UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CAMPUS DE ARAÇATUBA

OCORRÊNCIA DE PARASITOSES GASTRINTESTINAIS EM CORDEIROS NO MUNICÍPIO DE ALAMBARI, SÃO PAULO

Anaiza Simão Zucatto

Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CAMPUS DE ARAÇATUBA

OCORRÊNCIA DE PARASITOSES GASTRINTESTINAIS EM CORDEIROS NO MUNICÍPIO DE ALAMBARI, SÃO PAULO

Anaiza Simão Zucatto

Orientadora: Profa. Adj. Katia Denise Saraiva Bresciani

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

ARAÇATUBA – SP

2013

Catalogação na Publicação (CIP)
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Zucatto, Anaiza Simão

Z941o Ocorrência de parasitoses gastrintestinais em cordeiros no município de Alambari, São Paulo / Anaiza Simão Zucatto.

Araçatuba: [s.n], 2013.

56f. il.; + CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2013
Orientador: Profa Adj. Katia Denise Saraiva Bresciani

1. *Cryptosporidium* spp. 2. Ovinos. 3. Caracterização molecular. 4. Helmintos. 5. *Eimeria* spp.

CDD 599.649

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Ocorrência de parasitoses gastrintestinais em cordeiros no Município de Alambari, São Paulo.

AUTORA: ANAIZA SIMÃO ZUCATTO

ORIENTADORA: Dra. KÁTIA DENISE SARAIVA BRESCIANI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL (MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.

Dr. JANCARLO FERREIRA GOMES

Dra. SUELY REGINA MOGAMI BOMFIM

Dra. KÁTIA DENISE SARAIVA BRESCIANI

DATA DA REALIZAÇÃO: 26 de abril de 2013.

Presidente da Comissão Examinadora
Dra. KÁTIA DENISE SARAIVA BRESCIANI
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANAIZA SIMÃO ZUCATTO – Natural de Palmeira d'Oeste, São Paulo, 27 de dezembro de 1985, filha de Cláudio Tadeu Zucatto e Ofélia Mansano Simão Zucatto. Em 2004, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Camilo Castelo Branco (UNICASTELO), cidade de Fernandópolis, São Paulo. Graduou-se como Médica Veterinária em 29 de dezembro de 2008 (data da conclusão de curso). Realizou residência médico-veterinária na área de Diagnóstico Veterinário (patologia clínica) no Hospital Veterinário Luis Quintiliano de Oliveira, na Universidade Estadual Paulista, Campus de Araçatuba, com início em fevereiro de 2009 e término em janeiro de 2011. Ingressou no curso de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal, na Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP, Campus de Araçatuba – SP, em março de 2011, sob orientação da Professora Adjunto Katia Denise Saraiva Bresciani.

“Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades para a sua própria produção ou a sua construção.”

(Paulo Freire)

Aos meus pais, Cláudio e Ofélia, pela dedicação, amor e incentivo em todas as minhas decisões.

Aos meus irmãos, pelo carinho e apoio.

Ao meu querido namorado, Luis Fernando, pela paciência e compreensão.

À querida professora Katia, pela oportunidade, confiança e amizade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que cuida de mim em todos os aspectos, pela presença constante as minhas batalhas e as minhas guerras. Este é o Deus que me reveste de forças e me sustém com mãos fortes, me dando coragem e sabedoria todos os dias!

Aos meus queridos pais, muito obrigada pelo apoio incondicional, pelo amor, compreensão, ensinamentos e por serem essenciais no cumprimento de mais esta etapa.

Aos meus adorados irmãos, pela amizade e convívio.

Ao meu querido namorado, pelo amor, confiança e companheirismo por estes longos anos de minha vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, pelo apoio e estrutura oferecida para a realização do curso de Mestrado.

À minha querida orientadora, Prof. Katia Bresciani, modelo de excelência profissional, por ter me recebido e aberto a porta para esta oportunidade, por todo apoio, por ter acreditado em meu trabalho. Obrigada pela orientação, paciência, compreensão e ensinamentos.

Ao Prof. Marcelo Vasconcelos Meireles, pela oportunidade de trabalharmos ao Laboratório de Ornitopatologia. Pela competência, paciência e ensinamentos durante o desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos meus queridos amigos e colegas de residência e mestrado (Monally, Vanessa, Breno, Renata, Luis e Jucilene) pela convivência agradável, pelos momentos compartilhados de estresse e também de alegria e descontração. São pessoas muito especiais para mim! Muito obrigada pela imensa ajuda na execução do projeto, pelo companheirismo, força, pelas palavras de ânimo e incentivo, por desprender o tempo de cada uma em função da minha causa.

À querida professora Suely, não somente Professora é também amiga e companheira; esteve presente em todos os momentos desta jornada. Um exemplo de profissional, de mãe, de perseverança e dedicação que muito me ensinou. Mulher guerreira! Minha grande incentivadora a trilhar os caminhos do ensino e da pesquisa.

Aos colegas e colaboradores dessa pesquisa: Monally Conceição Costa Aquino, Sandra Valéria Inácio e Renata Nogueira Figueiredo pela dedicação e por todos os momentos compartilhados nesta pesquisa.

Ao laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, ao Professor Dr. Jesus Aparecido Ferro e a técnica Dra. Agda Facincani, que realizou parte do meu projeto com competência, disponibilidade e pontualidade.

À Profa. Suely Regina Mogami Bomfim e ao Prof. Cecílio Veiga Soares Filho por participarem da minha banca de qualificação, colaborando imensamente com sugestões e auxiliando na correção do artigo científico.

À Professora Sílvia Perri pela realização da análise estatística, paciência e disponibilidade.

Aos Produtores Rurais de Alambari, SP, pela humildade em colaborar, concedendo os animais para este experimento.

À família Bresciani pela estadia, confiança e carinho.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado durante o primeiro ano do curso.

À FAPESP pela concessão do auxílio financeiro (processo número 2010/52542-3) e pela bolsa de Mestrado (processo número 2010/13946-1).

A todos aqueles que por algum motivo não tiveram seus nomes aqui mencionados, mas que contribuíram diretamente ou indiretamente na minha formação pessoal e acadêmica.

SUMÁRIO

Página

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS..... **12**

1 INTRODUÇÃO..... **12**

2 REVISÃO DE LITERATURA..... **14**

2.1 Helmintoses gastrintestinais dos ruminantes..... **14**

2.2 Protozooses intestinais em ruminantes..... **16**

2.2.1 Eimerioses..... **16**

2.2.2 Criptosporidiose..... **18**

3 OBJETIVO..... **23**

REFERÊNCIAS..... **23**

CAPÍTULO 2 – OCORRÊNCIA DE PARASITOSES GASTRINTESTINAIS EM CORDEIROS NO MUNICÍPIO DE ALAMBARI, SÃO PAULO..... **35**

1 INTRODUÇÃO..... **36**

2 MATERIAL E MÉTODO..... **38**

2.1 Colheita das amostras..... **38**

2.2 Técnicas Coproparasitológicas..... **39**

2.3 Técnica de esporulação e identificação das espécies de *Eimeria* spp. **40**

2.4 Extração de DNA genômico..... **40**

2.5 Reação de *nested* PCR..... **40**

2.6 Sequenciamento dos fragmentos amplificados..... **41**

2.7 Alinhamento e tradução das sequências..... **41**

2.8 Análise estatística..... **41**

3 RESULTADOS..... **42**

4 DISCUSSÃO..... **44**
5 CONCLUSÃO..... **48**
REFERÊNCIAS..... **49**

OCORRÊNCIA DE PARASITOSES GASTRINTESTINAIS EM CORDEIROS NO MUNICÍPIO DE ALAMBARI, SÃO PAULO

RESUMO – O objetivo desta pesquisa foi determinar a ocorrência de parasitoses gastrintestinais e caracterizar molecularmente as espécies de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de cordeiros de até um ano de idade do município de Alambari, São Paulo. Um total de 193 amostras foram colhidas e em 126 das mesmas foi efetuada a contagem de ovos por gramas de fezes (OPG) Gordon e Whitlock (1939), para determinar a presença de helmintos e coccídeos do gênero *Eimeria*. Todas as amostras, foram avaliadas por meio da *nested*-PCR para amplificação de fragmentos de DNA da subunidade 18S do gene do RNAr para *Cryptosporidium*. Por meio do teste Qui-Quadrado e/ou Fisher foi verificada a associação da presença das parasitoses gastrintestinais em relação ao sexo, raça e idade dos animais. Das 126 amostras analisadas, 71,4% foram positivas pelo método de OPG, com identificação de 58,9% de ovos de Estrongilídeos; 5,6% de oocistos de *Eimeria* spp.; coinfecções em, 14,4% de Estrongilídeos e *Moniezia* spp.; e 15,5% Estrongilídeos e *Eimeria* spp., e 5,6% infecção pelos três parasitos. Coproculturas foram positivas em 16 amostras, com observação dos gêneros: 31,3% *Haemonchus* spp.; 12,5% *Trichostrongylus* spp.; *Oesophagsotumum* spp. em apenas uma; e infecção mista em 50% por *Haemonchus* e *Trichostrongylus*. Para *Eimeria* spp., a ocorrência foi de 19% dos animais, identificando as espécies: *E. crandallis*; *E. faurei*; *E. marsica; E. ovinoidalis*; *E. pallida*; *E. parva e E*. *weybridgensis.* A nPCR revelou positividade de 15% e o sequenciamento foi possível em 19 amostras, com detecção das espécies: *C. xiaoi* em 15 amostras, *C. ubiquituim* em três, e *C. meleagridis* em uma amostra, sendo estas duas últimas consideradas espécies zoonóticas.

Palavras-Chave: *Cryptosporidium* spp., ovinos, caracterização molecular, helmintos, *Eimeria* spp.

OCCURRENCE OF GASTROINTESTINAL PARASITES IN LAMBS IN THE MUNICIPALITY OF ALAMBARI, SÃO PAULO

ABSTRACT – The objective of this research was to determine the occurrence of gastrointestinal parasites and molecularly characterize the species of *Cryptosporidium* spp. in stool samples from lambs under one year old in the city of Alambari, São Paulo. A total of 193 samples were collected in 126 and the same was done counting eggs per gram of feces (EPG) Gordon and Whitlock (1939), to determine the presence of helminths and coccidia of the genus *Eimeria*. All samples were evaluated by nested-PCR amplification of DNA fragments subunit 18S rRNA gene for *Cryptosporidium*. By using the Chi-square and/or Fisher was significant association of the presence of intestinal parasites in relation to gender, race and age of the animals. Of the 126 samples analyzed, 71.4% were positive by OPG, identifying 58.9% of eggs of Strongyles, 5.6% of oocysts of *Eimeria* spp.; Coinfection in 14.4% of Strongyles and *Moniezia* spp., and 15.5% Strongyles and *Eimeria* spp., and 5.6% infection by the three parasites. Stool cultures were positive in 16 samples, with observation of genres: 31.3% *Haemonchus* spp., 12.5% *Trichostrongylus* spp.; *Oesophagsotumum* spp. in one, and 50% mixed infection with *Haemonchus* and *Trichostrongylus*. To *Eimeria* spp., the incidence was 19% of the animals, identifying the species: *E. crandallis; E. faurei; E. marsica; E. ovinoidalis; E. pallida; E. parva* and *E. weybridgensis*. The nPCR was positive in 15% and sequencing was performed in 19 samples with detection of species: *C. xiaoi* in 15 samples, *C. ubiquituim* three, and *C. meleagridis* in a sample, the latter being considered zoonotic species.

