

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**VETERINÁRIAS**

TESE

**DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR *Cystoisospora felis* (WENYON, 1923) FRENKEL, 1977 (APICOMPLEXA: CYSTOISOSPORINAE) PELO “WESTERN BLOTTING” EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO: BOVINOS.**

GISELE SANTOS DE MEIRELES

Seropédica, RJ

2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR *Cystoisospora felis* (WENYON, 1923) FRENKEL, 1977 (APICOMPLEXA: CYSTOISOSPORINAE) PELO “WESTERN BLOTTING” EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO: BOVINOS.**

**GISELE SANTOS DE MEIRELES**

*Sob a Orientação do Professor*

**Dr. Carlos Wilson Gomes Lopes**

*e Co-orientação*

**Dr. Walter Flausino**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutor em**  
**Ciências** Veterinárias, Área de  
Concentração Sanidade Animal.

**Seropédica, RJ**

**2013**

636.089696

M514d

T

Meireles, Gisele Santos de, 1980-  
Diagnóstico da infecção por  
*Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923)  
Frenkel, 1977 (Apicomplexa:  
*Cystoisosporinae*) pelo "Western Blotting"  
em animais de produção: bovinos / Gisele  
Santos de Meireles - 2013.  
121 f. : il.

Orientador: Carlos Wilson Gomes Lopes.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-  
Graduação em Ciências Veterinárias.  
Bibliografia: f. 54-66.

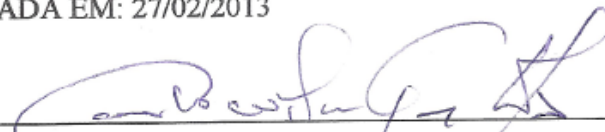
1. Parasitologia veterinária - Teses.  
2. *Cystoisospora felis* - Teses. 3. Bovino  
- Infecções - Teses. 4. Bovino - Parasito  
- Teses. 5. Western blotting - Teses. I.  
Lopes, Carlos Wilson Gomes, 1947-. II.  
Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**GISELE SANTOS DE MEIRELES**


Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências** no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Sanidade Animal.

DEFESA APROVADA EM: 27/02/2013



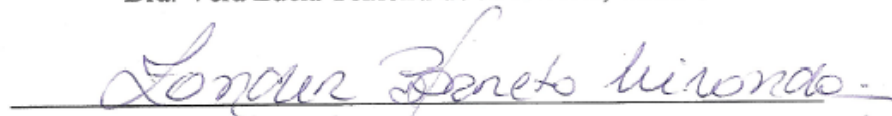
---

Dr. Carlos Wilson Gomes Lopes PhD, LD, UFRRJ



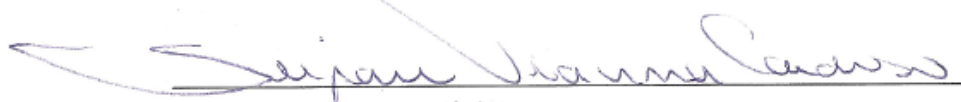
---

Dra. Vera Lúcia Teixeira de Jesus DSc, UFRRJ




---

Dra. Zander Barreto Miranda DSc, UFF



---

Dr. Sergian Vianna Cardozo DSc, UNIGRANRIO



---

Dra. Elan Cardozo Paes de Almeida DSc, UFF



---

Dr. Walter Flausino PhD, UFRRJ

## DEDICATÓRIA

*A Deus, o senhor e Autor da minha vida, que me fortalece e sempre me direciona no caminho que for de sua vontade.*

*A meu esposo, Adriano de Carvalho Ferreira, pelo apoio, compreensão, dedicação e força.*

*A minha filha, Luisa Santos de Meireles Carvalho Ferreira, razão e motivo da minha luta para um futuro melhor.*

*A minha irmã, Sheila Santos de Meireles, pelo apoio e incentivo.*

*A meus pais João Cruz de Meireles (in memorian) pelas palavras de incentivo e Julinda Maria Santos de Meireles pelo apoio incondicional e amor que dedicou a sua neta.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter guiado meus passos até aqui, superando todas as minhas expectativas e sonhos profissionais.

Agradeço a oportunidade a mim dada para fazer a iniciação científica, mestrado e doutorado em uma instituição pública de qualidade e ao Professor Carlos Wilson Gomes Lopes e ao Dr. Walter Flausino, por aceitarem me orientar. Pelos aprendizados de vida proporcionados pelo nosso convívio diário para o desenvolvimento desse trabalho e por me ensinarem o verdadeiro significado das palavras: Paixão, Persistência e Obstinação. A estes mestres e amigos o meu muito obrigado.

Aos meus colegas do laboratório de coccídios e coccidioses (L.C.C.) Dr. Walter Leira Teixeira Filho, Landreani Ramirez Gonçalves, Janaina da Soledad Rodrigues, Dr. Bruno Pereira Berto, Lianna Maria de Carvalho Balthazar, Gideão da Silva Galvão, Dra. Cleide Domingues Coelho, Natália Mello Pereira da Silva, Paulo Daniel de Santanna Leal (Posso Falar?), Mônica Matheus Florião Ulisses Jorge Pereira Stelman, Gilberto Flausino, Caroline Spitz dos Santos, Jhonatha Gramião Belini e Tays Araujo Camilo que ao fim desses oito anos de convívio acabaram se tornando parte da minha família. Um especial agradecimento aos meus amigos Landreani Ramirez Gonçalves, Natália Mello Pereira da Silva, Dra. Vanessa Almeida Raia, Patricia Barizon Cepeda pelo convívio e conversas tornando o peso das responsabilidades mais ameno e Charles Passos Rangel que mesmo distante continua me enviando palavras de incentivo.

A professora Dra. Vera Teixeira de Jesus pela paciência, compreensão e privilégio de desenvolvimento de trabalhos conjuntos, sempre se mostrando um exemplo como profissional e pessoa.

A equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias, por estarem sempre solícitos e prontos a colaboração.

A Claudio Rogério Rocha de Almeida da EMATER/Rio Claro, pois sem ele este trabalho não teria êxito e a EMATER/RJ pela liberação de seus funcionários para a ajuda nesse trabalho.

Aos demais professores, técnicos administrativos e colegas de curso, pelos ensinamentos lições diárias que contribuíram para o desenvolvimento de soluções para questionamentos e lapidação do meu discernimento.

A CAPES e FAPERJ que viabilizaram meus estudos fornecendo bolsas de doutorado.

A todos que de alguma maneira me ajudaram a chegar até aqui e ajudaram a manter o nível deste curso de pós-graduação.

## **BIOGRAFIA**

**GISELE SANTOS DE MEIRELES**, filha de Julinda Maria Santos de Meireles e João Cruz de Meireles, brasileira, nasceu em 30 de junho de 1980, no município do Rio de Janeiro, no estado do Rio de Janeiro.

Ingressou no curso de Medicina veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em agosto de 2001. Em setembro de 2003, ingressou como estagiária vinculada ao SINTEEG no Laboratório de Coccídios e Coccidioses, do departamento de Parasitologia Animal, sob orientação do Professor Dr. Carlos Wilson Gomes Lopes. Em agosto de 2004, iniciou como bolsista de Iniciação Científica do Programa Institucional de bolsas de Iniciação Científica (PIBIC – CNPq/UFRRJ), permanecendo por dois anos até julho de 2006.

Em 17 de Novembro de 2006, graduou-se em Medicina Veterinária, tendo então depois de um período de quatro meses ingressado no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, na área de concentração de Parasitologia Animal.

Em fevereiro de 2009 conclui Mestrado com o projeto intitulado “Análise Fenotípica e desenvolvimento de diagnóstico imunoenzimático de ‘Western Blotting’ para infecção por *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae) em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)”. Em março deste mesmo ano, ingressou no Doutorado do Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, na Área de concentração: Sanidade Animal, desta mesma IFES para dar continuidade aos seus estudos na mesma área de atuação sobre *Cystoisospora* e Cistoisosporose: diagnóstico e epidemiologia.



## LISTA DE FIGURAS

	Págs
<b>Figura 1.</b> Ciclo Biológico de <i>Cystoisospora felis</i> adaptado de Fayer (1980) .....	5
<b>Figura 2.</b> Relação filogenética entre espécies do gênero <i>Cystoisospora</i> e outros coccídios, baseada pela análise do gene transdutor ITS1 do RNAr, de acordo com SAMARASINGHE et al. (2008) .....	15
<b>Figura 3.</b> Garrafas pet submetidas à aeração forçada, para acelerar o processo de esporulação dos oocistos de <i>Cystoisospora felis</i> .....	18
<b>Figura 4.</b> Microrregião do Vale do Paraíba Fluminense em evidência o município de Rio Claro, estado do Rio de Janeiro. Fonte: IBGE .....	20
<b>Figura 5.</b> Dupla camada primária e secundária de solução de sacarose (ARROWOOD; STERLING, 1987) com adaptações .....	22
<b>Figura 6.</b> Oocistos esporulados de <i>Cystoisospora felis</i> , após a utilização do processo de limpeza de resíduos fecais. Solução de sacarose (escala = 10 $\mu$ m) .....	23
<b>Figura 7.</b> Sistema completo para realização da eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida-SDS. Fonte geradora de corrente elétrica (A), Cuba para eletroforese (B) e Unidade de refrigeração (C) .....	26
<b>Figura 8.</b> Eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida a 10% (A), em detalhe os poços isolados para aplicação das amostras e as mesmas se deslocando em função do campo elétrico (B) .....	26
<b>Figura 9.</b> <i>Cystoisospora felis</i> . Preparação do blotting. Membrana de nitrocelulose corada com Ponceau S, para visualização das proteínas transferidas (A) e incubação em uma solução com leite em pó desnatado (B) .....	28
<b>Figura 10.</b> Incubação over night do soro heterólogo anti- <i>Cystoisospora felis</i> no aparelho multicanal com canaletas individuais no Aparelho Mini Protean® II Multiscreen .....	28
<b>Figura 11.</b> Teste de ‘Western Blotting’ utilizando soro bovino experimentalmente infectado incubado em canaletas isoladas .....	29

	Págs
<b>Figura 12.</b> Reta de regressão dos valores de diâmetros, maior ( <b>DM</b> ) e menor ( <b>dm</b> ) dos oocistos esporulados de <i>C. felis</i> .....	32
<b>Figura 13.</b> Distribuição das médias das frequências dos oocistos esporulados de <i>Cystoisospora felis</i> recuperados de fezes de gatos experimentalmente infectados. <b>(a)</b> Diâmetro maior, <b>(b)</b> Diâmetro menor e <b>(c)</b> Índice morfométrico .....	33
<b>Figura 14.</b> SDS-PAGE a 12% de proteínas de oocistos esporulados de <i>Cystoisospora felis</i> .....	35
<b>Figura 15.</b> SDS-PAGE a 12% de proteínas de oocistos esporulados de <i>Cystoisospora felis</i> e Taquizoítas de <i>Toxoplasma gondii</i> . À esquerda, padrões de peso molecular, ao centro proteínas de oocistos esporulados de <i>C. felis</i> e a direita proteínas de taquizoítas de <i>T. gondii</i> em quilodaltons (KDa), coradas pelo azul de Coomassie 250R .....	37
<b>Figura 16.</b> Resultado do “Western Blotting” (C+) soro controle positivo em bovinos, (o) Soro infecção Oral e (H) Soro hiperimune em coelhos anti- <i>Cystoisospora felis</i> .....	39
<b>Figura 17.</b> Resultado do teste de ‘Western Blotting’ em soro de Bovino controle positivo para <i>Neospora</i> , <i>Toxoplasma</i> e <i>Cystoisospora</i> . (P) Padrão 250, (C-) Soro controle negativo, (C+) Soro controle positivo <i>C. felis</i> , (N) Soro controle positivo <i>Neospora</i> , (T) Soro controle <i>Toxoplasma</i> , (A). Amostras provenientes de propriedades de aptidão leiteira da mesoregião de Rio Claro, estado Rio de Janeiro, infectados naturalmente .....	42
<b>Figura 18.</b> Resultado do teste de ‘Western blotting’ em soro de Bovinos, provenientes de propriedades de aptidão leiteira da mesoregião de Rio Claro, estado Rio de Janeiro, infectados naturalmente. (PAM) Padrão de Alto Peso Molecular, (C+) Controle positivo, (C-) Controle Negativo e da canaleta 03 a 18 - Soro de bovinos oriundo de propriedades de aptidão leiteira .....	45

## LISTA DE TABELAS

	Págs
<b>Tabela 1.</b> Comparação das medidas de oocistos esporulados de <i>Cystoisospora felis</i> registrados por diferentes autores .....	31
<b>Tabela 2.</b> Comparação da resposta das bandas proteicas dominantes em soros anti- <i>Cystoisospora felis</i> .....	38
<b>Tabela 3.</b> Distribuição das bandas do imunoblotting anti- <i>Cystoisospora felis</i> de um bovino infectado experimentalmente via oral com $10^6$ oocistos esporulados .....	40
<b>Tabela 4.</b> Perfil dos polipeptídios imunodominantes dos respectivos soros controle positivos .....	41
<b>Tabela 5.</b> Frequência das cinco bandas proteicas específicas de <i>Cystoisospora felis</i> , observadas em soros bovinos coletados da região de Rio Claro .....	44
<b>Tabela 6.</b> Associação entre a presença de gatos e bovinos soropositivos ao Western Blotting para <i>Cystoisospora felis</i> .....	46
<b>Tabela 7.</b> Associação entre a presença de bezerros soropositivos ao Western Blotting para <i>Cystoisospora felis</i> em relação ao sexo .....	47
<b>Tabela 8.</b> Associação entre a presença de animais soropositivos ao Western Blotting para <i>Cystoisospora felis</i> em relação à idade .....	47
<b>Tabela 9.</b> Associação da presença do gato e seu contato direto com o alimento do bovino em relação aos animais soropositivos ao Western Blotting para <i>Cystoisospora felis</i> .....	48
<b>Tabela 10.</b> Associação da presença do gato e seu contato direto com a água do bovino em relação aos animais soropositivos ao Western Blotting para <i>Cystoisospora felis</i> .....	48
<b>Tabela 11.</b> Associação da presença do gato e seu contato direto com o bovino em relação aos animais soropositivos ao Western Blotting para <i>Cystoisospora felis</i> .....	49

	Págs
<b>Tabela 12.</b> Associação da presença de felinos silvestres e animais sororeativos ao Western Blotting para <i>Cystoisospora felis</i> .....	49
<b>Tabela 13.</b> Associação entre a presença de gatos e propriedades e bovinos soropositivos ao Western Blotting para <i>Cystoisospora felis</i> .....	50
<b>Tabela 14.</b> Associação do tipo de manejo utilizado na propriedade e bovinos sororeativos ao Western Blotting para <i>Cystoisospora felis</i> .....	50
<b>Tabela 15.</b> Associação do tipo de ordenha utilizado na propriedade e o resultado dos bovinos soropositivos ao Western Blotting para <i>Cystoisospora felis</i> .....	51
<b>Tabela 16.</b> Associação entre os resultados soropositivos ao Western Blotting para <i>Cystoisospora felis</i> pelo hectare da propriedade .....	51

## LISTA DE ANEXOS

		Págs
<b>Anexo 1.</b>	Questionário Epidemiológico Aplicado nas Propriedades .....	67
<b>Anexo 2.</b>	RODRIGUES, J. da S.; <b>DE MEIRELES, G.S.</b> ; FLAUSINO, W.; LOPES, C. W. G. The japanense quail ( <i>Corturnix japonica</i> ): a new intermediated host for <i>Cystoisospora felis</i> (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae). <i>Revista Brasileira de Medicina Veterinária</i> , v. 34, n. 1, p. 14-18, 2012 .....	71
<b>Anexo 3.</b>	<b>DE MEIRELES, G.S.</b> ; DA SILVA, N.M.P.; GALVÃO, G. DA S.; ALMEIDA, C.R.R.; FLAUSINO, W.; LOPES, C.W.G. Surto de coccidiose em bezerros búfalos ( <i>Bubalus bubalis</i> ) por <i>Eimeria bareillyi</i> Gil et al., 1963 (Apicomplexa: Eimeriidae) - Relato de casos. <i>Revista Brasileira de Medicina Veterinária</i> , v. 34, n. 2, p. 116-120, 2012 .....	77
<b>Anexo 4.</b>	CORDEIRO, M. D.; <b>DE MEIRELES, G. S.</b> ; SILVA, J. B.; SOUZA, M. M. S.; FONSECA, A. H. Soroprevalência para <i>Borrelia</i> spp. em caninos no município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro. <i>Revista Brasileira de Medicina Veterinária</i> , v. 34, n. 3, p. 251-256, 2012 .....	83
<b>Anexo 5.</b>	JESUS, V.L.T; PEREIRA, R. de C.G.; <b>DE MEIRELES, G. S.</b> ; RODRIGUES, J. da S.; JORGE, J.L.B.P. Brucelose Suína no Estado do Rio de Janeiro. <i>Revista Brasileira de Medicina Veterinária</i> , v. 32, n. 2, p. 101-104, 2010 .....	90
<b>Anexo 6.</b>	FLAUSINO, W., DE JESUS, V.L.T., BEZERRA, R. A., ALBUQUERQUE, G.R., JORGE, J.L.B.P., RODRIGUES, J da S., <b>DE MEIRELES, G.S.</b> , PEREIRA, R. de C. G. Ocorrência de Anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em suínos de uma criação comercial no estado do Rio de Janeiro <i>Revista Brasileira de Medicina Veterinária</i> , v. 32, n. 4, p. 198-200, 2010 .....	95
<b>Anexo 7.</b>	RAMIREZ, L., BERTO, B.P., TEIXEIRA FILHO, W. L., FLAUSINO, W., <b>DE MEIRELES, G.S.</b> , RODRIGUES, J. da S., ALMEIDA, C.R.R., LOPES, C.W.G. <i>Eimeria bareillyi</i> from the domestic water Buffalo, <i>Bubalus bubalis</i> , in the stade of Rio de Janiero, Brazil. <i>Revista Brasileira de Medicina Veterinária</i> , v. 31, n. 4, p. 261-264, 2009 .....	99

## RESUMO

DE MEIRELES, Gisele Santos. **Diagnóstico da infecção por *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae) pelo ‘Western Blotting em animais de produção: bovinos.** 2013. 103p. Tese (Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2013.

Este trabalho teve por objetivo, diagnosticar a infecção por *Cystoisospora felis* em bovinos através do Western Blotting, a partir de oocistos obtidos com o uso sequencial de várias técnicas de purificação adaptadas para o uso em oocistos esporulados de *C. felis*. Com o auxílio do SDS-PAGE a 12 % resultou na identificação de 25 grupos proteicos de: 266; 240; 186; 165; 140; 119, 112, 105, 98, 90, 78, 55, 47, 42, 37, 35, 30, 27-28, 25, 22, 19, 18, 16, 14 KDa, pertencentes a estrutura dos oocistos esporulados e esporozoítas de *C. felis*. Com base nesse resultado e em soro de bovino heterólogo anti-*C. felis* foi possível determinar os polipeptídeos dominantes relevantes à técnica de diagnóstico imunoenzimático com “Western Blotting”, sendo estas, as bandas imunodominantes: p208, p138, p113, p106, p62, p56, p51, p48, p44, p38, p36, p33 e p27. A fim de evitar o diagnóstico equivocado a partir de reações cruzadas foi feita a comparação do soro controle positivo anti-*C. felis* com o soro positivo anti-*Toxoplasma* e *Neospora* com o intuito de excluir as bandas proteicas comuns, prováveis marcadoras de gênero e grupo para identificação de bovinos infectados de maneira natural ou experimental com *C. felis*. Sendo evidenciadas, as seguintes unidades proteicas antigênicas específicas: p 206-208, p137-139, p112-113, p104-107, p27-28 responsáveis por determinar a positividade dos animais testados para *C. felis*. A partir das análises das variáveis foi possível observar que a presença de felinos associados, ao manejo, tipo de ordenha e tamanho das propriedades facilita a dispersão de *C. felis*.

**Palavras chave:** *Cystoisospora felis*; bandas imunodominantes, oocistos esporulados; SDS-PAGE; Western Blotting.

## ABSTRACT

DE MEIRELES, Gisele Santos. **Diagnosis of *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae) infection by Western Blotting in farm animals: bovines.** 2013. 103p. Thesis (Veterinary Science, Animal Health) Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

This study aimed to determine from the protein profile of oocysts of *Cystoisospora felis* recovered from the sequential use of various purification techniques adapted for specific use in sporulated oocysts of *C. felis*. With the aid of SDS-PAGE 12% resulted in identification of 25 groups of protein: 266, 240, 186, 165, 140, 119, 112, 105, 98, 90, 78, 55, 47, 42, 37, 35, 30, 27-28, 25, 22, 19, 18, 16, 14 kDa belonging to the structure of sporulated oocysts and sporozoites of *C. felis*. Based on this results and heterologous bovine serum anti-*C. felis* was possible to determine polypeptides dominant relevant to diagnostic immunoassay technique with "Western Blotting", these being immunodominant bands: P208, P138, P113, p106, p62, p56, p51, p48, p44, p38, p36, and p33 p27. In order to avoid misdiagnosis from cross-reactivity a positive control serum anti-*C. felis* was compared to with positive serum anti-Toxoplasma and *Neospora* in order to exclude the common protein bands, probably markers of gender and group to identify cattle infected naturally or experimentally with *C. felis*. As showed, the following specific antigenic protein units: p 206-208, P137-139, p112-113, p104-107, p27-28 are responsible for determining the animal tested positive or not for *Cystoisospora felis*. Of the analysis of the variables could be observed that the presence of felines related to the handling, size and type of milking properties facilitates dispersion *C. felis*.

Key words: *Cystoisospora felis*, immunodominant bands, sporulated oocysts, Western Blotting, purification techniques, SDS-PAGE.

## LISTA DE ABREVIACOES, APARELHOS E CONSUMÍVEIS

- EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- PBST – Soluo Tampão de Fosfato com Tween
- TWEEN - Monooleato de Sorbitan Etoxilado 20 EO
- TLCK – N $\alpha$ -Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride-
- PMSF – Phenylmethanelsulfonyl fluoride
- Ptn – Proteina
- a - Bactrim F®, Roche, Jaguaré, SP.
- b - Vermotrix Plus®, Jofadel Industria Farmactica S/A, Varginha, MG.
- c - Glicopan Pet®, Vetnil, Louveira, SP.
- d - Cat meal®, Guabi, Campinas, SP.
- e - Maz Cat, São Paulo.
- f - Pet Milk®, VETNIL IND., Louveira, SP.
- g - Aqualife 100, 110V, São Paulo, SP.
- h - Imunodot, Ribeirão Preto, SP.
- i - 2219 Multitemp II Thermostatic Circulater (LKB), Broma, EUA.
- j - Bio Rad Laboratories, EUA.
- k - Mini-Beadbeater, Biospec Products, Bartlesville, EUA.
- l - Millex, Milipore, EUA.
- m – Mini Protean® 3 Cell, Bio-Rad, USA.
- n – Power Pac 1000, Bio Rad, EUA.
- o – Thermomix, B. braun Biotech Internacional, EUA.
- p - Bio Rad Laboratories, EUA.
- q - Molecular imager ® Gel Doc™ and ChemiDoc™ Systems – Bio Rad Laboratories Inc, EUA.
- r - Quantity One, Sigma Verso 4.5.2/1-D Analysis Software - Bio Rad Laboratories, EUA.
- s - Precision Plus protein Standards/Kaleidoscope™ - Bio Rad Laboratories, EUA.
- t - Nitrocellulose Membrane, Bio Rad, EUA.
- u - Stora Filter Products, Sucia.
- v - Mini-Trans Blott, Bio Rad, EUA.
- w - Bio Rad Laboratories, EUA.



x - Molico®, Nestlé Brasil Ltda, SP.

y - Certomat® MOII/B.Braun Biotech International, EUA.

z - Mini Protean® II Multiscreen Apparatus – Bio Rad, EUA.

a' - Sigma®-Aldrich Chemie Gmbh, RFA.

b' - Sigma®-Aldrich Chemie Gmbh, RFA.

## SUMÁRIO

	Págs.
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	2
<b>2.1. <i>Cystoisospora felis</i> (WENYON, 1923) FRENKEL, 1977: HISTÓRICO E CLASSIFICAÇÃO TAXIONÔMICA</b> .....	2
<b>2.1.1. Observações iniciais</b> .....	2
<b>2.1.2. O gênero <i>Isoospora</i> Schneider, 1881</b> .....	2
<b>2.1.3. O gênero <i>Cystoisospora</i> Frenkel, 1977</b> .....	3
<b>2.2. <i>Cystoisospora felis</i> E SEUS HOSPEDEIROS DEFINITIVOS</b> .....	4
<b>2.2.1. Espécies de vertebrados</b> .....	4
<b>2.2.2. Infecção, patogenia e patologia</b> .....	4
<b>2.3. <i>Cystoisospora felis</i> E SEUS HOSPEDEIROS INTERMEDIÁRIOS</b> .....	6
<b>2.3.1. Espécies</b> .....	6
<b>2.3.2. Os estádios extra-intestinais de <i>Cystoisospora felis</i> nos hospedeiros intermediários</b> .....	7
<b>2.4. ESTUDOS SOBRE BIOLOGIA CELULAR DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Cystoisospora</i></b> .....	8
<b>2.5. EPIDEMIOLOGIA DO GÊNERO <i>Cystoisospora</i></b> .....	9
<b>2.6. ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO IMUNOBIOLÓGICA ENTRE O GÊNERO <i>Cystoisospora</i> E ESPÉCIES DA FAMÍLIA Sarcocystidae</b> .....	12
<b>2.7. SUSCEPTIBILIDADE E ESPECIFICIDADE AOS HOSPEDEIROS DA FAMÍLIA <i>Sarcocystidae</i></b> .....	13
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	16
<b>3.1. PROCEDIMENTOS A CAMPO</b> .....	16
<b>3.1.1. Locais de desenvolvimento do experimento e origem dos animais utilizados no trabalho</b> .....	16
<b>3.1.1.1. Infecção experimental de filhotes de gatos (<i>Felis catus</i>) livres de infecção.</b> .....	16
<b>3.1.1.2. Obtenção de soro heterólogo anti-<i>Cystoisospora felis</i> em coelhos</b> .....	18
<b>3.1.1.3. Obtenção de soro controle positivo anti-<i>Cystoisospora</i> em bovinos</b> .....	19
<b>3.1.1.4. Obtenção de soro controle positivo anti-<i>Neospora</i> e <i>Toxoplasma</i></b> .....	19
<b>3.1.1.5. Coleta das Amostras sanguíneas de bovinos de aptidão leiteira</b> .....	19
<b>3.2. PROCEDIMENTOS LABORATORIAS</b> .....	21
<b>3.2.1. Obtenção e seleção de oocistos esporulados de <i>Cystoisospora felis</i> para infecção experimental</b> .....	21

	Págs
3.2.2. Purificação dos oocistos esporulados de <i>Cystoisospora felis</i> .....	21
3.2.3. Preparação, Fragmentação e Dosagem do extrato antigênico total .....	23
3.2.4. Preparação, Fragmentação e Dosagem do extrato antigênico <i>Toxoplasma</i> ..	24
3.2.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio a 12% (sds-page) de triturado de oocistos esporulados de <i>Cystoisospora felis</i> .....	25
3.2.6. Preparação das amostras séricas .....	27
3.2.7. Transferência das proteínas de <i>Cystoisospora felis</i> do gel para o papel “western blotting” .....	27
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>30</b>
4.1. PROCESSO DE ESPORULAÇÃO, ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE OOCISTOS ESPORULADOS DE <i>Cystoisospora felis</i> .....	30
4.2. ANÁLISE MORFOLÓGICA DE OOCISTOS DE <i>Cystoisospora felis</i> .....	31
4.3. COMPLEXOS PROTÉICOS DE OOCISTOS ESPORULADOS DE <i>C. felis</i> OBTIDOS ATRAVÉS DE SDS-PAGE A 12% .....	34
4.4. COMPLEXOS PROTÉICOS DE OOCISTOS ESPORULADOS DE <i>Cystoisospora felis</i> COMPARADOS TAQUIZOÍTAS DE <i>Toxoplasma gondii</i> OBTIDOS ATRAVÉS DE SDS-PAGE A 12% .....	37
4.5. PERFIL ANTIGÊNICO SORO CONTROLE POSITIVO EM BOVINOS CONTRA SORO CONTROLE POSITIVO E SORO HIPERIME EM COELHOS ANTI- <i>Cystoisospora felis</i> .....	38
4.6. RESULTADOS DO TESTE DE IMUNODETECÇÃO EM SITUAÇÃO EXPERIMENTAL .....	39
4.7. COMPARAÇÃO DAS RESPOSTAS DOS SOROS CONTROLE POSITIVO <i>Neospora</i> e <i>Toxoplasma</i> FRENTE AO ANTÍGENO DE <i>Cystoisospora</i> .....	41
4.8. RESULTADOS DO TESTE DE IMUNODETECÇÃO EM CONDIÇÃO DE INFECÇÃO NATURAL .....	43
4.9. EPIDEMIOLOGIA DA <i>Cystoisospora felis</i> NO REBANHO LEITEIRO.....	45
<b>5. CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	<b>52</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>53</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>54</b>
<b>8. ANEXOS</b> .....	<b>67</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A pecuária tem sido um dos principais recursos responsáveis pelo desenvolvimento brasileiro nas últimas décadas. Sendo assim, doenças que acometem rebanhos, principalmente as que interferem diretamente na produtividade, são monitoradas para que não interfiram no custo benefício, onde a produtividade está muito próxima aos ganhos e perdas.

Entre as doenças frequentemente assinaladas podem-se incluir as virais, bacterianas, fúngicas, tóxicas, nutricionais, protozooses, e mais recentemente as priônicas que podem interferir no processo de reprodução e no desenvolvimento dos animais, na fase de seu crescimento e em sua fase produtiva. Entre estas, as protozooses podem ser consideradas de importância econômica, como no caso o complexo tristeza parasitária bovina (TPB) onde os agentes etiológicos associados a seus transmissores, artrópodes hematófagos, tem sido assinalados como de grande relevância em regiões tropicais e subtropicais no Brasil.

Ao lado da TPB em bovinos, outras protozooses passaram a ter relevância econômica para animais de produção no Brasil. Desta maneira, vários relatos sobre coccidioses gastrintestinais e hepáticas e outras mais complexas onde a participação de carnívoros tornou-se de grande importância para o rebanho nacional, entre estas as mais conhecidas são a neosporose, toxoplasmose e a sarcocistose. Além dessas, pouca importância se tem dado a cistoisporose, por ser uma doença de caráter subclínico, tendo cães e gatos como hospedeiros definitivos e diversos vertebrados como hospedeiros intermediários. Um dos fatores epidemiológicos de importância seria a capacidade de uma dessas espécies, *Cystoisospora felis*, ter em parte o mesmo ciclo de transmissão de *Toxoplasma gondii*, organismo zoonótico fartamente relatado na literatura.

Sendo assim, este trabalho tem como objetivo geral determinar através do *Western Blotting* a presença de animais de produção de portadores de infecção natural por *C. felis* e, como objetivos específicos: através de técnicas de limpeza adaptadas ao parasito deste trabalho traçar seu perfil proteico e com a técnica de western blotting determinar quais são as proteínas responsáveis pela determinação da infecção, identificar a fase dos animais mais suscetível à infecção e determinar se a presença de gatos na propriedade seja fator relevante como dispersor desta coccidiose.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. *Cystoisospora felis* (WENYON, 1923) FRENKEL, 1977: HISTÓRICO E CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA.

#### 2.1.1. Primeiras Observações

O coccídio intestinal *C. felis* já foi alocado inúmeras vezes entre diferentes táxons da árvore taxionômica zoológica desde a sua primeira observação até o presente. Até hoje, a sua denominação como tal é controversa. No entanto, fortes evidências morfológicas e moleculares, além das biológicas, têm pesado sobre as antigas classificações muitas vezes ainda utilizadas.

A espécie *C. felis* remonta dos primeiros achados de formas ovóides nas fezes de cães e gatos, as então chamadas psorospermas oviformes ou coccídios. Nesse tempo, tinha-se a idéia de que cães e gatos compartilhavam as mesmas espécies de coccídios, podendo infectar seus respectivos tratos gastrointestinais. Assim, *C. felis* baseia-se em estudos anteriores sobre *Coccidium rivolta* do gato e *C. bigeminum* do cão, e sobre *Diplospora bigemina*. A descrição da espécie *C. rivolta* do gato doméstico que foi redenominada como *Isospora rivolta* a partir da criação do gênero *Isospora*, em 1881. Por um momento foi confundido com outro coccídio, *C. rivolta*, por possuir mensurações similares à futura espécie *I. felis*. Porém, pelo fato de considerar as formas como polimorfismo da espécie por ele descrita, *D. bigemina*, Wasielewski faz com que o seu achado se torne *nomen nudum* (WENYON, 1923).

A evidência de que cães e gatos compartilhassem mesmas espécies de *Isospora* começou a ser desconsiderada a partir do trabalho de Nemesèri (1960), onde foi observada a especificidade de *I. felis* para felídeos, dando subsídios para a criação da espécie *I. canis*, que compartilha semelhanças morfométricas com a anterior, porém com forma de oocisto ovoide.

#### 2.1.2. O gênero *Isospora* Schneider, 1881

O gênero *Isospora* foi descrito por Duszynski (2004) para englobar os coccídios intestinais de invertebrados e vertebrados que possuíssem oocistos dispóricos tetrazóicos, tendo como espécie-tipo *I. rara*. No entanto, como inicialmente não se conhecia a capacidade de *I. bigemina*, *I. felis* (WENYON, 1923) e outras espécies de coccídios de carnívoros e onívoros em ter hospedeiros intermediários em seu ciclo biológico, o gênero *Isospora* passou a ser considerado como por espécies com hospedeiros homoxenos e transmissão feco-oral obrigatória. Assim, espécies de *Isospora* de aves passeriformes como *I. serini* e *I. canaria* de *Serinus canarius* (canário doméstico) e outras tantas foram facilmente incorporadas a este gênero, mesmo tendo diversas diferenças biológicas e morfológicas entre si. A presença de

corpo de Stieda nos esporocistos de espécies de *Isoospora* de passeriformes, inicialmente, não foi de grande peso para criação de um novo gênero para elas (BOX, 1977; BOX, 1981, BOX, et al., 1980). Contudo, atualmente para as espécies do gênero *Isoospora*, o uso da descrição do corpo de Stieda e/ou substieda seria uma das principais características morfológicas usadas para se enquadrar novas espécies encontradas, a exemplo do trabalho realizado por Berto et al. (2008) onde fez a descrição de *I. hemidactyli* encontrado nas fezes da lagartixa doméstica *Hemidactylus mabouia*, muito comum em residências.

Entretanto, como a espécie-tipo é *I. rara*, coccídio homoxeno dos moluscos gastrópodes *Limax cinereoniger* e *L. griseus*, com oocistos dispóricos tetrazóicos, a descoberta de que as espécies de *Isoospora* de cães e gatos possuíam ciclo heteroxeno facultativo fez com que fosse necessário incluí-las em um novo gênero. Questiona-se atualmente o fato de se ter como espécie-tipo do gênero *Isoospora*, *I. rara*, já que esta espécie é a única a ter sido observada em hospedeiros invertebrados, podendo possivelmente se tratar de um pseudoparasito (TENTER, et al., 2002; TENTER, et al., 1995). Sendo assim, passaram a permanecer neste gênero coccídios que tenham em seus esporocistos corpo de Stieda, e os que possuem fraturas no esporocisto em substituição ao corpo de Stieda passaram para o gênero *Cystoisospora* conforme descrições prévias feitas por Smith (1981).

### 2.1.3. O gênero *Cystoisospora* Frenkel, 1977

Entre 1972 e 1979, uma série de estudos foi conduzida, tendo como resultado marcante a descoberta da capacidade de *I. felis* e *I. rivolta* em formar cistos monozóicos em hospedeiros intermediários, em especial, nos linfonodos mesentéricos de roedores (FRENKEL; DUBEY, 1972, DUBEY; FRENKEL, 1972, DUBEY, 1979). Frenkel, em 1977, aproveitando os resultados obtidos incluiu-as em um novo gênero, *Cystoisospora*, alocando nele as espécies encontradas em cães e gatos, a respeito das quais, até aquele momento, já se conhecia a capacidade em formar cistos monozóicos em hospedeiros intermediários e de transmitir o parasito para seus hospedeiros definitivos. Outro detalhe que chama atenção é a ausência de corpo de Stieda nos esporocistos de oocistos de espécies do gênero *Cystoisospora*, que os aproxima das espécies da família Sarcocystidae por ter fraturas do esporocisto à semelhança de outros gêneros desta família.

Além das espécies de *Cystoisospora* de cães e gatos, oocistos deste gênero já foram identificados em outras duas espécies de vertebrados: *C. israeli*, espécie parasita intestinal da foca peluda sul-africana (*Arctocephalus pusillus*) (KUTTIN; KALLER, 1992) e *C. delphini*, do golfinho nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) (KUTTIN; KALLER, 1996). Em ambos hospedeiros, tais espécies de coccídios foram identificadas causando enterite.

Atualmente, *I. belli*, conhecido agente causal de isosporose humana, comum em indivíduos jovens não portadores de imunidade ativa ou imunocomprometidos, teve proposta para ser alocado taxonomicamente no gênero *Cystoisospora*, levando a mudança da família Eimeriidae para Sarcocystidae. Esse fato se deve a terem sido encontrados cistos monozóicos em linfonodos mesentéricos de humanos portadores de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (FRENKEL et al., 2003, FRENKEL; SMITH, 2003). Tal proposta vem a

corroborar com as demais características fenotípicas como, por exemplo, ausência de corpo de Stieda nos esporocistos de *I. belli*, a despeito das demais espécies da família Sarcocystidae.

