

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

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR**  
**DE *Cryptosporidium* spp. E *Eimeria* spp. EM CRIAÇÕES**  
**COMERCIAIS BRASILEIRAS DE COELHOS**

**Maísa Melo Heker**

Zootecnista

ARAÇATUBA – SP

2015

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

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE  
*Cryptosporidium* spp. E *Eimeria* spp. EM CRIAÇÕES  
COMERCIAIS BRASILEIRAS DE COELHOS**

**Maísa Melo Heker**

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles**

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

ARAÇATUBA – SP

2015

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

Heker, Maísa Melo

H366o

Ocorrência e caracterização molecular de *cryptosporidium* spp. e *eimeria* spp. em criações comerciais brasileiras de coelhos / Maísa Melo Heker

Araçatuba: [s.n], 2015

88f. il.; CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Medicina Veterinária, 2015

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles

1. Coccidiose. 2. Criptosporidiose. 3. Microscopia 4. PCR  
5. Sequenciamento. I. T.

CDD: 616.936

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** Ocorrência e caracterização molecular de Cryptosporidium spp. e Eimeria spp. em criações comerciais brasileiras de coelhos.

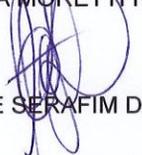
**AUTORA:** MAÍSA MELO HEKER

**ORIENTADOR:** Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES

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

  
Dr. WESLEN FABRÍCIO PIRES TEIXEIRA

  
Dra. PAOLA MORETTI RUEDA

  
Dra. GIANE SERAFIM DA SILVA

  
Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI

  
Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES

**DATA DA REALIZAÇÃO:** 30 de setembro de 2015.

  
\_\_\_\_\_  
Presidente da Comissão Examinadora  
Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES  
- Orientador -

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**MAÍSA MELO HEKER** - nascida na cidade de Franca, São Paulo no dia 04 de junho de 1984. Filha de Aparecida Pina de Melo Heker e Carlos Roberto Heker. Irmã de Carlos Roberto Heker Junior e José Pedro Melo Heker. Iniciou o curso de Zootecnia em março de 2004 na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da UNESP, Campus Botucatu. Durante a graduação participou de grupos de estudos diversos e foi diretora de projetos do grupo Piracema (EPA Jr.). Participou como ouvinte e da organização de cursos na área de Zootecnia. Nos anos de 2007 e 2008 obteve bolsa de iniciação científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) na área de Rancultura. Iniciou criação de coelhos em 2007 envolvendo-se com o Setor de Cunicultura da FMVZ. Ingressou no curso de Mestrado em Zootecnia, em março de 2011, pelo Programa de Pós Graduação em Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da UNESP, Campus Jaboticabal, com bolsa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) na área de Etologia e Bem-estar na Cunicultura. Em março de 2013 ingressou no curso de Doutorado pelo Programa de Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária (FMVA) da UNESP, Campus Araçatuba, com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) na área de Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal, realizando estágio de docência na disciplina de Cunicultura para curso de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) UNESP, Campus Jaboticabal nos anos de 2013 e 2014. Ministrou palestras sobre Cunicultura na Faculdade de Medicina Veterinária (FMVA) da UNESP, Campus Araçatuba, na Associação Científica Brasileira de Cunicultura e na Fundação Municipal de Ensino Superior de Bragança Paulista – FESB.

*“Todos os seres da criação são filhos do Pai  
e irmãos do homem...  
Deus quer que auxiliemos aos animais,  
se necessitarem de ajuda.*

*Toda criatura em desamparo tem o mesmo direito à proteção.”*

**Francisco de Assis**

*"Chegará um dia em que o homem conhecerá o íntimo dos  
animais e quando este dia chegar, um crime cometido contra  
um animal, será considerado um crime contra a humanidade".*

**Leonardo da Vinci**

*“A grandeza de uma nação pode ser julgada  
pelo modo que seus animais são tratados”.*

**Mahatma Gandhi**

*"Quando o homem aprender a respeitar (até) o menor ser da  
criação, seja animal ou vegetal,  
ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante.”*

**Albert Schweitzer**

## **Dedico**

*Aos meus pais Aparecida e Carlos,*

*Aos meus irmãos Carlos e José Pedro,*

*Ao meu marido Nathan Leone,*

pelo imenso amor, paciência e compreensão

do meu amor pelos animais.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que me deu força para enfrentar tantos momentos de dificuldade.

Agradeço à minha família por todo empenho, paciência e dedicação para realização de mais um sonho.

Agradeço ao meu companheiro *Nathan Leone* por me ajudar a crescer e me tornar cada dia uma pessoa melhor.

Agradeço ao Prof. Dr. *Marcelo Vasconcelos Meireles* por acreditar no trabalho, pela paciência, atenção e por todo ensinamento, realmente um ótimo orientador.

Agradeço à Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP, Campus Araçatuba pela estrutura completa para as análises do projeto.

Agradeço à CAPES pela concessão de Bolsa de Demanda Social.

Agradeço aos coelhos pela existência, pela oportunidade de poder amá-los e conviver todos os dias me trazendo alegria e vontade de viver.

Agradeço aos meus cachorros *Chokan, Tróia, Éti, Yucca, Bartok e Malu* por estarem ao meu lado 24 horas com muito amor e respeito.

Agradeço ao *Alex e Jussara*, pela colaboração, ensinamentos e amizade.

Agradeço à Prof. Dr. *Katia Denise Saraiva Bresciani* pelo prazer de tê-la conhecido, por tanta luz, alegria e paixão pela vida.

## SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	10
1 Infecção por <i>Eimeria</i> .....	10
1.1 Taxonomia.....	11
1.2 Ciclo Biológico.....	13
1.2.1 Migração tecidual de estágios evolutivos.....	15
1.2.2 Merozoíto polinucleado.....	16
1.3 Epidemiologia e sinais clínicos.....	18
1.4 Profilaxia.....	20
2 Infecção por <i>Cryptosporidium</i> .....	21
2.1 Taxonomia.....	22
2.2 Ciclo Biológico.....	22
2.3 Epidemiologia.....	24
2.3.1 Infecção em humanos.....	24
2.3.2 Infecção em coelhos.....	26
Referências.....	28
CAPÍTULO II – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>Cryptosporidium</i> spp. EM CRIAÇÕES COMERCIAIS DE COELHOS NO BRASIL.....	45
Resumo.....	45
Abstract.....	46
Introdução.....	47
Material e Métodos.....	48
Colheita e microscopia das amostras fecais.....	48
Exame Microscópico.....	49
Extração do DNA.....	49
PCR e sequenciamento.....	50
Resultado e Discussão.....	52
Referências.....	54
CAPÍTULO III – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>Eimeria</i> spp. EM CRIAÇÕES BRASILEIRAS DE COELHOS.....	60
Resumo.....	60
Abstract.....	61
Introdução.....	62
Material e Métodos.....	63
Colheita e microscopia das amostras fecais.....	63
Exame Microscópico.....	64
Extração do DNA.....	65
Reação em cadeia pela polimerase.....	66
Sequenciamento dos fragmentos amplificados pela PCR.....	67
Clonagem molecular.....	68
Análise estatística.....	70
Resultados e Discussão.....	70
Conclusões.....	80
Referências.....	80
CAPÍTULO 4 – IMPLICAÇÕES.....	86

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR  
DE *Cryptosporidium* spp. E *Eimeria* spp. EM CRIAÇÕES  
COMERCIAIS BRASILEIRAS DE COELHOS**

**RESUMO** – A eimeriose é a enfermidade parasitária importante em coelhos, que são hospedeiros de 11 espécies de *Eimeria*. A criptosporidiose é uma zoonose que pode ser transmitida por meio de alimentos e água contaminados com oocistos eliminados por animais e pessoas infectadas. O objetivo deste estudo foi verificar a ocorrência de *Eimeria* spp. e de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de coelhos, realizar a classificação molecular e relacionar a presença dos parasitos às diferentes categorias, em criações brasileiras. Amostras fecais (n = 514) foram colhidas de 21 granjas. Os oocistos foram purificados e visualizados por microscopia. Cinquenta e cinco amostras positivas para *Eimeria* spp., pela microscopia, foram submetidas à reação em cadeia pela polimerase (PCR) para amplificação de fragmento parcial da região ITS1 do gene do rRNA de *Eimeria* spp. e dos genes da subunidade 18S do rRNA e da glicoproteína GP60 de *Cryptosporidium* spp.. A microscopia revelou positividade de 19,45% (100/514) para *Eimeria* spp. e de 1,56% (8/514) para *Cryptosporidium* spp.. A PCR identificou *E. exigua* (14,5%), *E. flavescens* (61,8%), *E. intestinalis* (16,36%), *E. irresidua* (16,4%), *E. magna* (50,9%), *E. media* (3,6%), *E. perforans* (36,4%), *E. piriformis* (20,0%), *E. stiedai* (7,3%) e *E. vej dovskyi* (7,3%). Maior positividade foi observada em mini coelhos 33,17% (69/208), coelhos jovens 46,67% (35/75) e em fêmeas lactantes 24,47% (23/94). Sete amostras foram positivas pela PCR (12,73%; 7/55) para *Cryptosporidium* spp.. Pela análise molecular foi possível identificar *Cryptosporidium cuniculus* (18S rRNA) e *C. cuniculus* subtipo VbA21 (gp60) em coelhos jovens e matrizes.

**Palavras-Chave:** coccidiose, criptosporidiose, microscopia, PCR, sequenciamento

## OCCURRENCE AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Cryptosporidium* spp. AND *Eimeria* spp. IN BRAZILIAN RABBITS FARMS

**SUMMARY** – The eimeriosis is an important parasitic disease in rabbits, that can host 11 species of *Eimeria*. Cryptosporidiosis is a zoonotic disease that can be transmitted through food, drinking water and by contact with infected animals and people. The objective of this study was to verify the occurrence of *Eimeria* spp. and *Cryptosporidium* spp. in fecal samples of rabbits, perform their molecular classification and relate the presence of the parasites to the different categories in the Brazilian farms. Fecal samples (n = 514) were collected from 21 farms. The oocysts were purified and visualized by microscopy. Fifty five samples positive for *Eimeria* spp. using microscopy were subjected to polymerase chain reaction (PCR) for amplification of a partial fragment of the ITS1 region of the rRNA gene of *Eimeria* spp. and the 18S rRNA and the gp60 glycoprotein genes of *Cryptosporidium* spp.. The microscopy revealed positivity of 19.45% (100/514) for *Eimeria* spp. and 1.56% (8/514) for *Cryptosporidium* spp.. The PCR identified *E. exigua* (14.5%), *E. flavescens* (61.8%), *E. intestinalis* (16.36%), *E. irresidua* (16.4%), *E. magna* (50.9 %), *E. media* (3.6%), *E. perforans* (36.4%), *E. piriformis* (20.0%), *E. stiedai* (7.3%) and *E. vej dovskyi* (7.3 %). Higher positivity was observed in mini rabbits 33.17% (69/208), young rabbits 46.67% (35/75) and in lactating females 24.47% (23/94). Seven samples were positive by PCR (12.73%; 7/55) for *Cryptosporidium* spp.. Molecular analysis revealed *Cryptosporidium cuniculus* (18S rRNA) and *C. cuniculus* subtype VbA21 (gp60) in young rabbits and in does.

**Keywords:** coccidiosis, cryptosporidiosis, microscopy, PCR, sequencing

## **CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS**

No Brasil, é crescente a produção de coelhos como animais de estimação ou para produção de carne. De acordo com o CENSO Agropecuário de 2006, existem 17.615 estabelecimentos de criações de coelhos no Brasil, totalizando 294.584 cabeças e movimentação financeira de R\$ 2.965.423,00, no ano de 2006 (IBGE, 2009). Diversas reportagens em telejornais destacam o crescimento da cunicultura, como a reportagem apresentada, em abril de 2012, pelo programa Globo Rural, afirmando que o crescimento da produção de coelhos no estado de São Paulo cresceu 50% em 2012 (GLOBO RURAL, 2012).

Muitos criadores do país já presenciaram surtos de enfermidades na produção de coelhos, com presença de alta mortalidade em animais de diferentes faixas etárias, incluindo animais recém-desmamados, machos reprodutores e matrizes, com presença ou ausência de sinais clínicos, sempre associados às épocas de maior temperatura ambiental. Embora sem confirmação laboratorial, há suspeita de que esses surtos sejam causados por uma coccidiose.

### **1 Infecção por *Eimeria* em coelhos**

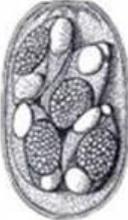
A coccidiose mais comum em coelhos é causada por protozoários do gênero *Eimeria*, que é o agente etiológico mais frequente em casos de mortalidade decorrente de infecções parasitárias nessa espécie animal (COUDERT, 1976; DKHIL et al., 2013; ONCEL et al., 2011; PEETERS et al., 1988).

## 1.1 Taxonomia

Coccídios do gênero *Eimeria* pertencem ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Coccidiida, subordem Eimeriidea e família Eimeriidae (BHAT et al., 1996; KHEYSIN, 1972; LICOIS, 2004). O filo Apicomplexa é representado por 87 espécies, seis gêneros e três famílias que incluem Cryptosporidiidae Leger, 1911 (*Cryptosporidium*), Eimeriidae Minchin, 1903 (*Eimeria* e *Isospora*) e Sarcocystidae Poche, 1913 (*Besnoitia*, *Sarcocystis* e *Toxoplasma*) (DUSZYNSKI; COUCH, 2013).

Os oocistos do gênero *Eimeria* são caracterizados pela presença de quatro esporocistos, contendo cada um dois esporozoítos. O oocisto é a forma evolutiva do parasito e apresenta alta resistência em condições ambientais e a diferentes agentes químicos; no entanto, apresenta alta susceptibilidade ao calor e à dessecação (LICOIS, 2004).

O coelho doméstico (*Oryctolagus cuniculus*) pode ser infectado por 11 espécies de *Eimeria* (Figuras 1 e 2): *E. coecicola* (placas de Peyer, *rotundus* *sacculus* e apendice), *E. exigua* (duodeno e íleo), *E. flavescens* (ceco e cólon), *E. intestinalis* (jejuno e íleo), *E. irresidua* (jejuno e íleo), *E. magna* (duodeno, jejuno e íleo), *E. media* (duodeno, jejuno e íleo), *E. perforans* (duodeno, jejuno e íleo), *E. piriformis* (cólon), *E. stiedai* (fígado e ductos biliares) e *E. vej dovskyi* (íleo) (BHAT et al., 1996; JELÍNKOVÁ et al., 2008; LICOIS et al., 1992; LICOIS et al., 1995; ONCEL et al., 2011; PAKANDL, 2009; PAKANDL; JELÍNKOVÁ, 2006).

<b>Espécies</b>		<i>E. exigua</i>	<i>E. perforans</i>	<i>E. coecicola</i>	<i>E. vejnovskyi</i>	<i>E. stiedai</i>
Período Pré-patente		7 dias	5 dias	9 dias	10 dias	14 dias
Dimensões		15.1 ± 0.5 x 13.9 ± 0.4	22.2 ± 2.8 x 13.9 ± 0.9	34.5 ± 2.4 x 19.7 ± 0.8	31.5 ± 1.2 x 19.1 ± 0.9	36.9 ± 0.4 x 19.9 ± 0.5
Morfologia do oocisto esporulado						
<b>Espécies</b>	<i>E. media</i>	<i>E. magna</i>	<i>E. piriformis</i>	<i>E. irresidua</i>	<i>E. intestinalis</i>	<i>E. flavescens</i>
Período Pré-patente	5 dias	7 dias	9 dias	9 dias	9 dias	9 dias
Dimensões	31.1 ± 2.1 x 17.0 ± 0.9	36.3 ± 1.7 x 24.1 ± 0.9	29.5 ± 2.3 x 18.1 ± 2.2	39.2 ± 1.8 x 23.1 ± 1.1	26.8 ± 1.7 x 18.9 ± 0.9	30.0 ± 2.2 x 21.0 ± 1.0
Morfologia do oocisto esporulado						

30 µm

FIGURA 1 - Período pré-patente, morfometria (comprimento x largura) e morfologia dos oocistos de *Eimeria* de coelhos (Adaptado de COUDERT et al., 1995; ECKERT et al., 1995).

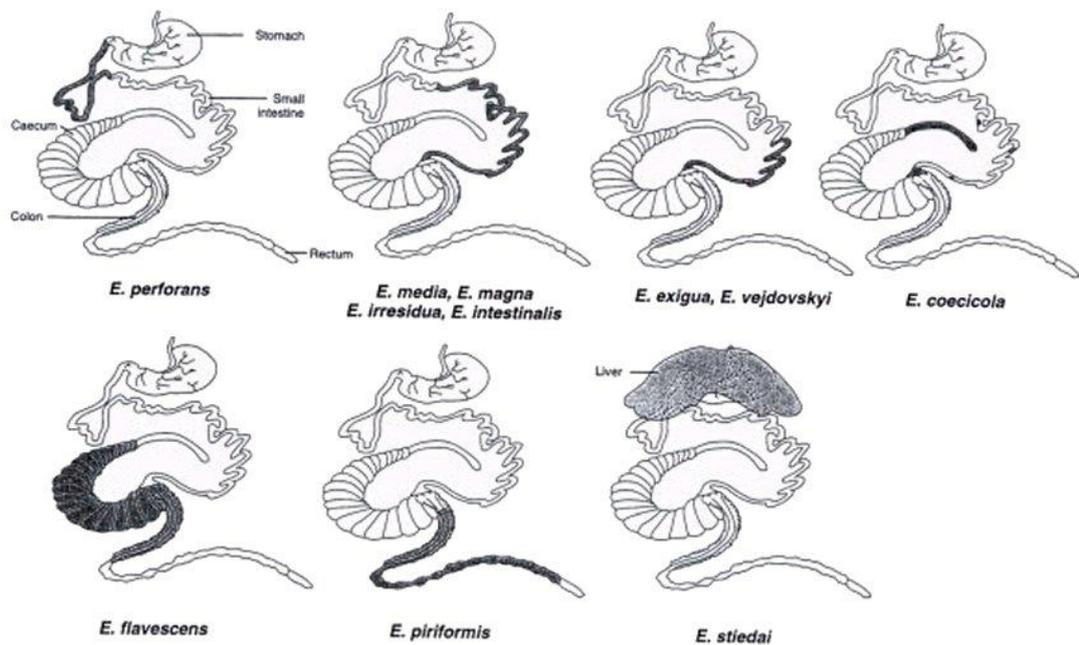


FIGURA 2 - Tropismo tecidual das espécies de *Eimeria* em coelhos (COUDERT et al., 2000).

## 1.2 Ciclo biológico

Parasitas do gênero *Eimeria* são monoxenos (apenas um hospedeiro), ou seja, apresentam alta especificidade pela espécie hospedeira. Em coelhos, se desenvolvem nas células epiteliais do intestino ou nos ductos biliares, como é o caso de *E. stiedai* (LICOIS, 2004).

O início do ciclo de vida das diferentes espécies de *Eimeria* se dá após ingestão do oocisto esporulado pelo hospedeiro. A exposição à tripsina no estômago rompe a parede do oocisto, liberando os esporozoítos (KAWAZOE, 2000). Na reprodução assexuada (esquizogonia ou merogonia), cada esporozoíto penetra em uma célula epitelial do intestino formando trofozoítos unicelulares, cujo núcleo se divide formando o esquizonte multinuclear, composto por merozoítos que são liberados para penetrar em outras células, originando uma segunda geração de esquizontes. Após a reprodução

assexuada, inicia-se a reprodução sexuada, quando os merozoítos se desenvolvem em gamontes femininos (macrogametócitos) e gamontes masculinos (microgametócitos). Os microgametócitos maduros são compostos por microgametas, que são liberados na luz intestinal e fecundam os macrogametas localizados no interior de enterócitos, produzindo os zigotos. Cada zigoto forma um oocisto não esporulado, que é eliminado pelas fezes após a ruptura das células intestinais (KHEYSIN, 1972). Quando as condições ambientais são favoráveis quanto à oxigenação, umidade e temperatura, ocorre meiose e mitose no oocisto não esporulado, que se torna esporulado e infectante (BHAT et al., 1996) (Figura 3).



