

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

**OCORRÊNCIA DA INFECÇÃO POR *Cryptosporidium*
spp. EM ÉGUAS E SEUS RESPECTIVOS POTROS EM
MUNICÍPIOS DA REGIÃO NOROESTE DO ESTADO DE
SÃO PAULO**

Sandra Valéria Inácio
Bióloga

ARAÇATUBA – SP
2012

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

**OCORRÊNCIA DA INFECÇÃO POR *Cryptosporidium*
spp. EM ÉGUAS E SEUS RESPECTIVOS POTROS EM
MUNICÍPIOS DA REGIÃO NOROESTE DO ESTADO DE
SÃO PAULO**

Sandra Valéria Inácio

Orientadora: Profa. Adj. Katia Denise Saraiva Bresciani

Co-orientador: Prof. Adj. Marcelo Vasconcelos Meireles

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

ARAÇATUBA – SP

2012

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

SANDRA VALÉRIA INÁCIO – Araçatuba – SP, 22 de Outubro de 1977. Graduação em Ciências Biológicas, 2009, Universidade Paulista de Araçatuba, UNIP, Araçatuba, SP. Professora Eventual da Secretaria do Estado da Educação, SP. Aluna do Curso de Pós Graduação *Lato sensu* em Gestão Ambiental pela Universidade Paulista, UNIP, Araçatuba, São Paulo. Aluna do Curso de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciência Animal – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – Campus de Araçatuba, São Paulo.

EPIGRAFE

"Não coloque um ponto final nas suas esperanças. Ainda há muito o que fazer, ainda há muito o que plantar, e o que amar nessa vida."

(Padre Fabio de Melo)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, ele é fonte de toda sabedoria, sempre foi, é e será a base de tudo em minha vida, e me dá forças para conquistar todos os meus objetivos. Aos meus pais Sebastião e Rosa que sempre acreditaram em mim, interessados em minhas escolhas, apoiando e me encorajando a enfrentar novos obstáculos. Aos meus irmãos Sérgio e Celso exemplos de coragem, humildade, sinceridade e cumplicidade. As minhas amigas que sempre me deram força para lutar nesta caminhada. Ao professor Marcelo sempre me ajudando e orientando, e em especial a professora Kátia que não tenho palavras para agradecer o quanto ela ajudou e confiou em mim ...“Eu gostaria de lhe agradecer pelas inúmeras vezes que você me enxergou melhor do que eu sou. Pela sua capacidade de me olhar devagar, já que nessa vida muita gente já me olhou depressa demais.” (Padre Fábio de Melo).
MUITO OBRIGADA!!!

AGRADECIMENTOS

Á Deus sem ele nada seria possível, ele é a luz que ilumina meu caminho.

Aos meus pais Sebastião e Rosa, duas pessoas incríveis que me deram a base de tudo em minha vida, ótimos exemplos.

A orientadora, professora Kátia pela paciência, confiança e direcionamento.

Ao técnico Gustavo pelas orientações e aconselhamentos.

Á minha equipe de trabalho Roberta, André, Edvania, William, Anaíza.

Aos amigos que me ajudaram muito Ronaldo, Grazielle, Luciana, Sr. Euclides e Diego.

A todos que direta ou indiretamente ajudou-me na realização deste trabalho, minha gratidão.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
SUMMARY	
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	9
1.1 Importância.....	9
1.2 Revisão Bibliográfica.....	9
2. Objetivo Geral.....	15
Referências.....	15
CAPÍTULO 2 – ARTIGO.....	19
Referências.....	25
APÊNDICE.....	29
Apêndice – QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO.....	30

OCORRÊNCIA DA INFECÇÃO POR *Cryptosporidium* spp. EM ÉGUAS E SEUS RESPECTIVOS POTROS EM MUNICÍPIOS DA REGIÃO NOROESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO

RESUMO – No primeiro capítulo foi abordada a importância, assim como os aspectos da etiologia, biologia, epidemiologia e diagnóstico da infecção por *Cryptosporidium* spp. No segundo capítulo, um total de 101 amostras fecais de éguas das raças Quarto de Milha, Mangalarga Marchador, Paint Horse, Crioula e Pampa e seus respectivos potros foram analisados pela técnica de Kinyoun. A partir dos resultados obtidos neste estudo foi elaborado um artigo científico a ser submetido à Revista Brasileira de Parasitologia. A ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* detectada pela técnica de Kinyoun foi de 20,8% (21/101) para potros e 17,8% (18/101) para éguas. Adicionalmente, observou-se que potros com idade superior a dois meses, independentemente da raça analisada, bem como os animais da raça Mangalarga são menos susceptíveis à ocorrência de *Cryptosporidium* spp.