Desse modo, utilizando-se a classificação mais recente, porém não consensual onde *C. felis* se encontra alocada, seguindo as classificações de Frenkel (1977), Smith (1981) e Corliss (1994):

Império: Eukaryota Corliss, 1994  
Reino: Protozoa Goldfuss, 1818  
Filo: Apicomplexa Levine, 1970  
Classe: Sporozoea Leuckart, 1879  
Subclasse: Coccidia Leuckart, 1879  
Ordem: Eucoccidiidae Leger e Duboscq, 1910  
Subordem: Eimeriorina Leger, 1911  
Família: Sarcocystida Poche, 1913  
Subfamília: Cystoisosporinae Smith, 1981  
Gênero: *Cystoisospora* Frenkel, 1977  
Espécie: *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977

## **2.2. *Cystoisospora felis* E SEUS HOSPEDEIROS DEFINITIVOS**

### **2.2.1. Espécies de vertebrados**

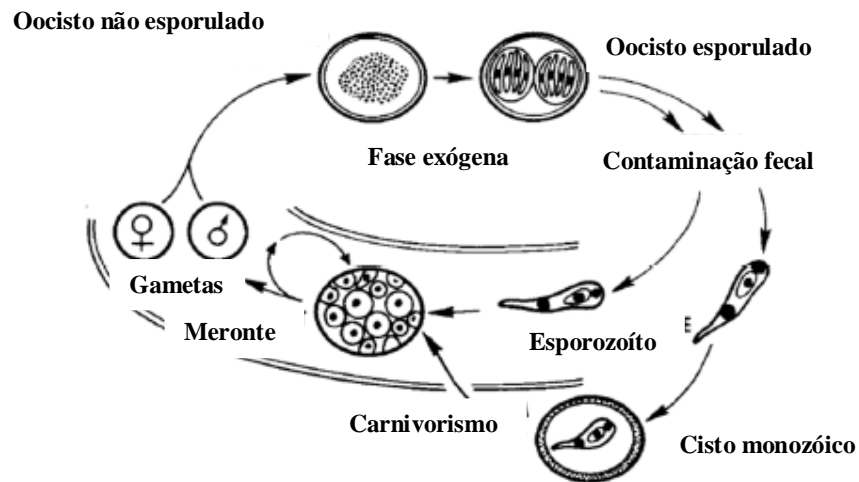
Em todos os trabalhos executados até a descrição de *C. felis* por Wenyon (1923), tal coccídio sempre foi associado às fezes de gatos domésticos (*Felis catus*), vindo a ser este o hospedeiro-tipo da espécie. Entretanto, diversas espécies de felídeos são atualmente consideradas como passíveis de se infectar com este parasito, sendo descrito na literatura a onça-pintada (*Panthera onca*) (BARRETTO; ALMEIDA, 1937), a suçuarana (*Puma concolor*) (AMARAL et al., 1966), o leopardo (*P. pardus*), tigres (*P. tigris*), o leopardo nublado (*Neofelis nebulosa*) (PATTON ; RABINOWITZ, 1994), o gato-selvagem-europeu (*F. silvestris*), a jaguatirica (*Leopardus pardalis*), o serval (*Leptailurus serval*), o lince (*Lynx lynx*), o leão (*P. leo*), o tigre (*P. tigris*), o gato-leopardo (*Prionailurus bengalensis*) (DUSZYNSKI et al., 2000) e o tigre siberiano (*P. tigris altaica*) (ZHIJUN et al., 2011).

### **2.2.2. Infecção, patogenia e patologia**

Como característica de todos os coccídios da subfamília Cystoisosporinae, *C. felis* pode infectar felídeos a partir da ingestão de oocistos esporulados contendo esporozoítos viáveis ou por vísceras de hospedeiros intermediários com formas de resistência tecidual, neste caso, os hipnozoítos (SMITH, 1981).

Os oocistos de *C. felis* são eliminados nas fezes na forma não esporulada, a exemplo dos indivíduos da subfamília Toxoplasmatinae e Cystoisosporinae, tornando-se esporulados

em condições ótimas de temperatura, umidade e oxigenação em um período médio de 48 horas após contato com o meio ambiente (SHAH, 1971). Posteriormente à ingestão de oocistos esporulados ou de cistos de *C. felis*, o parasito multiplica-se extensivamente no intestino delgado dos felinos, produzindo três gerações merogônicas e uma gametogônica (SHAH, 1971). De acordo com Hitchcock (1955), apenas duas gerações de merontes se desenvolveriam no epitélio intestinal de felinos infectados por *C. felis*. A terceira geração de merontes identificada por Shah (1971) é similar à segunda identificada por Hitchcock (1955). Shah (1971) observou entre as duas gerações identificadas previamente por Hitchcock (1955), uma forma merogônica que seria originada sem a exteriorização dos merozoítos de segunda geração à luz intestinal e que sofreria multiplicação por processo de endopoligenia, conforme o visualizado na figura abaixo.



**Figura 1.** Ciclo Biológico de *Cystoisospora felis* adaptado de Fayer (1980).

Entretanto, estudos ultraestruturais posteriores mostraram que nas merogonias iniciais, ao sexto dia de infecção com oocistos esporulados de *C. felis*, a divisão celular por endodigenia foi predominante. Nesse processo, ocorre a formação de duas células-filha no interior da célula-mãe. No estágio inicial, a célula-mãe ainda possui organelas internas como róptrias e micronemas e cada célula-filha consistem em uma membrana em forma de redoma



com microtúbulos presentes. O desenvolvimento foi pelo crescimento de tais complexos para envolver áreas do citoplasma contendo organelas internas dos merozoítos. Nos estádios finais de desenvolvimento, os complexos de membrana formam uma película interna que delimita as duas células-filhas maduras. Além disto, foi observado que estas células-filhas poderiam desenvolver futuras endodogênias no interior do mesmo vacúolo parasitóforo (FERGUSON et al., 1980). O processo de endogenia observado no intestino delgado de gatos infectados foi similar ao descrito previamente para endozoítos de *T. gondii* (OGINO; YONEDA, 1966; SHEFFIELD; MELTON, 1968) e de cistozoítos de espécies da família Sarcocystidae que formam cistos polizóicos (SCHOLTYSECK, 1973).

Em gatos, a infecção por *C. felis* é considerada como patogênica, porém de evolução branda, acometendo principalmente animais jovens. Os sinais clínicos são discretos, sendo caracterizados por diarreia com traços de muco e desidratação (SHAH, 1971, LOSS; LOPES, 1992a). Ao infectar felinos jovens com  $10^5$  oocistos de *C. felis*, Hitchcock (1955) não conseguiu reproduzir os sintomas de enterite, desidratação e diarreia. Tomimura (1957) verificou severa diarreia, anorexia, anemia, emagrecimento, moderada elevação da temperatura e perda de peso em filhotes de quatro a sete dias após infecção com  $10^5$  oocistos esporulados. As lesões macroscópicas são inaparentes, entretanto, à histopatologia, observa-se destruição do epitélio superficial do intestino delgado, em especial do íleo, hiperemia da lâmina própria, infiltrado neutrofílico moderado e aumento de secreção por parte da mucosa (SHAH, 1971).

Não há evidências concretas da existência de uma relação direta entre doenças imunossupressoras como a síndrome da imunodeficiência felina e a leucemia viral felina, a eliminação de oocistos de *T. gondii*, *C. felis* ou *C. rivolta* nas fezes de gatos (LIN et al., 1990).

### **2.3. *Cystoisospora felis* E SEUS HOSPEDEIROS INTERMEDIÁRIOS**

#### **2.3.1. Espécies**

No início da década de 1970, observou-se que *C. felis* tinha a capacidade de infectar hospedeiros não felinos e de ser transmitido a felídeos através do carnivorismo. Desde essa época até o momento atual, têm-se como possíveis hospedeiros intermediários de espécies de *Cystoisospora* camundongos, ratos, hamsters (FRENKEL; DUBEY, 1972), cães (DUBEY, 1975), bovinos (FAYER; FRENKEL, 1979), pássaros (LINDSAY; BLAGBURN, 1994), coelhos (COSTA; LOPES, 1998), suínos (MELO et al., 2003, CARVALHO FILHO et al., 2003) e frangos (MASSAD et al., 2002). Gatos alimentados com amostras de musculatura da língua e do esôfago de camelos vieram a eliminar oocistos de *C. felis* e *C. rivolta*, entre oocistos e esporocistos de outros coccídios da família Sarcocystidae (HILALI et al., 1995). Contudo, longe se está de se considerar o camelo como sendo hospedeiro intermediário deste coccídio, já que se tratou de estudo onde o ciclo biológico do parasito não foi seguido com exatidão, não tendo sido seguidos os postulados de Koch, isto é, os camelos abatidos não tinham sido experimentalmente infectados, já que na maioria dos artigos desenvolvidos experimentalmente citados anteriormente a presença de cistos monozóicos tem sido observada

em placas de Peyer, linfonodos mesentéricos, baço e fígado e recentemente em bursa cloacal de codornas japonesas (RODRIGUES et al., 2012).

### **2.3.2. Os estádios extra-intestinais de *Cystoisospora felis* nos hospedeiros intermediários**

Os estádios extra-intestinais de *C. felis* foram estudadas por Markus (1978), sendo chamadas por ele de dormozoítos (*dormire*, latim – dormir e *zoon*, grego – animal). Tais formas se apresentam no interior de cistos monozóicos, ou seja, com apenas uma forma em seu interior que podem permanecer viáveis por 15 meses. O cisto monozóico de *C. felis* se caracteriza como sendo um vacúolo parasitóforo simples, sem a existência de uma parede cística (típica de cistos de *T. gondii*, por exemplo) e aderida a uma camada de material granular eletro-denso (MEHLHORN; MARKUS, 1976). A controvertida parede cística pode ser bem visualizada conforme Gardiner et al. (1988). A ingestão de vísceras contendo as formas de resistência extra-intestinais, cistos monozóicos, pelo hospedeiro definitivo faz com que o ciclo se processe como o observado quando há a ingestão de oocistos esporulados em período pré-patente ligeiramente menor do que com a infecção por oocistos (DUBEY; FRENKEL, 1972, FRENKEL; DUBEY, 1972; DUBEY, et al., 2001; RODRIGUES et al., 2012).

O nome hipnozoíto foi sugerido por Levine (1985) para as mesmas formas previamente classificada por Markus (1978). Desde então, o nome tem sido mais utilizado com referência a esta forma evolutiva, como já vem sendo usado para as formas hepáticas de resistência observadas em diferentes espécies do gênero *Plasmodium* (MARCHIAFAVA; CELLI, 1885).

A distribuição corporal dos hipnozoítos nas diferentes vísceras avaliadas sugere um tropismo mais elevado pelas placas de Payer, linfonodos mesentéricos, baço e fígado (FRENKEL; DUBEY, 1972, BRÖSIGKE et al., 1982, FREIRE; LOPES, 1995c, COSTA; LOPES, 1998). Dubey (1979) observou que a musculatura esquelética de camundongos inoculados com oocistos de *C. rivolta* induzia a eliminação de oocistos deste coccídio por gatos. Entretanto, o mesmo autor não identificou nenhuma forma do parasito na musculatura através de histopatologia ou impressão dos órgãos. Costa e Lopes (1998), utilizando a técnica de digestão péptica em tecidos de coelhos experimentalmente infectados com oocistos de *C. felis*, constataram a presença de hipnozoítos no fígado, baço, linfonodos mesentéricos e placas de Peyer, sem identificá-los na musculatura esquelética.

Na década de 1980, técnicas de digestão enzimática de tecidos possibilitaram observar e isolar hipnozoítos do interior das células parasitadas. A digestão trípica de tecidos foi uma das primeiras utilizadas para isolamento desta forma evolutiva (HEINE, 1981, BRÖSIGKE et al., 1982). Entretanto, a digestão trípica tende a causar maiores danos aos hipnozoítos e, com o advento da digestão péptica de tecidos, uma quantidade maior de formas extra-intestinais pôde ser recuperada e isolada de tecidos de hospedeiros intermediários (FREIRE; LOPES, 1995a, DUBEY; FRENKEL, 1998, COSTA; LOPES, 1998, OLIVEIRA et al., 2001).

*Cystoisospora felis* pode ser considerada muito patogênica a camundongos neonatos. Estes, quando inoculados por via intraperitoneal com  $10^3$  esporozoítos de *C. felis*, podem causar a morte de 100% dos animais em apenas quatro dias. Por outro lado, quando  $10^6$

macrófagos de peritônio de camundongos adultos pré-inoculados com esporozoítos de *C. felis* foram inoculados em camundongos neonatos, todos os animais vieram a óbito 12 dias após inoculação (FREIRE; LOPES, 1995b), do mesmo modo que interfere no ganho de peso de camundongos infectados por via oral com oocistos esporulados (LOSS; LOPES, 1992b) ou mesmo em gerbiles da Mongólia com *C. ohioensis* do cão e *C. felis* respectivamente (FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2004; 2011).

#### **2.4. ESTUDOS SOBRE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Cystoisospora***

O cultivo de espécies do gênero *Cystoisospora* foi tentado por diversos autores. Muitos deles fracassaram em suas tentativas como, por exemplo, Sheffield e Melton (1972) em cultivos de esporozoítos de *C. rivolta* em células de rim de macacos e Shibalova e Petrenko (1972) que testaram diversos tipos celulares, entre eles, cultivos primários de células de embrião de galinha e codorna, cultivo secundários de células de rim de macaco, embriões humano, leporino e ovino, de macaco verde e células amnióticas de humanos. Fayer (1972) obteve êxito em cultivar esporozoítos de *C. rivolta* em células de rim felino, de rim fetal bovino e células de rim canino Madin-Darby. Entretanto, o cultivo continuado de esporozoítos nesses tipos celulares não foi possível, e as formas se degeneraram poucos dias após o início. Fayer e Thompson (1974) ao utilizar cultivos de células humanas (intestinais de embrião, epitélio esofágico, células amnióticas, pulmonares, HeLa – carcinoma epitelial de cérvix), assim como células traqueais bovinas, de rim de cães e de frangos pretenderam avaliar o desenvolvimento de estádios de *C. felis* nestas células onde observaram que todas as células foram aptas a propiciar o desenvolvimento de zoítos de *C. felis*. Observaram ainda o desenvolvimento de células-filhas multiplicadas através de endodiogenia e possivelmente por esquizogonia. Entretanto, estes estádios não se mantiveram continuamente em cultivos. Os corpos refráteis dos zoítos foram corados utilizando-se a coloração policrômica de Whipf. Esses autores observaram que, assim como os esporozoítos, os outros zoítos tinham os corpos refráteis corados no momento da penetração ativa nas células hospedeiras e após a saída, na geração seguinte. Durante o processo de multiplicação dos zoítos, os corpos refráteis não se coravam. Através da coloração por Ácido Periódico de Schiff (PAS), a mesma observação, quanto aos corpos refráteis, deu-se em relação ao acúmulo de carboidratos que aumentou até o momento da saída da célula e à diminuição durante a endodiogenia.

Diversos estádios de vida de *C. felis* foram observados em cultivos de esporozoítos na membrana corioalantóica (MCA) de ovos embrionados de galinha. Os ovos, tendo sido tratados ou não com acetato de cortisona ao momento da inoculação do esporozoítos, apresentaram três gerações de merontes e uma gametogonia na MCA, à semelhança do que ocorre no ciclo natural, no intestino delgado de felídeos. A formação de oocistos na MCA também foi observada, assim como o desenvolvimento de merontes no fígado e intestino delgado de embriões tratados com acetato de cortisona (GUTIÉRREZ; ARCAY, 1987).

O poder invasivo dos esporozoítos e merozoítos de *C. felis* em células de peritônio de ratos, impossibilitadas de desenvolver fagocitose, foi comparado, sendo os primeiros os mais invasivos, possivelmente por ter a necessidade de se deslocar por uma distância muito grande

até encontrar o sítio apropriado para seu desenvolvimento. Já o merozoíto não teria a necessidade de um poder invasivo tão grande por se encontrar próximo a células com condições de se servirem destas para seu desenvolvimento (TEJERO; ARCAY-DE-PERAZA, 1982).

Em estudo ultraestrutural sobre hipnozoítos albergados em linfonodos mesentéricos de camundongos experimentalmente infectados com oocistos de *C. felis*, observou-se que tal forma apresentava película típica de coccídios, contendo três camadas: a interna, interrompida apenas nos pólos apicais e anti-apicais e nos micropóros; enquanto as outras duas camadas permaneciam contínuas por toda a extensão do zoíto. Os microtúbulos se estendem desde o anel polar apical por até dois terços do comprimento da célula. Outras estruturas que chamaram à atenção neste estudo foram um corpo cristalóide localizado logo abaixo do núcleo da célula e inúmeros grânulos de polissacarídeos de característica eletropálido, os quais foram definidos como grânulos de amilopectina. Os hipnozoítos estavam sempre envoltos por um vacúolo parasitóforo composto por apenas uma membrana sem a formação de uma parede cística, a exemplo de *T. gondii*. Muitos dos vacúolos parasitóforos tinham inúmeros grânulos eletrodensos na porção externa da membrana e na sua face interna, uma grossa camada de material granular eletropálido (MEHLHORN; MARKUS, 1976). Os referidos autores consideraram a presença de corpos cristalóides, estrutura típica de esporozoítos, não observados em zoítos extra-intestinais, como uma evidência mais contundente de que estas formas não entravam em processo de endogenia, mesmo que em longo prazo. Desse modo, os hipnozoítos poderiam ser vistos como formas não totalmente desenvolvidas de cistozoítos, ou ainda um estágio de resistência ou espera, até que ele tivesse a oportunidade de fechar o seu ciclo de vida.

Outros trabalhos sobre os coccídios do gênero *Cystoisospora* é o excistamento de esporozoítos, em especial para realização de trabalhos imunológicos ou moleculares (TOYAMA, et al, 1982). O excistamento é uma vertente bem estudada em espécies da família Eimeriidae, especialmente pela ausência de formas extra-intestinais no ciclo biológico desses coccídios. No gênero *Cystoisospora*, apesar de estar alocado na família Sarcocystidae, a presença de poucas formas extra-intestinais em cistos monozóicos inviabiliza a obtenção de cistozoítos ou taquizoítos como para demais gêneros da família Sarcocystidae. A obtenção de esporozoítos livres é um importante passo para realização de trabalhos imunológicos e biomoleculares, já que as formas teciduais de *C. felis* não são isoladas em grandes quantidades. Poucos trabalhos foram realizados com excistamento de esporozoítos de espécies do gênero *Cystoisospora*. Em estudos desenvolvidos por McKenna e Charleston (1982), os mesmos observaram que o pré-tratamento com solução de hipoclorito de sódio e o uso de solução de excistamento contendo bile e tripsina levou a resultados em torno de 80% de liberação de esporozoítos.

## 2.5. EPIDEMIOLOGIA DO GÊNERO *Cystoisospora*

Diferente de alguns coccídios da família Sarcocystidae, como *Neospora caninum* Dubey et al., 1988 e *T. gondii* Nicolle e Manceaux, 1909 (BARBER; TREES, 1998, DUBEY; FRENKEL, 1998, HIETALA; THURMOND, 1999), *C. felis*, assim como *C. rivolta* não são

transmitidos congenitamente em infecções crônicas, transpondo a barreira transplacentária (DUBEY, 1977). Mesmo sem utilizar esta estratégia epidemiológica, as espécies do gênero *Cystoisospora* apresentam alta dispersão entre os hospedeiros definitivos.

Nichol et al. (1981), ao avaliarem os parasitos encontrados nas fezes de 92 gatos silvestres provenientes de cinco regiões da Inglaterra, encontraram 4,3% de positividade para *C. felis*. Em nenhuma das amostras de fezes estudadas foram encontrados oocistos de outro coccídio.

Em 96 amostras de fezes coletadas de gatos em clínicas veterinárias particulares, hospitais-escola e vários criadores de Taiwan (Formosa), 3,1% das amostras foram positivas para *C. felis* e 5,2% para *C. rivolta* (LIN et al., 1990). Quando em um estudo epidemiológico não aleatório foram analisadas fezes de gatos de rua oriundos de várias áreas da Bélgica, a frequência de animais positivos para coccídios do gênero *Cystoisospora* foi de 30,0%, sendo 10,0% dos exames positivos para *C. rivolta* e 20,0% positivo para *C. felis* (VANPARIJS et al., 1991), no entanto, não se deve esquecer de que, nesse estudo, apenas uma coleta de material foi feita, diminuindo em muito a chance de se encontrar o parasito, já que o animal teve de se encontrar em plena patência para ser considerado positivo.

Outro estudo sobre inquérito parasitológico em gatos de Hannover e suas imediações, na Alemanha, 932 amostras de fezes, 505 de gatos da área urbana e 427 da área rural foram pesquisadas, tendo sido observado em 2,0% das amostras oocistos de *C. rivolta* (1,0% na área urbana e 3,3% na área rural) e em 1,9% oocistos de *C. felis* (1,8% na área urbana e 2,1% na área rural) (MUNDHENKE; DAUGSCHIES, 1999). Um estudo anterior realizado em três cidades da Alemanha, nas regiões da Turingia e da Saxônia, revelou resultados muito diferentes dos encontrados posteriormente em Hannover. Nesse, oocistos de *C. felis*, *C. rivolta* e *T. gondii* estavam presentes respectivamente em 17,0%, 13,0% e 3,6% das análises fecais realizadas em um total de 111 gatos não domiciliados (RASCHKA et al., 1994). Observa-se que as frequências de tais coccídios nas fezes de felinos domésticos variam em muito, mesmo em se tratando de regiões próximas umas das outras, possivelmente estando relacionado ao tipo de hospedeiro intermediário predado.

Gennari et al. (1999) analisaram 187 amostras de fezes de gatos de diferentes idades, domiciliados, porém sendo a maioria deles com livre acesso à rua, durante os anos de 1991 a 1995, tendo como universo, diferentes regiões da cidade de São Paulo. A presença de endoparasitos nas amostras fecais na porcentagem de 95,72%. Oocistos de *Cystoisospora* foram os mais frequentes, presentes em 38,5% das amostras avaliadas. É claro que o presente trabalho não reflete a realidade da ocorrência de oocistos de coccídios do gênero *Cystoisospora* em fezes felinas, porém dá um forte indicativo da ocorrência deste protozoário na classe de felinos (domiciliados com livre acesso à rua).

Um estudo realizado no município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, mostrou que 42,42% dos gatos errantes capturados pelo Serviço de Controle de Zoonoses local nos três primeiros meses de 2002 (14 em 33 animais), estavam em plena eliminação de oocistos de *C. felis* ou entrariam em eliminação nos 15 dias após a captura. Os autores concluíram que o estresse da captura sofrido pelos animais exacerbaria a infecção pelo coccídio, reagudizando-a e levando a novo episódio de eliminação de oocistos (SANTOS et al., 2002).

Pelos motivos expostos, Dubey (1993) afirmou anteriormente que praticamente todo gato extra-domestizado iria, estava ou estaria eliminando oocistos do gênero *Cystoisospora*, de modo que, virtualmente, todo gato tornar-se-ia infectado por coccídios deste gênero, em especial, *C. felis*. Nessa mesma vertente Loss (1991)\* considerou que 100% dos gatos de rua avaliados em sua tese (LOSS, 1991) foram positivos para as espécies de *Cystoisospora* quando mantidos em cativeiro por um período de três dias. Tempo esse inferior ao período prepatente que varia de cinco a sete dias.

---

\*Comunicação pessoal

## 2.6. ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO IMUNOBIOLOGICA ENTRE O GÊNERO *Cystoisospora* E ESPÉCIES DA FAMÍLIA Sarcocystidae

Poucos estudos imunológicos foram desenvolvidos utilizando-se *Cystoisospora* como foco. Nesses, espécies do gênero *Cystoisospora* e *T. gondii* se associam, podendo ocorrer re-eliminações mútuas (DUBEY, 1976, OMATA et al., 1991a, OMATA et al., 1991b; DUBEY, 2010). Possibilidades estas, que vinculam a transmissão horizontal ou feco-oral de ambos coccídios a uma mesma avaliação epidemiológica.

A superinfecção de gatos cronicamente infectados com oocistos esporulados de *C. felis* induz a reeliminação de oocistos de *T. gondii* em suas fezes (CHESSUM, 1972, DUBEY, 1976).

A partir do estudo de Omata et al. (1991a), foi possível observar a inter-relação imunogênica entre antígenos de *C. felis* e de *T. gondii*. A infecção oral de um gato livre de coccídios por  $10^5$  oocistos esporulados de *T. gondii* levou a eliminação de oocistos entre o 20° e o 26° DAI (dias após inoculação). Através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), foi possível observar um rápido aumento de anticorpos IgG anti-*T. gondii* no soro deste felino (na ordem de 1/4096). Quanto aos títulos de anticorpos anti-*C. felis*, estes foram observados na ordem de 1/4. Porém, após a infecção oral do mesmo gato com oocistos esporulados de *C. felis*, sete semanas após a prima infecção com *T. gondii*, os títulos se elevaram para 1/64 em apenas sete dias. No mesmo estudo, a inoculação *per os* de oocistos esporulados de *T. gondii* em gatos naturalmente infectados e em processo de eliminação intermitente de oocistos de *C. felis* promoveu um rápido aumento de títulos de anticorpos anti-*C. felis* (1/4096) e anti-*T. gondii* (1/64). Mesmo com altos títulos de anticorpos IgG anti-*C. felis* no soro, os gatos deste ensaio eliminaram oocistos de *C. felis* poucos dias após o início da eliminação de oocistos de *T. gondii* nas fezes.

Cistos de *T. gondii* também induziram uma elevação dos títulos de anticorpos IgG anti-*C. felis* em torno de sete dias após a inoculação oral. Dessa vez, reeliminação de oocistos de *C. felis* não foi observada, já que esse felino também apresentava eliminação intermitente de oocistos de *C. felis* pelo menos quatro semanas antes da inoculação dos cistos.

A inoculação intramuscular tripla de taquizoítos de *T. gondii* conjugados aos adjuvantes (completo e incompleto) de Freund em intervalos de três semanas entre as aplicações, fez com que os títulos de anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*C. felis* aumentassem prontamente no soro de gatos em eliminação intermitente de oocistos de *C. felis*. No entanto, foi ineficaz em impedir a eliminação de oocistos de *T. gondii* e *C. felis* nas fezes após a inoculação oral de cistos de *T. gondii* (OMATA et al., 1991a). Tal estudo mostrou que, mesmo levando a aumento simultâneo de anticorpos IgG anti-*C. felis* e anti-*T. gondii*, a infecção por oocistos, cistos e taquizoítos de *T. gondii* foi capaz em induzir reeliminação de oocistos de *T. gondii* e algumas vezes de oocistos de *C. felis*. Essa reeliminação se deu mesmo quando se observava altos títulos de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e anti-*C. felis*.

Taylor et al. (1990) identificaram o complexo apical como sendo uma região antigenicamente semelhante entre muitos protozoários coccídios. No entanto, antígenos dispersos por todo o parasito também puderam ser identificados em reação cruzada para amostras séricas contendo IgG anti-*T. gondii* e anti-*C. felis*, evidenciando que não apenas o

complexo apical detém antígenos ancestralmente similares entre as espécies de coccídios (OMATA et al., 1991b).

Poucos estudos abordam as características feno-protéicas e antigênicas sobre espécies do gênero *Cystoisospora*. O único trabalho realizado identificou um grupo proteico com 22 KDa de peso molecular específico para *C. felis* através de “Western Blotting” com soro felino positivo para IgG anti-*C. felis* (OMATA et al., 1991b). Entretanto, não se sabe se essa especificidade é absoluta ou se em outras espécies do gênero *Cystoisospora*, podem ser identificadas por tal grupo antigênico.

Diferentemente da falta de estudos sobre espécies da subfamília Cystoisosporinae, são abundantes as informações a respeito da subfamília Toxoplasmatinae. Com o advento da reação em cadeia da polimerase e seu uso para o esclarecimento em questões taxionômicas, torna-se possível confirmar evidências lançadas pelos achados fenotípicos em estudos posteriores. Neste ponto, algumas espécies dos gêneros *Cystoisospora* (*C. felis*, *C. ohioensis*, *C. suis* e *C. belli*) foram, há alguns anos, avaliadas a partir da clonagem e sequenciamento do gene transcritor da subunidade 18S do RNAr (CARRENO et al., 1998; FRAZEN et al., 2000) e a partir do sequenciamento total realizado por Samarasinghe et al. (2008) do gene ITS1 do RNAr de algumas espécies deste mesmo gênero (*C. felis*, *C. rivolta*, *C. ohioensis-simile*, *C. suis*, *C. belli*, *T. gondii*, *N. caninum*, espécies do gênero *Sarcocystis* e espécies do gênero *Eimeria*) foi possível desenvolver um PCR específico para rápida identificação das espécies do gênero *Cystoisospora*. Possibilitando demonstrar uma proximidade genética com *T. gondii* e *N. caninum*. Constituindo assim, um *clade* grupo irmão de espécies do gênero *Sarcocystis* (Quadro 1). Com estes novos dados torna-se possível confirmar, estudos prévios (FRENKEL, 1977, FRENKEL, 1953) que tais coccídios possuem características que fazem com que sejam mais corretamente inseridos na família Sarcocystidae ao invés da família Eimeriidae. Por outro lado, existe conflitos entre o posicionamento de um espécie semelhante a *C. felis* encontrada no tigre siberiano na República Popular da China por Zhijun et al. (2011), apesar das características fenotípicas dos oocistos esporulados serem semelhantes, porém com sequenciamento da subunidade 18S rDNA.

## 2.7. SUSCEPTIBILIDADE E ESPECIFICIDADE AOS HOSPEDEIROS DA FAMÍLIA *Sarcocystidae*

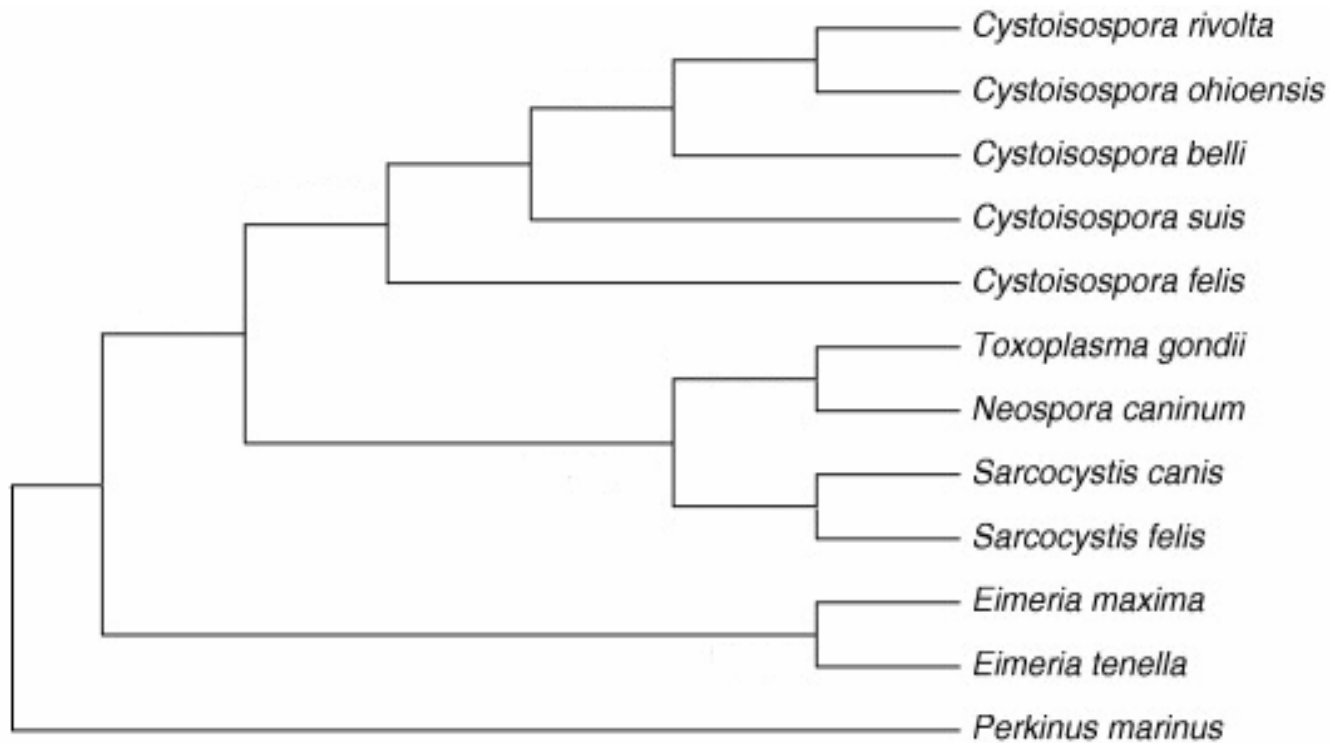
Alguns parasitos do gênero *Sarcocystis* oriundos de algumas de espécies de mamíferos parecem apresentar uma especificidade maior aos seus hospedeiros intermediários do que aos seus hospedeiros definitivos, visto que algumas das espécies deste gênero só podem ser determinadas quando se leva em conta o seu hospedeiro intermediário.

Estudos em longo prazo, quando conduzidos podem evidenciar grandes mudanças evolutivas destes parasitos. O achado ocasional de sarcocistos em musculatura de humanos é um exemplo sugestivo dessa hipótese e também o coloca como hospedeiro acidental, configurando um parasitismo final (SMITH, 1981) e segundo Beaver et al. (1979) algumas espécies do gênero *Sarcocystis* provenientes de primatas que provavelmente usam mamíferos carnívoros ou grandes répteis como hospedeiros finais ocasionalmente infectam pessoas.

Dos seis gêneros que integram esta família, *Cystoisospora*, provavelmente foi o que



recebeu menor atenção em relação a estudo dos mecanismos de transmissão, devido a sua natureza críptica para formação de cistos e ao seu conceito típico de coccídio (SMITH, 1981), apesar de ter sido assinalado em carnívoros (DUBEY, 1975) e em gado bovino (FAYER; FRENKEL, 1979) pela primeira vez e, a seguir em diversos outros hospedeiros vertebrados ao deslumbrar a capacidade das espécies do gênero *Cystoisospora*, com especial atenção a *C. felis* aqui relatada.



**Figura 2.** Relação filogenética entre espécies do gênero *Cystoisospora* e outros coccídios, baseada pela análise do gene transdutor ITS1 do RNAr, de acordo com SAMARASINGHE et al. (2008)

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. PROCEDIMENTOS A CAMPO

##### 3.1.1. Locais de desenvolvimento do experimento e origem dos animais utilizados no trabalho

Esta pesquisa seguiu o recomendado pelo COBEA (2006), com protocolo de nº 002563 junto à comissão de ética da UFRRJ.

##### 3.1.1.1. Infecção experimental de filhotes de gatos (*Felis catus*) livres de infecção

A infecção experimental dos gatos foi desenvolvida no laboratório de Coccídios e coccidioses (LCC) - Projeto Sanidade Animal (EMBRAPA/UFRuralRJ), Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), para isso, foi obtida uma gata jovem e sua prenhez determinada em seis semanas, através de exame ultrassonográfico. Em seguida, o animal foi alocado em gaiola suspensa dentro de uma baia desinfetada previamente, para evitar a contaminação dos animais. Entre o período de chegada da gata e o parto, foi realizado o tratamento preventivo com Sulfametoxazol e Trimetoprima<sup>a</sup> nas doses de 30 mg/kg e 6 mg/kg, respectivamente, por via oral, uma vez ao dia durante no período do periparto e amamentação, à semelhança do estudo realizado por Loss e Lopes (1997). Foi realizada também a vermifugação com pamoato de pirantel, praziquantel, febantel<sup>b</sup>, um comprimido para cada 10 kg de peso, por via oral, em duas doses com intervalo de 15 dias entre elas. Foi realizada suplementação mineral e vitamínica<sup>c</sup>, para suporte do organismo do animal na dosagem de 0,5 ml/kg, uma vez ao dia. Durante e após o tratamento da gata, foram coletadas fezes diariamente até o momento da desmama e estas foram submetidas à técnica de centrífugo-flutuação com solução saturada de açúcar de acordo com a metodologia de flutuação de Sheater (REESE et al., 1982) para confirmar ausência de oocistos e quaisquer outros parasitos.

Após o parto, continuou-se com os cuidados a fim de evitar a contaminação ambiental e consequente contaminação dos filhotes. A ninhada, em número de três animais, foi mantida sob o cuidado materno até o 39º dia de vida, quando ocorreu desmame e início da alimentação dos filhotes com ração seca<sup>d</sup>. Após esse período de adaptação, a mãe foi apartada dos filhotes e encaminhada para adoção.

Logo após o desmame e isolamento dos filhotes, as fezes destes foram coletadas da caixa higiênica diariamente até o fim do experimento, sendo submetidas à técnica de centrífugo-flutuação em solução saturada de açúcar, e a vermifugação preventiva dos filhotes foi realizada para eliminar as chances de uma contaminação via transplacentária ou transmamaria de quaisquer tipos de helmintos.

Os três filhotes de gato para a infecção experimental foram mantidos, isolados em gaiola dentro de uma baia que, previamente, teve o piso e paredes lavadas com hipoclorito de sódio a 5%. As gaiolas antes de serem utilizadas foram deixadas de molho durante 24 horas em hipoclorito de sódio na mesma concentração utilizada para lavagem das baias. Todo o complexo, baia e gaiolas, foram flambadas utilizando-se um maçarico acoplado a um botijão de gás (vassoura de fogo). As gaiolas foram mantidas suspensas e separadas umas das outras de maneira a não haver possibilidade de contato dos animais entre si e com o chão minimizando assim o risco contaminação.

Os filhotes foram acondicionados em gaiolas separadas, onde foram colocados cochinhos para água e comida *ad libitum* e uma caixa de poliestireno preenchida com granulado higiênico para gatos<sup>e</sup>, para facilitar a higiene da coleta do material fecal. Todo o material utilizado foi previamente limpo e esterilizado a fim de evitar a contaminação dos animais.

Os filhotes, com seis semanas de vida, foram inoculados por via oral com 500 µl da suspensão tamponada contendo 10<sup>6</sup> oocistos esporulados de *C. felis*, diluído em leite próprio para alimentação animal<sup>f</sup>, vide item 3.2.1. Depois da inoculação, exames fecais foram realizados de acordo com a metodologia de Sheater (REESE et al., 1982), executados diariamente até o início da eliminação de oocistos, onde a partir desse momento, as fezes passaram a ser coletadas em sua totalidade, pesadas, diluídas em água destilada e filtradas em tamis com gaze dobrada duas vezes. A colheita total do material fecal foi executada durante todo o período de eliminação de oocistos, período patente, o que compreendeu em um intervalo de três semanas. A suspensão fecal filtrada foi acondicionada em garrafas de poliestireno de um litro, adicionada de solução aquosa de dicromato de potássio a 2,5% em proporção de 1:2, e submetidas à aeração forçada por meio de bomba de aquário<sup>g</sup>, durante um período de 5 dias, com intervalos de aeração e descanso de 12 horas, até que os oocistos de *C. felis* atingissem uma taxa de esporulação mínima de 85% (Figura 3).



**Figura 3.** Garrafas pet submetidas à aeração forçada, para acelerar o processo de esporulação dos oocistos de *Cystoisospora felis*.

### 3.1.1.2 Obtenção de soro heterólogo anti-*Cystoisospora felis* em coelhos

Dois coelhos obtidos do IFRJ unidade de Pinheiral, foram transferidos para as instalações do laboratório de Coccídios e Coccidioses (LCC) - Projeto de Sanidade Animal (Embrapa/UFRRJ), Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Seropédica, RJ. Colocados dentro de baias isoladas em gaiolas individuais. Estes animais foram inoculados com extrato de proteína total de oocistos de *C. felis*, para produção de soro leporino hiperimune anti-*C. felis* através de inoculação intramuscular e subcutânea equivalente a  $5 \times 10^6$  oocistos em adição a 800  $\mu$ l de adjuvante completo e incompleto de Freund e 200  $\mu$ l de PBS pH 7,2 segundo Stibbs e Ongerth (1986).

