



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

LUCIANA VIEIRA PINTO RIBEIRO

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE
CRYPTOSPORIDIUM SPP. EM EQUINOS DE HARAS DO
NOROESTE DO PARANÁ, BRASIL**

LUCIANA VIEIRA PINTO RIBEIRO

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE
CRYPTOSPORIDIUM SPP. EM EQUINOS DE HARAS DO
NOROESTE DO PARANÁ, BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal da Universidade Estadual de
Londrina como requisito parcial para a obtenção do
título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. João Luis Garcia

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Ribeiro, Luciana Vieira Pinto .
OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *Cryptosporidium* spp. EM EQUINOS DE HARAS DO NOROESTE DO PARANÁ, BRASIL : / Luciana Vieira Pinto Ribeiro. - Londrina, 2016.
57 f.

Orientador: João Luis Garcia.
Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Potro - Teses. 2. Égua - Teses. 3. Diagnóstico molecular - Teses. 4. *Cryptosporidium* - Teses. I. Garcia, João Luis . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

LUCIANA VIEIRA PINTO RIBEIRO

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE
CRYPTOSPORIDIUM SPP. EM EQUINOS DE HARAS DO NOROESTE
DO PARANÁ, BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina
como requisito parcial para a obtenção do título de
Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. João Luis Garcia
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Selwyn Arlington Headley
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^ª. Dr^ª. Regina Mitsuka Bregano
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Alexey Leon Gomel Bogado
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Prof^ª. Dr^ª. Liza Ogawa
Universidade Estadual do Norte do Paraná -
UENP

Londrina, 01 de abril de 2016.

DEDICO

Ao meu marido Max Gimenez Ribeiro, pelo incentivo, apoio, paciência e amor. Ao meu filho Matheus que tão pequeno superou os momentos de distância para que eu pudesse concluir esta etapa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela proteção nas estradas ao longo dessa jornada e por me dar forças para concluir esse projeto.

Aos meus pais que me apoiaram em tempo integral e cuidaram do meu bem mais precisos, meu filho, durante as minhas idas e vindas.

Ao meu orientador professor João Luis Garcia que mal tenho palavras para realmente mostrar o tamanho da minha gratidão, pois foi sempre muito atencioso, muito compreensivo em minhas dificuldades, enfim um verdadeiro mestre.

Aos professores Selwyn Arlington Headley, Regina Mitsuka Bregano e Odilon Vidotto por suas contribuições na banca de qualificação.

Aos professores pelo aceite e participação na banca de defesa Selwyn Arlington Headley, Regina Mitsuka Bregano, Alexey Leon Gomel Bogado e Liza Ogawa.

Aos colegas Sérgio, Mércia e Thaís, minha eterna gratidão por toda ajuda de vocês conferida a mim durante toda a execução desse projeto, sem a ajuda de vocês não teria sido possível alcançar esses resultados.

À secretária Helenice Kieski por sua dedicação e atenção para com todos os alunos do programa de pós-graduação.

Aos meus queridos estagiários, que foram muitos ao longo desses anos que me auxiliaram na coleta das amostras, sempre com muita alegria e disponibilidade em qualquer momento que foram solicitados (Guilherme Koury, Laís, Rafael Pelarigo, Leonardo, Patrícia, Filipe, Karolaine, Bruna, Matheus, Wesley e Guta) e perdão caso tenha esquecido de alguém.

A minha amiga irmã Giovana, que além de aguentar meu estresse, ouvir meus desabafos durante este período de conciliar trabalho, maternidade e doutorado também me auxiliou muito nas traduções para elaboração dessa tese.

Aos proprietários dos haras que permitiram a nossa entrada nas propriedades e dispuseram de sua equipe de trabalho para nos auxiliar na contenção dos animais para garantir a nossa segurança.

A UNIPAR que concedeu os meus afastamentos durante os meus períodos de aula e também ao apoio financeiro em minhas despesas durante o doutorado.

"Todas as vitórias ocultam uma abdicação".
Simone de Beauvoir

RIBEIRO, Luciana Vieira Pinto. **Ocorrência e caracterização genética de *Cryptosporidium* spp. em equinos de haras do noroeste do Paraná, Brasil.** 2016. 57f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

A importância da criptosporidiose em animais de produção é traduzida não só pelo potencial zoonótico de algumas espécies como também pela perda econômica que a infecção promove. *Cryptosporidium* causa inflamação e atrofia das vilosidades intestinais resultando em perda de absorção e desequilíbrio no transporte de nutrientes. *Cryptosporidium* tem um amplo espectro de hospedeiros tais como, aves, anfíbios, répteis, peixes e vários mamíferos, mas pouco se sabe sobre a importância de seu envolvimento na transmissão ou na manutenção de infecção entre rebanhos domésticos. Por combinações de dados morfológicos, biológicos e moleculares, foram identificadas mais de 12 espécies de *Cryptosporidium* em mamíferos, *C. muris*, *C. parvum*, *C. wrairi*, *C. felis*, *C. andersoni*, *C. canis*, *C. hominis*, *C. suis*, *C. bovis*, *C. fayeri*, *C. ryanae*, e *C. macropodum*. *C. parvum* é a espécie mais amplamente estudada com especial importância na saúde humana, e com relatos de ocorrência em equinos, no entanto, poucos estudos sobre esse protozoário foram realizados em equinos no mundo e no Brasil. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência e realizar caracterização genética de *Cryptosporidium* spp. nas fezes de potros e éguas em haras da região Noroeste do Paraná. A pesquisa foi realizada em seis haras, sendo três no município de Umuarama, dois em Douradina e um em Xambrê. Todos os animais eram da raça Quarto de Milha. Um total de 157 amostras fecais foram submetidas a técnica de Ziehl-Neelsen modificado e a Nested - PCR sendo, 71 éguas, 65 potros lactentes e 21 potros desmamados. A ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. observada pela técnica de Ziehl-Neelsen modificado foi de 4,45% (7/157), destes a infecção representou uma taxa de 2,8% para as éguas (2/71) e 7,7% para os potros lactentes (5/65), coincidindo apenas uma égua e seu potro com infecção concomitante e sendo todas as amostras positivas do haras 02 do município de Umuarama. A taxa de detecção global de *Cryptosporidium* spp. observada pela nPCR foi de 9,55% (15/157), sendo 12,6% éguas (9/71) e 9,2% potros lactentes (6/65), coincidindo apenas uma égua e seu potro com infecção concomitante. Das 15 amostras positivas, 14 pertenciam ao haras 02 de Umuarama e apenas uma amostra ao haras 06 do município de Xambrê. A taxa de infecção para o haras 02 foi de 14,2% (7/49) pela técnica de Ziehl-Neelsen, e de 28,5% pela nPCR (14/49). No haras 06 a taxa de infecção foi de 3,4%(1/29) detectado apenas pela técnica da nPCR. Todas as amostras positivas na técnica de Ziehl-Neelsen também foram positivas na nPCR. Observou-se um $k = 0,61$ ($p < 0,001$) quando comparado as duas técnicas de diagnóstico pela concordância kappa (k), considerando a nPCR como "padrão ouro". A sequência obtida apresentou identidade molecular com *Cryptosporidium parvum*. Este foi o primeiro estudo molecular do *Cryptosporidium* em equinos realizado no Brasil, sendo de grande importância pois estes animais podem servir de reservatório deste protozoário podendo ser um risco à saúde pública.

Palavras-chave: Potros. Éguas. Diagnóstico molecular.