Palavra-chave: Doenças parasitárias em animais, Etiologia, Kinyoun

OCCURRENCE OF INFECTION BY *Cryptosporidium* spp. IN MARES AND THEIR RESPECTIVE FOALS IN MUNICIPALITIES OF THE NORTHWEST REGION OF SÃO PAULO STATE, BRAZIL

SUMMARY – In the first chapter, the importance and aspects related to the etiology, biology, epidemiology and diagnosis of infection by *Cryptosporidium* spp. were addressed. The second chapter reports the analysis, using Kinyoun stain, of a total of 101 fecal samples from mares of the breeds Quarter Horse, Mangalarga Marchador, Paint Horse, Crioula and Pampa and their respective foals. The results obtained in this study were used to prepare a scientific paper to be submitted to the Brazilian Journal of Veterinary Parasitology. Occurrence of infection by *Cryptosporidium*, according to Kinyoun stain, was 20.8% (21/101) for foals and 17.8% (18/101) for mares. In addition, foals older than two months, regardless of the analyzed breed, as well as Mangalarga animals, are less susceptible to the occurrence of *Cryptosporidium* spp.

Keywords: Parasitic diseases in animals, etiology, Kinyoun

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Importância

Agente etiológico de surtos de criptosporidiose por veiculação hídrica em países desenvolvidos, *Cryptosporidium* foi tido como responsável por quadros de má-nutrição e morte em crianças (ROSSIGNOL, 2010).

E 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 (FAYER, 2010; SMITH; NICHOLS, 2010;).

1.2 Revisão de Literatura

O gênero *Cryptosporidium* foi descrito pela primeira vez pelo parasitologista americano Ernest Edward Tyzzer em 1907, quando foi detectado em glândulas gástricas de camundongos de laboratório.

Quanto à classificação sistemática, este protozoário foi classificado como pertencente ao Filo Apicomplexa, por meio de estudos moleculares com utilização do gene 18S do rRNA. Entretanto, o *Cryptosporidium* spp. já foi considerado filogeneticamente mais próximo da subclasse Gregarina (CARRENO et al., 1999).

Atualmente, encontram-se descritas 20 espécies de *Cryptosporidium*. Dentre estas, 12 apresentam ocorrência em mamíferos, com 61 genótipos determinados de acordo com a caracterização genética e a espécie hospedeira (PLUTZER; KARANIS, 2009; SMITH; NICHOLS, 2010).

Cryptosporidium tem um ciclo de vida monoxeno, com localização no trato gastrointestinal do hospedeiro. Algumas características o distinguem de outros coccídios, como a localização intracelular extracitoplasmática, com

organela própria para alimentação e sua capacidade de auto-infecção (TZIPORI, 1998).

Após ingestão dos oocistos esporulados, são liberados quatro esporozoítos no intestino do hospedeiro. O esporozoíto é englobado pelas microvilosidades, originando um vacúolo parasítforo, iniciando a reprodução assexuada que formará os trofozoítos. Com a realização de três divisões nucleares, são liberados de oito e quatro esporozoítos que originarão os merontes tipo I e tipo II, respectivamente os quatro trofozoítos da segunda merogonia irão dar início à reprodução sexuada, com formação de macrogametas e microgametas. A fecundação do macro e microgameta dará origem ao zigoto, resultando na produção de oocistos de parede delgada, capazes de iniciar um novo ciclo dentro do hospedeiro e oocistos de parede espessa, que são altamente resistentes ao ambiente (Figura 1) (TZIPORI, 1998).

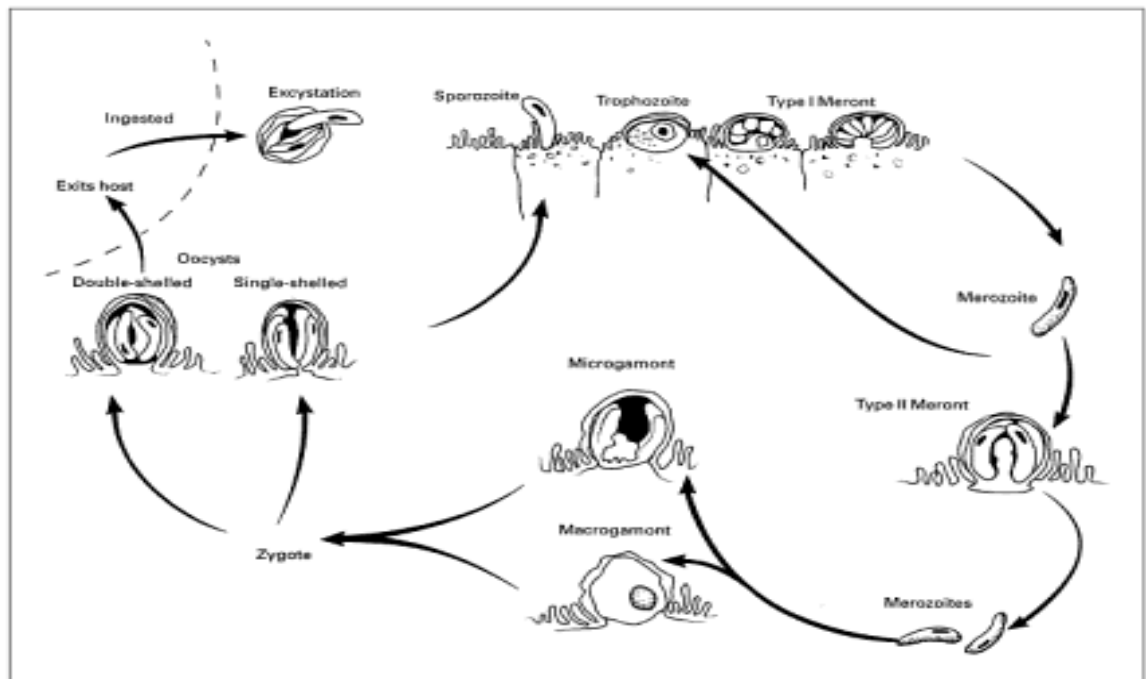


FIGURA 1- Ciclo de vida *Cryptosporidium parvum*. Ilustração de Eric Peterson. Tufts University School of Veter

Oocistos de *Cryptosporidium* são altamente resistentes às condições ambientais e à ação de produtos químicos. Esta característica deve-se a uma complexa barreira protetora, constituída de uma dupla camada de lipoproteínas e carboidratos, que conferem rigidez à sua parede (PLUTZER; KARANIS, 2009; THOMPSON et al., 2008).