Para o acompanhamento do desenvolvimento da infecção experimental de proteínas de *C. felis* em coelhos foram feitas coletas de sangue dos animais infectados, a partir da veia da orelha, com intervalos de dez dias entre elas. Perfazendo um total de sete amostras sanguíneas com a evolução de 0, 10, 21, 31, 42, 52 e 63 dias após a infecção (DAI), para utilização no teste de “western blotting”, ao fim do experimento o animal negativo foi doado e o animal infectado foi eutanasiado. Os procedimentos de manutenção e eutanásia para os coelhos seguiram as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - (COBEA, 2006), pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV, 2008)

### 3.1.1.3 Obtenção de soro controle positivo anti-*Cystoisospora* em bovinos

Para desenvolver o soro controle positivo anti-*C. felis* foi utilizado um bezerro recém-nascido de raça 5/8 Holandes e 3/8 Gir, pelagem arará, proveniente de uma criação tecnificada do Colégio Agrícola Nilo Peçanha - IFET, Pinheiral, RJ. O bezerro obtido foi testado pela técnica de reação de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma* e *Neospora*, sendo este negativo a ambos os testes e foi transferido para as instalações do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV). Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Seropédica, RJ. Colocado em baia isolada com água e comida *ad libitum*. O animal foi inoculado com 1,5 ml de oocistos íntegros de *C. felis*, por via oral na concentração de  $5 \times 10^6$  oocistos viáveis de *C. felis*. (STIBBS; ONGERTH, 1986).

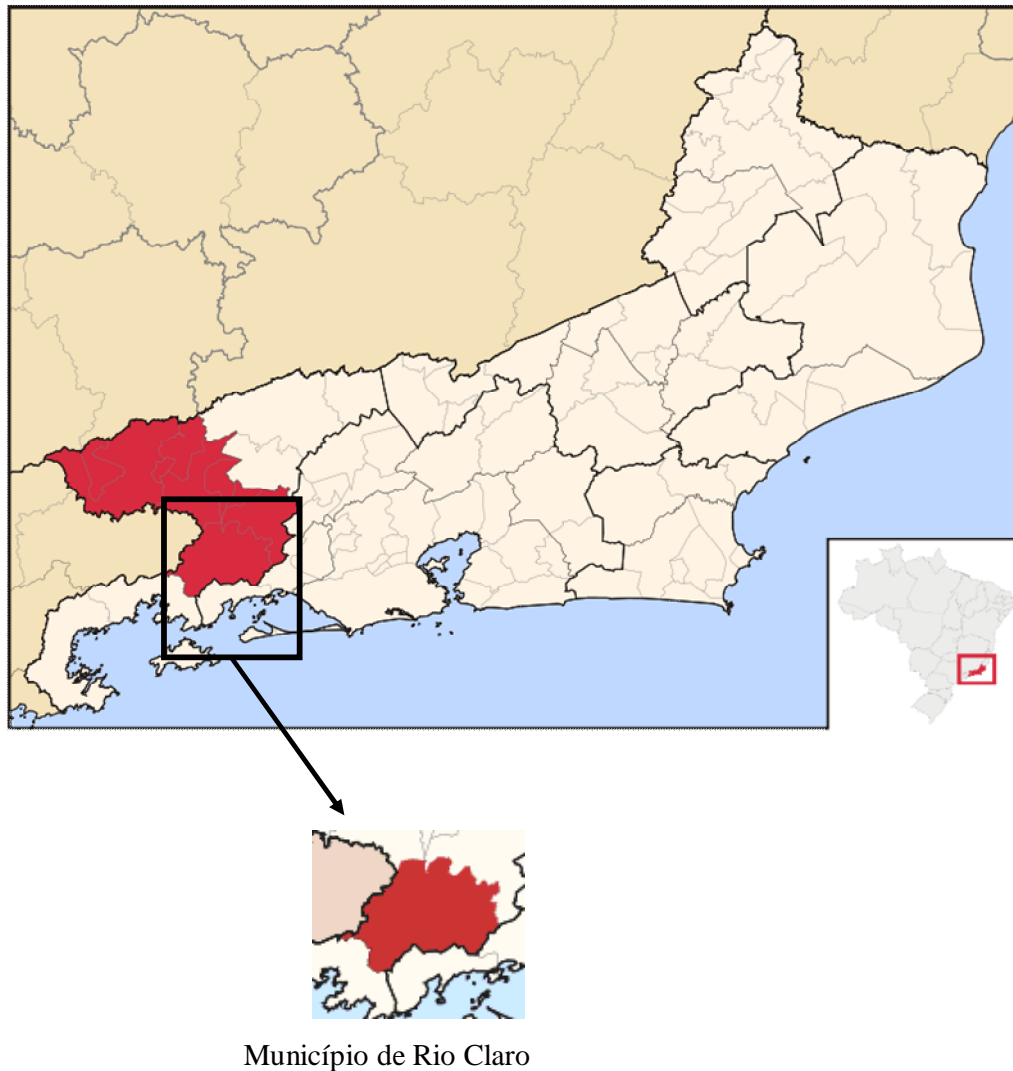
Para o acompanhamento do desenvolvimento da infecção experimental de proteínas de *C. felis* no bezerro foram feitas coletas de sangue do animal infectado, na da veia jugular, com intervalos regulares entre elas. Perfazendo um total de oito amostras sanguíneas com a evolução de zero, 1°, 3°, 7°, 14°, 21°, 28° e 35° dias após a infecção (DAI), para utilização no teste de “Western Blotting”, ao fim do experimento o animal foi doado.

### 3.1.1.4 Obtenção de soro controle positivo anti-*Neospora* e *Toxoplasma*

Com o objetivo de testar as possibilidades de reação cruzada entre antígenos provenientes de *Neospora* e *Toxoplasma* os quais possuem maior proximidade filogenética com o parasita do presente trabalho e por apresentarem alta frequência nos levantamentos sorológicos realizados em animais de produção. Foram da obtidos Imunodot® soros controle<sup>h</sup> positivos anti-*Neospora* e *Toxoplasma* desenvolvidos em bovinos para uso em técnicas laboratoriais de imunodiagnóstico.

### 3.1.1.5 Coleta das Amostras sanguíneas de bovinos de aptidão leiteira e caracterização da amostragem

As amostras sanguíneas coletadas foram armazenadas a -20° até o momento da realização do exame. Os animais selecionados foram bezerros machos e fêmeas, novilhas secas, vacas prenhes e em lactação, oriundos de propriedades de gado com aptidão leiteira, situadas no município de Rio Claro (altitude 446 m; Latitude Sul 22°43'23" e Longitude Oeste 44°08'08") com uma área de 843,4 km<sup>2</sup>, distribuídos pelos distritos de Rio Claro (sede), Lídice, Passa Três, São João Marcos e Getulândia. Dentro do Estado do Rio de Janeiro Região do Médio Paraíba, Mesorregião Sul-fluminense, Microrregião do Vale do Paraíba Fluminense. (CIDE, 2009) (Figura 4).



**Figura 4.** Microrregião do Vale do Paraíba Fluminense em evidência o município de Rio Claro, estado do Rio de Janeiro. Fonte: IBGE

A Região do Médio-Paraíba é onde se encontra a maior bacia leiteira Sulfluminense. O município de Rio Claro apresenta 32.000 bovinos, sendo 5.300 vacas ordenhadas e uma produção anual de 9.858 litros de leite/ano (IBGE, 2007). Para determinar o N amostral total necessário para a execução deste trabalho, foi usada a fórmula  $n = p(1-p) \cdot (1,96 / \Delta)^2$  (SAMPAIO, 2007). Para a realização da coleta dentro de cada propriedade visitada, estipulou-se uma porcentagem de 30,0% do total de animais encontrados na fazenda e realizou-se a coleta das amostras sanguíneas por cada faixa etária, de acordo com a disponibilidade dos animais encontrados nas propriedades no horário da visita, respeitando sempre o manejo do pequeno produtor. Logo após a coleta era feita a aplicação do questionário epidemiológico junto ao proprietário ou responsável pela propriedade e as variáveis encontradas foram analisadas pelo programa estatístico EpiInfo™.

## 3.2 PROCEDIMENTOS LABORATORIAS

### 3.2.1 Obtenção e seleção de oocistos esporulados de *Cystoisospora felis* para infecção experimental

Um isolado puro de oocistos esporulados de *C. felis*, mantido no Laboratório de Coccídios e Coccidioses, conservado sob-refrigeração a 4°C, foi utilizado como fonte de inoculação dos filhotes livres de coccídios. Este isolado puro foi procedente das fezes de gatos recém-desmamados e naturalmente infectados com oocistos esporulados de *C. felis*. Além disso, este isolado vem sendo mantido através de infecções experimentais sucessivas para sua manutenção em laboratório, desde 2002. Neste caso, o isolado puro utilizado foi mantido durante um período de seis meses em solução salina de Hank (ANDRADE, 2000), para armazenamento prolongado foi adicionado de penicilina G e estreptomicina, na proporção de 100 U/ml e 10 mg/ml, respectivamente e anfotericina B, na proporção de 0,5 mg/ml. A solução de armazenamento dos oocistos, rica em antibióticos e antifúngicos, foi removida através de centrifugação em tubos cônicos de poliestireno com capacidade para 15 ml a uma força centrífuga (F.C.) de 1.500 x g por 10 minutos a 10° C em centrífuga refrigerada modelo J 2-21<sup>i</sup> e o sedimento rico em oocistos foi ressuscitado em solução de PBS pH 7,2, este processo foi executado mais duas vezes. Os oocistos de *C. felis*, uma vez livres da solução de armazenamento foram finalmente ressuscitados em solução de PBS pH 7,2 sendo quantificado o número de oocistos por volume de suspensão, verificada em câmara hemocitométrica, sendo possível determinando um volume de 10<sup>6</sup> oocistos/ml. A suspensão final de oocistos esporulados serviu como inóculo para os gatos livres de coccídios.

### 3.2.2 Purificação dos oocistos esporulados de *Cystoisospora felis*

A purificação dos oocistos esporulados recém eliminados, se iniciou pela remoção do dicromato de potássio a 2,5% da suspensão de oocistos através de centrifugação em frascos de vidro para centrífuga com tampa rosqueável de capacidade de 300 ml. Foi centrifugado a F.C. de 500 x g por 10 minutos a 10° C. O sedimento foi ressuscitado e centrifugado em água destilada até que visualmente não se observassem mais traços de dicromato de potássio na suspensão.

Os oocistos esporulados de *C. felis* foram purificados, visando à remoção máxima de resíduos fecais. Antes do início das etapas subsequentes de limpeza foi adicionado um ml de Ácido Sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 5% na proporção 1:10 no material fecal, para evitar a proliferação de fungos e bactérias, devendo logo após ser lavado, no mínimo cinco vezes com água destilada para remoção de resíduos químicos. Para uma boa concentração dos oocistos esporulados de *C. felis*, o material recuperado foi submetido à técnica de suspensão por



sacarose segundo Truong e Ferrari (2006), para ter uma melhor separação dos oocistos esporulados dos resíduos fecais, pois por diferença de densidade as partículas mais densas precipitam e as partículas mais leves flutuaram, a partir deste princípio os oocistos flutuaram se separando do resíduo fecal. Esse sobrenadante repleto de oocistos recuperado, foi diluído em PBS pH 7,2 e em seguida centrifugado a 500 g e o “pelet” formado foi armazenado em tubo s tipo Falcon com 50 ml de capacidade.

O “pelet” que foi recuperado na etapa anterior foi submetido à terceira etapa de limpeza, utilizando a técnica centrífugo-flutuação em camada dupla descontínua primária e secundária de solução de sacarose (ARROWOOD; STERLING, 1987) com modificações. Adaptou-se a técnica para tubos vítreos de hemólise com capacidade de 15,0 ml, onde se utilizou: 5,0 ml de solução de sacarose com gravidade específica (g.e.) próxima a 1.103 g/l; 5,0 ml de solução saturada de açúcar com g.e. próxima a 1.064 g/l e 2,5 ml de suspensão aquosa de oocistos esporulados de *C. felis* provenientes do segundo passo de limpeza. As soluções de sacarose foram enriquecidas com tween 80 e centrifugadas, conforme referencia supracitada. Após a centrifugação, obtiveram-se, em meio à solução de sacarose, dois anéis horizontais de material leitoso (Figura 4) que foram removidos através de sucção, utilizando-se pipeta automática de 1000 µl e ponteiras plásticas de poliestireno, o material removido da solução de sacarose estava rico em oocistos de *C. felis* e com expressiva diminuição de resíduos fecais. A suspensão purificada de oocistos foi diluída em água destilada na proporção 1:1 e centrifugada (f.c.) a 500 g por 10 minutos a 10° C. O sedimento foi ressuspensionado em solução salina de Hank com penicilina, estreptomicina e anfotericina B e armazenado a temperatura de refrigeração, em torno de 4° C para posterior utilização.



**Figura 5.** Dupla camada primária e secundária de solução de sacarose (ARROWOOD; STERLING, 1987) com adaptações.

### 3.2.3. Preparação, Fragmentação e Dosagem do extrato antigênico total

Para certificar que a amostra refrigerada, de oocistos esporulados de *C. felis*, estava livre de contaminantes como fungos e/ou bactérias (Figura 5), esta foi lavada com Ácido Sulfúrico a 5% e deixado interagir por 20 minutos. Aproximadamente um ml de solução na concentração de  $5 \times 10^6$  oocistos esporulados de *C. felis* foi tomada e a solução de preservação associada com Acido Sulfúrico a 5% foi removida através de centrifugação, conforme o item anterior. O sedimento rico em oocistos foi ressuspensão e centrifugado em tubos cônicos de poliestireno em 5,0 ml de PBS estéril, cinco vezes, para remoção de todo resíduo do Ácido Sulfúrico e da solução de conservação. Ao final deste processo o sedimento foi ressuspensionado mais uma vez em 1,0 ml de tampão de lise (100 mM Tris, 10mM EDTA, 1% Nonidet™, 0,2 mM TLCK, 2 mM PMSF) e vertido em um tubo de microteste para titulação<sup>j</sup> de tampa rosqueável, de polipropileno, com capacidade de 2,0 ml. Foram adicionadas esferas de porcelana com diâmetro 2,0 – 2,5  $\mu\text{m}$ . Em seguida, o tubo foi submetido a 12 ciclos de agitação, no aparelho desfragmentador de células<sup>k</sup>, com duração de 30 segundos e intervalo de 30 segundos em banho de gelo para desfragmentação total dos oocistos esporulados de *C. felis*.



**Figura 6.** Oocistos esporulados de *Cystoisospora felis*, após a utilização do processo de limpeza de resíduos fecais. Solução de sacarose (escala = 10 $\mu\text{m}$ ).

Para se definir o número de oocistos apropriado para uma expressão mais nítida das bandas proteicas, foi necessária a quantificação dos oocistos em câmara hemocitométrica, onde são contados o número de oocistos nos quatro quadrantes externos, os valores obtidos foram somados e multiplicados pela constante de 2.500, conforme fórmula abaixo (COSTA; PEDROSO-DE-PAIVA, 2009):

$$\text{Células somadas nos 4 quadrantes} \times 2.500 = \text{oocistos/ml.}$$

O triturado de oocistos esporulados de *C. felis* foi submetido à filtração para retirada de impurezas, com filtro de  $45\mu\text{m}^1$  em seguida submetido à dosagem proteica segundo o método de Folin (LOWRY et al., 1951), obtendo-se uma concentração média de proteínas de 3,0 mg/ml. Em seguida o material foi armazenado a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  até o momento da aplicação em gel de poliacrilamida-SDS a 12%.

#### **3.2.4. Preparação, Fragmentação e Dosagem do extrato antigênico de *Toxoplasma gondii***

A cepa RH de taquizóitos de *T. gondii* foi obtida de material congelado em nitrogênio líquido do LCC, proveniente de manutenção em peritônio de camundongos Balbc. Foi descongelada uma ampola contendo  $10^6$  taquizóitos de *T. gondii*, em banho-maria a  $37^\circ\text{C}$ . Logo após o descongelamento o tubo foi centrifugado a 1500 g por 10 minutos para concentração dos taquizóitos na extremidade do tubo, o sobrenadante foi descartado e o “pelet” ressuspenso em PBS pH 7,2 e submetido a centrifugação por mais duas vezes para retirada da de todo resíduo líquido conservante.

Com “pelet” formado o sobrenadante foi novamente descartado e este ressuspenso em 1,0 ml de tampão de lise homogeneizado e esse líquido vertido em tubo de microteste para titulação de tampa rosqueável. Em seguida, foram adicionadas esferas de porcelana com diâmetro 2 – 2,5  $\mu\text{m}$  e o tubo foi submetido a cinco ciclos de agitação conforme o descrito no item anterior. O material foi filtrado e em seguida submetido a dosagem de proteínas segundo o método de Folin (LOWRY et al., 1951) obtendo uma concentração média de 2,8 mg/ml. O material foi armazenado para posterior aplicação em gel de poliacrilamida-SDS a 12%.

### **3.2.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio a 12% (sds-page) de triturado de oocistos esporulados de *Cystoisospora felis***

Para desenvolvimento da eletroforese, 500µl do material triturado de oocistos de *C. felis* foi adicionado a 500 µl de tampão de solubilização (2% 2-mercaptoetanol, 12,5 mM tampão Tris-HCl pH 6,8, glicerol a 20%, 2 mM PMSF, SDS a 4,6%) e submetidos a aquecimento em banho-maria a 100 °C por cinco minutos com a finalidade de promover a desnaturação de suas proteínas constituintes.

A eletroforese em sistema descontínuo (LAEMMLI, 1970; ANDREWS, 1981; ALFENAS, 1998), foi realizada em gel de SDS-poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE) com proporção acrilamida-bis acrilamida 30:1; utilizando cuba para eletroforese<sup>m</sup>, fonte geradora de corrente elétrica<sup>n</sup> e unidade de refrigeração<sup>o</sup> (Figura 6).

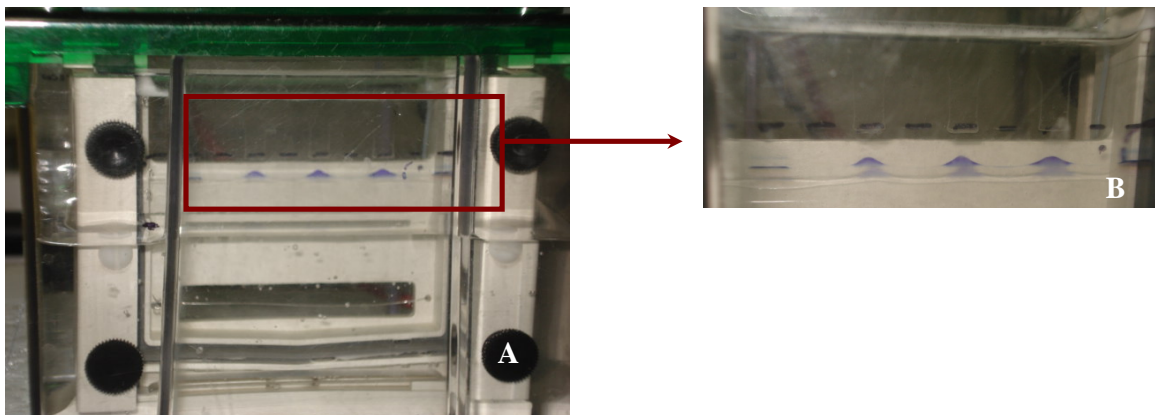
Realizou-se a aplicação progressiva do triturado de oocistos de *C. felis* em poços isolados (Figura 7) do gel nas seguintes quantidades, de padrão e proteína bruta: 10 e 60 µl, respectivamente. O processo de eletroforese foi executado a 150 Volts para fase de empilhamento e resolução do gel por aproximadamente cinquenta e cinco minutos.

Após a corrida, o gel foi fixado em solução de metanol-ácido acético por 15 minutos, à temperatura ambiente. Corado por solução de azul de Comassie 250R<sup>p</sup> por 45 minutos a temperatura ambiente, em seguida descorado com solução ácido acético-metanol até a total revelação dos zimogramas. Com o gel corado, sua imagem foi Capturada<sup>q</sup> e depois analisado por um programa<sup>f</sup> específico para determinar o peso molecular e todas as características dos zimogramas. Logo após esse processo, o gel foi re-fixado em solução de ácido acético a 5% por 30 minutos, à temperatura ambiente e montado em papel celofane poroso<sup>s</sup> para registro do ensaio.

Utilizou-se um padrão protéico<sup>s</sup> de alto peso molecular para a eletroforese contendo, dez bandas de ampla gama (10 – 250 KDa) e múltiplas cores.



**Figura 7.** Sistema completo para realização da eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida-SDS. Fonte geradora de corrente elétrica (A), Cuba para eletroforese (B) e Unidade de refrigeração (C).



**Figura 8.** Eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida a 10% (A), em detalhe os poços isolados para aplicação das amostras e as mesmas se deslocando em função do campo elétrico (B).

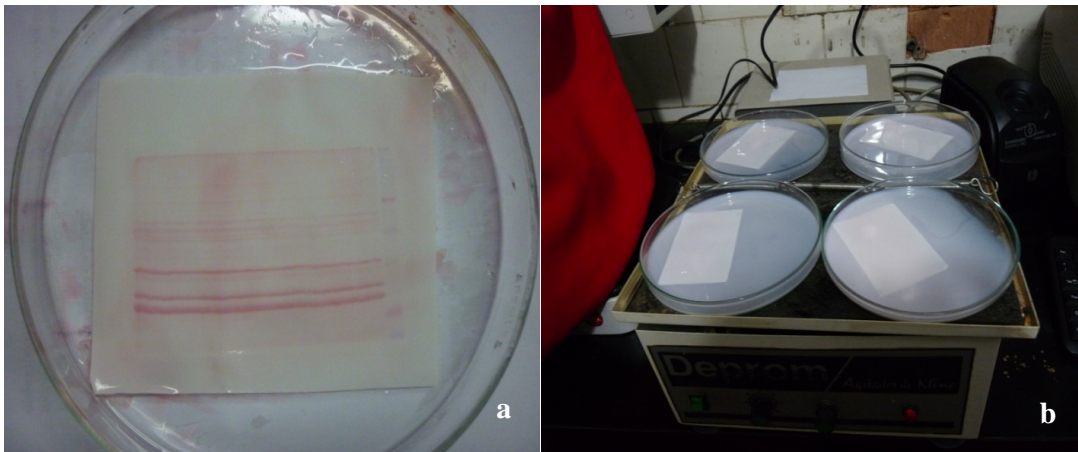
### 3.2.6. Preparação das amostras séricas

Após a higienização local, foi feita a coleta de sangue a partir da veia jugular utilizando agulhas descartáveis e tubos para coleta a vácuo com capacidade de dez ml. Após a coleta os tubos eram acondicionados em caixa de isopor refrigerada com gelo biológico e encaminhados ao Laboratório de Coccídios e Coccidioses para o processamento. Depois do período de coagulação, os tubos de coleta foram submetidos a 1500 g durante dez minutos para extração do soro sanguíneo a partir de pipetador automático e seu acondicionamento feito em tubos do tipo Eppendorf com capacidade de dois ml. Estes foram devidamente numerados, identificados e armazenados em freezer a -20 °C até o momento do uso.

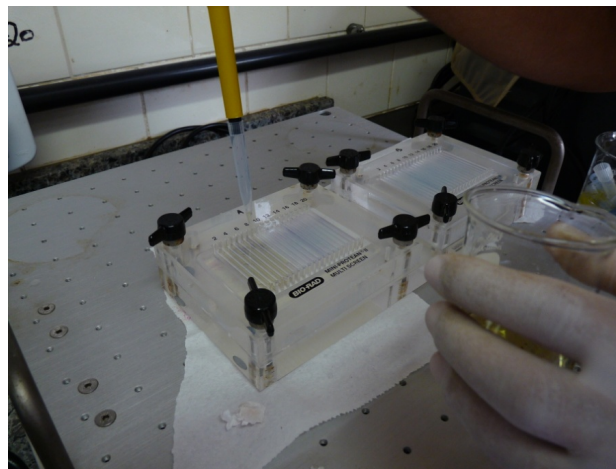
### 3.2.7. Transferência das proteínas de *Cystoisospora felis* do gel para o papel “Western Blotting”

O procedimento de transferência das proteínas do gel para o papel de nitrocelulose<sup>l</sup> foi adaptado segundo as técnicas de Towbin et al. (1979), Kurien e Scofield (2003) e Burnette (1981), para uma recuperação quantitativa das proteínas contidas em géis de poliacrilamida-SDS a 12%. Foi montado um sanduíche com as seguintes camadas: uma almofada de poliestireno porosa (13,5 x 14,0 cm e 1,2 mm); três a quatro folhas de papel filtro<sup>u</sup> 10,5 x 8,5 cm; o gel de poliacrilamida-SDS contendo as proteínas (10,0 x 8,0 cm), papel de nitrocelulose com 0,45 µm de espessura, mais três a quatro folhas de papel filtro e finalizando uma segunda folha de espuma de poliestireno porosa. Todos os componentes do sanduíche foram pré-umedecidos na solução de transferência (Glicina 30%, Trisbase, SDS a 10% e Metanol). O sanduíche foi colocado na cuba de transferência<sup>v</sup>, submergido no tampão de transferência e o processo de eletrotransferência executado a 30 Volts durante aproximadamente quatro horas. Após esse período, o sanduíche foi desmontado e a membrana de nitrocelulose corada com *Ponceau S*<sup>w</sup>, para possibilitar a visualização e certificar que as proteínas foram eletrotransferidas (Figura 8A), depois à membrana foi descorada com água destilada. O ‘blot’ foi incubado com leite em pó desnatado<sup>x</sup> e submetido ao agitador de Kline<sup>y</sup> por uma hora (Figura 8B). Esta substância bloqueante, tem como função ocupar os espaços livres entre as bandas na membrana impedindo as interações não específicas entre a membrana e o anticorpo usado para a detecção da proteína alvo. Em seguida, o ‘blot’ foi colocado no aparelho multicanal<sup>z</sup> com canaletas individuais e as amostras de soro de bovinos foram submetidas a técnica de Western Blotting na diluição 1:500 em PBST pH 7,2, durante uma noite sob agitação (Figura 9). Neste período o anticorpo reagiu com o antígeno adsorvido na membrana. O ‘blot’ foi lavado com PBST pH 7,2 e depois adicionou-se o conjugado<sup>a</sup> (IgG anti-IgG bovino, marcado com fosfatase alcalina) diluído 1:1000 em tampão fosfato com tween 20 (PBST) pH 7,2. Esta última etapa teve um período de incubação por duas horas.

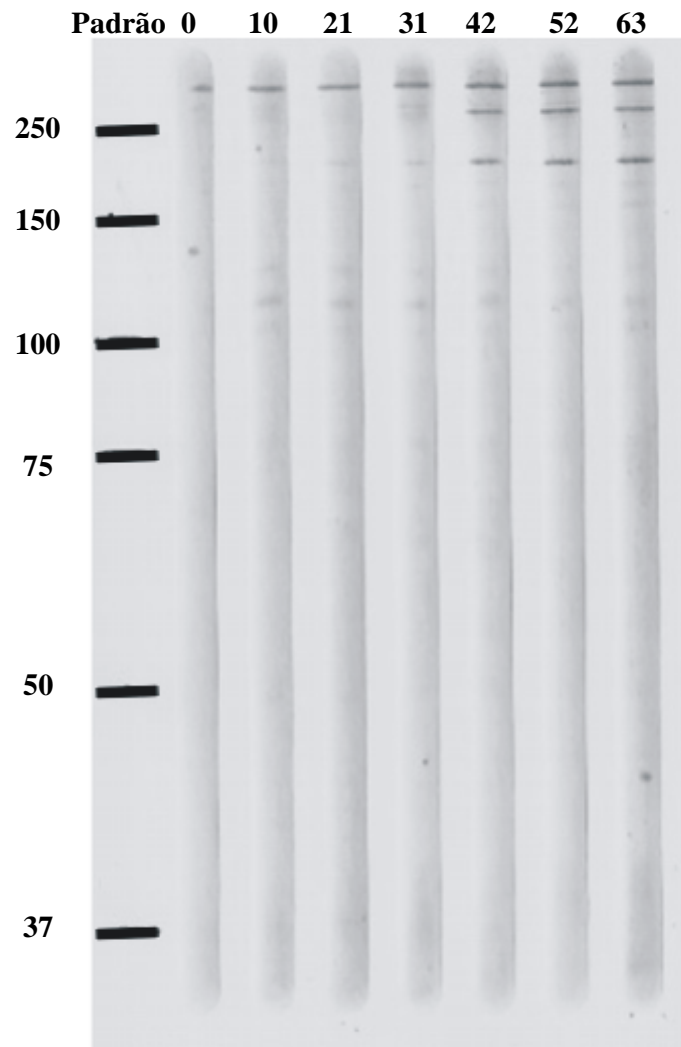
O processo de imunodeteção ocorreu quando foi adicionado o substrato 5-Bromo-4-Chloro-3-Indol YL Phosphate/Nitro Blue Tetrazolium (BCIP/NBT)<sup>b'</sup>, contendo cromógeno, dentro das canaletas que se encontrava em contato com o 'blot', ocorrendo à revelação gradativa das bandas, como pode ser observado na figura 10.



**Figura 9.** *Cystoisospora felis*. Preparação do blotting. Membrana de nitrocelulose corada com *Ponceau S*, para visualização das proteínas transferidas (a) e incubação em uma solução com leite em pó desnatado (b).



**Figura 10.** Incubação over night do soro heterólogo anti-*Cystoisospora felis* no aparelho multicanal com canaletas individuais no Aparelho Mini Protean® II Multiscreen.



**Figura 11.** Teste de Western Blotting utilizando soro bovino experimentalmente infectado incubado em canaletas isoladas.



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 PROCESSO DE ESPORULAÇÃO, ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS OOCISTOS RECUPERADOS DE *Cystoisospora felis*

O número de oocistos esporulados recuperados foi na ordem de  $10^6$  oocistos/ml, semelhante ao obtido previamente por Carvalho Filho et al., (2004) e Meireles et al. (2009), concentração esta que permitiu uma melhor expressão das proteínas no gel. Outro fator determinante para essa evidênciação foi a diminuição da porosidade no SDS-PAGE, utilizando a concentração a 12% para melhor aproveitamento com relação aos oocistos e visualização das proteínas constituintes de sua estrutura total. Com o uso da bomba de aquário, com intervalos de 12 horas de aeração intercalados com 12 horas de descanso, foi possível acelerar o processo de esporulação, minimizando o tempo de espera desse processo e otimizando também as porcentagens de recuperação dos oocistos esporulados, sendo a mínima porcentagem de esporulação obtida de 85%. Desta forma, permite-se a recuperação de oocistos com um maior número de estruturas integras proporcionando um maior número de bandas diferenciadas. Associado a isso, o trabalho com material recém-eliminado, a agilidade do processo de esporulação, concentração e limpeza, não excedendo a um período superior a três meses (DE MEIRELES, 2009) evitou a proliferação de microrganismos e a ação das enzimas responsáveis pela degradação das proteínas existentes no oocisto esporulado, conforme o observado por Leek e Fayer (1979). Apesar da técnica de recuperação empregada neste trabalho ser a mesma utilizada por De Meireles (2009), constatou-se que houve perda na quantidade das proteínas recuperadas dos oocistos, apesar de utilizar o mesmo número de oocistos ( $5 \times 10^6$ ). Este fato foi observado ao se submeter o material a dosagem proteica segundo a técnica de Folin (LOWRY, et al., 1951), obteve-se uma concentração média de proteínas igual a 3,0 mg/ml, quando essa mesma concentração de oocistos fornecia 5,0 mg/ml de proteína (DE MEIRELES, 2009). Também foi possível observar deformação rápida da parede dos oocistos, mesmo em solução adequada de conservação e a degeneração rápida das proteínas extraídas dos oocistos a partir do desfragmentador celular. Tal observação pode estar relacionada com a longa manutenção (10 anos) desta cepa em laboratório para infecção exclusivamente por via oral em felinos, provavelmente perdendo algumas de suas características estruturais e fenotípicas. Como observado com as espécies *Besnoitia jellisoni* e *Toxoplasma gondii*, que ao serem usados em estudos de infecção repetida em longo prazo para observar adaptabilidade e diversidade, ocorrendo a perda de alguns estádios de desenvolvimento e evolução desses parasitos. Pôde-se observar que *B. jellisoni* perdeu a capacidade de formar cistos na musculatura e a perda da capacidade de produção de oocistos de *T. gondii* ao se trabalhar com a passagem de seus taquizoítas em camundongos de

laboratório por longos períodos (FRENKEL et al., 1976, GOLDMAN et al., 1957, LUNDE; JACOBS, 1965).

#### 4.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA DE OOCISTOS DE *Cystoisospora felis*

Baseado em um número mínimo de 10 oocistos por dia de eliminação, foram mensurados um total de 140 oocistos, dos quais foram obtidas as medidas dos diâmetros maior  $41,27 \pm 2,45 \mu\text{m}$ , menor  $29,63 \pm 1,65 \mu\text{m}$  e o Índice morfométrico  $1,38 \pm 0,074 \mu\text{m}$ , comparando-os com outros autores conforme observados abaixo (Tabela 1).

Com base nos valores das medidas dos oocistos de *C. felis* foi feita a reta de regressão, sendo possível evidenciar que no material coletado havia uma única espécie, pois, a maioria dos valores se encontra próximos a reta e o valor de  $R^2$  encontrado, apesar de ser abaixo de 0,5 se torna ideal para a análise desta espécie devido a seu pleomorfismo e seu formato elipsóide (Figura 11).

**Tabela 1.** Comparação das medidas de oocistos esporulados de *Cystoisospora felis* registrados por diferentes autores.

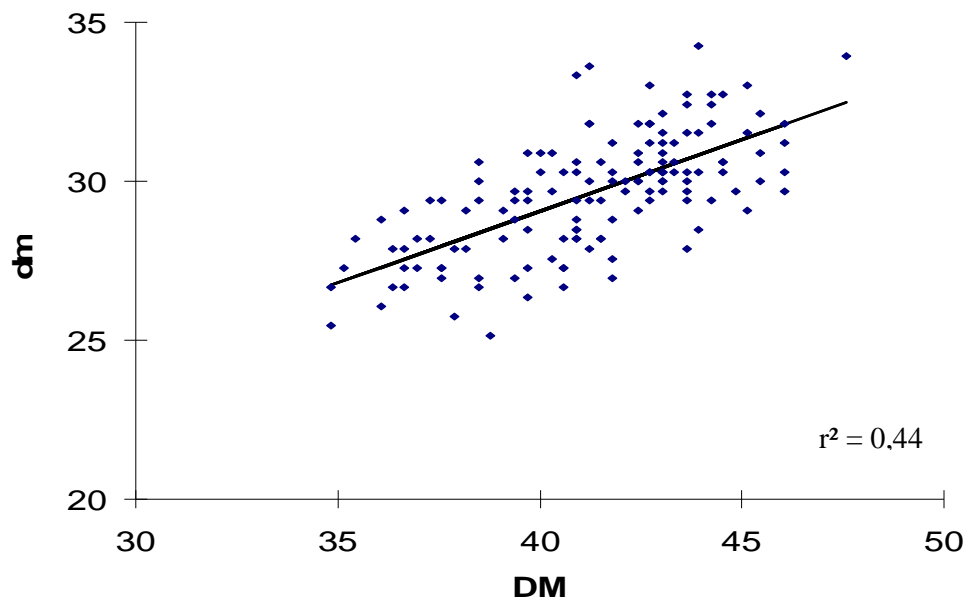
Medidas ( $\mu\text{m}$ )	Rocha e Lopes (1971)	Shah (1971)	Carvalho Filho et al. (2005)	Presente Trabalho
Oocistos esporulados	100 <sup>a</sup>	40	40	140
Diâmetro maior	$39,38 \pm 3,07$	$42 (38 - 51)^b$	$39,78 \pm 3,66$	$42,30 \pm 2,40$
Diâmetro menor	$30,51 \pm 2,18$	$31 (27 - 39)^b$	$30,69 \pm 1,84$	$29,70 \pm 1,63$
Índice Morfométrico	NA	NA	$1,30 \pm 0,10$	$1,39 \pm 0,072$

<sup>a</sup> Número de mensurações

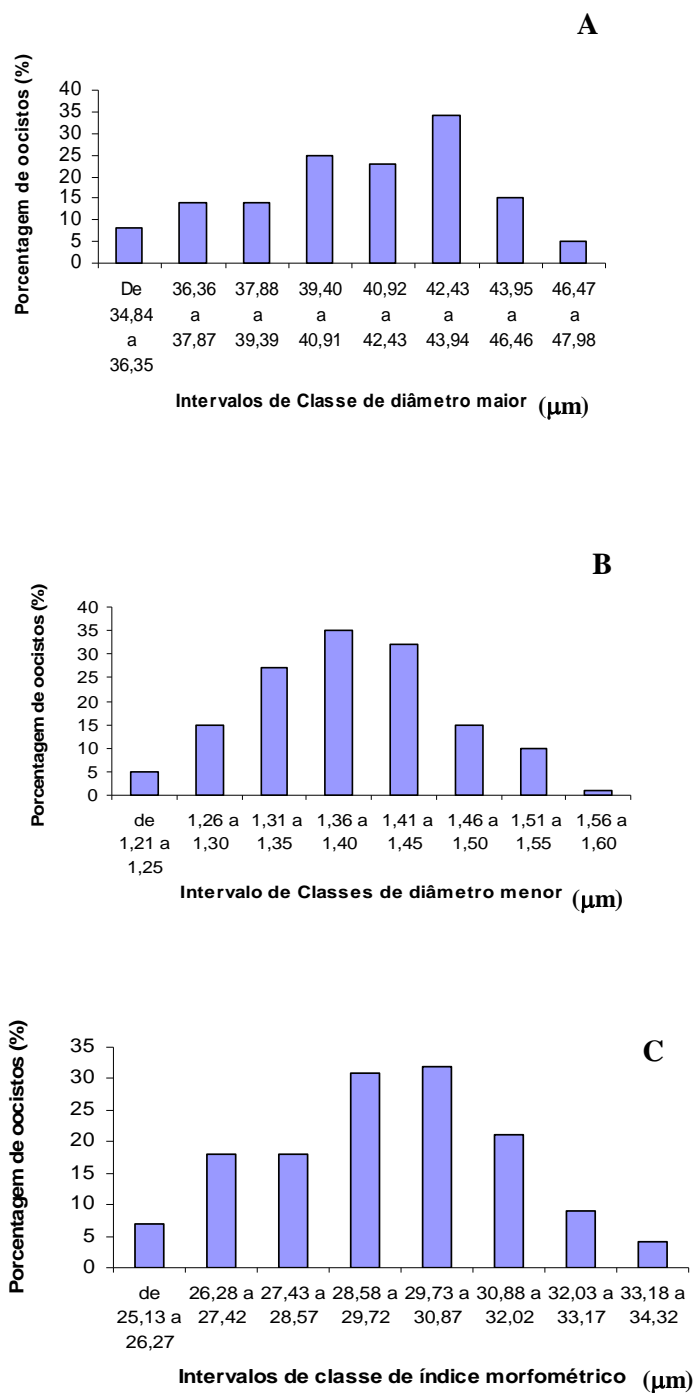
<sup>b</sup> Média e intervalo de mensurações entre parênteses

NA – Não avaliado

Analisando a figura 12 e a figura 13, que se referem a distribuição das medidas dos oocistos esporulados de *C. felis*, observa-se que as frequências nas classes aumentam e diminuem gradativamente, ou seja, as medidas dos oocistos apresentam-se em menor quantidade nos limites dos valores e em maior quantidade nos valores medianos, caracterizando, assim, que o material recuperado possuía oocistos distribuídos de maneira uniforme assemelhando-se aos oocistos esporulados encontrados por Rocha e Lopes (1971) e Carvalho Filho (2005).