RIBEIRO, Luciana Vieira Pinto. **Occurrence and genetics characterization of *Cryptosporidium* spp. in horse farms from the Northwest Paraná, Brazil.** 2016. 57p. Thesis (Doctor's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

The importance of cryptosporidiosis in farm animals is demonstrated not only by the zoonotic potential of some species as well as by the economic loss promoted by the infection. *Cryptosporidium* causes inflammation and villous atrophy resulting in loss absorption and imbalance of nutrients transport. *Cryptosporidium* has a wide range of hosts such as birds, amphibians, reptiles, fish and various mammals, but little is known about the importance of their connection with the transmission and maintenance of the infection among domestic livestock. Using combinations of morphological, biological and molecular data, 12 species of *Cryptosporidium* were identified in mammals: *C. muris*, *C. parvum*, *C. wrairi*, *C. felis*, *C. andersoni*, *C. canis*, *C. hominis*, *C. suis*, *C. bovis*, *C. fayeri*, *C. ryanae*, e *C. macropodum*. *C. parvum* is the most widely studied species with particular importance on human health and reported occurrence in horses. Few studies about this protozoan were accomplished in horses in the world and in Brazil. Thus, this study aimed to estimate the occurrence and perform genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. in the feces of foals and mares on horse farms from the Northwest of Paraná. The research was carried in six horse farms; three in the city of Umuarama, two in Douradina and one in Xambrê. All animals were Quarter Horses. A total of 157 fecal specimens were submitted to Ziehl-Neelsen modified technique and Nested - PCR which of 71 were mares, 65 suckling foals and 21 weaned foals. The observed occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocyst by Ziehl-Neelsen modified technique was 4,45% (7/157) which the infection represented 2,8% rate for mares (2/71) and 7,7% for suckling foals (5/65), coinciding only a mare and its foal with concomitant contamination and being all positive samples of the horse farm 02 from Umuarama. The overall detection rate of *Cryptosporidium* ssp. noticed by nPCR was 9,55% (15/157) being 12,6% mares (9/71) and 9,2% suckling foals (6/65), coinciding only a mare and its foal with concomitant contamination. Of the 15 positive samples, 14 belonged to the horse farm 02 from Umuarama and only one sample belonged to the horse farm 06 from Xambrê. The infection rate for the horse farm 02 was 14,2% (7/49) using the Ziehl-Neelsen technique, and 28,5% by nPCR (14/49). In the horse farm 06 the infection rate was 3,4% (1/29), detected only by nPCR technique. All positive samples in the Ziehl-Neelsen technique were also positive in the nPCR. There was a $k = 0.61$ ($p < 0.001$) when comparing two diagnostic tests' kappa coefficient (k), considering nPCR as "gold standard". The obtained sequence showed the molecular identity with *Cryptosporidium parvum*. This was the first molecular study of *Cryptosporidium* in horses held in Brazil, being of great importance because these animals might serve as vessels for the parasite, what may be a risk to public health.

Keywords: Foals. Mares. Molecular diagnosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Árvore filogenética de sequência do gene 18S rRNA de *Cryptosporidium* deste estudo e de outras espécies de *Cryptosporidium* disponíveis no GenBank. Taxon identificado no presente estudo: EQ240 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> spp. em diferentes populações de equídeos no mundo nos últimos 10 anos	16
Tabela 2 –	Ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> spp. em equinos, por diversos métodos de diagnóstico, provenientes de diferentes estados brasileiros	18
Tabela 3 –	Espécies de <i>Cryptosporidium</i> identificados em cavalos	20
Tabela 4 –	Ocorrência de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. pelas técnicas de Ziehl-Neelsen modificado e PCR e cálculo do coeficiente Kappa (K) em amostras fecais de equinos de haras da região Noroeste do Paraná, no ano de 2012 a 2013..	50
Tabela 5 –	Estimativa das divergências evolucionárias entre as sequências descritas abaixo obtidas no PUBMED (GENBANK). A análise evolucionária foi obtida pelo MEGA6.....	52

SUMÁRIO

1	ARTIGO DE REVISÃO - INFECÇÃO POR <i>Cryptosporidium</i> spp EM EQUINOS	12
1.1	INTRODUÇÃO	12
1.2	HISTÓRICO.....	14
1.3	CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA E MORFOLOGIA	15
1.4	EPIDEMIOLOGIA DO <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> SPP. EM EQUINOS.....	16
1.5	ESPÉCIES DE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> EM EQUINOS	18
1.6	CICLO DE VIDA.....	21
1.7	PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS	22
1.8	DIAGNÓSTICO	23
1.9	TRATAMENTO E CONTROLE.....	25
2.0	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	26
2	REFERÊNCIAS	27
3	OBJETIVOS	34
3.1	OBJETIVO GERAL	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4	ARTIGO A – OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> SPP. EM EQUINOS DE HARAS DO NOROESTE DO PARANÁ, BRASIL	35
	REFERÊNCIAS	45
5	CONCLUSÃO GERAL	53
	ANEXOS	54
	ANEXO A – Questionário Epidemiológico da Propriedade	55
	ANEXO B – Questionário Epidemiológico Individual	57

1 ARTIGO DE REVISÃO - INFECÇÃO POR *Cryptosporidium* spp. EM EQUINOS

1.1 INTRODUÇÃO

A população mundial de equídeos na última década foi estimada em 113.473.522 cabeças, sendo 58.770.171 equinos, 43.496.677 asininos e 11.206.674 muares segundo dado da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) (2008). Em 2006, pesquisadores publicaram um relatório sobre o Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo, mostrando que o cavalo é responsável pela geração de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos (LIMA; SHIROTA; BARROS, 2006). O Brasil está classificado como o quarto maior rebanho do mundo com cerca de 5,8 milhões de cabeças, perdendo apenas para os EUA com 9,5, para a China com 7,9 e México com 6,3 milhões de cabeças (FAO, 2008). No Brasil, o estado de Minas Gerais é o que apresenta o maior número de cabeças com 899 mil cabeças, e o estado do Paraná está em sexto lugar com 462 mil cabeças (IBGE, 2009).

No aspecto econômico o equino, desempenha funções de sela, carga e tração. A partir do século XX destaca-se no aspecto social através de atividades de esporte e lazer, inserido no meio militar (exército e polícia militar) e em terapia (equoterapia) sempre em íntimo contato com o homem (ALMEIDA; SILVA, 2010).

A fauna parasitária em equinos é ampla e de relevante importância para a sanidade animal, os quais podem desencadear alterações sistêmicas graves devido ao parasitismo gastrointestinal (FERREIRA et al., 2014). A importância da criptosporidiose em animais de produção é traduzida não só pelo potencial zoonótico de algumas espécies como também pela perda econômica que a infecção promove (FUJJI et al., 2014). A infecção por *Cryptosporidium* spp. causa inflamação e atrofia das vilosidades intestinais resultando em perda de absorção, desequilíbrio no transporte de nutrientes e consequentemente comprometimento na produtividade animal (INÁCIO et al, 2012).

Protozoários do gênero *Cryptosporidium* são coccídios de 4 a 8 µm de diâmetro (dependendo da espécie e da fase evolutiva), que sofrem esquizogonia, gametogonia e esporogonia nos vacúolos parasitóforos, geralmente no ápice das microvilosidades dos enterócitos (TYZZER, 1912).

A espécie *C. parvum* afeta uma grande variedade de mamíferos, sendo mais comumente encontrada em humanos e ruminantes, recebendo maior atenção quanto a sua

transmissão zoonótica (XIAO et al., 2004). *C. parvum* e *C. hominis* são as espécies mais prevalentes em humanos (SMITH et al., 2006).