Keywords – *Cryptosporidium* spp., sheep, molecular biology, helminths, *Eimeria* spp.

Capítulo 1

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a ovinocultura caracteriza-se pela exploração de carne, de leite e de pele (VIEIRA, 2005). A criação de pequenos ruminantes domésticos é uma atividade de grande importância socioeconômica, realizada em todos os continentes, especialmente na maioria dos países que possuem regiões de climas áridos e semiáridos (LEITE, 2007).

As infecções por nematóides têm representado uma das principais entraves à expansão da ovinocultura em nosso país (AMARANTE et al., 2004). Helmintoses gastrintestinais em ruminantes ocasionam perdas econômicas consideráveis, com acentuado comprometimento da produtividade destes animais, especialmente em sistemas de manejo ou programas de controle parasitários deficientes (SCHEUERLE, 2009).

Parasito hematófago do abomaso, *Haemonchus contortus,* causa quadros de anemias severas, caracterizado pela palidez das mucosas e edemas submandibular. *Trichostrongylus colubriformis* produz enterite, atrofia das vilosidades e consequentemente diminuição da digestão e absorção de nutrientes. Outra espécie importante é *Oesophagostumum columbianum* pela sua grande patogenicidade, que causa uma enfermidade aguda devido às larvas histotróficas se localizam no intestino delgado e grosso. Estas ocasionam a formação de nódulos, que podem evoluir para fibrose ou para abscessos na parede intestinal, além de provocar diarreias graves nos animais, podendo causar a morte dos mesmos (OLIVEIRA-SEQUEIRA; AMARANTE, 2001).

Protozoário distribuído mundialmente, *Eimeria* spp. destaca-se por ser uma importante doença entérica, causada por parasitos obrigatórios. Doença considerada insidiosa, esta coccidiose pode manifestar-se em diversos graus de infecção, sendo que os sinais clínicos variam de assintomático a severa

diarreia, com sangramento e lesão a mucosa intestinal. A fase mais comum da eimeriose é a subclínica, na qual não é facilmente diagnosticada e seu efeito tem impacto considerável em termos de eficiência de produção e saúde do rebanho. Os prejuízos ocorridos são significativamente maiores por diminuição da taxa de desenvolvimento, no ganho de peso e susceptibilidade a doenças em animais afetados que propriamente podem ocasionar a morte (VIEIRA, 2005).

Protozoários do gênero *Cryptosporidium* são parasitos intracelulares obrigatórios que pertencem ao filo Apicomplexa, capazes de parasitar as microvilosidades das células epiteliais do trato intestinal de hospedeiros vertebrados, incluindo o homem (XIAO et al., 2004).

Em relação à sua importância em Saúde Pública, com o surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, na década de 1980, relatos de infecções oportunistas foram associados à criptosporidiose e este parasito passou a ser considerado um importante patógeno em seres humanos, estando às infecções mais graves associadas geralmente a situações de imunodeficiência e imunocomprometimento (FAYER, 2010).

Devido à habilidade desse parasito infectar diversos hospedeiros e a sua presença constante no ambiente, pessoas podem adquirir a infecção por diversas formas, como por contato direto com pessoas (antroponótica) ou animais (zoonótica) infectados e ingestão de alimentos ou água contaminados (XIAO, 2010). Infecções humanas são mais frequentes em países em desenvolvimento, afetando particularmente crianças desnutridas (BERRILLI et al., 2012) e com falta de higiene que deverá apresentar maturidade imunológica.

Numerosos surtos causados pela contaminação de alimentos ou água (potável ou de recreação) por oocistos de *Cryptosporidium* já foram relatados em diversos países (SMITH; NICHOLS, 2010). A transmissão dessa infecção por veiculação hídrica é particularmente importante, devido à resistência dos oocistos aos tratamentos convencionais de água e pela capacidade de

distribuição em massa à população a partir de água de beber (KARANIS et al., 2007).

Devido à estreita relação deste protozoário com o saneamento básico deficiente e com o baixo poder aquisitivo populacional, *Cryptosporidium* foi incluído na Iniciativa das Doenças Negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (*World Health Organisation Neglected Diseases Initiative*) (SAVIOLI et al., 2006).

A transmissão zoonótica, mais frequente por *C. parvum,* está associada principalmente aos ruminantes (XIAO et al., 2004) que são considerados importantes reservatórios dessa espécie (XIAO; FAYER, 2008). Infecções zoonóticas por contato direto com animais tem sido documentadas, mas a relativa importância desse tipo de transmissão ainda não está clara (XIAO et al., 2004).

Considerando-se a importância que as parasitoses gastrintestinais ovinas assumem dentro da medicina veterinária preventiva e a elevada ocorrência das mesmas, foi realizada a presente pesquisa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Helmintoses gastrintestinais dos ruminantes

Os trichostrongilideos são vermes pequenos, frequentemente capilariformes, com bolsa copuladora e excetuando-se o verme pulmonar *Dictyocaulus*, parasitam o trato digestivo de animais e aves. Os gêneros mais importantes em ruminantes são *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Cooperia*, *Nematodirus* e *Ostertagia* (URQUHART et al., 1998). Em relação à posição sistemática dos nematódeos, esses parasitos são classificados dentro do Filo Nematoda, Superfamilia Trichostrongyloidea e Família Trichostrongylidae (URQUHART et al., 1998).

Resistência de ovinos à infecção por *Trichostrongilideos* foi correlacionada a variações sazonais (GASTALDI et al., 2001), a determinados

padrões raciais (AMARANTE et al., 2004), a fatores genéticos (AMARANTE; AMARANTE, 2003), proximidade da parturição (AMARANTE et al., 1999) como também ao tipo de nutrição (VAGENAS et al., 2007) ou sistema de manejo (GUTHRIE et al., 2010).

Entre as espécies de nematódeos gastrintestinais que infectam pequenos ruminantes, no Brasil, destacam-se *H. contortus, T. colubriformis, Cooperia* spp.*, Strongyloides papillosus* e *O. columbianum*. Na região sul, particularmente, *Ostertagia circumcincta* e *Nematodirus* spp. são evidenciados (OLIVEIRA-SEQUEIRA; AMARANTE, 2001). Em rebanhos de ovinos, em São Paulo, predomina a composição *H. contortus* e *T. colubriformis* (AMARANTE et al., 2004).

Em estudos realizados na região Sudeste (AMARANTE; BARBOSA, 1998) e Sul (RAMOS et al., 2004) foi descrita maior predominância de *H. contortus* em ovinos, confirmando as observações deste ser mais prevalente em regimes extensivos de regiões tropicais e subtropicais (TARIQ et al., 2008).

De maneira geral, no ciclo biológico desses parasitos gastrintestinais, os helmintos adultos, no trato digestivo dos hospedeiros, eliminam ovos nas fezes, destes eclodem larvas, que após um período de desenvolvimento até o terceiro estádio (L3), tornam-se infectantes no ambiente. Os ovinos ou bovinos as ingerem na vegetação contaminada e uma vez no aparelho digestivo dos mesmos, sofrem mudas e dão origem a espécimes adultas, de ambos os sexos, as quais darão sequência ao ciclo evolutivo do parasito. Assim, há uma fase de vida parasitária (no hospedeiro), com período pré-patente de 14 a 44 dias após a infecção, dependendo da espécie e uma fase de vida livre (no ambiente) que se processa sob condições adequadas de umidade e temperatura, em aproximadamente uma semana (OLIVEIRA-SEQUEIRA; AMARANTE, 2001).

Em ovinos, o *Trichostrongylus colubriformis* pode provocar redução no apetite, distúrbios na digestão e na absorção dos nutrientes, com consequente redução na conversão alimentar (CARDIA, 2009) e o *Haemonchus contortus* realiza o hematofagismo. Animais parasitados simultâneamente por estas

espécies de nematóides apresentam emagrecimento, anemia e hipoproteinemia, com consequente redução na produção de lã e carne (BASSETO et al., 2009).

Trichostrongilideos são responsáveis por sintomas como diarreia, anemia, perda de peso, emaciação, podendo, especialmente em animais jovens, causar a morte dos mesmos. As manifestações subclínicas relacionadas ao parasitismo podem afetar o desenvolvimento ponderal, os índices reprodutivos e até mesmo a condição imunitária dos ruminantes (SEQUEIRA et al., 2000; SCHEUERLE, 2009).

Para o diagnóstico de infecções por helmintos gastrintestinais é utilizada a técnica descrita por Gordon e Whitlock (1939), de uso comum para a contagem de ovos por grama de fezes (OPG) e a técnica de coprocultura, produzindo larvas de terceiro estádio, as quais podem ser identificadas morfologicamente (UENO; GONÇALVES, 1998).

2.2 Protozooses intestinais em ruminantes

2.2.1 Eimerioses

A enfermidade causada pelo Gênero *Eimeria* é denominada eimeriose e afeta preferencialmente células intestinais dos ruminantes. O número de espécies descritas em ovinos varia de nove a doze (JUBB et al., 1992).

Esta doença pode ser fatal (FOREYT, 1990), especialmente para cordeiros com aproximadamente quatro a oito semanas de idade (JUBB et al., 1992). Manifestação clínica de coccidiose em cordeiros da Raça Ideal, recém - desmamados, em regime de confinamento, com idade entre três a quatro meses, debilitados e apresentando diarreia foi constatada em Botucatu – São Paulo (AMARANTE et al., 1993). Tenesmo, prolapso retal e anemia também já foram registrados (CARLTON; McGAVIN, 1995).

O curso e a seriedade da doença são frequentemente determinados pelo número de oocistos ingeridos, número de células intestinais invadidas, pela

quantidade de tecido afetado devido à presença ou atividade do parasito, a espécie de *Eimeria* presente, fatores estressantes no ambiente, a idade e estado imunitário do hospedeiro (LIMA, 2004).

Cordeiros de pastagens ou alojados são acometidos, devido à contaminação do ambiente que proporciona condições favoráveis para que os oocistos esporulem e sobrevivam (PLATZER et al., 2005).

Práticas sanitárias visam impedir ou diminuir a ingestão de oocistos esporulados pelos ruminantes. Os animais devem ficar em instalações limpas e secas, separados de acordo com a idade e, sempre que possível, evitar grandes concentrações em pequenas áreas por longos períodos (LIMA, 2004) não causando a disseminação da infecção entre os mesmos.

O dano ao hospedeiro relativo à eimeriose é devido primariamente à destruição de células das vilosidades intestinais, causadas por estágios invasivos do parasito. A ingestão de um oocisto pode resultar na destruição de milhares de células durante o processo de formação de novos oocistos em decorrência das fases de reprodução (assexuada e sexuada). Nas infecções por coccídios pode haver danos celulares que permitem o extravasamento de sangue, plasma e proteínas para lúmem intestinal, e, desse modo afetar o funcionamento (LIMA, 2004).

Ovinos infectados por um grande número de espécies de *Eimeria* spp. podem apresentar acentuada especificidade em relação ao hospedeiro. A virulência deste protozoário varia com a espécie e poucas são consideradas patogênicas o suficiente para causarem manifestações clínicas da doença (VIEIRA et al., 1999).