**Figura 12.** Retas de regressão dos valores de diâmetros, maior (**DM**) e menor (**dm**) dos oocistos esporulados de *C. felis*

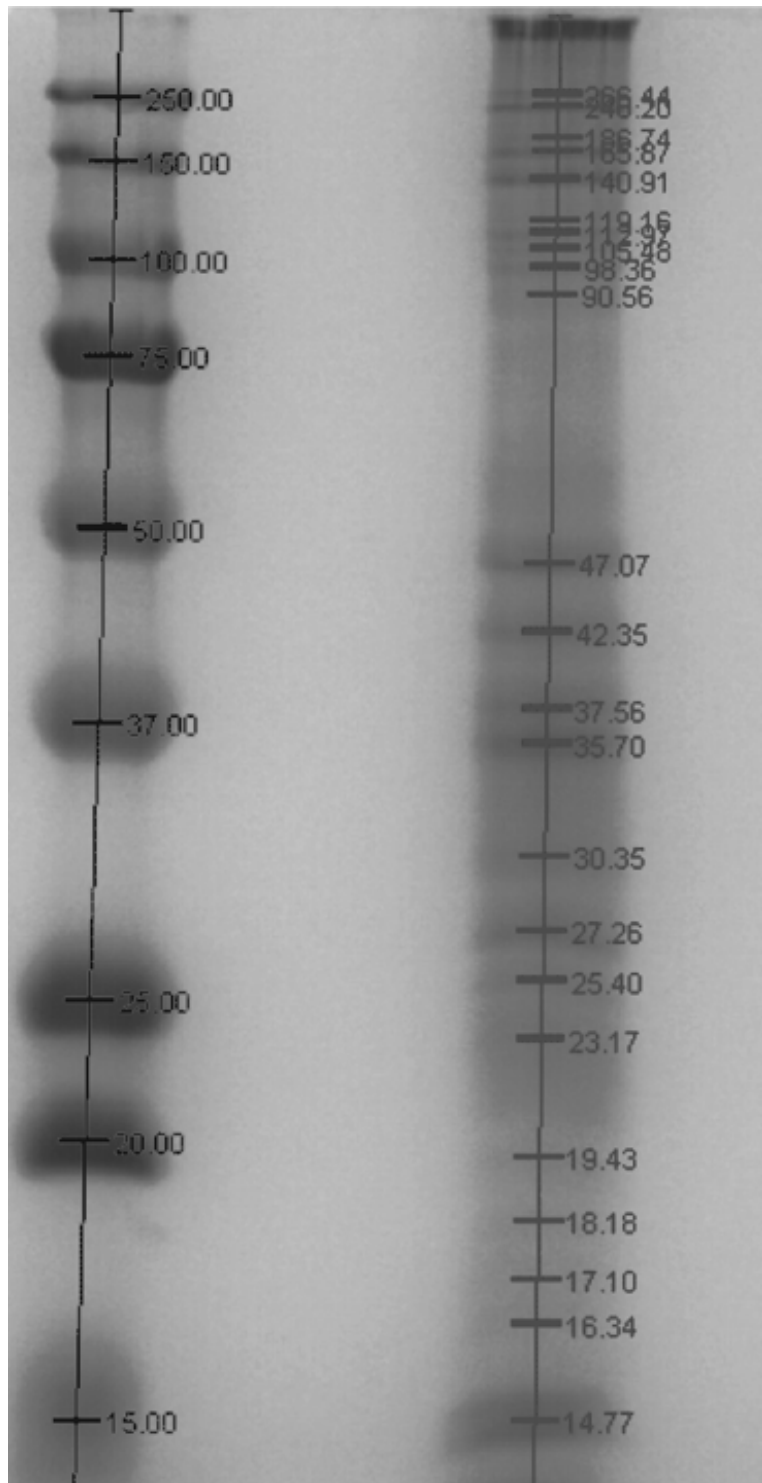


**Figura 13.** Distribuição das médias das frequências dos oocistos esporulados de *Cystoisospora felis* recuperados de fezes de gatos experimentalmente infectados. (a) Diâmetro maior, (b) Diâmetro menor e (c) Índice morfométrico.

### 4.3 COMPLEXOS PROTÉICOS DE OOCISTOS ESPORULADOS DE *C. felis* OBTIDOS ATRAVÉS DE SDS-PAGE A 12%

Na análise do gel a 12% foram detectadas, 25 bandas proteicas, nos zimogramas do extrato de antigênico de *C. felis*. Das bandas identificadas seus valores foram calculados a partir do programa Quantity One®<sup>P</sup> e obtiveram-se os seguintes pesos moleculares aproximados: 266; 240; 186; 165; 140; 119, 112, 105, 98, 90, 78, 55, 47, 42, 37, 35, 30, 27-28, 25, 22, 19, 18, 16, 17, 14 KDa. Dentre estas as 140, 47, 42, 37, 35, 30, 27 KDa foram complexos proteicos mais fortemente identificados nos zimogramas desta corrida, apresentando pico da quantidade relativa de concentração das bandas de 2,1; 3,5; 3,2; 2,6;3,1; 3,6; 3,3 % respectivamente, esses valores foram obtidos pelo mesmo programa supracitado. Os resultados obtidos neste trabalho diferem em parte dos obtidos por De Meireles (2009), das bandas identificadas do extrato antigênico que apresentaram similaridade foram as de 27, 30, 37, 97-98, 111-113 KDa. Esta diferença pode estar relacionada ao processo diferente usado para obtenção do extrato antigênico de *C. felis*. Antes era utilizando um sonificador ultrassônico de ponta na frequência de 60 Hz e devido à alta concentração de oocistos este processo acabava sendo muito demorado, de 130 a 150 ciclos, provavelmente danificando as primeiras proteínas obtidas, levando a formação de várias sub-unidades de uma mesma proteína e degenerando outras. Neste trabalho, a metodologia utilizada, já descrita no material e métodos (item 3.2.3.), agilizou o processo para obtenção do extrato antigênico diminuindo para 12 o numero de ciclos, associado à utilização de um novo inibidor de protease, o qual confere maior estabilidade da proteína no período de armazenagem e conferindo maior nitidez das bandas no gel (Figura 14).

Do extrato antigênico total obtido neste trabalho foi encontrada a proteína de -22 KDa, semelhante a obtida por Omata et al. (1991b) onde identificou essa proteína a partir do imunoblotting com esporozoítas de *C. felis* em soro de gatos experimentalmente infectados por via oral com oocistos deste parasito.



**Figura 14.** SDS-PAGE a 12% de proteínas de oocistos esporulados de *Cystoisospora felis*

Sabe-se que oocistos e esporozoítas de *T. gondii* têm duas bandas protéicas com peso molecular aproximado 25 e 67 KDa, as quais são ausentes em taquizoítas (KASPER; WARE, 1985). A proteína de 25 KDa do presente trabalho de produto esporulado de *C. felis* podem dividir similaridades com as de oocistos e esporozoítas de *T. gondii*, baseando-se nas relações taxionômicas relativamente homofiléticas entre as espécies de *Cystoisospora* e *T. gondii* (SMITH, 1981; CARRENO, et al., 1998; SAMARASINGHE, et al., 2008).

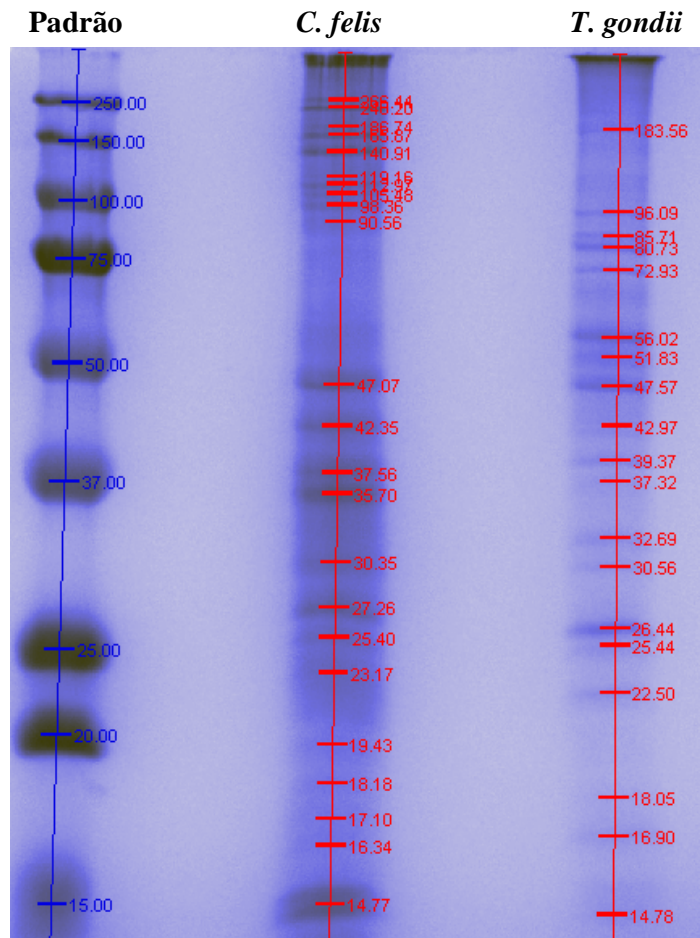
Diversos estudos relacionados à identificação de antígenos e proteínas constituintes de diferentes fases do ciclo biológico de *T. gondii* têm sido estudados. As proteínas encontradas neste trabalho de 14; 22; 30; 43 e 97 KDa são frequentemente encontrados em taquizoítas da cepa C e RH de *T. gondii*. Entretanto, determinados complexos protéicos de esporozoítas de *T. gondii* têm sido identificados como específicos para esporozoítas de *T. gondii* (KASPER et al., 1983; KASPER et al, 1985). Tais proteínas têm sido observadas com pesos moleculares de 25 e 67 KDa. Flausino et al. (1997), ao avaliar proteínas constituintes de taquizoítas da cepa C congênita e da “SERO-47” de *T. gondii* isolada de cérebro e coração de galinhas, observaram grupos comuns de 30; 34,7; 43; 50; 58; 67; 80; 97 KDa. A semelhança destes trabalhos o grupo protéico de 30, 35, 43 e 97-98 KDa foram evidenciadas no presente trabalho no extrato total oocistos esporulados de *C. felis*.

No trabalho de identificação e caracterização de antígenos úteis da taquizoítas de *Neospora caninum* (NC-1) para o diagnóstico conduzido por Bjerkas et al. (1994) foram evidenciadas como bandas proteicas de importância as seguintes: p17, p29, p30 e p37. Proteínas essas, importantes antígenos para diagnóstico da Neosporose em uma variedade de espécies animais. Assemelhando-se a estes resultados, também foram identificadas neste trabalho as seguintes bandas imunodominantes: p17, p30 e p37. Sendo a p17 associada às roptrias, organelas encontradas nos estádios infectantes de todos os coccídios e acredita-se que a liberação desta proteína esteja associada a penetração celular de acordo com estudos feitos com *T. gondii* (DUBREMETZ, et al., 1985, SPEER, et al., 1999). A p29-30 estaria associada a grânulos densos e proteína tubular e a membrana do vacúolo parasitóforo. Em *T. gondii* e outros coccídios, a secreção dos grânulos densos seria considerado como fator crucial na formação do vacúolo parasitóforo, uma estrutura característica importante dos parasitas protozoários para evasão do sistema imune, sua sobrevivência e desenvolvimento no meio intracelular dos hospedeiros (LERICHE; DUBREMETZ, 1991; TORII, et al., 1989; SANTORO, et al., 1985). Por último a p37 seria caracterizada como um componente amorfo associado a membrana de superfície do taquizoito de NC-1 (DUBREMETZ, et al., 1985).

Mesmo com o grande conhecimento acerca de constituintes protéicos e antigênicos de outras espécies da família Sarcocystida, em especial *T. gondii*, muito pouco se sabe ainda sobre o mesmo em espécies do gênero *Cystoisospora* e sua inter-relação com os demais coccídios desta família.

#### 4.4 Complexos protéicos de oocistos esporulados de *Cystoisospora felis* comparados taquizoítas de *Toxoplasma gondii* obtidos através de sds-page a 12%

Quando os complexos proteicos de *C. felis* foram comparados aos complexos obtidos de taquizoítas de *T. gondii* Cepa RH, foi possível observar uma similaridade em cinco proteínas de peso molecular aproximado de 47, 42, 37, 30, 25, 16-17 e 14 KDa. Devido a sua proximidade filogenética foi possível observar que os dois parasitos dividem proteínas comuns o que dificultaria a determinação do diagnóstico quando as mesmas forem usadas como antígeno para diagnóstico. Por esse motivo, se faz importante o conhecimento dessas bandas proteicas para sua exclusão quando se aplicar o teste imunoenzimático, observando a resposta imunodominante de anticorpos comuns, a semelhança do trabalho desenvolvido por Bjerkas et al. (1994).



**Figura 15.** SDS-PAGE a 12% de proteínas de oocistos esporulados de *Cystoisospora felis* e Taquizoítas de *Toxoplasma gondii*. À esquerda, padrões de peso molecular, ao centro proteínas de oocistos esporulados de *C. felis* e a direita proteínas de taquizoitos de *T. gondii* em quilodaltons (KDa), coradas pelo azul de Coomassie 250R.



#### 4.5 Análise soro controle positivo em bovinos contra soro controle positivo e soro hiperimune em coelhos anti-*Cystoisospora felis*

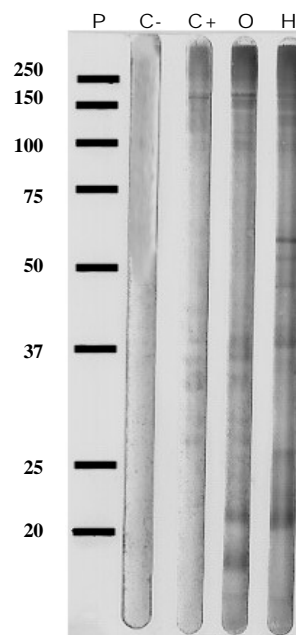
Como o material utilizado para diagnóstico foi o extrato antigênico total contendo proteínas tanto de parede, como de estruturas internas e esporozoítas. O soro controle positivo e o hiperimune são desafiados junto aos antígenos específicos de *C. felis* tornando possível diferenciar quais bandas seriam de estruturas internas ou do esporozoíta. Sendo este ultimo de maior importância, a partir dele ocorre a penetração celular, com isso o esporozoíta é responsável pelo estabelecimento da infecção,.

Foi encontrada a resposta imunodominante de anticorpos direta contra as seguintes proteínas, listados na tabela abaixo:

**Tabela 2.** Comparação da resposta das bandas proteicas dominantes em soros anti-*Cystoisospora felis*

Itens	Soros Testados		
	Bovino Oral	Coelho Oral	Coelho Hiperimune
1	208	227	220
2	138	208	197
3	113	186	186
4	106	126	144
5	62	113	113
6	56	106	106
7	51	41	70
8	48	38	60
9	44	34	55
10	38	30	48
11	36	28	40
12	33	24	38
13	30	21	35
14	27	18	32
15	-	16	28
16	-	-	26
17	-	-	23
18	-	-	21
19	-	-	16

Baseado nos resultados observados no ensaio comparado das respostas entre o soro controle positivo e o hiperimune desenvolvido em coelhos foi possível observar que as respostas imunodominantes de anticorpos, evidenciaram proteínas tanto de baixo, como alto peso molecular. Sendo que no soro hiperimune seria a reação estimulada a toda e qualquer proteína constituinte da estrutura do oocisto. Quando comparamos esta resposta contra a do soro controle positivo em coelho, observamos haver a resposta antigênica contra a forma de penetração celular, o que indicaria pertencer aos esporozoítas. Sendo as que determinaram forte reatividade: 227, 208, 186, 126, 113, 106, 41, 38, 34, 30, 28, 24, 21, 18, 16 KDa. Quando se coloca a resposta antigênica do soro controle positivo em bovinos frente ao soro controle positivo de coelhos, observa-se resposta similar quanto ao reconhecimento de bandas proteicas, tanto de alto como de baixo peso molecular, indicando também pertencer aos esporozoítas. Tendo em comum resposta a estas bandas imunodominantes: 27-28, 30, 38, 106, 113, 208 KDa. Contudo, mais investigações com soro anti-esporozoíta de *C. felis* e anticorpos monoclonais específicos precisam ser feitos para confirmar esta hipótese.



**Figura 16.** Resultado do “ Western blotting” (C+) soro controle positivo em bovinos, (o) Soro infecção Oral e (H) Soro hiperimune em coelhos anti-*Cystoisospora felis*.

#### 4.6 Resultados do teste de imunodeteccção em situação experimental

No “Western blotting”, quando as amostras de soro heterólogo anti-*C. felis* foram testadas apresentaram um perfil antigênico de *C. felis* gradual de acordo com a progressão da infecção. Foram testadas amostras sanguíneas com: dia zero, 1°, 3°, 7°, 14°, 21°, 28° e 35° dias após infecção (DAI) do bezerro experimentalmente infectado com extrato total de oocistos esporulados de *C. felis* via oral. Foram tomados para fins de frequência e comparação, os

valores da fase recente (14° DAI) e da fase latente (35° DAI) onde, pôde-se então observar uma resposta imunodominante de anticorpos direta contra as seguintes ptns: 208, 138, 113, 105-107, 62, 56, 51, 48, 44, 37-38, 36, 33, 30, 27 KDa (Tabela 3). Das amostras sanguíneas coletadas do bezerro, pôde-se evidenciar a progressão da resposta imune contra o parasito, indicando que o parasito fez penetração celular e desenvolvimento de cistos monozóicos em tecido extra-intestinal, com conseqüente estabelecimento da infecção.

**Tabela 3.** Distribuição das bandas do imunoblotting anti-*Cystoisospora felis* de um bovino infectado experimentalmente via oral com 10<sup>6</sup> oocistos esporulados.

Itens	Proteínas (KDa)			Infecção		Comum à ambas
	Dias Após Infecção			Recente	Latente	
	0	14°	35°			
1	-	273			X	
2	-	208	208			X
3	-	212			X	
4	-	138	-	X		
5	-	113	113			X
6	-	106	106			X
7	-	62	-	X		
8	-	56	-	X		
9	-	51	-	X		
10	-	48	48			X
11	-	44	44			X
12	-	38	-	X		
13	-	36	-	X		
14	-	33	-	X		
15	-	30	-	X		
16	-	27	-	X		

**4.7. COMPARAÇÃO DAS RESPOSTAS DOS SOROS CONTROLE POSITIVO *Neospora* e *Toxoplasma* FRENTE AO ANTÍGENO DE *Cystoisospora***

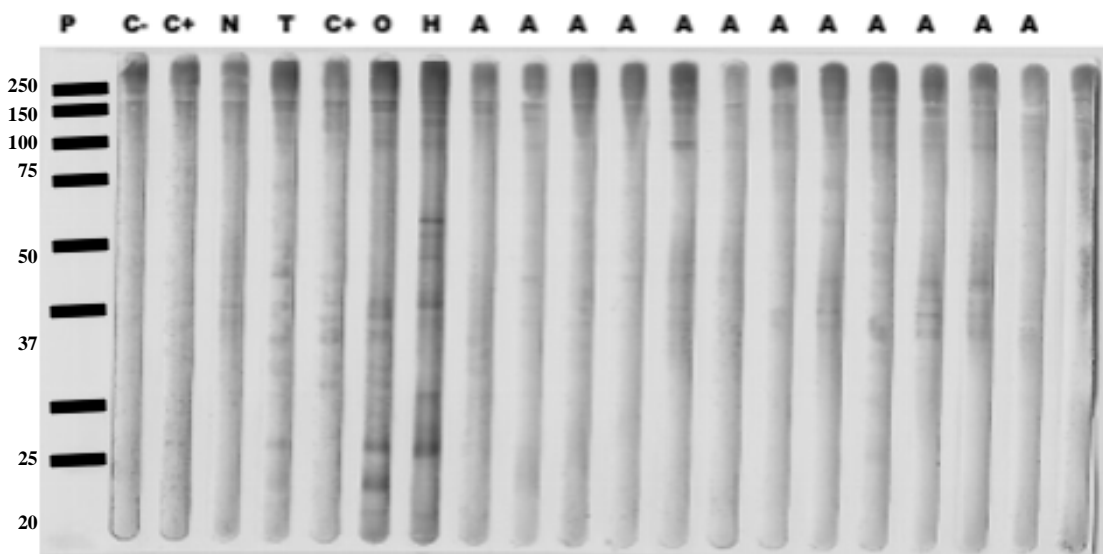
A partir do “Western Blotting”, foram jogados frente ao antígeno de *C. felis* os respectivos soro controle positivos e a comparação do perfil antigênico de *Cystoisospora* com o perfil de *Neospora* e *Toxoplasma* foi feita, por serem mais filogeneticamente próximos, com isso foi possível eliminar as bandas comuns (Tabela 4) que poderiam implicar em uma reação cruzada entre alguns polipeptídeos constituintes de sua estrutura, para selecionar as bandas responsáveis pelo diagnóstico específico de *Cystoisospora felis*, como o observado por Araújo et.al. (1984). Nesse sentido foram listadas todas as bandas proteicas imunodominantes detectadas no programa Quantity One® conforme tabela abaixo:

**Tabela 4.** Perfil dos polipeptídios imunodominantes dos respectivos soros controle positivos.

Itens	Soros Teste		
	Bovino	Bovino	Bovino
	anti- <i>Cystoisospora</i> KDa	anti- <i>Toxoplasma</i> KDa	anti- <i>Neospora</i> KDa
1	208	192	215
2	138	61	75
3	113	56	51
4	106	49-51	48
5	61-62	47-48	44
6	56	45	38
7	51	43-44	33
8	48	41	30
9	43-44	37-38	29
10	36-38	35	26
11	33	33	25
12	30	-	21
13	27	-	18
14	-	-	16

De acordo com os dados obtidos através do ensaio imunoenzimático e exposto na tabela acima foi possível determinar quais as bandas em comum, entre o soro controle positivo anti-*Cystoisospora* e anti-*Toxoplasma*, sendo estas com peso molecular aproximado de: 61, 56, 49-51, 47-48, 43-44, 37-38, 33 KDa.

Quando comparados, o soro controle positivo anti-*Cystoisospora*, anti-*Toxoplasma* e anti-*Neospora* (Figura 16), as bandas proteicas comuns foram: 51, 48, 44, 37-38, 33, 30 KDa. Como estes parasitos são pertencentes a mesma família, são intracelulares obrigatórios, possuem os mesmos mecanismos de transmissão estas proteínas podem estar relacionadas as estruturas internas comuns.



**Figura 17.** Resultado do teste de ‘Western Blotting’ em soro de Bovino controle positivo para *Neospora*, *Toxoplasma* e *Cystoisospora*. (P) Padrão 250, (C-) Soro controle negativo, (C+) Soro controle positivo *C. felis*, (N) Soro controle positivo *Neospora*, (T) Soro controle *Toxoplasma*, (A). Amostras provenientes de propriedades de aptidão leiteira da mesoregião de Rio Claro, estado Rio de Janeiro, infectados naturalmente.

Corroborando com os resultados de trabalhos anteriores (LERICHE; DUBREMETZ, 1991; TORII, et al., 1989; CHARIF, et al., 1990; VERHOFSTEDDE et al., 1988; WARE; KASPER, 1987), na execução da técnica enzimática, também foi possível identificar a p29-30, provavelmente associada a grânulos densos, proteína tubular e a membrana do vacúolo parasitóforo e por ser comum a todos os coccídios analisados. Também foi encontrada neste

trabalho a p37-38, que em imunoenaios de fixação encontrou-se associada a proteína de superfície da membrana de taquizoítas e foi evidenciada no soro de vacas, mesmo após 14 meses de infecção. Sendo possível que este antígeno detectado seja proveniente de formas latentes de infecção do parasita (BJERKAS, et al., 1994).

Após essa análise foi possível, evidenciar o perfil proteico específico de *Cystoisospora felis*, conferindo um diagnóstico mais sensível e específico para este parasito. Os polipeptídeos marcadores de peso molecular aproximado foram as seguintes: p206-208, p137-139, p112-113, p104-107, p27-28, responsáveis por determinar a positividade dos animais testados para *Cystoisospora felis* naturalmente infectados.

#### **4.8 Resultados do Teste de Imunodeteção em Condição de Infecção Natural**

Para padronização das respostas antigênicas quando aplicado ao soro homólogo em bovinos oriundos de propriedades de aptidão leiteira, frente ao immunblotting (Figura 17) e consequente caracterização do animal positivo. Foi observada a frequência das cinco bandas evidenciadas como realmente específicas ao parasita de estudo, sendo elas: p206-208, p137-139, p112-113, p104-107, p27-28, doravante chamadas de Ptn 1, Ptn 2, Ptn 3, Ptn 4 e Ptn 5. Pôde-se observar conforme tabela 5, uma frequência maior das bandas da Ptns 2, Ptn 4 e Ptn 5. Evidenciando a Ptn 5 como de maior importância para o diagnóstico, assemelhando-se ao realizado por Galván-Ramires et al. (1998) onde analisa a frequência de antígenos imunodominantes em soro de humanos *Toxoplasma* positivos e evidencia duas bandas de importância para diagnóstico e por Freschi et al. (2005). Devido sua maior frequência e maior reatividade, a Ptn 5, de menor peso molecular poderia estar relacionada com uma proteína marcadora da resposta específica em bovinos ao parasito deste estudo. Resultado semelhante ao encontrado por Omata, et al. (1991b) onde caracteriza a menor banda de 22 KDa como sendo a marcadora da resposta específica anti-*C. felis* em gatos experimentalmente infectados.

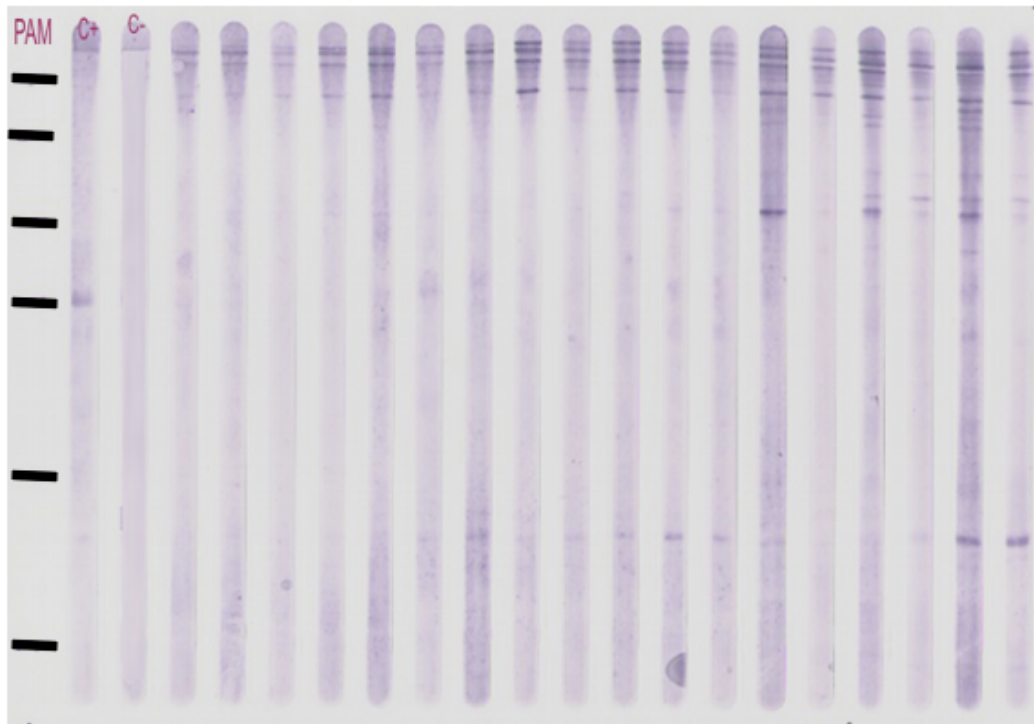
Dos 364 animais testados pelo método de imunodeteção padronizada para *C. felis* 231 apresentaram reação à ao menos uma dentre as cinco proteínas destacadas, representando uma frequência de 63,5% do total de animais testados. Contudo para a confirmação da positividade dos animais testados foram tomadas como referência a presença obrigatória da Ptn 5 associada ou não a presença das outras proteínas e a expressão das bandas que se revalaram com maior ou menor intensidade, podendo esta reação ser atribuído a concentração de antígenos produzidos pelo organismo hospedeiro, tornando a interação antígeno e anti-corpo mais intensa.

Muitos outros polipeptídeos imunodominantes foram evidenciados nos soros dos animais infectados naturalmente e não foram reconhecidos dentro do grupo de antígenos padronizados como específicos de *C. felis*. Outra hipótese está relacionada ao fato da propriedade apresentar condições de higiene precárias, estes animais de criações rústicas, com manejo ruim e alta promiscuidade com outros animais, poderia facilitar o contato com outros tipos de parasitos, que por ventura poderiam dividir similaridade entre as proteínas constituintes da parede de oocistos e esporozoítos de *C. felis*. Outra hipótese ainda, que poderia ser levantada, em relação a estes grupos antigênicos, poderiam se tratar de uma

“cepa” diferente do mesmo parasito, que pelo fato de estar se mantendo de maneira livre no ambiente, sem a intervenção de fatores limitantes e em a associação com outros tipos de coccídios, possa apresentar outros grupos antigênicos.

**Tabela 5.** Frequência das cinco bandas proteicas específicas de *Cystoisospora felis*, observadas em soros bovinos coletados da região de Rio Claro.

Valores em KDa	Frequência (n=364)
Ptn 1 (206-208)	5,22%
Ptn 2 (137-139)	11,81%
Ptn 3 (112-113)	9,62%
Ptn 4 (104-107)	15,11%
Ptn 5 (26-28)	46,15%



**Figura 18.** Teste de ‘Western blotting’ em soro de Bovinos, provenientes de propriedades de aptidão leiteira da mesoregião de Rio Claro, estado Rio de Janeiro, infectados naturalmente. (PAM) Padrão de Alto Peso Molecular, (C+) Controle positivo, (C-) Controle Negativo e da canaleta 03 a 18 - Soro de bovinos oriundo de propriedades de aptidão leiteira)

#### 4.9 EPIDEMIOLOGIA DA *Cystoisospora felis* NO REBANHO LEITEIRO

Quando as informações foram extraídas do questionário epidemiológico (Anexo 1), foi possível identificar algumas variáveis que influenciaram diretamente na ocorrência da infecção deste agente etiológico no gado leiteiro da região onde, foi possível analisar a frequência e a significância das variáveis analisadas.

Para ocorrência da infecção a variável biológica, felídeos, deve obrigatoriamente estar presente, conforme o analisado na tabela 6, sendo possível avaliar que a prevalência da



infecção não está associada ao sexo (Tabela 7) e nem a faixa etária (Tabela 8) dos animais testados. A associação da variável biológica e seu contato direto com o alimento (Tabela 9), a água (Tabela 10) ou com o próprio animal (Tabela 11), foram significativamente importantes para a ocorrência e dispersão da doença, bem como a presença de felinos silvestres circulantes nas propriedades (Tabela 12).

Na tabela 13 observa-se que o número de gatos presentes nas propriedades influencia diretamente na ocorrência da infecção, bem como o manejo (Tabela 14) e o tipo de ordenha (Tabela 15) utilizado na propriedade e uma maior ocorrência da infecção em propriedades menores (Tabela 16), a seguir:

**Tabela 6.** Associação entre a presença de gatos e bovinos soropositivos ao Western Blotting para *Cystoisospora felis*.

Nº de gatos presentes	Soro		$\chi^2$	Valor de $p$	Razão de chances (OR)	Intervalo de Confiança 95%
	Positivo	Negativo				
0	46	42				
1	62	45				
2	19	12	50,17 <sup>a</sup>	0,0001	1,15	0,7727-4,083 <sup>b</sup>
3	03	21				
4	10	20				
5	09	14				
6	20	04				
>11	04	08				
>12	23	02				
Total	196	168				

<sup>a</sup> Com correção de Yates

<sup>b</sup> Com aproximação de Woolf

**Tabela 7.** Associação entre a presença de bezerros soropositivos ao Western Blotting para *Cystoisospora felis* em relação ao sexo.

Variáveis	Animais	$\chi^2$	Valor de $p$	Razão de chances (OR)	Intervalo de Confiança 95%			
Machos	Positivo	28	0,5749 <sup>a</sup>	0,4483	0,72			
	Negativo	31						
Fêmeas	Positivo	39						
	Negativo	31						
Total		129						0,61 – 1,20 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Com correção de Yates

<sup>b</sup> Com aproximação de Woolf

**Tabela 8.** Associação entre a presença de animais soropositivos ao Western Blotting para *Cystoisospora felis* em relação a idade.

Variáveis	Soros	$\chi^2$	Valor de $p$	Razão de chances (OR)	Intervalo de Confiança 95%			
Bezerros	Positivo	67	2,107 <sup>a</sup>	0,1466	1,41			
	Negativo	62						
Vacas	Positivo	102						
	Negativo	133						
Total		364						0,89 – 2,22 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Com correção de Yates

<sup>b</sup> Com aproximação de Woolf

**Tabela 9.** Associação da presença do gato e seu contato direto com o alimento do bovino em relação aos animais soropositivos ao Western Blotting para *Cystoisospora felis*

Nº gatos	Western Blotting		$\chi^2$	Valor de <i>p</i>
	Positivo	Negativo		
0	0	0		
1	17	12		
2	19	12		
3	3	21		
4	0	0	47,44	0,0001
5	9	14		
6	20	4		
>11	4	8		
>12	23	2		
Total	95	73		

**Tabela 10.** Associação da presença do gato e seu contato direto com a água do bovino em relação aos animais soropositivos ao Western Blotting para *Cystoisospora felis*

Nº gatos	Western Blotting		$\chi^2$	Valor de <i>p</i>
	Positivo	Negativo		
0	0	0		
1	0	0		
2	0	0		
3	0	0		
4	10	20	32,02	0,0001
5	9	14		
6	20	4		
>11	4	8		
>12	23	2		
Total	66	48		

**Tabela 11.** Associação da presença do gato e seu contato direto com o bovino em relação aos animais soropositivos ao Western Blotting para *Cystoisospora felis*

Nº gatos	Western Blotting		$\chi^2$	Valor de <i>p</i>
	Positivo	Negativo		
0	0	0		
1	17	12		
2	19	12		
3	3	21		
4	10	20	49,46	0,0001
5	9	14		
6	20	4		
>11	4	8		
>12	23	2		
Total	105	93		

**Tabela 12.** Associação da presença de felinos silvestres e animais sororeativos ao Western Blotting para *Cystoisospora felis*.

Felinos silvestres	soros	Valor de <i>p</i>	Razão de chances (OR)	Intervalo de Confiança 95%
Presença	Positivo	174		
	Negativo	135	0,036 <sup>a</sup>	1,93
Ausência	Positivo	22		
	Negativo	33		
Total		364		

<sup>a</sup> Com correção de Yates

<sup>b</sup> Com aproximação de Woolf

**Tabela 13.** Associação entre a presença de gatos e propriedades e bovinos soropositivos ao Western Blotting para *Cystoisospora felis*

Propriedade	Nº Gatos	Soros		$\chi^2$	Valor de <i>p</i>
		Positivo	Negativo		
A	6	20	4	58,83 <sup>a</sup>	0,0004
B	0	15	5		
C	0	9	14		
D	>11	4	8		
E	1	15	16		
F	1	21	10		
G	0	5	7		
H	>12	23	2		
I	0	17	16		
J	1	17	12		
L	2	19	12		
M	3	3	21		
N	1	9	7		
O	5	9	14		
P	4	10	20		

<sup>a</sup> Com correção de Yates

**Tabela 14.** Associação do tipo de manejo utilizado na propriedade com os bovinos sororeativos ao Western Blotting para *Cystoisospora felis*.

Tipo de manejo	Soros		$\chi^2$	Valor de <i>p</i>
	Positivo	Negativo		
<sup>a</sup> Excelente-bom	33	26	17,27	0,0002
<sup>b</sup> Satisfatório-ruim	108	123		
<sup>c</sup> Ruim	55	19		
Total	196	168		

<sup>a</sup> Ordenha mecanizada, Limpeza diária, controle sanitário

<sup>b</sup> Ordenha manual, limpeza após uso das instalações, sem controle sanitário

<sup>c</sup> Ordenha manual, não faz limpeza, sem controle sanitário

**Tabela 15.** Associação do tipo de ordenha utilizado na propriedade e o resultado dos bovinos soropositivos ao Western Blotting para *Cystoisospora felis*.

Tipo da ordenha	Soros		$\chi^2$	Valor de $p$
	Positivo	Negativo		
Manual	110	89	16,54	0,0002
Aberta	26	36		
Fechada	32	71		
Total	168	196		

**Tabela 16.** Associação entre os resultados soropositivos ao Western Blotting para *Cystoisospora felis* pelo hectare da propriedade.

Hectare	Western Blotting		$\chi^2$	Valor de $p$
	Positivo	Negativo		
12,1-37,1	56	26	47,04	0,0001
62,1-87,1	52	73		
137,1-162,1	28	18		
162,1-187,1	2	23		
237,1-262,1	4	20		
337,1-362,1	10	21		
462,1-487,1	16	15		
Total	168	196		

## 5. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A técnica de “Western Blotting” mostrou-se eficaz na detecção de grupos antígenos anti-*C. felis* nas amostras sorológicas coletadas de animais naturalmente infectados. Possibilitando ainda determinar quais bandas são imunodominantes, sendo elas: p206-208, p137-139, p112-113, p104-107, p27-28.

Dentre o total de animais testados, foi possível identificar 63,2% de animais reativos a pelo menos uma das cinco proteínas de interesse, mas foram identificados 46,2% como realmente positivos, quando identificada a presença da proteína cinco associada ou não a presença das outras proteínas. Com isso, pode-se considerar a técnica eficaz para esse tipo de diagnóstico. Associado a isso os dados epidemiológicos obtidos nos questionários aplicados junto aos proprietários, pode-se evidenciar os fatores determinantes da dispersão natural deste parasita no ambiente.