O espectro de hospedeiros de *Cryptosporidium* é considerado amplo, sendo a infecção já demonstrada em aves, anfíbios, répteis, peixes e vários mamíferos, mas pouco se sabe sobre a importância de seu envolvimento na transmissão ou na manutenção de infecção entre rebanhos domésticos. No Reino Unido, pesquisas em equinos mostraram a presença de *C. parvum* em 28% de potros puros-sangues, embora não tenha estabelecido associação entre infecção e diarreia (TAYLOR; COOP; WALL, 2010).

Os oocistos de *Cryptosporidium* são difíceis de visualizar em exames fecais, porque são transparentes e pequenos exigindo conhecimento e experiência para sua identificação (*C. parvum* mede 5,0 por 4,5 μm). O diagnóstico pode ser realizado por meio de exames parasitológicos de fezes com o emprego de método de flutuação, em que os oocistos característicos do gênero são visualizados ao microscópio óptico, preferencialmente com contraste de fase (MENEZES, 2010).

A transmissão desse parasito ocorre de forma direta por via fecal-oral ou por meio de ingestão de água e alimentos contaminados, sendo influenciada pelo nível de contaminação ambiental, pela sobrevivência da forma infectante às condições do meio e pela resistência do oocisto aos métodos usados no tratamento da água, como a cloração, a ozonização ou a incompleta remoção dos oocistos pelos métodos de filtração (GOMES et al., 2008). Pode-se considerar que existam dois ciclos de transmissão, um antroponótico envolvendo a espécie *C. hominis* mais frequente em áreas urbanas e outro zoonótico com transmissão de *C. parvum* associado principalmente aos ruminantes, com maior ocorrência em áreas rurais (MORGAN et al., 1999). O contato com animais infectados tem sido relatado como causa de pequenos surtos envolvendo estudantes de medicina veterinária, técnicos de pesquisa e crianças que frequentaram eventos e feiras agropecuárias (XIAO; FENG, 2008).

Ainda que espécies e genótipos de *Cryptosporidium* encontrados em animais possam infectar humanos, a via de transmissão de algumas espécies ainda não foi totalmente elucidada, sendo necessário estudos complementares para avaliar a importância da transmissão zoonótica desses parasitos (RAMIREZ; WARD; SREEVATSAN, 2004). Aliado a isso, poucos estudos sobre *Cryptosporidium* em equinos foram realizados no mundo e no Brasil. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo revisar os aspectos epidemiológicos e moleculares do *Cryptosporidium* spp. em equídeos.

1.2 HISTÓRICO

O pesquisador americano Ernest Edward Tyzzer descreveu a primeira espécie do gênero em 1907, a partir de glândulas gástricas de camundongos, denominando-a *Cryptosporidium muris*, a segunda descrição foi em 1912 com o encontro do *C. parvum* no intestino delgado também de camundongos (TYZZER, 1907; 1912).

Apenas em 1971 que o gênero *Cryptosporidium* foi associado à diarreia em bezerros (PANCIERA; THOMASSEN; GARNER, 1971). O parasito é frequentemente encontrado em bezerros e está entre os três agentes presentes na etiologia das diarreias, causando perdas econômicas por mortes e por comprometimento no desenvolvimento dos animais (EDERLI; CARVALHO; SALES, 2004).

A primeira descrição do *Cryptosporidium* spp. em equinos data de 1978 por Snyder, em potros da raça Árabe com imunossupressão, surgindo vários outros relatos em cavalos imunocompetentes em diferentes lugares do mundo (TOSCAN et al., 2010; WAGNEROVÁ et al., 2015).

1.3 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA E MORFOLOGIA

O *Cryptosporidium* é um protozoário de localização intracelular e extracitoplasmático, pertencente ao Filo Apicomplexa (protozoários que possuem complexo apical); Classe Esporozoasida (que se reproduz por ciclo assexuado e sexuado, com formação de oocistos); Subclasse Coccidia (ciclo de vida envolvendo merogonia, gametogonia e esporogonia); Ordem Eucoccidiida (esquizogonia presente); Sudordem Eimeriina (com desenvolvimento independente de micro e macrogametas); Família Cryptosporidiidae (monoxeno, com quatro esporozoítos dentro do oocisto, mas sem esporocisto); Gênero *Cryptosporidium*, Genótipos e Subtipos (LEVINE, 1984).

Depois da descoberta inicial do *Cryptosporidium*, mais de 50 anos se passaram, sendo neste período comumente confundido com outros gêneros Apicomplexa, especialmente membros do gênero *Sarcocystis*, por possuírem oocistos com parede fina que frequentemente se rompem liberando os esporocistos os quais contém quatro esporozoítos, assim como o oocisto de *Cryptosporidium*. Assim, uma variedade de espécie foi erroneamente atribuída ao gênero (XIAO et al., 2004).

Na última década, as caracterizações moleculares do parasito ajudaram a esclarecer a confusão na taxonomia e validar a existência de muitas espécies em cada classe de vertebrados, como consequência muitas novas espécies de *Cryptosporidium* spp. foram caracterizadas (XIAO et al., 2004). Por combinações de dados morfológicos, biológicos e moleculares, foram identificadas 20 espécies de *Cryptosporidium* em mamíferos, *C. muris*, *C. parvum*, *C. wrairi*, *C. felis*, *C. andersoni*, *C. canis*, *C. hominis*, *C. suis*, *C. bovis*, *C. fayeri*, *C. ryanae*, e *C. macropodum*. Além das espécies nomeadas, alguns oocistos isolados de mamíferos foram identificados somente por sequência de gene e são simplesmente referidos como genótipos de *Cryptosporidium* (FAYER, 2010).

1.4 EPIDEMIOLOGIA DO *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. EM EQUINOS

A infecção natural por *Cryptosporidium* em equinos vem sendo relatada em muitos países, incluindo EUA, Canadá, Nova Zelândia, África e uma série de países europeus conforme Tabela 1 (WAGNEROVÁ et al., 2015).

Tabela 1. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em diferentes populações de equídeos no mundo nos últimos 10 anos.

Localização	Faixa etária	N	(%)	Técnica	Referência
Bélgica, Holanda, Alemanha e Grécia	Potros < 6 meses	398	2,0	IFD/PCR/SEQ	Kostopoulou et al. (2015)
República Checa e Polônia	Potros e Adultos	352	3,4	PCR/SEQ	Wagnerová et al. (2015)
República Checa	Cavalos adultos	219	2,3	PCR/SEQ	Laatamna et al. (2015)
	Muar adultos	124	1,6		
República Checa	Potros	53	1,8	PCR/SEQ	Laatamna et al. (2013)
	Adultos	85	3,5		
Itália	Potros	111	2,7	IFD/PCR/SEQ	Perrucci et al. (2011)
	Éguas	74	1,3		
Nova York, EUA	Potros	175	7,4	IFD	Burton et al. (2010)
			5,1	PCR/SEQ	
	Adultos (éguas)	174	1,7	IFD PCR/SEQ	
Itália, Europa	Potros e Adultos	150	4,6	CF/ZN	Veronesi et al. (2010)
			2,7	IFD	
			0	PCR	
Gales, Reino Unido	Potros e Adultos	52	3,8	IFD/PCR/SEQ	Chalmers et al. (2005)

IFD - Imunofluorescência direta; PCR - Reação em cadeia da polimerase; SEQ - Sequenciamento; CF - Centrifugo flutuação; ZN - Ziehl-Neelsen

Fonte: o autor.

