, *Cryptosporidium*, diarreia, transferência de imunidade passiva

**OCCURRENCE AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF  
*Cryptosporidium* spp IN LAMBS IN ARAÇATUBA REGION- SP- BRAZIL:  
ASSESSMENT OF PASSIVE TRANSFER STATUS**

**SUMMARY** - A total of 460 fecal samples were collected from lambs during the first 30 days of life with the aim to determine the occurrence of *Cryptosporidium* in Araçatuba region, as well as to identify species involved in this parasitism. Microscopic analysis of feces was carried out using malachite green negative stain. *Cryptosporidium* positive samples were subjective to a nested PCR, with amplification of fragments of the subunity 18S of the gene of the ribossomic RNA or the gene of the actin. In this study 6.73% of animals were eliminating oocysts of *Cryptosporidium* in their feces. The involved species and genotype were: *Cryptosporidium parvum* and cervide genotype, which represent a zoonotic potential and *Cryptosporidium parvum* type B. Blood samples (191) were collected from lambs that were up to 30 days old to determine the serum concentrations of immunoglobulin G, TP,  $\gamma$  globulin, GGT and ALP, as well as to determine the association between these variables. This was done in order to explore the possibility of using changes in activities of GGT e ALP as indirect indicators of immune passive transfer in lambs. The following tests were performed: radial immunodiffusion, spectrophotometry and electrophoresis respectively. GGT and ALP values were determinate using commercial kits. There was a statistically significant correlation between ALP and GGT. The same correlation was observed from TP, IgG and GGT. A positive  $\gamma$  globulin correlation was found between GGT, IgG and TP. ALP activity cannot be used as an indicator of immune passive transfer.

**Keywords:** molecular characterization, lambs, *Cryptosporidium*, diarrhea, immune passive transfer

## **CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS**

A região de Araçatuba, com 35 municípios, está localizada à Noroeste do estado de São Paulo, sendo a sua população estimada em 818.340 habitantes (IBGE, 2008), com limítrofes em Gabriel Monteiro, Bilac, Birigui, Buritama, Santo Antônio do Aracanguá, Pereira Barreto, Mirandópolis, Lavínia, Valparaíso e Guararapes (WIKIPÉDIA, 2008). O rebanho regional de ovinos é de aproximadamente 17.000 animais, distribuídos em 62 propriedades, que são cadastradas no núcleo de criadores de ovinos de Araçatuba (NOGUEIRA et al., 2007).

Araçatuba é a maior cidade da região, com cerca de 180.000 habitantes, segundo estimativa realizada no ano de 2007 (IBGE, 2008). Possui uma área territorial de 1167 Km<sup>2</sup>, latitude -21.20889<sup>0</sup>, longitude -50.43278<sup>0</sup> e altitude de 390m. O clima é tropical, com temperatura média anual de 25<sup>0</sup>C e com seca no inverno (WIKIPÉDIA, 2008). Conhecida como a “terra do boi gordo” por uma produção agropecuária intensa, a região de Araçatuba, nos últimos anos, vem se destacando frente ao mercado econômico nacional pela criação de ovinos com o objetivo de produção, provavelmente em decorrência do baixo rendimento da pecuária leiteira.

Por serem os neonatos os futuros produtos de venda, os cordeiros constituem-se em fonte de constante atenção, pois sua morte tem sido relatada mundialmente como responsável por grandes perdas econômicas na ovinocultura (HAUGHEY, 1991; KIRK et al., 1980).

As ovelhas possuem placenta sindesmocorial e, por este fato, não há passagem, da mãe para o feto, de moléculas com alto peso, incluindo as imunoglobulinas. Esta espécie é agamaglobulinêmica ao nascimento e necessita da ingestão de colostro que é rico em anticorpo e de outros fatores não imunes para a defesa passiva, para compensar a capacidade imune autógena limitada.

Este processo, denominado de transferência passiva, é de extrema importância para a proteção neonatal (CAMPBELL et al., 1977). O nível de imunoglobulinas

(Ig) no colostro é proporcional a sua concentração no soro sangüíneo dos neonatos (SHUBBER et al., 1979), sendo, a IgG, representante de 65 a 90% do teor de anticorpos totais (TIZARD, 1998).

Outros fatores não imunes são proteínas, carboidratos, lipídeos, vitaminas e sais minerais. Estes elementos participam da nutrição e regulação térmica do recém-nascido (MACHADO NETO et al., 2001). O colostro também contém hormônios, fatores de crescimento e enzimas, que possuem atividades associadas à maturação do trato digestório e de outros sistemas, sendo cruciais para o crescimento e desenvolvimento do recém-nascido (ODLE et al., 1996).

Como o colostro representa as secreções acumuladas no úbere no final da prenhez, os nascimentos prematuros podem resultar em quantidade insuficiente deste leite. O gotejamento excessivo das secreções mamárias antes do nascimento do descendente, as enfermidades na glândula mamária, nascimentos múltiplos, negligência nos cuidados maternos, principalmente em mães de primeira cria ou inexperientes, a debilidade do recém nascido, a sucção ineficiente ao mamar e/ou problemas físicos, são fatores que também propiciam a ocorrência de falha de transferência de imunidade passiva - FTIP (TIZARD, 1998).

Kruse (1983) descreveu que, em bezerros, as condições ideais para a absorção de Ig se fazem presentes somente durante as primeiras 24 a 48 horas de vida, em virtude da pequena produção de HCl pelo estômago, de mínima atividade de pepsina gástrica, da presença de um fator inibidor da tripsina no colostro e da reduzida atividade proteolítica intestinal.

Decorrido este período de até 48h de vida, se não houver ingestão de colostro, a possibilidade de ocorrer FTIP é elevada (TIZARD, 1998), pois as células primárias intestinais do duodeno e jejuno, onde se dá este mecanismo de absorção em bezerros, perdem a capacidade de transferir as imunoglobulinas da luz intestinal para as vias sistêmicas (BESSI et al., 2002; KRUSE, 1983).

Para se evitar a ocorrência de FTIP, é necessário assegurar que os neonatos ingiram colostro em quantidade, qualidade e no tempo corretos, minimizando-se,

assim, o desenvolvimento de possíveis doenças neonatais (RADOSTITS et al., 2000).

Sawyer et al. (1977), avaliando amostras de sangue de cordeiros coletadas às vinte e quatro horas após o nascimento e a sua provável absorção das imunoglobulinas colostrais, constataram que 14% dos animais que se apresentavam clinicamente normais demonstraram FTIP aos exames laboratoriais. Em contraste, a FTIP foi encontrada em até 46% dos cordeiros moribundos, que possuíam entre 24 horas e cinco semanas de vida. Este experimento evidenciou a importância da absorção de adequada quantidade de imunoglobulinas para a sobrevivência dos neonatos nas primeiras horas de vida.

Mc Guire (1983), avaliando a concentração de imunoglobulinas no soro sangüíneo de 590 ovinos, entre 24 e 36 horas de vida, observou que a FTIP ocorreu em 20 animais, sendo que destes, 45% morreram com até três semanas de idade, em contraste com os 570 cordeiros que possuíam, teoricamente, adequada transferência de imunidade passiva que tiveram, após as três semanas de vida, somente 5% de taxa de mortalidade.

Nóbrega Jr. et al. (2005) descreveram na Paraíba-Brasil, que 41,1% das mortes que ocorriam durante o período perinatal dos cordeiros, eram decorrentes de infecções neonatais. Esta mortalidade elevada foi ocasionada por ingestão inadequada de colostro, falha na desinfecção do umbigo no período pós-parto e por condições precárias de higiene. Segundo este autor, a diarreia é um sério problema em cordeiros, sendo responsável por 8,1% do total de mortes durante o período neonatal. Entre as causas desencadeantes de diarreia nesta espécie destacam-se as enfermidades parasitárias, sendo, o *Cryptosporidium spp*, um dos agentes etiológicos mais freqüentemente encontrado (QUILEZ et al., 2003).

Após sua primeira descrição por Tyzzer (1907), a criptosporidiose foi considerada, até recentemente, enfermidade rara e oportunista, sendo poucos os relatos de casos associados à presença de sintomas clínicos.

A partir da década de 70, o *Cryptosporidium* apresentou destaque crescente como agente etiológico de infecções envolvendo, principalmente, os sistemas digestório e respiratório de várias espécies. Somente após o seu reconhecimento como agente primário de doença clínica no homem e nos animais, foi que alguns tópicos relacionados a esta enfermidade, como sua epidemiologia, patogenia e características clínico-laboratoriais, começaram a ser elucidados.

No início da década de 80, com o aparecimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) nos Estados Unidos da América, foi dada atenção especial para a associação do *C. parvum* com a ocorrência de diarreia em pacientes portadores desta síndrome, sendo, hoje, considerada importante zoonose, estando as infecções mais graves, em seres humanos, geralmente associadas a situações de imunodeficiência, assim como, a maior susceptibilidade em crianças com idade inferior a dois anos (FAYER; UNGAR, 1986).

Indivíduos infectados demonstram diversos graus de sintomas, variando de acordo com a patogenicidade da espécie do *Cryptosporidium*, idade e *status* imunológico do hospedeiro (XIAO et al., 2004). Os protozoários do gênero *Cryptosporidium* parasitam a superfície de células epiteliais dos tratos gastrintestinal, respiratório e urinário de mamíferos, aves, répteis e peixes (CHERMETTE; BOUFASSA-OUZROUT, 1988).

O seu ciclo biológico é compreendido por três fases no trato digestório do mesmo hospedeiro. A reprodução assexuada do parasita ocorre na fase de esquizogonia e, durante a gametogonia, ocorre a reprodução sexuada. A última fase é chamada de esporogonia. Este último estágio é o de maior importância para a sua dispersão, sobrevivência, infectividade, assim como, detecção e identificação. Nesta fase há formação de oocistos, formas de resistência do parasita, que são eliminados nas fezes dos hospedeiros. Estima-se que aproximadamente 80% dos oocistos possuam parede espessa e, ao serem eliminados, são diretamente infectantes para outros animais. Os oocistos restantes (20%) possuem parede fina que se rompe antes da saída da célula do hospedeiro, permitindo a sua entrada

em novas células epiteliais. Este fenômeno é conhecido como auto - infecção, responsável pelo sintoma persistente de diarreia, em ausência de reinfecção exógena e resposta imune protetora.

O parasita possui característica própria de localização na célula do hospedeiro intracelular, porém extracitoplasmática no interior do vacúolo parasitóforo, que é uma invaginação da célula epitelial do intestino delgado no qual o parasita se alberga. Este aspecto, segundo alguns autores, possivelmente influi na pouca eficácia dos fármacos antimicrobianos visando a inibição do desenvolvimento do parasita (QUILEZ et al., 2003).

Outra característica importante é a resistência do oocisto ao meio ambiente. Eles permanecem com a capacidade infectante por um período de três a seis meses em temperaturas de 15 a 20<sup>0</sup>C. Possuem resistência a desinfetantes usuais como lodo, hipoclorito de sódio, hidróxido de sódio e clorito de benzamonio (CAMPBELL, 1982). Contudo, são sensíveis à temperatura extrema, -20<sup>0</sup>C por 8 horas e superior a 60<sup>0</sup>C por 30 minutos, especialmente quando estes permanecerem em água (ROBERTSON et al., 1998), desinfetantes como formóis salina e amônia (CAMPBELL, 1982).

Os oocistos são transmitidos via oral-fecal ou por contato direto de hospedeiro para hospedeiro. A contaminação indireta por água ou comida contaminada também foi relatada (RAMIREZ et al., 2004). A eliminação de oocisto nas fezes contamina, posteriormente, a cama e o úbere das ovelhas. Quanto mais novo o animal for infectado, menor será o período pré-patente, isto é, o tempo decorrido entre a ingestão dos oocistos e sua eliminação nas fezes. É possível visualizar os oocistos em fezes de cordeiros com seis dias de vida, com período pré-patente de três dias (ORTEGA-MOURA; WRIGHT, 1994).

O tempo de eliminação dos oocistos é inversamente proporcional à idade da primeira infecção. As maiores taxas de eliminação ocorrem cerca de cinco a seis dias após o início da infecção. Por esse motivo, a prevalência da infecção é elevada em superlotação, condições de higiene deficiente e final da época de

parição, pela contaminação do piquete durante todo este período. A eliminação de oocistos também aumenta na proximidade do parto como conseqüência da imunossupressão (QUILEZ et al., 2003). Se houver limpeza da área de parição, o número de cordeiros infectados diminui, especialmente, naqueles menores que sete dias de vida, confirmando que a infecção está associada à higiene nas fazendas (XIAO et al., 1994).