É importante assinalar aqui que, a permanência de felinos em áreas comuns de produção animal, não só se torna importante para a espécie *T. gondii* dado seu caráter zoonótico, mas também a outros coccídios como o estudado no presente trabalho, uma vez que dividem o mesmo ciclo epidemiológico de infecção e dispersão. Tais como, infecção *per os*, carnivorismo o que faz com que felinos domesticados ou silvestres participem deste contexto.

## 6. CONCLUSÕES

1. A associação das técnicas de limpeza adaptadas para oocistos esporulados de *C. felis*, forneceram um material mais íntegro, e livre de microbiota fecal, contribuindo para o uso deste material na caracterização fenotípica e no diagnóstico pelo “Western Blotting”.
2. Foram evidenciados no “Western Blotting” os grupos antigênicos de peso molecular aproximado: 208, 138, 113, 104-107, 62, 56, 51, 48, 44, 37-38, 36, 33, 30, 27 KDa. Sendo evidenciados como específicos de *Cystotisospora*, após sua comparação entre o soro controle positivo anti-*Toxoplama* e anti-*Neospora*, permitindo o diagnóstico da infecção natural através da reação contra os polipeptídeos imunodominantes: p206-208, p137-139, p112-113, p104-107, p27-28 deste parasito confirmando a infecção.
3. A utilização do “Western Blotting” anti-*C. felis* foi eficaz, para detecção de antígenos de *C. felis* em bovinos naturalmente infectados, determinando com isso a capacidade destes animais serem portadores de infecção natural.
4. A partir das análises das variáveis foi possível observar que a presença de felinos, associado ao manejo, tipo de ordenha e tamanho das propriedades facilita a dispersão de *C. felis* nas propriedades. Sendo a presença de felídeos o fator mais relevante como dispersor desta coccidiose, indicando que o processo de contaminação está veiculado aos oocistos esporulados através da infecção feco-oral e não a faixa etária dos animais.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C. *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins. Fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos*. 1ª ed., Viçosa: EUFV, 1998. 574p.
- AMARAL, V.; AMARO, R.G.; BIRGEL, E.H. Ocorrência da *Isospora felis* Wenyon, 1923, em suçuarana (*Puma concolor*). *Revista da Sociedade Paulista de Medicina Veterinária*, v. 4, n. 1, p. 25-28, 1966.
- ANDRADE, C.M. *Meios e soluções comumente empregados em laboratórios*. 1ª ed., Seropédica: EDUR, 2000. 353p.
- ANDREWS, A.T. *Eletrophoresis: theory, techniques, and biochemical and clinical applications*. Monographs on Physical Biochemistry. Oxford: Clarendon Press. 1981. 336p.
- ARAÚJO, F. G.; DUBEY, J. P.; REMINGTON, J. S. Antigenic similarity between the coccidian parasites *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi*. *Journal of Protozoology*, v. 31, n. 1, p. 145-147, 1984.
- ARROWOOD, M.J.; STERLING, C.R. Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic percoll gradients. *Journal of Parasitology*, v. 73, n. 2, p. 314-319, 1987.
- BARBER, J.S.; TREES, A.J. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *International Journal for Parasitology*, v. 28, n. 1, p. 57-64, 1998.
- BARRETTO, J.F.; ALMEIDA, J.L. de. Primeiras observações sobre a presença de *Isospora felis* Wenyon, 1923 (Protozoa-Eimerídiá) em felídeos no Brasil. *Boletim da Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 8, n. 2, p. 357-360, 1937.
- BEAVER, P. C.; GADGIL, R. K.; MORERA, P. *Sarcocystis* in man: a review and report of Five cases. *The American journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 28, n. 5, p. 819-844, 1979.
- BERTO, P.B.; LOPES, B. DO B.; FLAUSINO, W.; TEIXEIRA-FILHO, W.L, LOPES, C.W.G. Contribution on the study of *Isospora hemidactyli* Carini, 1936 and a report of an adeleid pseudoparasite of the house gecko *Hemidactylus mabouia*, from Rio de Janeiro metropolitan region, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, n. 3, p. 150 - 154, 2008.

- BJERKAS, I.; JENKINS, M. C.; DUBEY, J. P. Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of Neosporosis. *American Society for Microbiology*, v. 1, n. 2, p.214-221, 1994.
- BOX, E.D. *Isospora* as an extraintestinal parasite of passerine birds. *Journal of Protozoology*, v. 28, n. 2, p. 244-246, 1981.
- BOX, E.D. Life cycles of two *Isospora* species in the canary, *Serinus canarius* Linnaeus. *Journal of Protozoology*, v. 21, n. 1, p. 57-67, 1977.
- BOX, E.D.; MARCHIONDO, A.A.; DUSZYNSKI, D.W.; DAVIS, C.P. Ultrastructure of *Sarcocystis* sporocysts from passerine birds and opossums: comments on classification of the genus *Isospora*. *Journal of Parasitology*, v. 66, n. 1, p. 68-74, 1980.
- BRÖSIGKE, S.; HEINE, J.; BOCH, J. DER NACHWELS Extraintestinalen entwicklungstadien (dormozoitien) in experimentall mit *Cystoisospora rivolta* oozysten infierten mause. *Klientier Praxis*, v. 27, n. 1, p. 25- 34, 1982.
- BURNETTE,W.N. “Western Blotting”: Eletrophoretic transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A. *Analytical Biochemistry*, n.112, p. 195 – 203, 1981.
- CARRENO, R.A.; SCHNITZLER, B.E.; JEFFRIES, A.C.; TENTER, A.M.; JOHNSON, A.M.; BARTA, J.R. Phylogenetic analysis of coccidia based on 18S rDNA sequence comparison indicates that *Isospora* is most closely related to *Toxoplasma* and *Neospora*. *Journal of Eukariotic Microbiology*, v. 45, n. 2, p. 184-188, 1998.
- CARVALHO FILHO, P. R. de. *Caracterização fenotípica dos estágios exógenos de Cystoisospora felis (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae)*. Seropédica; UFRRJ, 2005. 71p. Dissertação (Ciências Veterinárias) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2005.
- CARVALHO FILHO, P.R.; FLAUSINO; W.; LOPES, C.W.G. Electrophoretic protein pattern of *Cystoisospora felis* (WENYON, 1923) FRENKEL, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae) sporulated oocysts. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 13, n. 4, p. 173-175, 2004.
- CARVALHO FILHO, P.R.; MELO, P.S.; MASSAD, F.V.; LOPES, C.W.G. Determinação da infecção de suínos por *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae) através de prova biológica em felinos livres de coccídios. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 12, n. 1, p. 7-12, 2003.

- CIDE – Fundação Centro de Informação e Dados do Rio de Janeiro. Atualmente CEPERJ. Disponível em: <<http://www.cide.rj.gov.br/>> Capturado em: 25 de mar. 2009.
- CFMV – CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. Legislação. Disponível em: <[www.cfmv.org.br](http://www.cfmv.org.br)> Capturado em: 30 ago. 2006.
- CHARIF, H.; DARCY, F.; TORPIER, G.; CESBRON-DELAUW, M.F.; CAPRON, A. *Toxoplasma gondii*: characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. *Experimental Parasitology*, v. 71, n. 1, p. 114-124, 1990.
- CHESSUM, B.S. Reactivation of *Toxoplasma* oocyst production in the cat by infection with *Isospora felis*. *British Veterinary Journal*, v. 128, n. 7, p. 33-36, 1972.
- COBEA. Legislação & Ética. Disponível em: < [www.cobea.org.br/etica.htm](http://www.cobea.org.br/etica.htm) >. Capturado em: 25 Jul. 2006.
- CORLISS, J.O. An interim utilitarian (“User-friendly”) hierarchical classification and characterization of the protists. *Acta Protozoologica*, v. 33, n. 1, p. 1-51, 1994.
- COSTA, C. A. F.; PEDROSO DE PAIVA, D. *Cultivo in vivo, in vitro e diagnóstico específico de Eimeria spp. Em Gallus gallus*. Brasília: Embrapa, 2009. 219p. [Informação tecnológica]
- COSTA, P.S. DA; LOPES, C.W.G. Avaliação do parasitismo por *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae) em coelhos do tipo carne. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 7, n. 1, p. 15-19, 1998.
- DE MEIRELES, G. S. *Padronização da técnica de ‘Western Blotting’ para diagnóstico da infecção por Cystoisospora felis (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae) em coelhos (Oryctolagus cuniculus)*. Seropédica; UFRRJ, 2009. 68p. Dissertação (Ciências Veterinárias) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.
- DUBEY J.P. *Toxoplasma, Hammondia, Besnoitia, Sarcocystis, and Other Tissue Cyst-Forming Coccidia of Man and Animals*, In: DUBEY, J.P. *Parasitic Protozoa.*, vol. 3, New York Academic press, p.101-237, 1977.
- DUBEY, J. P. *Toxoplasmosis of animals and humans*. 2a Ed. Boca Raton, CRC Press, 2010. 313p.
- DUBEY, J.P. Experimental *Isospora canis* and *I. felis* infection in mice, cats and dogs. *Journal of Protozoology*, v. 22, n. 3, p. 416-417. 1975.

- DUBEY, J.P. Intestinal protozoa infections. *Veterinary Clinic of North America: Small Animal Practice*, v. 23, n. 1, p. 37-55, 1993.
- DUBEY, J.P. Life cycle of *Isospora rivolta* (Grassi, 1879) in cats and mice. *Journal of Protozoology*, v. 26, n. 3, p. 433-443. 1979.
- DUBEY, J.P. Reshedding of *Toxoplasma* oocysts by chronically infected cats. *Nature*, v. 262, n. 5565, p. 213-214, 1976.
- DUBEY, J.P.; FRENKEL, J.K. Extra-Intestinal stages of *Isospora felis* and *I. rivolta* (Protozoa: Eimeriidae) in cats. *Journal of Protozoology*, v. 19, n. 1, p. 89-92. 1972.
- DUBEY, J.P.; FRENKEL, J.K. Toxoplasmosis of rats: a review with considerations of their values as an animal model and their possible role in epidemiology. *Veterinary Parasitology*, v. 77, n. 1, p. 1-32, 1998.
- DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; SAVILLE, W.J.A.; REED, S.M.; GRANSTROM, D.E.; SPEER, C.A. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). *Veterinary Parasitology*, v. 95, n. 2-4, p. 89-131, 2001.
- DUBREMETZ, J. F.; RODRIGUEZ, C.; FERREIRA, E. *Toxoplasma gondii*: redistribution of monoclonal antibodies on tachyzoites during host cell invasion. *Experimental Parasitology*, v.59, n. 1, p. 24-32, 1985.
- DUSZYNSKI, D.W.; COUCH, L.; UPTON, S.J. *Coccidia (Eimeridae) of Canidae and Felidae*, 2000. <<http://biology.unm.edu/biology/coccidia/carniv1.html>> Acesso em: 05 de julho de 2004.
- FAYER, R. Cultivation of feline *Isospora rivolta* in mammalian cells. *Journal of Parasitology*, v. 58, n. 6, p. 1207-1208, 1972.
- FAYER, R. Epidemiology of protozoan infections: the Coccidia. *Veterinary Parasitology*, v. 6, n. 1-2, p. 75-103, 1980.
- FAYER, R.; FRENKEL, J.K. Comparative infectivity for calves of oocysts of feline coccidia: *Besnoitia*, *Hammondia*, *Cystoisospora*, *Sarcocystis* and *Toxoplasma*. *Journal of Parasitology*, v. 65, n. 5, p. 756-762. 1979.
- FAYER, R.; THOMPSON, D.E. *Isospora felis*: development in cultured cells with some cytological observations. *Journal of Parasitology*, v. 60, n. 1, p. 160-168, 1974.

- FERGUSON, D.J.P.; BIRCH-ANDERSEN, A.; HUTCHINSON, W.M.; SIIM, J.C. Ultrastructural observations showing enteric multiplication of *Cystoisospora* (*Isospora*) *felis* by endodiogeny. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, v. 63, n. 3, p. 289-291, 1980.
- FLAUSINO, W.; SOARES, C.O.; FREIRE, R.B.; LOPES, C.W.G. Variações intraespecíficas de taquizoítas de *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) isolados de uma infecção natural e comparadas frente à cepa congênita. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 4, n. 3, p. 13-17, 1997.
- FRANZEN, C; MULLER, A.; BIALEK, R.; DIEHL, V.; SALZBERGER, B.; FATKENHEUER, G. Taxonomic position of the human intestinal protozoan parasite *Isospora belli* as based on ribosomal RNA sequences. *Parasitology Research*, v.86, n. 8, p. 669-676, 2000.
- FRAZÃO-TEIXEIRA, E.; OLIVEIRA, F. C. R. DE; FIUZA, V. R. DA S.; JIMÉNEZ-SANZ, A. L.; DETMANN, E. Compromised nutrition in gerbils infected by *Cystoisospora felis* detected through an animal performance analysis tool. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 20, n. 3, p. 242-245, 2011.
- FRAZÃO-TEIXEIRA, E.; OLIVEIRA, F.C.R. de ; LOPES, C. W. G.; DETMANN, E. Eficiência bionutricional de camundongos albinos experimentalmente infectados com *Cystoisospora ohioensis*. *Revista Universidade Rural: Ciências da Vida*, v. 24, supl. 1, p. 215-216, 2004.
- FREIRE, R.B.; LOPES, C.W.G. Avaliação da digestão enzimática por pepsina e tripsina na obtenção de hipnozoítas de *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Sarcocystieda). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 4, n. 1, p. 21-23, 1995a.
- FREIRE, R.B.; LOPES, C.W.G. Distribuição de hipnozoítas de *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Sarcocystieda) em camundongos albinos experimentalmente infectados. *Revista Brasileira Parasitologia Veterinária*, v. 5, n. 1, p. 23-28, 1996.
- FREIRE, R.B.; LOPES, C.W.G. Infecção experimental em camundongos neonatos com esporozoítas de *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Sarcocystieda). *Revista Brasileira Ciência Veterinária*, v. 2, n. 1, p. 33-34. 1995b.
- FREIRE, R.B.; LOPES, C.W.G. *In vitro* excystation of *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Sarcocystieda). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 4, n. 1, p. 15-19, 1995c.

- FRENKEL JK, DUBEY JP, HOFF RL. Loss of stages after continuous passage of *Toxoplasma gondii* and *Besnoitia jellisoni*. *Journal of Protozoology*. v. 23, n. 3, p. 421-424, 1976.
- FRENKEL, J.K. *Besnoitia wallacei* of cats and rodents: with a reclassification of other cyst-forming isosporoid coccidia. *Journal of Parasitology*, v. 63, n. 4, p. 611-628. 1977.
- FRENKEL, J.K. Infections with organisms resembling *Toxoplasma*, together with the description of a new organism: *Besnoitia jellisoni*. *Atti VI Congresso Internazionale di Microbiologia*, v. 5, p. 426-434, 1953.
- FRENKEL, J.K.; DUBEY, J.P. Rodents as vectors for feline Coccidia, *Isospora felis* and *Isospora rivolta*. *Journal of Infectious Diseases*, v. 125, n. 1, p. 69-72. 1972.
- FRENKEL, J.K.; SILVA, M.B. de O., SALDANHA, J.C., SILVA-VERGARA, M.L. de, CORREIA, D., BARATA, C.H., SILVA, E.L., RAMIREZ, L.E., PRATA, A. Presença extra-intestinal de cistos unizóicos de *Isospora belli* em paciente com SIDA. Relato de caso. *Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical*, v. 36, n. 3, p. 409-412, 2003.
- FRENKEL, J.K.; SMITH, D.D. Determination of the genera of cyst-forming coccidia. *Parasitology Research*, v. 91, n. 5, p. 384-389, 2003.
- FRESCHI, C. R.; HIGA, A. C.; TINUCCI COSTA, M.; PANCRACIO, H. P.; MACHADO, R. Z. Caracterização de antígenos de toxoplasma gondii, pela técnica de “western blotting”, em soros de cães com sinais clínicos suspeitos de toxoplasmose. *Ars Veterinária*, v.21, n.2, p 265-271, 2005.
- GALVÁN-RAMÍREZ, M. L.; GUILLÉN-VARGAS, C.; SAAVEDRA-DURÁN, R.; ISLOS-RODRÍGUEZ, A. Analysis of *Toxoplasma gondii* antigens with sera from toxoplasmosis patients. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 31, n. 3, p. 271-277, 1998.
- GARDINER, C. H.; FAYER, R.; DUBEY, J.P. *An atlas of protozoan parasites in animal tissues*. Beltsville: U.S. Department of Agriculture, Agriculture Handbook, n. 651. 1988. 83p.
- GENNARI, S.M.; KASAI, N.; PENA, H.F. de J.; CORTEZ, A. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 36, n. 2, p. 87-91, 1999.
- GOLDMAN, M.; CARVER, R.K.; SULZER, A. J. Similar internal morphology of *Toxoplasma gondii* and *Besnoitia jellisoni* stained with silver protein. *Journal of Parasitology*, v. 43, n. 4, p. 490-491, 1957.

- GUTIÉRREZ, F., ARCAJ, L. Cultivo de *Cystoisospora felis* Frenkel, 1977 (*Isospora felis* Wasielewski, 1904, Wenyon, 1923) en la membrana corioalantoidea de embrión de pollo. *Acta Científica Venezolana*, v. 38, n. 6, p. 474-483, 1987.
- HEINE, J. Die tryptische Organverdauung als Methode zum nachweis extraintestinaler Stadien bei *Cystoisospora* spp. – Infektionen. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, v. 94, n. 6, p. 103-104, 1981.
- HIETALA, S.K., THURMOND, M.C. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. *International Journal for Parasitology*, v. 29, n. 10, p. 1669-1676, 1999.
- HILALI, M.; FATANI, A.; AL-ATIYA, S. Isolation of tissue cysts of *Toxoplasma*, *Isospora*, *Hammondia* and *Sarcocystis* from camel (*Camelus dromedarius*) meat in Saudi Arabia. *Veterinary Parasitology*, v. 58, n. 4, p. 353-356, 1995.
- HITCHCOCK, D.J. The life cycle of *Isospora felis* in the kitten. *Journal of Parasitology*, v. 41, n. 1, p. 383-393, 1955.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Capturado em 12 de mar. 2007
- KASPER, L.H.; BRADLEY, M.S.; PFEFFERKORN, E.R. Identification of stage-specific sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies. *Journal of Immunology*, v. 132, n. 1, p. 443-449, 1984.
- KASPER, L.H.; CRABB, J.H.; PFEFFERKORN, E.R. Purification of a major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoabsorption with a monoclonal antibody. *Journal of Immunology*, v. 130, n. 5, p. 2407-2412, 1983.
- KASPER, L.H.; WARE, P.L. Recognition and characterization of stage-specific oocyst/sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by human antisera. *Journal of Clinical Investigation*, v. 75, n. 5, p. 1570-1577, 1985.
- KOWALIK, S.; ZAHNER, H. *Eimeria separata*: method for the excystation of sporozoites. *Parasitology Research*, v. 85, n. 6, p. 496-499, 1999.
- KURIEN, T.B.; SCOFIELD, R.H. Protein blotting: a review. *Journal of Immunological methods*, v. 274, n. 1-2, p. 1-15, 2003.

- KUTTIN, E.S.; KALLER, A. *Cystoisospora delphini* n. sp. causing enteritis in a bottlenosed dolphin (*Tursiops truncatus*). *Aquatic Mammals*, v. 22, n. 1, p. 57-59, 1996.
- KUTTIN, E.S.; KALLER, A. *Cystoisospora israeli* n. sp. causing enteritis in a South African fur seal. *Aquatic Mammals*, v. 18, n. 3, p. 79-81, 1992.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 259, p. 680-685, 1970.
- LEEK, R.G.; FAYER, R. Survival of sporocysts of *Sarcocystis* in various media. *Proceedings of Helminthology Society of Washington*, v. 46, n. 1, p. 151-154, 1979.
- LERICHE, M. A.; DUBREMETZ, J. F. Exocytosis of dense granules after host-cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Parasitology Research*, v. 75, n. 7, p. 559-562, 1990.
- LEVINE, N.D. *Veterinary Protozoology*. 1<sup>st</sup> ed. Ames: Iowa State Univ. Press, 1985. 414 p.
- LIN, D.S.; LAI, S.S.; BOWMAN, D.D.; JACOBSON, R.H.; BARR, M.C.; GIOVENGO, S.L. Feline immunodeficiency virus, feline leukaemia virus, *Toxoplasma gondii* and intestinal parasitic infections in Taiwanese cats. *British Veterinary Journal*, v. 146, n. 5, p. 468-475, 1990.
- LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L. Biology of mammalian *Isospora*. *Parasitology Today*, v. 10, n. 6, p. 214-220, 1994.
- LOSS, Z.G. *Cystoisosporose felina*. 1991. 104p. Tese (Medicina Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 1991.
- LOSS, Z.G.; LOPES, C.W.G. Alguns aspectos clínicos da infecção por *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1926) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae) em gatos. *Arquivos da Universidade Federal Rural Rio de Janeiro*, v. 15, n. 1, p. 79-84, 1992a.
- LOSS, Z.G.; LOPES, C.W.G. Efeito da infecção experimental por *Cystoisospora felis* (Apicomplexa: Cystoisosporinae) no ganho de peso de camundongos. *Arquivos da Universidade Federal Rural Rio de Janeiro*, v. 15, n. 1, p. 109-111, 1992b.
- LOSS, Z.G.; LOPES, C.W.G. Tratamento durante a gestação e no período pós-parto com sulfadiazina associada a pirimetamina de gatas portadoras de infecção natural por *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) e *C. rivolta* (Grassi, 1879) (Apicomplexa: Cystoisosporinae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 6, n. 1, p. 57-60, 1997.



- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- LUNDE, M.N.; JACOBS, L. Antigenic relationship of *Toxoplasma gondii* and *Besnoitia jellisoni*. *Journal of Parasitology*, v. 51, n. 2, p. 273-276, 1965.
- MARKUS, M.B. Terminology for invasive stages of protozoa of the subphylum Apicomplexa (Sporozoa). *South African Journal of Science*, v. 74, n. 2, p. 105-106. 1978.
- MASSAD, F.V.; OLIVEIRA, F.C.R.; ALBUQUERQUE, G.R.; LOPES, C.W.G. Hipnozoítas de *Cystoisospora ohioensis* (Dubey, 1975) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae) em frangos. *Revista Brasileira Ciência Veterinária*, v. 10, n. 1, p. 57-58, 2002.
- MCKENNA, P.B.; CHARLESTON, W.A.G. Activation e excystation of *Isospora felis* and *Isospora rivolta* sporozoites. *Journal of Parasitology*, v. 68, n. 2, p. 276-286, 1982.
- MEHLHORN, H.; MARKUS, M.B. Electron microscopy of stages of *Isospora felis* of the cat in the mesenteric lymph node of the mouse. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, v. 51, n. 1, p. 15-24, 1976.
- MELO, P.S.; CARVALHO FILHO, P.R.; FLAUSINO, W.; LOPES, C.W.G. Hypnozoites of *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae) in swine (*Sus scrofa domestica*) viscera: a new intermediate host. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 12, n. 3, p. 103-107, 2003.
- MUNDHENKE, H.; DAUGSCHIES, A. Untersuchungen zum Vorkommen von Endoparasiten bei der Katze in Hannover und seinem Umland. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, v. 86, n. 2, p. 43-48, 1999.
- NEMESËRI, L. Beitrage zur atologie der coccidiose der Hunde. I. *Isospora canis* sp. n. *Acta Veterinaria Hungarica*, v. 10, p. 95-99, 1960.
- NICHOL, S.; BALL, S.J.; SNOW, K.R. Prevalence of intestinal parasites in feral cats in some urban areas of England. *Veterinary Parasitology*, v. 9, n. 2, p. 107-110, 1981.
- OGINO, N.; YONEDA, C. The fine structure and mode of division of *Toxoplasma gondii*. *Archives of Ophthalmology*, v. 75, n. 2, p. 218-227, 1966.

- OLIVEIRA, F.C.R.; ALBUQUERQUE, G.R.; LOPES, C.W.G.; MASSAD, F.V.; MUNHOZ, A.D. Hipnozoítas de *Cystoisospora ohioensis* (Dubey, 1975) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae) recuperados de órgãos de camundongos através da digestão péptica. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.10, n.1, p.29-35, 2001.
- OMATA, Y.; OIKAWA, H.; KANDA, M.; MIKAZUKI, K.; CLAVERIA, F.G.; DILORENZO, C.; TAKEHARA, T.; SAITO, A.; SUZUKI, N. Humoral immune response to *Isospora felis* and *Toxoplasma gondii* in cats experimentally inoculated with *Isospora felis*. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v. 53, n. 6, p. 1071-1073. 1991b.
- OMATA, Y.; OIKAWA, H.; KANDA, M.; MIKAZUKI, K.; TAKEHARA, T.; VENTURINI, C.; SAITO, A.; SUZUKI, N. Enhancement of humoral immune response of *Isospora felis*-infected cats after inoculation with *Toxoplasma gondii*. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v. 53, n. 1, p. 163-165, 1991a.
- PATTON, S.; RABINOWITZ, A.R. Parasites of wild felidae in Thailand: a coprological survey. *Journal of Wildlife Disease*, v. 30, n. 3. p. 472-475, 1994.
- RASCHKA, C.; HAUPT, W.; RIBBECK, R. Untersuchungen zum Endoparasitenbefall bei streuenden katzen. *Monatshefte Veterinarmedizin*, v. 49, n. 7, p. 307-315, 1994.
- REESE, N.C.; CURRENT, W.L.; ERNST, J.V.; BAILEY, W.S. Cryptosporidiosis of man and calf: a case report and results of experimental infections in mice and rats. *American Journal of Tropical Medicine*, v. 31, n. 2, p. 226-229, 1982.
- ROCHA, E.M. da; LOPES, C.W.G. Comportamento da *Isospora canis*, *Isospora felis* e *Isospora rivolta* em infecções experimentais em cães e gatos. *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, v. 1, n. 1, p. 65-70, 1971.
- RODRIGUES, J. da S. ; DE MEIRELES, G.S. ; FLAUSINO, W. ; LOPES, C. W. G.. The japanense quail (*Corturnix japonica*): a new intermediated host for *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae). *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 34, n. 1, p. 14-18, 2012.
- SAMARASINGHE, B.; JOHNSON, J.; RYAN, U. Phylogenetic analysis of *Cystoisospora* species at the rRNA ITS1 locus and development of a PCR-RFLP assay. *Experimental Parasitology*, v. 118, n. 4, p. 592-595, 2008.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. Belo Horizonte: FEPMVZ, 3ª Ed., Belo Horizonte, 2007. 264p.

- SANTORO, F.; AFCHAIN, D.; PIERCE, R.; CESBRON, J. Y.; OVLAQUE, G.; CAPRON, A. Serodiagnosis of *Toxoplasma* infection using a purified parasite protein (P30). *Clinical Experimental Immunology*, v. 62, n. 2, p. 262-269, 1985.
- SANTOS, J.A.; STABENOW, C.S.; OLIVEIRA, F.C.R. de; LOPES, C.W.G. Cistosisporose em gatos de rua do município de Campos dos Goytacazes, RJ. *CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, Anais...* Rio de Janeiro: CBPV, 12 Janeiro, 2002 1 CD-ROM.
- SCHOLTYSECK, E. Ultrastructure. In: HAMMOND, D.M.; LONG, P.L. *The Coccidia*. Baltimore: Univ. Park Press, p. 81, 1973.
- SHAH, H.L. The life cycle of *Isospora felis*, Wenyon, 1923, a coccidium of the cat. *Journal of Protozoology*, v. 18, n. 1, p. 3-17. 1971.
- SHEFFIELD, H.G.; MELTON, M.L. The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Parasitology*, v. 54, n. 2, p. 209-226, 1968.
- SHEFFIELD, H.G.; MELTON, M.L. *Toxoplasma gondii*: the oocyst, sporozoite, and infection of cultured cells. *Science*, v. 167, n. 37, p. 892-893, 1972.
- SHIBALOVA, T.A.; PETRENKO, V.I. [*Isospora bigemina*: sporozoite-induced development of the life cycle in tissue culture.] *Parazitologiya*, v. 6, n. 6, p. 201-205, 1972 [em russo].
- SMITH, D. D. The Sarcocystidea: *Sarcocystis*, *Frenkelia*, *Toxoplasma*, *Besnoitia*, *Hammondia* and *Cystoisospora*. *Journal of Protozoology*, v. 28, n. 2, p. 262-266, 1981.
- SPEER, C.A.; DUBEY, J.P.; MCALLISTER, M.M.; BLIXT, J.A. Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, v. 29, n. 10, p. 1509-1519, 1999.
- STIBBS, H.H.; ONGERTH, J.F. Immunofluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal smears. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 24, n. 4, p. 517-521, 1986.
- SUGGS, M., WALLS, K.W., KAGAN, I.G. Comparative antigenic study of *Besnoitia jellisoni*, *B. panamensis* and five *Toxoplasma gondii* isolates. *Journal of Immunology*, v. 101, n. 1, p.166-175, 1968.
- TAYLOR, W.P.; EVANS, C.B.; ALEY, S.B.; BAUTA, J.R.; DANFORTH, H.D. Identification of an apically-located antigen that is conserved in sporozoan parasites. *Journal of Protozoology*, v. 37, n. 6, p. 540-546, 1990.

- TENTER, A.M. Current research on *Sarcocystis* species of domestic animals. *International Journal for Parasitology*, v. 25, n. 11, p. 1311-1330, 1995.
- TENTER, A.M.; BARTA, J.R.; BEVERIDGE, I.; DUSZYNSKI, D.W.; MEHLHORN, H.; MORRISON, D.A.; THOMPSON, R.C.A.; CONRAD, P.A. The conceptual basis for a new classification of the coccidia. *International Journal for Parasitology*, v. 32, n. 5, p. 595-616, 2002.
- TEREJO, F.; ARCAJ-DE-PERAZA, L. *Cystoisospora felis*: initial penetrative ability into cell cultures from rat peritoneal exudate. *Acta Científica Venezolana*, v. 33, n. 6, p. 338-341, 1982.
- TOMIMURA, T. Experimental studies on coccidiosis in dog and cats sporogony of *Isospora felis* and its artificial infection in cats. *Japanese Journal of Parasitology*, v. 6, n. 1, p. 12-24, 1957.
- TORII, M. J.; ADAMS, J. H.; MILLER, H. L.; AIKAWA, M. Release of merozoite dense granules during erythrocyte invasion by *Plasmodium knowlesi*. *Infection and Immunity*, v. 57, n.10, p. 3230-3233, 1989.
- TOWBIN, H.; STAEBELIN, J.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 76, p. 4350-4354, 1979.
- TOYAMA, T.; TSUNODA, K.; FUJITA, J. Excystation of *Isospora felis* oocysts and *I. ohioensis* sporocysts *in vitro*. *Japanese Journal of Veterinary Science*, v. 44, n. 6, p. 971-973, 1982.
- TRUONG, Q.; FERRARI, B.C. Quantitative and qualitative comparisons of *Cryptosporidium* faecal purification procedures for the isolation of oocysts suitable for proteomic analysis. *International Journal for Parasitology*, v. 36, p. 811-819, 2006.
- VANPARIJS, O.; HERMANS, L.; van der FLAES, L. Helminth and protozoan parasites in dogs and cats in Belgium. *Veterinary Parasitology*, v. 38, n. 1, p. 67-73, 1991.
- VERHOFSTEDDE, C.; VAN GELDER, P.; RABAEY, M. The infection-stage-related IgG response to *Toxoplasma gondii* studied by Western Blotting. *Parasitology Research*, v. 74, n. 6, p. 516-520, 1988.
- WARE, P.L.; KASPER, L.H. Strain-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity*, v. 55, n. 3, p. 778-783, 1987.

WENYON, C.M. Coccidiosis of cats and dogs and the status of the *Isoospora* of man. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 17, n. 1, p. 231-288, 1923.

ZHIJUN, H.; MINGWEI, X.; HONGLIANG, C.; YUPING, H. Phylogenetic position analysis of an *Isoospora* isolated from Siberian tiger in eimeriid coccidian based on 18S rDNA sequence. *Pakistan Journal of Zoology*, v. 43, n. 3, p. 505-510, 2011.

## 8. ANEXOS

### ANEXO – 1

Questionário epidemiológico aplicado durante as visitas às propriedades do município Rio Claro, Estado do Rio de Janeiro.

IDENTIFICAÇÃO DA PROPRIEDADE Nº \_\_\_\_

1. Nome: \_\_\_\_\_  
2. Proprietário: \_\_\_\_\_ E-mail: \_\_\_\_\_  
3. Município: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_  
4. Localização em coordenadas: \_\_\_\_\_

### 5. PARTE FÍSICA

- 5.1 Tamanho em hectares da propriedade: \_\_\_\_\_  
5.1.1 Qual área é destinada para criação: \_\_\_\_\_  
5.2 Apresenta benfeitorias?  
( ) Sim. Quais? \_\_\_\_\_  
( ) Não  
5.3 Material utilizado na construção: \_\_\_\_\_  
5.4 Apresenta residência(s)?  
( ) Sim. Quantas? \_\_\_\_\_  
( ) Não  
5.5 Apresenta funcionário(s) remunerado(s)?  
( ) Sim. Quantos? \_\_\_\_\_  
( ) Não  
5.6 Apresenta morador(es)?  
( ) Sim. Quantos? \_\_\_\_\_  
( ) Não

### 6. MANEJO

- 6.1 Número total de bovinos: \_\_\_\_\_  
6.2 Número de total de vaca(s): \_\_\_\_\_ Em lactação: \_\_\_\_\_ Secas: \_\_\_\_\_

6.3 Número total de novilha(s): \_\_\_\_\_

6.4 Número total de bezerro(s): ♂ \_\_\_\_\_

♀ \_\_\_\_\_

6.5 Número total de reprodutor(es): \_\_\_\_\_

6.6 Possui Veterinário responsável?

( ) Sim

( ) Não

6.7 Qual o sistema de criação?

( ) Extensivo

( ) Semi-intensivo

( ) Semi-extensivo

( ) Intensivo

6.8 Qual o sistema de produção?

( ) Familiar

( ) Empresarial

( ) Pré-empresarial

6.13 Qual o tipo de ordenha?

( ) Manual

( ) Mecanizada-aberta

( ) Mecanizada-fechada

6.18 Como é o manejo dos animais?

( ) Excelente – Bom

( ) Satisfatório – Ruim

6.19 Como são as condições higiênico-sanitárias?

( ) Excelente – Boa

( ) Satisfatória – Ruim

6.20 Existe criação de outros animais no mesmo ambiente?

( ) Sim. Quais? \_\_\_\_\_

( ) Não

6.21 Qual a origem da água dos bovinos?

( ) Rio

( ) Açude

( ) Nascente

( ) Encanada tratada

( ) Outras. Quais? \_\_\_\_\_

6.22 A água é colocada em reservatório próprio?

Sim

Não

6.23 Quantas ordenhas são realizadas no dia?

1

2

3

6.24 Qual o tipo de reprodução (monta)?

Natural

Inseminação artificial

Ambas

Transferência de embriões

## **7. PERGUNTAS REFERENTES À CISTOSPOROSE**

7.1 A propriedade apresenta gatos?

Sim

Não

7.2. Quantos gatos? \_\_\_\_\_

7.3 Os gatos têm contato com os bovinos?

Sim

Não

7.4 Os gatos têm contato com a alimentação dos bovinos?

Sim

Não

7.5 Os gatos têm contato com a fonte de água dos bovinos?

Sim

Não

7.6 Qual o tipo de alimentação dos gatos?

Ração

Comida caseira

Ambas

7.7 A propriedade apresenta roedores?

Sim

Não



7.8 Presença de animais silvestres nas redondezas?

( ) Sim Quais? \_\_\_\_\_

( ) Não

8 Sobre as instalações?

8.1 Qual a frequência e a forma de higienização? \_\_\_\_\_

8.2 Qual o destino dos resíduos orgânicos? \_\_\_\_\_

8.3 Qual o destino dos animais mortos? \_\_\_\_\_

### IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS

Animal Nº: _____
Nome: _____
Idade: _____
Raça: _____
Procedência: _____
Aborto?: _____ Qtos.: _____
Repetição Cio: _____
Produção leite kg/dia: _____
Fêmea: ( ) Cheia
( ) Vazia

Animal Nº: _____
Nome: _____
Idade: _____
Raça: _____
Procedência: _____
Aborto?: _____ Qtos.: _____
Repetição Cio: _____
Produção leite kg/dia: _____
Fêmea: ( ) Cheia
( ) Vazia

Animal Nº: _____
Nome: _____
Idade: _____
Raça: _____
Procedência: _____
Aborto?: _____ Qtos.: _____
Repetição Cio: _____
Produção leite kg/dia: _____
Fêmea: ( ) Cheia
( ) Vazia
Obs.: _____
_____

Animal Nº: _____
Nome: _____
Idade: _____
Raça: _____
Procedência: _____
Aborto?: _____ Qtos.: _____
Repetição Cio: _____
Produção leite kg/dia: _____
Fêmea: ( ) Cheia
( ) Vazia
Obs.: _____
_____

Animal Nº: _____
Nome: _____
Idade: _____
Raça: _____
Procedência: _____
Aborto?: _____ Qtos.: _____
Repetição Cio: _____
Produção leite kg/dia: _____
Fêmea: ( ) Cheia
( ) Vazia
Obs.: _____
_____

Animal Nº: _____
Nome: _____
Idade: _____
Raça: _____
Procedência: _____
Aborto?: _____ Qtos.: _____
Repetição Cio: _____
Produção leite kg/dia: _____
Fêmea: ( ) Cheia
( ) Vazia
Obs.: _____
_____

## **ANEXO – 2**

**RODRIGUES, J. S.; DE MEIRELES, G. S.; FLAUSINO, W.; CARLOS WILSON GOMES LOPES, C. W. G.** The japanense quail (*Corturnix japonica*): a new intermediated host for *Cystoisospora felis* (wenyon, 1923) frenkel, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae)\*  
*Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 34, n. 1, p. 14-18, 2012

**THE JAPANENSE QUAIL (*Coturnix japonica*): A NEW INTERMEDIATED  
HOST FOR *Cystoisospora felis* (WENYON, 1923) FRENKEL, 1977  
(APICOMPLEXA: CYSTOISOSPORINAE)\***

Janaina da Soledad Rodrigues<sup>1</sup>, Gisele Santos de Meireles<sup>1</sup>,  
Walter Flausino<sup>2</sup> and Carlos Wilson Gomes Lopes<sup>3\*</sup>

**ABSTRACT.** Rodrigues J. da S., Meireles G.S. de, Flausino W. & Lopes C.W.G. **The japanense quail (*Coturnix japonica*): a new intermediated host for *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae).** [A codorna japonesa (*Coturnix japonica*): um novo hospedeiro para *Cystoisospora felis* (Wenyon 1923) Frenkel 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae)]. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 34(1):14-18, 2012. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: lopescw@ufrj.br.