A patogenia e o quadro clínico da doença são influenciados por vários fatores que incluem entre eles espécie do parasito, idade, competência imunológica do indivíduo infectado e a associação com outros patógenos (RADOSTITS et al., 2000).

O resultado da infecção por eimeriídeos, se tratando de espécies patogênicas, pode variar de morte súbita em animais susceptíveis, a uma reação discreta em animais imunes. Quando aparece a doença, os animais

infectados apresentam fezes diarreicas de coloração escura, as vezes com presença de muco e sangue, desidratação, perda de apetite e consequentemente perda de peso (LIMA, 2004).

A coproscopia quantitativa deve ser considerada um método diagnóstico para a *Eimeria* (LIMA, 2004). A esporulação e identificação de espécies podem ser realizadas de acordo com a forma, cor, presença ou ausência de micrópila e capuz micropilar, e pelo tamanho dos oocistos, além de apresentar as características morfológicas dos esporocistos, seguindo os parâmetros de Amarante e Barbosa (1992).

2.2.2 Criptosporidiose

Quanto à sistemática de *Cryptosporidium*, a taxonomia do gênero é ainda insatisfatória (PLUTZER; KARANIS, 2009), baseado em algumas características morfológicas, biológicas e bioquímicas, foi observada proximidade com a subclasse Gregarina (CARRENO et al., 1999). A similaridade entre os referidos parasitos incluem o ciclo de vida monoxênico, oocistos com quatro esporozoítos e parede dupla, gamontes extracelulares e localização no trato gastrointestinal do hospedeiro (HIJJAWI et al., 2004).

Contudo, os coccídios estão classificados como organismo protista, pertencente ao Filo Apicomplexa (possui complexo apical), Classe Sporozoa (apresenta estágios de reprodução sexuada e assexuada com formação de oocistos), subclasse Coccidia (ciclo de vida envolvendo merogonia, gametogonia e esporogonia), ordem Eucoccidiida (ocorre esquizogonia), sub-ordem Eimeriina (com formação de macrogametas e microgametas), Família Cryptosporidiidae (um oocisto com quatro esporozoitos e sem esporocistos) e gênero *Cryptosporidium* (PLUTZER; KARANIS, 2009).

A caracterização molecular de isolados de diferentes origens (animal, humana e ambiental) tem sido amplamente usada para investigar o potencial zoonótico das espécies deste protozoário (XIAO; FAYER, 2008).

Atualmente são descritas 22 espécies, das quais duas espécies têm sido encontradas em peixes, uma em anfíbios, duas em répteis, três em aves e 14 em mamíferos e ainda, mais de 40 genótipos adaptados a diversos hospedeiros (BERRILI et al., 2012). Alguns desses genótipos foram nomeados espécies quando informações suficientes a respeito de sua morfologia, biologia e características genéticas foram esclarecidas (XIAO; FAYER, 2008).

Nos últimos 20 anos, houve uma rápida expansão das pesquisas envolvendo o gênero *Cryptosporidium*, em grande parte relacionada a estudos moleculares, propiciando a descrição de várias espécies, genótipos e subtipos do parasito (PLUTZER; KARANIS, 2009).

Algumas características particulares distinguem esse gênero de outros coccídeos, como a localização que ocupam na célula do hospedeiro, a capacidade de autoinfecção e sua resistência a muitos antiparasitários (PLUTZER; KARANIS, 2009).

Infecção por *Cryptosporidium* causa atrofia, fusão das vilosidades intestinais e inflamação, resultando em perda da superfície absortiva e transporte desequilibrado de nutrientes (THOMPSON et al., 2008).

A diarreia por má absorção resulta da interação entre produtos parasitários, como as proteinases, que rompem a barreira epitelial e a resposta imunológica e inflamatória do hospedeiro (THOMPSON et al., 2008).

Responsáveis pela maior parte das infecções humanas, *C. parvum* e *C. hominis*, estas duas espécies do protozoário já foram detectadas em amostras fecais de ovinos por meio da caracterização molecular (XIAO et al., 2004).

Na Austrália, a infecção por *Cryptosporidium* foi referida com ineditismo em cordeiros com diarreia, com até 21 dias de idade (BARKER; CARBONELL, 1974). Este parasito é considerado importante nas espécies domésticas, particularmente em pequenos ruminantes, sendo associado à Síndrome da Diarreia Neonatal e a imunossupressão com altos níveis de morbidade (COSENDEY et al., 2008).

Em Botucatu-SP, Green et al. (2005), realizaram colheita de amostras fecais em um grupo de 20 ovelhas e seus respectivos filhotes no dia do

nascimento e ao 4º, 8º, 16º, 32º e 64º dias pós-parto. As amostras foram examinadas por meio da técnica de centrifugo sedimentação em éter, por esfregaços corados com auramina e pelo método de coloração Ziehl-Neelsen modificada. Oocistos de *Cryptosporidium* foram verificados em 26,7% dos cordeiros, os quais foram eliminados com maior frequência ao 4º dia de vida e em 31,9% das mães principalmente no 4º dia pós-parto.

Por meio da técnica de Ziehl-Neelsen modificada, constatou-se 41% de positividade para *Cryptosporidium* spp. em 130 ovinos de ambos os sexos e idades variadas provenientes de dez rebanhos, no Rio de Janeiro. A alta aglomeração de animais foi apontada como um dos prováveis fatores de risco associados à infecção (COSENDEY et al., 2008).

Santín et al. (2007) nos Estados Unidos da América, determinaram a ocorrência de *Cryptosporidium* em amostras fecais de 32 ovelhas e 31 cordeiros e caracterizaram molecularmente. As fezes foram colhidas por três dias consecutivos nas mães e ao 7º, 14º e 21º dia de vida dos filhotes, totalizando 189 amostras. Estas foram analisadas por meio de microscopia de imunofluorescência e pelo PCR (reação em cadeia da polimerase). Este segundo foi o método mais sensível, no qual se verificou maior positividade (57/189), sendo que dos 63 animais avaliados, oito ovelhas e 24 cordeiros eram positivos. Também foram detectados cordeiros positivos aos 21 dias de idade. A caracterização molecular revelou *C. parvum* (2/189), *Cryptosporidium* genótipo cervídeo (48/189) e *C. bovis*-like (7/189).

Na região de Araçatuba, São Paulo, Féres et al. (2009) avaliaram a ocorrência de *Cryptosporidium* em amostras fecais de cordeiros com até 30 dias de idade, por meio da técnica de coloração negativa com verde Malaquita, observando positividade em 6,7% (31/460) das amostras analisadas. Caracterização molecular das amostras positivas ao PCR demonstrou o genótipo cervídeo, *C. parvum* 18S rRNA tipo A e *C. parvum* 18S rRNA tipo B, todos com potencial zoonótico.

Por meio de técnicas moleculares, espécies de *Cryptosporidium* foram observadas em amostras fecais de cordeiros, como, nos Estados Unidos da

América (FAYER; SANTÍN, 2009), Reino Unido (MUELLER-DOBLIES et al., 2008), Itália (PAOLETTI et al., 2009), Espanha (QUÍLEZ et al., 2008), Tunísia (SOLTANE et al., 2007), China (WANG et al., 2010), Austrália (YANG et al., 2009) e Brasil (FÉRES et al., 2009). E as principais responsáveis por infecções em ovinos são: *C. parvum, C. xiaoi* e *C. ubiquitum* (FAYER; SANTÍN, 2009; FAYER et al., 2010).

Sinais clínicos mais associados à infecção por *Cryptosporidium* em humanos são diarreia, desidratação, má absorção e perda de peso (TZIPORI; WARD, 2002). Infecções autolimitantes podem ocorrer em indivíduos imunocompetentes (AL-BRAIKEN et al., 2003) e em pacientes imunocomprometidos, pode se desenvolver a forma crônica da doença, podendo resultar em óbito (ABRAHAMSEN et al., 2004).

Em muitos animais as infecções não são associadas a sinais clínicos, em outros, pode haver diarreia aguda autolimitante. Em animais imunossuprimidos, a infecção é frequentemente crônica, podendo ser letal (XIAO et al., 2004).

Os métodos tradicionalmente utilizados para o diagnóstico de *Cryptosporidium*, consistem na detecção direta do parasito por meio de microscopia óptica. No entanto, as características morfológicas para uma correta identificação dessas formas infectantes são insuficientes, sendo que o diagnóstico, baseado apenas nesses métodos não é confiável e relativamente demorado (FALL et al., 2003).

As técnicas mais empregadas para essa finalidade são: coloração por Kinyoun (MA; SOAVE, 1983), Ziehl-Neelsen modificado (HENRIKSEN; POHLENZ, 1981), safranina azul de metileno (BAXBY et al., 1984) e coloração negativa de verde-malaquita (ELLIOT et al., 1999). Embora úteis, essas técnicas apresentam baixa sensibilidade e/ou especificidade, principalmente quando existem poucos oocistos nas amostras (MORGAN et al., 1998).

Outro método comumente utilizado para detecção de formas evolutivas infectantes a partir de amostras fecais consiste na técnica de centrífugo-flutuação em solução de Sheather (CURRENT, 1990). Os oocistos podem ser

visualizados utilizando-se microscopia óptica de campo claro ou de contraste de fase (XIAO; FENG, 2008).

Oocistos de *Cryptosporidium* são muito pequenos (4-8 µm), com uma pequena variação morfológica ou mesmo idênticos entre as diferentes espécies, sem esporocistos e de difícil visualização (FALL et al., 2003). Dessa forma, a identificação da espécie, se baseada apenas em critérios morfométricos, pode ser pouco discriminatória (MORGAN et al., 1998).

Como métodos imunológicos, oocistos fecais podem ser detectados pela reação de imunofluorescência direta e teste imunoenzimático (ELISA) (JEX et al., 2008). Esses métodos apresentam vantagens sobre o diagnóstico parasitológico direto, com bons resultados de sensibilidade e especificidade (JOHNSTON et al., 2003).

Alguns testes imunoenzimáticos são capazes de detectar a infecção em animais que ainda não estão eliminando oocistos nas fezes (pré-patente) (SMITH; NICHOLS, 2010), outra vantagem é que podem ser empregados de maneira rápida para triagem de um grande número de animais (GARCIA et al., 2003) e como limitações dessas técnicas imunológicas, não é possível a determinação da espécie ou genótipo de *Cryptosporidium* envolvidos na infecção.

Dada a limitação na detecção de espécies de *Cryptosporidium* a partir dos métodos diretos e imunológicos, o diagnóstico baseado em técnicas moleculares, como a PCR e suas variantes, seguida de sequenciamento automático de ácidos nucleicos, oferece uma alternativa eficiente para a diferenciação desses organismos (JEX et al., 2008).

Muitos *loci* têm sido utilizados, como *locus* codificador da fração 18S, actina (SULAIMAN et al., 2002), proteína do choque térmico - HSP-70 (MORGAN et al., 1998), proteína da parede do oocisto - COWP (SPANO et al., 1997) e glicoproteína GP-60 (PENG et al., 2003). Este último tem demonstrado um elevado grau de polimorfismo entre isolados de espécies de *Cryptosporidium*, com identificação de diversos subgenótipos e subtipos (PLUTZER; KARANIS, 2009).

Técnicas moleculares apresentam alta sensibilidade e especificidade (JEX et al., 2008), no entanto, devido ao alto custo, quando comparada às outras técnicas de detecção de oocistos, esse método não tem sido rotineiramente utilizado em laboratórios de diagnóstico (MEIRELES, 2010).