A ocorrência do *Cryptosporidium* spp. em equinos no Brasil foi determinada por Gomes et al. (2008) que estabeleceram a prevalência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. em equinos do Jockey Club de Santa Maria, RS. As amostras foram processadas pelo método de centrifugo-flutuação de Faust modificada, e *Cryptosporidium* spp. foi encontrado em 75% das amostras.

Souza et al. (2009) avaliaram a infecção natural por *Cryptosporidium* spp., *Giardia* sp. e *Eimeria leuckarti* em três grupos de equídeos com diferentes manejos no Rio de

Janeiro. Foram analisadas 396 amostras pela técnica de centrífugo-flutuação e pela técnica de safranina azul de metileno. A prevalência de *Cryptosporidium* spp. foi de 0,7%, de *Giardia* sp. 0,5% e de *Eimeria leuckarti* 0,5%.

Toscan et al. (2010) estudaram 104 animais, com idades variando de 5 meses a 20 anos, na cidade de Santa Maria, RS. Utilizaram a técnica de centrífugo-flutuação de Faust modificada, sendo encontrada uma prevalência de 59,6% de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

Marques (2010) avaliou a presença de *Cryptosporidium* spp. na cidade de Porto Alegre, RS, em cavalos do Exército Brasileiro (71 animais), do Hospital Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (7 animais) e de centro de treinamento (12 animais), totalizando 90 equinos. O autor utilizou a técnica de Ziehl-Neelsen e detectou uma taxa de infecção de 27,87% (25/90), sendo que a infecção só foi encontrada nos animais provenientes do Exército Brasileiro representando uma taxa de 35,21% (25/71).

Sevá et al. (2010) analisaram a ocorrência de *Cryptosporidium* em animais domésticos de propriedades rurais ao redor de fragmentos da mata Atlântica do interior no município de Teodoro Sampaio, SP. Foram analisadas amostras de bovinos (197), equinos (63), suínos (25), ovinos (11) e cães (28), e processadas pela técnica de flutuação em solução de sacarose, seguido de caracterização molecular (PCR). Só foi verificada ocorrência do protozoário em bovinos e em cães.

Inácio et al. (2012) realizaram estudo em 11 fazendas da região Noroeste do Estado de São Paulo, analisaram 98 éguas e 98 potros de diversas raças e sexo e observaram a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em 21,4% dos potros e 18,4% das éguas.

Por fim, no estado do Paraná na cidade de Curitiba, Fujji et al. (2014), detectaram presença do protozoário nas amostras fecais de equinos de dois diferentes centros de treinamento, pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada.

A ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp. em equinos, no Brasil encontra-se exposta na Tabela 2.

Tabela 2. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em equinos, por diversos métodos de diagnóstico, provenientes de diferentes estados brasileiros

Localização	Técnica	Faixa etária	n	Ocorrência (%)	Referência
Santa Maria, RS	Cf	Potros < 2 anos	18	83,3	Gomes et al. (2008)
		Potros 2-5 anos	31	71,0	
		Adultos	15	80,0	
Rio de Janeiro, RJ	Cf/Sam	Adultos	396	0,75	Souza et al. (2009)
Santa Maria, RS	Cf	Potros < 2 anos	26	65,3	Toscan et al. (2010)
		Potros 2-8 anos	39	76,9	
		Adultos	39	38,4	
Porto Alegre, RS	ZN	Adultos 2-16 anos	90	27,9	Marques (2010)
Teodoro Sampaio, SP	F/PCR	Adultos	63	0	Sevá et al. (2010)
Noroeste de SP	K	Potros	98	21,4	Inácio et al. (2012)
		Adultos	98	18,4	
Curitiba, PR	ZN	Adultos	108	18,5	Fujii et al. (2014)

ZN - Ziehl-Neelsen; Cf - Centrífugo-flutuação; Sam - Safranina azul de metileno; K - Kinyoun; F - Flutuação em solução de sacarose.

Fonte: o autor.

1.5 ESPÉCIES DE *CRYPTOSPORIIDUM* EM EQUINOS

C. parvum é a espécie mais amplamente estudada com especial importância na saúde humana, e com inúmeros relatos de ocorrência em equinos (COLE et al., 1999; CHALMERS et al., 2005; PERRUCCI et al., 2011; CAFFARA et al., 2013; WAGNEROVÁ et al., 2015; GALUPPI et al., 2015).

Em pesquisa realizada por Veronesi et al. (2010), foram investigados 120 potros e 30 éguas em cinco fazendas italianas. As amostras foram analisadas por três técnicas, imunofluorescência direta, flutuação fecal, esfregaços fecais corados e PCR. A prevalência de *Cryptosporidium* foi de 8% e a análise do sequenciamento identificou a espécie *C. parvum*.

A infecção concomitante entre éguas e seus potros por *C. parvum* também foi descrita na Itália por Perrucci et al. (2011). Os animais acometidos coincidiu de ser uma mãe e seu potro e este apresentava diarreia durante o período de infecção.

As técnicas de biologia molecular e a análise filogenética do gene codificador do RNA ribossômico 18S (18S rRNA) de *C. parvum* permitiu diferenciar 40 genótipos diferentes (humano, macaco, bovino, canino, camundongo, suíno, furão, equino, cervídeo, leporino, marsupial, entre outros) (XIAO et al., 2004).

Baseados em análises filogenéticas estes genótipos estão sendo definidos como espécies distintas e incluem *C. hominis* (anteriormente designado genótipo humano de *C. parvum* ou genótipo 1), *C. parvum* (também designado genótipo bovino de *C. parvum* ou genótipo 2), *C. canis* (genótipo canino de *C. parvum*) (XIAO et al., 2004) e *C. horse genotype* (CAFFARA et al., 2013).

O *C. horse genotype* foi descrito pela primeira vez por Ryan et al. (2003) em cavalos selvagens da raça Przewalski na República Checa e considerada equino-específico. Burton et al. (2010) também descreveram o *C. horse genotype* em potros do Estado de Nova Iorque (Tabela 1). Porém estudos mostram que este genótipo pode acometer outros animais e também humanos, representando uma ameaça para a saúde dos humanos (XIAO et al., 2009; BURTON et al., 2010; CAFFARA et al., 2013). Estudos recentes, relataram a ocorrência do subtipo XIIIa A22R9 do genótipo *Hedgehog* (HH) de *Cryptosporidium* em equinos da Argélia (LAATAMNA et al., 2013).

Outros pesquisadores realizaram o sequenciamento de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de equinos, sendo identificados *C. parvum* (RYAN et al., 2003; CHALMERS; GRINBERG, 2005; VERONESI et al., 2010; PERRUCCI et al., 2011; CAFFARA et al., 2013; GALUPPI et al., 2015; WAGNEROVÁ et al., 2015), *C. horse genotype* (RYAN et al., 2003; CHALMERS et al., 2005; BURTON et al., 2010; CAFFARA et al., 2013; GALUPPI et al., 2015; KOSTOPOULOU et al., 2015; WAGNEROVÁ et al., 2015), subtipo XIIIa A22R9 do genótipo *Hedgehog* (HH) (LAATAMNA et al., 2013), subtipo equino de *C. muris* (WAGNEROVÁ et al., 2015) e subtipo equino de *C. tyzzeri* (WAGNEROVÁ et al., 2015).