*Cystoisospora felis* is an obligatory intracellular parasite that infects several species of felines. Infection is transmitted by either ingesting sporulated oocysts directly, or consuming an intermediated host harboring monozytic cysts. In this study, 10 Japanese quails (*Coturnix japonica*) were infected with a pure inoculum of *C. felis* ( $10^6$  sporulated oocysts/ml); after 60 days post infection, liver, spleen, and cloacal bursa were removed from each quail and were separately fed to 3 kittens. A forth kitten was infected with  $10^6$  sporulated oocysts/ml orally. Fecal samples were collected from each kitten daily and evaluated for the presence of oocysts; the percent sporulation of resulting oocysts was calculated daily. In addition, 50 sporulated oocysts from each infected individual were measured in  $\mu\text{m}$ , and evaluated for length, width and shape index. Kitten fed on liver had an average oocyst length of 44.30 (39.53 – 48.84), width of 31.30 (27.44 – 36.05) and shape index of 1.40 (1.16 – 1.58); while the kitten fed on spleen had an average length of 46.30 (41.40– 50.71), width of 32.90 (29.30 – 37.20) and shape index of 1.40 (1.22 – 1.71). The kitten fed on cloacal bursa had an average length of 44.80 (40.00 – 49.31), width of 31.20 (27.91 – 36.5) and shape index of 1.40 (1.18 – 1.60); and the kitten infected with sporulated oocysts orally had an average length of 43.60 (40.30 – 47.58), width of 30.80 (26.66 – 34.22) and shape index of 1.40 (1.23 – 1.58). Furthermore the prepatent and patent periods were determined for *C. felis* in the quail that serves as an experimental model for working in experimental conditions.

**KEY WORDS.** *Cystoisospora felis*, Japanese quail, experimental infection.

**RESUMO.** *Cystoisospora felis* é um parasito intracelular obrigatório que acomete felídeos de diversas espécies, e podem se contaminar tanto pela ingestão de oocistos esporulados, quanto pela ingestão de tecidos de hospedeiros intermediários infectados previamente com oocistos esporulados. Neste es-

---

\*Received on March 13, 2011.

Accepted for publication on June 30, 2011.

<sup>1</sup> Médica-veterinária, *M.CsVs*. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mails: jajasoledad@gmail.com e gisele.meireles@gmail.com – bolsistas CNPq e CAPES.

<sup>2</sup> Biólogo, *PhD*. Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: flausino@ufrj.br - bolsista CNPq.

<sup>3</sup> Médico-veterinário, *PhD, LD*. Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000. +Correspondence author: E-mail: lopescw@ufrj.br – bolsista CNPq.

tudo, 10 codornas japonesas foram infectadas com um inóculo puro de oocistos de *C. felis*, na concentração de  $10^6$  e, após 60 dias, o baço, o fígado e a bursa cloacal dessas codornas infectadas foram oferecidos a três filhotes de gato livres de infecção. Um quarto gato ainda foi infectado com uma suspensão de  $10^6$  oocistos viáveis de *C. felis* por via oral. Após o início da eliminação, os oocistos foram colocados para esporular e, em seguida, 50 oocistos oriundos de cada infecção foram mensurados em  $\mu\text{m}$ , apresentado em média diâmetro maior (DM), diâmetro menor (dm) e índice morfométrico com os seguintes valores: 44,30 (39,53 – 48,84), 31,30 (27,44 – 36,05) e 1,40 (1,16 – 1,58) para os oriundos do animal infectado com fígado, 46,30 $\pm$ 2,20, 32,90 $\pm$ 1,90 e 1,40 $\pm$ 0,1 para os oocistos do animal infectado com baço; 44,80 (40,00 – 49,31), 31,20 (27,91 – 36,5) e 1,40 (1,18 – 1,60), para os oocistos oriundos do animal infectado com bursa cloacal; 43,60 (40,30 – 47,58), 30,80 (26,66 – 34,22) e 1,40 para os oocistos do animal que recebeu oocistos direto por via oral. Com estes resultados foi possível concluir que não existem diferenças significativas na morfometria dos oocistos de *C. felis*. Além disso, os períodos, pré-patente e patente foram semelhantes quando gatos foram alimentados com vísceras de codornas infectadas previamente com oocistos esporulados de *C. felis* em comparação com o animal que recebeu  $10^6$  oocistos esporulados por via oral.

PALAVRAS-CHAVE. *Cystoisospora felis*, codorna japonesa, infecção experimental.

## INTRODUCTION

*Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel 1977, an obligatory-intracellular parasite of the Sarcocystidae family (Cystoisosporinae subfamily), is one of the coccidium more frequently found in the feces of domestic cats (Amaral et al. 1966). *C. felis* oocysts are easily distinguished from other feline-feces coccidia by their large size (Frenkel & Dubey 1972).

Dubey & Frenkel (1972) identified two possible forms of *Cystoisospora* transmission in felines: first, by directly ingesting sporulated oocysts; or second by consuming an intermediate host infected previously with sporulated oocysts. A wide range of animals have been described as intermediate hosts serving as vectors for *Cystoisospora* species: including, mice, rats, and dogs (Frenkel & Dubey 1972); birds (Lindsay & Blagburn 1994); bovines

(Fayer & Frenkel 1979); swine (Carvalho Filho et al. 2003); rabbits (Costa & Lopes 1998); Mongolian gerbils (Carvalho Filho et al. 2004); and chickens (Massad et al. 2003).

The systemic distribution of hipnozoites in the viscera of different intermediate hosts was indicated by an accentuate tropism for mesenteric lymph nodes, spleen, liver and Payers' patches in mammals (Frenkel & Dubey 1972, Brösigke et al. 1982, Freire & Lopes 1996, Costa & Lopes 1997).

The present study evaluates the levels of infection obtained when healthy kittens are exposed to different types Japanese quail viscera which have been infected with *C. felis* and compares it to healthy kittens directly exposed to *C. felis*.

## MATERIAL AND METHODS

The current study was carried out at the Laboratório de Coccidios e Coccidioses (LCC) – Projeto Sanidade Animal (Embrapa/UFRRJ), Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, UFRRJ.

A healthy cat, in the final stage of gestation was brought to the LCC and it was lodged in individual bay with water and food *ad libitum*. An examination of the feces was performed to determine if the female cat was free from gastrointestinal-parasite infection. In addition, a preventive treatment for coccidia was adopted as suggested by Loss & Lopes (1997).

Kittens were separated from their mother 45 days after parturition; fecal examinations were than performed for 30 days to ensure that kittens were free from coccidia infection. Kittens were then placed separately in suspended cages, which were previously disinfected with sodium hypochlorite and flame torch to prevent possible contaminations.

To evaluate kitten infection via infected viscera, ten Japanese quails (*Coturnix japonica*) were inoculated, using an orogastric tube, with *C. felis* suspension of  $10^6$  sporulated oocysts/mL (Figure 1). Sixty days after inoculation the Japanese quails were euthanized (Cobea 2007) and their livers, spleens and cloacal bursa were separated. A pure suspension of *C. felis* sporulated oocysts ( $10^6$  oocysts/mL) in Hank' solution (Andrade 2000) was also prepared to evaluate transmission direct infection. *C. felis* sporulated oocysts were obtained from the purification of fecal samples from naturally infected cats.

A total of 4 kittens were used in this study; each received orally a distinct source of infection: cat I –



Figure 1. *Cystoisospora felis* sporulated oocyst. Sugar saturated solution. 1000X.

ground spleen, cat II – ground liver, cat III – ground cloacal bursa, and cat IV - suspension of  $10^6$  sporulated oocysts/mL. Beginning the day after inoculation, fecal samples were examined daily for infection as described by Figueiredo et al. (1984). For Oocyst sporulation, fecal samples were collected and diluted separately, and stored in plastic vials containing potassium dichromate 2.5% in water solution in a proportion ratio of 1:9 (v/v), which was placed under forced aeration using a aquarium pump and at  $\sim 22^\circ\text{C}$ .

Oocysts were checked daily for sporulation and classified as either, sporulated or non-sporulated. Once 80% of a sample was determined to have sporulated a morphologic analysis and characterization of the oocysts was carried out; 50 sporulated oocysts from each source of infection were measured separately using a micrometric ocular (K-15X PZO) in a binocular microscope (Carl Zeiss). For each oocyst the length and width were determined, as well as the index shape. Pictures were taken using a digital camera model CD Mavica MVC-CD250 Sony®.

During the experimental infections, prepatent and patent periods were observed for determining if there were differences in the source of lipnozoites.

In addition, the means of sporulated oocysts from different sources of infection was statistically

compared according to Sampaio (2002).

## RESULTS AND DISCUSSION

By comparing the measurements of the length, width and index shape of oocysts recovered from the various sources of infection (Table 1), significant differences between these values were not observed. These results differ from those observed by Medeiros et al. (2007); they found that oocysts of *C. felis* proceeding from mice viscera were larger than those transmitted naturally. Although, the length and width means observed from each source of infection in this study were similar to those observed by Medeiros et al. (2007). Conversely the measurements observed in the present study for oocysts transmitted via infected quail viscera were larger than those observed after transmission by Mongolian gerbil viscera (Carvalho Filho et al. 2004). However the index shape of the oocysts was similar in both studies.

Prepatent and patent periods were the same among kittens exposed to infected viscera and similar to those exposed directly to sporulated oocysts (Table 2). Analogous results were observed by Dubey & Streitl (1976) and Carvalho Filho et al. (2004). Lindsay & Blagburn (1994) described a patent period from day 10-11 for *C. felis*; for cats free of coccidia were infected by  $10^4$  sporulated oocysts orally. Kittens fed on liver or spleen shed more

Table 1. *Cystoisospora felis* sporulated oocysts from different sources of infection.

Source of infection	Oocysts ( $\mu\text{m}$ ) (n=50) *		Shape index
	Length	Width	
Liver	44.30 (39.53-48.84)	31.30 (27.44-36.05)	1.40 (1.16-1.58)
Spleen	46.30 (41.40-50.71)	32.90 (29.30-37.20)	1.40 (1.22-1.71)
Cloacal bursa	44.80 (40.00-49.31)	31.20 (27.91-36.5)	1.40 (1.18-1.60)
Sporulated oocysts	43.60 (40.30-47.58)	30.80 (26.66-34.22)	1.40 (1.23-1.58)

\* No significant differences were observed.

Table 2. The shedding of *Cystoisospora felis* oocysts by cats infected from different sources.

Origin of infecting material	Source of infection	Period		Number of oocysts counts	
		Pre-patent	Patent	OoPG <sup>a</sup>	Total fecal volume
Japanese quail <sup>b</sup>	Spleen	5	12	3,450	57,740
	Liver	5	12	4,880	216,522
	Cloacal Bursa	5	12	445	19,924
Sporulated oocysts <sup>c</sup>	Fecal oocysts	7	14	31,274	1,565,948

<sup>a</sup> Oocysts per gram of feces

<sup>b</sup> Infected with  $10^8$  sporulated oocysts/mL previously.

<sup>c</sup> Kittens infected with  $10^8$  sporulated oocysts/mL orally.

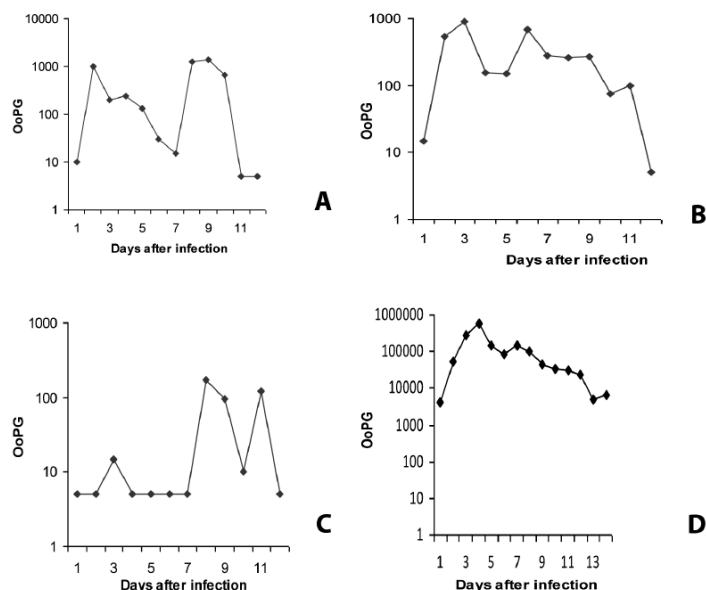


Figure 2. Shedding of *Cystoisospora felis* oocysts by cats fed on, (a) liver, (b) spleen, (c) cloacal bursa of the Japanese quail, and (d) infected with  $10^6$  sporulated oocysts orally

oocysts than that fed on cloacal bursa, but less than the kitten infected orally (Figure 2).

The data observed in this study was compatible to *Cystoisospora felis* infection, besides it the Japanese quail was considered as a new intermediated host; besides it Japanese quail should be considered as a good intermediated host for biological experimental infection.

## REFERENCES

- Amaral V., Amaro R.G. & Birgel E.H. Ocorrência da *Isoospora felis* Wenyon, 1923, em suçuarana (*Puma concolor*). *Rev. Soc. Paul. Med. Vet.*, 4:25-28, 1966.
- Andrade C.M. *Meios e Soluções comumente empregados em Laboratórios*. 1ª ed. EDUR, Seropédica, 2000. 353p.
- Brösigke S., Heine J. & Boch J. Der nachweis extraintestinalen Entwicklungstadien (Dormozoiten) in experimentall mit *Cystoisospora rivolta* oozysten infierten Mause. *Klont. Praxis*, 27:25-34, 1982.
- Carvalho Filho P.R., de Massad F.V., Bezerra M.M., de Oliveira F.C.R. & Lopes C.W.G. *Cystoisospora felis* e *C. rivolta* (Apicomplexa: Cystoisosporinae) em vísceras de gerbis da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) e sua transmissão para gatos livres de coccídios. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 13:169-172, 2004.
- Carvalho Filho P.R. de, Melo P.S., Massad F.V. & Lopes C.W.G. Determinação da infecção de suínos por *Cystoisospora felis* (Wenyon 1923) Frenkel 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae) através de prova biológica em felinos livres de coccídios. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 12:7-12, 2003.
- Cobea. Legislação & ética. Disponível at: <<http://www.cobea.org.br/ética.htm>>. Access on: Mar 14, 2007.
- Costa P.S. & Lopes C.W.G. Hipinozoítas de *Cystoisospora felis* (Apicomplexa: Cystoisosporinae). *Rev. Bras. Ci. Vet.*, 1:35-36, 1997.
- Costa P.S. da & Lopes C.W.G. Avaliação do parasitismo de hipinozoítas de *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Sarcocystidae) em coelhos tipo carne. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 7:15-19, 1998.
- Dubey J.P. & Streitel R.H. *Isoospora felis* and *I. rivolta* infections in cats induced by mouse tissue or oocysts. *British Vet. J.*, 132:649-651, 1976.
- Fayer R. & Frenkel J.K. Comparative infectivity for calves of oocysts of feline coccidian: *Besnoitia*, *Hammondia*, *Cystoisospora*, *Sarcocystis* and *Toxoplasma*. *J. Parasitol.*, 65:756-762, 1979.
- Figueiredo P.C. de, Serra-Freire N.M. da & Grisi L. Eimerias de bovinos leiteiros no Estado do Rio de Janeiro: técnicas de diagnóstico e espécies identificadas. *Atas Soc. Biol. Rio de Janeiro*, 24:3-10, 1984.
- Freire R.B. & Lopes C.W.G. Distribuição de hipinozoítas de *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel 1977 (Apicomplexa: Sarcocystidae) em camundongos albinos experimentalmente infectados. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 5:23-28, 1996.
- Frenkel J.K. & Dubey J.P. Rodents as vectors for feline Coccidia. *Isoospora felis* and *Isoospora rivolta*. *J. Infect. Dis.*, 125:69-72, 1972.
- Lindsay D.S. & Blagburn B.L. Biology of mammalian *Isoospora*. *Parasitol. Today*, 10:214-220, 1994.

- Loss Z.G. & Lopes C.W.G. Tratamento durante a gestação e no período pós-parto com sulfadiazina associada à pirimetropina de gatas portadoras de infecção natural por *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) e *C. rivolta* (Grassi 1879) (Apicomplexa: Cystoisosporinae). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 6:57-60, 1997.
- Massad F.V., de Oliveira F.C.R., Albuquerque G.R. & Lopes C.W.G. Hipnozoítas de *Cystoisospora ohioensis* (Dubey, 1975) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae) em frangos. *Rev. Bras. Ci. Vet.*, 10:57-58, 2002.
- Medeiros S.M. de, Loss Z.G., Flausino W. & Lopes C.W.G. Pleomorfismo de oocistos de *Cystoisospora felis* (Wenyon 1923) Frenkel 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae) induzido por diferentes fontes de infecção. *Rev. Bras. Ci. Vet.*, 14:163-166, 2007.
- Sampaio I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2ª Ed. FEPMVZ, Belo Horizonte, 2002. 265p.

### **ANEXO – 3**

**DE MEIRELES, G.S.;** DA SILVA, N.M.P.; GALVÃO, G. DA S.; ALMEIDA, C.R.R.; FLAUSINO, W.; LOPES, C.W.G. Surto de coccidiose em bezerros búfalos (*Bubalus bubalis*) por *Eimeria bareillyi* Gil et al., 1963 (Apicomplexa: Eimeriidae) - Relato de casos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 34, n. 2, p. 116-120, 2012.



**SURTO DE COCCIDIOSE EM BEZERROS BÚFALOS (*Bubalus bubalis*)  
POR *Eimeria bareillyi* GIL et al., 1963 (APICOMPLEXA: EIMERIIDAE) -  
RELATO DE CASOS\***

Gisele Santos de Meireles<sup>1\*</sup>, Natália Mello Pereira da Silva<sup>2</sup>, Gideão da Silva Galvão<sup>1</sup>,  
Claudio Rogério Rocha Almeida<sup>3</sup>, Walter Flausino<sup>4</sup> e Carlos Wilson Gomes Lopes<sup>5</sup>

**ABSTRACT.** de Meireles G.S., da Silva N.M.P., Galvão G. da S., Almeida C.R.R., Flausino W. & Lopes C.W.G. [Coccidiosis outbreak in water buffalo calves (*Bubalus bubalis*) due to *Eimeria bareillyi* Gil et al., 1963 (Apicomplexa: Eimeriidae) - Case reports]. Surto de coccidiose em bezerros búfalos (*Bubalus bubalis*) por *Eimeria bareillyi* Gil et al., 1963 (Apicomplexa: Eimeriidae) - Relato de casos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 34(2):116-120, 2012. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: gisa\_meireles@yahoo.com.br

The buffalo breeding has great economic potential, but a little importance is giving in some areas of Brazil. There is little information on the impact of coccidiosis in calves. Eimeriosis is considered as more important especially in young calves due to morbidity and mortality. This paper aims to report two outbreaks of *Eimeria bareillyi* on dairy farms, one at the Municipality of Rio Claro and, the second one located at the Municipality of Itaguaí, both in the State of Rio de Janeiro, Brazil. In the first dairy farm, the owner pointed out death of 10 animals, aged between 30 and 60 days of life in a period over four months. In the second propriety, calves aged of two to four weeks old, did not died, but developed symptoms characterized by sudden diarrhea, with rapid recovery without causing anorexia or weight loss. In the first case, one of the 10 died calves was posted. Histologically, lesions in the final portion of the ileum were characterized by loss of mucosal cells, shortening of villi and presence of the parasite forms, characterized by oocysts, macro and microgametocytes. Likewise, in the second propriety, young calves also developed diarrhea without come to death. Fecal samples from calves of both dairy farms were examined, where a large amount of *E. bareillyi* oocysts were found. Baycox ® 5% at a dose of 30mg/kg was used in both properties and coccidiosis was cleared.

**KEY WORDS.** Coccidiosis outbreak, water buffalo, dairy farm, *Eimeria bareillyi*.

**RESUMO.** A criação de búfalos tem grande potencial econômico, mas pouca importância é dada em algumas regiões do Brasil. Com isso, há poucas informações sobre o impacto das coccidioses em bezerros búfalos. Eimeriose é considerada a doença

mais importante, especialmente nos animais mais jovens, devido à alta morbidade e mortalidade. Este trabalho tem como objetivo relatar dois surtos de *Eimeria bareillyi* em explorações leiteiras, um no município de Rio Claro e, a segunda localizada no

\* Recebido em 1 de maio de 2011.

Aceito para publicação em 28 de fevereiro de 2012.

<sup>1</sup> Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. \*Autor para correspondência. E-mail: gisa\_meireles@yahoo.com, E-mail: galvaovet@gmail.com - Bolsistas CAPES.

<sup>2</sup> Curso de Medicina Veterinária, IV, UFRRJ, BR 465, Km 07, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: nathumell@hotmail.com - Bolsista IC-CNPq.

<sup>3</sup> Médico-veterinário, EMATER-Rio Claro, Avenida Independência, 279, Rio Claro, RJ 27460, Brasil. E-mail: claudiovetrc@yahoo.com.br

<sup>4</sup> Biólogo, PhD, Departamento de Parasitologia Animal (DPA), IV, UFRRJ, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: flausino@ufrj.br - Bolsista CNPq.

<sup>5</sup> Médico-veterinário, PhD, LD, DPA, IV, UFRRJ, BR 465, Km 07, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: lopeswgc@ufrj.br - Bolsista CNPq.

município de Itaguaí, ambos no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Na primeira fazenda de gado leiteiro, o proprietário relatou óbito de 10 animais, com idades entre 30 e 60 dias de vida em um período superior a quatro meses. Nos bezerras da segunda propriedade, com idades variando de duas a quatro semanas de idade, não houve óbito, mas desenvolveram sintomas caracterizados por diarreia súbita, porém de recuperação rápida, sem causar anorexia ou perda de peso. No primeiro caso, material de um dos 10 bezerras que morreram foi analisado. Histologicamente, lesões na porção final do íleo foram caracterizados pela perda de células da mucosa, encurtamento das vilosidades e presença de vários estágios de desenvolvimento do parasita, caracterizado por oocistos, macro, e microgametocitos. Da mesma forma, na segunda propriedade, bezerras também tiveram como sintomas diarreia, porém sem chegar a óbito. As amostras fecais de bezerras de ambas, propriedades citadas, foram examinadas, onde uma grande quantidade de oocistos de *E. bareillyi* foram encontrados. Baycox® a 5% na dosagem de 30 mg/kg foi utilizado em ambas as propriedades e a coccidiose foi debelada.

**PALAVRAS-CHAVE.** Surto de coccidiose, búfalos, granja leiteira, *Eimeria bareillyi*.

## INTRODUÇÃO

A Eimeriose é uma doença causada por protozoário que tem como agentes etiológicos, várias espécies do gênero *Eimeria* Schneider, 1875 (Apicomplexa: Eimeriidae) parasito intracelular obrigatório da mucosa intestinal e transmitida por oocistos que necessitam de umidade e temperatura ideais para seu desenvolvimento, manutenção e esporulação ambientais (Soulsby 1998). Esta parasitose pode cursar com infecção aguda, caracterizada por enterite, variando de diarreia branda a severa com ou sem sangue, inflamação da mucosa intestinal, desidratação, pelos arrepiados e sem brilho, perda de peso, anemia, baixa conversão alimentar, podendo ocorrer, dependendo da severidade da infecção, sintomatologia nervosa (Griffiths 1974).

A susceptibilidade dos animais a eimeriose pode estar relacionada, principalmente a idade, a predisposição genética, resistência imunológica inata ou adquirida, níveis de estresse, manejo, desmama, localização do parasito no epitélio intestinal, número e localização das fases endógenas, assim como fatores climáticos e ambientais (Hayat et al. 1994). Segundo os estudos de Levine (1985), Bovinos e

bubalinos possuem alguns parasitos do gênero *Eimeria* em comum. Dentre as principais espécies, já identificadas acometendo bubalinos foram encontradas: *Eimeria zurnii*, *E. bovis*, *E. cylindrica*, *E. ellipsoidalis*, *E. auburnensis*, *E. subspherica*, *E. bareillyi*, *E. canadensis*, *E. ankarensis* e *E. bukidonensis* (de Noronha Jr & Buzetti 2002). A identificação das espécies tem sido baseada nas características morfológicas dos oocistos esporulados, bem como, na espécie de hospedeiro e localização das suas fases endógenas (Fayer 1980; Ramirez et al. 2009). Das espécies anteriormente citadas *E. ankarensis* e *E. bareillyi*, são tidas como específicas de bubalinos. *Eimeria bareillyi*, destaca-se das demais espécies, que se desenvolvem na mucosa do intestino delgado, por ser eliminada em grande quantidade nas fezes de bezerras búfalos, durante as duas primeiras semanas de vida (Nalbantoglu et al. 2008). Vários relatos de infecção por *E. bareillyi* em búfalos tem sido feitos na Índia, onde foi possível determinar que este parasito é específico do búfalo doméstico (Sanyal et al. 1985). Num inquérito feito em 20 propriedades das províncias de Caserta e Latina, na Itália, dos 162 animais examinados 14% encontravam-se positivos para oocistos desta espécie, sendo relatados pouco ou nenhum sintoma clínico associados à doença (Restani & Tassi 1969).

No Brasil, os relatos de *E. bareillyi* foram feitos em Minas Gerais e o outro no Rio de Janeiro. No primeiro relato, os dados foram obtidos da observação da evolução da eimeriose em bezerras bubalinos naturalmente infectados, sendo esta a primeira espécie identificada, a partir do nascimento até o 23º dia de vida. Permanecendo como única espécie prevalente nas fezes de bezerras do 7º ao 14º dia de vida. Os animais mais intensamente parasitados tiveram sintomatologia clínica caracterizada por apatia, diarreia com muco e sangue. Alguns dos animais estudados vieram a óbito indicando a patogenicidade deste parasito (Bastianetto et al. 2008). No Rio de Janeiro, O caso descrito encontrou três bezerras que albergavam oocistos de *E. bareillyi* nas fezes de um total de 33 bezerras búfalos examinados. Neste caso, os animais encontravam-se aparentemente saudáveis (Ramirez et al. 2009). Em outro estudo na Holanda, realizado com bezerras búfalos naturalmente infectados, também foi possível evidenciar a patogenicidade de *E. bareillyi*, associando-a ao óbito de animais com três semanas de vida (Dubey et al. 2008).

Este trabalho relata dois surtos de coccidiose por *E. bareillyi* em bezerros búfalos em duas granjas leiteiras localizadas nos municípios de Rio Claro e de Itaguaí, ambos no estado do Rio de Janeiro.

## HISTÓRICO

### Origem dos Animais

**Propriedade em Rio Claro:** Voltada para produção leiteira, onde a criação de búfalos é consorciada com bovinos e ovinos. O proprietário relatou o óbito de 10 bezerros búfalos, de um total de 30 animais, entre 45 a 50 dias de idade, em um período de quatro meses. O bezerreiro é comum para bovinos e bubalinos. Os bezerros búfalos que vieram a óbito estavam em período de aleitamento. A sintomatologia clínica foi caracterizada por diarreia breve, desidratação, olhos fundos, pelo eriçado e sem brilho, sem cólica ou tosse, anorexia e prostração, vindo a óbito num prazo de 4 a 5 dias. Durante este período, a fim de evitar a morte dos animais, quando estes paravam de mamar, o proprietário relatou que fazia medicação profilática com Tribissen® (trimetopim e sulfadiazina), Terramicina® (oxitetraciclina), Dectomax® (Doramectina) e desinfecção da área

com cal virgem. Um dos bezerros búfalos (Figura 1a), fêmea, com 50 dias de idade, com bom escore corporal, que veio a óbito na propriedade, foi necropsiada. Os órgãos torácicos e abdominais não tiveram alterações macroscópicas aparentes, apesar de se observar certo grau de autólise dado a temperatura ambiental elevada e por ser necropsiado no dia seguinte ao óbito. Havia conteúdo aquoso e leite talhado no rumem e abomaso. O conteúdo intestinal coletado estava esbranquiçado e levemente endurecido. Porém, dado ao quadro clínico caracterizado por diarreia, amostra de fezes e fragmentos de intestino delgado, foram coletados e estes mantidos em formol histológico e encaminhados ao Laboratório de Coccídios e Coccidioses (LCC) - Projeto Sanidade Animal (Embrapa/UFRRJ).

**Propriedade em Itaguaí:** Nesta propriedade de criação exclusiva de búfalos também voltada para a produção leiteira, amostras de fezes foram coletadas para observação da carga parasitária do rebanho em uma visita de rotina. Nesta visita, o proprietário relatou que um dos bezerros da propriedade apresentou leve grau de desidratação, pelos sem brilho, diarreia aquosa e fétida com curso de duração

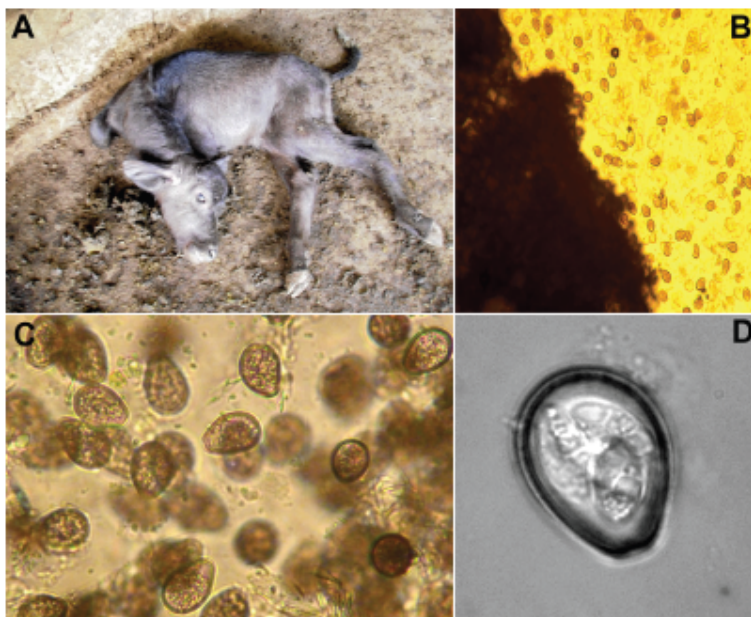


Figura 1. Coccidiose em bezerros búfalos por *Eimeria bareillyi*: a. Bezerro levado a óbito; b. Oocistos em fragmento de mucosa e livres obj. 5X; c. Numerosos oocistos encontrados nas fezes 40X; d. Oocisto esporulado em obj. 100X. Solução saturada de sacarose.

de três dias. Durante esse período como tratamento curativo desse animal o mesmo fez uso de ivermectina, não obtendo êxito com tratamento. Da mesma maneira que no caso anterior, amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal para serem examinadas no LCC.

**Exame laboratorial:** Ao exame de fezes, um grande número de oocistos foi observado na amostra coletada nas respectivas propriedades. Oocistos foram recuperados usando a técnica de flutuação Sheather com solução saturada de sacarose (S.G. 1.20) e, examinadas com auxílio de um microscópio binocular (Carl Zeiss, RFA) com base em Duszynski & Wilber (1997). Para identificação da espécie como base em seu tipo morfológico, parte dessas amostras foram mantidas em solução de dicromato de potássio a 2,5 % ( $K_2Cr_2O_7$ ) 1:6 (v/v) em placas de Petri a temperatura ambiente para que esporulassem. Para observação da morfologia dos oocistos esporulados utilizou-se as objetivas de 10, 40 e 100X. Para a mensuração, foram selecionados apenas oocistos esporulados e íntegros, para tanto, utilizou-se uma ocular micrométrica K-15X PZO (Polônia) e a objetiva de 40X no mesmo microscópio binocular citado anteriormente. Em cada oocisto esporulado procurou-se observar e mensurar, em  $\mu m$ , as estruturas morfológicas destacadas por Levine (1985) e Ramirez et al. (2009). Na avaliação das amostras procedentes das duas propriedades foi possível observar centenas de oocistos, bem como pedaços de mucosas repletos de oocistos não esporulados (Figura 1b,c). A média de 30 oocistos esporulados foi de 31,05 (28,00 – 34,00) x 25,11 (22,00 – 29,00)  $\mu m$ , além das características morfológicas semelhante às de *E. bareillyi* (Figura 1d).

Para análise histopatológica os fragmentos de intestino delgado coletados na necropsia do animal da granja leiteira de Rio Claro, foram emblocados em parafina, corados em hematoxilina e eosina e montados entre lâmina e laminula. Pode-se observar que no fragmento de mucosa do íleo diferentes fases de desenvolvimento de um coccídio caracterizadas por pequenos gamontes, macro e microgametócitos e alguns oocistos ainda não esporulados (Figura 2). Além disso, observou-se associado às formas evolutivas deste coccídio, perda de mucosa intestinal, atrofia das vilosidades com infiltração por células mononucleares.

Após a confirmação do diagnóstico como coccidiose, foi indicado aos proprietários de ambas as granjas leiteiras, o tratamento preventivo e cura-

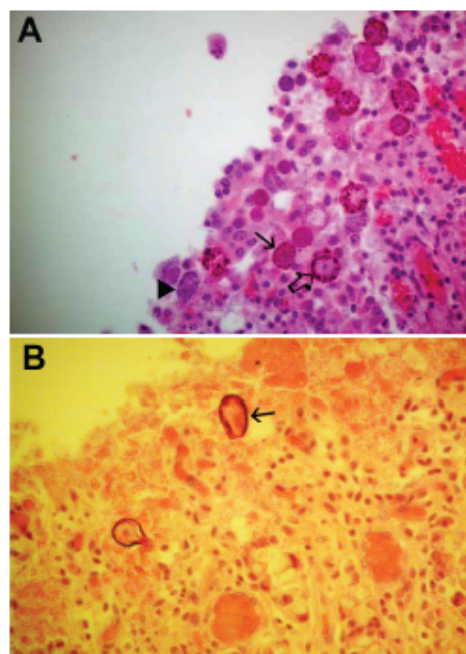


Figura 2. Coccidiose em bezerros búfalos por *Eimeria bareillyi*. a. Presença de gamontes (→), macro (⇐) e microgametócito (▶); b. Presença de oocistos não esporulados (→). H.E. obj. 40X.

tivo dos animais com Baycox® (Toltrazuril a 5% na dosagem de 30 mg/kg). Após o tratamento, os sintomas relacionados à coccidiose desapareceram em ambas as propriedades com a recuperação dos animais e o declínio da infecção.

## DISCUSSÃO

Os coccídios após a esporulação foram semelhantes aos de *E. bareillyi* conforme suas características morfológicas semelhantes as descrições de Levine (1985) e Ramirez et al. (2009) e das medidas de seus oocistos e esporocistos (Tabela 1).

A análise dos segmentos histológicos de mucosa do íleo procedentes do animal com 50 dias de idade, assinalou a presença de formas evolutivas semelhantes aos achados de Pande et al. (1971), Bastianetto et al. (2008) e Dubey et al. (2008) caracterizando-o como espécie altamente patogênica para bezerros búfalos. Como evidencia este trabalho, onde foi possível observar uma perda de 33% dos bezerros búfalos, por esta coccidiose em sua forma mais aguda.

Tabela 1. Aspectos comparativos dos oocistos esporulados de *Eimeria bareillyi* procedentes de *Bubalus bubalis*

Número de Amostras	Oocistos (µm)			Esporocistos (µm)		Referências
	Diâmetro		Índice morfométrico	Diâmetro		
	Maior	Menor		Maior	Menor	
-	30,8 (26 - 35)	21,6 (19 - 25)	-	18	8	Gill et al. 1963.
-	35 - 24	25 - 15	-	18 - 15	6 - 9	Levine, 1985
-	27,2 (23,2 - 9,5)	19,3 (16,5 - 22)	1,38 (1,26 - 1,57)	-	-	Dubey et al. 2008
48	28 - 30	19 - 21	-	15	7	Bastanetto et al. 2008
65	29,5 (27 - 33)	21,3 (20 - 24)	1,4 (1,2 - 1,6)	16,4 (13 - 19)	7,2 (6 - 8)	Ramirez et al. 2009
<b>Presente trabalho:</b>						
13*	31,05 (28 - 34)	25,11 (22 - 29)	1,24 (1,0 - 1,38)	-	-	Rio Claro, RJ
13**	35,12 (32-41)	25,62 (23-27)	1,37 (1,18-1,50)	16,13 (13-19)	7,95 (7-9)	Itaguaí, RJ

\*Oocistos não esporulados.

\*\* Oocistos Esporulados.

Foi sugerido, em ambos os casos, para o tratamento dos animais, o medicamento conhecido por sua marca comercial Baycox® (Toltrazuril a 5%)<sup>a</sup> na dosagem de 30 mg/kg por ter sua eficiência comprovada nos estágios intracelulares dos coccídios, produzindo uma diminuição da atividade enzimática mitocondrial com consequente alteração do metabolismo respiratório e dano na síntese dos ácidos nucleicos para a formação das estruturas constituintes dos oocistos (Darius et al. 2004) o que o tornou efetivo para a prevenção e tratamento curativo para búfalos (Ghanem et al. 2008). Sinalizando a eficiência do tratamento precoce de animais infectados; já, refletindo numa queda da taxa de eliminação de oocistos nas fezes, bem como no número de dias de eliminação de oocistos e diminuiu substancialmente a severidade da diarreia nos animais destas duas propriedades.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barbosa M.A., Blasi A.C., Oliveira M.R. & Correa F.M.A. Natural parasitism of buffaloes in Botucatu, SP, Brazil. III. Dynamics of gastrointestinal parasitism in cows and their calves. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 87:37-41, 1992.
- Bastanetto E., Freitas C.M.V., Bello A.C.P.P., Cunha A.P., Dalla Rosa R.C. & Leite R.C. Primeiro diagnóstico de *Eimeria bareillyi* (Apicomplexa: Eimeridae) nas fezes de bezerros bubalinos (*Bubalus bubalis*) naturalmente infectados no Estado de Minas Gerais, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 17(supl. 1):234-238, 2008.
- Darius A.K., Mehlhorn H., Heydorn A.O. Effect of toltrazuril and ponazuril on the fine structure and multiplication of tachyzoites of the NC-1 strain of *Neospora caninum* (a synonym of *Hammondia heydorni*) in cell cultures. *Parasitol. Res.*, 92:453-458, 2004.
- de Noronha Jr. A.C.F. & Buzetti W.A.S. Eimeriose em búfalos. *Cienc. Agr. Saude*, 2:47-53, 2002.
- \*Bayer S.A., São Paulo, SP.
- Dubey J.P., Wouda W. & Muskens J. Fatal intestinal coccidiosis in a three-week-old buffalo calf (*Bubalus bubalis*). *J. Parasitol.*, 94:1289-1294, 2008.
- Duszynski D.W. & Wilber P.G. A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeridae. *J. Parasitol.*, 83:333-336, 1997.
- Gahnem M.M., Radwaan M.E., Moustafa A.M.M. & Ebeid M.H. Comparative therapeutic effect of toltrazuril, sulphadimidine and amprolium on *Eimeria bovis* and *Eimeria zurnii* given at different times following infection in buffalo calves (*Bubalus bubalis*). *Prev. Vet. Med.*, 84:161-170, 2008.
- Griffiths R.B. Parasites and Parasitic Disease, p.236-275. In: Cockrill W.R. (Ed.), *The Husbandry and Health of Domestic Buffalo*. FAO, Roma, 1974.
- Hayat C.S., Ruknudin A., Hayat B. & Akhtar M. Prevalence of coccidiosis in cattle and buffaloes with emphasis on age, breed, sex, season and management. *Pakistan Veterinary Journal*, 14:214-217, 1994.
- Levine N.D. *Veterinary Protozoology*. Iowa State Univ. Press., Ames, 1985. 414p.
- Nalbantoglu S., Sari B., Cicek H. & Karaer Z. Prevalence of Coccidian Species in the water buffalo (*Bubalus bubalis*) in the Province of Afyon, Turkey. *Acta Vet.*, 77:111-116, 2008.
- Pande B.P., Bhatia B.B. & Chauhan P.P.S. Sexual stages and associated lesion in *Eimeria bareillyi* of buffalo calves. *Indian J. Ani. Sci.*, 41:151-154, 1971.
- Ramirez L., Berto B.P., Teixeira Filho W.L., Flausino W., Meireles G.S. de, Rodrigues J. da S. Almeida C.R.R. & Lopes C.W.G. *Eimeria bareillyi* from the domestic water buffalo, *Bubalus bubalis*, in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Bras. Med. Vet.*, 31:261-264, 2009.
- Restani R. & Tassi P. *Eimeria bareillyi* in bufali Italiani. *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.*, 23:881-885, 1969.
- Sanyal P.K., Ruprah N.S. & Chhabra M.B. Attempted transmission of three species of *Eimeria* Schneider, 1875 of buffalo-calves to cow-calves. *Indian J. Ani. Sci.*, 55:301-304, 1985a.
- Soulsby E.J.L. *Parasitologia y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. 7ª ed. Interamericana, Cidade de México, 1987. 823p.