3 OBJETIVO

Pelo fato da proximidade de criadores de ovinos com animais possivelmente doentes e/ou eliminando oocistos fecais no ambiente, o presente estudo teve como objetivo determinar a ocorrência de infecção por helmintos, coccídeos do gênero *Eimeria* spp. e *Cryptosporidium* spp., e caracterizar molecularmente as espécies de *Cryptosporidium* em amostras fecais de cordeiros de até um ano de idade do município de Alambari, São Paulo.

REFERÊNCIAS

ABRAHAMSEN, M.S.; TEMPLETON, T.J.; ENOMOTO, S.; ABRAHANTE, J.E.; ZHU, G. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. **Science**, v.304, n.5669, p.441- 445, 2004.

AL BRAIKEN, F.A.; AMIN, A.; BEECHING, N.J.; HOMMEL, M.; HART, C.A. Detection of *Cryptosporidium* amongst diarrhoeic and asymptomatic children in Jeddah, Saudi Arabia. **Annals Tropical Medicine Parasitology**, v.97, n.5, p.505-510, 2003.

AMARANTE, A.F.T.; AMARANTE, M.R.V. Breeding sheep for resistance to nematode infections. **Journal Animal Veterinary** Advances, v.2, n.3, p.147-161, 2003.

AMARANTE, A.F.T., BARBOSA, M.A. Species of coccidia occurring in lambs in São Paulo State, Brazil**. Veterinary Parasitology**, v.41, n.3-4, p.189-193, 1992.

AMARANTE, A.F.T.; BARBOSA, M.A. Comparison between pasture sampling and tracer lambs to evaluate contamination of sheep pastures by nematode infective larvae. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v.7, n.2, p.95-99, 1998.

AMARANTE, A.F.T., BARBOSA, M.A., SEQUEIRA, J.L. Coccidiose em cordeiros em Botucatu, relato de dois casos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária,** v.2, n.1, p.73-74, 1993.

AMARANTE, A.F.T.; BRICARELLO, P.A.; ROCHA, R.A.; GENNARI, S.M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France lambs to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v.120, n.1-2, p.91-106, 2004.

AMARANTE, A.F.T.; CRAIG, T.M.; RAMSEY, W.S.; DAVIS, S.K.; BAZER , F.W. Nematode burdens and cellular responses in the abomasal mucosa and blood of Florida Native, Rambouillet and crossbreed lambs. **Veterinary Parasitology**, v.80, n.4, p.311-324, 1999.

BARKER, I.K.; CARBONELL, P.L. *Cryptosporidium agni* sp. n. from lambs and *Cryptosporidium bovis* sp. n. from a calf with observations on the oocyst. **Parasitology Research,** v.44, n.4, p.289-298, 1974.

BASSETTO, C.C.; SILVA, B.F.; FERNANDES, S.; AMARANTE, A.F.T. Contaminação da pastagem com larvas infectantes de nematoides gastrintestinais após o pastejo de ovelhas resistentes ou susceptíveis à verminose. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v.18, n.4, p.63-68, 2009.

BAXBY, D.; BLUNDELL, N.; HART, C.A. The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. **The Journal Hygiene**, v.93, n.2, p.317-23, 1984.

BERRILLI, F.; D'ALFONSO, R.; GIANGASPEROD, A.; MARANGI, M.; BRANDONISIO, O.; KABORÉ, Y.; GLÉ, C.; CIANFANELLI, C.; LAURO, R.; DI CAVE, D. *Giardia duodenalis* genotypes and *Cryptosporidium* species in humans and domestic animals in Côte d'Ivoire: Occurrence and evidence for environmental contamination. **Transactions Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, v.106, n.3, p.191-195, 2012.

CARDIA, D.F.F. **Resposta imunológica e fisiopatologia das infecções artificiais por *Trichostrongylus colubriformis* em cordeiros Santa Inês**. Botucatu, 2009. 42 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.2009.

CARRENO, R.A.; MARTIN, D.S.; BARTA, J.R. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. **Parasitology Research**, v.85, n.11, p.899-904, 1999.

CARLTON, W.W., McGAVIN, M.D. **Thomson´s Special Veterinary Pathology.** 2rd. Ed. Missouri : Mosby, 1995. 654p.

COSENDEY, R.I.J.; FIÚZA, V.R.S.; TEIXEIRA, C.S.; OLIVEIRA, F.C.R. Frequência de oocistos de coccídios do gênero Cryptosporidium em ovinos no estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal,** v.9, n.4, p.687-695, 2008.

CURRENT, W.L. Techniques and laboratory maintenance of *Cryptosporidium.* In: DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; FAYER, R. (Eds). **Cryptosporidiosis of man and animals**. Boca Raton: CRS, p.31-49, 1990.

ELLIOT, A.; MORGAN, U.M.; THOMPSOM, R.C.A. Improved staining method for detecting *Cryptosporidium* oocysts in stools using malachite green. **Journal General Applied Microbiology**, v.45, n.6, p.139-142, 1999.

FALL, A.; THOMPSON, R.C.A.; HOBBS, R.P.; MORGAN-RYAN, U. Morphology is not a reliable tool for delineating species within *Cryptosporidium*. **Journal Parasitology**, v.89, n.2, p.399-402, 2003.

FAYER R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Experimental Parasitology**, v.124, n.1, p.90-97, 2010.

FAYER, R.; SANTÍN, M. Cryptosporidium xiaoi n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (Ovis aries). **Veterinary Parasitology**, v.164, n.2-4, p.192–200, 2009.

FÉRES, F.C.; LOMBARDI, A.L.; CARVALHO, M.P.P.; MENDES, L.C.N.; PEIRÓ, J.R.; CADIOLI, F.A.; MEIRELES, M.V.; PERRI, S.H.V.; FEITOSA, F.L.F. Ocorrência e caracterização molecular de *Cryptosporidium* em cordeiros. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia,** v.61, n.4, p.1002-1005, 2009.

FOREYT, W.J. Coccidiosis and cryptosporidiosis in sheep and goats. **Veterinary Clinics North American Food Animal Practice,** v.6, n.3, p.655-670, 1990.

GARCIA, L.S.; SHIMIZU, R.Y.; NOVAK, S.; CARROLL, M.; CHAN, F. Commercial assay for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens by rapid solid-phase qualitative immunochromatography. **Journal Clinical Microbiology**, v.41, n.1, p.209-212, 2003.

GASTALDI, K.A.; SILVA SOBRINHO, A.G.; COSTA, A.J.; ROCHA, U.F. Variação estacional do número de ovos por grama de fezes de nematódeos parasitos de ovinos na região de Jaboticabal, São Paulo. **Ars Veterinary**, v.17, n.2, p.124-129, 2001.

GREEN, R.E.; AMARANTE, A.F.T.; MASCARINI, L.M. Patterns of shedding of cryptosporidial oocysts by ewes and lambs kept indoors. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science,** v.42, n.3, p.204-209, 2005.

GUTHRIE, A.D.; LEARMOUNT., J.; VANLEEUWEN, J.; PEREGRINE, A.S.; KELTON, D.; MENZIES, P.I.; FERNÁNDEZ, S.; MARTIN, R.C.; MEDEROS, A.; TAYLOR, M.A. Evaluation of a British computer model to simulate gastrointestinal nematodes in sheep on Canadian farms. **Veterinary Parasitology**, v.174, n.1-2, p.92-105, 2010.

HENRIKSEN, S.A.; POHLENZ, J.F.L. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl–Neelsen technique. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.22, n.3-4, p.594-596, 1981.

HIJJAWI, N.S.; MELONI, B.P.; NG'ANZO, M.; RYAN, U.M.; OLSON, M.E.; COX, P.T.; MONIS, P.T.; THOMPSON, R.C. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. **Journal Parasitology**, v.34, n.7, p.769-777, 2004.

JEX, A.R.; SMITH, H.V.; MONIS, P.T.; CAMPBELL, B.E.; GASSER, R.B. *Cryptosporidium*: biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. **Biotechnology Advances**, v.26, n.4, p.304-317, 2008.

JOHNSTON, S.P.; BALLARD, M.M.; BEACH, M.J.; CAUSER, L.; WILKINS, P.P. Evaluation of Three Commercial Assays for Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* Organisms in Fecal Specimens. **Journal Clinical Microbiology**, v.41, n.2, p.623-626, 2003.

JUBB, K.V.F., KENNEDY, P.C, PALMER, N. **Pathology Domestic Animals.** 4rd. New York: Academic Press, London, 1992. v.2, p. 300.

KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **Journal Water and Health**, v.5, n.1, p.1-38, 2007.

LEITE, E.R. **Ovinocaprinocultura no Nordeste – organização e crescimento**. Disponível em: <http://www.nogueirafilho.com.br/arquivos_artigos/ovinocaprinoorganizacao.htm. Acesso em: novembro. 2012.

LIMA, J.D. Coccidiose dos ruminantes domésticos. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v.13, n.1, p.9-13, 2004.

MA, P.; SOAVE, R. Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. **Journal Infectious Diseases**, v.147, n.5, p.824-828, 1983.

MEIRELES, M.V. *Cryptosporidium* infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. **Revista Brasileira Parasitologia**, v.19, n.4, p.197-204, 2010.

MORGAN, U.M.; PALLANT, L.; DWYER, B.W.; FORBES, D.A.; RICH, G.; THOMPSON, R.C. Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. **Journal Clinical Microbiology**, v.36, n.4, p.995-998, 1998.

MUELLER-DOBLIES, D.; GILES, M.; ELWIN, K.; SMITH, R.P.; CLIFTON-HADLEY, F.A.; CHALMERS, R.M. Distribution of *Cryptosporidium* species in sheep in the UK. **Veterinary Parasitology**, v.154, n.3-4, p.214-219, 2008.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G.; AMARANTE, A.F.T. **Parasitologia animal** - Animais de Produção. 1.ed. São Paulo: Epub, 2001. 273p.

PAOLETTI, B.; GIANGASPERO, A.; GATTI, A.; IORIO, R.; CEMBALO, D.; MILILLO, P.; TRAVERSA, D. Immunoenzymatic analysis and genetic detection of *Cryptosporidium parvum* in lambs from Italy. **Experimental Parasitology**, v.122, n.4, p.349-352, 2009.

PENG, M.M.; MESHNICK, S.R.; CUNLIFFE, N.A.; THINDWA, B.D.; HART, C.A.; BROADHEAD, R.L.; XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis in children in Malawi. **Journal of Eukaryotic Microbiology**. v.50, p.557–559, 2003.

PLATZER, B.; PROSL, H.; CIESLICKI, M.; JOACHIM, A. Epidemiology of *Eimeria* infections in an Austrian milking sheep flock and control with diclazuril. **Veterinary Parasitology**, v.129, n.1-2, p.1-9, 2005.

PLUTZER, J.; KARANIS, P. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: An update. **Veterinary Parasitology**, v. 65, n.3-4, p.187-199, 2009.

QUÍLEZ, J.; TORRES, E.; CHALMERS, R.M.; HADFIELD, S.J.; DEL CACHO, E.; SÁNCHEZ-ACEDO, C. *Cryptosporidium* genotypes and subtypes in lambs and goat kids in Spain. **Applied Environmental Microbiology**, v.74, n.19, p.6026-6031, 2008.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. Doenças Causadas pelos protozoários. In:_____. **Clínica Veterinária**: Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. 9ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Kioogan, 2000. Cap. 25, p. 1156-1194.