As lesões entéricas causadas pelo *Cryptosporidium sp.* reduzem a atividade das enzimas intracelulares da mucosa intestinal e levam a um quadro diarréico com conseqüente diminuição da absorção intestinal e alteração do metabolismo corpóreo (JERVIS et al., 1966). Outros sintomas da doença são a desidratação, dor abdominal, apatia, perda de apetite e perda de peso (ODONOGHUE, 1995).

A máxima receptividade da infecção é durante as primeiras semanas de vida. Conforme a idade aumenta, diminui a gravidade dos sintomas e a quantidade de oocistos eliminados (QUILEZ et al., 2003).

A diarréia, principal sintoma, está presente apenas em ruminantes infectados com até seis dias de idade e, em menor percentagem, em animais com mais de 28 dias. As manifestações clínicas declinam em ovinos infectados com um ou dois meses (ORTEGA-MORA; WRIGHT, 1994).

Em estudo realizado no Paraguai por Martinez et al. (2001), foi constatado que a diarréia apresenta-se principalmente em situações de estresse. A enfermidade também está relacionada com a precária infra-estrutura. Cerca de 87% e 66% dos animais dos animais com oito a 14 dias de vida e com 15 dias a 15 semanas, respectivamente, eram positivos para *Cryptosporidium*, porém, com infecção leve.

A resistência ligada à idade pela infecção por *Cryptosporidium parvum* em ovinos tem significado epidemiológico importante, pois se tem sugerido que os animais adultos, aparentemente saudáveis, servem como fonte de infecção, mas raramente desenvolvem sintomas clínicos. Contudo, tem-se demonstrado que ovinos previamente infectados são refratários à reinfecção e que essa mudança

não é acompanhada por soro conversão de IgG (FAYER, 1989; ORTEGA-MORA; WRIGHT, 1994).

Os sintomas clínicos são sazonais em ruminantes e coincidem com a época de parição e amamentação. A prevalência dos sintomáticos mostra-se na segunda semana de vida, confirmando que os animais são infectados imediatamente após o nascimento (ORTEGA-MORA; WRIGHT, 1994).

A diarreia está associada ao risco de infecção e o parasitismo é fortemente associado à probabilidade de diarreia. Segundo estudo realizado em Zaragoza-Espanha, 93.3% dos cordeiros infectados por *Cryptosporidium* na primeira semana de vida apresentaram diarreia (CAUSAPÉ et al., 2002). A mortalidade é baixa, mas aumenta quando ocorre a associação com infecção concomitante ou deficiência nutricional.

Ao pesquisar na literatura a incidência da infecção por *Cryptosporidium* em ovinos, foi possível observar uma grande variabilidade. Em Zaragoza, Espanha, identificou-se este agente em 59% das amostras de fezes de cordeiros analisadas (CAUSAPÉ et al., 2002). No México foi detectada, em cordeiros assintomáticos, uma positividade de 33,5% para *Cryptosporidium* (FRESÁN et al., 2005). Na Galícia, Hermida et al. (2007) encontraram 31% dos cordeiros positivos para *Cryptosporidium*. Na Polônia, Majewska et al. (2000) observaram 18,2% dos cordeiros eliminando oocistos de *Cryptosporidium* nas fezes.

Um estudo coparassitológico no nordeste da Espanha, detectou que o *C. parvum* foi o agente etiológico da diarreia em 45% dos cordeiros, acompanhado da *E. coli* enteropatogênica (30%) e do *Rotavirus* 21% (MUNOZ et al., 1996).

Dados nacionais a respeito da prevalência e das espécies envolvidas nesta enfermidade não são tão bem documentados em cordeiros como são em bezerros.

Segundo Feitosa et al. (2004), na região de Araçatuba-SP, 12,4% dos bezerros com até 30 dias de vida apresentaram-se positivos para *Cryptosporidium* sendo que, destes, 26,3% demonstraram diarreia, valor bem inferior aos constatados por

Ortolani e Soares (2003) no estado de São Paulo, onde observaram que 38% (76/200) dos bezerros com diarreia eliminavam oocistos de *Cryptosporidium* nas fezes. No estado do Rio de Janeiro, 11,7% dos bezerros com diarreia foram positivos para o agente em questão (EDERLI et al., 2004).

Anderson et al. (1982) ressaltaram a importância da criptosporidiose em termos de saúde pública por meio da descrição de um caso de criptosporidiose em uma estudante de veterinária que teve contato com bezerros portadores da criptosporidiose intestinal. Os sintomas, iniciados cinco dias após o contato inicial, consistiam de náusea, diarreia e febre, evoluindo para dor abdominal, calafrios e sudorese. Os exames de fezes realizados aos nove, 10 e 11 dias, foram positivos para o *Cryptosporidium sp.*, tornando-se negativos aos 13 dias.

Saredi e Bava (1998) avaliando 553 crianças internadas no Hospital Ricardo Gutierrez (Buenos Aires - Argentina) observaram oocistos de *Cryptosporidium sp.* em 21 (3,8%) pacientes. A média de idade da população com criptosporidiose (16 meninos e 5 meninas) era de 11 meses. Os autores constataram, ainda, que 76% dos pacientes moravam na periferia de Buenos Aires e 71% ingeriam água não tratada. A ocorrência de diarreia com a presença de muco (63%) ou de diarreia líquida (36%) foi verificada em 90% dos pacientes. A média do tempo gasto em hospitalização até a confirmação do diagnóstico foi de 20 dias.

Na cidade de Milwaukee (Wisconsin-EUA) cerca de 400.000 pessoas desenvolveram criptosporidiose em virtude da contaminação da água com oocistos de *Cryptosporidium sp.*, o que caracteriza a sua importância como agente entérico e zoonótico (HOWARD; SMITH, 1999).

Demonstrou-se, em um estudo no nordeste brasileiro, que um terço das crianças com menos de quatro anos e de família de baixa renda, eram positivas para *Cryptosporidium*, sendo os oocistos identificados mais facilmente em indivíduos com diarreia persistente. Nos países desenvolvidos, este parasita é a causa de diarreia em indivíduos imunodeprimidos e relatada como de origem alimentar. Sugere-se que criptosporidiose é endêmica nos países ainda em

desenvolvimento, com cerca de 30% das crianças com família de baixa renda positivas à pesquisa do parasito. Foi constatado, também, que se trata de uma enfermidade sazonal, já que, ao longo de quatro anos de estudo, a presença dos oocistos nas fezes ocorria quase exclusivamente na época de chuvas (NEWMAN et al., 1999).

A caracterização das espécies e genótipos envolvidos na criptosporidiose é de extrema relevância do ponto de vista da saúde pública, levando-se em consideração o potencial zoonótico de determinadas espécies de *Cryptosporidium*.

Originalmente, as espécies do gênero *Cryptosporidium* eram atribuídas às características morfológicas do oocisto e especificidade ao hospedeiro. Mas a caracterização genética utilizando técnicas específicas e fidedignas como a reação em cadeia de polimerase (PCR) e o seqüenciamento genético, permitiu a distinção entre os isolados de *Cryptosporidium* e confirmou a importância das espécies deste gênero. Análises da subunidade 18S do gene do RNA ribossômico (18S rDNA) revelaram a existência de diferentes genótipos (XIAO et al., 1999). A variação de alelos neste *locus* indica significativa heterogenicidade intra-espécie de *Cryptosporidium* levando ao reconhecimento de muitos outros genótipos (SPANIO et al., 1998) por ser um gene com variação de seqüência limitada (XIAO et al., 2004).

Outros genes como o hsp70 (SULAIMAN et al., 2000), a actina (SULAIMAN et al., 2002) e o GP60 são fortemente polimórficos e, por este fato, utilizados para subgenotipagem (STRONG et al., 2000; XIAO et al., 2004).

Apesar de não haver consenso para classificação definitiva das espécies do *Cryptosporidium*, alguns autores sugerem a existência de pelo menos quinze espécies adaptadas a certos hospedeiros, a saber: *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. canis*, *C. felis*, *C. hominis*, *C. muris*, *C. parvum*, *C. suis* e *C. wrairi* em mamíferos, *C. baileyi*, *C. galli* e *C. meleagridis* em aves, *C. saurophilum* e *C. serpentis* em répteis e *C. molnari* em peixes (LEAV et al., 2003; RYAN et al., 2002; RYAN et al.,

2003; RYAN et al., 2004; SITJÁ-BOBADILLA; ALVAREZ-PELLITERO, 2003; THOMPSON, 2002; TZIPORI; WARD, 2002; XIAO et al., 2004).

*C. parvum* e *C. hominis* são responsáveis pela maior parte das infecções humanas (RYAN et al., 2002) sendo, o primeiro, conhecido como tendo a maior infectividade para ovinos, caprinos, bovinos e cervos (XIAO et al., 2004). O *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. muris*, *Cryptosporidium* suíno genótipo I e o genótipo cervídeo também fazem parte das espécies com potencial zoonótico (SOBA et al., 2006).

Ryan et al. (2005) utilizando a técnica de PCR observaram, nas fezes de ovinos, uma amostra positiva para *C. hominis*, duas para *C. andersoni*, 33 para genótipo cervídeo, 14 para *Cryptosporidium* genótipo B bovino, quatro para genótipo marsupial, quatro para genótipo suíno II, duas para *Cryptosporidium* suíno e uma amostra positiva para um isolado não identificado, sugerindo, que, na Austrália, os ovinos não seriam uma fonte de infecção importante para o homem, já que *C. parvum*, assumido como a espécie de maior potencial zoonótico, não foi identificado em qualquer amostra seqüenciada.

Nos Estados Unidos da América, Santin et al. (2007), ao analisarem 57 amostras fecais de 31 cordeiros e 32 ovelhas, pela técnica de PCR, encontraram duas amostras positivas para *C. parvum*, 48 para *Cryptosporidium* genótipo cervídeo, e sete para *C. bovis like*. Dois cordeiros mostraram infecção com duas espécies diferentes, *C. genótipo cervídeo* e *C. bovis* e, o outro, *C. parvum* e genótipo cervídeo, sugerindo que os ovinos são mais comumente infectados por genótipo cervídeo do que por *C. parvum*.

A presença dos oocistos nas fezes pode ser utilizada como método de diagnóstico desta enfermidade (TZIPORI, 1983). Por seu tamanho reduzido e pela similaridade com as leveduras, torna-se necessário o emprego de técnicas coproparasitológicas e colorações específicas.

Uma alternativa é a realização de esfregaço direto com coloração negativa, um método de detecção fácil e rápido, mas pouco sensível, devido à escassa quantidade de fezes que se examina.

As técnicas de concentração de oocistos permitem examinar uma maior quantidade de fezes e facilita a identificação dos mesmos. Neste grupo incluem técnicas de flutuação com diferentes soluções como a sacarose de Sheater, sulfato de zinco, sulfato de magnésio, sendo, a microscopia de contraste de fase, necessária para identificar os oocistos. As técnicas de sedimentação como o formol-éter e o formol acetato de etílio e a coloração específica como Ziehl-Neelsen modificada, safranina, Koster modificada ou verde malaquita possibilitam a visualização direta do oocisto.

Recentemente, a técnica de PCR também tem sido usada por inúmeros laboratórios para detectar a presença de oocistos, com a vantagem de possuir elevada sensibilidade.

Como os sintomas desta enfermidade são inespecíficos e podem ser produzidos por outros agentes entéricos de origem infecciosa e/ou parasitária, devem-se realizar os diagnósticos diferenciais para a *Escherichia coli* potencialmente patogênica, para a enterotoxemia produzida por toxinas do *Clostridium perfringens* tipo B e C, bem como para a salmonelose, as infecções virais causadas por rotavírus, por exemplo, e, por fim, para as coccidioses, como, por exemplo, a eimeiriose (QUILEZ et al., 2003).

Até o momento, nenhum tratamento específico tem sido eficaz contra a criptosporidiose. Numerosos fármacos foram testados, de caráter profilático e terapêutico, geralmente sem resultados satisfatórios (CHERMETTE; BOUFASSA-OUZROUT, 1988).

A hidratação oral ou venosa é o tratamento mais importante para diminuir os sintomas da infecção em humanos e animais.