#### **ANEXO – 4**

CORDEIRO, M.D.; DE MEIRELES, G. S.; SILVA, J.B.; SOUZA, M. M.S.; FONSECA, A. H. Soroprevalência para *Borrelia* spp. em caninos no município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 34, n. 3, p. 251-256, 2012.

## SOROPREVALÊNCIA PARA *Borrelia* SPP. EM CÃES NO MUNICÍPIO DE SEROPÉDICA, ESTADO DO RIO DE JANEIRO\*

Matheus Dias Cordeiro<sup>1</sup>, Gisele Santos de Meireles<sup>2</sup>, Jenevaldo Barbosa da Silva<sup>3</sup>, Miliane Moreira Soares de Souza<sup>4</sup> e Adivaldo Henrique da Fonseca<sup>5\*</sup>

**ABSTRACT.** Cordeiro M.D., de Meireles G.S., da Silva J.B., de Souza M.M.S. & da Fonseca A.H. [Seroprevalence for *Borrelia* spp. in dogs at the Municipality of Seropédica in the State of Rio de Janeiro]. Soroprevalência para *Borrelia* spp. em cães no município de Seropédica, estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 34(4):251-256, 2012. Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 km 7 Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: adivaldofonseca@yahoo.com

This study aimed to verify the presence of IgG antibodies against *B. burgdorferi* in stray and domiciled dogs from Seropédica, RJ. To investigate the prevalence of antibodies against *B. burgdorferi*, was performed to collect blood from 293 dogs in four areas of the Municipality of Seropédica, RJ. Serum samples were analyzed through of the indirect Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), using crude antigens of *B. burgdorferi* strain of North American origin. To confirm the presence of *Borrelia* spp., 102 positive samples were tested by Western Blotting. Ticks were also collected through of inspection of the animals. The specimens found were manually removed and stored in polypropylene bottles and later identified. The association between seropositive animals and variables were performed using the  $\chi^2$ . Of the 293 sera tested, 154 (52.56%) were positive for homologous antibodies anti-*B. burgdorferi*. It was founded a prevalence of 43.75% (14/32) in "54 km", 51.72% (45/87) in "49 km", 46.67% (42/90) in "40 km" and 63.1% (53/84) in UFRRJ. It was significant difference ( $p < 0.05$ ) between the prevalence of antibodies against *Borrelia* spp. in stray dogs and domiciled. Dogs with access to the street had a frequency significantly ( $p < 0.05$ ) greater than animals kept in prison. There were no statistical differences ( $p > 0.05$ ) the relationship between the variables: presence of ticks, animal sex, habits, frequenting pastures and age of the animals with seropositivity observed in either species. Regarding ticks, at least 64.5% (189/293) dogs were infested with ticks at the moment of collection. Only two species of ticks were identified, *Rhipicephalus sanguineus* and *Amblyomma cajennense*. The presence of antibodies anti-*B. burgdorferi* in dogs from Seropédica, RJ is indicative of the presence of spirochetes in this area.

**KEY WORDS.** Spirochetes, zoonoses, serology.

**RESUMO.** O estudo teve como objetivo estudar a soroprevalência de anticorpos homólogos da classe IgG anti-*Borrelia burgdorferi* em cães do município de Seropédica-RJ. Foi efetuada a coleta de sangue de 293 cães em quatro áreas do município de Seropédica-RJ, e os soros obtidos foram subme-

\*Recebido em 30 de janeiro de 2012.

Aceito para publicação em 29 de fevereiro de 2012.

<sup>1</sup>Médico-veterinário, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (CPGCV), Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: mathcordeiro@hotmail.com - bolsista CNPq.

<sup>2</sup>Médica-veterinária, M.C.F.: PPGCV, IV, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: gisa\_meireles@yahoo.com.br - bolsista CAPES.

<sup>3</sup>Médico-veterinário, M.C.F.: IV, PPGCV, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: jenevaldo@hotmail.com - bolsista CNPq.

<sup>4</sup>Médica-veterinária, Dr.C.F.: Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, IV, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: miliane@ufrj.br

<sup>5</sup>Médico-veterinário, Dr.Med.Vet.Parasitol.Vet., LD, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, IV, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000. \*Autor para correspondência. E-mail: adivaldofonseca@yahoo.com - bolsista CNPq.

tidos à pesquisa de anticorpos homólogos da classe IgG contra *B. burgdorferi* cepa americana G39/40, utilizando o teste de Ensaio de Imunoabsorção enzimática (ELISA) indireto. Para confirmação da presença de *Borrelia* spp. no município, 102 amostras positivas foram testadas pelo Western Blotting. Também foram coletados carrapatos, a partir da inspeção das regiões das orelhas, dorso e coxins palmares e plantares dos animais. Dos animais estudados, 154 (52,56%) foram positivos para anticorpos homólogos anti-*B. burgdorferi*. Apenas as espécies, *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma cajennense*, foram identificadas, sendo encontradas em 189 (64,5%) de animais parasitados. Das 102 amostras submetidas ao WB como teste confirmatório, 85,29% (87/102) apresentou pelo menos cinco das dez bandas específicas. Foi observada diferença significativa entre as prevalências encontradas em caninos errantes e domiciliados. Os cães com idade acima de 2 anos, tiveram uma frequência significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que animais mantidos presos. Não foram observadas diferenças estatísticas entre a relação das variáveis, presença de carrapatos, sexo dos animais, hábitos de frequentar pastos e acesso à rua com a soropositividade observada. A presença de anticorpos homólogos anti-*B. burgdorferi* em caninos de Seropédica, RJ foi considerado um indicativo da presença de espiroquetas na região estudada.

**PALAVRAS-CHAVE.** Espiroquetas, zoonoses, sorologia.

### INTRODUÇÃO

A borreliose de Lyme (BL) foi descrita em 1975 por Steere et al. (1977), ao investigarem um surto de artrite em adolescentes na comunidade de "Old Lyme" em Connecticut nos EUA. O agente etiológico da BL foi identificado em 1982 por Willy Burgdorfer tendo sido denominado *Borrelia burgdorferi* (Yoshinari et al. 2010).

No Brasil, a enfermidade tem diferenças clínicas significativas, e por este motivo foi denominada Doença de Lyme-*simile*, Síndrome Infecto-Reacional Lyme-*simile* (SIRLS) ou Doença de Lyme-*simile* Brasileira com intuito de diferenciá-la da BL clássica. Os primeiros casos foram identificados em 1992. Entretanto, ainda não foram isoladas bactérias do complexo *B. burgdorferi sensu lato* nos fluidos biológicos ou em tecidos. No intuito de desvincular esta zoonose brasileira da BL clássica americana ou européia, objetivando o incentivo às pesquisas e a difusão do conhecimento sobre esta

enfermidade emergente à classe médica brasileira propôs a mudança da nomenclatura para Síndrome Baggio-Yoshinari (SBY). Yoshinari et al. (2010).

Estudos soroepidemiológicos das borrelioses no Brasil, foram realizados em humanos (Yoshinari et al. 2003, Corradi et al. 2006), em cães (Soares et al. 1999, Joppert et al. 2001, Alves et al. 2004, Odwyer et al. 2004, Salgado 2006), equinos (Salles et al. 2002, Madureira 2004), bovinos (Fonseca et al. 1996, Ishikawa 1996) e bubalinos (Corrêa 2007) e a soroprevalência na maioria dos estudos apresenta valores próximos aos reportados em áreas endêmicas na América do Norte (Greene 1990).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência de anticorpos homólogos da classe IgG contra *B. burgdorferi* em cães domiciliados no município de Seropédica e em cães errantes e domiciliados no *campus* Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados 209 amostras de soros de cães em área urbana do município de Seropédica e 79 na UFRRJ, sendo 44 de cães domiciliados e 35 de cães errantes. Todas as amostras foram coletadas entre outubro de 2010 a abril de 2011, e os cães eram de diferentes idades, ambos os sexos, aparentemente sadios e predominantemente sem raça definida (SRD). Os animais utilizados neste estudo considerados errantes, são animais vadios que vivem no entorno dos alojamentos da UFRRJ, alimentados por acadêmicos de diferentes cursos da Instituição.

Para calcular a amostragem foi considerada uma prevalência esperada de 15,58%, baseado em um estudo sorológico para *Borrelia* spp. realizado em cães de área rural do Estado do Rio de Janeiro (O'Dwyer et al. 2004). O número ideal de animais foi determinado pela fórmula de amostragem aleatória simples, utilizando 95% de intervalo de confiança e erro máximo de 5% (Thrusfield 1995). Desta forma, determinou-se um número amostral de 203 animais. Para evitar que possíveis perdas de material durante a coleta e processamento dos soros pudessem interferir no resultado final da pesquisa, e pelo fato da possibilidade de estudo da prevalência de outras doenças, foi estabelecida uma amostra de 209 cães na área urbana.

A área urbana do município de Seropédica foi subdividida em três áreas, sendo, área 1: "Km 40", com um total de 90 animais; área 2: "Km 49", com um total de 90 animais e área 3: "Km 54", com



um total de 32 animais, e o número de animais coletados de cada área decorreu da proporção média de cães vacinados nos anos de 2008 e 2009<sup>6</sup>. Foram coletadas outras 84 amostras de soro de cães no *Campus* da UFRRJ, sendo 49 animais domiciliados no Bairro Ecologia e 35 animais errantes.

As amostras sanguíneas foram obtidas por punção da veia cefálica em seringas de 5 mL e posteriormente transferidas para frascos estéreis sem anticoagulante. Posteriormente, o sangue foi centrifugado e os soros obtidos foram acondicionados em frascos de polipropileno e mantidos a -20°C até o momento da análise sorológica.

Os soros obtidos foram submetidos à pesquisa de anticorpos da classe IgG contra antígeno bruto de *B. burgdorferi* utilizando o Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA) indireto, com antígeno a 15mg/mL, soro diluído em Tampão salino fosfato (PBS Tween 20 0,05% pH 7,4) a 1:800 e o conjugado a 1:5000 (anti-dog IgG, whole molecule, alkaline phosphatase, Sigma®) (Soares et al. 1999). Foram utilizadas 12 amostras negativas de animais previamente testados e um controle positivo de um animal inoculado com antígeno inativado de *B. burgdorferi* cepa G39/40. O ponto de corte (*cutoff*) para o ensaio foi determinado utilizando a distribuição t-Student com um grau de confiança de 99,99%, segundo a média mais três vezes o desvio padrão dos valores da densidade óptica (DO) dos controles negativos (Frey et al. 1998). O índice de densidade óptica foi calculado com base na fórmula  $DO \times 100 / \text{"cutoff"}$ .

Os soros de 102 animais que apresentaram positivos no teste ELISA indireto foram submetidos à técnica de *Western Blotting* (WB) como exame confirmatório.

Para a padronização do WB foi realizado o protocolo segundo Madruga et al. (2001) com modificações. Realizou-se a eletroforese (Mini-Protean II System, Bio Rad) de 250 µg de antígeno bruto de *B. burgdorferi*, por duas horas utilizando corrente de 25 mA em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% e gel de empilhamento de 5%. Fez-se a transferência das proteínas para o papel de nitrocelulose, utilizando uma corrente de 30V, 70 mA e 25W (Mini-Trans Blot System, Bio Rad). Após a transferência, a fita foi corada com Ponceau S, com a finalidade de identificar a presença de proteínas, sendo, a seguir bloqueada com leite desnatado a 5% por uma hora. O *blot* foi preso no aparato Mini-Protean

II Multiscreen formando canaletas individuais. Em seguida, colocou-se, em cada canaleta, o controle positivo, o controle negativo e as amostras a serem testadas, todos diluídos na proporção de 1:500 em Tampão salino fosfato (PBS Tween 20 a 0,1% e pH 7,2) e num volume de 500µl, em seguida foi incubando em agitador de placas à temperatura ambiente por uma noite. Depois de lavados com PBST 0,1%, foi adicionado 500 µl do conjugado (anti-dog IgG, whole molecule, alkaline phosphatase, SIGMA®) diluído à 1:1000 em PBST 01% e incubado também a temperatura ambiente por pelo menos duas horas em agitador de placas. Ao final desse tempo, acrescentou-se o substrato revelador BCIP/NBT e aguardou-se a revelação das bandas no controle positivo e nas amostras. Em seguida, os blots foram escaneados e as bandas identificadas e calculadas a partir do programa Quantity One® (SigmaVersão 4.5.2/ 1-D Analysis Software – Bio Rad, Laboratories, EUA).

O estudo das associações entre as variáveis de interesse foi realizado por meio do  $\chi^2$ . As análises foram realizadas com o auxílio do programa computacional BioEstat 5.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise soro-epidemiológica dos 293 soros testados revelou que um total de 154 (52,56%) animais foram reativos ao ELISA indireto. Desta forma, foi encontrada uma prevalência de 46,67% (42/90) no "Km 40", 51,72% (45/87) no "Km 49", 43,75% (14/32) no "Km 54" e 63,1% (53/84) na UFRRJ. Os índices de densidade óptica obtido em cada área estão apresentados na Figura 1.

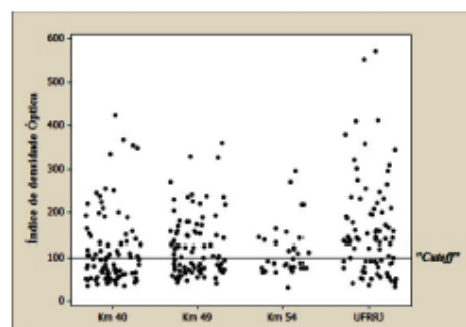


Figura 1. Distribuição das densidades ópticas dos animais em relação ao "cutoff" ( $DO \times 100 / \text{"cutoff"}$ ) obtidas do ensaio ELISA indireto para *Borrelia* spp. dos soros de cães no município de Seropédica, RJ.

<sup>6</sup> Secretaria de Saúde – Setor de Vigilância Sanitária – Prefeitura Municipal de Seropédica, RJ.

A alta prevalência encontrada no presente estudo pode ser justificada, em parte, pelo número de cães errantes e o tipo de criação dos animais domiciliados com acesso frequente à rua, facilita o contato com cães errantes, bovinos, equinos e animais selvagens, aumentando a chance de infecção (Torrence et al. 1990). Os animais domésticos e selvagens apresentam maior risco em adquirir o agente etiológico porque são parasitados por grande número e diversidade de carrapatos (Fonseca et al. 2005).

A prevalência encontrada no *campus* da UFRRJ (63,1%) foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que a prevalência encontrada em cães coletados em área urbana no município de Seropédica (48,33%). Este fato se deu, provavelmente, pelo número expressivo de animais errantes no *campus* da Universidade, os quais são animais com alto índice de infestação por carrapatos. Outro motivo, é que o seu *campus* universitário possui características de área rural, apresentando uma vegetação típica de Mata Atlântica com fragmentos florestais no interior onde grande parte está caracterizada por vegetação secundária com grandes áreas campestres e áreas de pastagem para bovinos e equinos (Ferreira et al. 2010).

Os dados obtidos através da entrevista feita aos proprietários dos animais domiciliados revelaram que 51 dos 132 animais positivos no ELISA indireto tinham hábito de frequentar pastos ou currais (Tabela 2). Apesar de não apresentar significância, o hábito de frequentar pastos e currais expõe o animal ao contato prévio com carrapatos da espécie *Amblyomma cajennense*, e isto pode representar um maior risco de infecção, uma vez que, acredita-se ser, este carrapato, o principal transmissor de Borreliose a humanos e animais (Fonseca et al. 2005, Yoshinari et al. 2010). Porém, apenas sete animais domiciliados estavam sendo parasitados por *A. cajennense* no momento da coleta, e quatro destes foram positivos ao ELISA indireto. Estudando aspectos soropidemiológicos para *Borrelia* spp. em equinos no Estado do Rio de Janeiro, Salles et al. (2002) observaram diferenças significativas entre a infestação por carrapatos e sorologia positiva. Estes equinos eram parasitados por carrapatos das espécies *Dermacentor nitens*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e principalmente *A. cajennense*.

Dentre os 257 proprietários que responderam à entrevista, 49 disseram ainda que seus animais adentram em áreas de mata para caçar, no entanto não houve diferença estatística.

Grande parte dos proprietários (76,65%) relatou

Tabela 1. Frequência sorológica de anticorpos anti-*B. burgdorferi* em caninos do município de Seropédica, RJ, determinado pelo ELISA indireto, em relação idade do animal.

Idade	Positivo	Negativo	Total
≤ 2 anos	37	64	96
> 2 anos	95	60	155
Total	132	125	257

Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ )

fazer o tratamento contra carrapatos. Porém, no momento da coleta 64,5% dos cães estavam parasitados por carrapatos (Tabela 1). As únicas espécies encontradas foram *Rh. sanguineus* e *A. cajennense*, sendo a primeira espécie mais abundante. Segundo O'Dwyer et al. (2001), cães criados em áreas urbanas de Paracambi, município vizinho de Seropédica, estavam parasitados, principalmente, por *R. sanguineus*, enquanto cães de áreas rurais apresentaram, preponderantemente, as espécies *A. ovale*, *A. tigrinum*, *A. aureolatum* e *A. cajennense*. A análise estatística revelou que não houve nível de significância entre as variáveis, parasitismo por carrapatos no momento da coleta e soropositividade. Porém, uma infestação natural por populações elevadas de carrapatos, pode ser considerada um indicador de altos títulos sorológicos (Salles et al. 2002).

A análise estatística em relação ao sexo mostrou que, apesar de existir um maior número de positividade entre as fêmeas (92/154), não houve diferença estatística.

Houve diferença estatística em relação à idade, ocorrendo uma maior frequência entre animais acima de dois anos (Tabela 1). Este fato, ocorre devido a um maior tempo de exposição à carrapatos. Alves et al. (2004) e Salgado (2006) relataram diferenças estatísticas em cães a partir de três e um ano de idade, respectivamente. Por outro lado, Joppert et al. (2001) e O'Dwyer et al. (2004) não encontraram significância nos dados em relação à idade.

No Brasil, a prevalência de anticorpos contra *B. burgdorferi* em cães, através do ELISA indireto, foi inicialmente pesquisada por Soares et al. (1999) que observaram uma prevalência de 20% no município de Itaguaí. Utilizando a mesma técnica, Joppert et al. (2001) encontraram 9,7% de soropositividade em cães da cidade de Cotia, SP. Nessa mesma região foi relatada uma soroprevalência de 7,5% em humanos, também através do ELISA indireto (Yoshinari et al. 1997).

A prevalência total encontrada no presente estudo (52,56%) foi superior aos resultados de O'Dwyer

et al (2004), que observaram uma prevalência de 15,58% em cães de área rural de sete cidades do Estado do Rio de Janeiro, dentre elas, Seropédica, RJ.

O resultado encontrado neste trabalho corrobora com o achado de Alves et al. (2004), que observou uma frequência de anticorpos de 48,25% em cães da Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, sendo que no município de Seropédica foi obtida uma prevalência de 51,28%.

Salgado (2006) na cidade de Campo Grande, MS e Santos (2008) na cidade do Rio de Janeiro, RJ ao determinarem a presença de anticorpos da classe IgG anti-*B. burgdorferi* em cães acautelados no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de seus respectivos municípios, encontraram resultados superiores ao do presente estudo, 73,3% e 86,8% de positividade, respectivamente.

Os valores encontrados no presente estudo corroboram com pesquisas sorológicas realizadas em cães de áreas endêmicas para borreliose de Lyme nos EUA (Magnarelli et al. 1985, Burgess 1986).

A existência de reação cruzada entre *Borrelia* spp. e *Leptospira* sp. tem sido relatada, embora não sendo significativa (Wells et al. 1993). Soares et al. (1999) e Joppert et al. (2001) não observaram reações cruzadas significativas entre anticorpos de *B. burgdorferi* e variantes sorológicas de *Leptospira* spp. Das 154 amostras positivas no ELISA indireto, 102 foram submetidas ao WB como teste confirmatório. Com isso, 87 (85,29%) amostras apresentaram pelo menos cinco das dez bandas específicas para infecção crônica (Anticorpos da Classe IgG) de acordo com Wang et al. (2010). Joppert et al. (2001) confirmou, através do WB, 20 (86,96%) exames de 23 animais positivos no ELISA indireto.

## CONCLUSÃO

A alta frequência de anticorpos para *B. burgdorferi* indica e reforça a importância dos cães como sentinela para a presença de *Borrelia* spp. na região.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves A.L., Madureira R.C., Silva R.A., Corrêa F.N. & Botteon R.C.C.M. Frequência de anticorpos contra *Borrelia burgdorferi* em cães na região metropolitana do Rio de Janeiro. *Pesq. Vet. Bras.*, 24:204-205, 2004.
- Burgess E.C. Natural exposure of Wisconsin dogs to the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Lab. Anim. Sci.*, 36:288-290, 1986.
- Chomel B. Tick-borne infections in dogs - An emerging infectious threat. *Vet. Parasitol.*, 179:294-301, 2011.
- Corrêa F.N. *Pesquisa de Anticorpos Homólogos anti-Borrelia burgdorferi em Búfalos (Bubalus bubalis) do Estado do Pará*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro. 36p., 2007. (Disponível em: <[http://adivaldofonseca.vet.br/2011/wp-content/uploads/25\\_Correa\\_2007\\_mestrado.pdf](http://adivaldofonseca.vet.br/2011/wp-content/uploads/25_Correa_2007_mestrado.pdf)>).
- Corradi D.A., Carvalho V.M. & Coutinho S.D. Anticorpos para *Borrelia burgdorferi* em indivíduos que trabalham com animais silvestres. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 58:966-968, 2006.
- Ferreira I., Ventura P.E.C. & Luz H.R. *Aves no campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*. 1ª ed. EDUR, Seropédica, 2010. 255p.
- Fonseca A.H., Salles R.S., Salles S.A.N., Madureira R.C. & Yoshinari N.H. Borreliose de Lyme simile: uma doença emergente e relevante para a dermatologia no Brasil. *Anais Bras. Dermatol.*, 80:171-178, 2005.
- Fonseca A.H., Ishikawa M.M., Soares C.O., Massard C.L. & Yoshinari N.H. Lyme borreliose serology in cattle in Brazil. *Rev. Univ. Rur.: Cienc. Vida*, 18:85-89, 1996.
- Frey A., Canzio J.D. & Zurakowski D. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. *J. Immunol. Methods*, 221:35-41, 1998.
- Greene R.T. An update on the serodiagnosis of canine Lyme borreliosis. *J. Vet. Intern. Med.*, 4:167-171, 1990.
- Joppert A.M., Hagiwara M.K. & Yoshinari N.H. Antibodies in dogs from Cotia county, São Paulo State, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 43:251-255, 2001.
- Madureira R.C. *Frequência de anticorpos homólogos anti-Borrelia burgdorferi em equinos dos municípios de Três Rios, Vassouras e Valença, estado do Rio de Janeiro*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro. 40p., 2004. Disponível em: <[http://adivaldofonseca.vet.br/2011/wp-content/uploads/22\\_Madureira\\_2004\\_mestrado.pdf](http://adivaldofonseca.vet.br/2011/wp-content/uploads/22_Madureira_2004_mestrado.pdf)>.
- Madruça C.R., Soares C.O. & Araújo F.R. *Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária*. 1ª ed., Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, 2001. v.1. 360p.
- Magnarelli L.A., Jacobson R.H., Lauderdale T.L., Chang Y.F., Shin S.J., Thomford J.W., Todhunter R.J. & Summers B.A. Borreliosis in dogs from southern Connecticut. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 189:955-959, 1985.
- O'Dwyer L.H., Soares C.O., Massard C.L., Souza J.C.P., Flausino W. & Fonseca A.H. Soroprevalência de *Borrelia burgdorferi* *latu sensu* associada à presença de carrapatos em cães de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Cienc. Rur.*, 34:201-205, 2004.
- O'Dwyer L.H., Massard C.L. & Souza J.C.P. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro state, Brazil. *Vet. Parasitol.*, 94:143-150, 2001.
- Salgado F.P. *Identificação de hemoparasitos e carrapatos de cães procedentes do centro de controle de zoonoses de Campo Grande Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2006. 55p. (Disponível em: <<http://hdl.handle.net/123456789/947>>).
- Salles R.S., Fonseca A.H., Scofield A., Madureira R.C. & Yoshinari N.H. Sorologia para *Borrelia burgdorferi latu sensu* em equinos no estado do Rio de Janeiro. *Hora Vet.*, 127:46-49, 2002.

- Santos M., Júnior V.H., Ribeiro-Rodrigues R. & Talhari S. Borreliose de Lyme. *Anais Bras. Dermatol.*, 85:930-938, 2010.
- Santos V.G. *Aspectos clínicos e laboratoriais da Cinomose, Ehrlichiose e Borreliose em cães (Canis familiaris, Linnaeus, 1758) naturalmente infectados*. Dissertação (Medicina Veterinária), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2008. 58p. (Disponível em: <<http://www.ufrj.br/posgrad/cpmv/teses/vania.pdf>>)
- Soares C.O., Fonseca A.H., Ishikawa M.M., Manera G.B., Scofield A. & Yoshinari N.H. Sorologia para borreliose em cães procedentes da Baixada Fluminense, estado do Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Med. Vet.*, 21:111-114, 1999.
- Steere A.C., Malawista S.E., Snyderman D.R., Shope R.E., Andiman W.A., Ross M.R. & Steere R.M. Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arthritis Rheum.*, 20:7-17, 1977.
- Thrusfield M.V. *Veterinary epidemiology*. 2ª. ed. Blackwell, Oxford, 1995. 479p.
- Torrence M.E., Suzanne R.J., Jay F.L., William L.N. & Kevin D.P. Serosurvey of shelter dogs in Virginia for antibodies to *Borrelia burgdorferi*. *Prev. Vet. Med.*, 10:41-46, 1990.
- Wang G., Agüero-Rosenfeld M.E., Wormser G.P. & Schwartz I. Detection of *Borrelia burgdorferi*, p.443-466. In: Samuels D.S. & Radolf J.D. (Eds), *Borrelia: Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis*. 1ª ed., Caister Academic Press, Norfolk, 2010.
- Wells S.J., Trent A.M., Robinson R.A., Knutson K.S. & Be R.F. Association between clinical lameness and *Borrelia burgdorferi* antibody in dairy cows. *Am. J. Vet. Res.*, 54:398-405, 1993.
- Yoshinari N.H., Abrão M.G., Bonoldi V.L.M., Soares C.O., Madruga C.R., Scofield A., Massard C.L. & Fonseca A.H. Coexistence of Antibodies to Tick-borne Agents of Babesiosis and Lyme Borreliosis in Patients from Cotia County, State of São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 98:311-318, 2003.
- Yoshinari N.H., Barros P.J.L., Bonoldi V.L.N., Ishikawa M., Barros-Battesti D.M., Pirana S., Fonseca A.H. & Schumaker T.T. Perfil da Borreliose de Lyme no Brasil. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med.*, 52:111-117, 1997.
- Yoshinari N.H., Mantovani E., Bonoldi V.L.N., Marangoni R.G. & Gauditano G. Doença de Lyme-símile Brasileira ou Síndrome Baggio-Yoshinari: Zoonose exótica e emergente transmitida por carrapatos. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 56:363-369, 2010.

## **ANEXO – 5**

JESUS, V.L.T; PEREIRA, R. de C.G.; **DE MEIRELES, G. S.**; RODRIGUES, J. da S.; JORGE, J.L.B.P Brucelose Suína no Estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 32, n. 2, p. 101-104, 2010.

## BRUCELOSE SUÍNA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO\*

### SWINE BRUCELLOSIS IN THE STATE OF RIO DE JANEIRO

Vera Lucia Teixeira de Jesus<sup>1</sup>, Rita de Cássia Gomes Pereira<sup>2</sup>, Gisele Santos de Meireles<sup>3</sup>,  
Janaina Soledad Rodrigues<sup>4</sup>, Jorge Luiz Baronto Pereira Jorge<sup>5</sup> e Walter Flausino<sup>6</sup>

**ABSTRACT.** Jesus V.L.T de, Pereira R. de C.G., Flausino W., Meireles G.S. de, Rodrigues J. da S. & Jorge J.L.B.P. [Swine brucellosis in the State of Rio de Janeiro, Brazil]. *Brucelose suína no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Revista Brasileira de Medicina Veterinária, 32(2):101-104, 2010.* Departamento de Avaliação e Reprodução Animal, Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, km 7 da Br 465, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: [jesus@ufrj.br](mailto:jesus@ufrj.br)

The objective of this serum-epidemiologic inquiry was to associate the occurrence of vaginal discharge, abortions, mummified phoetuses, repetitive breeding and abscesses in nuts covered by natural service with brucellosis infection. From July to December 2008, five blood samples were colleted and serum samples were submitted to serum agglutination test with buffer acidified antigen (AAT) for brucellosis. In the first trial, of the 10 matrices with reproductive disturbances, 3/10 (30.0%) were positives. In the second trial, matrices and reproducers had prevalence of 12.8% (5/34) females. In the third trial the prevalence of 8.9% for the flock, consisted of 282 swine, being 19/137 (12.2%) female and 6/120 (4.8%) male were reagents, with a difference for sex ( $p=0.0349$ ) and not for age. Being thus, sanitary culling of the reacting animals was recommended. After the discard, two trials were done once more and no reacting animals were found. As the swine farms aim to the certification for sales of reproducers, a remain flock was discarded. A new breed was formed with rigid measured of sanitation for purchasing and selling animals, therefore, this work serves of alert, so that the brucellosis examination should be adopted as routine in swine farms in the State of Rio de Janeiro.

KEY WORDS: Abortion, infection, reproduction, brucellosis.

**RESUMO.** O objetivo deste inquérito soro-epidemiológico foi de associar a ocorrência de corrimentos vaginais, abortamentos, repetições deaios, fetos mumificados e abscessos em porcas cobertas por monta natural, com a infecção por *Brucella*. Durante os meses de julho a dezembro de 2008, foram feitas cinco coletas de sangue, os soros obtidos foram submetidos à prova de

Soroaglutinação Rápida com Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) para a brucelose. Na primeira coleta, das 10 matrizes com distúrbios reprodutivos, 3/10 (30,0%) foram reagentes. Na segunda coleta, as matrizes e os reprodutores, tiveram uma prevalência de 12,8% (5/34) fêmeas reagentes. Na terceira coleta foi constatada prevalência de 8,9% para o rebanho de 282 suínos,

\* Recebido em 18 de agosto de 2009.

Aceito em 03 de março de 2010.

<sup>1</sup>Médica-veterinária, *Dr.CsVs*. Departamento de Avaliação e Reprodução Animal, Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: [jesus@ufrj.br](mailto:jesus@ufrj.br)

<sup>2</sup>Médica-veterinária, Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: [regp@ufrj.br](mailto:regp@ufrj.br) – bolsista REUNI

<sup>3</sup>Médica-veterinária, *M.CsVs*. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: [gisele.meireles@gmail.com](mailto:gisele.meireles@gmail.com) – bolsista CAPES

<sup>4</sup>Médica-veterinária, *M.CsVs*. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: [jajasoledad@gmail.com](mailto:jajasoledad@gmail.com) – bolsista CNPq

<sup>5</sup>Médico-veterinário, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, Rua José Breves, 550, Centro, Pinheiral, RJ 27197-000, Brasil.

<sup>6</sup>Biólogo, *PhD*. Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: [flausino@ufrj.br](mailto:flausino@ufrj.br)

sendo 19/137 (12,2%) fêmeas e 6/120 (4,8%) machos reagentes, com diferença para sexo ( $P > 0,05$ ) e não para a idade. Foi recomendado o abate sanitário dos animais reagentes. Após o descarte, foram feitas mais duas novas coletas, sem registro de animais reagentes. Como a granja visa à certificação para venda de reprodutores, o restante do rebanho foi descartado, e iniciado um novo plantel com rígidas medidas sanitárias para compra e venda de animais, portanto, este trabalho serve de alerta, para que o exame de brucelose seja adotado na rotina das granjas de suínos no Estado do Rio de Janeiro.

PALAVRAS CHAVE: Abortamento, abscesso, reprodução, brucelose.

### INTRODUÇÃO

A suinocultura no Brasil vem apresentando nos últimos anos um grande avanço tecnológico; mesmo assim há registro de baixos índices de produtividade, devido a diversos fatores, tais como a utilização de práticas de manejo inadequada e deficiências de diagnóstico de enfermidades (Ribeiro 2005).

Diversos agentes infecciosos podem estar envolvidos em problemas reprodutivos de uma granja, os quais podem ocorrer de forma clínica, facilmente detectada, ou na forma sub-clínica, tornando difícil a sua identificação e controle. Dentro deste quadro clínico, enquadram-se a brucelose suína, que é uma zoonose, cujo agente etiológico é *Brucella suis*, subdividida em cinco sorotipos, sendo que o suíno é hospedeiro mais frequente para os sorotipos 1 e 3. *Brucella abortus* pode infectar os suínos, porém é menos patogênica (Silva Paulo et al. 2000, EFSA 2009).

Em vários continentes, há relato de casos esporádicos em porcos domésticos, devido a *B. suis*, mas em alguns países da América do Sul e Sudoeste da Ásia, há uma alta prevalência, com predomínio do sorotipo 1. No Brasil, é considerada como a segunda mais prevalente no quadro de infecção do gênero *Brucella* sp., segundo a OIE (2009).

Os suínos estão suscetíveis à brucelose a partir do quarto ao quinto mês de idade, transmitindo de suíno ao outro, através da ingestão de alimentos ou água contaminados por descargas vulvares, ou pela ingestão de fetos abortados e membranas fetais. As porcas infectadas apresentam abortamento, em qualquer fase da gestação, sendo influenciada mais pelo tempo de exposição ao agente, do que o período de gestação. Também ocorrem outros distúrbios reprodutivos tais como: natimortos e descargas vulvares. Nos machos, predomina orquite, e pode afetar secundariamente outros órgãos genitais, e é comum o isolamento do sêmen, sem

qualquer sinal clínico do macho, portanto para a espécie é considerada a transmissão pela cópula. Em ambos os sexos, também afetam as articulações causando laminites e paralisia (FAO 2009).

Para o diagnóstico sorológico da brucelose suína, utiliza-se o mesmo antígeno padronizado e comercializado no Brasil para *B. abortus*, visto que *B. suis* também é uma cultura lisa e o teste de soroaglutinação consegue detectar a parte de lipossacarídeo destas duas espécies (Lord et al. 1997, Matos et al. 2004, PNSS 2008, EFSA 2009).

O objetivo deste inquérito soro-epidemiológico foi de verificar as associações dos distúrbios reprodutivos com a brucelose, e da mesma com diferentes categorias de animais, bem como demonstrando a importância do controle sanitário rigoroso na granja de suínos.

### MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia baseou-se no inquérito soro-epidemiológico para a brucelose proposto pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), segundo o Programa Nacional de Sanidade de Suídeos (PNSS 2008), visando detectar o diagnóstico situacional da doença em uma granja comercial no município de Pinheiral, no Estado do Rio de Janeiro. Com este objetivo, inicialmente, foi feita uma coleta por matrizes com distúrbios reprodutivos, sendo confirmados animais reagentes; com isso, houve a necessidade de verificar a ocorrência da brucelose no rebanho como um todo.

A propriedade avaliada tratava-se de uma granja com sistema intensivo, com a finalidade de ensino e comercialização de matrizes e os seus derivados para o consumo humano. Composta por 282 suínos, as matrizes da raça Camborough 23, os reprodutores AG PIC 412 e os cruzamentos Ultra-Light. Estes animais são mantidos em maternidade, creche, recría, terminação e pocilgas das matrizes e dos reprodutores individualizados. A ração era fabricada na propriedade, e analisada sempre pelo técnico responsável em laboratório credenciado. A água era tratada com cloro e fornecida "ad libitum" aos animais; quanto à limpeza das instalações e o tratamento dos dejetos, eram realizados diariamente.

Para o diagnóstico da brucelose, as amostras de sangue foram coletadas nos meses de julho a dezembro de 2008, por punção auricular, com agulha descartável, uma para cada animal e transportadas para o laboratório de diagnóstico. Os soros sanguíneos obtidos foram estocados a -20°C e, depois, submetidos ao teste de diagnóstico de brucelose.

Como teste de triagem foi realizado o com Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), cujos exames foram fei-

tos no Laboratório de Patologia da Reprodução (LPR), do Projeto Saúde Animal, Convênio Embrapa/UFRRJ. No teste AAT foi utilizado o antígeno com concentração de 8%, tamponado em pH ácido (3,65), padronizado a partir da cepa 119-3 de *Brucella abortus*, inativado pelo calor, antígeno produzido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), sendo o exame realizado segundo o protocolo preconizado pelo manual técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) (MAPA 2003).

Um banco de dados foi montado no programa EPI INFO (CDC 2008) no qual foram incluídos todos os registros dos distúrbios reprodutivos das matrizes, como abortamentos, abscessos, fetos mumificados, repetições de cio e corrimento vaginal, bem como os resultados dos testes sorológicos. O teste Qui-quadrado e Fisher exato, quando recomendado, foi utilizado para verificação de associações entre a variável explicada (prevalência de Brucelose) e as variáveis explicativas (sexo e idade) (Sampaio 2000).