RAMOS, C.I.; BELLATO, V.; SOUZA, A.P.; AVILA, V.S.; COUTINHO, G.C.; DALAGNOL, C.A. Epidemiologia das helmintoses gastrintestinais de ovinos do Planalto Catarinense. **Ciência Rural**, v.34, n.6, p.1889-1895, 2004.

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

SAVIOLI, L.; SMITH H.; THOMPSON A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. **Trends Parasitology**, v.22, n.5, p. 203-208, 2006.

SCHEUERLE, M. **Anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus* and the Famacha: method as a tool to delay the development of anthelmintic resistance.** Auflage, 2009. 113 f. Dissertacao (Mestrado) - Gedruckt mit Genehmigung der Tierarztlichen Fakultat der Ludwig-Maximilians, Universitat Munchen. 2009.

SEQUEIRA, T.C.G.O.; AMARANTE, A.F.T.; SEQUEIRA, J.L. Parasitological characteristics and tissue response in the abomasum of sheep infected with *Haemonchus* spp. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v.52, n.5, p.447-452, 2000.

SMITH, H.V.; NICHOLS, R.A.B. *Cryptosporidium*: detection in water and food. **Experimental Parasitology**, v.124, n.1, p.61–79, 2010.

SOLTANE, R.; GUYOT, K.; DEI-CAS, E.; AYADI, A. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. (Eucoccidiorida: Cryptosporidiidae) in seven species of farm animals in Tunisia. **Parasite**, v.14, n.4, p.335–338, 2007.

SPANO, F.; PUTIGNANI, L.; MCLAUCHLIN, J.; CASEMORE, D.P.; CRISANTI, A. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. **FEMS Microbiol Letter**, v.150, n.2, p.209-217, 1997.

SULAIMAN, I.M.; LAL, A.A.; XIAO, L. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. **Journal Parasitology**, v.88, n.2, p.388-394, 2002.

TARIQ, K.A.; CHISHTI, M.Z.; AHMAD, F.; SHAWL, A.S. Epidemiology of gastrointestinal nematodes of sheep managed under traditional husbandry system in Kashmir Valley. **Veterinary Parasitology**, v.158, n.1-2, p.138-143, 2008.

THOMPSON, R.C.A.; PALMER, C.S.; O´HANDLEY, R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. **Veterinary Journal**, v.177, n.1, p.18-25, 2008.

TZIPORI, S.; WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. **Microbes Infection**, v.4, n.10, p.1047-58, 2002.

UENO, H.; GONÇALVES, P.C. **Manual para diagnóstico de helmintoses de ruminantes**. 4.ed. Tokyo: Japan International Cooperation, 1998. 143p.
URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L. **Parasitologia veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 273p.

VAGENAS, D.; BISHOP, S.C.; KYRIAZAKIS, I. A model to account for the consequences of host nutrition on the outcome of gastrointestinal parasitism in sheep: model evaluation. **Parasitology**, v.134, n.9, p.1279-1289, 2007.

VIEIRA, L. S. Endoparasitoses gastrintestinais em caprinos e ovinos. Sobral: **Embrapa Caprinos**, 32p., 2005.

VIEIRA, L.S.; CAVALCANTE, A.C.; XIMENES, L.J.F. Infection with *Eimeria* species in hair sheep reared in Sobral, Ceará State, Brazil. **Revue Medicine Veterinaire***,* v.150, n.6, p.547-550, 1999.

XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. **Experimental Parasitology,** v.124, n.1, p.80-89, 2010.

XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. **International Journal Parasitology**, v.38, n.11, p.1239-1255, 2008.

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S.J. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, n.1, p.72-97, 2004.

XIAO, L.; FENG, Y. Zoonotic cryptosporidiosis. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v.52, n.3, p.309-323, 2008.

WANG, Y.; FENG, Y.; CUI, B.; JIAN, F.; NING, C.; WANG, R.; ZHANG, L.; XIAO, L. Cervine genotype is the major *Cryptosporidium* genotype in sheep in China. **Parasitology Research**, v.106, n.2, p.341-347, 2010.

YANG, R.; JACOBSON, C.; GORDON, C.; RYAN, U. Prevalence and characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species in pre-weaned sheep in Austrália. **Veterinary Parasitology**, v.161, n.1-2, p.19-24, 2009.

Capítulo 2

CAPÍTULO 2 – OCORRÊNCIA DE PARASITOSES GASTRINTESTINAIS EM CORDEIROS NO MUNICÍPIO DE ALAMBARI, SÃO PAULO

RESUMO – O objetivo desta pesquisa foi determinar a ocorrência de parasitoses gastrintestinais e caracterizar molecularmente as espécies de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de cordeiros de até um ano de idade do município de Alambari, São Paulo. Um total de 193 amostras foram colhidas e em 126 das mesmas foi efetuada a contagem de ovos por gramas de fezes (OPG) Gordon e Whitlock (1939), para determinar a presença de helmintos e coccídeos do gênero *Eimeria*. Todas as amostras, foram avaliadas por meio da *nested*-PCR para amplificação de fragmentos de DNA da subunidade 18S do gene do RNAr para *Cryptosporidium*. Por meio do teste Qui-Quadrado e/ou Fisher foi verificada a associação da presença das parasitoses gastrintestinais em relação ao sexo, raça e idade dos animais. Das 126 amostras analisadas, 71,4% foram positivas pelo método de OPG, com identificação de 58,9% de ovos de Estrongilídeos; 5,6% de oocistos de *Eimeria* spp.; coinfecções em, 14,4% de Estrongilídeos e *Moniezia* spp.; e 15,5% Estrongilídeos e *Eimeria* spp., e 5,6% infecção pelos três parasitos. Coproculturas foram positivas em 16 amostras, com observação dos gêneros: 31,3% *Haemonchus* spp.; 12,5% *Trichostrongylus* spp.; *Oesophagsotumum* spp. em apenas uma; e infecção mista em 50% por *Haemonchus* e *Trichostrongylus*. Para *Eimeria* spp., a ocorrência foi de 19% dos animais, identificando as espécies: *E. crandallis*; *E. faurei*; *E. marsica; E. ovinoidalis*; *E. pallida*; *E. parva e E*. *weybridgensis.* A nPCR revelou positividade de 15% e o sequenciamento foi possível em 19 amostras, com detecção das espécies: *C. xiaoi* em 15 amostras, *C. ubiquituim* em três, e *C. meleagridis* em uma amostra, sendo estas duas últimas consideradas espécies zoonóticas.

PALAVRAS-CHAVE: *Cryptosporidium* spp., ovinos, caracterização molecular, helmintos, *Eimeria* spp.

1 INTRODUÇÃO

Na criação de ovinocultura, a verminose é o principal problema sanitário, na qual causa sérios prejuízos devido a redução da produtividade do rebanho e mortalidade de animais. Várias espécies de helmintos gastrintestinais já foram descritas, porém, em regiões com clima tropical e subtropical, duas delas são predominantes: *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*, sendo a primeira principal parasito de pequenos ruminantes (AMARANTE et al., 2004).

Ao ingerirem as larvas infectantes (L3) presentes na pastagem, os próprios animais são as fontes de contaminação do ambiente, pois eliminam nas fezes os ovos dos nematoides, os quais irão se desenvolver ciclo de vida livre até darem origem as L3 (OLIVEIRA-SEQUEIRA; AMARANTE, 2001).

Entre as espécies de nematódeos gastrintestinais que infectam pequenos ruminantes, no Brasil, destacam-se *H. contortus, T. colubriformis, Cooperia spp., Strongyloides papillosus*, *Oesophagostomum columbianum* e *Moniezia expansa*. Na região sul, particularmente, *Ostertagia circumcincta* e *Nematodirus* spp. são evidenciados (OLIVEIRA-SEQUEIRA; AMARANTE, 2001).

No Estado de São Paulo (SP), a composição parasitária predominante, em pequenos ruminantes, é *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis* e *Oesophagostomum columbianum* (AMARANTE et al., 2004).

O coccídeo do gênero *Eimeria* causa grande impacto a criação de ovinos e pode ocasionar quadro de enterite hemorrágica popularmente conhecida como curso vermelho (LIMA, 2004). Cordeiros de pastagens ou alojados são acometidos, apresentando estes últimos maior risco devido à contaminação do ambiente que proporciona condições favoráveis para que os oocistos esporulem e sobrevivam (PLATZER et al., 2005).

A gravidade e o curso da doença são frequentemente determinados pelo número de oocistos ingeridos, número de células intestinais invadidas, pela quantidade de tecido afetado devido à presença ou atividade do parasito, a

espécie de *Eimeria* presente, fatores estressantes no ambiente, a idade e estado imunitário do hospedeiro (FOREYT, 1990; LIMA, 2004).

A destruição de células das criptas frequentemente resulta em desprendimento da mucosa intestinal e enterite hemorrágica. Diarreia e septicemia bacterianas, via de regra, acompanham os surtos de eimeriose (FOREYT, 1990).

Os protozoários do gênero *Cryptosporidium* são parasitos intracelulares obrigatórios que pertencem ao filo Apicomplexa, capazes de parasitar as microvilosidades das células epiteliais do trato gastrintestinal de hospedeiros vertebrados, incluindo o homem (XIAO et al., 2004).

Nos últimos anos, houve uma rápida expansão das pesquisas envolvendo esse gênero, em grande parte relacionada a estudos moleculares, propiciando a descrição de várias espécies, genótipos e subtipos do parasito (PLUTZER; KARANIS, 2009). Atualmente são reconhecidas 22 espécies e mais de 40 genótipos desse protozoário adaptados a diversos hospedeiros (BERRILI et al., 2012).

Devido a habilidade desse parasito infectar diferentes hospedeiros e a sua presença constante no ambiente, as pessoas podem adquirir a infecção por contato direto com outros indivíduos ou animais infectados, pela ingestão de alimentos ou água contaminados (XIAO, 2010). Dessa forma, a caracterização molecular de isolados de diferentes origens (animal, humana e ambiental) tem sido amplamente usada com o intuito de investigar o potencial zoonótico das espécies do referido protozoário (XIAO; FAYER, 2008).

Ovinos são comumente infectados pelas principais espécies: *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium xiaoi* e *Cryptosporidium ubiquitum* (FAYER; SANTÍN, 2009), sendo o primeiro apontado como importante agente causador de diarreia neonatal em ruminantes (O'HANDLEY; OLSON, 2006) e um dos principais responsáveis pela criptosporidiose humana (XIAO; FENG, 2008). Assim, esses animais tem sido considerados importantes reservatórios da infecção zoonótica (XIAO; FAYER, 2008).

Este protozoário já foi observado em fezes de cordeiros em países como, nos Estados Unidos da América (FAYER; SANTÍN, 2009), Reino Unido (MUELLER-DOBLIES et al., 2008), Itália (PAOLETTI et al., 2009), Espanha (QUÍLEZ et al., 2008), Tunísia (SOLTANE et al., 2007), China (WANG et al., 2010), Austrália (YANG et al., 2009) e Brasil (FÉRES et al., 2009).