Em crianças, a administração de nitazolide diminuiu a duração da excreção de oocistos e da diarreia, mas sua eficiência em adultos imunodeficientes ainda não

está estabelecida (GILLES; HOFFMAN, 2002). Contudo, há a possibilidade da prevenção neonatal com colostro ou leite hiperimune obtido após a vacinação das mães no último período da gestação por via intramuscular e um mês antes da parição, através da infusão intramamária. O título de anticorpo no colostro/leite permaneceu elevado por até duas semanas pós-parição (GOMEZ, 2001).

Como não há tratamento efetivo contra o *Cryptosporidium*, é necessária a implantação de práticas de manejo e adequada higiene sanitária para evitar o contato do neonato com o parasita e prevenir a propagação da doença em animais saudáveis (HARP; GOFF, 1998). Dentre estas, destacam-se : o isolamento de animais doentes; a confirmação de que o neonato ingeriu colostro adequadamente; a redução do número de animais no ambiente e, por fim, a separação dos animais por idade. Estas práticas de manejo são simples e possibilitam minimizar e/ou reduzir a possibilidade de infecção. Em casos mais complicados, poder-se-á realizar a limpeza com água sob pressão e desinfecção das instalações, para prevenir o acúmulo de oocistos (HARP et al., 1989; SISCHO et al., 2000).

Os objetivos destes estudos visaram :

1. Determinar, na região de Araçatuba-SP, a ocorrência de *Cryptosporidium* em amostras de fezes de cordeiros com até 30 dias de vida e classificar as espécies e genótipos deste parasito, bem como testar a hipótese de sua correlação com o tipo de criação ao qual os animais são submetidos, o nível de contaminação ambiental, o índice pluviométrico, a consistência das fezes e a idade dos animais;
2. Determinar as concentrações séricas de imunoglobulina G, proteína total e de sua fração eletroforética  $\gamma$  globulina, assim como a atividade sérica das enzimas gama glutamiltransferase (GGT) e fosfatase alcalina (FA), e estabelecer a correlação entre estas variáveis e as diferentes faixas etárias;

3. Avaliar se as atividades séricas das enzimas GGT e FA podem ser utilizadas, indiretamente, como indicadores de adequado nível de proteção humoral e/ou como falha de transferência de imunidade passiva em cordeiros.

## REFERÊNCIAS

ANDERSON, B.C.; DONNDELINGER, M.D.; WILKINS, M.D. et al. Cryptosporidiosis in a Veterinary Student. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 180, p. 408-409, 1982.

BESSI, R.; PAULETTI, P.; D'ARCE, R.D. et al. Absorção de anticorpos do colostro em bezerros. I estudo no intestino delgado proximal. *R. Bra. Zootec.*, v. 31, p. 2314-2324, 2002.

CAMPBELL, S.G.; SIEGEL, M.J.; KNOWLTON, B.J. Sheep immunoglobulins and their transmission to the neonatal lamb. *N. Z. Vet. J.*, v. 25, p. 361-365, 1977.

CAMPBELL, I.; TRIPORI, S.; HUTCHISON, G. et al. The effect of disinfectants on survival of *Cryptosporidium* oocysts. *Vet. Rec.*, v. 111, p. 414-415, 1982.

CAUSAPÉ, A.C.; QUILEZ, J.; SANCHEZ, C. et al. Prevalence and analysis of potential risk factors for *Cryptosporidium parvum* infection in lambs in Zaragoza. *Vet. Parasitol.*, v.104, p.287-289, 2002.

CHERMETTE, R.; BOUFASSA-OUZROUT, S. Criptosporidiosis: a Cosmopolitan Disease in Animals and in Man. 2.ed. Paris, OIE, 1988. 122p.

EDERLI, B.B.; CARVALHO, C.B.; SALES, L.G. Ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* em bezerros na microrregião de Campos dos Goytacazes no norte do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol.*, v. 13, p. 45-48, 2004

FAYER, R.; UNGAR, B.L.P. *Cryptosporidium* sp. and cryptosporidiosis. *Microbiol. Rev.*, v. 50, p. 458-483, 1986.

FAYER, R. Epidemiology and control of bovine coccidiosis 1989. Proceedings of the V<sup>th</sup> international coccidiosos conference tours, França.

FEITOSA, L.F.F.; SHIMAMURA, G.M.; ROBERTO, T. et al. Prevalência da criptosporidiose em bezerros na região de Araçatuba, Estado de São Paulo, Brasil. *Ciência Rural*, v.34, p.189-193, 2004.

FRESÁN, A.M.U.; ALAVAREZ, A.G.; GARCIA, S.F. et al. Prevalence of *Cryptosporidium spp.* in asymptomatic sheep in family flocks from México State. *J. Vet. Med.* n..52, p. 482-483, 2005

GILLES, H.M.; HOFFMAN, P.S. Treatment of intestinal parasitic infection: a review of nitazoxanide, *Treds Parasitol.* v. 18, p. 95-97, 2002.

GOMEZ, M. Neonate diarrheic processes and cryptosporidiosis. *Ganadéria* n.10, p.1-10, 2001.

HARP, J.A.; WOODMANSEE, D.B.; MOON, H.W. Effects of colostral antibody on susceptibility of calves to *Cryptosporidium parvum* infection. *J. Vet. Res.*, v.50, p. 2117-2119, 1989.

HARP, J.A.; GOFF, J.P. Strategies for control of *Cryptosporidium parvum* infection in calves. *J. Dairy Sci.*, v.81, p. 289-294, 1998.

HAUGHEY, K.G. Perinatal lamb mortality-its investigation, causes and control. *J.South Afr. Veter. Assoc.*, v.62, p.78-91, 1991.

HERMIDA, J.A.C.; WARLETA, M.G.; MEZO, M. Natural infection by *Cryptosporidium parvum* e *Giardia duodenais* in sheep and goats in Galia (Spain). *Small Ruminant Research*, v. 72, p. 96-100, 2007.

HOWARD, J.L.; SMITH, R.A. Food Animal Practice. Current Veterinary Therapy - 4 . SAUNDERS : Philadelphia, 1999, 766p.

IBGE, Censo demográfico. Disponível em: < [http://www.ibge.gov.br/home/mapa\\_site/mapa\\_site.php#indicadores](http://www.ibge.gov.br/home/mapa_site/mapa_site.php#indicadores) >. Acessado em 01 fev. 2008

JERVIS, H.R.; MERRIL, J.G.; SPRINZ, H. Coccidiosis in the guinea pig small intestine due a *Cryptosporidium*. *American Journal of Veterinary Research*, v. 27, p.408-14, 1966.

KIRK, H.J., HUFFMAN, E.M., ANDERSON, B.L. Mastitis and udder abnormalities as related to neonatal lamb mortality in shed lambed range ewes. *J Anim. Sci.*, v.40, n.4, p.610-616, 1980.

KRUSE, P.E. The importance of colostral immunoglobulin and their absorption from the intestine of the newborn animals. *Annales de Recherches Veterinaries*, v.14, p. 349-53, 1983.

LEAV, A.B.; MACKAY, M.; WARD, H.D. *Cryptosporidium* species: New insights an old challenges. *Clinical Infectious Diseases*, v.36, p.903-906, 2003.

MACHADO NETO R.; PACKER I.V.; BONILHA L.M. et al. Concentração de IgG sérica em bezerros das raças Nelores, Guzerá, Gir, Caracu. 2. Efeitos sobre o

crescimento e mortalidade até a desmama. *Revta. Bras. Zootec.* v. 26, p. 920-923, 1997.

Mc GUIRE, T.C.; REGNILER, J.; KELLOM, T. et al. Failure in passive transfer of immunoglobulin G1 to lambs: measurement of immunoglobulins in ewe colostrum. *Am. J. Vet. Res.* v.44, n.6, p.1064-1067.1983.

MAJEWSKA, A.C.; WERNER, A.; SULINA, P. et.al. Prevalence of *Cryptosporidium* in sheep and goats bred on five farms in west-central region of Poland. *Vet. Parasitol.* v. 89, p. 269-275, 2000

MARTINEZ, R.D.R.; PRIETO, R.H.P.; VERA, E. La cryptosporidiosis en los terneros recién nacidos. Su etiología, patogenia, síntomas, tratamiento y profilaxia. *Revista de Ciência y tecnologia.* v.1, p.99-108, 2001.

MUNOZ, M.; ALVAREZ, M.; LANZA, I. et al. Role of enteric pathogens in the etiology of neonatal diarrhea in lambs and goat kids in Spain. *Epidemiol. Infet.* v. 117, p. 203-211, 1996.

NEWMAN, D.R.; SERS, C.L.; MOORE, S.R. et al. Longitudinal study of *Cryptosporidium* infection in children in northeastern Brazil. *The journal of infection disease.* v.180, p.167-175, 1999.

NOBREGA Jr, J.E.; RIET-CORREA, F.; NOBREGA, R.S. et al. Mortalidade perinatal de cordeiros no semi-árido da Paraíba. *Pes. Vet. Bras.* v. 3, p. 171-178, 2005

NOGUEIRA, A.H.C.; CURCI, V.C.L.M.; FERRARI, C.I.L.; CARDOSO, T.C. Aspectos epidemiológicos da ovinocultura na região de Araçatuba – dados

preliminares. Disponível em

[www.biologico.sp.gov.br/biologico/v68\\_supl\\_raib/033.PDF](http://www.biologico.sp.gov.br/biologico/v68_supl_raib/033.PDF). Acesso em out. 2007.

ODLE, J.; ZIJLSTRA, R. T.; DONOVAN, S. M. Intestinal effects of milkborne growth factors in neonates of agricultural importance. *J. Anim. Sci.*, v. 74, p. 2509-2522, 1996.

ODONOGHUE, P.J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in animal. *Int.J.Parasitol.*, v. 25, p.139-195, 1995.

ORTEGA-MORA, L.M.; WRIGHT, S.E. Age-related resistance in ovine cryptosporidiosis : patterns of infection and humoral immune response. *Infection and Immunity*, v.62, p.5003-9, 1994.

ORTOLANI, E.L.; SOARES, P.C. Aspectos epidemiológicos de la criptosporidiosis em becerros de rebanho lecheros. *Parasitol. Latinoam.*, v. 58, p. 122-127, 2003.

QUILEZ, J.; ACEDO, C.S.; CACHO, E. Criptosporidiosis de los pequenos ruminantes. *Peq. Rum.*, v.4, n.2, p.1-20, 2003.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D. C. et al. *Veterinary Medicine : a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. 9 ed. London : Baillière Tindall, 2000. 1502p.

RAMIREZ, N.E.; WARD, L.A.; SREEVATSAN, S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in human and animals *Microbes an Infection* p.1-13, 2004.

ROBERTSON, L.J.; HIDALGO, H.; FEREGRINO, M. et al. A “double-blind” placebo-controlled study of nitazoxanide in the treatment of cryptosporidial diarrhea in AIDS patients in Mexico. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* v. 92, p. 663-666, 1998.

RYAN, U.M.; FALL, A.; WARD, L. et al. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporididae) from Homo sapiens. *J. Eukaryotic Microbiol.*, v. 49, p. 433-440, 2002.

RYAN, U.M.; XIAO, L.; READ, C.I. et al. A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporididae) from birds. *J. Parasitolol.*, v. 89, p. 809-813, 2003.

RYAN, U.M.; MONIS, P.; ENEMARK, H.L. et al. *Cryptosporidium suis* N. SP. (apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*sus scrofa*). *J. Parasitol.*, v. 90, p.769-773, 2004

RYAN, U.M.; BATH, C.; ROBERTSON, I. et al. Sheep May Not Be an Important Zoonotic Reservoir for *Cryptosporidium* and *Giardia* Parasites. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.71, p.4992–4997, 2005.

SANTIN, M.; TROUT, J.M.; FAYER, R. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* an *Giardia* species and genotypes in sheep in Maryland. *Vet. Parasitol.*, v.146, p.17-24, 2007.

SAREDI, N.; BAVA, J. Cryptosporidiosis in pediatric patients. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.40, n.3, p.197-200, 1998.

SAWYER, M.; WILLADSEN, C.H.; OSBURN, B.I. et al. Passive transfer of colostral immunoglobulin from ewe to lambs and its influence on neonatal lambs mortality. *J.am. Vet. Med. Assoc.* v.171, n.12, p.1255-1259, 1977.

SHUBBER, A.H.; DOXEY, D.L.; BLACK, W.J. et al. Immunoglobulin level in ewe colostrums and in lamb serum. *Res.Vet. Sci.*, v.27, p.283-285, 1979.

SISCHO, W.M.; ATWILL, E.R.; LANYON,L.E. et al. Cryptosporidia on dairy farms and the role these farms may have in contaminating surface water supplies in the northeastern United States. *Prev. Vet. Med.*, v. 43, p. 253-267, 2000.