Dessecação, variações de temperatura, de pH e exposição à luz ultra violeta podem reduzir o tempo de sobrevivência dos oocistos (SMITH; NICHOLS, 2010).

Os pássaros, anfíbios, répteis e mamíferos, incluindo o homem, podem ser hospedeiros de diferentes espécies de *Cryptosporidium* (FAYER, 2010; NICHOLS, SMITH, 2010; PLUTZER; KARANIS, 2009).

A transmissão antroponótica e zoonótica da criptosporidiose ocorre pela rota fecal-oral, onde as fezes representam a via de eliminação do agente e a boca do hospedeiro sua porta de entrada (Figura 2). Oocistos de *Cryptosporidium* podem ser encontrados frequentemente na água e em alimentos (THOMPSON et al., 2008). A constatação deste protozoário em vegetais crus ou pobremente cozidos, frutos do mar, como ostras e mariscos, leite não pasteurizado, cidra e água mineral tem sido relatada em vários países, podendo ocorrer a contaminação dos alimentos durante sua produção, colheita, transporte e processamento (SMITH; NICHOLS, 2010).

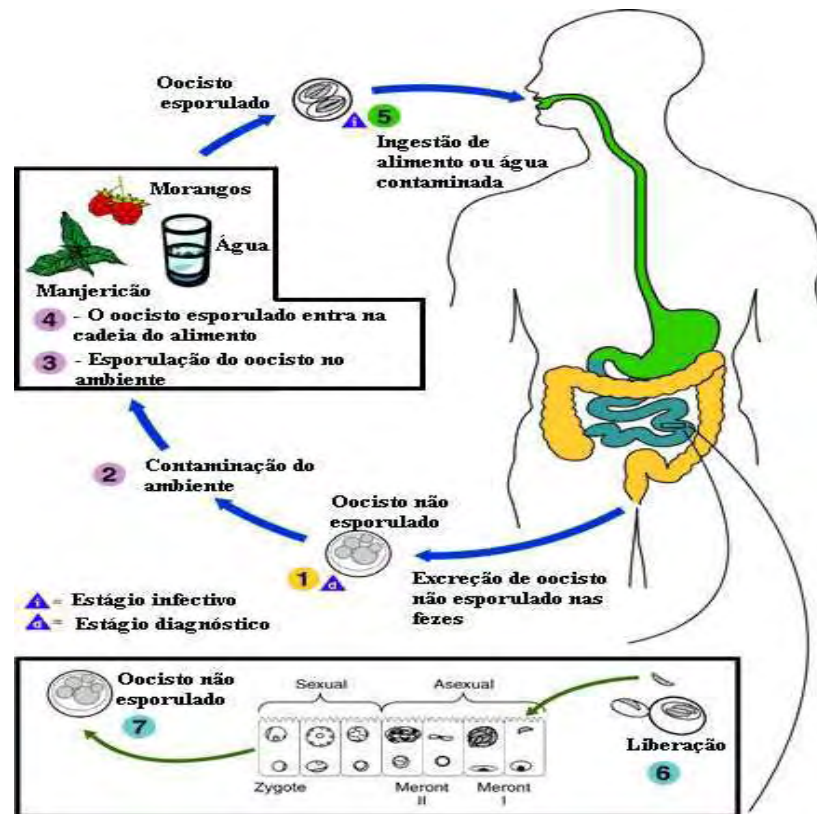


FIGURA 2- Ciclo do parasito *Cryptosporidium* no hospedeiro humano

Historicamente, surtos de criptosporidiose por veiculação hídrica, foram associados, em grande parte, ao acesso de seres humanos a reservatórios de água como piscinas, lagos de recreação e parques aquáticos (SMITH; NICHOLS, 2010).

Com relação à condição imunitária, em animais imunocompetentes, a infecção assume caráter auto-limitante, podendo ocorrer a detecção deste parasito mais frequentemente em jovens. Em adultos, o estresse pode induzir queda da resistência, acarretando no hospedeiro a forma de infecção subclínica crônica (THOMPSON et al., 2008).

Os oocistos de *Cryptosporidium* são de difícil visualização, medindo entre 4 a 6 μm , com forma esférica e estrutura interna que dificulta seu diagnóstico ao microscópico óptico (FAYER et al., 2000).

Isto se deve a dois fatores, em primeiro lugar, seu tamanho diminuto e, além disso, várias espécies neste gênero apresentam-se morfológicamente idênticas, o que inviabiliza a análise morfológica como único método diagnóstico para a identificação espécie específica (FAYER et al., 2000).