FIGURA 3 - Ciclo de vida de *Eimeria* (Adaptado de [http://www.vuvb.utc.sk/Zoology/zoo\\_web/protozoa.html](http://www.vuvb.utc.sk/Zoology/zoo_web/protozoa.html)).

O ciclo de *Eimeria* de coelhos difere pouco daquele de *Eimeria* de outros hospedeiros; o número de gerações assexuadas é fixo e característico para cada espécie. Existem algumas peculiaridades, como a migração do

esporozoítos do local de entrada para o local alvo, principalmente no ciclo de *E. coecicola* e *E. stiedai*, que apresentam características únicas. Outra peculiaridade seria a presença de dois tipos de merontes e de merozoítos (PAKANDL, 2009).

### 1.2.1 Migração tecidual de estágios evolutivos

A primeira geração assexuada de *E. coecicola* se desenvolve no tecido linfóide associado ao intestino e as outras fases ocorrem no epitélio do apêndice vermiforme cecal, *sacculus rotundus* e placas de Peyer. Os esporozoítos primeiro penetram nas células epiteliais do intestino delgado; 48 horas após a inoculação, são encontrados no local de multiplicação específico para cada espécie (PAKANDL et al., 1993, 1996a). Os esporozoítos de *E. coecicola* aparentemente migram do intestino para outros tecidos, por meio do sistema linfático (PAKANDL, 2009). Após infecção com *E. magna* (PAKANDL et al., 1995), os esporozoítos migram do duodeno para o jejuno e, mais abundantemente, para o íleo.

Drouet-Viard et al. (1994) inocularam esporozoítos de *E. intestinalis* em coelhos; após 10 minutos, estavam presentes na mucosa duodenal e após quatro horas estavam localizados no íleo, o local específico de desenvolvimento. O percurso de migração de *E. intestinalis* e de outros coccídios de coelho (exceto *E. coecicola*) é desconhecido, mas acredita-se que diferem de *E. coecicola*, pois não foram encontrados esporozoítos de *E. intestinalis* fora do intestino (PAKANDL; JELÍNKOVÁ, 2006), embora tenham sido observados em linfócitos intraepiteliais (LICOIS et al., 1992).

Em alguns aspectos, a migração de esporozoítos de coccídios de coelho se assemelha à invasão de tecidos em galinhas. Os esporozoítos de *Eimeria tenella* primeiro penetram nos enterócitos do epitélio cecal e, posteriormente, nos linfócitos intraepiteliais (PAKANDL, 2009). Os linfócitos deixam o epitélio e os esporozoítos são transportados através do epitélio das criptas (LAWN;

ROSE, 1982). O intestino delgado, especialmente o duodeno, parece ser o local de entrada para coccídios de coelhos, independentemente do local específico de seu desenvolvimento (PAKANDL, 2009).

A migração também ocorre com merozoítos, como encontrado por Norton et al. (1979) e Pakandl et al. (2003), que relataram que a primeira geração de merontes de *E. flavescens* parasita o intestino delgado, enquanto o restante do desenvolvimento endógeno ocorre no ceco. *E. stiedai* se desenvolve no epitélio dos ductos biliares, no entanto, a forma de migração de seus esporozoítos ainda não foi definida (DÜRR, 1972; FITZGERALD, 1970; HORTON, 1967; PAKANDL, 2009).

### 1.2.2 Merozoíto polinucleado

Os merozoítos polinucleados são característicos de coccídios de coelhos, diferindo dos uninucleados pela quantidade de núcleos e presença de estruturas nos merozoítos recém-formados, nomeadas de complexo membranoso inferior, roptrias e conóide (DANFORTH; HAMMOND, 1972; PAKANDL et al., 1996a) (Tabela 1, adaptado de PAKANDL, 2009). Esse estágio se desenvolve a partir de um esporozoíto com organelas características, como película de três camadas e complexo apical conservados, mas com divisão nuclear e formação inicial de merozoítos já iniciada (PAKANDL, 2009).

A fase de merozoíto polinucleado faz parte do ciclo de vida de *Eimeria* spp. de coelhos, acreditando-se que a presença de dois tipos de merontes reflete o dimorfismo sexual (CHEISSIN, 1967; PELLÉRDY; DÜRR; 1970).

Streun et al. (1979) propuseram que o desenvolvimento endógeno da linha masculina é constituída por merontes formando merozoítos polinucleados por endomerogonia, originando microgamontes, enquanto a linha feminina é constituída por merozoítos uninucleados por ectomerogonia, originando macrogamontes.

Tabela 1 - Merozoítos polinucleados em coccídios de coelhos

Espécie	Estágios estudados e merozoítos polinucleados encontrados	Referência
<i>E. coecicola</i>	CE completo; merozoítos polinucleados encontrados somente na 3ª e 4ª GA	Pakandl et al., 1993, 1996a
<i>E. exigua</i>	CE completo.	Jelínková et al., 2008
<i>E. flavescens</i>	CE completo; merozoítos polinucleados encontrados somente quando 5ª GA se desenvolve	Norton et al., 1979
<i>E. intestinalis</i>	CE completo	Pakandl et al., 2003; Pakandl, 2005
	Provavelmente 3ª GA (5 dias após inoculação)	Licois et al., 1992
	Provavelmente 3ª GA (4 dias após inoculação)	Sénaud; Černá, 1969
<i>E. magna</i>	CE completo	Danforth; Hammond, 1972
	CE completo	Ryley; Robinson, 1976
	CE completo	Pakandl et al., 1996b
	CE completo	Cheissin, 1960
<i>E. media</i>	CE completo	Pakandl, 1988
	CE completo	Pakandl et al., 1996c
<i>E. perforans</i>	CE completo	Streun et al., 1979
<i>E. piriformis</i>	CE completo	Pakandl; Jelínková, 2006
	CE completo	Pellérdy; Dürr, 1970
<i>E. stiedai</i>	Provavelmente última GA (13 dias após inoculação)	Černá; Sénaud, 1971
<i>E. vej dovskyi</i>	CE completo	Pakandl 1988; Pakandl; Coudert, 1999

GA: Geração assexuada.

CE: ciclo endógeno.

### 1.3 Epidemiologia e sinais clínicos

A infecção por *Eimeria* não ocorre em coelhos lactentes, antes de 22 dias de idade (DÜRR; PELLÉRDY, 1969; PAKANDL; HLÁSKOVÁ, 2007). Nessa faixa etária, os láparos ainda se alimentam de leite e começam a ingerir outros alimentos, como ração e forragens, iniciando as alterações no ambiente intestinal. A ineficiência de excitação, dentre outros fatores, como a deficiência de ácido para-aminobenzóico no leite materno, contribuem para a resistência inata aos coccídios, em mamíferos muito jovens (ROSE, 1973).

Os coelhos adultos geralmente são portadores assintomáticos de *Eimeria* e são uma fonte de infecção em potencial para os animais mais jovens, especialmente após o desmame (COUDERT et al., 2000; ONCEL et al., 2011). Em coelhos com até dois meses de idade, há alta ocorrência de eimeriose, que diminui ao longo de seu crescimento (ONCEL et al., 2011). Esse fato está relacionado à baixa imunidade e ao tipo de alimentação (EBTESAM, 2008); as taxas de morbidade e de mortalidade podem ser de 90% e 60%, respectivamente (MENG et al., 2007). A coccidiose subclínica é comum na indústria de coelhos, que não apresentam sinais clínicos característicos, mas podem apresentar redução do consumo de ração, piora na conversão alimentar e no ganho de peso, resultando em perdas econômicas (JING et al., 2012).

As condições climáticas, tipo de alimentação, higiene, manejo e alojamento podem favorecer a ocorrência de eimeriose, visto que na maioria das criações não existe controle parasitário preventivo (GONZALEZ-REDONDO et al., 2008). A enfermidade clínica ocorre com mais frequência em criações onde o manejo higiênico sanitário é deficiente (ONCEL et al., 2011), com maior incidência em épocas de calor e de alta umidade, afetando principalmente coelhos jovens (BAO et al., 2004) e quando há condições ideais para esporulação dos oocistos, incluindo temperatura de aproximadamente 27°C (COUDERT et al., 1995).

As espécies de *Eimeria* de coelhos podem ser classificadas em relação aos parâmetros clínicos, como ganho de peso, diarreia e mortalidade (LEBAS

et al., 1986). Há espécies não patogênicas (*E. coecicola*), pouco patogênicas (*E. exigua*, *E. perforans*, *E. vej dovskyi*), patogênicas (*E. irresidua*, *E. magna*, *E. media* e *E. piriformis*) e altamente patogênicas (*E. stiedai*, *E. intestinalis*, *E. flavescens*) (COUDERT et al., 1995; JITHENDRAN et al., 1996; PAKANDL, 2009).

As espécies predominantes na produção comercial de coelhos são as espécies patogênicas (*E. magna* e *E. media*) e as altamente patogênicas (*E. intestinalis* e *E. flavescens*) (FAROUGOU et al., 2005; PAKANDL, 2009; JING et al., 2012). Giorgi (1968) e Cardoso e Guimarães Júnior (1993) afirmam que a coccidiose de localização hepática, causada por *E. stiedai*, é a mais importante em coelhos, devido às altas taxas de morbidade e de mortalidade, apesar de Bhat et al. (1996) afirmarem que infecções por espécies intestinais são mais comuns que a coccidiose hepática.

A prevalência de eimeriose em países europeus varia de 21 a 60%, na Índia de 13 a 64% (CATCHPOLE; NORTON, 1979; CHANDRA; GHOSH, 1990; GONZALEZ-REDONDO et al., 2008) e em diferentes regiões da Turquia de 13,3 a 80% (ÇETINDAĞ; BIYIKOĞLU, 1997; KARAER, 2001).

A enfermidade clínica em coelhos é caracterizada por atrofia das vilosidades intestinais, má absorção de nutrientes, desequilíbrio eletrolítico, diarreia, perda de apetite, perda de peso, anemia, hipoproteinemia, desidratação e, em alguns casos, alta mortalidade (BHAT et al., 1996; COUDERT, 1976; ONCEL et al., 2011; PATTON et al., 2000; PEETERS et al., 1981b; PEETERS et al., 1984; SANTOS, 1984), causando perdas econômicas na produção (DROUET-VIARD et al., 1997a), como relatado por Arnoni (1980), em ocorrência de 48% de mortalidade em coelhos na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, causada por *E. stiedai*.

Há poucos estudos sobre eimeriose em coelhos no Brasil. Ao analisar criações no norte do Paraná, Cardoso e Guimarães Júnior (1993) identificaram oito espécies de *Eimeria*, por meio de análise morfométrica e morfológica de oocistos (*E. coecicola*, *E. flavescens*, *E. intestinalis*, *E. irresidua*, *E. magna*, *E.*

*media*, *E. perforanse*, *E. stiedai*), sendo que *E. perforans* e *E. coecicola* apresentaram maior ocorrência, 36,76% e 79,78%, respectivamente.

#### 1.4 Profilaxia

A eimeriose em coelhos é controlada principalmente pela adição de drogas anticoccidianas à ração (PAKANDL, 2009). Três medicamentos anticoccidianos são atualmente utilizados como preventivos: salinomicina (COUDERT, 1981; KUTZER et al., 1981; LÄMMLER; HEIN 1980; PEETERS et al., 1982; SAMBETH; RAETHER, 1980; VARGA, 1982), robenidina (COUDERT, 1978; PEETERS et al., 1979a, 1980, 1983; PEETERS; HALEN, 1980) e metichlorpindol/methylbenzoate (COUDERT, 1978; JOYNER et al. 1983; PEETERS et al. 1979b, 1982, 1983; VARGA 1982). Essas drogas geralmente são misturadas aos *pellets* da ração de coelhos, e sua administração prolongada pode resultar em resistência à droga (COUDERT, 1989; PEETERS et al., 1988):

Desde o final de 2008, o diclazuril (VANPARIJS et al., 1989) está autorizado como aditivo na alimentação de coelhos na França, Itália e Espanha (PAKANDL, 2009). No entanto, existem outras drogas preventivas que são eficazes contra protozoários de coelhos, como o decoquinato (COUDERT, 1978) e a narasina (PEETERS et al., 1981a) (PAKANDL, 2009). As sulfonamidas, como formolsulfatiazol (COUDERT, 1978), sulfadimetoxina (COUDERT, 1981) e sulfaquinoxalina (CHAPMAN, 1948; JOYNER et al., 1983; KUTZER et al., 1981), e o toltrazuril (PEETERS; GEEROMS, 1986) são utilizados principalmente para o tratamento de coccidiose clínica (PAKANDL, 2009). No entanto, o tratamento normalmente não é bem-sucedido quando os sinais clínicos da coccidiose já estão presentes, independentemente do fármaco utilizado (PAKANDL, 2009).

A robenidina (JOYNER et al., 1983; PEETERS et al., 1982) é utilizada como medicamento preventivo em rações de coelhos no Brasil, porém, é mais indicada para prevenção de infecção por *E. stiedai* e não apresenta boa eficiência contra outras espécies de *Eimeira* (PAKANDL, 2009).

Embora os medicamentos anticoccidianos possam assegurar o controle da coccidiose de forma relativamente confiável e barata, seu uso não é bem aceito pelos criadores de coelhos. A administração dessas drogas apresenta algumas desvantagens, tais como o impacto negativo sobre o ambiente devido à sua excreção pelas fezes, que poderiam ser posteriormente utilizadas como fertilizantes, sua absorção intestinal pode resultar em deposição de resíduos na carne destinada ao consumo, além da possibilidade de toxicidade para os hospedeiros. Além disso, a resistência aos medicamentos anticoccidianos é observada em protozoários de coelhos (PAKANDL, 2009).

Embora a vacinação contra a eimeriose seja utilizada em galinha doméstica e a administração por via oral ou via *spray* para dispersão de oocistos de *Eimeria* em ninhos de láparos tenha demonstrado resultados satisfatórios (DROUET-VIARD et al., 1997a,b), a dificuldade de seleção de cepas adequadas ainda impossibilita o desenvolvimento de uma vacina eficaz na prevenção da eimeriose em coelhos (PAKANDL, 2009).

## **2 Infecção por *Cryptosporidium***

*Cryptosporidium* foi descrito primeiramente em trabalhos realizados com ratos (TYZZER, 1912). A partir de 1970, quando apareceram os primeiros casos de infecção por *Cryptosporidium* em humanos, as pesquisas tiveram um foco maior em pacientes imunossuprimidos (HUNTER; THOMPSON, 2005). A criptosporidiose foi considerada a segunda causa de diarreia e morte em crianças da África e Ásia (STRIEPEN, 2013); em crianças de países desenvolvidos, representa 20% dos casos de diarreia (MOSIER; OBERST, 2000).

## 2.1 Taxonomia

*Cryptosporidium* pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidiorida, subordem Eimeriina e família Cryptosporidiidae. Apresenta ciclo monoxeno, oocisto com 4 esporozoítos, localização principalmente no trato gastrintestinal do hospedeiro e ciclo evolutivo de localização epicelular (VALIGUROVÁ et al., 2008).

A classificação de *Cryptosporidium* spp. é constantemente atualizada com o uso de métodos moleculares (XIAO; FAYER, 2008; PLUTZER; KARANIS, 2009) que, conjuntamente com estudos morfológicos, biológicos ou de especificidade por hospedeiros auxiliam na validação das espécies descritas (XIAO; RYAN, 2004).

## 2.2 Ciclo Biológico

Após ingestão dos oocistos, ocorre a excitação e liberação dos quatro esporozoítos que, em todas as espécies de *Cryptosporidium*, se instalam na superfície apical das células epiteliais do intestino (THOMPSON et al., 2005). Seu desenvolvimento apresenta localização epicelular, dentro de um compartimento extracitoplasmático, sobreposto pela membrana celular do hospedeiro (THOMPSON et al., 2005) (Figura 4).

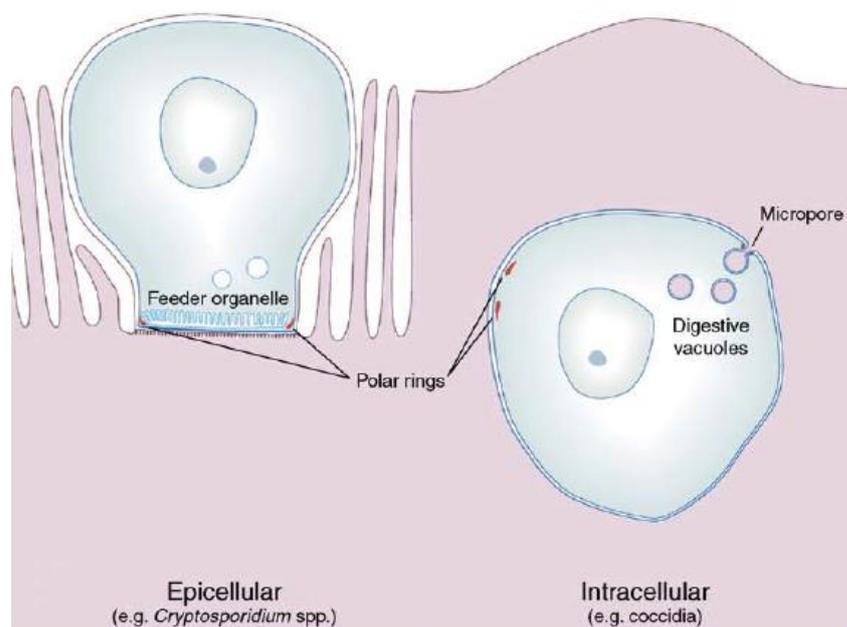


FIGURA 4 - Interações do parasito com o hospedeiro (BARTA; THOMPSON, 2006).

Os esporozoítos se transformam em trofozoítos, que se diferenciam em merontes (esquizontes) com seis ou oito merozoítos, originando dois ou três tipos de merontes, dependendo da espécie (ANGUS, 1983; FAYER, 2008; LEVINE, 1985). Merontes do tipo I liberam de seis a oito merozoítos, que infectam outras células e se desenvolvem em merontes do tipo I ou merontes do tipo II (FAYER, 2008; HIJJAWI et al., 2004). Merozoítos de merontes do tipo II iniciam a gametogonia, se diferenciando em microgamontes (masculinos) e macrogamontes (femininos) (FAYER, 2008). Os microgamontes são multinucleados e cada núcleo se torna um microgameta, que fertiliza o macrogamonte uninucleado (FAYER, 2008) e forma zigotos com paredes especializadas de proteção (ANGUS, 1983), os oocistos (FAYER, 2008) (Figura 5).