Neste trabalho, foram realizados métodos convencionais para demonstrar a ocorrência de Helmintos e coccídeo do gênero *Eimeria* e para o *Cryptosporidium* foi utilizada a reação de *nested*-PCR para a amplificação de fragmentos de DNA da subunidade 18S do gene do RNA ribossômico em amostras fecais de cordeiros com até um ano de idade, de propriedades do município de Alambari, São Paulo. O sequenciamento de amostras positivas foi efetuado para identificação das espécies de *Cryptosporidium* responsáveis pela infecção.

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 Colheita das amostras

O Município de Alambari, de acordo com os dados do IBGE, 2008 tem um total de 475 ovinos. Desta forma, na execução deste projeto foram visitadas as propriedades e aplicados os questionários com o conhecimento real do número de animais existentes em cada fazenda e a partir daí, foram colhidas amostras fecais de todos os cordeiros de idade até um ano.

Durante o período de julho de 2011, amostras fecais de todas as ovinoculturas (três propriedades) da referida localidade, de cordeiros até um ano de idade, foram coletadas diretamente da ampola retal, totalizando 193 amostras, as quais foram armazenadas em potes coletores devidamente identificados, sob refrigeração a 8ºC até o momento do exame.

No Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP, campus de Araçatuba, as amostras foram preparadas para cada uma das técnicas propostas.

Das 193 amostras, foi possível a realização da técnica de contagem de ovos por gramas de fezes somente em 126, alíquotas positivas com OPG acima de 500 foram efetuadas coproculturas para recuperação das larvas e identificação dos possíveis gêneros e para *Eimeria* spp. o material foi mantido em solução de bicromato de potássio a 2,5% para posterior esporulação e mensuração dos oocistos para classificação das espécies.

A composição do rebanho era variada, sendo este formado por machos (n=12) e fêmeas (n=114), mestiços (n=22) e exemplares das raças Texel (n=85) e Santa Inês (n=19). De acordo com a faixa etária, os animais foram divididos em grupos, sendo o primeiro até seis meses (n=45) e o segundo grupo de sete a 12 meses (n=81).

As amostras fecais foram avaliadas quanto à consistência e classificadas como sólidas (normais n=105) e pastosas a líquidas (diarreicas n=21).

Alíquota fecal de aproximadamente 20 gramas das 193 amostras foram armazenadas devidamente identificadas em microtubos de 2 mL e congelada a -20ºC *in natura* para posterior extração de oocistos e realização da nPCR, para *Cryptosporidium*, no laboratório de Ornitopatologia da UNESP, campus de Araçatuba/SP.

Em relação ao rebanho, eram constituídos por machos (n=38) e fêmeas (n=155), mestiços (n=42) e exemplares das raças Texel (n=129) e Santa Inês (n=22). Quanto a idade e a consistência fecal, foram divididos em grupo 1 (n=91) até seis meses, o grupo 2 (n=102) sete a 12 meses, e a consistência fecal em sólidas (normais n=156) e pastosas a líquidas (diarreicas n=37).

2.2 Técnicas Coproparasitológicas

As amostras foram analisadas pela contagem de ovos por grama de fezes (OPG) de acordo com a técnica de Gordon e Whitlock (1939). Quando a média de OPG foi superior a 500, foram realizadas coproculturas, posteriormente as larvas foram recuperadas e contadas estabelecendo assim o

percentual, por gênero. A identificação foi realizada com base na descrição feita por Ueno e Gonçalves (1998).

2.3 Técnica de esporulação e identificação das espécies de *Eimeria* spp.

As amostras positivas, analisadas quantitativamente pelo método de contagem de oocistos por grama de fezes (OOPG), foram colocadas para esporular com solução de bicromato de potássio a 2,5% por sete dias, em temperatura ambiente, para posterior identificação das espécies de *Eimeria,* seguindo os parâmetros de Ueno e Gonçalves, (1998).

2.4 Extração de DNA genômico

O DNA genômico dos oocistos foi extraído utilizando-se o *QIAamp DNA Stool Mini Kit*® (Qiagen), seguindo-se o protocolo descrito pelo fabricante, com exceção de incubação à 99º C após diluição dos oocistos em tampão ATL e eluição do DNA em 50 microlitros de buffer AE. O DNA extraído foi conservado à temperatura de -20°C, até o seu processamento.

2.5 Reação de *nested*-PCR

Para amplificação de fragmentos de DNA do gene da subunidade 18S do RNA ribossômico foi utilizada a técnica de *nested*-PCR com oligonucleotídeos iniciadores 5´ TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG 3’ e 5’ CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA 3’ para a reação primária (1325 bp) e 5’ GGAAGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG 3’ e 5´ AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A 3´ para a reação secundária (826-840 bp) (XIAO et al., 2000).

As seguintes condições de reação foram utilizadas: preparação de 25µL de solução contendo 2,5 µL de tampão para PCR 1 x, $MgCl_2$ a 2,5 mM , 1 U de Taq DNA polimerase, 200 µM de cada desoxiribonucleotídeo, 100 nM de cada oligonucleotídeo iniciador e 2,5 µL de DNA alvo nas duas reações. Como

controle positivo e negativo foram utilizados *C. galli* e água ultra-pura respectivamente. As amostras foram processadas em aparelho termociclador, submetidas à desnaturação inicial do DNA a 94º C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos, cada um consistindo em desnaturação por 45 segundos a 94º C, 45 segundos de anelamento a 57ºC e 60 segundos de extensão a 72º C, com extensão final a 72ºC, por 7 minutos (XIAO et al., 2000).

2.6 Sequenciamento dos fragmentos amplificados

Amostras que apresentaram amplificação intensa do fragmento de DNA, visualizadas por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, foram purificadas utilizando-se o kit QIAquick® Gel Extraction (Qiagen), e submetidas a sequenciamento com utilização do ABI Prism® Dye Terminator Cicling Sequence kit (Applied Biosystems®) em sequenciador automático ABI 3730XL (Applied Biosystems). As reações de sequenciamento foram feitas nas duas direções, com os oligonucleotídeos iniciadores da reação secundária.

2.7 Alinhamento e tradução das sequências

Para determinação da sequência consenso foi utilizado o software Codoncode Aligner versão 1.5.2. (CodonCode Corporation Dedham®, MA, USA). O alinhamento das sequências consensos dos fragmentos amplificados por PCR foi feito com o auxílio dos programas Clustal W (THOMPSON et al., 1997) e BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999), tomando-se como base sequências homólogas disponíveis no *GenBank*.

2.8 Análise estatística

A análise estatística descritiva foi efetuada por meio do cálculo de porcentagem e pelo Teste Qui Quadrado e/ou Fisher para verificar associação

entre a ocorrência das parasitoses gastrintestinais e as variáveis estudadas, raça, sexo, idade e consistência fecal. O nível de significância adotado foi de 5%, e as análises estatísticas foram efetuadas empregando-se o programa Statistical Analysis System (SAS), versão 9.2 (2008).

3 RESULTADOS

Por meio da análise estatística descritiva, das 126 amostras, 71,4% foram positivos pelo método de OPG, observando ovos de pelo menos um helminto e/ou oocistos de *Eimeria* spp.. Identificando a presença de 58,9% de ovos de Estrongilídeos; e 05,6% oocistos de *Eimeria* spp.; coinfecções foram ainda verificadas, 14,4% ovos de Estrongilídeos e *Moniezia* spp.; e 15,5% Estrongilídeos e oocistos de *Eimeria* spp., e 05,6% infecção pelos três parasitos.

A coprocultura foi positiva em 16 amostras, e revelaram os seguintes gêneros: 31,3% *Haemonchus* spp.; 12,5% *Trichostrongylus* spp.; *Oesophagsotumum* spp. em apenas uma amostra; e infecção mista em 50% por *Haemonchus* e *Trichostrongylus*.

O teste de Qui Quadrado e/ou Fisher não resultou em associação da positividade por meio da técnica de OPG com relação ao sexo (p=0,3214), idade (p=0,6381) e consistência fecal (p=0,1124), havendo associação somente com a raça (p=0,0122), observando que a maior parte dos cordeiros era da raça Texel.

Em relação ao coccídeo *Eimeria* spp., a ocorrência foi de 19% dos animais, identificando as seguintes espécies: *E. crandallis*; *E. faurei*; *E. marsica; E. ovinoidalis*; *E. pallida*; *E. parva e E*. *weybridgensis* (figura 1), observando-se a presença de mais de uma espécie em todas as amostras analisadas. As espécies encontradas com maior frequência foram *E*. *weybridgensis* e *E. ovinoidalis*.

A análise estatística resultou em associação com a presença deste coccídeo com as variáveis sexo (p=0,0017), raça (p<0,0001) e faixa etária

(p<0,0001), não sendo significativo com relação a consistência fecal (p=0,3229). A maioria dos cordeiros positivos eram fêmeas, sendo das raças Santas Inês e Texel, com até seis meses de idade, e que apresentaram consistência sólida.

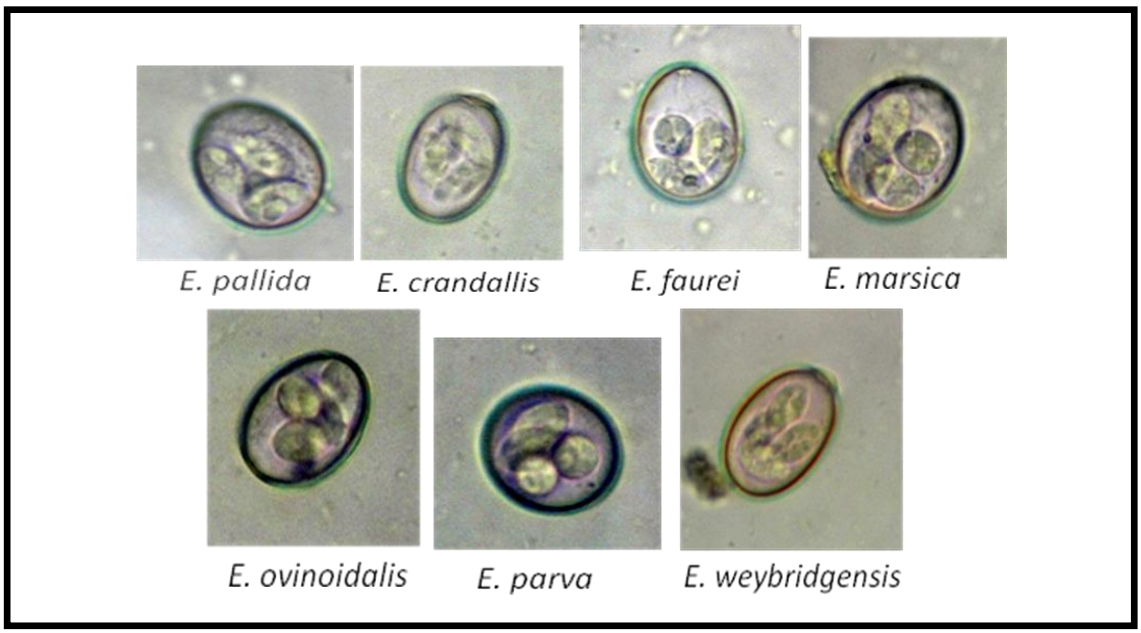


Figura 1- Aspecto microscópico de sete espécies de *Eimeria* identificadas em fezes de cordeiros até um ano de idade, naturalmente infectados no Município de Alambari-SP, (objetiva 40x).