SITJÀ-BOBADILLA, A.; ALVAREZ-PELLITLERO, P. Experimental transmission of *Cryptosporidium molnari* (Apicomplexa: Coccidia) to gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). *Parasitol. Res.*, v. 91, p. 209-214, 2003.

SOBA, B.; PETROVEC, M.; MIOC, V. et al. Molecular characterizations of *Cryptosporidium* isolates from humans in Slovenia. *Clin. Microbiol. Infect.*, v.12, n.9, p. 918-921, 2006.

STRONG, W.B.; GUT, J.; NELSON, R. Cloning and sequence analysis of highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60Kilodalton glycoprotein and characterization of its 15 and 45 Kilodalton zoite surface antigen products. *Infect. Immun.* v. 68. p. 4117-4134, 2000.

SULAIMAN, I.L. MORGAN, U.M.; THOMPSON, R.C.A. et al. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70 kilodanton heat shock protein (HSP70) gene. *Appl. Environ.* v. 66, p. 2385-2391, 2000.

SULAIMAN, I.L.; LAL, A.A. XIAO, L. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. *J. Parasitol.* v. 88, p. 388-394, 2002.

THOMPSON, R.C.A. Presidential address: rediscovering parasites using molecular tools – towards revising the taxonomy of *Echinococcus*, *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Int. J. Parasitol.*, v. 32, p. 493-496, 2002.

TYZZER, E.E. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.5, p. 12-13, 1907.

TZARD, I.R. *Imunologia Veterinária*. 5 ed. São Paulo, 1998. 544 p.

TZIPORI, S. Cryptosporidioses in Animals and Humans *Microbiological reviews* v. 47, p. 84-96, 1983

TZIPORI, T.; WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection*. v. 4, p. 1047-1058, 2002.

WIKIPÉDIA, Araçatuba. Disponível em: <  
<http://pt.wikipedia.org/wiki/Ara%C3%A7atuba>>. Acessado em: 01 fev. 2008.

XIAO, R.P.; HERD, R.P.; McCLURE, K.E. Periparturient rise in the excretion of *Giardia* sp. Cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts as a source of infection for lambs. *J. Parasitol* , n.80, p.55-59,1994.

XIAO, L.; MORGAN, U.M.; LIMOR, J. et al. Genetic diversity with *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, V. 65, p. 3386-3391, 1999.

XIAO, L.; FAYER, L.; RYAN, R. et al. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 17, p. 72-97, 2004.

## CAPÍTULO 2 – TÍTULO DO TRABALHO

### Ocorrência e caracterização molecular de *Cryptosporidium* em cordeiros na região de Araçatuba- São Paulo- Brasil

**RESUMO** – O objetivo deste estudo foi determinar a ocorrência de *Cryptosporidium* em amostras de fezes de cordeiros, na região de Araçatuba - Estado de São Paulo, assim como testar a hipótese de sua correlação com os seguintes fatores: tipo de criação ao qual os animais são submetidos, o nível de contaminação ambiental, o índice pluviométrico, a consistência das fezes, a idade dos animais e a caracterização das espécies e genótipo de *Cryptosporidium* envolvidos nesta parasitose. Foram coletadas 460 amostras de fezes de cordeiros com até 30 dias de idade de diversas raças sem distinção ao sexo em 21 propriedades. Realizou-se análise microscópica pela técnica de coloração negativa com verde malaquita em todas as amostras de fezes. Para a identificação molecular de *Cryptosporidium*, nas amostras positivas à microscopia, utilizou-se a reação de *nested* PCR, com amplificação de fragmentos da subunidade 18S do gene do RNA ribossômico ou do gene da actina. Encontrou-se 6,73% dos animais eliminando oocistos de *Cryptosporidium* nas fezes em oito propriedades, sem a existência de correlação estatística entre as variáveis analisadas. A espécie e genótipo envolvidos foram: *Cryptosporidium parvum* e genótipo cervídeo os quais representam potencial zoonótico e o *Cryptosporidium parvum* tipo B.

**Palavras-chave:** caracterização molecular, cordeiros, *Cryptosporidium*, epidemiologia

**Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* in lambs in Araçatuba region- São Paulo- Brazil**

**ABSTRACT** – The aim of this study was to determine the occurrence of cryptosporidiosis in fecal lambs samples from Araçatuba region - São Paulo, in order to test the hypothesis of the correlation between *Cryptosporidium* and following factors: type of animal raising, level of environmental contamination, pluviometric index, feces consistence, animal age, and molecular characterization of species and genotypes involved in *Cryptosporidium* parasitism. A total of 460 fecal samples were collected from lambs during the first 30 days of life, from various screeds, of both sexes from 21 farms. All samples were analyzed using malachite green stain under microscopy. For identification molecular *Cryptosporidium*, using positive samples, were subjected to nested -PCR with amplification of fragments of the subunit 18S of RNA ribosome gene or actin gene. In this study, 6,73% from eight farms of animals were eliminating oocysts of *Cryptosporidium* in their feces, no statistical relation ship was found between the parameters evaluated. The species and genotype involved were: *C. parvum* and cervlde genotype, which present a zoonotic potential of disease, and *Cryptosporidium parvum* type B.

**Keywords:** molecular characterization, lambs, *Cryptosporidium*, epidemiology

## Introdução

O agente *Cryptosporidium* é relatado como um dos principais causadores de diarreia em cordeiros (DE GRAAF et al., 1999), sendo este responsável por grande impacto econômico, por sua elevada morbidade e, em alguns casos, mortalidade (CASEMORE et al., 1997). Contudo, somente após o seu reconhecimento como fator primário de doença clínica no homem e nos animais, foi que alguns tópicos relacionados a esta enfermidade, como sua epidemiologia e patogenia, começaram a ser elucidados.

A transmissão do agente se faz pela eliminação de oocistos nas fezes, contaminando, posteriormente, o meio ambiente e o úbere das ovelhas. As maiores taxas de excreção ocorrem com cinco a seis dias do início da infecção, em virtude do maior número de oocistos eliminados. Por esse motivo, a prevalência da infecção é elevada em superlotação, condições de higiene deficiente e em final da época de parição, pela contaminação dos piquetes durante todo este período. A eliminação de oocistos também aumenta na proximidade do parto por imunossupressão (QUILEZ et al., 2003).

Em ovinos, as maiores taxas de infecção são observadas nas primeiras semanas de vida (MARTINEZ et al., 2001; QUILEZ et al., 2003) com a maior positividade aos 21 dias (SANTIN et al., 2007).

Ortega-Mora e Wright (1994) constataram que o tempo de eliminação e a quantidade de oocistos eliminados foram maiores nos cordeiros mais jovens que nos animais com maior tempo de vida. A diarreia ocorreu durante o pico máximo de eliminação dos oocistos, sendo que, à medida que a idade aumentava, o número de animais com este sintoma clínico diminuía, não se fazendo presente nos animais mais velhos.

Ao estudar a incidência da infecção por *Cryptosporidium* em ovinos, é possível observar sua grande variabilidade. Em Zaragoza, identificou-se este agente em 59% das amostras de fezes de cordeiros analisadas (CAUSAPÉ et al., 2002). No México detectaram, em cordeiros assintomáticos, uma positividade de

33,5% para *Cryptosporidium* (FRESÁN et al., 2005). Em Galícia, Hermida et al. (2007) encontraram 31% dos cordeiros positivos para *Cryptosporidium*. Na Polônia, Majewska et al. (2000) observaram 18,2% dos cordeiros eliminando oocistos de *Cryptosporidium* nas fezes.

Em estudo desenvolvido no Estado de São Paulo-Brasil por Green et al. (2004) ao analisarem 364 amostras de fezes de cordeiros observaram que em estação do ano chuvosa 55,4% dos animais eliminaram oocistos de *Cryptosporidium* nas fezes e em estação de seca 17,3% destes mesmos animais foram positivos para este agente.

No início da década de 80, com o aparecimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) nos Estados Unidos da América, foi dada atenção especial para a infecção por *Cryptosporidium parvum*, pelo desenvolvimento de diarreia em pacientes portadores desta síndrome, sendo, nos dias atuais, considerada uma importante zoonose, estando as infecções mais graves, em seres humanos, associadas geralmente a situações de imunodeficiência com maior susceptibilidade em crianças com idade inferior a dois anos (FAYER; UNGAR, 1986).

Deste modo a caracterização das espécies e genótipos envolvidos na criptosporidiose é de extrema relevância do ponto de vista da saúde pública, levando-se em consideração o potencial zoonótico de determinadas espécies de *Cryptosporidium*. Nos Estados Unidos da América e na Austrália foram identificados em ovinos espécies e genótipo de *Cryptosporidium* com elevado potencial zoonótico (RYAN et al., 2005; SANTIN et al., 2007).

Feitosa et al. (2004), na região de Araçatuba-SP, ao analisarem amostras de fezes de bezerros com até 30 dias de idade, constataram que 12,4% destes apresentaram-se positivos para *Cryptosporidium* sendo 73,7% portadores assintomáticos e 26,3% com diarreia.

O objetivo deste estudo foi determinar na região de Araçatuba-SP, a ocorrência de *Cryptosporidium* em amostras de fezes de cordeiros e classificar as espécies e genótipos deste parasito, assim como testar a hipótese de sua correlação com seguintes fatores: tipo de criação ao qual os animais são submetidos, o nível de contaminação ambiental, o índice pluviométrico, a consistência das fezes e a idade dos animais.

### **Material e Métodos**

Em coleta única por animal, foram obtidas 460 amostras de fezes de cordeiros na região do município de Araçatuba, Estado de São Paulo, provenientes de 21 propriedades rurais mantidas sob os sistemas de criação intensiva (n=4), semi-intensiva (n=8) e extensiva (n=9). A escolha dos animais incluídos na análise foi aleatória, sendo realizada de acordo com sua disponibilidade no local, independentemente da raça, do sexo, da condição física e da presença de diarreia. Os períodos das coletas foram de abril a novembro de 2006 e abril a junho de 2007.

Somente em uma das propriedades de criação semi-intensiva foram realizadas duas coletas; a primeira em 2006 e a segunda em 2007 pelo fato desta apresentar o maior número de animais positivos para *Cryptosporidium* no primeiro ano de coleta.

O índice pluviométrico mensal (Fonte: Departamento de Água e Esgoto de Araçatuba- DAEA)<sup>1</sup> e o número das propriedades no ano de 2006 foram, a saber: Abril- 0 mm/mês de chuva (n=3); Junho- 18mm/mês (n=1); Julho- 15mm/mês (n=6); Agosto- 62,5mm/mês (n=5); Setembro- 101,1mm/mês (n=4); Outubro- 60,5mm/mês (n=1); Novembro- 212mm/mês (n=1). A propriedade em que houve duas coletas, no ano de 2007 esta foi realizada nos meses de Abril- 67,5mm/mês; Maio- 158mm/mês e Junho- 0mm/mês.

<sup>1</sup> LONGHINI, comunicação pessoal, 07/09/2007, Ivan, São Paulo, Brasil, DAEA

Para verificar a contaminação ambiental por oocistos de *Cryptosporidium* foram coletadas duas amostras com aproximadamente 8 ml cada de crostas do comedouro e duas do solo de cada propriedade, sendo, então, acondicionadas em tubos de plásticos e armazenadas a 4°C até o momento de sua análise.

Os animais foram divididos em quatro grupos, de acordo com a faixa etária: Grupo I 0-7 dias (n=147); Grupo II 8 a 15 dias (n=136); Grupo III 16 a 22 dias (n=122); Grupo IV 23-30 dias (n=55).

As amostras fecais foram obtidas diretamente do reto dos animais ou com uma sonda uretral introduzida no reto, quando necessário, através da qual se injetava cerca de 10 ml de solução fisiológica com uma seringa, obtendo-se, assim, um lavado. O armazenamento destas amostras foi em tubos de plásticos a 4°C até o momento de sua análise.

Avaliou-se principalmente a presença e a intensidade dos dois principais sintomas clínicos observados na criptosporidiose em cordeiros que são a diarreia e a desidratação. Para tanto, foi realizado o escalonamento das fezes segundo o grau de hidratação, da seguinte forma: peletizada (Grau 1), sólida (Grau 2), amolecida (Grau 3) e líquida (Grau 4) (ORTEGA-MORA; WRIGHT, 1994). A aferição clínica do grau de desidratação dos animais (em perda ponderal) foi estimada de acordo com Radostits et al. (2000), conforme o tempo gasto em segundos para que ocorra o retorno da prega cutânea, e observando-se a intensidade de retração do globo ocular na órbita.