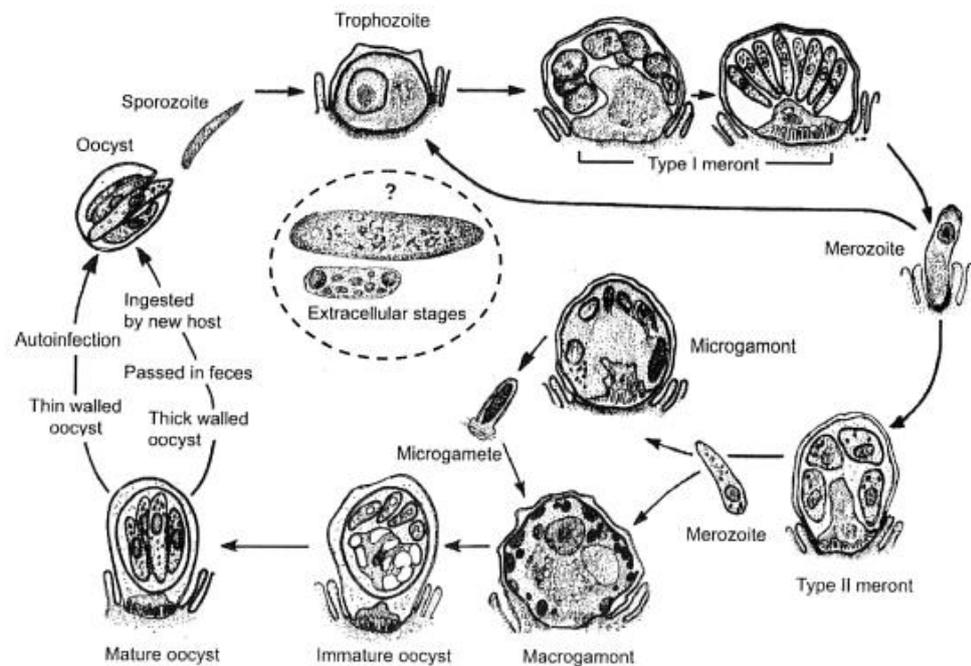


FIGURA 5 - Representação do ciclo de vida do *Cryptosporidium* (FAYER, 2008).

## 2.3 Epidemiologia

### 2.3.1 Infecção em humanos

*Cryptosporidium* spp. infecta hospedeiros vertebrados, incluindo o homem, sendo assim uma importante zoonose (FAYER, 2010). Atualmente, há classificação de 27 espécies de *Cryptosporidium* e diversos genótipos em vários hospedeiros, incluindo anfíbios, aves, mamíferos, peixes e répteis (RYAN et al., 2014). *Cryptosporidium* apresenta transmissão fecal-oral, comumente pela ingestão de água e alimentos contaminados, ou por contato direto ou indireto com fezes do hospedeiro infectado (THOMPSON et al., 2005).

A importância da criptosporidiose em animais domésticos não está relacionada somente ao potencial zoonótico de algumas espécies de

*Cryptosporidium*, mas também às perdas econômicas que essa parasitose promove na produção animal (RAMIREZ et al., 2004); por esses motivos, a caracterização das espécies e genótipos envolvidos em casos de criptosporidiose é de extrema relevância (XIAO; FENG, 2008).

Em humanos, a doença é geralmente causada por *Cryptosporidium hominis* e *Cryptosporidium parvum* e menos frequentemente por *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium canis*, *Cryptosporidium felis*, *Cryptosporidium cuniculus* e, raramente, por outras espécies ou genótipos (CACCIÒ et al., 2005; HUNTER et al., 2004; ROBINSON; CHALMERS, 2010).

A análise de casos em humanos em todo o mundo tem mostrado que *C. parvum* e *C. hominis* são responsáveis por mais de 90% das infecções. A proporção da infecção por outras espécies ou genótipos pode ser maior em pacientes imunocomprometidos, embora sua distribuição varie de acordo com características geográficas e socioeconômicas específicas (XIAO; RYAN, 2008).

Indivíduos imunocompetentes apresentam manifestações clínicas que envolvem diarreia, vômito, febre, cólica e dor de cabeça (CHEN et al., 2002; FARTHING, 2000). Em grupos de risco como crianças, idosos e em pessoas imunossuprimidas, a infecção pode ser crônica e fatal (CACCIO; POZIO, 2006; CHALMERS; DAVIES, 2010).

*C. cuniculus* foi reconhecido no Reino Unido como uma importante causa de infecção intestinal no homem (ROBINSON et al., 2008), quando houve contaminação com oocistos presentes em fezes de um coelho que teve acesso a um reservatório de água, causando diarreia em 29 pessoas (PULESTON et al., 2014). *C. cuniculus* é considerado como um patógeno emergente para humanos (CHALMERS et al., 2009), sendo a terceira espécie mais frequente em infecções em humanos no Reino Unido, depois de *C. parvum* e *C. hominis* (CHALMERS et al., 2011).

### 2.3.2 Infecção em coelhos

A primeira descrição de infecção natural por *Cryptosporidium* em coelhos foi relatada por Inman e Takeuchi (1979), porém, sem classificação da espécie. Em coelhos, já foi identificada infecção natural somente por *C. cuniculus*, no entanto, eles são susceptíveis à infecção experimental por duas espécies zoonóticas: *C. parvum* e *C. meleagridis* (ROBINSON; CHALMERS, 2010).

O período pré-patente da infecção por *C. cuniculus* pode variar de quatro a sete dias e o período patente dura sete dias (ROBINSON et al., 2010). Os únicos hospedeiros conhecidos de *C. cuniculus* são o homem e o coelho (HADFIELD; CHALMERS, 2012), porém, há poucos estudos relacionados à prevalência de infecção por essa espécie no homem ou em animais (CHALMERS et al., 2011; NOLAN et al., 2010; ROBINSON et al., 2010; SHI et al., 2010).

Ainda não há definição sobre a importância de *C. cuniculus* como agente de enfermidade clínica em coelhos. *Cryptosporidium* sp. associado à diarreia em coelho pode ocorrer no período pós desmame devido ao estresse ocasionado pela separação da mãe, transporte para gaiolas de alojamento coletivo e mudança da alimentação (KAUPKE et al., 2014).

Os sinais clínicos de criptosporidiose em coelhos são mais severos entre 30 e 40 dias de idade, e a ocorrência de *Cryptosporidium* sp. após 50 dias de idade diminui significativamente. As fontes de infecção para coelhos jovens são as mães, que parecem excretar oocistos esporadicamente pouco antes do parto e vários dias após o parto (PAVLÁSEK et al., 1996; ROBINSON; CHALMERS, 2010).

O gene da glicoproteína GP60 é utilizado para realizar a classificação molecular de *C. cuniculus*, com o objetivo de relacionar a presença de subtipos genéticos dessa espécie a características epidemiológicas e clínicas desta infecção. Em coelhos, já foi relatada a presença de subtipos das famílias Va e Vb (CHALMERS et al., 2009). Sete subtipos Va e 13 subtipos Vb foram

encontrados em coelhos selvagens e domésticos, mas sem associação com diarreia (CHALMERS et al., 2009; NOLAN et al., 2010; ROBINSON et al., 2010; SHI et al., 2010; ZHANG et al., 2012). O subtipo Va é o mais encontrado em humanos e em amostras de água; ocasionalmente é encontrado em coelhos. O subtipo Vb é encontrado mais em coelhos, mas também foi encontrado em humanos (CHALMERS et al., 2009; NOLAN et al., 2010; ROBINSON et al., 2010; SHI et al., 2010; ZHANG et al., 2012). A importância de se definir os diferentes subtipos reside no fato de que existem diferenças clínicas e na virulência entre os subtipos de diferentes espécies (FENG et al., 2012).

Em coelhos selvagens da Austrália, Nolan et al. (2010) encontraram 6,8% (12/176) de infecção para os subtipos VbA23R3 e VbA26R4. SHIBASHI et al. (2006) encontraram índices de prevalência de *Cryptosporidium* de 19% (13/66) e 3,3% (1/30), respectivamente em coelhos de estimação com e sem diarreia; todos os animais que apresentavam diarreia vieram a óbito. Na China, SHI et al. (2010) relataram a presença dos subtipos VbA29, VbA35 e VbA36 de *C. cuniculus* em 3,4% (37/1081) das amostras fecais. Esses resultados evidenciam a provável participação dos coelhos na epidemiologia da criptosporidiose humana.

Existem poucos trabalhos publicados sobre *Cryptosporidium* e *Eimeria* em coelhos no Brasil, particularmente sobre sua caracterização molecular. Em decorrência da escassez de literatura relacionada a uma espécie animal que tem importância crescente como animal doméstico e como uma espécie de interesse zootécnico, pesquisas são necessárias visando ao esclarecimento de aspectos relacionados à epidemiologia, sinais clínicos e etiologia de infecções por *Cryptosporidium* e *Eimeria* nessa espécie animal.

O objetivo do trabalho foi verificar a ocorrência de infecção por *Eimeria* spp. e *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de coelhos em granjas brasileiras, realizar sua classificação molecular para determinação das espécies e subtipos do parasito e relacionar a presença dos parasitos às condições de manejo e às diferentes categorias de animais.

## REFERÊNCIAS

ANGUS, K. W. Cryptosporidiosis in man, domestic animals and birds: a review. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 76, p. 62-70, 1983.

ARNONI, J. V.; RANIER, D. S. S.; COIMBRA, A. M. *Eimeria* spp. em coelhos domésticos (*Oryctolagus cunicullus*). In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 17., 1980, Fortaleza. **Anais...** Brasília, EMBRAPA, 1980, p. 310.

BAO, J. C., ZI, L. G.; Q. H. K.; C. Z.; W. S. R.; YU, T. H. New characteristics, prevention and cure technique of coccidiosis in rabbit. In: WORLD RABBIT CONGRESS, 8., 2004, Puebla, México. **Anais...** México, 2004, p. 433-438.

BARTA, J. R.; THOMPSON, R. C. A. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. **TRENDS in Parasitology**, v. 22, n. 10, p. 463-468, 2006.

BHAT, T. K.; JITHENDRAN, K. P.; KURADE, N. P. Rabbit coccidiosis and its control: A review. **World Rabbit Science**, v. 4, p. 37-41, 1996.

CACCIÒ, S. M. Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. **Parasitology**, v. 47, p. 185 - 192, 2005.

CACCIÒ, S. M., POZIO, E. Advances in the epidemiology, diagnosis and treatment of cryptosporidiosis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 4, p. 429-443, 2006.

CATCHPOLE, J. L.; NORTON, C. C. The species of *Eimeria* in rabbits for meat production in Britain. **Parasitology**, v. 79, p. 247-249, 1979.

CARDOSO, M. A.; GUIMARÃES JÚNIOR, J. S. Ocorrência de *Eimeria* spp em coelhos domésticos (*Oryctolagus cuniculus*) em quatro municípios no norte do Paraná. **Semina: Ciência Agrárias**, v. 14, p. 12-16, 1993.

ÇETINDAĞ, M.; BIYIKOĞLU, G. Ankara yöresi evcil tavşanlarında *Eimeria* türlerinin yayılışı. **Türkiye Parasitoloji Dergisi**, v. 21, p. 301-304, 1997.

ČERNÁ, Ž.; SÉNAUD, J. Some peculiarities of the fine structure of merozoites of *Eimeria stiedai*. **Folia Parasitologica**, v. 18, p. 177–178, 1971.

CHALMERS, R. M.; DAVIES, A. P. Minireview: clinical cryptosporidiosis. **Experimental Parasitology**, v.124, p. 138–146, 2010.

CHALMERS, R. M.; ELWIN, K.; HADFIELD, S. J.; ROBINSON, G. Sporadic human cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium cuniculus*, United Kingdom, 2007-2008. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 536-538, 2011.

CHALMERS, R. M.; ROBINSON, G.; ELWIN, K.; HADFIELD, S. J.; XIAO, L.; RYAN, U.; MODHA, D.; MALLAGHAN, C. *Cryptosporidium* rabbit genotype, a newly identified human pathogen. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 5, p. 829–830, 2009.

CHANDRA, D.; GHOSH, S. S. Incidence of diarrhoeal infections in rabbits. **Indian Journal of Animal Science**, v. 60, p. 801-803, 1990.

CHAPMAN, M. P. The use of sulphaquinoxaline in the control of liver coccidiosis in domestic rabbits. **Veterinary Medicine**, v. 43, p. 375–379, 1948.

CHEN, X. M.; KEITHLY, J. S.; PAYA, C. V.; LARUSSO, N. F.

Cryptosporidiosis. **New England Journal of Medicine**, v. 346, p. 1723–1731, 2002.

CHEISSIN, E. M. **Life cycles of the coccidia of domestic animals**. Leningrad: Izdatelstvo Nauka, 1967. 192p.

CHEISSIN, E. M. Cytological observation of the life cycles of rabbit coccidia. In: Izdatelstvo AN SSSR. **Voprosy tsytologii i protistologii**. Moskva-Leningrad, 1960. p. 258–276.

COUDERT, P. Intestinal coccidial infections in the rabbit: Comparison of the pathogenicity of *Eimeria* spp. **Comptes Rendus Hebdomadaires de Séances de L'Académie de Sciences**, v. 282, n. D24, p. 2219-2222, 1976.

COUDERT, P. Evaluation comparative de l'efficacité de 10 médicaments contre 2 coccidioses graves du lapin. Comm. No. 31, **Journées de la Recherche Cunicole**, Toulouse, 1978.

COUDERT, P. Chemoprophylaxe von Darm- und Gallengangskokzidiosen beim Kaninchen. 4. Tagung der Fachgruppe Kleintierkrankheiten in Verbindung mit dem Institut für Kleintierzucht der Fal und der Deutschen Gruppe der WRSA, **Celle**, 18.–20., p. 106–121, 1981.

COUDERT, P. Some peculiarities of rabbit coccidiosis. In: INTERNATIONAL COCCIDIOSIS CONFERENCE ON COCCIDIA AND INTESTINAL COCCIDIOMORPHS, 5., 1989, Tours, France. **Anais...** Tours, 1989. p. 481–488.

COUDERT P.; LICOIS D.; DROUET-VIARD F. *Eimeria* species and strains of rabbits. In: ECKERT, J., BRAUN, R., SHIRLEY, M. W., COUDERT, P. (Eds.), COST. 89/820. **Biotechnology: Guidelines on Techniques in Coccidiosis**

**Research.** Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 1995. p. 52-73.

COUDERT, P. ; LICOIS, D.; DROUET-VIARD, F.; PROVÔT, F. Coccidiosis. In: ROSELL J.M. (Ed.). **Enfermedades del conejo**. Madrid: Mundi-Prensa Libros, v.II, 2000. p. 219-234.

DANFORTH, H. D.; HAMMOND, D. M. Merogony in multinucleate merozoites of *Eimeria magna* Pérard, 1925. **Journal of Protozoology**, v. 19, p. 454–457, 1972.

DKHIL, M. A.; AL-QURAI SHY, S.; ABDEL-BAKI, A-A.; DELIC, D.; WUNDERLICH, F. *Eimeria coecicola*: Spleen response of *Oryctolagus cuniculus*. **Experimental Parasitology**, v. 133, p. 137-143, 2013.

DROUET-VIARD, F.; COUDERT, P.; LICOIS, D.; BOIVIN, M. Acquired protection of the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) against coccidiosis using a precocious line of *Eimeria magna*, effect of vaccine dose and age at vaccination. **Veterinary Parasitology**, v. 69, p. 197–201, 1997a.

DROUET-VIARD, F.; COUDERT, P.; LICOIS, D.; BOIVIN, M. Vaccination against *Eimeria magna* coccidiosis using spray dispersion of precocious line oocysts in the nest box. **Veterinary Parasitology**, v. 70, p. 61–66, 1997b.

DROUET-VIARD, F.; LICOIS, D.; PROVÔT, F.; COUDERT, P. The invasion of rabbit intestinal tract by *Eimeria intestinalis* sporozoites. **Parasitology Research**, v. 80, p. 706–707, 1994.

DÜRR, U. Life cycle of *Eimeria stiedai*. **Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 19, p. 101–103, 1972.

DÜRR, U.; PELLÉRDY, L. The susceptibility of suckling rabbits to infection with coccidia. **Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae**, v.19, p. 453–462, 1969.

DUSZYNSKI, D. W.; COUCH, L. **The biology and identification of the coccidian (Apicomplexa) of rabbits of the world**. United States of America: Academic Press, Elsevier, 2013. 352p.

EBTESAM, M. M. Hepatic coccidiosis of the domestic Rabbit *Oryctolagus cuniculus* domesticus L. in Saudi Arabia. **World Journal of Zoology**, v. 3, p. 30-35, 2008.

ECKERT, J.; TAYLOR, M.; LICOIS, D.; COUDERT, P.; CATCHPOLE, J.; BUCKLAR, H. Identification of *Eimeria* and *Isospora* species and strains. Morphological and biological characteristics. In: ECKERT J., BRAUN R., SHIRLEY M.W., COUDERT P. (Ed.). **Biotechnology. Guidelines on Techniques in Coccidiosis Research**. Office for official publications of the European communities. Luxembourg, 1995. p. 103-119.

FAROUGOU, S.; KPODÉKON, M.; KOUTINHOUI, B.; DOUGNON, P.; ADÉHAN, R.; DJAGO, Y.; AHLINCOU, F. Situation actuelle des parasitoses gastro-intestinales et externes du lapin au Sud-Bénin. **RASPA**, v. 3, n. 1, p. 23–26, 2005.

FARTHING, M. J. Clinical aspects of human cryptosporidiosis. **Contributions to Microbiology**, v. 6, p. 50–74, 2000.

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

FAYER, R. General Biology. In: FAYER, R. and XIAO, L. 2Ed.

***Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis.** Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 1-35.

FENG, Y.; WANG, L.; DUAN, L.; GOMEZ-PUERTA, L. A.; ZHANG, L.; ZHAO, X.; HU, J.; ZHANG, N.; XIAO, L. Extended outbreak of cryptosporidiosis in a pediatric hospital, China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, p. 312–314, 2012.

FITZGERALD, P. R. New findings on the life cycle of *Eimeria stiedae*. **Journal of Parasitology**, v. 56, n.2, p. 100–101, 1970.

GIORGI, W. Doenças observadas em coelhos durante o quinquênio 1963-1967, no Estado de São Paulo. **Biológico**, v. 34, n. 1, p. 71-82, 1968.

GLOBO RURAL. **Criação de coelhos ganha adeptos no sudoeste de São Paulo.** 2012. Disponível em: <<http://g1.globo.com/economia/globo-rural/videos/t/edicoes/v/criacao-de-coelhos-ganha-adeptos-no-sudoeste-de-sao-paulo/1891495>>. Acesso em: 15 jul. 2015.

GONZALEZ-REDONDO, P.; FINZI, A.; NEGRETTI, P.; MICCI, M. Incidence of coccidiosis in different rabbit keeping systems. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 60, p. 1267-1270, 2008.

HADFIELD, S. J.; CHALMERS, R. M. Detection and characterization of *Cryptosporidium cuniculus* by real-time PCR. **Parasitology Research**, v. 111, n. 3, p. 1385-1390, 2012.

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

HORTON, R. J. The route of migration of *Eimeria stiedae* (Lindeman, 1865) sporozoites between the duodenum and bile ducts of the rabbit. **Parasitology**, v. 57, p. 9–17, 1967.

HUNTER, P. R.; HUGHES, S.; WOODHOUSE, S.; RAJ, N.; SYED, Q.; CHALMERS, R. M.; VERLANDER, N. Q.; GOODACRE, J. Health sequelae of human cryptosporidiosis in immunocompetent patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, p. 504–510, 2004.

HUNTER, P. R.; THOMPSON, R. C. A. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 1181–1190, 2005.

IBGE. **CENSO AGROPECUÁRIO 2006**. 2009. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/brasil\\_2006/Brasil\\_censoagro2006.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/brasil_2006/Brasil_censoagro2006.pdf)>. Acesso em: 13 jul. 2015.

INMAN, L. R.; TAKEUCHI, A. Spontaneous cryptosporidiosis in an adult female rabbit. **Veterinary Pathology**, v. 16, p. 89–95, 1979.

JELÍNKOVÁ, A.; LICOIS, D.; PAKANDL, M. The endogenous development of the rabbit coccidium *Eimeria exigua* Yakimoff. **Veterinary Parasitology**, v. 156 (3-4), p. 168-172, 2008.

JING, F.; YIN, G.; LIU, X.; SUO, X.; QIN, Y. Large-scale survey of the prevalence of *Eimeria* infections in domestic rabbits in China. **Parasitology Research**, v. 110, 1495L 500, 2012.