Das 193 amostras analisadas por meio da nPCR, 29 foram positivas. Deste número total, o sequenciamento foi possível para 19 amostras. A análise das sequências de gene 18S rRNA permitiu a identificação de *C. xiaoi* em 15 amostras, *C. ubiquitum* em três e *C. meleagridis* em uma (Tabela 1).

Todas as propriedades apresentaram animais positivos, o *C. xiaoi* não foi detectado em apenas uma das propriedades, sendo esta composta por animais de onze a doze meses de idade. Enquanto o *C. ubiquitum* e *C. meleagridis* foram observados em uma única criação de ovinocultura, em que havia presença de pombos sobre a ração.

Não houve diferença estatística na associação da positividade com as raças (p=0,1706) e o sexo (p=0,6120) dos cordeiros. Pelo teste de Qui-

Quadrado, houve associação entre a faixa etária (p=0,0107) e a consistência fecal (p=0,0010) em relação à ocorrência de *Cryptosporidium* spp.

A maioria dos cordeiros infectados por *Cryptosporidium* spp. eram jovens, abaixo de seis meses de idade (Tabela 1) e não apresentaram diarreia (Tabela 2).

Tabela 1- Distribuição das espécies de *Cryptosporidium* spp. detectadas por meio de nPCR e sequenciamento, de acordo com a faixa etária

Faixa etária (meses)	Animais	Número Positivo – nPCR (%)	Espécies Identificadas[a]
até 06	91	20 (21.9)	*C. xiaoi* (8) *C.ubiquituim* (3)
07 – 12	102	09 (8.8)	*C. xiaoi* (7) *C.meleagridis* (1)
Total	193	29 (15.0)	*C. xiaoi* (15) *C.ubiquituim* (3) *C. meleagridis* (1)

[a] Identificação das espécies por sequenciamento foi bem sucedido em 19 de 29 amostras.

Tabela 2- Ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp. detectada por meio da nPCR, de acordo com a consistência fecal

Consistência fecal	Número de animais	Número Positivo – nPCR (%)	P(1)
Normais	156	17 (10.9)	0.0010
Diarreicas	37	12 (32.4)	

(1) teste χ^2

4 DISCUSSÃO

Pelo teste de OPG realizado neste estudo, a ocorrência foi de 71,4%, revelando ovos de pelo menos um helminto e/ou oocistos de *Eimeria* spp. nos animais. Porém dados inferiores foram constatado por Brito et al. (2009), apresentando também infecção simultânea e multiespecífica de helmintos e coccídios em ovinos.

As frequências dos gêneros identificados parasitando cordeiros foram: *Haemonchus* spp.; *Trichostrongylus* spp.; *Oesophagsotumum* spp. e infecção mista por *Haemonchus* e *Trichostrongylus,* sendo estes em sua maioria da raça Texel. Morales et al. (2001), em estudo da infecção por nematodeos gastrintestinais em ovelhas na Venezuela, e Miller et al. (1998), em avaliação do parasitismo em ovinos da raça Suffolk nos Estados Unidos, identificaram os gêneros *Haemonchus* e *Trichostrongylus* como dominantes nesses rebanhos. Ng'ang'a et al. (2004), verificando a epidemiologia de helmintos gastrintestinais em ovinos da raça Dorper no semiárido do Quênia, observaram os seguintes gêneros: *Trichostrongylus*, *Haemonchus, Oesophagostomum* e também *Cooperia,* na qual este último não foi evidenciado neste trabalho.

Em cordeiros na Alemanha, a ocorrência do coccídeo do gênero *Eimeria* foi de 66,4% nas amostras positivas (GAULY et al., 2004), 91,3% na Austria (PLATZER et al., 2005) e 93,1% na região nordeste da China (WANG et al., 2010a), não condizentes com os dados avaliados neste estudo que mostrou ocorrência da infecção de 19%.

Espécies mais frequentes nesta pesquisa foram *E. weybridgensis* e *E. ovinoidalis* concordando com Amarante e Barbosa (1992) e Platzer et al. (2005), sendo que a *E. ovinoidalis* também estava entre as mais observadas por Gauly et al. (2004). Já Wang et al. (2010a) detectou como espécies mais evidentes *E. ahsata, E. parva* e *E. bakuensis*.

A *Eimeria* afeta todas as idades, mas mais intensamente cordeiros por serem mais susceptíveis (TAYLOR; CATCHPOLE, 1994). Morbidade, mortalidade e impacto econômico estão associados principalmente aos cordeiros jovens, responsáveis pela liberação de grandes quantidades de oocistos no ambiente (SILVA et al., 2007).

Infecções mistas encontradas entre as amostras são mais comumente vistas que a presença de uma única espécie (ARSLAN et al., 1999), sendo descritas simultaneamente até nove espécies de *Eimeria* (GAULY et al., 2004), estando de acordo com os achados presentes, em que há coinfecção entre as

espécies deste gênero. Isto também se deve pelo meio existente dos animais estarem expostos a biodiversidade ambiental (SILVA et al., 2007).

Consideradas espécies patogênicas *E. crandallis* e *E. ovinoidalis*, a maioria das outras espécies apresentam patogenicidade relativamente baixa (TAYLOR et al., 2010). Embora esta última seja encontrada com maior frequência no presente estudo, nenhum caso de coccidiose clínica foi observada, apesar da eliminação de oocistos em suas fezes. Infecção subclínicas são susceptíveis especialmente aos animais jovens, a doença pode ocorrer sob fatores de estresse como, mudanças na alimentação, reagrupamento, desmame, clima e transporte (WANG et al., 2010a).

Neste estudo, as fêmeas e cordeiros com padrão racial foram mais afetados, portanto ainda há poucos relatos direcionados à estes grupos, o que de certa forma poderiam contribuir para a epidemiologia deste parasito. Porém uma pesquisa envolvendo ovelhas das raças Merino, Corriedale, Ideal e Romney Marsh, em Botucatu-SP, não observaram predisposição racial às infecções por *Eimeria* spp., mas é provável que os cordeiros das diferentes raças apresentem também susceptibilidade similar à eimeriose (BRESCIANI et al., 2002).

Em nosso estudo, observamos 15% de ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em cordeiros por meio da nPCR.

Resultados superiores como 77,4% nos Estados Unidos, 25% no Brasil e 24,5% na Austrália, foram verificados por Santín et al. (2007), Silva, (2007) e Yang et al. (2009), mas Fiuza et al. (2011) no Brasil, observaram apenas 1,6% de positividade nos animais examinados. Porém, Robertson et al. (2010) na Noruega, evidenciaram achados semelhantes aos nossos.

Das amostras positivas para *Cryptosporidium*, a maioria dos cordeiros apresentaram fezes com consistência sólida (tabela 2), contrapondo-se estes dados por Causapé et al. (2002) na Espanha, que detectaram maior positividade em animais diarreicos. Em relação a faixa etária, outros autores também relataram alta ocorrência deste protozoário nos mais jovens (MAJEWSKA et al., 2000; CAUSAPE et al., 2002; SANTÍN et al., 2007).

A espécie de maior frequência observada nos cordeiros foi *C. xiaoi* seguida pelo *C. ubiquitum,* dados semelhantes foram verificados na Austrália (SWEENY et al., 2011). Distribuída no mundo todo, está última espécie foi isolada em seres humanos (ONG et al., 2002; XIAO, 2010), mas tem sido observada em cordeiros com menos de doze meses de idade (SANTÍN et al., 2007; YANG et al., 2009; ROBERTSON et al., 2010; WANG et al., 2010; SWEENY et al., 2011).

No presente estudo, foi observado *C. ubiquitum* em cordeiros de cinco dias à seis meses de idade, porem Wang et al. (2010) encontraram *C. ubiquitum* em todos os grupos de idade (cordeiros e ovelhas adultas) e foi considerada a principal espécie em ovinos na China.

Em concordância com nossa pesquisa, Swenny et al. (2011), isolaram *C. ubiquitum* em cordeiros de duas semanas a quatro meses de idade. Casos esporádicos desta espécie afetam os seres humanos e têm sido descritos (LEONI et al., 2006; SOBA et al., 2006) e, portanto, esta espécie deve ser considerado um patógeno zoonótico (SANTÍN et al., 2007).

No Brasil, este é o primeiro relato de *C. xiaoi* em cordeiros. Infecções geneticamente confirmadas por *C. xiaoi*, (antes referido como *C. bovis-like*) essa nova espécie foi nomeada em homenagem ao Dr. Lihua Xiao por suas contribuições na taxonomia e epidemiologia molecular de espécies de *Cryptosporidium* (FAYER; SANTÍN, 2009). Este parasito foi observado em ovinos nos EUA (SANTÍN et al., 2007); Espanha (NAVARRO-I-MARTINEZ et al., 2007); Tunísia (ELWIN; CHALMERS, 2008); Reino Unido (MUELLER-DOBLIES et al., 2008); China (WANG et al., 2010), Noruega (ROBERTSON et al., 2010) e Austrália (SWEENY et al., 2011). Neste estudo, *C. xiaoi* foi observado nos dois grupos de faixas etárias, sendo também encontrado por outros autores em ovinos entre 14 e 21 dias de idade, e de dois a 48 meses (SANTÍN et al., 2007; NAVARRO-I-MARTINEZ et al., 2007; ELWIN; CHALMERS, 2008; MUELLER-DOBLIES et al., 2008). No entanto, Wang et al. (2010), observaram esta espécie somente em cordeiros.

Das três propriedades analisadas, o *C. ubiquitum* e *C. meleagridis* foram observados em uma única criação de ovinocultura, onde foram notados no momento da colheita das amostras, pombos e gatos que permaneciam no compartimento em que era armazenada a ração administrada ao rebanho.

C. meleagridis foi descrito inicialmente em perus (*Meleagris gallopavo*), em 1955 (SLAVIN, 1955) e posteriormente em várias espécies de aves (RYAN; XIAO, 2008), incluindo os pombos domésticos (QI et al., 2011). *C. meleagridis* é a terceira espécie mais comum no homem (CAMA et al., 2008) e já foi detectada em humanos tanto imunocompetentes como imunossuprimidos (XIAO; FENG, 2008; CAMA et al., 2008). A presença de *C. meleagridis* em fezes de ovinos, neste experimento, não significa que houve infecção, pois há possibilidade de ingestão de oocistos eliminados por pombos presentes no ambiente e sua eliminação passiva, em fezes.

5 CONCLUSÃO

A ocorrência da infecção por nematódeos em cordeiros até um ano de idade foi alta, sendo observado com maior frequência *Haemonchus* spp.; *Trichostrongylus* spp. e entre as espécies identificadas de *Eimeria* verificou-se a *E. ovinoidalis* considerada patogênica. Os cordeiros foram afetados por uma combinação mista de coccídeo, demonstrando uma cinética de oocistos e patogenicidade diferente. A infecção por *Cryptosporidium* foi detectada nos cordeiros, com predominância de *C. xiaoi*, sendo o primeiro estudo de caracterização molecular desta espécie de *Cryptosporidium* no Brasil. Também foram encontradas *C. ubiquituim* e *C. meleagridis*, duas espécies com potencial zoonótico.

REFERÊNCIAS

AMARANTE, A.F.T., BARBOSA, M.A. Species of coccidia occurring in lambs in São Paulo State, Brazil**. Veterinary Parasitology,** v. 41, n.3-4, p. 189-193, 1992.