Em equinos foram descritas várias espécies, as quais estão representadas na Tabela 3. Dentre elas as de maior prevalência são: *C. parvum* e *C. horse genotype* (XIAO et al., 2004), as quais ganham uma relevância ainda maior pelo fato de o *C. parvum* ser considerada a espécie mais zoonótica mais importante (BURTON et al., 2010) e o *C. horse genotype* estar associado aos casos clínicos em humanos na Inglaterra (ROBINSON; ELWIN; CHALMERS, 2008) e nos Estados Unidos (XIAO et al., 2009).

Caffara et al. (2013), em estudos conduzidos com amostras fecais de potros internados no Departamento de Veterinária Ciências Médicas da Universidade de Bolonha, Itália, mostraram que das 37 amostras analisadas por PCR e posterior sequenciamento, em três animais foram detectados a espécie *C. parvum* e em 11 animais a espécie *C. horse genotype*, sendo esta espécie identificada pela primeira vez em potros na Itália.

Chalmers et al. (2005), em estudo conduzido em Gales, no Reino Unido, com 52 equinos, revelou dois animais positivos para *C. parvum* genótipo 2, um dos agentes etiológicos predominantes da criptosporidiose no homem.

As espécies de *Cryptosporidium* identificadas em equinos no mundo encontram-se exposta na Tabela 3.

Tabela 3. Espécies de *Cryptosporidium* identificados em cavalos.

Localidade	Faixa etária	Espécie	Ocorrência (%)	Referência
Bélgica, Holanda, Alemanha e Grécia	Potros < 6 meses	<i>C. horse genotype</i>	0,5	Kostopoulou et al. (2015)
Itália	Potros e Éguas	<i>C. parvum</i>	1,6	Galuppi et al. (2015)
		<i>C. horse genotype</i>	6,8	
		Infecção mista	2,9	
República Checa e Polônia	Potros e Adultos	<i>C. muris</i>	2,5	Wagnerová et al. (2015)
		<i>C. tyzzeri</i>	0,2	
		<i>C. parvum</i>	0,2	
		<i>C. horse genotype</i>	0,2	
Argélia, República Checa	Potros e Adultos	Genótipo Hedgehog (HH) de <i>Cryptosporidium</i>	2,8	Laatamna et al. (2013)
Itália	Potros e Éguas	<i>C. parvum</i>	2,1	Perrucci et al. (2011)
Nova York, EUA	Potros (1-10 semanas)	<i>C. horse genotype</i>	5,1	Burton et al. (2010)
Itália Central	Potros (0 ≥ 8 semanas) e Adultos	<i>C. parvum</i>	8	Veronesi et al. (2010)
Nova Zelândia	Potros	<i>C. parvum</i>	18	Grinberg et al. (2009)

Fonte: o autor.

1.6 CICLO DE VIDA

Cryptosporidium spp. tem ciclo de desenvolvimento assexuado e sexuado, e todos os estágios de desenvolvimento endógenos ocorrem, principalmente, na superfície das células epiteliais do intestino delgado (O'DONOGHUE, 1995). As formas endógenas são: trofozoítos, merontes contendo merozoítos, macro e microgametas. O desenvolvimento endógeno resulta na formação de oocistos (BOWMAN, 2010).

Os oocistos de *Cryptosporidium* têm formato subsférico e são muito pequenos (em torno de 5µm). Quando esporulados, contêm quatro esporozoítos (oocistos infectantes), sem apresentar esporocistos, sendo esta a principal característica do gênero (MENEZES, 2010). Os oocistos infectantes são eliminados nas fezes e disseminam-se no meio ambiente (BOWMAN, 2010).

Quando ingeridos por um hospedeiro, os esporozoítos são liberados pela ação do dióxido de carbono, tripsina e sais biliares (TAYLOR; COOP; WALL, 2010). Estes invadem o ápice das microvilosidades das glândulas gástricas ou da metade distal do intestino delgado, originando vacúolos parasitóforos intracelulares extracitoplasmáticos (BOWMAN, 2010). O esporozoíto torna-se mais esférico e diferencia-se em trofozoíto, iniciando a reprodução assexuada (esquizogonia) que resulta na formação de esquizonte ou meronte tipo 1 que contém de seis a oito merozoítos. O esquizonte se rompe liberando os merozoítos que invadem as células epiteliais adjacentes e se desenvolvem em esquizonte tipo 2 que contém quatro merozoítos.

Inicia-se a gametogonia (diferenciação de microgametas e macrogametas), fase de reprodução sexuada, onde os microgametas fertilizam os macrogametas produzindo os zigotos. Estes sofrem esporogonia dando origem aos oocistos esporulados (TAYLOR; COOP; WALL, 2010). Há formação de dois tipos de oocistos conforme o tipo de parede, espessa ou delgada (MENEZES, 2010). Os oocistos de parede delgada podem se romper na luz intestinal, sendo este o mecanismo que produz a autoinfecção, já os oocistos de parede espessa e resistentes são eliminados nas fezes, caracterizando a forma exógena infectante (BOWMAN, 2010).

O período pré-patente varia entre dois a 14 dias na maioria dos animais domésticos e o período patente pode variar de acordo com a espécie hospedeira de alguns dias a vários meses (O'DONOGHUE, 1995).

1.7 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS

Os esporozoítos são liberados do oocisto durante a passagem pelo trato gastrointestinal, causando a infecção dos enterócitos, desenvolvem-se na superfície apical das células epiteliais intestinal e danificam as microvilosidades intestinais, resultando em má absorção, má digestão e diarreia (MAIR; COHEN; PEARSON, 2013).

A severidade dos sinais clínicos está ligada aos fatores relacionados ao agente, tais como, quantidade do inóculo e virulência; fatores ligados ao hospedeiro, como idade e imunocompetência, e fatores ambientais, como fonte da água (COHEN, 2002).

Em potros, o principal sinal clínico é a diarreia, principalmente em animais neonatos, podendo ocorrer também em animais desmamados até um ano de idade. Em animais adultos geralmente a infecção é assintomática (MAIR; COHEN; PEARSON, 2013).

As características clínicas incluem diarreia persistente, associado à desidratação, fraqueza, ocorre a morte em alguns casos (MAIR; COHEN; PEARSON, 2013). Os sinais clínicos geralmente persistem por cinco a 14 dias nos animais das faixas etárias descritas acima, mas em potros com 3-6 meses, a diarreia pode ser crônica e persistir até que os potros tenham entre 9-12 meses de idade (COHEN, 2002).

A criptosporidiose foi diagnosticada em potros hospitalizados por diversas afecções, sugerindo que o estresse da internação e outras doenças concomitantes podem predispor-los à ocorrência da doença clínica (MAIR; COHEN; PEARSON, 2013).

A infecção por *Cryptosporidium* spp. é, geralmente, auto limitante em indivíduos imunocompetentes, no entanto em animais imunocomprometidos o *Cryptosporidium* spp. é um microrganismo patogênico, capaz de determinar diarreia aquosa, má absorção e perda de peso (TOSCAN et al., 2010). Em potros com imunodeficiência grave, duodeno, jejuno e ílio podem ser infectados, além do estômago, ducto biliar, cólon e ducto pancreático (COHEN, 2002). Bjorneby; Leach; Perryman (1991) relataram a infecção experimental de cinco potros com oocistos de *C. parvum*. Segundo os autores, após exposição ao parasito, estes animais desenvolveram diarreia aquosa por dois a cinco dias. Quatorze dias após a infecção, os mesmos foram eutanasiados e demonstraram a presença do parasita no trato gastrointestinal.