JITHENDRAN, K. P.; BHAT, T. K.; BANERJEE, D. P.; GHOSH, J. D.; GUPTA, S. K. Coccidiosis in Angora rabbits - a field study in Himachal

Pradesh. Parasitic diseases-new horizons. In: NATIONAL CONGRESS OF VETERINARY PARASITOLOGY AND NATIONAL SYMPOSIUM ON MOLECULAR PARASITOLOGY, 8., 1996, Índia. **Anais...** Índia: CCS Haryana Agricultural University, 1996. p. 41-49.

JOYNER, L. P.; CATCHPOLE, J.; BERRET, S. *Eimeria stiedai* in rabbits: the demonstration of responses to chemotherapy. **Research in Veterinary Science**, v. 34, p. 64–67, 1983.

KARAER, Z. Evcil Tavşanlarda (*Oryctolagus cuniculus*) Coccidiosis. In: DINÇER Ş., Ed. Coccidiosis. **Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları**, Meta Basım, İzmir, n. 17, p. 269-278, 2001.

KAUPKE, A.; A, KWIT, E.; CHALMERS, R. M.; MICHALSKI, M. M.; RZEZUTKA, A. An outbreak of massive mortality among farm rabbits associated with *Cryptosporidium* infection. **Research in Veterinary Science**, v. 97, n. 1, p. 85-87, 2014.

KAWAZOE, U. Coccidiose. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2000. p. 391-405.

KHEYSIN, Y. M. **Life cycles of coccidian of domestic animals**. Baltimore: University Park Press, 1972. 264p.

KUTZER, E.; LEIBETSEDER, J.; FREY, H.; BÖHM, J.; PRETS, H. Salinomycin, ein neues Antikokzidium in der Kaninchenmast. **Wiener tierärztliche Monatsschrift**, v. 68, p. 57-64, 1981.

LÄMMLER, G.; HEIN, B. Prophylaktische wirksamkeit des polyäther-antibiotikums salinomycin bei der gallengangscoccidiose des kaninchens. **Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift**, v. 93, p. 449–454,

1980.

LAWN, A. M.; ROSE, M. E. Mucosal transport of *Eimeria tenella* in the cecum of the chicken. **Journal Parasitology**, v. 68, p. 1117–1123, 1982.

LEBAS, F.; COUDERT, P.; ROUVIER, R.; DE ROCHAMBEAU, H. **The rabbit husbandary, health and production**. Rome: FAO, 1986. 134p.

LEVINE, N. D. Phylum II. Apicomplexa Levine 1970. In: LEE, J. J.; HUTNER, S. H.; BOVEE, E. C. (Eds.). **Illustrated Guide to the Protozoa**. Kansas: Society of Protozoologists, 1985. p. 322–374.

LICOIS, D. Domestic rabbit enteropathies. In: WORLD RABBIT CONGRESS, 8., 2004, Puebla, México. **Anais...** Puebla: 2004.p. 385-403.

LICOIS, D.; COUDERT, P.; BAHAGIA, S.; ROSSI, G. L. Endogenous development of *Eimeria intestinalis* in rabbits (*Oryctolagus cunicullus*). **Journal of Parasitology**, v. 78, n. 6, p. 1041-1048, 1992.

LICOIS, D.; COUDERT, P.; DROUET-VIARD, F.; BOIVIN, M. *Eimeria magna*: pathogenicity, immunogenicity and selection of a precocious line. **Veterinary Parasitology**, v. 60, n. 1-2, p. 27-35, 1995.

MENG, Q. L; TIAN, G. F; YAN, H. B; ZHANG D. F. Investigation on coccidial species of rabbits in Xinjiang. **Progress in Veterinary Medicine**, v. 8, p. 44–47, 2007.

MOSIER, D. A.; OBERST, R. D. Cryptosporidiosis. A global challenge. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 916, p. 102–111, 2000.

NOLAN, M. J.; JEX, A. R.; HAYDON, S. R.; STEVENS, M. A.; GASSER, R.

B. Molecular detection of *Cryptosporidium cuniculus* in rabbits in Australia. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, p. 1179-1187, 2010.

NORTON, C. C.; CATCHPOLE, J.; JOYNER, L. P. Redescriptions of *Eimeria irresidua* Kessel & Jankiewicz, 1931 and *E. flavescens* Marotel & Guilhon, 1941 from the domestic rabbit. **Parasitology**, v. 79, p. 231–248, 1979.

ONCEL, T.; GULEGEN, E.; SENLIK, B.; BAKIRCI, S. Intestinal coccidiosis in Angora rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) caused by *Eimeria intestinalis*, *Eimeria perforans* and *Eimeria coecicola*. **YYU Veteriner Fakultesi Dergisi**, v. 22, n. 1, p. 27-29, 2011.

PAKANDL, M. Coccidia of rabbit: a review. **Folia Parasitologica**, v. 56, n. 3, p. 153-166, 2009.

PAKANDL, M. Description of *Eimeria vej dovskyi* sp. n. and redescription of *Eimeria media* Kessel, 1929. **Folia Parasitologica**, v. 35, p. 1–9, 1988.

PAKANDL, M. Selection of a precocious line of the rabbit coccidium *Eimeria flavescens* Marotel and Guilhon (1941) and characterisation of its endogenous cycle. **Parasitology Research**, v. 97, p. 150–155, 2005.

PAKANDL, M.; ČERNÍK, F.; COUDERT, P. The rabbit coccidium *Eimeria flavescens* Marotel and Guilhon, 1941: an electron microscopic study of its life cycle. **Parasitology Research**, v. 91, p. 304–311, 2003.

PAKANDL, M.; COUDERT, P. Life cycle of *Eimeria vej dovskyi* Pakandl, 1988: electron microscopy study. **Parasitology Research**, v. 85, p. 850–854, 1999.

PAKANDL, M.; COUDERT, P.; LICOIS, D. Migration of sporozoites and

merogony of *Eimeria coecicola* in the gut-associated lymphoid tissue. **Parasitology Research**, v. 79, p. 593–598, 1993.

PAKANDL, M.; DROUET-VIARD, F.; COUDERT, P. How do sporozoites of rabbit *Eimeria* species reach their target cells? **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Life Sciences**, v. 318, p. 1213–1217, 1995.

PAKANDL, M.; EID AHMED, N.; LICOIS, D.; COUDERT, P. *Eimeria magna* Pérard, 1925: life cycle studies with parental and precocious strains. **Veterinary Parasitology**, v. 65, p. 213–222, 1996b.

PAKANDL, M.; GACA, K.; DROUET-VIARD, F.; COUDERT, P. *Eimeria coecicola*: endogenous development in gut-associated lymphoid tissue. **Parasitology Research**, v. 82, p. 347–351, 1996a.

PAKANDL, M.; GACA, K.; LICOIS, D.; COUDERT, P. *Eimeria media* Kessel, 1929: comparative study of endogenous development between precocious and parental strains. **Veterinary Research**, v. 27, p. 465–472, 1996c.

PAKANDL, M.; HLÁSKOVÁ, L. The reproduction of *Eimeria flavescens* and *Eimeria intestinalis* in suckling rabbits. **Parasitology Research**, v. 101, p. 1435–1437, 2007.

PAKANDL, M.; JELÍNKOVÁ, A. The rabbit coccidium *Eimeria piriformis*: Selection of a precocious line of life-cycle study. **Veterinary Parasitology**, v. 137(3-4), p. 351–354, 2006.

PATTON, N. M.; HAGEN, K. W.; GORHAM, J. R.; FLATT, R. E. **Domestic rabbits: diseases and parasites**. Washington: USDA, 2000. 490p.

PAVLASEK, I.; LAVICKA, M.; TUMOVA, E.; SKRIVAN, M. Spontaneous

*Cryptosporidium* infection in weaned rabbits. **Veterinary Medicine (Prague)**, v. 41, p. 361–366, 1996.

PEETERS, J. E.; HALEN, P. Efficacy of some coccidiostatics against the intestinal coccidiosis in rabbits. 1. Amprolium-ethopabat and metichlorpindol. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, v. 48, p. 299–306, 1979a.

PEETERS, J. E.; JANSSEN-GEEROMS, R.; LAMPO, P.; HALEN, P. Synergistic anticoccidial activity of metichlorpindol and methylbenzoquate in rabbits. **Annales de Recherches Veterinaires**, v. 123, p. 573–579, 1979b.

PEETERS, J. E.; HALEN, P. Field trials with the coccidiostatics metichlorpindol and robenidine in a rabbit farm. **Annales de Recherches Veterinaires**, v. 11, p. 49–55, 1980.

PEETERS, J. E.; JANSSEN-GEEROMS, R.; HALEN, P. Effet des anticoccidiens Coyden 25, Cycopstat et Whytsin 10 sur l'excrétion oocystale dans l'élevage cunicole industriel. **Revue de L'agriculture**, v. 33, p. 845–855, 1980.

PEETERS, J. E.; GEEROMS, R.; ANTOINE, O.; MAMMERICKX, M.; HALEN, P. Efficacy of narasin against hepatic and intestinal coccidiosis in rabbits. **Parasitology**, v. 83, p. 293–301, 1981a.

PEETERS, J. E.; GEEROMS, R.; FROYMAN, R.; HALEN, P. Coccidiosis in rabbits: a field study. **Research in Veterinary Science**, v. 30, n. 3, p. 328–334, 1981b.

PEETERS, J. E.; GEEROMS, R.; MOLDEREZ, J.; HALEN, P. Activity of clopidol methylbenzoquate, robenidine and salinomycin against hepatic coccidiosis in rabbits. **Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe b-journal of**

**Veterinary Medicine Series b-infectious Diseases Immunology Food Hygiene Veterinary Public Health**, v. 29, p. 207–218, 1982.

PEETERS, J. E.; GEEROMS, R.; VAWERYCK, H.; BOUQUET, Y.; LAMPO, P.; HALEN, P. Immunity and effect of clopidol/methylbezoquate and robenidine before and after weaning on rabbit coccidiosis in the field. **Research in Veterinary Science**, v. 35, p. 211–216, 1983.

PEETERS, J. E.; POHL, P.; CHARLIER, G. Infectious agents associated with diarrhoea in commercial rabbits. **Annales de Recherches Veterinaires**, Brussels, v. 15, n. 3, p. 335-340, 1984.

PEETERS, J. E.; GEEROMS, R. Efficacy of toltrazuril against intestinal and hepatic coccidiosis in rabbits. **Veterinary Parasitology**, v. 22, p. 21–35, 1986.

PEETERS, J.E.; GEEROMS, R.; HALEN, P.H. Epidemiology of coccidiosis in commercial rabbits (1982-1987) and resistance against Robenidine. In: WORLD RABBIT CONGRESS, 4., 1988, Budapest. **Anais...** Budapest, 1988. p. 399-408.

PELLÉRDY, L. P.; DÜRR, U. Zum endogenen entwicklungszyklus von *Eimeria stiedai* (Lindemann, 1865) kisskalt, Hartman 1907. **Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 20, p. 227–244, 1970.

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

PULESTON, R. L.; MALLAGHAN, C. M.; MODHA, D. E.; HUNTER, P. R.; NGUYEN-VAN-TAM, J. S.; REGAN, C. M.; NICHOLS, G. L.; CHALMERS

R. M. The first recorded outbreak of cryptosporidiosis due to *Cryptosporidium cuniculus* (formerly rabbit genotype), following a water quality incident. **Journal of Water and Health**, v. 12, n. 1, p. 41-50, doi: 10.2166/WH.2013.097, 2014.

RAMIREZ, N. E.; WARD, L. A.; SREEVATSAN, S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. **Microbes and Infection**, v.6, p. 1-13, 2004.

RYAN, U.; FAYER, R.; XIAO, L. Cryptosporidium species in humans and animals: current understanding and research needs. **Parasitology**, v. 141, n. 13, p. 1667-1685, doi: 10.1017/S0031182014001085, 2014.

ROBINSON, G.; ELWIN, K.; CHALMERS, R. M. Unusual *Cryptosporidium* genotypes in human cases of diarrhea. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, p. 1800-1802, 2008.

ROBINSON, G.; CHALMERS, R. M. The European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), a source of zoonotic cryptosporidiosis. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, p. e1-e13, 2010.

ROBINSON, G.; WRIGHT, S.; ELWIN, K.; HADFIELD, S. J.; KATZER, F.; BARTLEY, P. M.; HUNTER, P. R.; NATH, M.; INNES, E. A.; CHALMERS, R. M. Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Morphology, biology and phylogeny. **International Journal for Parasitology**, v. 40, p. 1539-1548, 2010.

ROSE, M. E. Immunity. In: HAMMOND, D. M.; LONG, P. L. (Eds.). **The Coccidia**. Baltimore: University Press, 1973. p. 295–241.

RYLEY, J. F.; ROBINSON, T. E. Life cycle studies with *Eimeria magna*

Pérard, 1925. **Zeitschrift fur Parasitenkunde-parasitology Research.**, v. 50, p. 257–275, 1976.

SAMBETH, W.; RAETHER, W. Prophylaktischer effekt von salinomycin gegen die kokzidiose des kaninchens. **Zentralblatt fur Veterinarmedizin Reihe b-journal of Veterinary Medicine Series b-infectious Diseases Immunology Food Hygiene Veterinary Public Health**, v. 27, p. 446–458, 1980.

SANTOS, M. J. **Frequência e identificação de coccídios em coelhos domésticos (*Oryctolagus cuniculus*) em quatro localidades do estado de Minas Gerais.** Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1984, 64p.

SÉNAUD, J.; ČERNÁ, Ž. Étude ultrastructurale des mérozoïtes et de la schizogonie des coccidies (Eimeriina): *Eimeria magna* (Pérard, 1925) de l'intestin des lapins et *Eimeria tenella* (Railliet et Lucet, 1891) des caecums des poulets. **Journal of Protozoology**, v. 16, p. 155–165, 1969.

SHI, K.; JIAN, F.; LV, C.; NING, C.; ZHANG L.; REN, X.; DEAREN T. K.; LI, N.; QI, M.; XIAO, L. Prevalence, Genetic Characteristics, and Zoonotic Potential of *Cryptosporidium* Species Causing Infections in Farm Rabbits in China. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 9, p. 3263-3266, 2010.

SHIBASHI, T.; IMAI, T.; SATO, Y.; ABE, N.; YUKAWA, M.; NOGAMI, S. *Cryptosporidium* infection in juvenile pet rabbits. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 68, n. 3, p. 281-282, 2006.

STREUN, A.; COUDERT, P.; ROSSI, G. L. Characterization of *Eimeria* species. II. Sequential morphologic study of the endogenous cycle of *Eimeria perforans* (Leuckart, 1879; Sluiter and Swellengrebel, 1912) in experimentally

infected rabbits. **Zeitschrift fur Parasitenkunde-parasitology Research.**, v. 60, p. 37–53, 1979.

STRIEPEN, B. Time to tackle cryptosporidiosis. **Nature**, v. 503, p. 189–191, 2013.

THOMPSON, R. C. A.; OLSON, M. E.; ZHU, G.; ENOMOTO, S.; ABRAHAMSEN, M. S.; HIJJAWI, N. S. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. **Advances in Parasitology**, v. 59, p. 77-158, 2005.

TYZZER, E.E. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidian found in the small intestine of the common mouse. **Archiv Fur Protistenkund**, v. 26, p. 394–418, 1912.

VALIGUROVÁ, A.; JIRKŮ, M.; KOUDELA, B.; GELNAR, M.; MODRÝ, D.; ŠLAPETA, J. Cryptosporidia: Epicellular parasites embraced by the host cell membrane. **International Journal for Parasitology**, v. 38, 913-922, 2008.

VANPARIJS, O.; DESPLENTER, L.; MARSBOOM, R. Efficacy of diclazuril in the control of intestinal coccidiosis in rabbits. **Veterinary Parasitology**, v. 34, p. 185–190, 1989.

VARGA, I. Large-scale management and parasite populations: Coccidia in rabbit. **Veterinary Parasitology**, v. 11, p. 69–84, 1982.

XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterization 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.; FENG, Y. Zoonotic cryptosporidiosis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, p. 309–323, 2008.

XIAO, L.; RYAN, U. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 483-490, 2004.

XIAO, L.; RYAN, U. Molecular Epidemiology. In: FAYER, R.; XIAO, L. ***Cryptosporidium* and cryptosporidiosis**. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 119-163.

ZHANG, W.; SHEN, Y.; WANG, R.; LIU, A.; LING, H.; LI, Y.; CAO, J.; ZHANG, X.; SHU, J.; ZHANG, L. *Cryptosporidium cuniculus* and *Giardia duodenalis* in Rabbits: Genetic Diversity and Possible Zoonotic Transmission. **Plos One**, v. 7, e31262, 2012.

## **CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp. EM CRIAÇÕES COMERCIAIS BRASILEIRAS DE COELHOS**

**RESUMO** – A criptosporidiose é uma importante zoonose que pode ser transmitida por meio de alimentos, água de bebida e por contato com animais e pessoas infectadas. Além disso, doença clínica ou subclínica é frequente em diversas espécies de animais, incluindo coelhos domésticos. O objetivo deste estudo foi determinar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp., realizar sua classificação molecular e relacionar a presença do parasito às diferentes categorias animais em criações brasileiras de coelhos, por meio da análise de amostras fecais de coelhos de 21 granjas localizadas nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Pernambuco, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo. Quinhentas e catorze amostras de fezes foram colhidas e armazenadas a solução de dicromato de potássio 5%. Os oocistos foram purificados por centrifugo-flutuação em solução de Sheather e visualizados por microscopia utilizando a coloração negativa com verde malaquita. Cinquenta e cinco amostras foram submetidas à reação em cadeia pela polimerase e sequenciamento de fragmentos amplificados, referentes aos genes da subunidade 18S do rRNA e da glicoproteína GP60, visando à caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp.. Oito amostras foram positivas para *Cryptosporidium* spp. pela microscopia (1,56%; 8/514) e sete foram positivas pela PCR (12,73%; 7/55). Pela análise molecular foi possível identificar *Cryptosporidium cuniculus* (18S rRNA) e *C. cuniculus* subtipo VbA21 (gp60) em coelhos jovens e matrizes.

**Palavras-Chave:** Brasil, coccidiose, classificação molecular, PCR, subtipo.

**ABSTRACT** – Cryptosporidiosis is an important zoonotic disease that can be transmitted via water, food and contact with infected animals and people. Furthermore, clinical and subclinical disease occur in many animal species, including the domestic rabbit. The objective of this study was to determine the occurrence of *Cryptosporidium* spp., perform its molecular classification and correlate the presence of the parasite to the different animal categories in Brazilian rabbits farms. A total of 514 fecal samples from 21 rabbits farms located in the states of Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Pernambuco, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul and São Paulo were collected and stored at 5% potassium dichromate. Fecal samples were purified by centrifugal-flotation in Sheather solution and screened for *Cryptosporidium* spp. oocysts using the negative malachite green staining. Aiming the molecular characterization of *Cryptosporidium* spp., nested PCR targeting the 18S rRNA gene and gp60 gene followed by sequencing of amplified fragments were accomplished in 55 samples. Eight samples were positive for *Cryptosporidium* spp. by microscopy (1.56%; 8/514) and seven samples were positive by PCR (12.73%; 7/55). Molecular analysis revealed *Cryptosporidium cuniculus* for the 18S rRNA gene and *C. cuniculus* subtype VbA21 for the gp60 gene in kits and does.

**Keywords:** Brazil, *Cryptosporidium*, molecular classification, rabbits, subtype.

## Introdução

*Cryptosporidium* é um protozoário apicomplexa, que acomete seres humanos e animais, e está associado a sinais clínicos relacionados ao sistema gastrointestinal, na dependência da idade e estado de saúde do hospedeiro, da espécie do parasito e da dose infectante (XIAO; FAYER, 2008).

Na África e na Ásia, a criptosporidiose foi considerada a segunda maior causa de diarreia e morte em crianças com menos de cinco anos de idade (STRIEPEN, 2013), sendo responsável por 20% das causas de diarreia em crianças de países em desenvolvimento (MOSIER; OBERST, 2000) e por 748.000 casos anuais de diarreia nos Estados Unidos (SCALLAN et al., 2011).