As amostras fecais, das crostas do comedouro e do solo foram submetidas à purificação e concentração dos oocistos através da sedimentação com água/éter (MELONI; THOMPSON, 1996). Os sedimentos foram armazenados a 4°C até o momento de sua análise microscópica, realizada através da técnica de coloração negativa com verde malaquita (ELLIOT et al., 1999). A avaliação semi-quantitativa dos oocistos seguiu a seguinte nomenclatura: Negativo: 0, Grau 1: de 1 a 10 oocistos na lâmina, Grau 2: de 1 a 5 oocistos por campo na objetiva de 20x, Grau

3: de 5 a 20 oocistos por campo na objetiva de 20x e Grau 4: acima de 21 oocistos por campo na objetiva de 20x.

Em todas as amostras positivas à microscopia houve a extração de DNA segundo Meireles et al. (2007), para a posterior realização da reação de *nested* PCR, através da amplificação de fragmento da subunidade 18S do gene RNA ribossômico segundo Xiao et al. (2000) ou do gene da actina (SULAIMAN et al., 2002).

Em todas as reações utilizou-se água ultra pura como controle negativo, e *Cryptosporidium* genótipo de avestruzes, previamente identificado, como controle positivo.

Foi escolhida aleatoriamente uma amostra de cada propriedade em que houve animais positivos para a realização das reações de sequenciamento. Estas foram realizadas em duplicata e nas duas direções, com o DYEnamic®ET dye terminator Cycle Sequencing Kit (MegaBACE®) utilizando para tanto os mesmos primers da reação de *nested* PCR. O alinhamento e tradução das seqüências de nucleotídeos foram feitas pela determinação da seqüência consenso através do software Codoncode Aligner v. 1.5.2. (CodonCode Corp. Dedham, MA, USA) e alinhadas com o auxílio dos programas Clustal W (THOMPSON et al., 1997) e BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999), tomando-se como base seqüências homólogas disponíveis no GenBank.

Para confirmar a análise microscópica, foi realizado, de cada propriedade em que todos os animais foram negativos para *Cryptosporidium*, um “pool” das amostras de fezes, sendo estas divididas de acordo com os diferentes grupos de idade dos animais, e seguindo a mesma metodologia adotada para as amostras de fezes positivas para *Cryptosporidium* por análise microscópica.

Para verificar as associações entre o grau de consistência das fezes e de eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* nas fezes de cordeiros, realizou-se o Teste de Kruskal-Wallis e o teste de comparações múltiplas de Dunn. Quando

estas mesmas variáveis foram analisadas para cada grupo, segundo a idade, utilizou-se coeficiente de correlação de Spearman.

O teste exato de Fisher foi empregado para verificar a correlação entre os resultados das propriedades em que houve cordeiros positivos e negativos, segundo a eliminação de *Cryptosporidium* nas fezes, bem como entre o tipo de criação e o mês de coleta.

A análise estatística foi efetuada empregando-se o programa SAS (Statistical Analysis System), sendo consideradas significativas quando  $p < 0,05$  (ZAR,1999).

### **Resultados e Discussão**

Constatou-se, quando da interpretação dos dados epidemiológicos, que 38,1% (8/21) das propriedades na região de Araçatuba- SP possuíam animais positivos para *Cryptosporidium* com uma ocorrência de 6,73% (31/460) de cordeiros eliminando oocistos deste agente em suas fezes. Como a eliminação ocorre esporadicamente e em baixo nível nos animais assintomáticos, uma única coleta pode subestimar a real prevalência da doença em uma determinada população (SANTIN et al., 2007). Esta pode ser a razão na qual, embora o número de propriedades em que houve animais positivos ter sido elevado para *Cryptosporidium*, este valor não reflete no número total de animais positivos dentro de cada uma destas propriedades.

Não houve diferença estatística significativa entre o tipo de criação ao quais os animais foram submetidos e número de amostras positivas para *Cryptosporidium* mas, em número absoluto, mais da metade das propriedades em que os cordeiros eliminaram oocistos nas fezes encontravam-se em propriedades com regime de criação do tipo semi-intensiva (Tab.1).

No presente trabalho todas as amostras de crostas do comedouro e solo das diferentes propriedades foram negativas para *Cryptosporidium* em análise microscópica. Este fato deve-se a uma pequena contaminação ambiental em

virtude de um número reduzido de animais que estariam eliminando oocistos do parasito em suas fezes.

Ryan et al. (2005), na Austrália, observaram uma maior sensibilidade da técnica de PCR à microscopia. Para a confirmação das análises microscópicas obteve-se um “pool” das amostras de fezes, em cada propriedade em que todos os animais foram negativos para *Cryptosporidium*, e realizado nest PCR. Os resultados para esta análise foram negativos em todas as amostras.

Provavelmente, em virtude do reduzido número de animais positivos neste estudo, não foi possível verificar associação estatística significativa entre o grau de consistência das fezes, a idade e a taxa de eliminação de oocistos (Tab.2).

Nenhum dos animais positivos para *Cryptosporidium* sintomático ou assintomático, demonstrou desidratação quando de sua avaliação física. Ressalta-se, porém, o fato de que a utilização do lavado retal como método de coleta naqueles animais em que não foi possível obter as amostras pelo método tradicional devido à pequena quantidade de material fecal, poder-se-ia interferir na real ocorrência da criptosporidiose, por diminuir a possibilidade de visualização microscópica do agente, em virtude da obtenção de pouco material para análise.

Ao analisar os valores individualmente, verificou-se que dois animais com diarreia e positivos para o agente em questão encontravam-se no grupo de idade de 0-7 dias e com grau de eliminação de oocisto 2 e 3 (Tab.2), corroborando com os achados de Causapé et al. (2002), em Zaragoza, que observaram que cerca de 93.3% dos cordeiros infectados por *Cryptosporidium spp.* na primeira semana de vida apresentavam diarreia.

Green et al. (2004), no Estado de São Paulo-Brasil, utilizando cordeiros em coletas mensais, observou que as maiores taxas de eliminação foram nos meses chuvosos do ano. No Brasil, pela sazonalidade reprodutiva da espécie ovina, os nascimentos de cordeiros ocorrem principalmente na estação de seca. Em razão da idade dos animais neste estudo, as amostras de fezes foram coletadas em estação chuvosa em somente uma propriedade (Novembro 212mm/mês de índice

pluviométrico), sendo que esta não possuía animais eliminando oocistos de *Cryptosporidium spp.* nas fezes. Este pode ser o outro motivo no qual houve um número reduzido de animais positivos.

Apesar de não haver consenso para classificação definitiva das espécies de *Cryptosporidium*, alguns autores sugerem a existência de pelo menos quinze espécies adaptadas a certos hospedeiros, a saber: *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. canis*, *C. felis*, *C. hominis*, *C. muris*, *C. parvum*, *C. suis* e *C. wrairi* em mamíferos, *C. baileyi*, *C. galli* e *C. meleagridis* em aves, *C. saurophilum* e *C. serpentis* em répteis e *C. molnari* em peixes (LEAV et al., 2003; RYAN et al., 2002; RYAN et al., 2003; RYAN et al., 2004; SITJÁ-BOBADILLA; ALVAREZ-PELLITERO, 2003; THOMPSON, 2002; TZIPORI; WARD, 2002; XIAO et al., 2004)

O *C. parvum* e *C. hominis* são responsáveis pela maior parte das infecções humanas (RYAN et al., 2002) sendo a primeira, conhecida com a maior infectividade para ovinos, caprinos, bovinos e cervos (XIAO et al., 2004). Mas o *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. muris* e *Cryptosporidium* suíno genótipo I e o genótipo cervídeo também fazem parte das espécies com potencial zoonótico (SOBA et al., 2006).

Ryan et al. (2005) utilizando a técnica de PCR observaram uma amostra positiva de *C. hominis*, duas de *C. andersoni*, 33 de genótipo cervídeo, 14 de *Cryptosporidium* genótipo B bovino, quatro de genótipo marsupial, quatro de genótipo suíno II, duas de *C. suíno* e uma amostra de um novo isolado não identificado em fezes de ovinos, sugerindo que, na Austrália, os ovinos não seriam uma fonte de infecção importante para o homem, já que *C. parvum*, apontado como sendo a espécie com maior potencial zoonótico, não foi identificado em nenhuma amostra seqüenciada.

Para determinar as espécies envolvidas na infecção por *Cryptosporidium* na referida região, foi utilizada a técnica de nested PCR. No Brasil, não há relato das espécies e genótipos envolvidos nesta parasitose ovina. Neste estudo, foram

identificados *Cryptosporidium* genótipo cervídeo e *C. parvum* por amplificação do gene da actina, relacionados, portanto, com potencial zoonótico, e *C. parvum* tipo B, através de amplificação de fragmento da subunidade 18S do gene RNA ribossômico. O gene da actina foi utilizado neste estudo com um intuito de melhorar a qualidade e/ ou a positividade dos animais através da técnica de PCR, pois, em algumas amostras, embora o animal fosse sabidamente positivo através da microscopia, este resultado não refletiu ao amplificar o fragmentos da subunidade 18 S do gene do RNA ribossômico.

Nos Estados Unidos da América, Santin et al. (2007) ao analisarem 57 amostras fecais de 31 cordeiros e 32 ovelhas, através da técnica de PCR, encontraram duas amostras de *C. parvum*, 48 de *Cryptosporidium* genótipo cervídeo e sete de *C. bovis like*. Dois cordeiros mostraram infecção com duas espécies diferentes, *C.* genótipo cervídeo e *C. bovis* e o outro *C. parvum* e *C.* genótipo cervídeo, sugerindo que os ovinos são mais comumente infectados por *C.* genótipo cervídeo do que por *C. parvum*, neste país, estando, assim, a espécie ovina entre aquelas que apresentam potencial zoonótico elevado (FAYER et al., 2006).

### **Conclusões**

Embora o número de cordeiros positivos para *Cryptosporidium* não ser elevado na região de Araçatuba- São Paulo, a espécie e genótipo encontrados foram descritos anteriormente como tendo potencial zoonótico.

A constatação da presença de *C. parvum* nas amostras de fezes de cordeiros demanda cuidados higiênicos e sanitários para evitar a sua transmissão para a população humana.

Tabela 1 – Distribuição das propriedades de acordo com o tipo de criação, intensiva, semi-intensiva e extensiva e presença ou ausência de animais positivos para *Cryptosporidium spp.* Araçatuba, 2007

Tipo de criação	Positivo		Negativo		Total		P <sup>(1)</sup>
	N	%	N	%	N	%	
Intensiva	1	4,8	3	14,3	4	19,0	0,2698
Semi-intensiva	5	23,8	3	14,3	8	38,1	
Extensiva	2	9,5	7	33,3	9	42,9	
Total	8	38,1	13	61,9	21	100,0	

<sup>(1)</sup> teste exato de Fisher

Tabela 2 – Distribuição dos animais pelos grupos de idade de acordo com o grau de eliminação de oocistos e grau de consistência das fezes com coeficiente de correlação de Spearman ( $r_s$ ) para cada grupo. Araçatuba, 2007 ( $p > 0,05$ )

Grupo	Grau de eliminação de oocistos	Grau de consistência das fezes								Total		$r_s$ (p)
		1		2		3		4		N	%	
		N	%	N	%	N	%	N	%			
G I	0	56	38,1	21	14,3	61	41,5	3	2,0	141	95,8	0,116 (0,1624)
	1	2	1,4	-	-	-	-	-	-	2	1,4	
	2	-	-	-	-	1	0,7	1	0,7	2	1,4	
	3	-	-	-	-	1	0,7	1	0,7	2	1,4	
	Total	58	39,5	21	14,3	63	42,8	5	3,4	147	100,0	
G II	0	76	55,9	26	19,2	19	13,9	4	2,9	125	91,9	0,121 (0,1600)
	2	3	2,2	-	-	2	1,5	-	-	5	3,7	
	3	2	1,5	1	0,7	1	0,7	-	-	4	2,9	
	4	-	-	-	-	2	1,5	-	-	2	1,5	
	Total	81	59,6	27	19,9	24	17,6	4	2,9	136	100,0	
G III	0	64	52,5	22	18,0	24	19,7	-	-	110	90,2	0,044 (0,6266)
	1	4	3,3	-	-	3	2,5	-	-	7	5,7	
	2	-	-	-	-	1	0,8	-	-	1	0,8	
	3	1	0,8	-	-	1	0,8	-	-	2	1,6	
	4	2	1,6	-	-	0	0,0	-	-	2	1,6	
Total	71	58,2	22	18,0	29	23,8	-	-	122	100,0		
G IV	0	40	72,7	11	20,0	1	1,8	1	1,8	53	96,4	-0,108 (0,4345)
	2	1	1,8	-	-	-	-	-	-	1	1,8	
	3	1	1,8	-	-	-	-	-	-	1	1,8	
	Total	42	76,4	11	20,0	1	1,8	1	1,8	55	100,0	

## REFERÊNCIAS

CASEMORE, D.P.; WRIGHT, S.E.; COOP, R.L. *Cryptosporidium*- human and animal epidemiology. In FAYER,R. (Ed.). *Cryptosporidium e Cryptosporidiose*. Boca Raton,1997. p. 400-415.