O método convencional mais utilizado é a técnica de Ziehl-Neelsen, exame de esfregaços fecais tratados com corantes ácido-rápidos, que possibilitam a observação de oocistos (CIRAK; BAUER, 2004).

A utilização de ferramentas moleculares é de grande importância na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* especialmente, por possibilitar a caracterização molecular desse oocisto obtido de amostras fecais ou ambientais (CACCIÒ et al., 2005).

As técnicas moleculares mais utilizadas, atualmente, são a reação em cadeia de polimerase seguida da digestão dos fragmentos amplificados com enzimas de restrição (PCR-RFLP) e sequenciamento de DNA (XIAO et al., 2004).

A primeira descrição de *Cryptosporidium* em equinos foi realizada em potros árabes com comprometimento do sistema imune (SNYDER et al., 1978).

A criptosporidiose é mais grave quando o hospedeiro apresenta alguma condição imunossupressora, podendo ocorrer diarreia aquosa, má absorção e perda de peso (JOHNSON et al., 1997). A manifestação da infecção em equinos é pouco relatada, entretanto, acredita-se que a maioria desses animais infectados sejam assintomáticos (OLSON et al., 1997).

A prevalência em equinos pode variar conforme o clima, o manejo, a população, a localização geográfica e o método diagnóstico utilizado para sua detecção (SOUZA et al., 2009).

Majewska et al. (2004) observaram concordância entre as técnicas de coloração com Ziel-Nielsen e ensaio imunoenzimático na detecção deste protozoário, verificando ocorrência de 3,5% de oocistos de *Cryptosporidium parvum* em cavalos na Polônia.

Um estudo piloto realizado por Chalmers et al. (2005) em cavalos, identificou a ocorrência do genótipo 2 de *C. parvum*, que é um dos agentes etiológicos que acometem humanos.

Jonhson et al. (1997) não encontraram *Cryptosporidium* em 91 equinos adultos provenientes de 16 regiões da Califórnia, por meio da técnica de imunofluorescência direta.

Grinberg et al. (2008) isolaram e identificaram por meio de biologia molecular *Cryptosporidium* em potros com diarreia na Nova Zelândia, para inferir sobre possíveis rotas de transmissão. Estes pesquisadores não concluíram a origem deste parasito ou o seu potencial zoonótico, entretanto, foram identificados diferentes alelos de *C. parvum*. Os autores sugeriram que este polimorfismo reflete a diversidade genética em *C. parvum*.

Gomes et al. (2008), em Santa Maria, RS verificaram presença de *Cryptosporidium* em 75% (48/64) dos equinos estabulados no Jockey Club, por meio da técnica de Faust modificada, todavia, este resultado contraria a maioria dos estudos em equinos que revelaram ser baixa a ocorrência deste protozoário.

Um estudo realizado por Veronesi et al. (2009) com 150 animais (120 potros e 30 éguas) na Itália descreveram que a falta de imunidade em animais jovens pode influenciar na intensidade da excreção como na prevalência do parasita em questão.

Sobre a infecção natural por *Cryptosporidium*, em equinos, com diferentes tipos de manejo, Souza et al. (2009) concluíram que a infecção provavelmente está relacionada ao estado imunológico e às condições sanitárias ambientais dos equinos. Este estudo foi realizado com 396 amostras coletadas de diferentes populações (16 fazendas de quatro cidades do Rio de Janeiro, Seropédica, Volta Redonda, Quatis, Barra do Piraí, Pinheiral, 4 corporações militares do Estado do Rio de Janeiro e pelo Centro de Controle de Zoonoses de várias regiões da cidade do Rio de Janeiro).

Toscan et al. (2010), no Município de Santa Maria detectaram 38,5% (20/52) de positividade para *Cryptosporidium* spp. em 52 cavalos de tração,

sem raça definida, de ambos os sexos, com faixa etária entre um e vinte anos de idade. As amostras fecais foram examinadas pela técnica de centrífugo-flutuação com sulfato de zinco (Faust et al., 1938) sendo encontrada maior prevalência entre os jovens. Também foi notada elevada ocorrência de cavalos assintomáticos, que implica na contaminação do meio ambiente e possíveis riscos de infecção, especialmente para os cocheiros.

Burton et al. (2010), no Estado de Nova York, verificaram pela técnica de imunofluorescência indireta 7,4% (13/175) de positividade em potros e 1,7% (3/174) nas éguas e pela PCR, porcentagem de 5,1% (9/175) em potros e negatividade em éguas (0/174).

2 Objetivo geral

No presente trabalho pretende-se determinar a ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp. em éguas e seus respectivos potros em municípios da região noroeste do estado de São Paulo e correlacionar a positividade para esse parasito com as variáveis raça, sexo, idade, grau de hidratação e fonte de água. Para tanto, serão empregadas duas metodologias: Kinyoun e Nested PCR.

REFERÊNCIAS

BURTON, A. J.; NYDAM, D. V.; DEAREN, T. K.; MITCHELL, K.; BOWMAN, D. D.; XIAO, L. The prevalence of *Cryptosporidium*, and identification of the *Cryptosporidium* horse genotype in foals in New York State. **Veterinary Parasitology**, v. 174, n. 1-2, p. 139–144, 2010.