AMARANTE, A.F.T.; BRICARELLO, P.A.; ROCHA, R.A.; GENNARI, S.M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France lambs to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v. 120, p. 91-106, 2004.

ARSLAN, M. O.; UMUR, S.; KARA, M. The prevalence of coccidian species in sheep in Kars Province of Turkey. **Tropical Animal Health Production,** v. 31, n. 3, p. 161-165, 1999.

BERRILLI, F.; D'ALFONSO, R.; GIANGASPEROD, A.; MARANGI, M.; BRANDONISIO, O.; KABORÉ, Y.; GLÉ, C.; CIANFANELLI, C.; LAURO, R.; DI CAVE, D. *Giardia duodenalis* genotypes and *Cryptosporidium* species in humans and domestic animals in Côte d'Ivoire: Occurrence and evidence for environmental contamination. **Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 3, p. 191– 195, 2012.

BRESCIANI, K. D. S.; AMARANTE, A. F. T.; PERRI, S. H. V. Ocorrência de *Eimeria* spp. em ovelhas de quatro raças. **Veterinária e Zootecnia**, v. 11, p. 19-30, 2002.

CAMA, V.A.; BERN, C.; ROBERTS, J.; CABRERA, L.; STERLING, C.R.; ORTEGA, Y.; GILMAN, R.H.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 10, p. 1567 – 1574, 2008.

CAUSAPÉ, A.C.; QUILEZ,J.; SANCHEZ-ACEDO, C.; DEL CACHO, C.E.; LÓPEZ-BERNAD, F. Prevalence and analysis of potencial risk factors for *Cryptosporidium parvum* infection in lambs in Zaragoza (northeastern Spain). **Veterinary Parasitology**, v. 104, n. 4, p. 287-298, 2002.

ELWIN, K.; CHALMERS, R.M. Contemporary identification of previously reported novel *Cryptosporidium* isolates reveals *Cryptosporidium* bovis and the cervine genotype in sheep (Ovis aries). **Parasitology Research**, v. 102, n. 5, p. 1103–1105, 2008.

FAYER, R.; SANTÍN, M. Cryptosporidium xiaoi n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (Ovis aries). **Veterinary Parasitology**, v. 164, n. 2-4, p. 192–200, 2009.

FÉRES, F.C.; LOMBARDI, A.L.; CARVALHO, M.P.P.; MENDES, L.C.N.; PEIRÓ, J.R.; CADIOLI, F.A.; MEIRELES, M.V.; PERRI, S.H.V.; FEITOSA, F.L.F. Ocorrência e caracterização molecular de *Cryptosporidium* em cordeiros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v. 61, n. 4, p. 1002-1005, 2009.

FIUZA, V.R.S.; COSENDEY, R.I.J.; FRAZÃO-TEIXEIRA, E; SANTÍN, M.; FAYER, R.; OLIVEIRA, F.C.R. Molecular characterization of *Cryptosporidium* in Brazilian sheep. **Veterinary Parasitology,** v. 175, n. 3-4, p. 360–362, 2011.

FOREYT, W.J. Coccidiosis and cryptosporidiosis in sheep and goats. **Veterinary Clinics of North American Food Animal Practice,** v. 6, n.3, p. 655-70, 1990.

GAULY, M.; REEG, J.; BAUER, C.; ERHARDT, G. Influence of production systems in lambs on the *Eimeria* oocyst output and weight gain. **Small Ruminant Research**, v. 55, n. 1-3, p. 159-167, 2004.

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

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Alambari-SP, Pecuária, 2008**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>. Acesso em: 17 ago. 2010.

LEONI, F.; AMAR, C.; NICHOLS, G.; PEDRAZA-DIAZ, S.; MCLAUCHLIN, J. Genetic análisis of *Cryptosporidium* from 2414 human with diarrhea in England between 1985 and 2000. **Journal Medical Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 703–707, 2006.

LIMA, J.D. Coccidiose dos ruminantes domésticos. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 9-13, 2004.

MILLER, J.E.; BAHIRATHAN, M.; LEMARIE, S.L.; HEMBRY, F.G.; KEARNEY, M.T.; BARRAS, S.R. Epidemiology of gastrointestinal nematode parasitism in Suffolk and Gulf Coast Native sheep with special emphasis on relative susceptibility to *Haemonchus contortus* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 74, n. 1, p. 55-74, 1998.

MORALES, G.; PINO, L.A.; SANDOVAL, E.; MORENO, L. Gastrointestinal nematode infection in ewes raised in an arid zone of Venezuela. **Parasitología al Dia**, v. 25, n. 1-2, p. 36-39, 2001.

MUELLER-DOBLIES, D.; GILES, M.; ELWIN, K.; SMITH, R.P.; CLIFTON-HADLEY, F.A.; CHALMERS, R.M. Distribution of *Cryptosporidium* species in sheep in the UK. **Veterinary Parasitology**, v. 154, n. 3-4, p. 214–219, 2008.

NG'ANG'A, C.J.; MAINGI, N.; MUNYUA, W.K.; KANYARI, P.W. Epidemiology of gastrointestinal helminths infections in Dorper sheep in a semi-arid area of Kenya. **Onderstepoort Journal Veterinary Research**, v. 71, n. 3, p. 219-226, 2004.

NAVARRO-I-MARTINEZ, L.; DA SILVA, A.J.; BORNAY-LLINARES, F.J.; MOURA, I.N.; DEL AGUILA, C.; OLEAGA, A.; PIENIAZEK, N.J. Detection and molecular characterization of *Cryptosporidium bovis-like* isolate from a newborn lamb in Spain. **Journal Parasitology**, v. 93, n. 6, p. 1536–1538, 2007.

O'HANDLEY, R.M.; OLSON, M.E. Giardiasis and cryptosporidiosis in ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 22, n. 3, p. 623-643, 2006.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G.; AMARANTE, A.F.T. **Parasitologia animal** - Animais de Produção. 1.ed. São Paulo: Epub, 2001. 273p.

ONG, C.S.L.; EISLER, D.L.; ALIKHANI, A.; FUNG, V.W.; TOMLIN, J.; BOWIE, W.R.; ISAAC-RENTON, J.L. Novel *Cryptosporidium* genotypes in sporadic cryptosporidiosis cases: first report of human infections with a corvine genotype. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 263–268, 2002.

PAOLETTI, B.; GIANGASPERO, A.; GATTI, A.; IORIO, R.; CEMBALO, D.; MILILLO, P.; TRAVERSA, D. Immunoenzymatic analysis and genetic detection of *Cryptosporidium parvum* in lambs from Italy. **Experimental Parasitology**, v. 122, n. 4, p. 349-352, 2009.

PLATZER, B.; PROSL, H.; CIESLICKI, M.; JOACHIM, A. Epidemiology of *Eimeria* infections in an Austrian milking sheep flock and control with diclazuril. **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 1-2, p. 1-9, 2005.

PLUTZER, J.; KARANIS, P. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: An update. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 3-4, p. 187-199, 2009.

QI, M.; WANG, R.; NING, C.; LI, X.; ZHANG, L.; JIAN, F.; SUN, Y.; XIAO, L. *Cryptosporidium* spp. in pet birds: Genetic diversity and potential public health significance. **Experimental Parasitology**, v. 128, n. 4, p. 336-340, 2011.

QUÍLEZ, J.; TORRES, E.; CHALMERS, R.M.; HADFIELD, S.J.; DEL CACHO, E.; SÁNCHEZ-ACEDO, C. *Cryptosporidium* genotypes and subtypes in lambs and goat kids in Spain. **Applied Environmental Microbiology**, v. 74, n. 19, p. 6026– 6031, 2008.

ROBERTSON, L.J.; GJERDE, B.K.; FURUSETH HANSEN, E. The zoonotic potential of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Norwegian sheep: A longitudinal investigation of 6 flocks of lambs. **Veterinary Parasitology**, v. 171, n. 1-2, p. 140–145, 2010.

RYAN U, XIAO L. BIRDS. IN: FAYER R, XIAO L, eds. ***Cryptosporidium*** **and Cryptosporidiosis**. Boca Raton: CRC Press, 2008, p. 395–418.

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

SAS Institute Inc. The SAS System, release 9.2. SAS Institute Inc., Cary:NC, 2008.

SILVA, F.M.P. **Diagnóstico e caracterização molecular de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bovinos e ovinos.** Botucatu. 2007. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica da Universidade Estadual Paulista, UNESP, 2007.

SILVA, T.P.; FACURY FILHO, E.J.; NUNES, A.B.V.; ALBUQUERQUE, F.H.M. R.; FERREIRA, P.M.; CARVALHO, A.U. Dinâmica da infecção natural por *Eimeria* spp. em cordeiros da raça Santa Inês criados em sistema-intensivo no Norte de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** Belo Horizonte, v. 59, n. 6, p. 1468-1472, 2007.

SLAVIN, D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). **Journal Comparative Pathology,** v.65, n. 3, p. 262 – 266, 1955.

SOBA, B.; PETOVEC, M.; MIOC, V.; LOGAR, J. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans in Slovenia. **Clinical Microbiology Infection**, v. 12, n. 9, p. 918–921, 2006.

SOLTANE, R.; GUYOT, K.; DEI-CAS, E.; AYADI, A. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. (Eucoccidiorida: Cryptosporidiidae) in seven species of farm animals in Tunisia. **Parasite**, n. 1, v. 14, p. 335–338, 2007.

SWEENY, J.P.A.; RYAN, U.M.; ROBERTSON, I.D.; YANG, R.; BELL, K.; JACOBSON, C. Longitudinal investigation of protozoan parasites in meat lamb farms in southern Western Australia. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 101, n. 3-4, p. 192– 203, 2011.

TAYLOR, M.A.; CATCHPOLE, J. Review article: Coccidiosis of domestic ruminants. **Applied Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 73-86, 1994.

TAYLOR M.A.; COOP R.L.; WALL R.L. **Parasitologia Veterinária.** 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010, 742p.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 24, p. 4876-4882. 1997.

UENO, H.; GONÇALVES, P.C. **Manual para diagnóstico de helmintoses de ruminantes**. 4.ed. Tokyo: Japan International Cooperation, 1998. 143p.

XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. **Experimental Parasitology,** v. 124, n. 1, p. 80-89, 2010.

XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1239–1255, 2008.

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S.J. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 1, p. 72–97, 2004.

XIAO, L.; ALDERISIO, K.; LIMOR, J.; ROYER, M.; LAL, A.A. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5492-5498, 2000.

XIAO, L.; FENG, Y. Zoonotic cryptosporidiosis. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 309-323, 2008.

XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 80-89, 2010.

WANG, Y.; FENG, Y.; CUI, B.; JIAN, F.; NING, C.; WANG, R.; ZHANG, L.; XIAO, L. Cervine genotype is the major *Cryptosporidium* genotype in sheep in China. **Parasitology Research**, v. 106, n. 2, p. 341–347, 2010.

WANG, C.R.; XIAO, J.Y.; CHEN, A.H.; CHEN, J.; WANG, Y.; GAO, J.F.; ZHU, X.Q. Prevalence of coccidial infection in sheep and goats in northeastern China. **Veterinary Parasitology,** v. 174, p. 213-217, 2010a.

YANG, R.; JACOBSON, C.; GORDON, C.; RYAN, U. Prevalence and characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species in pre-weaned sheep in Austrália. **Veterinary Parasitology**, v. 161, n. 1-2, p. 19-24, 2009.