CAUSAPÉ, A.C.; QUILEZ, J.; SANCHEZ, C. et al. Prevalence and analysis of potential risk factors for *Cryptosporidium parvum* infection in lambs in Zaragoza (northeastern Spain). *Vet. Parasitol.*, v.104, n.4, p.287-298, 2002

DE GRAAF, D.C.; VANOPDENBOSCH, E.; ORTEGA-MORA, L.M. A review of importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int. J. Parasitol.*, n. 29, p.1269-1287, 1999.

ELLIOT, A.; MORGAN, U.M.; THOMPSON, R.C.A. Improved staining method for detecting *Cryptosporidium* oocysts in stools using malachite green. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, v. 45, p. 139-142, 1999.

FAYER, R.; UNGAR, B.L.P. *Cryptosporidium* sp. and cryptosporidiosis. *Microbiol. Rev.*, v. 50, p. 458-483, 1986.

FAYER, R.; SANTIN, M.; TROUT, J.M. et al. Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2 year old dairy cattle in the eastern United States. *Vet. Parasitol.*, v.135, n.2, p.105-112, 2006.

FEITOSA, L.F.F.; SHIMAMURA, G.M.; ROBERTO, T. et al. Prevalência da criptosporidiose em bezerros na região de Araçatuba, Estado de São Paulo, Brasil. *Ciência Rural*, v.34, n.1, p.189-193, 2004.

FRESÁN, A. M.U.; ALAVAREZ, A.G.; GARCIA,S.F. et al. Prevalence of *Cryptosporidium spp.* in asymptomatic sheep in family flocks from México State. *J. Vet. Med.*, n..52, p. 482-483, 2005

GREEN, R.E.; AMARANTE, A.F.T.; MASCARINI, L.M. The seasonal distribution of *Cryptosporidium* oocysts in sheep raised in the state of São Paulo. *Brazil J. Vet. Parasitol.*, v.13, n.3, p. 125-127, 2004

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symp.* v. 41, p.95-98, 1999

HERMIDA, J.A.C.; WARLETA, M.G.; MEZO,M. Natural infection by *Cryptosporidium parvum* e *Giardia duodenais* in sheep and goats in Galia (Spain). *Small Ruminant Research*, v. 72, p. 96-100, 2007.

LEAV, A.B.; MACKAY, M.; WARD, H.D. *Cryptosporidium* species: New insights an old challenges. *Clinical Infectious Diseases*, v.36, p.903-906, 2003

MAJEWSKA, A.C.; WERNER, A.; SULINA, P. et.al. Prevalence of *Cryptosporidium* in sheep and goats bred on five farms in west-central region of Poland. *Vet. Parasitol.* v. 89, n. 4, p. 269-275, 2000

MARTINEZ, R.D.R.; PRIETO, R.H.P.; VERA, E. La cryptosporidiosis en los terneros recién nacidos. Su etiología, patogenia, síntomas, tratamiento y profilaxia. *Revista de Ciência y tecnologia.* v.1, n.3, p.99-108, 2001.

MEIRELES, M.V., SOARES, R.M., BONELLO,F. et al. Natural infection with zoonotic subtype of *Cryptosporidium parvum* in Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.147, p.166-170, 2007.

MELONI, B.P.; THOMPSON, R.C.A. Simplified methods for obtaining purified oocysts from mice and for growing *Cryptosporidium parvum* in vitro. *J. Parasitol.*, v. 82, p. 757-762, 1996.

ORTEGA-MORA, L.M.; WRIGHT, S.E. Age-related resistance in ovine cryptosporidiosis: patterns of infection and humoral immune response. *Infection and Immunity*, v.62, n.11, p.5003-9, 1994

QUILEZ, J.; ACEDO, C.S.; CACHO, E. Criptosporidioses de los pequenos ruminantes. *Peq. Rum.*, v.4, n.2, p.1-20, 2003.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D. C. et al. *Veterinary Medicine : a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. 9 ed. London : Baillière Tindall, 2000. 1502p.

RYAN, U.M.; FALL, A.; WARD, L. et al. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporididae) from Homo sapiens. *J. Eukaryotic Microbiol.*, v. 49, p. 433-440, 2002.

RYAN, U.M.; XIAO, L.; READ, C. et al. A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporididae) from birds. *J. Parasitolol.*, v. 89, p. 809-813, 2003.

RYAN, U.M.; MONIS, P.; ENEMARK, H.L. et al. *Cryptosporidium suis* N. SP. (apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*sus scrofa*). *J. Parasitol.*, v. 90, p.769-773, 2004

RYAN, U.M.; BATH, C.; ROBERTSON, I. et al. Sheep May Not Be an Important Zoonotic Reservoir for *Cryptosporidium* and *Giardia* Parasites. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.71, n.9, p.4992–4997, 2005.

SANTIN, M.; TROUT, J.M.; FAYER, R. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species and genotypes in sheep in Maryland. *Vet. Parasitol.*, v.146, n.1-2, p.17-24, 2007.

SAS Institute Inc., SAS OnlineDoc®, Version 8, Cary, NC: SAS Institute Inc., 1999.

SITJÀ-BOBADILLA, A.; ALVAREZ-PELLITLERO, P. Experimental transmission of *Cryptosporidium molnari* (Apicomplexa: Coccidia) to gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Parasitol. Res.*, v. 91, p. 209-214, 2003.

SOBA, B.; PETROVEC, M.; MIOC, V. et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans in Slovenia. *Clin. Microbiol. Infect.*, v.12, n.9, p. 918-921, 2006.

SULAIMAN, L.M.; LAL, A.A.; XIAO, L. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. *J. Parasitol.*, v.88, p. 388-394, 2002.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F. et al. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality tools. *Nucleic Acids Researchs*, v. 24, p. 4876-4882, 1997.

THOMPSON, R.C.A. Presidential address: rediscovering parasites using molecular tools – towards revising the taxonomy of *Echinococcus*, *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Int. J. Parasitol.*, v. 32, p. 493-496, 2002.

TZIPORI, T.; WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection*, v. 4, p. 1047-1058, 2002.

XIAO, L.; ALDERISIO, K.; LIMOR, J. et al. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. *Appl Environ Microbiol.*, v.66, p. 5492-5498, 2000.

XIAO, L.; FAYER, L.; RYAN, R. et al. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 17, p. 72-97, 2004.

ZAR, J.H. *Biostatistical analysis*. 4. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1999. 663 p.

### **CAPÍTULO 3 – TÍTULO DO TRABALHO**

#### **Avaliação das atividades séricas de gama glutamiltransferase e fosfatase alcalina e das concentrações de proteína total, imunoglobulina G e fração $\gamma$ globulina no soro sanguíneo de cordeiros**

**RESUMO** – O objetivo deste estudo foi determinar as concentrações séricas de imunoglobulina G, PT e de sua fração eletroforética  $\gamma$  globulina, assim como a atividade enzimática de GGT e FA. Estabeleceu-se a possibilidade da atividade destas enzimas ser utilizada indiretamente como indicadores de um adequado nível de proteção humoral e/ou como falha de transferência de imunidade passiva em cordeiros. Foi pesquisada a correlação entre as variáveis em quatro grupos de idade divididos em até 30 dias de vida. Para tanto, foram coletadas 191 amostras de sangue de cordeiros em 21 propriedades da região de Araçatuba - São Paulo. Realizaram-se os testes de imunodifusão radial, espectrofotometria e eletroforese para obtenção dos valores de IgG, PT e  $\gamma$  globulina, respectivamente. Para os valores da atividade de GGT e FA, foram utilizados *kits* comerciais. Houve correlação estatística significativa entre FA e GGT, fato observado também com PT, IgG e GGT. A  $\gamma$  globulina mostrou-se correlacionada com GGT, IgG e PT. A atividade de FA não deve ser utilizada como indicadora de transferência de imunidade passiva em cordeiros.

**Palavras-chave:** fosfatase alcalina, gama glutamiltransferase, imunoglobulina G, proteína total,  $\gamma$  globulina

**Evaluation of seric activities of gamma glutamiltransferase and alkaline phosphatase and of concentrations of total protein, immunoglobulin G and  $\gamma$  globulin fraction on blood sera of lamb**

**RESUMO-** The aim of this study was to determine the serum concentrations of immunoglobulin G, TP and the  $\gamma$  globulin electrophoretic fraction, as well as the enzymatic activities of GGT and ALP. This was done in order to explore the possibility of using changes in activities of these enzymes as indirect indicators of adequate humoral immunity and/or failure of immune passive transfer in lambs. Pearson correlation was performed between variable of four groups of age during the first 30 days of life. Blood samples (191) from lambs from 21 different farms in Araçatuba region- São Paulo. The following tests were performed: radial immunodiffusion, spectrophotometry and electrophoresis to stain the amount of IgG, TP and  $\gamma$  globulin, respectively. GGT and ALP values were determinate using commercial kits. There was a statistically significant correlation between ALP and GGT. The same correlation was observed from TP, IgG and GGT. A positive  $\gamma$  globulin correlation was found between GGT, IgG and TP. ALP activity cannot be used as an indicator of immune passive transfer.

**Keywords:** alkaline phosphatase, gamma glutamiltransferase, immunoglobulin G, total protein,  $\gamma$  globulin

## **Introdução**

Ao contrário do cão e do gato, que recebem imunização passiva ainda quando na vida intra-uterina, pela passagem de imunoglobulinas (Ig) do sangue materno para o feto (BRAMBELL, 1958), os bezerros, cordeiros, leitões e potros adquirem proteção imunológica exclusivamente após o nascimento, através do colostro, em virtude do tipo de placenta, que na ovelha é sindesmocorial (RADOSTITS et al., 2000). Este processo, denominado de transferência de imunidade passiva, é de extrema importância para a proteção neonatal (CAMPBELL et al., 1977).

O período crítico para os cordeiros são os primeiros dias pós-nascimento, quando estes mamam colostro insuficiente ou de baixa qualidade, em decorrência da pouca concentração de imunoglobulinas (ZARRILLI et al., 2003), da idade em que colostro é administrado (KRUSE, 1970) e do estágio metabólico do neonato, ocasionando a denominada “falha de transferência de imunidade passiva” - FTIP (QUIGLEY; DREWRY, 1998).

A concentração da Ig sangüínea às 24h pós-nascimento pode ser usada como indicadora de imunidade suficiente para melhorar as taxas de sobrevivência de cordeiros e/ou à menor susceptibilidade a doenças neonatais (REID, 1972), sendo observados valores mais elevados nos animais que sobrevivem a esta faixa etária (AHAMAD et al., 2000).

Avaliando-se amostras de sangue de cordeiros coletadas às vinte e quatro horas após o nascimento, com provável absorção das imunoglobulinas colostrais, 14% dos animais, que se apresentavam clinicamente normais, demonstraram FTIP aos exames laboratoriais. Em contraste, a FTIP foi encontrada em 46% dos cordeiros moribundos, entre 24 horas e cinco semanas de vida. Este experimento evidenciou a importância da absorção de adequada quantidade de imunoglobulinas para a sobrevivência dos neonatos nas primeiras horas de vida (SAWYER et al., 1977).

Mc Guire et al. (1983), avaliando a concentração de imunoglobulinas no soro sangüíneo de 590 ovinos, entre 24 e 36 horas de vida, observaram que a falha da transferência de imunidade passiva ocorreu em 20 animais, sendo que, destes, 45% morreram com até três semanas de idade, em contraste com os 570 cordeiros que possuíam, teoricamente, adequada transferência de imunidade passiva, e que tiveram, após as três semanas de vida, somente 5% de taxa de mortalidade.