CACCIÒ, S.M.; THOMPSON, A.R.C.; MCLAUNCHLIN, J.; SMITH, H.V. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **Trends in Parasitology**, v.21, n.9, p. 430-437, 2005.

CARRENO, R.A.; MARTIM, 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 sequence. **Parasitology Research**, v. 85, n.4, p. 899-904, 1999.

CIRAK, V.Y.; BAUER, C. Comparison of conventional coproscopical methods and commercial coproantigen ELISA Kits for the detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dogs and cats. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift.**, v. 117, n.9-10, p. 410-413, 2004.

CHALMERS, R.M.; THOMAS, A.L.; BUTLER, B.A.; MOREL, M.C. Identification of *Cryptosporidium parvum* genotype 2 in domestic horses. **Veterinary Record**. v. 156, n. 2, p. 49-50, 2005.

FAUST, E.C.; D'ANTONI, J.S.; ODON, V.; MILLER, M.J.; PEREZ, C.; SAWITZ, W.; THOMEN, L.F.; TOBIE, J.; WALKER, J.H. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces I. Preliminary communication. **American Journal of Tropical Medicine**, v.18, p.169-183, 1938.

FAYER, R.; MORGAN, U.M.; UPTON, S.J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, v.30, n. 12-13, p. 1305-1322, 2000.

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

GOMES, A.D.; BARRETA, C.; ZIEGLER, D.P.; SAUSEN, L.; STOEVER, N.; SANGIONI, L.A.; VOGEL, F.S.F.; MONTEIRO, S.G.; ZANELLA, A. Prevalência de *Cryptosporidium* spp e *Giardia* sp em equinos

estabulados no Jockey Club de Santa Maria – RS, Brasil. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.38, n.9, p. 2662-2665, 2008.

GRINBERG, A.; LEARMONTH, J.; KWAN, E.; POMROY, W.; VILLALOBOS, N.L.; GIBSON, I.; WIDMER, G. Genetic Diversity and Zoonotic Potential of *Cryptosporidium parvum* Causing Foal Diarrhea. **Journal of clinical Microbiology**, v. 46, n. 7, p. 2396-2398, 2008.

JOHNSON, E.; ATWILL, E. R.; FILKINS, M. E.; KALUSH J. The prevalence of shedding of *Cryptosporidium* and *giardia* spp. based on a single fecal sample collection from each of 91 horses used for backcountry recreation. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9, n. 1, p. 56-60, 1997.

MAJEWSKA, A. C.; TAMANG P. S. L.; GRACZYK, T. K. Equine *Cryptosporidium parvum* infections in western Poland. **Parasitology Research**, v. 93, n.4, p. 274–278, 2004.

OLSON, M.E.; THORLAKSON, C.L.; DESELLIERS, L., MORCK, D.W.; MCALLISTER, T.A. *Giardia* and *Cryptosporidium* in Canadian farm animals. **Veterinary Parasitology**, v. 68, n. 4, p.375-381, 1997.

PLUTZER, J.; KARANIS, P. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: in update. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1-2, p. 187 -192, 2009.

ROSSIGNOL, J.F. *Cryptosporidium* and *Giardia*: Treatment options and prospects for new drugs. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 45-53, 2010.

SOUZA, P.N.B.; BOMFIM, T.C.B.; HUBER, F.; ABBOUD, L.C.S.; GOMES, R.S. Natural infection by *Cryptosporidium* sp., *Giardia* sp. and *Eimeria*

leuckarti in three groups of equines with different handlings in Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 3-4, p. 327–333, 2009.

SMITH, H.V.; NICHOLS, R.A.B. *Cryptosporidium*: detection in water and food. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 6-79, 2009.

SNYDER, S.P.; ENGLAND, J.J.; MCCHESENEY, A.E. Cryptosporidiosis in immunodeficient Arabian foals. **Veterinary Pathology**, v. 15, n. 1, p. 12-17, 1978.

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

TOSCAN, G.; PEREIRA, R.C.F.; VOGEL, F.S.F.; SANGIONI, L.A. *Cryptosporidium* spp. in traction horse in Santa Maria, RS, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 1, p. 211-213, 2010.

TYZZER, E.E. A sporozoan found em the peptic glands of the commom mouse. **Proceedings of the Society Experimental Biology Medicine Association**. v. 5, p. 12- 13, 1907

TZIPORI, S.; GRIFFTHS, J.K. Natural history and biology of *Cryptosporidium parvum*. **Advances in Parasitology**, v. 40, n. 5, p. 4-36, 1998.