## RESULTADOS

No período de julho a dezembro de 2008, foram realizadas quatro coletas sorológicas, as quais estão discriminadas na Tabela 1, nas quais observamos uma prevalência de 30,0% na primeira coleta, o grupo das matrizes com distúrbios reprodutivos. Na segunda coleta das matrizes e reprodutores, uma prevalência de 12,8%, e na terceira coleta composta de todo o plantel de 8,86%.

Nas demais coletas (quinta e sexta) efetuadas após o abate sanitário dos animais reagentes, que ocorreu no mês de dezembro de 2008, sugerida pela equipe de coleta

Tabela 1. Diagnóstico da Brucelose para *Brucella abortus* em suínos.

Data da coleta	Teste AAT para Brucelose		
	Positivo	Negativo	Total (%)
1ª. (15/07/2008)	03	07	10 (30,00)
2ª. (31/07/2008)	05	34	39 (12,80)
3ª. (25/08/2008)	25	257	282 (8,86)
4ª. (06/11/2008)	00	183	183 (0,00)
5ª. (16/03/2009)	00	06	06 (0,00)
6ª. (25/06/2009)	00	07	07 (0,00)

e exame e realizada pelos técnicos responsáveis pelo rebanho, observa-se que em 2009, não houve ocorrência de nenhum animal reagente, visto que, adotaram como medida de controle e profilaxia, a quarentena dos animais comprados e comercializados na propriedade.

Agora uma análise detalhada sobre a terceira coleta, que foi decisiva para iniciar as medidas descritas anteriormente, observa-se que dos 282 animais, foi encontrada uma prevalência de 8,9%, ao qual discriminada por sexo, demonstra que 19/137 (12,2%) fêmeas e 06/

Tabela 2. Diagnóstico da Brucelose em suínos.

Sexo	Teste AAT para Brucelose <sup>a</sup>		
	Reagente	Não Reagente	Total
Macho	6 (2) <sup>b</sup>	120 (43)	126
Fêmea	19 (7)	137 (49)	156
Total	25 (9)	257 (91)	282

<sup>a</sup> p= 0,0349; OR = 0,3605 (0,1394 < 95% < 0,9324).

<sup>b</sup> Em percentagem.

120 (4,8%) machos reagentes ao teste de AAT, cujos resultados estão na Tabela 2.

Pelo Qui-quadrado demonstrou que houve diferença (p=0,0349) para sexo, que representa a forma de transmissão da brucelose, estavam restritas as fêmeas, devido aos distúrbios registrados, como abortamentos, fetos mumificados e repetição de cios, mas pode ser descartada a transmissão pela cópula, visto que os machos que reagiram ao teste de AAT eram lactentes, e não apresentavam o quadro de orquite e nem de infertilidade, e assim não eram os reprodutores da granja.

Quanto ao fator idade, os animais foram agrupados por categorias de produção, com intuito de verificar qual o grupo mais susceptível à infecção, assim discriminado: animais em lactação (≥38 dias); creche (39≥90 dias), recria (91≥141 dias), terminação (96≥141 dias), matrizes e reprodutores, os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3. Resultado do diagnóstico para Brucelose em suínos.

Categoria de produção	Teste AAT para diagnóstico da Brucelose		
	Positivo	Negativo	Total
Lactação	04	49	53
Creche	15	117	132
Recria	00	47	47
Terminação	00	15	15
Matrizes	06	26	32
Reprodutores	00	03	03
Total	25	257	282

Os resultados não demonstraram diferença, mas houve uma concentração de reagentes à brucelose, na categoria creche, levantando a possibilidade da transmissão por resíduo de alimento, o que foi descartado pelos técnicos da granja. Quanto aos lactentes, correspondem aos filhotes das matrizes reagentes que pariram no período das coletas de sangue.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Após análise criteriosa da prevalência encontrada, a mesma não difere dos resultados do estado de Pernambuco, apresentou prevalência de 31,8% em granjas comerciais (Ribeiro, 2005), onde houve uma concentração de reagentes ao teste de Soroaglutinação Lenta, em propriedades com histórico de abortamentos, mas



difere do inquérito realizado no estado de Goiás, com índice de prevalência de 2,5%, de 4279 suínos examinados em granjas comerciais (Matos et al. 2004).

Visando a certificação da granja para venda de reprodutores, o restante do rebanho foi descartado, e iniciado um novo plantel com rígidas medidas sanitárias para compra e venda de matrizes, servindo de alerta o exame de brucelose na rotina das granjas de suínos no Estado do Rio de Janeiro.

Todos os animais de reposição para reprodução devem ser comprados de suinoculturas certificadas, oficialmente livre dessa doença.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CDC. Disponível em: <<http://www.cdc.gov>>. Acesso em: 12 mar. 2009.
- EFSA. Porcine brucellosis (*Brucella suis*). *EFSA J.*, 1144: 1-111, 2009.
- FAO. Infertility in cows. Disponível em: <<http://www.fao.org/wairdocs>>. Acesso em: 3 ago. 2009.
- Lord V., Cherwonogrodzky J.W., Marcano M.J & Melendez G. Serological and Bacteriological Study of Swine Brucellosis. *J. Clin. Microbiol.*, 1:295-297, 1997.
- MAPA. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose, Manual Técnico. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br> Acesso em: 2 ago. 2003.
- Matos M.P.C., Sobestiansky J., Porto R.N.G. & Meirinhos M.L.G. Ocorrência de anticorpos para *Brucella* sp. em soros de matrizes suínas de granjas que abastecem o mercado consumidor de Goiânia, Estado de Goiás, Brasil. *Ci. An. Bras.*, 5:105-108, 2004.
- OIE. Swine Brucellosis. Disponível em: <[http://www.oie.int/eng/nommes/mmanual/A\\_00053.htm](http://www.oie.int/eng/nommes/mmanual/A_00053.htm)>. Acesso em: 01 ago. 2009.
- PNSS. Controle da Brucelose Suína. Disponível em: <<http://www.defesaagropecuaria.al.gov.br/programas/.../programa-nacional-de-sanidade-suidea-pnss>>. Acesso em: 1 ago. 2009.
- Ribeiro T.C.F.S. *Aspectos Produtivos da Suinocultura e Estudo Epidemiológico da Brucelose Suína na Região Metropolitana de Natal, RN*. Tese de Doutorado em Ciência Veterinária. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2005. 64p.
- Sampaio I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, 2000. 221p.
- Silva P.P., Vigliocco A.M., Ramondino R.F., Marticorena D., Bissi E., Briones G., Gorchs C., Gall D. & Nielsen K. Evaluation of primary binding assays for presumptive serodiagnosis of swine brucellosis in Argentina. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, 9:828-831, 2000.

## **ANEXO – 6**

FLAUSINO, W., DE JESUS, V.L.T., BEZERRA, R. A., ALBUQUERQUE, G.R., JORGE, J.L.B.P., RODRIGUES, J da S., **DE MEIRELES, G.S.**, PEREIRA, R. de C. G. Ocorrência de Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos de uma criação comercial no estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 32, n. 4, p. 198-200, 2010.

## OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Toxoplasma gondii* EM SUÍNOS DE UM SISTEMA DE CRIAÇÃO COMERCIAL NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO\*

### OCURRENCE OF ANTIBODIES ANTI-*Toxoplasma gondii* IN PIGS IN A SYSTEM OF COMMERCIAL BREEDING IN THE STATE OF RIO DE JANEIRO

Walter Flausino<sup>1</sup>, Vera Lúcia Teixeira de Jesus<sup>2</sup>, Rodrigo Alves Bezerra<sup>3</sup>, George Rêgo Albuquerque<sup>4</sup>, Jorge Luiz Baronto Pereira Jorge<sup>5</sup>, Janaina da Soledad Rodrigues<sup>6</sup>, Gisele Santos de Meireles<sup>7</sup> e Rita de Cássia Gomes Pereira<sup>8</sup>

**ABSTRACT.** Flausino W., De Jesus V.L.T., Bezerra R.A., Albuquerque G.R., Jorge J.L.B.P., Rodrigues J. da S., Meireles G.S. de & Pereira R. de C.G. [Occurrence of antibodies Anti-*Toxoplasma gondii* in pigs in a commercial breeding in the State of Rio de Janeiro]. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos de um sistema de criação comercial no estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 32(4):198-200, 2010. Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. BR- 465 km 7. Seropédica, 23.890-000, RJ, Brasil. E-mail: flausino@ufrj.br

In order to evaluate the occurrence of anti-*T. gondii* in pigs from Pinheiral municipality, state of Rio de Janeiro, were collected and examined blood samples from 282 animals from a commercial farm. The serum samples were tested at enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting antibodies to *Toxoplasma gondii* and considered as positive those with reaction at dilution  $\geq 1:16$ . Of the 282 swine serum samples, 35 (12.41%) were positive for anti-*T. gondii*. Significant differences were observed regarding age ( $p = 0.0000004$ ). Thus, anti-*T. gondii* were found in the animals studied, and it may be a source of infection for the human population.

**KEY WORDS.** ELISA, pigs, zoonosis, *Toxoplasma gondii*, commercial breeding.

**RESUMO.** Com o objetivo de avaliar a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em suínos no município de Pinheiral, Estado do Rio de Janeiro, foram coletadas e examinadas amostras de sangue de 282 animais provenientes

de uma granja comercial. Os soros foram submetidos a técnica de Imunoabsorção enzimática (ELISA) para a pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e considerados positivos aqueles com reação na diluição  $\geq 1:16$ . Dos

\*Recebido em 4 de abril de 2010

Aceito em 21 de setembro de 2010.

<sup>1</sup> Biólogo. *PhD*. Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: flausino@ufrj.br – bolsista CNPq.

<sup>2</sup> Médica-veterinária, *Dr. CsVs*. Departamento de Avaliação e Reprodução Animal, Instituto de Zootecnia, UFRRJ, BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23.890-000. E-mail: jesu@ufrj.br

<sup>3</sup> Médico-veterinário. Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, Salobrinho, Ilhéus, BA 45662-000, Brasil. – bolsista CAPES.

<sup>4</sup> Médico-veterinário, *Dr. CsVs*. Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, UESC, Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, Salobrinho, Ilhéus, BA 45662-000, Brasil. E-mail: gralbu@uesc.br

<sup>5</sup> Médico-veterinário, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, Pinheiral, RJ.

<sup>6</sup> Médica-veterinária, *M. CsVs*. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRRJ, BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: jajasoledad@gmail.com – bolsista CNPq.

<sup>7</sup> Médica-veterinária, *M. CsVs*. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRRJ, BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: gisele.meireles@gmail.com – bolsista CAPES.

<sup>8</sup> Médica-veterinária, Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, UFRRJ, BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: rcgp@ufrj.br – bolsista REUNI.

282 soros suínos, 35 (12,41%) foram positivos. Foram observadas diferenças significativas quanto a idade ( $p=0,0000004$ ). Desta forma, anticorpos anti-*T. gondii* foram encontrados nos animais estudados, podendo estes ser fonte de infecção para a população humana.

PALAVRAS-CHAVE. ELISA. suínos, zoonose, criação comercial, *Toxoplasma gondii*.

### INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma enfermidade causada pelo coccídio *Toxoplasma gondii*, caracterizada como zoonose e tem os felídeos como hospedeiros definitivos e os animais homeotérmicos como hospedeiros intermediários (Dubey 2004). Os animais podem se infectar pela ingestão oral de oocistos presentes no ambiente, ou de cistos teciduais na carne de animais infectados (Kijlstra & Jongert 2008).

Em animais de produção, cistos teciduais de *T. gondii* são frequentemente observados em tecidos de suínos, ovinos e caprinos infectados (Tenter et al. 2000). A infecção pelo *T. gondii* em suínos normalmente é assintomática, porém pode provocar alterações reprodutivas, como aborto, natimortalidade e mumificação fetal em fêmeas que se infectam pela primeira vez durante a gestação (Vidotto et al. 1987; Kim et al. 2009). A maioria dos suínos adquire a infecção por *T. gondii* após o nascimento pela ingestão de oocistos no ambiente contaminado, poucos sendo infectados por transmissão transplacentária (Dubey 2009).

Os suínos são considerados a principal fonte de infecção para humanos (Velmurugan et al. 2009). A toxoplasmose humana é considerada a principal causa de infecção de retina no mundo (Holland 2003). Doença severa, desenvolve-se em pacientes com SIDA ou que recebem terapia imunossupressora. A infecção durante a gestação pode causar aborto ou resultar em sérias doenças fetais e malformações, com retardamento mental e perda de visão (Sycocot 2007, Wallon et al. 2004).

Vista sua importância para a saúde pública e os prejuízos causados para os animais de produção, o objetivo do presente trabalho foi determinar a ocorrência de anticorpos contra *T. gondii* em suínos, abatidos no município de Pinheiral, Estado do Rio de Janeiro.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados sangue de 282 suínos, em uma granja no município de Pinheiral, Estado do Rio de Janeiro, no período de julho a setembro de 2008.

O sangue foi coletado por punção da veia cava e transportado ao Laboratório de Coccídios e Coccidioses, Departamento de Parasitologia Animal, Projeto

Sanidade Animal Embrapa/UFRRJ, do Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde os soros foram separados, identificados, armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  e encaminhados para o Laboratório de Parasitologia Veterinária da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) onde as análises sorológicas foram realizadas.

Para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, foi utilizado o teste de Imunoabsorção enzimática (ELISA) conforme Suárez-Aranda et al. (2000) com algumas modificações. Utilizou-se a antígeno na diluição de 50  $\mu\text{g/ml}$ , todas as lavagens foram feitas com PBS contendo 0,1% de Tween 20 (PBS-T), o bloqueio foi feito com PBS-T contendo 5% de leite desnatado e a reação foi interrompida com 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N. O antígeno solúvel foi obtido do exsudato peritoneal de camundongos infectados com a cepa RH de *T. gondii*, conforme Silva et al. (2005).

Para análise das variáveis sexo e idade dos animais, foi usado o teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), com nível de significância de 5%, utilizando o programa EPI INFO versão 3.5.1.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, dos 282 soros testados, 12,41% (35/282) (IC 95% = 8,8 % – 16,8 %) foram positivos para anticorpos anti-*T. gondii*.

Valores de prevalência mais expressivos que estes, do presente trabalho, foram observados por Azevedo et al. (2010) na Paraíba (36,2%) e Cavalcante et al. (2006) na Amazônia (37,5%). Resultados semelhantes ao presente estudo foram encontrados por Moura et al. (2007) no Paraná (8,5%) e Suárez-Aranda et al. (2000) em São Paulo (9,6%).

A baixa positividade obtida neste estudo pode ser explicada pela pouca idade dos animais avaliados, uma vez que um número maior de sororreagentes geralmente é verificado entre animais mais velhos, como também, em função da alta tecnificação da suinocultura (Vidotto et al. 1990). A criação de suínos confinados em granjas tecnificadas é responsável pela diminuição da soroprevalência nesses animais, diminuindo a chance de infecção humana por esta espécie animal (Kijlstra & Jongert 2008).

Quando se analisa a faixa etária (Figura 1) verifica-se que a soropositividade aumentou com a idade, ( $p>0,000$ ) (Tabela 1) corroborando aos resultados de Tsutsui et al. (2003), no norte do Paraná e Garcia et al. (1999) no Paraná, evidenciando que animais mais velhos têm maior soropositividade, pois estão mais susceptíveis a entrar em contato com oocistos.

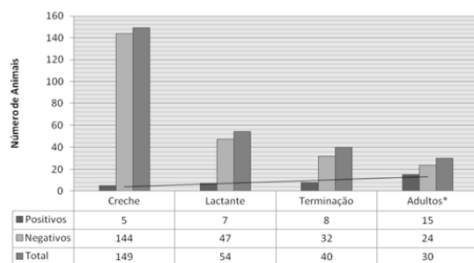


Figura 1. Positividade dos 282 amostras de soros de suínos analisados para a presença de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suas faixas etárias, no município de Pinheiral, RJ, Brasil, 2009.

Tabela 1. Resultado do teste de Qui-quadrado em 282 amostras de soro de suínos avaliados quanto à presença de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e das variáveis sexo, idade e raça, município de Pinheiral, RJ, Brasil, 2009.

Variáveis	Animais		Valor de p
	Positivos	Negativos	
Sexo			
Macho	14	111	0,7123323
Fêmea	21	136	
Idade			
Jovens	20	233	0,0000004
Adultos	15	24	

\*Sem raça definida

Com a análise da variável sexo frente à positividade do total de suínos não se nota diferença ( $p=0,71$ ) (Tabela 1) mesmos resultados foram encontrados por Bezerra et al. (2009) na Bahia e Millar et al. (2008) no Paraná.

Anticorpos anti-*T. gondii* foram encontrados nos animais estudados, sugerindo que estes possam servir de infecção para indivíduos que têm o hábito de consumir carne suína crua ou mal cozida.

**Agradecimentos.** Aos Doutores Itamar Teodorico Navarro, da Universidade Estadual de Londrina e Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira, da Universidade Estadual do Norte Fluminense, pelo fornecimento dos soros controles.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azevedo S.S., Pena H.F.J., Alves C.J., Guimaraes A.A.M., Oliveira R.M., Maksimov P., Schares G. & Gennari S.M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in swine from Northeastern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 19:80-84, 2010.
- Bezerra R.A., Paranhos E.B., Del'arco A.E. & Albuquerque G.R. Detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos criados e abatidos no Estado da Bahia, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 18:78-80, 2009.
- Cavalcante G.T., Aguiar D.M., Chiebao D., Dubey J.P., Ruiz V.L.A., Dias R.A., Camargo L.M.A., Labruna M.B. & Gennari S.M.

Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cats and pigs from rural Western Amazon, Brazil. *J. Parasitol.*, 92:863-864, 2006.

Dubey J.P. Toxoplasmosis in pigs-The last 20 years. *Vet. Parasitol.* 164:89-103, 2009.

Dubey J.P. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. *Vet. Parasitol.*, 126:57-72, 2004.

Garcia J.L., Navarro I.T., Ogawa L. & Oliveira R.C. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii*, em suínos, bovinos, ovinos, e eqüinos, e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná-Brasil. *Cienc. Rural*, 29:91-97, 1999.

Holland G.N. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part I: Epidemiology and course of disease. *Am. J. Ophthalmol.* 136:973-988, 2003.

Kijlstra A. & Jongert E. Toxoplasma-safe meat: close to reality? *Trends Parasitol.*, 25:18-22, 2008.

Kim J.H., Kang K., Kang W.C., Sohn H.J., Jean Y.H., Park B.K., Kim Y. & Kim D.K. Porcine abortion outbreak associated with *Toxoplasma gondii* in Jeju Island, Korea. *J. Vet. Sci.*, 10:147-151, 2009.

Millar P.R., Daquer H., Vicente R.T., Costa T., Sobreiro L.G. & Amendoeira M.R.R. *Toxoplasma gondii*: estudo soroprevalência de suínos da região Sudoeste do Estado do Paraná. *Pesq. Vet. Bras.*, 28:15-18, 2008.

Moura A.B., Osaki S.C., Zulpo D.L. & Marana E.R.M. Ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em suínos e ovinos abatidos no município de Guarapuava, PR, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 16:54-56, 2007.

Silva D.A.O., Vitaliano S.N., Mineo T.W.P., Ferreira R.A., Bevilacqua E. & Mineo J.R. Evaluation of homologous, heterologous, and affinity conjugates for the serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*). *J. Parasitol.*, 91:1212-1216, 2005.

Suarez-Aranda F., Galisteo J.R., Hiramoto R.M., Cardoso R.P.A., Meireles L.R., Miguel O. & Andrade J.R. The prevalence and avidity of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in pigs from Brazil and Peru. *Vet. Parasitol.*, 91:23-32, 2000.

SYROCOT (Systematic Review on Congenital Toxoplasmosis) Study Group. Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a metaanalysis of individual patients data. *Lancet*, 369:115-122, 2007.

Tenter A.M., Heckeroth A.R. & Weiss L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.*, 30:1217-1258, 2000.

Tsutsui V.S., Navarro I.T., Freire R.L., Freitas J.C., Prudencio L.B., Delbem A.C.B. & Marana E.R.M. Soroprevalência e fatores associados à transmissão do *Toxoplasma gondii* em suínos do norte do Paraná. *Arch. Vet. S.*, 8:27-34, 2003.

Velmurugan G.V., Su C. & Dubey J.P. Isolate designation and characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from -pigs in the united states. *J. Parasitol.*, 95:95-99, 2009.

Vidotto O., Navarro I.T., Giraldo N., Mitsuka R. & Freire R.L. Estudos epidemiológicos da toxoplasmose em suínos da região de Londrina, PR. *Semina: Ci. Agr.*, 11:53-59, 1990.

Vidotto O., Reis A.C.F., Costa A.J., Vioti N.M. Toxoplasmose experimental em porcas gestantes. Alterações patológicas e isolamento. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 39:795-814, 1987.

Wallon M., Kodjikian L., Binquet C., Garweg J., Fleury J., Quantin C. & Peyron F. Long term ocular prognosis in 327 children with congenital toxoplasmosis. *Pediatrics*, 113:1567-1572, 2004.

ANEXO -7

RAMIREZ, L., BERTO, B.P., TEIXEIRA FILHO, W. L., FLAUSINO, W., **DE MEIRELES, G.S.**, RODRIGUES, J. da S., ALMEIDA, C.R.R., LOPES, C.W.G. *Eimeria bareillyi* from the domestic water Buffalo, *Bubalus bubalis*, in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.31, n.4, p.261-264, 2009.

***Eimeria bareillyi* FROM THE DOMESTIC WATER BUFFALO, *Bubalus bubalis*, IN THE STATE OF RIO DE JANEIRO, BRAZIL\***

*Eimeria bareillyi* DO BÚFALO DOMÉSTICO, *Bubalus bubalis*, NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL

Landreani Ramirez<sup>1</sup>; Bruno Pereira Berto<sup>1</sup>; Walter Leira Teixeira Filho<sup>2</sup>; Walter Flausino<sup>2</sup>; Gisele Santos de Meireles<sup>3</sup>; Janaina da Soledad Rodrigues<sup>4</sup>; Cláudio Rogério Rocha Almeida<sup>5</sup> and Carlos Wilson Gomes Lopes<sup>6</sup>

**ABSTRACT.** Ramirez, L.; Berto, B.P.; Teixeira Filho, W.L.; Flausino, W.; Meireles, G. S. de; Rodrigues, J. da S.; Almeida, C.R.R. & Lopes, C.W.G. *Eimeria bareillyi* from the domestic water buffalo, *Bubalus bubalis*, in the State of Rio de Janeiro, Brazil. [*Eimeria bareillyi* do búfalo doméstico, *Bubalus bubalis*, no estado do Rio de Janeiro, Brasil.] *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 31(4):261-264, 2009. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, Km 07, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: landrynana@hotmail.com

This study reports domestic water buffalos, *Bubalus bubalis*, parasitized by *Eimeria bareillyi*. Its oocysts were pyriform, with smooth, bilayered wall, 29.5 (27-33) x 21.3 (20-24) µm length and width respectively. Micropyle was present, without a micropyle cap. Polar granule and oocyst residuum were absent. Sporocysts were elongating ellipsoidal. Stieda body was present; however, substieda and parastieda bodies were absent. Sporocyst residuum was present and sporozoites presented a refractile body and a nucleus. Sporulated oocysts of *E. bareillyi* were uniform in their distribution, evidencing the presence of a single species in spite of polymorphic in its shape.

**KEY WORDS.** Morphology, sporulated oocysts, coccidia, *Bubalus arnee*, Bovidae, Rio Claro.

**RESUMO.** Este estudo relata búfalos domésticos, *Bubalus bubalis*, parasitados por *Eimeria bareillyi*. Seus oocistos foram piriformes, com parede lisa e dupla, 29,5 (27-33) x 21,3 (20-24) µm de diâmetros, maior e menor respectivamente. Micrúpila estava presente sem capuz polar. Grânulo polar e residuo, estavam ausentes. Os esporocistos foram elipsóides alongados. Corpo de Stieda presente, porém, corpos de substieda e parastieda ausentes. O residuo do esporocisto estava presente e os esporozoítas possuíam um corpo refrátil e um núcleo. Oocistos desta espécie de coccídia são uniformes em sua distribuição, evidenci-

ando a presença de uma só espécie, apesar de serem polimórficos quanto a sua forma.

**PALAVRAS-CHAVE.** Morfologia, oocistos esporulados, coccídios, *Bubalus arnee*, Bovidae, Rio Claro.

#### INTRODUCTION

The buffalo is a large bovine animal, frequently used as livestock in Asia, South America, Europe and Africa. In 2000, the United Nations Food and Agriculture Organization estimated that there were approximately 158 million buffalo in the world (Nowak & Paradiso, 1983; Clutton-Brock, 1999; Wilson & Reeder, 2005).

\* Accepted for publication on June 26, 2009.

<sup>1</sup> Bióloga, MSc, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (CPGCV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465, Km 07, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: landrynana@hotmail.com and bertobp@ufrj.br

<sup>2</sup> Biólogo, PhD, Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Instituto de Veterinária (IV), UFRRJ, Seropédica, RJ. E-mail: leira@ufrj.br and flausino@ufrj.br

<sup>3</sup> Médica-veterinária, M.Sc, CPGCV, UFRRJ, BR 465, Km 07, Seropédica, RJ. E-mail: gisele.meireles@gmail.com - CNPq scholarship.

<sup>4</sup> Médico-veterinária, CPGCV, UFRRJ, BR 465, Km 07, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: jajasoledad@gmail.com - CAPES scholarship.

<sup>5</sup> Médico-veterinário, EMATER-Rio Claro, Avenida Independência, 279, Rio Claro, RJ 27460-000, Brasil.

<sup>6</sup> Médico-veterinário, PhD, LD, DPA, IV, UFRRJ, BR 465, Km 07, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: lopeswg@ufrj.br - CNPq fellowship.

There are established feral populations in Australia but the dwindling true wild populations are thought to survive in India, Nepal, Bhutan and Thailand. All the domestic varieties and breeds descend from one common ancestor, the wild Asian water buffalo, which is now an endangered species (Nowak & Paradiso, 1983; Clutton-Brock, 1999; Wilson & Reeder, 2005).

There are some scientific names for these animals; however, the International Commission on Zoological Nomenclature ruled that the name for wild species is not invalid by virtue of its being antedated by a name based on a domestic form. Therefore, the International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN) considers the wild forms of water buffalo under *Bubalus arnee* Kerr, 1792, while the domestic forms are considered under *B. bubalis* Linnaeus, 1758 (Gentry et al., 2004; Wilson & Reeder, 2005).

Coccidiosis associated with the genus *Eimeria* Schneider, 1881 are frequently reported from buffalos (Barbosa, 1992; Noronha et al., 2009). Duszynski et al. (2001) recognize 13 eimerid coccidian parasites of water buffalos: *Eimeria zuernii* (Rivolta, 1878) Martin, 1909; *E. bovis* (Züblin, 1908) Fiebiger, 1912;

*E. canadensis* Bruce, 1921; *E. bukidnonensis* Tubangui, 1931; *E. cylindrica* Wilson, 1931; *E. thianethi* Gwéléssiany, 1935; *E. auburnensis* Christensen, Porter, 1939; *E. brasiliensis* Torres, Ramos, 1939; *E. alabamensis* Christensen, 1941; *E. gokaki* Rao, Bhatavdekar, 1959; *E. ovoidalis* Ray, Mandal, 1961; *E. bareillyi* Gill, Chhabra, Lala 1963; and *E. ankarensis* Sayin, 1969.

Experimentally, *E. bareillyi* was found to be pathogenic and, recently, it was associated to death of a three-week-old buffalo calf (Dubey et al., 2008)

The aim of this study was report *E. bareillyi* parasitizing domestic water buffalos, *B. bubalis*, in the Municipality of Rio Claro, Rio de Janeiro State, Brazil.

#### MATERIALS AND METHODS

Samples were collected from 33 domestic water buffalos of farms located in Rio Claro City (22° 43' S and 44° 08' W), Rio de Janeiro State, Brazil. Fecal samples were collected manually from the rectum of adults and calves, placed into plastic vials containing potassium dichromate solution 2.5% ( $K_2Cr_2O_7$ ) (1:6 w/v), and they were carried to Laboratório de Coccidios e Coccidioses located at Universidade Federal

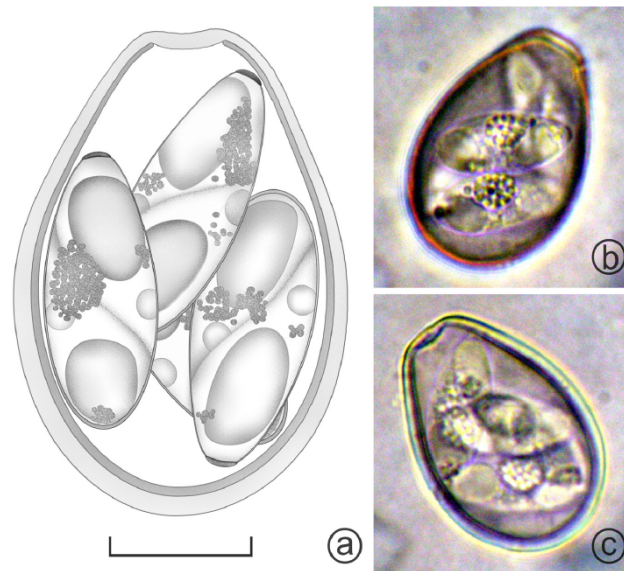


Figure 1. Line drawing (a) and photographs (b, c) of *Eimeria bareillyi*, a coccidium species recovered of buffalos, *Bubalus bubalis*, from Rio Claro City, Rio de Janeiro State, Brazil. Scale-bar: 10µm for line drawing; and 20µm for photographs.



Rural do Rio de Janeiro. Samples were placed in a thin layer (~ 5 mm) of K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 2.5% solution in Petri plates, and incubated at 23-28°C for 10 days or until 70% of oocysts were sporulated. Oocysts were recovered by flotation in Sheather's sugar solution (sp.g. 1.20) and examined microscopically using a technique described by Duszynski & Wilber (1997). Morphological observations and measurements, in µm, were performed using a binocular microscope Carl Zeiss with apochromatic oil immersion objective lens and ocular micrometer K-15X PZO (Poland). Line drawing was prepared using a binocular microscope Wild M-20 with drawing tube. Pictures were taken using a digital camera model CD Mavica MVC-CD250 Sony®. Size ranges are in parenthesis followed by average and shape index (length/width). Linear regression and histograms were performed using the software Excel XP (Microsoft Co., Redmond, WA, USA), based on Sampaio (2002).

**RESULTS AND DISCUSSION**

Thirty three domestic water buffalos were examined; three of them shed oocysts in the feces. These positive animals were healthily calves. Initially, the oocysts were non-sporulated, while 70% sporulated by day still sporulated at 25 days.

Sixty five sporulated oocysts (Figure 1) were observed and measured. They were pyriform, with smooth, bilayered wall, ~1.3 µm. Micropyle was present, ~1.8 high × 4.9 wide, without a micropyle cap. Polar granule and oocyst residuum were absent. Sporocysts were elongate ellipsoidal, with a smooth, thin, single-layered wall. Stieda body was flattened and delicate, ~0.4 high × 2.1 wide. Substieda and parastieda bodies were absent. Sporocyst residuum usually formed a mass of granules; however, sometimes some scattered granules were present. Sporozoites with one posterior refractile body and a nucleus.

Table 1. Measurements of sporulated oocysts of *Eimeria bareillyi*, a coccidium species recovered of buffalos, *Bubalus bubalis*.

Oocyst descriptions	Values					
	Oocysts <sup>d</sup>			Sporocysts <sup>d</sup>		
	Length	Width	Shape index	Length	Width	Shape index
Gill et al. (1963) <sup>a</sup>	30.8 (26-35)	21.6 (19-25)	-	18	8	-
Dubey et al. (2008) <sup>b</sup>	27.2 (23.2-9.5)	19.3 (16.5-22)	1.38 (1.26-1.57)	-	-	-
Current study <sup>c</sup>	29.5 (27-33)	21.3 (20-24)	1.4 (1.2-1.6)	16.4 (13-19)	7.2 (6-8)	2.3 (1.7-3.0)

<sup>a</sup>Samples from India, original description; <sup>b</sup>from Netherlands; <sup>c</sup>from Brazil and <sup>d</sup>Length and width in µm.

These oocysts were closely resembled with *E. bareillyi*, originally described from buffalos in India by Gill et al. (1963). Table 1 shows the measurements of the oocysts recovered in the current study; in the original description of Gill et al. (1963); and in the recent report of fatal coccidiosis of a three-week-old buffalo calf by Dubey et al. (2008).

Analyzing Figure 2, frequencies in the classes increase and diminish gradually, or either, the oocysts measurements are grouped in lesser amount in the limits of the values and larger amount in the medium values. Thus, these measurements showed uniform in their distribution, evidencing the presence of a single species.

Oppositely, the linear regression (Figure 3) showed a non-uniform distribution, with R<sup>2</sup> value less than 0.5, and so revealed the polymorphism of this species. Similar methodology and results were

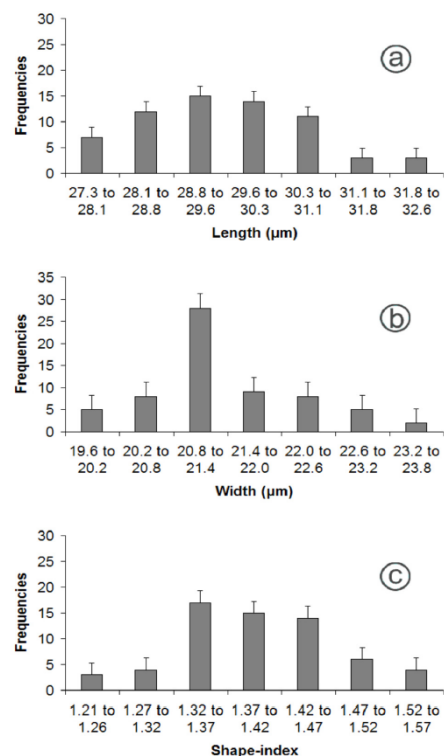


Figure 2. Frequencies in the distribution of the sporulated oocysts of *Eimeria bareillyi* recovered from fecal samples of buffalos, *Bubalus bubalis*, from the Municipality of Rio Claro, Rio de Janeiro State, Brazil. (a) Length, (b) width and (c) shape-index.

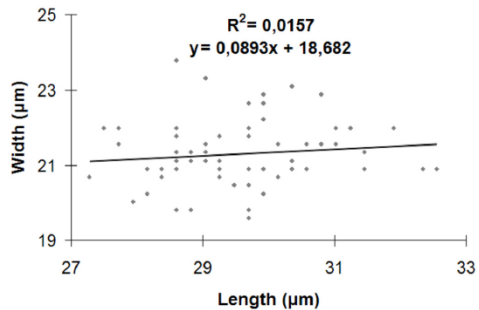


Figure 3. Distribution of the sporulated oocysts of *Eimeria bareillyi* recovered from fecal samples of buffalos, *Bubalus bubalis*, from the Municipality of Rio Claro, Rio de Janeiro State, Brazil.

obtained from studies of eimerid coccidian parasites of fowls by Norton & Joyner (1981) and Joyner (1982); *Hammondia heydorni* (Tadros, Laarman, 1976) Dubey, 1977 oocysts by Pereira et al. (2001); *Tyzzeria parvula* (Kotlán, 1933) Klimes, 1963 oocysts by Berto et al. (2008a); and *Isospora hemidactyli* Carini, 1936 oocysts by Berto et al. (2008b).

#### REFERENCES

- Barbosa, M.A.; Blasi, A.C.; Oliveira, M.R. & Correa, F.M.A. Natural parasitism of buffaloes in Botucatu, SP, Brazil. III. Dynamics of gastrointestinal parasitism in cows and their calves. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 87: 37-41, 1992.
- Berto, B.P.; Flausino, W.; Almeida, C.R.R. & Lopes, C.W.G. Polymorphism of *Tyzzeria parvula* (Kotlán, 1933) Klimes, 1963 (Apicomplexa: Eimeriidae) oocysts from the greylag geese *Anser anser* L., 1758 conditioned in two distinct sites. *Rev. Bras. Med. Vet.*, 30: 215-219, 2008.
- Berto, B.P.; Lopes, B. do B.; Flausino, W.; Teixeira-Filho, W.L. & Lopes, C.W.G. Contribution on the study of *Isospora hemidactyli* Carini, 1936 and a report of an adeleid pseudoparasite of the house gecko *Hemidactylus mabouia*, from the Rio de Janeiro Metropolitan Region, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 17: 150-154, 2008.
- Clutton-Brock, J. *A Natural History of Domesticated Mammals*. Cambridge University Press, Cambridge, 1999, 238p.
- Dubey, J.P.; Wouda, W. & Muskens, J. Fatal intestinal coccidiosis in a three-week-old buffalo calf (*Bubalus bubalis*). *J. Parasitol.*, 94: 1289-1294, 2008.
- Duszynski, D.W. & Wilber, P.G. A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. *J. Parasitol.*, 83: 333-336, 1997.
- Duszynski, D.W.; Upton, S.J. & Couch, L. The Coccidia of Bovidae, 2001. Disponible on: <<http://biology.unm.edu/biology/coccidia/artiodact1.html>>. Accessed on: Jun. 24, 2009.
- Gentry, A.; Clutton-Brock, J. & Groves, C.P. The naming of wild animal species and their domestic derivatives. *J. Archaeol. Sci.*, 31: 645-651, 2004.
- Gill, B.S.; Chhabra, M.B. & Lall, N.B. A new species of coccidium, *Eimeria bareillyi* n. sp. from buffaloes. *Arch. Protistenkunde*, 106: 571-574, 1963.
- Joyner, L.O. Host and Site specificity. In: Long P.L. (Ed.), *The biology of the Coccidia*. University Park Press, Baltimore, 1982. p. 35-62.
- Noronha, A.C.F.; Starke-Buzetti, W.A. & Duszynski, D.W. *Eimeria* spp. in Brazilian Water Buffalo. *J. Parasitol.*, 95: 231-234, 2009.
- Norton, C.C. & Joyner, L.P. *Eimeria acervulina* and *E. mivati*: oocysts, life-cycle and ability to develop in the chicken embryo. *Parasitology*, 83: 269-279, 1981.
- Nowak, R.M. & Paradiso, J.L. *Walker's Mammals of the World*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1983, 1629 p.
- Pereira, M.J.S.; Fonseca, A.H. & Lopes, C.W.G. Regressão linear na caracterização de variações morfométricas em Coccidia. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 10: 75-78, 2001.
- Sampaio, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. FEP MVZ, Belo Horizonte, 2002, 265p.
- Wilson, D.E. & Reeder, D.M. *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 2005, 2000 p.