Aproximadamente 20 espécies e diversos genótipos de *Cryptosporidium* já foram encontrados em humanos, incluindo *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. cuniculus*, *C. ubiquitum*, *C. viatorum*, *C. muris*, *C. suis*, *C. fayeri*, *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. scrofarum*, *C. tyzzeri*, *C. erinacei* e os genótipos cavalo, gambá, macaco e esquilo I (CAMA et al., 2003; FAYER, 2010; FENG et al., 2007; LIU et al., 2014; PLUTZER; KARANIS, 2009; ROBINSON et al., 2008; XIAO et al., 2004; XIAO, 2010; XIAO; FAYER, 2008).

Os coelhos eram considerados como o único hospedeiro de *C. cuniculus*, até o surto de criptosporidiose em humanos ocorrido no Reino Unido (CHALMERS et al., 2009). A crescente aquisição de coelhos como animais de estimação enfatiza a necessidade de monitoramento de infecções por *Cryptosporidium* e sua importância em saúde pública (SHIIBASHI et al., 2006). Os coelhos também podem ser infectados por *C. parvum* e *C. meleagridis*, que também são espécies consideradas patogênicas para humanos (DUSZYNSKI; COUCH, 2013).

Nos coelhos, a infecção por *Cryptosporidium* muitas vezes não é detectada devido à baixa prevalência e ao fato de que a infecção muitas vezes é subclínica (SHI et al., 2010; ZHANG et al., 2012). No entanto, quando submetidos a condições estressantes, coelhos portadores de *Cryptosporidium* podem desenvolver diarreia, cuja gravidade vai depender da idade,

alimentação e estado imunológico dos animais (KAUPKE et al., 2014). A diarreia associada à criptosporidiose pode resultar em mortalidade e ocorre principalmente no período pós-desmame, quando há estresse associado à separação da mãe, transporte para gaiolas de engorda e mudança de alimentação (KAUPKE et al., 2014; SHIIBASHI et al., 2006).

No Brasil, não há trabalhos relacionados à caracterização molecular de *Cryptosporidium* em coelhos. Em outros países, há diversos relatos de identificação de *C. cuniculus* e de seus subtipos relacionados ao gene da glicoproteína GP60 (CHALMERS et al., 2009; KAUPKE et al., 2014; NOLAN et al., 2010; RYAN et al., 2003; SHI et al., 2010; ZHANG et al., 2012).

Este trabalho visou à determinação da ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de coelhos em granjas brasileiras, sua caracterização molecular para determinação da espécie e do subtipo do parasito e relacionar a presença do parasito às diferentes categorias animais em criações brasileiras de coelhos.

## **Material e Métodos**

### *Colheita e Processamento das Amostras Fecais*

As amostras fecais foram colhidas em 21 criações comerciais de coelhos, que tem como objetivo a comercialização de animais de estimação, para pesquisa, abate para consumo ou reprodução. As criações se localizam nos municípios de Bambuí (MG), São João Batista da Glória (MG), Campo Grande (MS), Jaboatão dos Guararapes (PE), Curitiba (PR), Teresópolis (RJ), Eldorado do Sul (RS), Porto Alegre (RS), Santa Maria (RS), Araçatuba (SP), Araraquara (SP), Botucatu (SP), Campinas (SP), Guariba (SP), Jaboticabal (SP), Pradópolis (SP), Ribeirão Pires (SP) e Ribeirão Preto (SP).

Foram colhidas 514 amostras constituídas por aproximadamente 30 g de fezes, diretamente no interior das gaiolas, no piso embaixo das gaiolas ou em

bandejas coletoras localizadas embaixo das gaiolas, e armazenadas em frascos de plástico contendo dicromato de potássio 5%, a 4° C.

As amostras foram classificadas de acordo com a idade, sexo e estado reprodutivo dos animais: fêmeas vazias, fêmeas gestantes, fêmeas lactantes, filhotes de 31 a 50 dias de idade, filhotes de 51 a 80 dias de idade e machos adultos. As amostras de filhotes foram constituídas por um *pool* de amostras fecais referentes a vários animais alojados em uma mesma gaiola, enquanto que as amostras de coelhos adultos foram individuais.

As amostras fecais foram coadas em peneira de plástico descartável e submetidas à concentração e purificação por centrífugo-flutuação em solução de Sheather acrescida com 0,1% de Tween 20. O sedimento resultante do processo de purificação foi diluído em solução salina fosfatada (PBS) com antibióticos (100 U penicilina/ml + 100 µg gentamicina/ml + 100 µg estreptomicina/mL + 0,25 µg anfotericina B/mL) e armazenado a 4° C.

### *Exame Microscópico*

A pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. foi realizada no sedimento resultante do processo de purificação das 514 amostras, utilizando a coloração negativa com verde malaquita (ELLIOT et al., 1999).

### *Extração do DNA*

Os microtubos contendo o sedimento resultante da purificação foram centrifugados a 12.000 g, por 3 minutos, com descarte do sobrenadante. O sedimento foi diluído em 600 µL de tampão L1 (24g de isotiocianato de guanidina; 20 mL de Tris-HCL 0,1M pH 6,4; 4,4 mL de EDTA 0,2M pH 8,0; 0,5 mL de triton X-100 e polivinilpirrolidona 1%). Após adição de 20 µL de álcool isoamílico e 200 mg de pérolas de vidro de 0,45 µm, o microtubo foi submetido

à agitação por 2 minutos, em velocidade máxima, no Mini-Beadbeater (Biospec), com incubação a 60°C por 2 horas e agitação periódica a 1.000 rpm por 5 segundos, a cada 5 minutos, e centrifugação a 12.000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi homogeneizado com 300 µL de isopropanol e transferido para uma coluna de sílica (Zymo-Spin<sup>TM</sup> IIC – Thermo Scientific) previamente inserida em um tubo coletor de 2 mL. O tubo foi centrifugado a 16.100 g por um minuto, com descarte da solução. 600 µL de tampão L2 (24 g de tiocianato de guanidina; 20 mL de 0,1M Tris-HCL pH 6,4; 4,4 mL de EDTA 0,2M pH 8,0) foram adicionados à coluna de sílica, com centrifugação a 16.100 g, por um minuto, e descarte da solução. 600 µL de tampão L3 (etanol 70% em solução de NaCl 10mM, Tris-HCL 10mM e EDTA 0,5mM, pH 7,5) foram adicionados por duas vezes seguidas, com centrifugação a 16.100 g por um minuto e descarte da solução do microtubo. Após transferência da coluna de sílica para um tubo de 1,5 mL, 50 µL de solução de eluição (Tris 10mM, EDTA 0,5mM, pH 9), previamente aquecida a 56°C, foi adicionada à coluna de sílica, com centrifugação a 16.100 g por um minuto, colheita do DNA eluído na coluna de sílica e armazenamento do DNA a -20°C.

### *PCR e sequenciamento*

Para identificação da espécie de *Cryptosporidium*, 55 amostras foram selecionadas, incluindo as positivas pela microscopia, de forma que cada categoria de animais fosse representada, para realização da *nested* PCR (nPCR) seguida de sequenciamento dos fragmentos amplificados (nPCR/S). Dessa forma, foram selecionadas amostras correspondentes a: cinco fêmeas vazias, 10 fêmeas gestantes, 12 fêmeas lactantes, 14 filhotes de 31 a 50 dias, oito filhotes de 51 a 80 dias e seis machos adultos.

A nPCR foi realizada para amplificação de fragmentos do gene da subunidade 18S do RNA ribossômico (18S rRNA), com os 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 pb) e 5' GGA AGG 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 pb) (XIAO et al., 2000), nas seguintes condições de reação: preparação de 25 µL de solução contendo 2,5 µL de tampão para PCR 10 x, 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 U de Taq DNA polimerase, 200 µM de cada desoxiribonucleotídeo, 100 nM de cada oligonucleotídeo iniciador e 2,5 µL de DNA alvo. As amostras foram submetidas à desnaturação inicial do DNA a 94°C por 3 minutos, seguida de 39 ciclos, cada um consistindo em desnaturação a 94°C por 45 s, 45 s de anelamento a 55°C e 60 s de extensão a 72°C, com extensão final a 72°C por 7 min.

Visando à subtipagem de *C. cuniculus*, as amostras positivas pela nPCR/S para o gene 18S rRNA foram submetidas à nPCR/S para amplificação e sequenciamento de fragmento parcial do gene da glicoproteína GP60, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores 5' ATAGTCTCCGCTGTATTC 3' e 5' GGAAGGAACGATGTATCT 3' para a reação primária (909 bp) e 5' TCCGCTGTATTCTCAGCC 3' e 5' GCAGAGGAACCAGCATC 3' para a reação secundária (875 pb) (ALVES et al., 2003).

Como controle positivo da nPCR foram utilizados DNA genômico de *Cryptosporidium serpentis* (18S rRNA) e de *C. parvum* (GP60). Água ultrapura foi utilizada como controle negativo. Os fragmentos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

Os fragmentos resultantes da nPCR para os dois genes foram purificados utilizando-se o QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) e submetidos ao sequenciamento bidirecional no Centro de Sequenciamento e Genômica Funcional da UNESP, Campus de Jaboticabal, utilizando o "ABI Prism® Dye Terminator 3.1" (Applied Biosystems), em seqüenciador automático ABI 3730XL (Applied Biosystems).

A determinação da sequência consenso foi realizada por meio do software Codoncode Aligner v. 1.5.2. (CodonCode Corporation). Somente foram considerados nucleotídeos com valores de qualidade de sequenciamento

maior ou igual a 20. Após determinação da sequência consenso dos fragmentos amplificados por PCR, elas foram alinhadas com 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*.

A análise estatística descritiva foi efetuada para avaliação dos resultados.

## Resultados e Discussão

Pela microscopia e pela nPCR foi observada positividade para *Cryptosporidium* spp. de 1,56% (8/514) e 12,73% (7/55), respectivamente. Dentre as amostras positivas pela microscopia, sete foram positivas pela nPCR. Positividade para *Cryptosporidium* foi encontrada em cinco granjas, sendo três em amostras de filhotes de coelhos entre 31 e 50 dias, nas cidades de Campo Grande, Curitiba e Ribeirão Preto, duas de filhotes entre 51 e 80 dias, em Jaboticabal, uma de uma fêmea gestante e uma em uma fêmea lactante, em Ribeirão Preto (Tabela 1). A análise molecular revelou *C. cuniculus* para o gene 18S rRNA e *C. cuniculus* subtipo VbA21 para o gene GP60, com 100% de similaridade genética para ambos os genes.

Tabela 1 - Identificação das amostras positivas pela nPCR em relação à categoria animal

<b>Categoria</b>	<b>% (positivas/total)</b>
Fêmea vazia	0 (0/5)
Fêmea gestante	10 (1/10)
Fêmea lactante	8,33 (1/12)
Filhote 31-50 dias	21,43 (3/14)
Filhote 51-80 dias	25 (2/8)
Machos	0 (0/6)

A criptosporidiose em coelhos geralmente se caracteriza por ausência de sinais clínicos e baixo número de oocistos em fezes (COX et al., 2005; INMAN; TAKEUCHI, 1979; PAVLASEK et al., 1996; PEETERS, 1988; SHIIBASHI et al., 2006). A criptosporidiose clínica ocorre com mais frequência em coelhos entre 30 e 40 dias de idade e a fonte de infecção para os coelhos jovens são as mães que excretam oocistos pouco antes do parto e vários dias depois do parto (PAVLÁSEK et al., 1996). Esses fatores podem explicar a ocorrência de *C. cuniculus* apenas em filhotes e em fêmeas gestantes e lactantes, como ocorrido no presente estudo.

Ocorrência semelhante à encontrada neste trabalho (1,56%; 8/514) foi observada no único trabalho desenvolvido no Brasil (1,66%; 2/120), utilizando o exame microscópico para pesquisa de *Cryptosporidium* spp. em coelhos, no Rio Grande do Sul (SILVA et al., 2006).

Em outros países, os valores de ocorrência de *Cryptosporidium* em coelhos também são semelhantes ao encontrado neste estudo, porém com identificação de outros subtipos (CHALMERS et al., 2009; NOLAN et al., 2010; SHI et al., 2010;). Zhang et al. (2012) relataram a presença dos subtipos VbA21e VbA32 e prevalência de *Cryptosporidium* spp., pela microscopia, de 2,38% (9/378). Shi et al. (2010) relataram prevalência de 3,4% (37/1081) na China, sendo de 10,9% (27/249) para coelhos jovens e de 0,92% (7/761) para coelhos adultos. Neste trabalho, ocorrência de 22,73% (5/22) foi encontrada para os coelhos jovens e de 5,71% (2/35) para coelhos adultos. Ocorrência mais alta em coelhos jovens (19,7%; 13/66) também foi identificada no Japão, por Shiibashi et al. (2006).

O subtipo VbA21 encontrado neste trabalho também foi encontrado por Zhang et al. (2012) em granjas de coelhos na China. No entanto, não há relatos quanto à infecção pelo subtipo VbA21 em humanos, apesar de outros subtipos de *C. cuniculus* terem sido relatados em humanos: os subtipos VaA9, VaA11, VaA18, VaA19, VaA21, VaA22, VaA23, VaA32, VbA20, VbA22, VbA25, VbA26, VbA28, VbA29, VbA30, VbA32, VbA33, VbA34, VbA36, VbA37 (BOUZID et al., 2010; CHALMERS et al., 2009; ROBINSON; CHALMERS, 2010).

Neste trabalho, foi demonstrado que *C. cuniculus* subtipo VbA21 está presente em criações de coelhos no Brasil, em fêmeas gestantes, fêmeas lactantes e em filhotes. Apesar da ocorrência de infecção por *C. cuniculus* em criações brasileiras de coelhos pesquisadas neste experimento ser baixa e semelhante à observada em outros países, a possibilidade de transmissão de um agente zoonótico para o homem deve ser considerada, particularmente em pessoas que apresentam contato direto ou indireto com coelhos domésticos. Por outro lado, a infecção por *C. cuniculus* deve ser considerada no diagnóstico diferencial de enfermidade clínica relacionada ao sistema gastrointestinal em coelhos domésticos.

## REFERÊNCIAS

ALVES, M.; XIAO, L.; SULAIMAN, I.; LAL, A. A.; MATOS, O.; ANTUNES, F. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle and zoo ruminants in Portugal. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 2744-2747, 2003.

BOUZID, M.; TYLER, K. M.; CHRISTEN, R.; CHALMERS, R. M.; ELWIN, K.; HUNTER, P. R. Multilocus analysis of human infective *Cryptosporidium* species and subtypes using ten novel genetic loci. **BMC Microbiology**, v. 10, p. 213, 2010.

CACCIÒ, S. M.; POZIO, E. Advances in the epidemiology, diagnosis and treatment of cryptosporidiosis. **Expert Review of Anti Infective Therapy**, v. 4, p. 429–443, 2006.

CAMA, V. A.; BERN, C.; SULATMAN, I. M.; GILMAN, R. H.; TICONA, E.; VIVAR, A.; KAWAI, V.; VARGAS, D.; ZHOU, L.; XIAO, L. *Cryptosporidium*

species and genotypes in HIV-positive patients in Lima, Peru. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 50, p. 531–533, 2003.

CHALMERS, R. M.; ROBINSON, G.; ELWIN, K.; HADFIELD, S. J.; XIAO, L.; RYAN, U.; MODHA, D.; MALLAGHAN, C. *Cryptosporidium* rabbit genotype, a newly identified human pathogen. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 5, p. 829–830, 2009.

COX, P.; GRIFFITH, M.; ANGLES, M.; DEERE, D.; FERGUSON, C. Concentrations of pathogens and indicators in animal feces in the Sydney watershed. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 5929–5934, 2005.

DUSZYNSKI, D. W.; COUCH, L. **The Biology and Identification of the Coccidia (Apicomplexa) of Rabbits of the World**. San Diego: Elsevir, 2013. 335p.

ELLIOT, A.; MORGAN, U. M.; THOMPSON, R. C. Improved staining method for detecting *Cryptosporidium* oocysts in stools using malachite green. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 139–142, 1999.

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

FAYER, R., SPEER, C. A.; DUBEY, J. P. The general biology of *Cryptosporidium*. In: FAYER R. (Ed.). ***Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis**. Boca Raton: CRC Press, 1997. p. 1–41.

FENG, Y.; ALDERISIO, K. A.; YANG, W.; BLANCERO, L. A.; KUHNE, W. G.; NADARESKI, C. A.; REID, M.; XIAO, L. *Cryptosporidium* genotypes in wildlife from a New York watershed. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 6475–6483, 2007.

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, p. 95-98, 1999.

INMAN, L. R.; TAKEUCHI, A. Spontaneous cryptosporidiosis in an adult female rabbit. **Veterinary Pathology**, v. 16, p. 89–95, 1979.

KAUPKE, A.; KWIT, E.; CHALMERS, R. M.; MICHALSKI, M. M.; RZEZUTKA, A. An outbreak of massive mortality among farm rabbits associated with *Cryptosporidium* infection. **Research in Veterinary Science**, v. 97, Issue 1, p. 85-87, 2014.

LIU, H.; SHEN, Y.; YIN, J.; YUAN, Z.; JIANG, Y.; XU, Y.; PAN, W.; HU, Y.; CAO, J. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon*, *Giardia* and *Cyclospora* in diarrheal out patients in China. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, p. 25, 2014.

MOSIER, D. A.; OBERST, R. D. Cryptosporidiosis. A global challenge. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 916, p. 102–111, 2000.

NOLAN, M. J.; JEX, A. R.; HAYDON, S. R.; STEVENS, M. A.; GASSER, R. B. Molecular detection of *Cryptosporidium cuniculus* in rabbits in Australia. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, p. 1179-1187, 2010.

PAVLASEK, I., LAVICKA, M.; TUMOVA, E.; SKRIVAN, M. Spontaneous *Cryptosporidium* infection in weaned rabbits. **Veterinární Medicína (Praha)**, v. 41, p. 361–366, 1996.

PEETERS, J. E. Recent advances in intestinal pathology of rabbits and further perspectives. In: WORLD RABBIT CONGRESS, 4., **World Rabbit Science**, p. 293–315, 1988.

PLUTZER, J.; KARANIS, P. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 187–199, 2009.

ROBINSON, G.; ELWIN, K.; CHALMERS, R. M. Unusual *Cryptosporidium* genotypes in human cases of diarrhea. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, p. 1800–1802, 2008.

ROBINSON, G.; CHALMERS, R. M. The European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), a source of zoonotic cryptosporidiosis. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, p. e1-e13, 2010.

RYAN, U.; XIAO, L.; READ, C.; ZHOU, L.; LAL, A. A.; PAVLASEK, I. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 4302-4307, 2003.

RYAN, U.; FAYER, R.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. **Parasitology**, v. 141, n. 13, p. 1667-1685, doi:10.1017/S0031182014001085, 2014.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R. M.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R. V.; HOEKSTRA, R. M. Foodborne illness acquired in the United States – major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 7–15, 2011.

SHI, K.; JIAN, F.; LV, C.; NING, C.; ZHANG L.; REN, X.; DEAREN T. K.; LI, N.; QI, M.; XIAO, L. Prevalence, genetic characteristics, and zoonotic potential of *Cryptosporidium* species causing infections in farm rabbits in China. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 9, p. 3263-3266, 2010.

SHIIBASHI, T.; IMAI, T.; SATO, Y.; ABE, N.; YUKAWA, M.; NOGAMI, S. *Cryptosporidium* infection in juvenile pet rabbits. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 68, n. 3, p. 281-282, 2006.

SILVA, A. S. da; CEOLIN, L. V.; MONTEIRO, S. G. Endoparasitoses de coelhos criados em diferentes sistemas de manejo. **Revista da FZVA, Uruguiana**, v. 13, n. 2, p. 127-136, 2006.