1.8 DIAGNÓSTICO

Não existe um "padrão ouro" de detecção de *Cryptosporidium* em equinos, e a sensibilidade e especificidade dos vários testes de coprodiagnóstico diferem consideravelmente (COLE et al., 1999).

O diagnóstico baseia-se na detecção de oocistos nas fezes, porém, os oocistos são pequenos (4-5 µm de diâmetro) e difíceis de identificar por microscopia em exames coproparasitológicos de rotina (MAIR; COHEN; PEARSON, 2013). A visualização de oocistos por microscopia é um meio valioso para o diagnóstico e auxilia na determinação da intensidade da infecção. Permite também realizar análise morfométrica e avaliação morfológica dos oocistos, porém não permite a classificação das espécies (MEIRELES, 2010).

Métodos de detecção convencionais são baseados na concentração de oocistos e técnicas de coloração de esfregaços fecais (FAYER; MORGAN; UPTON, 2000). A concentração de oocistos pode ser realizada por flutuação utilizando solução de sacarose, sendo a técnica de Sheather mais comum (MAIR; COHEN; PEARSON, 2013). Independentemente da técnica, deve-se considerar que oocistos do gênero *Cryptosporidium* são muito pequenos e muito semelhantes em suas características morfológicas e de coloração com leveduras, esporos de fungos e outras estruturas presentes em amostras fecais, podendo resultar em falso-positivo (MEIRELES, 2010).

Diferentes métodos de coloração podem ser empregados, incluindo safranina azul de metileno, onde os organismos se coram de vermelho apresentando-se como esferas de 4-6 µm de diâmetro, Kinyoun, Ziehl-Neelsen modificado (ZN) e fucsina carbólica - dimetilsulfóxido (DMSO) (MAIR; COHEN; PEARSON, 2013).

A técnica de ZN, proporciona um fundo azul-esverdeado que permite que os oocistos se sobressaiam e apareçam corados de rosa claro a púrpura intensa, resultando num bom contraste (RIGO; FRANCO, 2002).

Outro exame que utiliza a microscopia é o histopatológico, que pode ser realizado de material de necropsia ou biopsia. Nos cortes histológicos, estágios endógenos podem ser visualizados pela coloração de Hematoxilina-Eosina ou Giemsa. Os parasitos podem ser identificados dentro de vacúolos parasitóforos (O'DONOGHUE, 1995).

As técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), são aplicáveis quando há baixa quantidade de oocistos na amostra em análise. A técnica é altamente sensível e precisa, porém, apresenta várias limitações (FAYER; MORGAN;

UPTON, 2000). Os falsos positivos podem resultar de detecção de ácidos nucleicos livres de microorganismos não viáveis e contaminação laboratorial. Alguns contaminantes ambientais podem interferir com ensaios qualitativos e/ou quantitativos (FAYER; MORGAN; UPTON, 2000).

O *Cryptosporidium* apresenta muita variação genética entre as espécies e entre os genótipos, sendo de fundamental importância a caracterização molecular dos isolados, a fim de avaliar epidemiologicamente, prevenir e controlar surtos de criptosporidiose em humanos e animais (MEIRELES, 2010). A PCR possibilita a identificação genotípica do parasito com o sequenciamento dos genes codificadores da subunidade menor do RNA ribossomal (SSU rDNA, SSU rRNA, 18S rDNA ou 18S rRNA), da proteína da parede do oocisto de *Cryptosporidium* (COWP), glicoproteína 60 kDa (GP60), proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP-70) e Actina (XIAO et al., 2004) resultando na distinção dos diversos subgenótipos existentes (FAYER, 2010). O sequenciamento é a etapa final que deve ser aplicada após a técnica de PCR para a identificação da espécie de *Cryptosporidium* (HUBER et al., 2007).

1.9 TRATAMENTO E CONTROLE

Embora inúmeros tratamentos já tenham sido testados em uma variedade de animais, não existe nenhuma quimioterapia ou imunoterapia específica que tenha sido comprovadamente eficaz para tratar a criptosporidiose no homem ou nos animais (COHEN, 2002), sendo mais de 120 compostos diferentes já foram testados e sem sucesso (O'DONOGHUE, 1995).

Alguns produtos foram utilizados no tratamento da criptosporidiose proporcionando melhora sintomática ou redução aparente da infecção, como o colostro de vacas hiperimunizadas com *C. parvum*, a azitromicina, o diclazuril e a eritromicina. (O'DONOGHUE, 1995).

É provável que o tratamento de potros com imunodeficiência grave não tenha êxito, enquanto em potros imunocompetentes a infecção é frequentemente subclínica ou leve e auto limitada, devendo nestes animais fornecer apenas terapia de suporte (COHEN, 2002), a qual é realizada com reposição de líquidos e eletrólitos oral ou intravenoso, sendo benéfica principalmente no alívio da desidratação aguda causada pela diarreia, enquanto se aguarda a recuperação espontânea. A nutrição parenteral às vezes pode ser necessária (O'DONOGHUE, 1995).

A prevenção e o controle da criptosporidiose pode ser difícil, pois os oocistos eliminados nas fezes já infectantes são extremamente resistentes às condições ambientais, podendo sobreviver por meses se não forem expostos às temperaturas extremas ou à dessecação. Além disso, são altamente resistentes à maioria dos desinfetantes químicos. O calor ($> 55^{\circ}\text{C}$), o congelamento ou dessecação completa são os meios mais eficazes de eliminá-los. A exposição à solução de amônia a 5% ou formalina a 10% por 18 horas também é capaz de inviabilizar os esporozoítos presentes nos oocistos (MAIR; COHEN; PEARSON, 2013; COHEN, 2002).

O saneamento adequado pode ajudar diminuindo a quantidade de oocistos no ambiente dos potros, através de estratégias específicas que incluem o fornecimento de água não contaminada, limpeza rigorosa de preferência com vassoura de fogo, desinfecção das baias de parto removendo toda a cama e isolamentos dos potros com diarreia constituem algumas das alternativas de controle (MAIR; COHEN; PEARSON, 2013).

2.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com a revisão, pode-se verificar grande variação da ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em equinos, havendo necessidade de mais estudos moleculares no Brasil devido à escassez de dados nessa população. E também devido à grande variação genética entre as espécies e genótipos de *Cryptosporidium* spp., bem como a sua grande importância em saúde pública e ao íntimo contato de cavalos com o homem.

2.REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F. Q.; SILVA, V. P. Progresso científico em equideocultura na 1ª década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 119-129, 2010.
- BJORNEBY, J. M.; LEACH, D. R.; PERRYMAN, L. E. Persistent Cryptosporidiosis in horses with severe combined immunodeficiency. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 10, p. 3823-3826, oct. 1991.
- BOWMAN, D. D. **Georgis -Parasitologia Veterinária**. 9ª ed. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2010. 432 p.
- BURTON, A. J.; NYDAM, D. V.; DEAREN, T. K.; MITCHELL, K.; BOWMAN, D. D.; XIAO, L. The prevalence of *Cryptosporidium*, and identification of the *Cryptosporidium* horse genotype in foals in New York State. **Veterinary Parasitology**, v. 174, p. 139-144, 2010.
- CAFFARA, M.; FREDERICA PALLAVER, S. P.; IACONO, E.; GALUPPI, R. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from foals in Italy. **The Veterinary Journal**, v. 198, p. 531-533, 2013.
- CHALMERS, R. M.; GRINBERG, A. Significance of *Cryptosporidium parvum* in horses. **The Veterinary Record**, v. 156, p. 688, May 2005.
- CHALMERS, R. M.; THOMAS, A. L.; BUTLER, B. A.; DAVIS MOREL, M. C. G. Identification of *Cryptosporidium parvum* genotype 2 in domestic horse. **The Veterinary Record**, v. 156, p. 49-50, Jan 2005.
- COHEN, N. D. Equine cryptosporidial diarrhea. In: MAIR, T.; DIVERS, T.; DUCHARME, N. **Manual of Equine Gastroenterology**. 1ª ed. N Y: W.B. Saunders, 2002. p. 504-507.
- COLE, D. J.; SNOWDEN, K.; COHEN, N. D.; SMITH, R. Detection of *Cryptosporidium parvum* in horses: thresholds of acid-fast stain, immunofluorescence assay, and flow cytometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 457-460, Feb 1999.