VERONESI, F.; PASSAMONTI, F.; CACCIÓ, S.; DIAFERIA, M.; FIORETTI, D.P. Epidemiological Survey on Equine *Cryptosporidium* and *Giardia* Infections in Italy and Molecular Characterization of Isolates. **Zoonoses and Public Health**, v.57, n. 7-8, p. 510-517, 2009

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

CAPITULO 2 – CRIPTOSPORIDIOSES EM ÉGUAS E POTROS DA REGIÃO NOROESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

Título

Criptosporidioses em Éguas e Potros da Região Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil

Cryptosporidiosis in Mares and Foals of the Northwest Region of São Paulo State, Brazil

Sandra Valéria Inácio¹, Roberta Lomonte Lemos de Brito², Anaiza Simão Zucatto³, Willian Marinho Dourado Coelho⁴, Monally Conceição Costa de Aquino⁵, André de Abreu Rangel Aguirre⁶, Silvia Helena Venturoli Perri⁷, Marcelo Vasconcelos Meireles⁸, Katia Denise Saraiva Bresciani⁹

1. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Araçatuba – SP, Brasil. sandra_byol@yahoo.com.br

2. Doutoranda em Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Medicina Veterinária de Jaboticabal, UNESP, Jaboticabal - SP, Brasil. rolomonte@gmail.com

3. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Araçatuba – SP, Brasil. anaszucatto@hotmail.com

4. Doutor em Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Medicina Veterinária de Jaboticabal, UNESP, Jaboticabal - SP, Brasil. willianmarinho@hotmail.com

5. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Araçatuba – SP, Brasil. monallyaquino@hotmail.com
 6. Graduando do Curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Araçatuba – SP, Brasil. andreaguirrevet@hotmail.com
 7. Professora Assistente Doutora do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Araçatuba, SP, Brasil. shvperri@fmva.unesp.br
 8. Professor Adjunto do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução, Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Araçatuba – SP, Brasil. marcelo@fmva.unesp.br
 9. Professora Adjunta do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – UNESP/Araçatuba, SP. - Rua: Clóvis Pestana, 793, Bairro Dona Amélia, CEP 16050-680, Araçatuba/SP. Telefone (18) 3636-1370 – Fax (18) 36361352 e-mail: bresciani@fmva.unesp.br
- Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UNESP – Campus de Araçatuba (Protocolo n.º.2009-002165).

Abstract: The present study aimed to analyze the occurrence of infection by *Cryptosporidium* spp. in mares and their respective foals. A total of 101 mares and 101 foals of several breeds were employed; among foals, 62 were males and 39 females, aged from three to 330 days. Feces were collected directly from the rectal ampulla, purified and processed according to modified Kinyoun stain. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. was 21.8% (21/101) for foals and 17.8% (18/101) for mares, according to Kinyoun stain. Foals younger than 60 days were more susceptible to the infection. A significant association with breeds and age was evidenced for the occurrence of *Cryptosporidium* spp. The obtained results led to the conclusion that foals older than two months and Mangalarga animals are less susceptible to occurrence of *Cryptosporidium* spp.

Keywords: Parasitic Diseases in animals, etiology, Kinyoun

Resumo: O presente estudo tem como objetivo analisar a ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp. em éguas e seus respectivos potros. Um total de 101 éguas e 101 potros de diversas raças foram utilizados, sendo que entre os filhotes, 62 eram machos e 39 fêmeas, com idade variando de três até 330 dias. Fezes foram colhidas diretamente da ampola retal, purificadas e processadas pela técnica de Kinyoun modificada. A ocorrência de *Cryptosporidium* spp. observada foi de 21,8% (21/101) para potros e 17,8% (18/101) para éguas pela técnica de Kinyoun. Potros com menos de 60 dias foram mais susceptíveis a infecção. Associação significativa com as raças e a idade foi evidenciada em relação à ocorrência de *Cryptosporidium* spp. A partir dos resultados obtidos conclui-se neste estudo que potros com idade superior dois meses e animais da raça Mangalarga são menos susceptíveis à ocorrência de *Cryptosporidium* spp.

Palavra-chave: Doença parasitária em animais, Etiologia, Kinyoun

Introdução

O protozoário *Cryptosporidium* tem sido associado à presença de diarreia em animais imunocompetentes e imunodeficientes (BJORNEBY et al., 1991; COLEMAN et al., 1989; GIBSON et al., 1983; GRINBERG et al., 2003; MAIR et al., 1990).

A análise dos fatores de risco envolvidos na eliminação fecal de oocistos de *Cryptosporidium parvum* em cavalos foi realizada por Cole et al. (1998). Todavia, alguns aspectos clínicos e epidemiológicos desta infecção ainda não estão bem esclarecidos (VERONESI et al., 2009). No Brasil dados sobre a

ocorrência de *Cryptosporidium* spp. na espécie equina são escassos até o momento.

O presente estudo tem como objetivo analisar a ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp. em éguas e seus respectivos potros em municípios da região noroeste do estado de São Paulo e correlacionar a positividade para esse parasito com as variáveis raça, sexo, idade, grau de hidratação das fezes e fonte de água.

Material e Métodos

A pesquisa foi realizada em 11 fazendas localizadas nos Municípios de Araçatuba, Birigui, Guararapes e Santo Antônio do Aracanguá, na região Noroeste do Estado de São Paulo, durante o período de novembro de 2010 a março de 2011. Um total de 101 éguas e seus respectivos potros foram utilizados, porém para análise estatística foi considerado um n=99 para cada população de animais. Estes eram das raças Quarto de Milha, Mangalarga Marchador, Paint Horse, Croula e Pampa e entre os filhotes, 62 eram machos e 39 fêmeas, com idade variando de três até 330 dias. Os potros foram distribuídos conforme sua idade em dois grupos ≤ 60 dias e > 60 dias.