STRIEPEN, B. Time to tackle cryptosporidiosis. **Nature**, v. 503, p. 189–191, 2013.

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 tools. **Nucleic Acids Research**, v. 24, p. 4876-4882, 1997.

XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 80–89, 2010.

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

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, p. 1239–1255, 2008.

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

XIAO, L.; MORGAN, U. M.; FAYER, R.; THOMPSON, R. C. A. *Cryptosporidium* systematics and implications for public health. **Parasitology Today**, v. 16, p. 297-295, 2000.

ZHANG, W.; SHEN, Y.; WANG, R.; LIU, A.; LING, H.; LI, Y.; CAO, J.; ZHANG, X.; SHU, J.; ZHANG, L. *Cryptosporidium cuniculus* and *Giardia duodenalis* in rabbits: genetic diversity and possible zoonotic transmission. **Plos One**, v. 7, Issue 2, e31262, 2012.

### **CAPITULO 3 – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Eimeria* spp. EM CRIAÇÕES BRASILEIRAS DE COELHOS**

**RESUMO** – A eimeriose é a enfermidade parasitária mais importante em coelhos, que são hospedeiros de 11 espécies de *Eimeria*. Há relatos de alta mortalidade em criações industriais de coelhos, relacionada à presença de infecções únicas ou múltiplas por *Eimeria* spp.. O objetivo desta pesquisa foi verificar a ocorrência de *Eimeria* spp. em amostras fecais de mini coelhos e de coelhos de corte de diferentes idades, realizar sua classificação molecular e relacionar a presença do parasito às diferentes categorias de animais, em criações brasileiras. Amostras fecais (n = 514) foram colhidas de 21 criações de coelhos nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Pernambuco, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo e examinadas por meio de microscopia, para visualização de oocistos de *Eimeria* spp.. Cinquenta e cinco amostras positivas pela microscopia foram submetidas à reação em cadeia pela polimerase (PCR) para amplificação de fragmento parcial da região ITS1 do gene do rRNA, para identificação espécie-específica. A microscopia revelou positividade de 19,45% (100/514). A PCR realizada em 55 amostras positivas pela microscopia possibilitou a identificação de *E. exigua* (14,5%), *E. flavescens* (61,8%), *E. intestinalis* (16,36%), *E. irresidua* (16,4%), *E. magna* (50,9%), *E. media* (3,6%), *E. perforans* (36,4%), *E. piriformis* (20,0%), *E. stiedai* (7,3%) e *E. vej dovskyi* (7,3%). Maior positividade foi observada em mini coelhos 33,17% (69/208), coelhos jovens 46,67% (35/75) e em fêmeas lactantes 24,47% (23/94). Amostras fecais provenientes de granjas que utilizam vassoura de fogo como técnica de desinfecção apresentaram menor ocorrência de *Eimeria*.

**Palavras-chave:** coccidiose, cunicultura, eimeriose, microscopia.

**ABSTRACT** – The eimeriosis is the most important parasitic disease in rabbits. There are 11 valid *Eimeria* species infecting rabbits. There are several reports of high mortality in rabbits farms, in many cases related to the presence of single or multiple infections with *Eimeria* spp.. The objective of this research was to verify the occurrence of *Eimeria* spp. in fecal samples of mini rabbits and meat rabbits of different ages, accomplish the its molecular classification and correlate the presence of the parasite to the different animal categories, in Brazilian rabbits farms. Fecal samples (n = 514) were collected from 21 rabbits farms in the states of Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Pernambuco, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul and São Paulo, and screened for *Eimeria* spp. oocysts using microscopy. Fifty-five samples positive by microscopy were subjected to species-specific polymerase chain reaction (PCR) targeting the ITS1 rRNA gene aiming *Eimeria* species identification. Microscopy revealed positivity in 19.45% (100/514) of the samples. The species-specific PCR enabled the identification of *E. exigua* (14.5%), *E. flavescens* (61.8%), *E. intestinalis* (16.3%), *E. irresidua* (16.4%), *E. magna* (50.9%), *E. media* E (3.6%), *E. perforans* (36.4%), *E. piriformis* (20.0%), *E. stiedai* (7.3%) and *E. vej dovskiyi* (7.3%). Higher positivity was observed in mini rabbits (33.17%; 69/208), young rabbits (46.67%; 35/75) and lactating females (24.47%; 23/94). Fecal samples from farms that use fire broom as disinfection technique showed lower occurrence of *Eimeria*.

**Keywords:** Brazil, coccidiosis, *Eimeria*, microscopy, rabbit production.

## Introdução

A coccidiose em coelhos é causada por protozoários do gênero *Eimeria*, é responsável por alta morbidade e mortalidade e, conseqüentemente, por perdas econômicas (BHAT et al., 1996; DKHIL et al., 2013; DROUET-VIARD et al., 1997; ONCEL et al., 2011; RAZAVI et al., 2010; YAN et al., 2013). Os filhotes são mais susceptíveis à eimeriose, no entanto, os adultos infectados são portadores e fonte de infecção para outros animais (COUDERT et al., 2000; ONCEL et al., 2011).

Os sinais clínicos da eimeriose em coelhos são diarreia, perda de apetite, perda de peso, desidratação, septicemia secundária e óbito (COUDERT, 1976; PATTON et al., 2000; PEETERS et al., 1984; SANTOS, 1984; VITOVEC; PAKANDL, 1989). É comum os coelhos apresentarem coccidiose subclínica, caracterizada por redução do consumo de ração, piora na conversão alimentar e no desempenho, resultando em perdas econômicas para a cunicultura (JING et al., 2012).

Onze espécies de *Eimeria* infectam coelhos: *E. coecicola*, *E. flavescens*, *E. intestinalis*, *E. irresidua*, *E. exigua*, *E. magna*, *E. media*, *E. perforans*, *E. piriformis*, *E. stiedai* e *E. vej dovskyi* (KVICEROVA et al., 2008; LICOIS, 2009; PAKANDL, 2009). A identificação das espécies comumente é realizada por meio de análise morfológica e morfométrica de oocistos, esporocistos e esporozoítos (EI-SHAHAWI et al., 2012; LI et al., 2010). No entanto, há sobreposição de dados morfológicos e morfométricos entre as diferentes espécies, o que dificulta sua identificação precisa somente por microscopia (LICOIS, 2004; LONG; JOYNER, 1984; OLIVEIRA et al., 2011). Dessa forma, técnicas moleculares foram desenvolvidas como método de detecção e identificação de *Eimeria* spp. em coelhos (NIEPCERON et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011; SU et al., 2003), visto que existem diferenças quanto à patogenicidade entre as espécies do parasito.

Existem poucos trabalhos utilizando técnicas de biologia molecular para identificação das espécies de *Eimeria* em coelhos, sendo este o primeiro trabalho realizado no Brasil.

O objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência de infecção por *Eimeria* spp., realizar a classificação molecular da espécie do parasito e relacionar a presença de infecção por *Eimeria* spp. com as diferentes categorias animais, em criações brasileiras de coelhos.

## **Material e Métodos**

### *Colheita e microscopia das amostras fecais*

Amostras fecais de coelhos foram colhidas em criações comerciais brasileiras destinadas à venda como animais de estimação, pesquisa, abate, matrizes e filhotes, sendo animais abaixo ou acima de quatro meses de idade considerados como jovens ou adultos, respectivamente.

Um total de 514 amostras foram coletadas em 21 granjas, no interior das gaiolas, no piso ou em bandejas coletoras localizadas embaixo das gaiolas. Cada amostra, constituída por aproximadamente 30g de fezes, foi coletada em frascos plásticos e armazenada em dicromato de potássio 5%.

As criações se localizam nos municípios de Bambuí (MG), São João Batista da Glória (MG), Campo Grande (MS), Jabotão dos Guararapes (PE), Curitiba (PR), Teresópolis (RJ), Eldorado do Sul (RS), Porto Alegre (RS), Santa Maria (RS), Araçatuba (SP), Araraquara (SP), Botucatu (SP), Campinas (SP), Guariba (SP), Jaboticabal (SP), Pradópolis (SP), Ribeirão Pires (SP) e Ribeirão Preto (SP).

As amostras foram colhidas em diferentes categorias, de acordo com o tipo de criação, idade, sexo e fase reprodutiva, como descrito a seguir: fêmea vazia, fêmea vazia mini coelho, fêmea gestante, fêmea gestante mini coelho,

fêmea lactante, fêmea lactante mini coelho, filhotes de 31 a 50 dias de idade, filhotes de mini coelhos de 31 a 50 dias de idade, filhotes de 51 a 80 dias de idade, macho adulto e macho mini coelho. As amostras de coelhos de 31 a 50 dias foram constituídas por um *pool* de amostras fecais referentes a vários animais alojados em uma mesma gaiola, enquanto que as amostras de coelhos adultos foram individuais.

As amostras foram mantidas por 48 h em frasco aberto, em temperatura ambiente, para aeração e esporulação dos oocistos de *Eimeria*, e posteriormente coadas e centrifugadas a 2.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento diluído em solução de Sheather e centrifugado a 800 g por 10 minutos. Dez mL do sobrenadante foram homogeneizados com 40 mL de Tween 20 0,1%, seguindo-se centrifugação por 10 minutos, a 2.000 g, com posterior descarte do sobrenadante e transferência de 2 mL do sedimento para um microtubo de 2 mL, para lavagem por centrifugação, a 2.000 g, por 3 minutos, até retirada total do dicromato de potássio. O sedimento resultante foi diluído em solução salina fosfatada (PBS) com antibióticos (100 U penicilina/mL + 100 µg gentamicina/mL + 100 µg estreptomicina/mL + 0,25 µg anfotericina B/mL) e armazenado a 4° C.

### *Exame Microscópico*

A pesquisa de oocistos de *Eimeria* foi realizada no sedimento resultante do processo de purificação das 514 amostras.

A avaliação semiquantitativa da presença de oocistos seguiu a seguinte nomenclatura: negativo, 0; grau 1, de 1 a 10 oocistos na lâmina; grau 2, de 1 a 5 oocistos por campo em objetiva de 20x; grau 3, de 5 a 20 oocistos por campo em objetiva de 20x; e grau 4, acima de 21 oocistos por campo em objetiva de 20x (FÉRES et al., 2009).

### *Extração do DNA*

Com o objetivo de identificar as espécies de *Eimeria*, amostras positivas à microscopia foram selecionadas de modo a realizar a reação em cadeia pela polimerase (PCR) em amostras representativas de todas as granjas, estado reprodutivo e faixas etárias. Dessa forma, foram selecionadas de 20 a 100% das amostras positivas pela microscopia, em cada categoria, o que resultou um total de 55 amostras para exame pela PCR: três fêmeas vazias, duas fêmeas vazias de mini coelho, cinco fêmeas gestantes, cinco fêmeas gestantes de mini coelho, cinco fêmeas lactantes, sete fêmeas lactantes de mini coelho, cinco machos, um macho de mini coelho, três filhotes de 31 a 50 dias, 11 filhotes de 31 a 50 dias de mini coelho e oito filhotes de 51 a 80 dias.

As amostras foram centrifugadas a 12.000 g, por 3 minutos, e o sobrenadante foi descartado. O sedimento, correspondente a aproximadamente 100 mg, foi diluído em 600 µL de tampão L1 (24g de tiocianato de guanidina; 20 mL de Tris-HCL 0,1M pH 6,4; 4,4 mL de EDTA 0,2M pH 8,0; 0,5 mL de triton X-100 e polivinilpirrolidona 1%), adicionado com 20 µL de isopropanol e 200 mg de pérolas de vidro (0,45 µm) e submetido à agitação em velocidade máxima, por 2 minutos, em Mini-BeadBeater (Biospec®). O microtubo foi incubado a 60°C por 2 horas, com agitação periódica a 1.000 rpm, por 5 segundos, a cada 5 minutos, seguindo-se centrifugação do microtubo a 12.000 g, por 5 minutos. O sobrenadante foi homogeneizado com 300 µL de isopropanol e o conteúdo transferido para uma coluna de sílica (Zymo-Spin™ IIC – Thermo Scientific) e centrifugado a 16.100 g, por um minuto, com descarte da solução do microtubo. 600 µL de tampão L2 (24 g de tiocianato de guanidina; 20 mL de 0,1M Tris-HCL pH 6,4; 4,4 mL de EDTA 0,2M pH 8,0) foram adicionados e centrifugados a 16.100 g, por um minuto, com descarte da solução do microtubo. 600µL do tampão L3 (etanol 70% em solução de NaCl 10mM, Tris-HCL 10mM e EDTA 0,5mM, pH 7,5) foram adicionados por duas vezes seguidas, com centrifugação a 16.100 g, por um minuto, e descarte da solução do microtubo. Após transferência da coluna

de sílica para um tubo de 1,5 mL, 50 µL de solução de eluição (Tris 10mM, EDTA 0,5mM, pH 9), previamente aquecida a 56°C, foi adicionada e o tubo foi centrifugado a 16.100 g, por um minuto, com colheita do DNA eluído da coluna de sílica e armazenamento a -20°C.

### *Reação em cadeia pela polimerase*

Inicialmente, foi realizada a PCR gênero-específica para determinação presuntiva de quais oligonucleotídeos iniciadores seriam utilizados na PCR espécie-específica, a partir da análise do tamanho do fragmento amplificado (Figura 1). A PCR gênero-específica foi realizada utilizando oligonucleotídeos iniciadores para amplificação de fragmento parcial da região espaçadora interna (ITS1) do gene do rRNA, ITS1-F 5'GGGAAGTTGCGTAAATAGA3' e ITS1-R 5'CTGCGTCCTTCATCGAT 3' (OLIVEIRA et al., 2011). As condições do ciclo compreenderam uma desnaturação inicial por 5 min a 95°C, 30 ciclos de 45 s a 95°C, 45 s a 54°C e 1 min a 72°C, e extensão final por 7 min a 72°C. Os fragmentos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. De acordo com o tamanho do fragmento de DNA amplificado, a amostra foi submetida à PCR espécie-específica (Tabela 1 (OLIVEIRA et al., 2011) e Figura 2).

Tabela 1 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para identificação espécie-específica de *Eimeria* em coelhos, utilizando a PCR

<b>Espécie de <i>Eimeria</i></b>	<b>Oligonucleotídeo iniciador</b>	<b>Sequência 5´ - 3´</b>
<i>E. coecicola</i>	Ecoe-ITS1-F	AGCTTGGTGGGTTCTTATTATTGTAC
	Ecoe-ITS1-R	CTAGTTGCTTCAACAAATCCATATCA
<i>E. exigua</i>	Eexi-ITS1-F	GAATAAGTTCTGCCTAAAGAGAGCC
	Eexi-ITS1-R	TATATAGACCATCCCCAACCCAC
<i>E. flavescens</i>	Efla-ITS1-F	GAATATTGTTGCAGTTTACCACCAA
	Efla-ITS1-R	CCTCAACAACCGTTCTTCATAATC
<i>E. intestinalis</i>	Eint-ITS1-F	TGTTTGTACCACCGAGGGAATA
	Eint-ITS1-R	AACATTAAGCTACCCTCCTCATCC
<i>E. irresidua</i>	Eirr-ITS1-F	TTTGGTGGGAAAAGATGATTCTAC
	Eirr-ITS1-R	TTTGCATTATTTTTAACCCATTCA
<i>E. magna</i>	Emag-ITS1-F	TTTACTTATCACCGAGGGTTGATC
	Emag-ITS1-R	CGAGAAAGGTAAAGCTTACCACC
<i>E. media</i>	Emed-ITS1-F	GATTTTTTTTCCACTGCGTCC
	Emed-ITS1-R	TTCATAACAGAAAAGGTAAAAAAGC
<i>E. perforans</i>	Eper-ITS1-F	TTTTATTTTCATTCCCATTTCATCC
	Eper-ITS1-R	CTTTTCATAACAGAAAAGGTCAAGCTTC
<i>E. piriformis</i>	Epir-ITS1-F	ACGAATACATCCCTCTGCCTTAC
	Epir-ITS1-R	ATTGTCTCCCCCTGCACAAC
<i>E. stiedai</i>	Esti-ITS1-F	GTGGGTTTTCTGTGCCCTC
	Esti-ITS1-R	AAGGCTGCTGCTTTGCTTC
<i>E. vej dovskyi</i>	Evej-ITS1-F	GTGCTGCCACAAAAGTCACC
	Evej-ITS1-R	GCTACAATTCATTCCGCC

#### *Sequenciamento dos fragmentos amplificados pela PCR*

Como os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR espécie-específica haviam sido utilizados somente em amostras puras de *Eimeria* spp. de coelhos (OLIVEIRA et al., 2011), para confirmação da especificidade da PCR espécie-específica em amostras fecais os fragmentos de DNA amplificados foram purificados com o QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) e submetidos ao sequenciamento bidirecional no Centro de Sequenciamento e Genômica Funcional da UNESP, Campus de Jaboticabal, utilizando o “ABI Prism® Dye Terminator 3.1” (Applied Biosystems), em sequenciador

automático ABI 3730XL (Applied Biosystems). As reações de sequenciamento foram realizadas nas duas direções, com os oligonucleotídeos iniciadores da PCR espécie-específica.

As sequências consenso foram determinadas utilizando o software CodonCode Aligner v. 2.0.4 (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts, USA), considerando-se somente os nucleotídeos com qualidade acima de 20, e alinhadas com sequências homólogas publicadas no *GenBank*, utilizando o software Clustal X (THOMPSON et al. 1997) e o *Bioedit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999).

### *Clonagem molecular*

A clonagem molecular de fragmentos de DNA amplificados pela PCR espécie-específica foi realizada quando não foi possível a identificação da espécie pelo sequenciamento, em função da pequena quantidade de DNA amplificado.

Bactérias liofilizadas (*E. coli* JM 107; Thermo Scientific®) foram ressuspendidas em dois mililitros de meio SOC Medium (Sigma-Aldrich®). Para transformá-las em bactérias competentes, foi utilizado o TransformAid Bacterial Transformation Kit (Thermo Scientific®), seguindo o seguinte protocolo: 100 µL de meio SOC, contendo as bactérias, foram adicionados a dois mililitros de meio C-Medium, com incubação por 18 horas, a 37°C, a 150 rpm. Após, 150 µL da cultura de bactérias foram adicionados a 1,5 mL de meio C-Medium e incubadas a 37°C por 30 minutos. O material foi centrifugado a 12.000 *g* por um minuto e o sobrenadante foi descartado. Assim, as células bacterianas foram ressuspendidas em 300 µL de solução-T e incubadas por cinco minutos em gelo. Após este período, foram centrifugadas novamente a 12.000 *g*, por um minuto, com descarte do sobrenadante. Nova ressuspensão das células foi realizada em 120 µL de solução-T com subsequente incubação, durante cinco minutos, em gelo. Nesse momento, as bactérias já estavam competentes e o

vetor contendo o inserto foi adicionado (cinco  $\mu\text{L}$  do inserto + vetor para cada 50  $\mu\text{L}$  de preparado de bactérias), com incubação em gelo, por sete minutos. Após esse período, houve plaqueamento em meio Luria-Bertani sólido (meio LB) (Sigma-Aldrich®).

A ligação do inserto no vetor foi realizada utilizando-se o *CloneJET PCR Cloning Kit* (Thermo Scientific®), adicionando sete microlitros do produto de PCR, 10  $\mu\text{L}$  de 2x tampão de reação e um microlitro de *DNA blunting enzyme*. As amostras foram agitadas brevemente em vortex e incubadas a 70°C, por cinco minutos, seguindo-se a incubação em gelo até a próxima etapa, quando foram adicionados, a cada reação, um microlitro de *PJET 1.2/blunting Cloning Vector* (50 ng/ $\mu\text{L}$ ) e um microlitro de T4 ligase, totalizando 20  $\mu\text{L}$  de volume final. Os microtubos contendo a solução do inserto e vetor foram novamente agitados brevemente em vortex e incubados, em temperatura ambiente, por 30 minutos, até o momento de serem adicionados às bactérias competentes.