EDERLI, B.; CARVALHO, C. B.; SALES, L. G. Ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* em bezerros na microrregião de Campos dos Goytacazes no norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 2, p. 45-48, 2004.

FAO - **Food and Agriculture Organization**. United Nations. 2008. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor>> Acesso em: 28/08/2015.

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

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

FERREIRA, G. M. S.; DUTRA, F. A. F.; AMORIM FILHO, E. F.; SANTOS, A. C. G. Parasitismo gastrointestinal e hematologia em equinos e asininos da mesorregião da aglomeração urbana, São Luiz, Maranhão. **Archives of Veterinary Science**, v. 19, n. 2, p. 22-30, 2014.

FUJJI, K. Y.; DITTRICH, J. R.; CASTRO, E. A.; ALMEIDA, J. C. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em dois centros de treinamento de equinos de Curitiba, Paraná. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**, São Paulo, v. 51, n. 2, p. 118-121, 2014.

GALUPPI, R.; PIVA, S.; CASTAGNETTI, C.; IACONO, E.; TANEL, S.; PALLAVER, F.; FIORAVANTI, M. L.; ZANONI, R. G.; TAMPIERI, M. P.; CAFARRA, M. Epidemiological survey on *Cryptosporidium* in an Equine Perinatology Unit. **Veterinary Parasitology**, v. 210, p. 10-18, 2015.

GOMES, A. D.; BARRETTA, C.; ZIEGLER, D. P.; SAUSEN, L.; STOEVER, N.; SANGIONI, L. A.; VOGEL, F. S. F.; MONTEIRO, S. G.; ZANELLA, A. Prevalência de *Cryptosporidium* spp e *Giardia* sp em equinos estabulados no jockey club de Santa Maria -

RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 9, p. 2662-2665, Dezembro 2008.

GRINBERG, A.; POMROY, W. E.; CARSLAKE, H. B.; SHI, Y.; GIBSON, I. R.; DRAYTON, B. M. A study of neonatal cryptosporidiosis of foals in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 57, p. 284-289, 2009.

HUBER, F.; SILVA, S.; BOMFIM, T. C. B.; TEIXEIRA, K. R. S.; BELLO, A. R. Genotypic characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 150, p. 65-74, 2007.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2009/ppm2009.pdf>. Acesso em : 07/11/2015.

INÁCIO, S. V.; BRITO, R. L. L.; ZUCATTO, A. S.; COELHO, W. M. D.; AQUINO, M. C. C.; AGUIRRE, A. A. R.; PERRI, S. H. V.; MEIRELES, M. V.; BRESCIANI, K. D. S. *Cryptosporidium* spp. infection in mares and foals of the northwest region of São Paulo State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 4, p. 355-358, Out.-Dez. 2012.

KOSTOPOULOU, D.; CASAERT, S.; TZANIDAKIS, N.; VAN DOORN, D.; DEMELER, J.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SARATSI, A.; VOUTZOURAKIS, N.; EHSAN, A.; DOORNAERT, T.; LOOIJEN, M.; DE WILDE, N.; SOTIRAKI, S.; CLAEREBOU, E.; GEURDEN, T. The occurrence and genetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species in foals in Belgium, The Netherlands, Germany and Greece. **Veterinary Parasitology**, v. 211, p. 170-174, 2015.

LAATAMNA, A. E.; WAGNEROVÁ, P.; SAK, B.; KVETONOVÁ, D.; XIAO, L.; ROST, M.; McEVOY, J.; SAADI, A. R.; AISSI, M.; KVAC, M. Microsporidia and *Cryptosporidium* in horses and donkeys in Algeria: Detection of a novel *Cryptosporidium hominis* subtype family (Ik) in a horse. **Veterinary Parasitology**, v. 208, p. 135-142, 2015.

LAATAMNA, A. E.; WAGNEROVÁ, P.; SAK, B.; KVETONOVÁ, D.; AISSI, M.; ROST, M.; KVAC, M. Equine cryptosporidial infection associated with *Cryptosporidium* hedgehog

genotype in Algeria. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 350-353, 2013.

LEVINE, N. D. Taxonomy and review of the Coccidian genus *Cryptosporidium* (Protozoa: Apicomplexa). **The Journal of Protozoology**, v. 3, n. 1, p. 94-98, 1984.

LIMA, R. A. S.; SHIROTA, R.; BARROS, G. S. C. **Estudo do complexo do agronegócio do cavalo**. Piracicaba: CEPEA/ESALQ/USP, 250p., 2006.

MAIR, T. S.; COHEN, N. D.; PEARSON, G. R. *Cryptosporidium parvum*: Cryptosporidiosis. In: VAN DER KOLK, J. H.; VELDHUIS KROEZE, E. J. B. **Infectious diseases of the horse: diagnosis, pathology, management, and public health**. Manson Publishing. 2013. 327p.

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

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

MENEZES, R. C. A. A. Coccídios. In: MONTEIRO, S. G. **Parasitologia na Medicina Veterinária**. 1ª edição. São Paulo, SP: Roca, 2010. p. 141-157.

MORGAN, U. M.; XIAO, L.; FAYER, R.; LAL, A. A.; THOMPSON, R. C. A. Variation in *Cryptosporidium*: towards a taxonomic revision of the genus. **International Journal for Parasitology**, Australian, v. 29, n. 11, p. 1733 - 1751, November 1999.

O'DONOGHUE, P. J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 2, p. 139-195, 1995.

PANCIERA R.J., THOMASSEN R.W.; GARNER F.M. Cryptosporidial infection in a calf. **Veterinary Pathology**, v. 8, p. 479-484, 1971.

PERRUCCI, S.; BUGGIANI, C.; SGORBINI, M.; CERCHIAI, I.; OTRANCO, D.;

TRAVERSA, D. *Cryptosporidium parvum* infection in a mare and her foal with foal heat diarrhoea. **Veterinary Parasitology**, v. 15, n. 182, p. 2-4, dec 2011.

RAMIREZ, N. E.; WARD, L. A.; SREEVATSAN, S. A. Review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 8, p. 773-785, July 2004.

RIGO, C. R.; FRANCO, R. M. B. Comparação entre os métodos de Ziehl-Neelsen modificado e *Acid-Fast-Trichrome* para a pesquisa fecal de *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 3, p. 209-214, Mai-Jun 2002.

ROBINSON, G., ELWIN, K., CHALMERS, R. M. Unusual *Cryptosporidium* genotypes in human cases of diarrhea. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p. 1174–1176, 2008.

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

SEVÁ, A. P.; FUNADA, M. R.; SOUZA, S. O.; NAVA, A.; RICHTZENHAIN, L. J.; SOARES, R. M. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from domestic animals in a rural area surrounding Atlantic dry forest fragments in Teodoro Sampaio municipality, State of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 4, p. 249-253, Out.-Dez. 2010.