Muitos são os métodos utilizados para se determinar as concentrações séricas de imunoglobulinas em animais neonatos, incluindo a quantificação direta de imunoglobulina G (IgG) por imunodifusão radial (MADEN et al., 2003).

Os valores limítrofes entre hipogamaglobulinemia e concentrações normais de IgG em cordeiros ainda não foram completamente definidos. Na clínica, valores séricos de IgG entre 2000 e 3000 mg/dL em animais com um a dois dias de idade são aceitos como normais (GILBERT et al., 1988). Britti et al. (2005) constataram, nesta mesma faixa etária, que um valor sérico de IgG menor do que 1000 mg/dL pode ser utilizado para determinar o risco de morte associado à FTIP.

A mensuração da proteína total (PT) no soro sangüíneo pode ser utilizada como método de avaliação indireta de IgG, associando-a à concentração total de globulinas (MADEN et al., 2003), sendo o seu valor, antes da ingestão de colostro, ao redor de 6,6 g/dL, e de 8,8 g/dL após a ingestão ter ocorrido (CZARNECKI et al., 1991), decrescendo para 7,6 g/dL, às 48 h de vida (AHAMAD et al., 2000).

Quando o soro sangüíneo é submetido à eletroforese, as proteínas se separam por carga elétrica, fazendo com que a maior parte das imunoglobulinas migrem para a classe  $\gamma$  globulina, sendo, a IgG, a classe que apresenta maior concentração na referida fração protéica (TIZARD, 1998).

Halliday (1976) demonstrou que a concentração de  $\gamma$  globulina em cordeiros que sobreviveram com até os seis meses de idade era significativamente maior aos daqueles que vieram a óbito. FindLay (1973) e Harker (1974) observaram que

a mortalidade em cordeiros estava inversamente relacionada com o nível de  $\gamma$  globulina no soro sangüíneo.

A absorção intestinal não é seletiva em ruminantes neonatais. Se o colostro for ingerido no tempo correto, algumas enzimas colostrais podem passar pela barreira intestinal usando o mesmo mecanismo das imunoglobulinas, podendo as mesmas, desta forma, também ser usadas como parâmetro de transferência de imunidade passiva (WEAVER, et al., 2000).

Em bovinos adultos, a gama glutamiltransferase (GGT) e a fosfatase alcalina (FA) são de grande importância na identificação de animais com doenças hepáticas crônicas (PEARSON; CRAIG, 1980) mas, em neonatos ruminantes, a atividade destas enzimas no soro sangüíneo pode ser utilizada como método de avaliação da transferência de imunidade passiva (BRAUN et al., 1978).

Em cordeiros, a atividade sérica de GGT em animais alimentados com colostro é 140 vezes maior do que em animais adultos. Entretanto, em indivíduos que não ingeriram colostro, a atividade sérica de GGT era similar a de adultos (BRAUN et al., 1978). Segundo Maden et al. (2003), quando os pontos de corte para a atividade de GGT são maiores que 93 UI/l e a concentração de IgG maior que 400 mg/dL, a atividade sérica de GGT possui uma sensibilidade de 100%. Segundo Britti et al. (2005), há uma correlação intensa da concentração de IgG e a atividade enzimática de GGT no primeiro e segundo dias de vida.

Os objetivos deste estudo visaram :

1. Determinar as concentrações séricas de imunoglobulina G, PT e de sua fração eletroforética  $\gamma$  globulina, assim como das atividades enzimática séricas de GGT e FA, em cordeiros com até 30 dias de idade;
2. Estabelecer a correlação entre as variáveis nas diferentes faixas etárias e demonstrar em quais grupos de estudo esta associação ocorre de forma mais evidente;

3. Avaliar se as atividades séricas das enzimas GGT e FA podem ser utilizadas indiretamente como indicadores de um adequado nível de proteção humoral e/ou como falha de transferência de imunidade passiva em cordeiros.

### **Material e Métodos**

Foram coletadas amostras de sangue de 191 cordeiros, com até 30 dias de vida, em 21 propriedades de Araçatuba e região-Estado de São Paulo. Os animais eram mantidos sob os regimes de criação intensiva (4 propriedades), semi-intensiva (8 propriedades) e extensiva (9 propriedades).

Estes animais foram divididos em quatro grupos, de acordo com a faixa etária, a saber: G1 0-7 dias de vida (n=50); G2 8-15 dias (n=50); G3 16-22 dias (n=50) e G4 23-30 dias (n=41), escolhidos aleatoriamente, de acordo com a sua disponibilidade no local, sem distinção ao sexo ou à raça e histórico de ingestão de colostro ou enfermidades.

As coletas de sangue foram realizadas após anti-sepsia local por punção da veia jugular, utilizando-se, para tanto, agulhas 25 x 8mm, acopladas a tubos à vácuo, e o sangue mantido à temperatura ambiente até a retração do coágulo. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 3000 r.p.m. durante cinco minutos, e o soro transferido para um tubo de polipropileno, sendo congelado imediatamente a -20°C, até o momento de seu processamento.

Em todas as amostras coletadas, foram mensuradas as atividades séricas de GGT seguindo a metodologia de Szasz (1969), e de FA, segundo as recomendações de McComb et al. (1981), com o uso de analisador bioquímico automático (Biosystems BTS 370 – Automatic Analyser), utilizando-se *kits* comerciais (GGT Labtest, Cod. 105 e FA, Labtest, Cód. 40).

Para a quantificação da IgG no soro sangüíneo, foi realizado o teste de imunodifusão radial através do Vet-Rid Kit para ovinos (Bethyt, Cód. R50-100), em

22 animais pertencentes a cada um dos quatro grupos de idade, utilizando-se a metodologia empregada por Fahey e McKelvey (1965).

A PT foi determinada através do método de biureto preconizado por Gornall et al. (1949), utilizando-se, para tanto, um espectrofotômetro digital SB-190, marca CELM em 26 animais de G1, 42 animais de G2, 40 animais de G3 e 36 animais de G4. A migração eletroforética para separação da fração  $\gamma$  do soro sangüíneo destes mesmos animais foi efetuada segundo as técnicas descritas por Friedman (1961) e Kremers et al. (1967), com as seguintes modificações: em cubas para eletroforese Colab, foram estendidas fitas de acetato de celulose de 2,5 x 14,0 cm, umidecida com solução tampão; sobre as mesmas foi colocado, na extremidade correspondente ao ânodo, 1 microlitro da amostra de soro. Ao sistema preparado com tampão barbital, de pH 8,6 e força iônica correspondente a 0,05, aplicou-se uma corrente de 220 volts para cada corrida eletroforética, durante 35 minutos. Após a separação da fração protéica, fez-se a coloração das tiras, com Ponceau "S", durante 15 minutos, seguida da lavagem com solução de ácido acético a 5% em água destilada e posterior desidratação, durante dois minutos, com metanol. Na fase seguinte, as tiras foram diafanizadas, durante dois minutos, com a seguinte solução: 83 partes de metanol, 16 partes de ácido acético glacial e uma parte de glicerina P.A. As tiras, posteriormente, foram estendidas entre as placas de vidro, e mantidas aquecidas em estufa a 80 - 90° C, até a sua completa transparentização. A separação e quantificação da fração  $\gamma$  foram realizadas por fracionamento em aparelho de densitometria através do programa Multi analystt (Bio- rad Laboratories, Hercules, CA).

A análise estatística constituiu-se do Teste de Kruskal-Wallis e teste de comparações múltiplas de Dunn nas diferentes idades, para as diferentes variáveis (PT, fração  $\gamma$  globulina, GGT, FA e IgG). O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para avaliar, dentro de cada grupo de idade, a associação entre as diferentes variáveis.

As estatísticas foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$  e

efetuada empregando-se o programa SAS (Statistical Analysis System).

### **Resultados e Discussão**

Como observado na Tab.1, não houve diferença estatística significativa entre os grupos de idade em relação à PT. Ao analisar os valores absolutos para esta variável, é possível observar que, em G1, nove dos 26 cordeiros apresentavam valor de PT sérica menor que 5,0 g/dL, valor este que, segundo Radostits et al. (2000) representaria a ocorrência de FTIP. Neste mesmo grupo de idade, somente dois dos 26 animais possuíam concentrações séricas de PT maior que 7,0 g/dL, discordando de Ahamad et al. (2000), que observaram valores em torno de 7,6 g/dL, às 48 h de vida, sendo maiores naqueles cordeiros que sobreviveram ao período pós natal.

No segundo grupo de idade, somente dez (10/42) cordeiros demonstraram FTIP e, em nenhum dos animais deste grupo, o valor de PT foi superior a 8,0 g/dL, o que contraria os resultados de Czarnecki et al. (1991), que constataram estabilização dos valores de PT sérica ao final da segunda semana de vida, com valor médio de 8,3 g/dL.

Nos animais do G3, três dos 40 cordeiros analisados demonstraram PT com valor sérico menor que 5,0 g/dL, indicando diminuição do número total de animais com hipoproteinemia em relação aos dos animais do G2, pela possível produção protéica endógena que ocorre fisiologicamente nos mesmos durante a referida faixa etária.

Em G4, o número de animais com PT sérica menor que 5,0 g/dL elevou-se para dez (10/36), provavelmente em decorrência de anemia por parasitose, enfermidade comum em cordeiros com esta faixa de idade.

Em todos os grupos houve forte correlação estatística positiva entre as variáveis PT e GGT (Tab. 4), fenômeno explicado pelo fato destas macromoléculas serem absorvidas logo após a ingestão do colostro durante a fase de permeabilidade intestinal neonatal.

Houve correlação estatística positiva em G1, G2 e G3 entre os valores de PT e as concentrações séricas de IgG, e desta com a fração  $\gamma$  globulina (Tab. 4), fato justificado por Tizard (1998), que afirmou que as IgGs constituem a maior parte da fração protéica  $\gamma$  globulina.

Os valores de  $\gamma$  globulina observados nos grupos de idade um e quatro diferiram estatisticamente (Tab.1), sendo menores nos animais mais velhos em decorrência da degradação protéica após a cessação da ingestão de colostro, por ser a meia vida plasmática da IgG de 20 dias, aproximadamente.

Vihan (1988) demonstrou que, de zero a três dias de vida, os cordeiros possuíam uma concentração média de  $\gamma$  globulina sérica igual a 2,2 g/dL, valor bem superior ao dos animais do primeiro grupo de idade deste estudo, cuja média de  $\gamma$  globulina foi 1,3 g/dL. Segundo este mesmo autor, aos 30 dias, estes valores decresciam para 0,6 g/dL, sendo esse teor menor ao observado nos animais do G3 (1,0 g/dL) e G4 (0,8 g/dL).

A fração  $\gamma$  Globulina também apresentou correlação estatística positiva com a GGT em todos os grupos de idade (Tab. 4). Ao contrário de Pauli (1983), não foi evidenciada qualquer associação entre FA e  $\gamma$  globulina no soro sangüíneo de cordeiros após a ingestão de colostro (Tab. 4). Porém, vale ressaltar que tal correlação foi constatada pelo autor supra citado em bezerros com até um dia de vida, podendo, dessa forma, haver influência da espécie envolvida.

Cordeiros com concentrações séricas iguais ou superiores a 0,5g/dL de  $\gamma$  globulina, às 24 horas de vida, possuem maiores chances de sobreviver ao período pós-natal (VIHAN, 1988). Em nenhum dos animais incluídos neste estudo observou-se sintoma e/ou indício de qualquer doença, sendo o valor de  $\gamma$  globulina inferior ao recomendado por este autor em um dos 26 cordeiros de G1; seis (6/42) em G2; dois (2/40) em G3; e quatro (4/36) em G4.

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos de idade para IgG devido ao valor elevado desta classe de imunoglobulina no soro sangüíneo dos cordeiros. Mas há redução gradativa nos valores mínimos do primeiro para o

quarto grupo de idade, sendo o valor, em G1, aproximadamente quatro vezes maior que em G4 (Tab. 3).

Como demonstrado na Tab. 2, houve diferença estatística significativa de GGT entre os grupos 1, 2 e 4, mais evidente entre os animais do G1 e do G4, já que a atividade sérica desta enzima era, em média, cerca de oito vezes menor nos animais de idade mais avançada, podendo esta diminuição decorrer da degradação e/ou diminuição da absorção enzimática durante os primeiros 30 dias de idade (THOMPSON; PAULI, 1981).