Após transformação das bactérias e inserção do vetor contendo o inserto, elas foram plaqueadas em meio LB sólido enriquecido com ampicilina (50 mg/ml) e a cultura foi incubada por 18 h, para crescimento das colônias. Após esse período, observou-se o crescimento de colônias na placa e elas foram selecionadas (uma colônia por tubo, cinco colônias de cada amostra), as quais foram ressuspensas novamente em 400  $\mu\text{L}$  de meio Luria-Bertani líquido (LB broth) (Sigma-Aldrich®) com ampicilina (50 mg/mL) e incubadas a 37°C por quatro horas.

A análise da presença e orientação do inserto de DNA no vetor foi realizada por meio de PCR realizada diretamente da colônia presente em meio sólido, utilizando 12,5  $\mu\text{L}$  de JumpStart® Taq ReadyMix® (Sigma-Aldrich), os oligonucleotídeos iniciadores (*pJET 1.2 Forward Sequencing Primer* e *pJET 1.2 Reverse Sequencing Primer*) presentes no *CloneJET PCR Cloning Kit* (Thermo Scientific®), na concentração de 10 pmol/ $\mu\text{L}$ . Uma colônia de cada amostra foi ressuspensa em 20  $\mu\text{L}$  dessa solução. O ciclo utilizado para amplificação consistiu em desnaturação inicial do DNA a 95°C por três minutos, seguida de

25 ciclos, cada um consistindo em desnaturação a 94°C por 30 segundos, 30 segundos de anelamento a 60°C e 30 segundos de extensão a 72°C, com extensão final a 72°C, por três minutos. O produto da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio.

A identificação da espécie de *Eimeria* foi realizada por sequenciamento do plasmídeo, nas duas direções, com os oligonucleotídeos iniciadores fornecidos com o *CloneJET PCR Cloning Kit* (Thermo Scientific®).

### *Análise estatística*

A análise estatística descritiva foi efetuada para o cálculo de porcentagem e Teste de Qui Quadrado para verificar associação entre as variáveis. Os testes de Kruskal-Wallis e comparação múltipla de Dunn foram utilizados para a avaliação semiquantitativa e do tipo de infecção. O nível de significância adotado foi de 5% e as análises foram realizadas no programa GraphPad Prisma 6 e SAS 9.0.

## **Resultados e Discussão**

A ocorrência de *Eimeria* spp., determinada por meio da microscopia, foi de 19,45% (100/514) considerando todas as amostras, sendo de 33,17% (69/208) em mini coelhos e 10,13% (31/306) em coelhos de porte médio e grande, com diferença estatisticamente significativa entre as duas categorias ( $X^2 = 41,96$ ;  $p < 0,001$ ). Este fato provavelmente está relacionado às condições de manejo empregadas, visto que, em criações de mini coelhos, que apresentam número menor de animais, a utilização de vassoura de fogo e a limpeza dos ninhos não são feitas de forma rotineira. Em criações comerciais de animais de corte são comuns o uso de vassoura de fogo e a retirada do ninho para lavagem. Jing et al. (2012) também observaram que em granjas

com número menor de animais foi observada alta prevalência (61,4%; 43/70) de infecção por *Eimeria*, quando comparadas às granjas maiores (34,2%; 41/120).

Foram observadas diferenças significativas na ocorrência de *Eimeria* entre coelhos adultos (14,81%; 65/439) quando comparados aos coelhos jovens (46,67%; 35/75) ( $X^2 = 41,49$ ;  $p < 0,0001$ ) (Tabela 2). Diferenças significativas também foram encontradas em Taiwan, China e Arábia Saudita, com prevalência para adultos de 27,9% a 48,5%, enquanto para coelhos jovens a prevalência foi de 32,24% a 97,6% (AL-MATHAL, 2008; JING et al., 2012; LI et al., 2010; QIAO et al., 2012).

Tabela 2 - Ocorrência de oocistos de *Eimeria* em amostras fecais de coelhos de acordo com a idade e sexo

Idade	Sexo	Nº de amostras	Positivos à Microscopia (n)	Positivos/total examinados (%)	Positivos/total por faixa etária (%)
Adulto	Macho	112	6	6/112 (5,36) <sup>A</sup>	65/439 (14,81) <sup>a</sup>
Adulto	Fêmea	327	59	59/327 (18,04) <sup>B</sup>	
Jovens até 50 dias		55	27	27/55 (49,09)	35/75 (46,67) <sup>b</sup>
Jovens de 51-80 dias		20	8	8/20 (40)	
Total		514	100		

Sobrescritos minúsculos indicam diferenças significativas ( $p < 0,0001$ ) entre coelhos adultos (> 4 meses) e jovens (< 4 meses).

Sobrescritos maiúsculos indicam diferenças significativas ( $p = 0,001$ ) entre machos e fêmeas.

A maior suscetibilidade de animais mais jovens ou a imunidade adquirida por animais mais velhos (PAKANDL et al., 2008) estão provavelmente relacionadas às diferenças na prevalência de eimeriose entre diferentes faixas etárias (JING et al., 2012; QIAO et al., 2012). Nenhuma diferença significativa foi observada entre coelhos com idade inferior a 50 dias ou com idade entre 51 a 80 dias ( $X^2 = 0,49$ ;  $p = 0,48$ ).

Li et al. (2010) não observaram diferenças na ocorrência de infecção por *Eimeria* spp. em relação ao sexo, diagnosticando 28% (26/96) de positividade em machos e 34,4% (32/93) em fêmeas, diferindo desta pesquisa, que mostrou

diferença significativa entre machos (5,36%; 6/112) e fêmeas (18,04%; 59/327) ( $\chi^2 = 10,64$ ;  $p = 0,001$ ). Na Índia, Arábia Saudita e Irã a prevalência encontrada para machos foi de 20,25% a 44,2% e para fêmeas de 30,97% a 55,8% (AL-MATHAL, 2008; HIRANI; SOLANKI, 2010; YAKHCHALI; TEHRANI, 2007).

Ao comparar cada categoria reprodutiva presente nas granjas, também foram observadas diferenças significativas ( $\chi^2 = 54,21$ ;  $p < 0,0001$ ). Maior ocorrência foi observada em coelhos jovens e fêmeas lactantes (46,67% (35/75) e 24,47% (23/94), respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 - Ocorrência de oocistos de *Eimeria* e distribuição dos escores de eliminação de oocistos em amostras fecais de coelhos de acordo com a categoria animal

Categoria	Nº amostras	Positivos à microscopia	Escore de eliminação fecal de oocistos*				
			0	1	2	3	4
Macho <sup>A</sup>	112	6 (5,36) <sup>a</sup>	106	5	0	1	0
Fêmea vazia <sup>AB</sup>	45	5 (11,11) <sup>ab</sup>	40	3	2	0	0
Fêmea gestante <sup>BC</sup>	188	31 (16,49) <sup>b</sup>	157	22	4	5	0
Fêmea lactante <sup>C</sup>	94	23 (24,47) <sup>b</sup>	71	18	0	4	1
Filhotes até 50 dias <sup>D</sup>	55	27 (49,09) <sup>c</sup>	28	9	5	5	8
Filhotes de 51-80 dias <sup>D</sup>	20	8 (40) <sup>c</sup>	12	3	0	2	3
Total	514	100	414	60	11	17	12

Sobrescritos minúsculos indicam diferenças significativas ao teste de Qui Quadrado. Sobrescritos maiúsculos, na categoria, indicam diferenças significativas pelo teste de Qui Quadrado para a avaliação semiquantitativa dos oocistos.

\*Número de amostras classificadas por escore de eliminação de oocistos. Negativo: 0; 1 a 10 oocistos na lâmina: 1; 1 a 5 oocistos por campo na objetiva de 20x: 2; 5 a 20 oocistos por campo na objetiva de 20x: 3; acima de 21 oocistos por campo na objetiva de 20x: 4.

Existe um padrão na excreção de oocistos em coelhas utilizadas para reprodução (POŁOZOWSK, 1993), com ocorrência de dois picos após o parto, sendo o primeiro no período perinatal e o segundo no período que antecede o desmame dos filhotes, o que explica a alta positividade encontrada neste experimento, em fêmeas lactantes (24,47%) e em fêmeas gestantes (16,49%), enquanto que em fêmeas vazias a positividade foi de 11,11% (Tabela 3). Papeschi et al. (2013) também avaliaram a excreção de oocistos em fêmeas ao primeiro e segundo parto, que ocorreu do 6º ao 12º dia pós-parto e do 18º ao

24º dia pós-parto, enquanto no segundo parto a excreção iniciou ao 7º dia pós-parto. A maior excreção de oocistos em fêmeas pós-parto é devida às condições de estresse e mudanças hormonais que ocorrem durante os períodos de gestação, parto e lactação, que podem levar à queda na resistência às infecções por parasitas (MARAI et al., 2010).

Quanto à avaliação semiquantitativa da eliminação de oocistos (Tabela 3), observa-se que a maioria dos animais positivos apresentaram de 1 a 10 oocistos por lâmina (grau 1) ( $X^2 = 18,64$ ;  $p = 0,009$ ). Fêmeas gestantes, lactantes e filhotes são as categorias que apresentaram mais oocistos ( $X^2 = 110,55$ ;  $p < 0,0001$ ).

A partir dos 22 dias de idade, os láparos se tornam susceptíveis à infecção por *Eimeria* (PAKANDL, 2009; PAKANDL; HLÁSKOVÁ, 2007). Nessa fase, os coelhos começam a consumir alimentos sólidos (PAKANDL, 2009), iniciando as alterações no ambiente intestinal e aumentando a capacidade dos esporozoítos de penetrarem nas células hospedeiras (PAKANDL, 2009; PAKANDL; HLÁSKOVÁ, 2007). A excreção de oocistos em filhotes se inicia no 39º dia de idade e termina entre 81 e 109 dias de idade (PAPESCHI et al., 2013).

A ocorrência de eimeriose em amostras fecais de coelhos providos de criatórios que não utilizavam a vassoura de fogo (42,86%; 96/224) foi estatisticamente superior ( $X^2 = 138,8$ ;  $p < 0,0001$ ) à diagnosticada nos animais onde era empregada esta técnica de desinfecção (1,38%; 4/290).

Das 100 amostras positivas à microscopia, 55 foram analisadas pela PCR, para identificação das espécies de *Eimeria*. A Figura 1 apresenta o resultado da PCR gênero-específica utilizada como triagem para realização posterior da PCR espécie-específica, de acordo com o número de pares de base (pb) dos fragmentos amplificados. Os produtos da amplificação variam de 400 pb a 600 pb (OLIVEIRA et al., 2011).

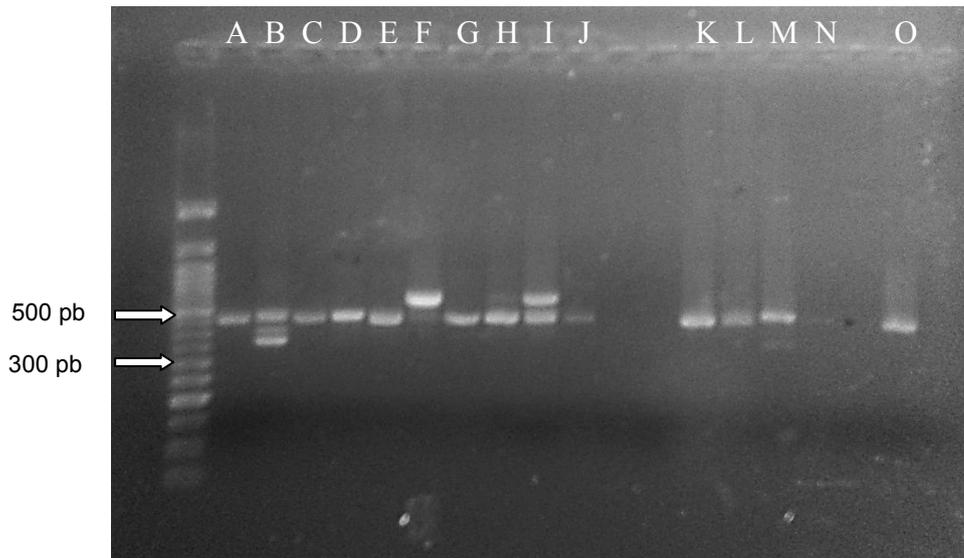


FIGURA 1 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% de fragmentos amplificados pela PCR para detecção de *Eimeria* spp. em amostras fecais de coelhos, utilizando oligonucleotídeos iniciadores gênero-específicos. A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N: 450 a 500 pb (*E. exigua*, *E. flavescens*, *E. intestinalis*, *E. magna*, *E. media*, *E. perforans* ou *E. piriformis*). F e I: > 500 pb (*E. coecicola* ou *E. stiedai*) B e M: < 450 pb (*E. irresidua* ou *E. vej dovskyi*).

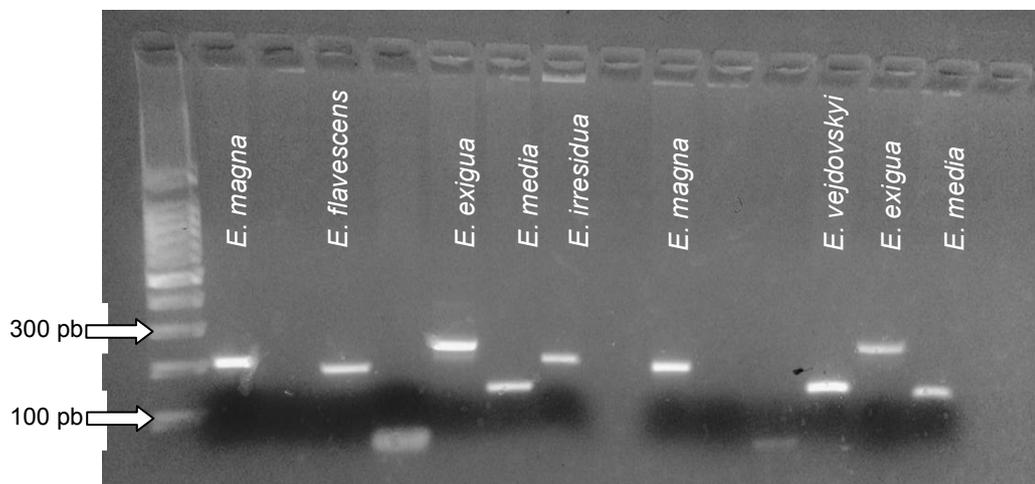


FIGURA 2 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% de fragmentos amplificados pela PCR para detecção de *Eimeria* em amostras fecais de coelhos, utilizando oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos.

A PCR espécie-específica resultou na identificação de todas as espécies que parasitam coelhos, com exceção de *E. coecicola*. As espécies identificadas foram as pouco patogênicas *E. exigua* (7,27%; 7/55), *E. perforans* (36,36%;

20/55) e *E. vej dovskyi* (7,27%; 7/55); as patogênicas *E. irresidua* (16,36%; 9/55), *E. magna* (50,91%; 28/55), *E. media* (3,64%; 2/55) e *E. piriformis* (20%; 11/55) e as altamente patogênicas *E. flavescens* (61,82%; 34/55), *E. intestinalis* (16,36%; 9/55) e *E. stiedai* (7,27%; 7/55) (Tabela 4, Figura 2).

Tabela 4 - Espécies de *Eimeria* identificadas de acordo com o local de origem das amostras fecais de coelhos

Estado	Cidade	% positivas (positivas/examinadas)	<i>Eimeria</i> spp.
MG	BambuÍ	0 (0/5)	
MG	São João Batista da Glória	0 (0/5)	
MS	Campo Grande	5 (1/20)	<i>E. flavescens</i> , <i>E. magna</i>
PE	Jaboatão dos Guararazes	12,5 (1/8)	<i>E. media</i>
PR	Curitiba Granja 1	0 (0/29)	
PR	Curitiba Granja 2	20 (1/5)	<i>E. exigua</i> , <i>E. flavescens</i> , <i>E. intestinalis</i> , <i>E. magna</i> , <i>E. media</i> , <i>E. perforans</i> , <i>E. stiedai</i>
RJ	Teresópolis	0 (0/19)	
RS	Eldorado do Sul	12,5 (1/8)	<i>E. exigua</i> , <i>E. flavescens</i> , <i>E. perforans</i> .
RS	Porto Alegre	4,3 (1/23)	<i>E. flavescens</i> , <i>E. intestinalis</i> , <i>E. magna</i>
RS	Santa Maria Granja 1	4,3 (1/23)	<i>E. exigua</i> , <i>E. magna</i>
RS	Santa Maria Granja 2	0 (0/6)	
SP	Araçatuba	50 (2/4)	<i>E. exigua</i> , <i>E. intestinalis</i> , <i>E. magna</i>
SP	Araraquara Granja 1	25 (2/8)	<i>E. magna</i>
SP	Araraquara Granja 2	0 (0/4)	
SP	Botucatu	0 (0/76)	
SP	Campinas	0 (0/76)	
SP	Guariba	11,8 (2/17)	<i>E. flavescens</i> , <i>E. magna</i> , <i>E. perforans</i>
SP	Jaboticabal	42,86 (9/21)	<i>E. flavescens</i> , <i>E. irresidua</i> , <i>E. magna</i> , <i>E. perforans</i> , <i>E. stiedai</i>
SP	Pradópolis	87,5(7/8)	<i>E. exigua</i> , <i>E. flavescens</i> , <i>E. intestinalis</i> , <i>E. irresidua</i> , <i>E. magna</i> , <i>E. perforans</i> , <i>E. piriformis</i> , <i>E. stiedai</i> , <i>E. vej dovskyi</i>
SP	Ribeirão Pires	0 (0/3)	
SP	Ribeirão Preto	49,3 (72/146)	<i>E. flavescens</i> , <i>E. intestinalis</i> , <i>E. irresidua</i> , <i>E. magna</i> , <i>E. perforans</i> , <i>E. piriformis</i> <i>E. stiedai</i> , <i>E. vej dovskyi</i>
<b>Total</b>	<b>21</b>	<b>19,5 (100/514)</b>	

Diferentes ocorrências foram verificadas no Brasil e no mundo que podem estar relacionadas ao tipo de técnica utilizada para identificação, manejo local, clima e alimentação. No Brasil, alguns autores relataram a ocorrência de *Eimeria* spp. utilizando análise morfológica de oocistos, com positividade variando de 71,22 a 94,16% (ARNONI, 1980; MUNDIN; BARDON, 1989; SANTOS, 1984; SILVA et al., 2006). Cardoso e Guimarães Júnior (1993) identificaram, no norte do Paraná, as espécies *E. coecicola*, *E. flavescens*, *E. intestinalis*, *E. irresidua*, *E. magna*, *E. media*, *E. perforans* e *E. stiedai*, com 72,78% (79/109) das amostras positivas para pelo menos uma dessas espécies.

Em países como Benin, China, Índia, Irã, Quênia e Taiwan, a positividade para oocistos de *Eimeria* variou de 29 a 85%, valores mais altos que o encontrado no presente estudo (FAROUGOU et al., 2004; HIRANI; SOLANKI, 2010; JING et al. 2012; LI et al. 2010; OKUMU et al., 2014; YAKHCHALI; TEHRANI, 2007).

A espécie *E. coecicola*, que não foi encontrada neste trabalho, foi relatada em diversos países como Benin, Índia, China, Taiwan e Quênia (FAROUGOU et al., 2004; HIRANI; SOLANKI, 2010; JING et al., 2012; LI et al., 2010; OKUMU et al., 2014). As espécies pouco patogênicas, *E. exigua* e *E. perforans*, também foram encontradas em Benin, China, Taiwan, Quênia e Irã, sendo que *E. exigua* não foi encontrada no Quênia e no Irã (FAROUGOU et al., 2004; JING et al., 2012; LI et al., 2010; OKUMU et al., 2014; YAKHCHALI; TEHRANI, 2007). A espécie *E. vej dovskyi* foi encontrada também, além deste trabalho, somente em Benin (FAROUGOU et al., 2004).