Um questionário epidemiológico foi aplicado aos proprietários, contendo perguntas a respeito da idade, sexo, raça e tipos de fontes de água dos equinos envolvidos no estudo.

Amostras fecais foram colhidas diretamente da ampola retal dos animais e acondicionadas sob refrigeração, sendo posteriormente realizados esfregaços fecais. Para a padronização da determinação do grau de hidratação das fezes foi adotada a classificação: sólida, semi-sólida, pastosa ou líquida. E quanto à coloração foi estipulado o seguinte critério: verde, verde musgo, marrom, verde amarelado e amarelo. As informações referentes às condições fecais foram introduzidas no banco de dados para correlacionar o status físico das fezes e a ocorrência do parasito, sendo incluídas também as variáveis:

idade; sexo; raça; consistência; cor e tipos de fontes de água utilizadas pelos animais envolvidos no estudo.

Esfregaços fecais foram confeccionados a partir de amostras purificadas (MELONI; THOMPSON, 1996) e posteriormente foram corados pela técnica de Kinyoun modificada (LENETTE, 1985) para observação de oocistos de *Cryptosporidium*.

A observação foi efetuada com microscópio óptico de luz em aumento de 40 e 100 vezes. A infecção por *Cryptosporidium* foi classificada como positiva ou negativa com base na presença ou ausência de oocistos nas amostras examinadas.

As variáveis foram analisadas pelo teste de qui-quadrado (χ^2) ou teste exato de Fisher e teste de Mann-Whitney (ZAR, 1999), com o emprego do programa SAS (SAS, 2008), com nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

Por meio da técnica de Kinyoun foi observada ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em 20,8% (21/101) dos potros e 17,8% (18/101) das éguas. Potros apresentaram maior ocorrência para *Cryptosporidium* comparativamente às éguas adultas, o que vem ao encontro dos achados de Burton et al. (2010).

De acordo com a técnica de Kinyoun houve positividade de 12,1% (12/99) de amostras positivas para potros e suas respectivas mães. Cavalos maduros não são considerados importantes fontes de infecção para potros (COLE et al., 1998) e a infecção dos potros não foi associada com a de suas mães (MAJEWSKA et al., 2004).

Estudos que utilizaram a técnica de coloração de Ziehl-Neelsen detectaram resultados superiores e inferiores à ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* observada neste trabalho, como 27,8 % (25/90) por Marques (2010) em Porto Alegre, Brasil e 0,75% (3/396) por Souza et al. (2009), no Rio de Janeiro, Brasil, respectivamente. Assim, cavalos adultos assintomáticos, são

considerados como fontes de contaminação ambiental, inclusive devido conteúdo fecal produzido pelos mesmos (MARQUES et al., 2010).

Tanto a técnica de Ziehl-Neelsen como a de Kinyoun modificado fundamentam-se no princípio da coloração álcool-ácido-resistentes de oocistos do *Cryptosporidium* spp. nas fezes (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDCP), 2011; DE CARLI, 2001; RIGO; FRANCO, 2002;).

Potros com idade inferior a dois meses, ≤ 60 dias foram mais susceptíveis a infecção criptosporídica ($p=0,0062$), com 12,1% (12/99) de ocorrência enquanto que > 60 , foram 9,1% (9/99) de positivos. Duas amostras dos potros com 60 e 90 dias positivas apresentaram-se fezes líquidas, uma mãe positiva apresentou fezes de consistência pastosa.

Cole et al. (1998) apontaram em seu estudo a diarreia relacionada à presença do protozoário supramencionado e Grinberg et al. (2003) aparentemente evidenciaram este sinal clínico em potros imunocompetentes. Em nosso estudo, a consistência ($p=0,2119$ e $p=0,2403$) e a cor ($p=0,6842$ e $p=0,5023$) das fezes, não foram associadas com a ocorrência da doença em potros e éguas, respectivamente, o que é concordante com observações de Veronesi et al., (2009), Burton et al., (2010).

No que concerne ao aspecto racial, houve uma associação significativa ($p<0,0001$) entre a ocorrência de *C. parvum*, pela técnica de Kinyoun com a raça dos potros sendo que foi observado 30,0% (15/50) de positividade para Quarto de Milha, 2,4% (1/42) para o padrão racial Mangalarga Marchador, 80,0% (4/5) para Paint Horse, um 100% (1/1) da raça Crioula e 0% (0/1) para Pampa. No entanto, no trabalho de Cole et al. (1998) a associação foi significativa para cavalos Puro-Sangue.

Neste estudo não houve associação significativa entre a ocorrência do protozoário e o sexo dos potros ($p=0,1700$), como também para com as fontes de águas de bebida utilizadas pelos animais da propriedade ($p=0,4877$).

Souza et al. (2009) observaram maior proporção de machos naturalmente infectados por *Cryptosporidium* e também concluíram que a enfermidade em eqüinos, com diferentes tipos de manejo, está provavelmente

relacionada ao estado imunológico e às condições sanitárias encontradas no local em que vivem os mesmos, uma vez que estes já foram incriminados como fonte de infecção ambiental (VERONESI et al., 2009).