Ao analisar os dados individuais da atividade enzimática de GGT sanguínea sérica, a maior parte dos animais possuía valores entre 100 e 500UI/L. Nos animais de G1 observou-se que sete dos 50 cordeiros demonstravam valores maiores que 1000 UI/L, e somente um animal poderia ser considerado como portador de FTIP, caso a classificação de Radostits et al. (2000) fosse tomada como referência, pois o cordeiro apresentava atividade sérica de GGT inferior a 50 UI/L.

Em G2, dois (2/50) cordeiros analisados não apresentaram adequado nível de proteção humoral. Em G3 e G4, os valores encontravam-se, em sua maior parte, entre 50 a 100 UI/L. Em G3, quatro (4/50) cordeiros foram portadores de FTIP e, em G4, três (3/50) demonstraram este mesmo fenômeno. Nenhum animal de G4 demonstrou valores acima de 500 UI/L.

Constatou-se correlação estatística entre a atividade enzimática sérica de GGT e os níveis de IgG nos soros sangüíneos de animais que possuíam entre oito a 15 dias de idade (Tab. 4), demonstrando que a GGT pode ser utilizada como indicadora indireta de falha de transferência de imunidade em animais mais velhos, discordando dos achados de Maden et al. (2003) que evidenciaram, em cordeiros, forte correlação entre estas duas variáveis, desde o momento do nascimento até os três dias de vida.

Não foi observado, neste estudo, correlação estatística significativamente positiva entre a enzima FA com a IgG, PT e  $\gamma$  globulina em cordeiros com até 30

dias de idade (Tab. 4). Constatação semelhante foi verificada por Britti et al. (2005) que mencionaram discreta correlação entre a atividade de FA e a concentração de IgG sérica no primeiro dia de vida, sendo, que, em cordeiros com esta mesma faixa etária, o aumento da referida enzima no soro sangüíneo não refletiu proporcionalmente e quantitativamente sua atividade na secreção colostrada de suas mães.

Embora sem representação estatística significativa, é possível observar uma diminuição da concentração de FA de G1 para G2. Deste último grupo para o G3, constatou-se discreta elevação, diminuindo, a partir de então, nos animais do G4, com significado estatístico em relação aos demais grupos (Tab. 2).

De acordo com Britti et al. (2005), a atividade sérica de FA no primeiro e segundo dias de vida dos cordeiros estaria em torno de 1100 UI/L. Ao analisar os valores individuais em G1, observou-se que 29 animais (29/50) possuíam valores séricos compreendidos entre 500 e 1000 UI/L, e sete animais (7/50) apresentavam atividade sérica de FA entre 1000 e 1493 UI/L. Nos animais do grupo 2, observaram-se concentrações séricas compreendidas entre 500 e 1000 UI/L e de 1000 e 1236 UI/L, respectivamente, em 31 e quatro animais. No G3, apenas três (3/50) animais eram portadores de teores séricos de FA maiores de 1000 UI/L.

Nenhum animal do G4 apresentou atividade sérica de FA maiores do que 1000 UI/L, sendo a maior parte das amostras analisadas com valores menores que 500 UI/L. Esta expectativa de diferença estatística nos níveis de FA em decorrência do fator etário não foi observada, possivelmente em virtude da drástica alteração enzimática que ocorre em um período muito curto de vida do animal (RENDEL et al., 1964) e pelos elevados desvios padrões encontrados neste estudo, principalmente nas amostras dos animais pertencentes ao G1.

**Conclusões**

- As concentrações séricas de IgG e de proteína total não apresentaram influência do fator etário em cordeiros com até 30 dias.
- Ao contrário da GGT, a atividade de FA não deve ser utilizada como indicadora indireta de transferência de imunidade passiva em ovinos

Tabela 1- Distribuição dos animais através da Média ( $\bar{x}$ ), desvio-padrão (s) e mediana (Md) de PT (g/dL) e  $\gamma$  Globulina (g/dL), segundo os grupos de idade Araçatuba, 2007

Grupo	PT		$\gamma$ Globulina	
	$\bar{x} \pm s$	Md	$\bar{x} \pm s$	Md
G1	5,56 $\pm$ 1,06	5,60 a	1,38 $\pm$ 0,85	1,32 a
G2	5,64 $\pm$ 0,74	5,85 a	1,01 $\pm$ 0,42	1,00 ab
G3	5,68 $\pm$ 0,66	5,60 a	1,08 $\pm$ 0,41	1,01 ab
G4	5,36 $\pm$ 0,76	5,40 a	0,88 $\pm$ 0,36	0,84 b

Medianas seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

Tabela 2- Distribuição dos animais através Média ( $\bar{x}$ ), desvio-padrão (s) e mediana (Md) de GGT (UI/L) e FA (UI/L), segundo os grupos de idade Araçatuba, 2007

Grupo	GGT		FA	
	$\bar{x} \pm s$	Md	$\bar{x} \pm s$	Md
G1	733,50 $\pm$ 1827,16	203,65 a	868,53 $\pm$ 1580,95	659,25 a
G2	161,94 $\pm$ 131,72	109,50 b	592,50 $\pm$ 280,53	572,15 a
G3	129,62 $\pm$ 138,80	85,90 bc	609,17 $\pm$ 327,52	584,55 a
G4	93,35 $\pm$ 82,31	69,99 c	402,67 $\pm$ 210,63	373,10 b

Medianas seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

Tabela 3- Distribuição dos animais através do Mínimo (Min), máximo (Max) e mediana (Md) de IgG (mg/dL), segundo os grupos de idade Araçatuba, 2007

Grupo	IgG		
	Min	Max	Md
G1	510	>1000	>1000 a
G2	248	>1000	>1000 a
G3	320	>1000	>1000 a
G4	135	>1000	885 a

Medianas seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

Tabela 4- Coeficiente de correlação de Spearman entre os valores das variáveis: GGT, IgG, PT,  $\gamma$  Globulina e FA, segundo os grupos de idade Araçatuba, 2007

Grupo	Variável	Variável				
		GGT	IgG	PT	$\gamma$ Globulina	FA
G1	GGT	1	0,341	0,499*	0,644*	0,315*
	IgG		1	0,565*	0,706*	0,072
	PT			1	0,895*	-0,103
	$\gamma$ Globulina				1	-0,203
	FA					1
G2	GGT	1	0,542*	0,459*	0,548*	0,375*
	IgG		1	0,825*	0,809*	0,265
	PT			1	0,884*	0,254
	$\gamma$ Globulina				1	0,208
	FA					1
G3	GGT	1	0,322	0,594*	0,647*	0,349*
	IgG		1	0,480*	0,473*	0,288
	PT			1	0,756*	0,220
	$\gamma$ Globulina				1	0,056
	FA					1
G4	GGT	1	0,232	0,608*	0,609*	0,272
	IgG		1	0,208	0,332	-0,176
	PT			1	0,837*	0,093
	$\gamma$ Globulina				1	0,056
	FA					1

\*  $p < 0,05$

## REFERÊNCIAS

AHAMAD, R.; KHAN,A.; MUHAMMAD,T.J. et al. The level of immunoglobulins in relation to neonatal lamb mortality in Pak-Karakul sheep. *Veterinarski Arhiv* v. 70, p. 129-139, 2000.

BRAMBELL, F.W.R. The passive immunity of the young mamal. *Biological Reviews*, v.33, p. 488 - 531, 1958.

BRAUN, J.P.; RICO, A.G.; BERNARD, P. et al. Tissue and blood distribution of gamma-glutamyl transferase in the lamb and in the ewe. *Res. Vet. Sci.*, v. 25, p.25-37, 1978.

BRITTI, D.; MASSIMINI, G.; PELI, A, et al. Evaluation of serum enzyme activities as predictors of passive transfer status in lamb. *JAVMA*, v. 226, p. 951-955, 2005.

CAMPBELL, S.G.; SIEGEL, M.J.; KNOWLTON, B.J. Sheep immunoglobulin and their transmission to the neonatal lamb. *N. Z. Vet. J.*, v.25, p. 361-365, 1977.

CZARNECKI, A.; GLUSZAK, A.; LAW, K.R.W. et al Changes in erythrocytes, leukocytes and immunoglobulins in Polish lowland long wool lambs during the postnatal period. *Ve.t Bull.*, v. 61, p. 5225, 1991

FAHEY, J.L.; McKELVEY, E.M. Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody agar plates *J. Immunology*, v. 94, p. 84, 1965 a

FINDLAY,C.R. Serum immune globulin levels in labs under a week old. *Vet. Rec.* v. 92, p. 530-532, 1973

FRIEDMAN, H.S. A standardized procedure for serum protein electrophoresis on cellulose acetate membrane strips. *Clinica Chimica Acta*, v. 6, p. 775-781, 1961.

GILBERT, R.P.; GASKINS, C.T.; HILLERS, J.K. et al. Genetic and environmental factors affecting immunoglobulin G1 concentration in ewe colostrums and lam serum. *J. Anim. Sci.* v.66, p. 855-863, 1988.

GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M. Determination of serum protein by means of biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*, v. 177, p. 751-766, 1949.

HALLIDAY, R. Variation in immunoglobulin concentration in Finnish Dorset Horn lambs. *Res. Vet. Sci.* v. 21, p. 331-334, 1976

HARKER, D.B. Serum immunoglobulin levels in artificially reared lambs. *Vet. Res.* v. 95, p. 229-231, 1974.

KREMERS, B.; BRIERE, R.; BATASAKIS, J.G. Reflectance densitometry of cellulose acetate protein electrophoresis. *American Journal of Medical Technology*, v. 33, p. 28-34, 1967.

KRUSE, V. Absorption of immunoglobulin from colostrums in the newborn calves. *Animal Production* v.12, p. 627-638, 1970

MADEN, M.; ALTUNOK, V.; IRDANE, F.M.B et al. Blood and colostrums/ milk serum Gamma Glutamytransferase activity as a predictor of passive transfer status in lambs. *J. Vet. Med. Series B.* v. 50, p. 128-137, 2003

Mc GUIRE, T.C.; REGNILER, J.; KELLOM, T. et al. Failure in passive transfer of immunoglobulin G1 to lambs: measurement of immunoglobulins in ewe colostrum. *Am. J. Vet. Res.* v.44, n.6, p.1064-1067.1983.

MCCOMB, R.B.; BOWER, G.N.; UPRETTI, A. 4-nitrophenyl phosphatase characterization of high-purity materials for measuring alkaline. *Clin. Chem.* v. 27, p.135-141, 1981

PAULI, J.V. Colostral transfer of gamma glutamyl transferase in lambs. *N.Z.Vet. J.* v.31, p.150-151, 1983

PEARSON, E. G.; CRAIG, A. M. Diagnosis of liver disease in equine and food animals. *Mod. Vet. Pract.*, v.61, p. 233-237, 1980.

QUIGLEY, J.D.; DREWRY, J.J. Nutrient and immunity transfer from cow to calf pre and postcalving. *Journal of dairy Science.* v.81, p. 2779-2790, 1998.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D. C. et al. *Veterinary Medicine : a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses.* 9 ed. London : Baillière Tindall, 2000. 1502p.

REID, J.F.S. Serum immune globulin concentration of newborn Hill lambs. *Vet. Rec.* v. 90, p. 371-372, 1972

RENDEL, J., AALUND, O., FREEDIAND, R. A. et al. The relationship between the alkaline phosphatase polymorphism and blood group O in sheep. *Genetics*, n.50, p.973-986, 1964.

SAS Institute Inc., SAS OnlineDoc®, Version 8, Cary, NC: SAS Institute Inc., 1999.

SAWYER, M.; WILLADSEN, C.H.; OSBURN, B.I. et al. Passive transfer of colostral immunoglobulin from ewe to lambs and its influence on neonatal lambs mortality. *J.am. Vet. Med. Assoc.* v.171, n.12, p.1255-1259, 1977.

SZASZ, G. A kinetic photometric method for serum gamma-glutamyl transpeptidase, *Chin. Chem.* v.15, p. 124-136, 1962.

TZARD, I.R. *Imunologia Veterinária*. 5 ed. São Paulo, 1998.544 p.

VIHAN, V.S. Immunoglobulins levels and their effect on neonatal survival in sheep and goats. *Small Ruminant Research*. v.1, p. 135-144, 1988.

WEAVER, D.M.; TYLER, J.W.; VANMETRE, D.C. et al Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. *J. Vet Intern. Med.* v.14, p. 569-577, 2000.

ZARRILLI, A.; MICERA, E.; LACARPIA, N, et al. Evaluation of ewe colostrum quality by estimation of enzyme activity levels. *Revue Med. Vet.* v..8-9, p. 521-523, 2003.