As espécies patogênicas *E. irresidua*, *E. magna*, *E. media* e *E. piriformis* foram todas encontradas em Benin, China e Irã; *E. magna* e *E. piriformis* foram encontradas também na Índia, Taiwan e Quênia e *E. media* nesses países, exceto Quênia (FAROUGOU et al., 2004; HIRANI; SOLANKI, 2010; JING et al., 2012; LI et al., 2010; OKUMU et al., 2014). Todas as espécies altamente patogênicas *E. flavescens*, *E. intestinalis* e *E. stiedai* foram encontradas em Benin e na China, enquanto *E. flavescens* também foi relatada no Quênia, *E.*

*intestinalis* na Índia e Quênia e *E. stiedai* no Irã (FAROUGOU et al., 2004; HIRANI; SOLANKI, 2010; JING et al., 2012; LI et al., 2010; OKUMU et al., 2014).

Infecção mista ocorreu em 10 granjas (47,62%) (Tabela 4). Em uma mesma granja foram observados coelhos com infecções duplas, triplas, quádruplas, sêxtuplas e sétuplas. A maioria das granjas apresentou animais com infecções individuais, duplas ou triplas, dados também encontrados por Li et al. (2010). O presente trabalho mostra a evidência de que infecções mistas por *Eimeria* ocorrem principalmente em granjas cujo manejo sanitário é precário e onde não existe uso de vassoura de fogo, que é indicada para eliminação de coccídios do ambiente.

A presença de três a seis espécies por amostra também foi verificada no norte do Paraná por Cardoso e Guimarães Junior (1993). Na China, Arábia Saudita e Irã, a maioria das infecções encontradas foram duplas, triplas, quádruplas e quádruplas (ABDEL-BAKI; AL-QURAIHY, 2013; JING et al., 2012; YAKHCHALI; TEHRANI, 2007).

Os grupos que apresentaram maior número de espécies nas amostras fecais são os filhotes e as fêmeas lactantes (Tabela 5). Houve diferenças significativas entre os tipos de infecção ( $\chi^2 = 26,37$ ;  $p < 0,001$ ).

Tabela 5 - Ocorrência de infecção mista pelas diferentes espécies de *Eimeria* diagnosticadas em amostras fecais de coelhos

Categoria animal	Infecção					
	Individual	Dupla	Tripla	Quíntupla	Sêxtupla	Sétupla
Fêmea vazia	2	1	0	0	0	0
Fêmea vazia mini	1	0	1	0	0	0
Fêmea gestante	1	3	1	0	0	0
Fêmea gestante mini	1	3	1	0	0	0
Fêmea lactante	1	1	2	0	1	0
Fêmea lactante mini	6	1	0	0	0	0
Filhote mini 31-50 dias	4	2	3	1	0	1
Filhote 31-50	1	1	1	0	0	0
Filhote 51-80 dias	1	1	3	1	0	2
Macho	0	4	0	1	0	0
Macho mini	0	1	0	0	0	0
Total	18 <sup>ab</sup>	18 <sup>a</sup>	12 <sup>abc</sup>	3 <sup>bc</sup>	1 <sup>c</sup>	3 <sup>bc</sup>

Sobrescritos minúsculos indicam diferenças significativas pelo teste de Dunn ( $p < 0,001$ ).

Położowsk (1993) encontrou nove espécies de *Eimeria* em amostras fecais de coelhos jovens com até três meses de idade e três espécies em coelhos em idade reprodutiva. Neste estudo, foi verificado que os coelhos jovens com até três meses de idade estavam infectados com 10 espécies de *Eimeria*; as fêmeas lactantes com oito espécies, as fêmeas gestantes com cinco espécies e os machos com sete espécies (Tabela 6).

Tabela 6 - Identificação de *Eimeria* sp. pela reação em cadeia da polimerase espécie-específica, de acordo com as categorias de coelhos

<i>Eimeria</i> <i>spp.</i>	% (amostras positivas/ amostras examinadas pela PCR)											
	Fêmea vazia	Fêmea vazia mini	Fêmea gestante	Fêmea gestante mini	Fêmea lactante	Fêmea lactante mini	Filhote mini 31-50 dias	Filhote 31-50 dias	Filhote 51-80 dias	Macho	Macho mini	Total
<i>E. exigua</i>	33,33 (1/3)	0	0	0	0	0	9,09 (1/11)	0	37,5 (3/8)	40 (2/5)	0	7
<i>E. flavescens</i>	0	20 (1/5)	80 (4/5)	80 (4/5)	60 (3/5)	42,86 (3/7)	54,54 (6/11)	33,33 (1/3)	87,5 (7/8)	80 (4/5)	100 (1/1)	34
<i>E. intestinalis</i>	0	20 (1/5)	0	0	20 (1/5)	0	18,18 (2/11)	33,33 (1/3)	75 (6/8)	20 (1/5)	0	12
<i>E. irresidua</i>	33,33 (1/3)	0	0	20 (1/5)	40 (2/5)	28,57 (2/7)	27,27 (3/11)	0	0	0	0	9
<i>E. magna</i>	66,66 (2/3)	20 (1/5)	40 (2/5)	0	20 (1/5)	42,86 (3/7)	72,72 (8/11)	100 (3/3)	62,5 (5/8)	20 (1/5)	0	26
<i>E. media</i>	0	20 (1/5)	0	0	0	0	9,09 (1/11)	0	0	0	0	2
<i>E. perforans</i>	0	0	80 (4/5)	80 (4/5)	60 (3/5)	0	18,18 (2/11)	0	75 (6/8)	20 (1/5)	0	20
<i>E. piriformis</i>	0	0	0	0	60 (3/5)	0	0	0	37,5 (3/8)	20 (4/5)	100 (1/1)	11
<i>E. stiedai</i>	0	0	0	0	20 (1/5)	0	27,27 (3/11)	0	25 (2/8)	20 (1/5)	0	7
<i>E. vej dovskyi</i>	0	0	0	20 (1/5)	20 (1/5)	0	9,09 (1/11)	33,33 (1/3)	12,5 (1/8)	0	0	5
<b>Total de amostras</b>	40	5	104	84	45	49	33	22	20	75	37	514
<b>Total de amostras positivas pela microscopia</b>	3	2	6	25	5	18	23	4	8	5	1	100
<b>%</b>	7,50	40,00	5,77	29,76	11,11	36,73	69,70	18,18	40,00	6,67	2,70	19,45

## Conclusões

Foram identificadas 10 espécies de *Eimeria* em granjas brasileiras de coelhos. Em 10 criações foram diagnosticadas infecções mistas com diferentes espécies de *Eimeria* em um mesmo animal. A maior ocorrência para *Eimeria* foi encontrada em fêmeas gestantes, lactantes e em filhotes. Granjas que utilizam vassoura de fogo apresentam menor positividade para *Eimeria* spp..

## REFERÊNCIAS

ABDEL-BAKI, A-A. S.; AL-QURAI SHY, S. Prevalence of coccidia (*Eimeria* spp.) infection in domestic rabbits, *Oryctolagus cuniculus*, in Riyadh, Saudi Arabia. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 45, n. 5, p. 1329-1333, 2013.

AL-MATHAL, E. M. Hepatic Coccidiosis of the Domestic Rabbit *Oryctolagus cuniculus domesticus* L. in Saudi Arabia. **World Journal of Zoology**, v. 3, n. 1, p. 30-35, 2008.

ARNONI, J. V.; RANIER, D. S. S.; COIMBRA, A. M. *Eimeria* spp. em coelhos domésticos (*Oryctolagus cunicullus*). In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 17., Fortaleza. **Anais...** Brasília: EMBRAPA, 1980. p. 310.

BHAT, T. K.; JITHENDRAN, K. P.; KURADE, N. P. Rabbit coccidiosis and its control: A review. **World Rabbit Science**, v. 4, p. 37-41, 1996.

CARDOSO, M. A.; GUIMARÃES JÚNIOR, J. S. Ocorrência de *Eimeria* spp. em coelhos domésticos (*Oryctolagus cuniculus*) em quatro municípios no norte do Paraná. **Semina: Ciência Agrárias**, Londrina, v. 14, p. 12-16, 1993.

COUDERT, P. Intestinal coccidial infections in the rabbit: Comparison of the pathogenicity of *Eimeria* spp. **Comptes Rendus Hebdomadaires de Séances de L'Académie de Sciences**, v. 282, n. D24, p. 2219-2222, 1976.

COUDERT, P.; LICOIS, D.; DROUET-VIARD, F. et al. Coccidiosis. In: ROSELL J. M. (Ed.). **Enfermedades del conejo**. Madrid: Mundi-Prensa, v.II, 2000. p.219-234.

DKHIL, M. A.; AL-QURASHY, S.; ABDEL-BAKI, A-A.; DELIC, D.; WUNDERLICH, F. *Eimeria coecicola*: Spleen response of *Oryctolagus cuniculus*. **Experimental Parasitology**, v. 133, p. 137-143, 2013.

DROUET-VIARD, F.; COUDERT, P.; LICOIS, D.; BOIVIN, M. Acquired protection of the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) against coccidiosis using a precocious line of *Eimeria magna*, effect of vaccine dose and age at vaccination. **Veterinary Parasitology**, v. 69, p. 197-201, 1997.

EL-SHAHAWI, G. A.; EL-FAYOMI, H. M.; ABDEL-HALEEM, H. M. Coccidiosis of domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in Egypt: light microscopic study. **Parasitology Research**, v. 110, p. 251–258, 2012.

FAROUGOU, S.; KOUTINHOVIN, B.; KPODEKON, M.; DOUGNON, P.; DJAGO, Y.; ADEHAN, R.; AHLINCOU, F. Gastro-intestinal and external parasitose of rabbit in Benin. In: WORLD RABBIT CONGRESS, 8., 2004, Puebla, Mexico. **Anais...** Puebla, 2004. p. 532-539.

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.

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, p. 95-98, 1999.

HIRANI, N. D.; SOLANKI, J. B. Prevalence of coccidia in rabbit in middle Gujarat. **Indian Journal of Field Veterinarians**, v. 5, n. 3, p. 37-38, 2010.

JING, F.; YIN, G.; LIU, X.; SUO, X.; QIN, Y. Large-scale survey of the prevalence of *Eimeria* infections in domestic rabbits in China. **Parasitology Research** v. 110, 1495L 500, 2012.

KVICEROVA, J.; PAKANDL, M.; HYPŠA, V. Phylogenetic relationships among *Eimeria* spp. (Apicomplexa, Eimeriidae) infecting rabbits: evolutionary significance of biological and morphological features. **Parasitology**, v. 135, p. 443–452, 2008.

LI, MING-HSIEN; HUANG, HAI-I; OOI, HONG-KEAN. Prevalence, infectivity and oocyst sporulation time of rabbit-coccidia in Taiwan. **Tropical Biomedicine**, v. 27, n. 3, p. 424–429, 2010.

LICOIS, D. Comments on the article of Ming-Hsien Li and Hong-Kean Ooi Fecal occult blood manifestation of intestinal *Eimeria* spp. infection in rabbit. **Veterinary Parasitology**, v. 161, p. 327–329, 2009.

LICOIS, D. Domestic rabbit enteropathies. In: WORLD RABBIT CONGRESS, 8., 2004, Puebla, Mexico. **Anais...** Puebla, 2004. p. 385-403.

LONG, P. L.; JOYNER, L. P. Problems in the identification of species of *Eimeria*. **Journal Protozoology**, v. 31, p. 535–541, 1984.

MARAI, I. F. M.; ASKAR, A. A.; MCKROSKEY, R. A.; TENA, E. Replacement in rabbit herds. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 12, p. 431-444, 2010.

MUNDIN, M. J. S.; BARDON, E. Avaliação semestral de coccídios intestinal em coelhos domésticos (*Oryctolagus cuniculus*) com diferentes condições de manejo e faixa etária, em Uberlândia, Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 6., 1989, Bagé. **Anais... Bagé: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, 1989. p. 117.

NIEPCERON, A.; AUDINET-POUVREAU, B.; GARRIDO, S.; LICOIS, D. Développement d'un outil de diagnostique sensible (PCR) pour détecter spécifiquement *Eimeria intestinalis*. In: JOURNÉES DE LA RECHERCHE CUNICOLE, 13., 2009, Le Mans, France. 2009. **Anais... Le Mans**, 2009. p. 211-214.

OLIVEIRA, U. C.; FRAGA, J. S.; LICOIS, D.; PAKANDL, M.; GRUBER, A. Development of molecular assays for the identification of the 11 *Eimeria* species of the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). **Veterinary Parasitology**, v. 176, p. 275-280, 2011.

ONCEL, T.; GULEGEN, E.; SENLIK, B.; BAKIRCI, S. Intestinal coccidiosis in Angora rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) caused by *Eimeria intestinalis*, *Eimeria perforans* and *Eimeria coecicola*. **YYU Veteriner Fakultesi Dergisi**, v. 22, n. 1, p. 27-29, 2011.

OKUMU, P. O.; GATHUMBI, P. K.; KARANJA, D. N.; MANDE, J. D.; WANYOIKE, M. M.; GACHUIRI, C. K.; KIARIE, N.; MWANZA, R. N.; BORTER, D. K. Prevalence, pathology and risk factors for coccidiosis in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in selected regions in Kenya. **Veterinary Quarterly**, v. 34, n. 4, p. 205-210, doi: 10.1080/01652176.2014.978044, 2014.

PAKANDL, M. Coccidia of rabbit: a review. **Folia Parasitologica**, v. 56, n. 3, p. 153-166, 2009.

PAKANDL, M.; HLÁSKOVÁ, L. The reproduction of *Eimeria flavescens* and *Eimeria intestinalis* in suckling rabbits. **Parasitology Research**, v.101, p.1435-1437, 2007.

PAKANDL, M.; HLASKOVA, L.; POPLSTEIN, M.; CHROMA, V.; VODICKA, T.; SALAT, J.; MUCKSOVA, J. Dependence of the immune response to coccidiosis on the age of rabbit suckling. **Parasitology Research**, v. 103, p. 1265–1271, 2008.

PAPESCHI, C.; FICHI, G.; PERRUCCI, S. Oocyst excretion pattern of three intestinal *Eimeria* species in female rabbits. **World Rabbit Science**, v. 21, p. 77-83, 2003.

PATTON, N. M.; HAGEN, K. W.; GORHAM, J. R.; FLATT, R. E. **Domestic Rabbits: Diseases and Parasites**. Washington: USDA, 2000, p. 490.

PEETERS, J. E.; POHL, P.; CHARLIER, G. Infectious agents associated with diarrhoea in commercial rabbits. **Annales de Recherches Veterinaires**, Brussels, v. 15, n. 3, p. 335-340, 1984.

POŁOZOWSKI, A. Coccidiosis of rabbits and its control. **Wiadomości Parazytologiczne**, v. 39, p. 13-28, 1993.

QIAO, J.; MENG, Q. L.; CAI, X. P.; TIAN, G. F.; CHEN, C. F.; WANG, J. W.; WANG, W. S.; ZHANG, Z. C.; CAI, K. J.; YANG, L. H. Prevalence of coccidiosis in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Northwest China. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 11, n. 4, p. 517-520, 2012.

RAZAVI, S. M.; ORYAN, A.; RAKHSHANDEHROO, E.; MOSHIRI, A.; MOOTABI, A. A. *Eimeria* species in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Fars province, Iran. **Tropical Biomedicine**, v. 27, n. 3, p. 470–475, 2010.

SANTOS, M. J. **Frequência e identificação de coccídios em coelhos domésticos (*Oryctolagus cuniculus*) em quatro localidades do estado de Minas Gerais**. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1984, 64p.

SILVA, A. S.; CEOLIN, L. V.; MONTEIRO, S. G. Endoparasitoses de coelhos criados em diferentes sistemas de manejo. **Revista da FZVA, Uruguiana**, v.13, n.2, p. 127-136, 2006.

SU, Y. C.; FEI, A. C.; TSAI, F. M. Differential diagnosis of five avian *Eimeria* species by polymerase chain reaction using *primers* derived from the internal transcribed spacer 1 (ITS1) Sequence. **Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 221–227, 2003.

VITOVEC, J.; PAKANDL, M. The pathogenicity of rabbit coccidium *Eimeria coecicola* Cheissin, 1947. **Folia Parasitologica (Praha)**, v. 36, p. 289–293, 1989.

YAN, W.; WANG, W.; WANG, T.; SUO, X.; QIAN, W.; WANG, S.; FAN, D. Simultaneous identification of three highly pathogenic *Eimeria* species in rabbits using a multiplex PCR diagnostic assay based on ITS1-5.8S rRNA-ITS2 fragments. **Veterinary Parasitology**, v. 193, p. 284-288, 2013.

YAKHCHALI, M.; TEHRANI, A. A. Eimeriosis and pathological findings in New Zealand white rabbits. **Journal of Biological Science**, v. 7, p. 1488–1491, 2007.

## CAPÍTULO 4 – IMPLICAÇÕES

O diagnóstico de todas as espécies de coccídios presentes em coelhos no Brasil é muito importante, visto que existem diferenças em relação à patogenicidade de cada espécie de *Eimeria* e a criptosporidiose causada por *C. cuniculus* é uma zoonose.

As espécies de *Eimeria* de alta patogenicidade (*E. flavescens*, *E. intestinalis* e *E. stiedai*) estão presentes em quase todas as granjas positivas neste trabalho, principalmente em fêmeas lactantes e filhotes, explicando assim, a alta mortalidade observada em láparos infectados por *Eimeria*, em diferentes regiões brasileiras.

Neste trabalho, ficou evidente que infecções mistas por *Eimeria* ocorrem principalmente em granjas cujo manejo sanitário é precário e onde não existe uso de vassoura de fogo, que é indicada para eliminação de coccídios do ambiente.

O único coccidiostático utilizado como profilaxia em coelhos é a robenidina presente em rações comerciais. Atualmente, essa droga já não apresenta a mesma eficácia, em função da resistência adquirida pelas espécies de *Eimeria* de coelhos. No Brasil, somente uma empresa alterou recentemente o uso de robenidina para diclazuril, em rações de coelhos.

A detecção de espécies de *Eimeria* patogênicas encontradas neste trabalho ressalta a importância de reavaliação, por parte das empresas produtoras de rações comerciais, da eficácia dos agentes anticoccidianos adicionados às rações de coelhos, no Brasil. Da mesma forma, os produtores preocupados com a mortalidade de láparos, sua fonte de renda, devem ter consciência de que apenas realizar o tratamento após uma ocorrência de mortalidade por eimeriose não é suficiente para evitar prejuízos econômicos. Outras medidas relacionadas à prevenção de eimeriose devem ser adotadas, principalmente aquelas relacionadas às boas condições de higiene.

Sabe-se que é quase impossível remover todos os oocistos de *Eimeria* do ambiente, porém, a redução significativa da contaminação ambiental pode reduzir a dose infectante e, portanto, os sinais clínicos da doença. Além disso, a exposição a uma quantidade menor de oocistos resulta em desenvolvimento de imunidade precoce.

Muitos subtipos de *Cryptosporidium cuniculus* já foram encontrados em humanos (20 subtipos) e devemos estar cientes de que alguns ainda não encontrados em humanos, como o subtipo VbA21, também podem emergir como novos patógenos, quando fatores socioeconômicos e as alterações ambientais favorecerem a transmissão.

Tanto a eimeriose quanto a criptosporidiose podem resultar em perdas econômicas nas granjas de coelhos a partir do momento em que a produção é prejudicada por redução no desempenho dos animais e mortalidade. Por outro lado, maior atenção se torna necessária em relação à criptosporidiose em coelhos, como uma zoonose importante em saúde pública.