Neste aspecto, vale ressaltar que em estudos epidemiológicos já realizados, foi notado que a infecção criptosporídica se concentra particularmente em uma fazenda ou local e isto pode ser atribuído às características do manejo adotado na propriedade (VERONESI et al., 2009, BURTON et al., 2010), no presente trabalho verificou-se que todas as amostras colhidas dos potros foram positivas (7/7) com idade variando entre 35 e 120 dias.

Conclusão

A partir dos resultados obtidos neste estudo conclui-se que potros acima de dois meses e a raça Mangalarga são menos susceptíveis a ocorrência de *Cryptosporidium* spp.

Referências

BJORNEBY, J. M.; LEACH, D. R.; PERRYMAN, L. E. Persistent Cryptosporidiosis in Horses with Severe Combined Immunodeficiency. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 10, p. 3823-3826, 1991.

BURTON, A. J.; NYDAM, D. V.; DEAREN, T. K.; MITCHELL, K.; BOWMAN, D. D.; XIAO, L. The prevalence of *Cryptosporidium*, and identification of the *Cryptosporidium* horse genotype in foals in New York State. **Veterinary Parasitology**, v. 174, n. 1-2, p. 139–144, 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Disponível em: <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Cryptosporidiosis.htm>> Acesso em: 27 set. 2011.

COLE, D.J.; COHEN, N.D.; SNOWDEN, K.; SMITH, R. Prevalence of and risk factors for fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 213, n.9, p. 1296-302, 1998.

COLEMAN, S.U.; KLEI T.R.; FRENCH, D.D.; CHAPMAN, M.R., CORSTVET, R.E. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. In equids in Louisiana. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, n. 4, p. 575–577, 1989.

De CARLI, G.A.; MOURA, H. Métodos de coloração para Coccídeos intestinais. In.: De CARLI, G.A. **Parasitologia clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas**. São Paulo: Atheneu,, p. 223-264, 2001.

GIBSON, J. A.; HILL, M. W. M.; HUBER, M. J. Cryptosporidiosis in Arabian foals with severe combined immunodeficiency. **Australian Veterinary Journal**, v. 60, n. 12, p. 378–379, 1983.

GRINBERG, A.; OLIVER, L.; LEARMONTH, J. J.; LEYLAND, M.; ROE, W.; POMROY, W. E. Identification of *Cryptosporidium parvum* “cattle” genotype from a severe outbreak of neonatal foal diarrhoea. **The Veterinary Record**, v.153, n. 20, p. 628–631, 2003.

LENNETTE, E.H. **Manual of clinical microbiology**. 4. ed. Washington: American Society of Microbiology, 1985. p. 1149.

MAJEWSKA, A. C.; TAMANG P. S. L.; GRACZYK, T. K. Equine *Cryptosporidium parvum* infections in western Poland. **Parasitology Research**, v. 93, n.4, p. 274–278, 2004.

MAIR, T. S.; TAYLOR, F. G.; HARBOUR, D. A.; PEARSON, G. R. Concurrent *Cryptosporidium* and Coronavirus infections in an Arabian foal with combined immunodeficiency syndrome. **The Veterinary Record**, v. 126, n. 6, p. 127–130, 1990.

MARQUES, S. M. T. Cryptosporidiosis in Horses of Urban Areas of Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 30, n. 7, p. 356-358, 2010.

MELONI, B.P.; THOMPSON, R.C.A. Simplified methods for obtaining purified oocysts from mice and for growing *Cryptosporidium parvum* in vitro. **Journal of Parasitology**, v.82, n.5, p.757-762, 1996.

RIGO, C.R.; FRANCO, R.M.B. Comparação entre os métodos de Ziehl Neelsen modificado e Acid-Fast-Trichrome para a pesquisa fecal de *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. 35, p. 209-214, 2002.

SAS Institute Inc. **The Statistical analysis system**, release 9.2. SAS Institute Inc., Cary: NC, 2008.

SOUZA, P.N.B.; BOMFIM, T.C.B.; HUBER, F.; ABBOUD, L.C.S.; GOMES, R.S. Natural infection by *Cryptosporidium* sp., *Giardia* sp. and *Eimeria leuckarti* in three groups of equines with different handlings in Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 3-4, p. 327–333, 2009.

VERONESI, F.; PASSAMONTI, F.; CACCIÓ, S.; DIAFERIA, M.; FIORETTI, D.P. Epidemiological Survey on Equine *Cryptosporidium* and *Giardia* Infections in Italy and Molecular Characterization of Isolates. **Zoonoses and Public Health**, v.57, n. 7-8, p. 510-517, 2009.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1999. p. 930.

APÊNDICES

APÊNDICE - QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA – FOA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

MESTRADO

Projeto: “Ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp. em éguas e seus respectivos potros em municípios da região noroeste do Estado de São Paulo”.

Questionário

LEVANTAMENTO DE DADOS – SITUAÇÃO ATUAL

1.0- IDENTIFICAÇÃO DA PROPRIEDADE

Nome do proprietário:

Nome da propriedade:

Município:

Telefone:

Endereço:

Distância da área urbana:

Fonte da água: Potável () Poço () e Nascente ()

2.0- LEVANTAMENTO DA CRIAÇÃO

Raça do equino:

Quantas éguas:

Machos:

Potros:

Época de maior frequência de nascimento:

Acesso à aguada?

Nome

Sexo

Idade