SMITH, H. V.; CACCIO, S. M.; TAIT, A.; MCLAUCHLIN, J.; THOMPSON, R. C. A. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. **Trends in Parasitology**, v. 22, p. 160-167, 2006.

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

SOUZA, P. N. B.; BOMFIM, T. C. B.; HUBER, F.; ABOUD, L. C. S.; GOMES, R. S. Natural infection by *Cryptosporidium* spp., *Giardia* sp. and *Eimeria leuckarti* in three groups

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

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

TOSCAN, G.; PEREIRA, R. C. F.; ARAUJO, L.; SANGIONI, L. A.; VOGEL, F. S. F. Comparação da prevalência de *Cryptosporidium* spp. em equinos de tração e em atletas do jockey club de Santa Maria, RS, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 2, p. 436-440, Abri/Jun 2010.

TYZZER, E. E. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 5, p. 12-13, 1907.

TYZZER, E. E. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. **Archives fur Protistenkunde**, v. 26, p. 394-412, 1912.

VERONESI, F.; PASSAMONTI, F.; CACCIÒ, S.; DIAFERIA, M.; PIERGILI FIORETTI, D. Epidemiological survey on equine *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in Italy and molecular characterization of isolates. **Zoonoses Public Health**, v. 57, p. 510-517, 2010.

WAGNEROVÁ, P.; SAK, B.; McEVOY, J.; ROST, M.; MATYSIAK, A. P.; JEZKOVÁ, J.; KVÁC, M. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. including novel identification of the *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium tyzzeri* in horses in the Czech Republic and Poland. **Parasitology Research**, v. 114, p. 1619-1624, 2015.

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

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

XIAO, L.; HLAVSA, M. C.; YODER, J.; EWERS, C.; DEAREN, T.; YANG, W.; NETT, R.; HARRIS, S.; BREND, S. M.; HARRIS, M.; ONISCHUK, L.; VALDERRAMA, A. L.;

COSGROVE, S.; XAVIER, K.; HALL, N.; ROMERO, S.; YOUNG, S.; JOHNSTON, S. P.; ARROWOOD, M.; ROY, S.; BEACH, M. J. Subtype analysis of *Cryptosporidium* specimens from sporadic cases in Colorado, Idaho, New Mexico, and Iowa in 2007: widespread occurrence of one *Cryptosporidium hominis* subtype and *Cryptosporidium* horse genotype. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 9, p. 3017-3020, Sept 2009.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. nas fezes de potros e éguas de haras da região Noroeste do Paraná.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar as técnicas de diagnóstico de Ziehl-Neelsen e PCR para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais.

Realizar o sequenciamento para avaliar espécies e genótipos obtidos.

Criar uma árvore filogenética com as sequências obtidas e comparar com outros isolados caracterizados no GenBank.

4 ARTIGO A

OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. EM EQUINOS DE HARAS DO NOROESTE DO PARANÁ, BRASIL

OCCURRENCE AND GENETICS CHARACTERIZATION OF *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. IN HORSE FARMS FROM THE NORTHWEST PARANÁ, BRAZIL

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de potros de diferentes idades e éguas na região Noroeste do Paraná. A pesquisa foi realizada em seis diferentes haras da região de Umuarama, Paraná. Um total de 157 amostras fecais foram submetidas a técnica de Ziehl-Neelsen modificada e Nested - PCR, sendo 71 éguas, 65 potros lactentes e 21 potros desmamados. A ocorrência observada de oocistos de *Cryptosporidium* spp. pela técnica de ZN foi de 4,4% (7/157), destes a infecção representou uma taxa de 2,8% para as éguas (2/71) e 7,7% para os potros lactentes (5/65), coincidindo apenas uma égua e seu potro com infecção concomitante e sendo todas as amostras positivas do haras 02 do município de Umuarama. A taxa de detecção de *Cryptosporidium* spp. observada pela nPCR foi de 9,5% (15/157), sendo 12,6% em éguas (9/71) e de 9,2% em potros lactentes (6/65), coincidindo apenas uma égua e seu potro com infecção concomitante. Das 15 amostras positivas, 14 pertenciam ao haras 02 de Umuarama e apenas 1 amostra ao haras 06 do município de Xambrê. A taxa de infecção para o haras 02 foi de 14,2% (7/49) pela técnica de ZN, e de 28,5% (14/49) pela nPCR. No haras 06 a taxa de infecção foi de 3,4% (1/29) detectado apenas pela técnica da nPCR. Todas as amostras positivas na técnica de ZN também foram positivas na nPCR, porém a técnica da nPCR mostrou maior sensibilidade do que a de ZN no diagnóstico do *Cryptosporidium* spp. em equinos. Observou-se um $k = 0,61$ ($p < 0,001$) quando comparado as duas técnicas de diagnóstico pela concordância kappa (k), considerando a nPCR como padrão ouro. A sequência obtida apresentou identidade molecular com *Cryptosporidium parvum*. Este foi o primeiro estudo utilizando nPCR para diagnóstico do *Cryptosporidium* em equinos no Brasil, no entanto ainda deve ser avaliado seu potencial zoonótico.

Palavras-chave: *Cryptosporidium parvum*. Éguas. Potros. Diagnóstico molecular.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the occurrence of *Cryptosporidium* spp. in feces samples from foals and mares from the neighborhood of Umuarama, Paraná. A total of 157 fecal specimens were submitted to Ziehl-Neelsen modified technique and Nested - PCR, which of 71 were mares, 65 suckling foals and 21 weaned foals. The observed occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocyst by ZN technique was 4,4% (7/157) which the infection represented 2,8% rate for mares (2/71) and 7,7% for suckling foals (5/65), coinciding only a mare and its foal with concomitant contamination and being all positive samples of the horse farm 02 from Umuarama. The overall detection rate of *Cryptosporidium* spp. noticed by nPCR was 9,5% (15/157) being 12,6% mares (9/71) and 9,2% suckling foals (6/65), coinciding only a mare and its foal with concomitant contamination. Of the 15 positive samples, 14 belonged to the horse farm 02 and only one sample to the horse farm 06 from Xambrê. The infection rate for the horse farm 02 was 14,2% (7/49) using the ZN technique and 28,5% (14/49) by nPCR. At the horse farm 06 the infection rate was 3,4% (1/29) detected only by nPCR technique. All positive samples in the ZN technique were also positive in nPCR, however the nPCR technique showed a higher susceptibility than the ZN diagnosing *Cryptosporidium* spp in horses. There was a $k = 0.61$ ($p < 0.001$) when comparing two diagnostic tests' kappa coefficients (k), considering nPCR as "gold standard". The obtained sequence showed the molecular identity with *Cryptosporidium parvum*. This was the first study using nPCR for diagnosis of *Cryptosporidium* in horses held in Brazil, however its zoonotic potential must still be evaluated.

Keywords: *Cryptosporidium parvum*. Mares. Foals. Molecular diagnosis.

Introdução

A criptosporidiose é conhecida como uma infecção de distribuição cosmopolita que acomete animais domésticos, silvestres e o homem (COSENDEY et al., 2008). Em equinos a criptosporidiose é auto limitante em imunocompetentes, porém em animais imunossuprimidos pode levar aos quadros de diarreia aquosa, má-absorção e perda de peso, devido à conversão alimentar inadequada que o animal pode apresentar no curso da doença (TOSCAN et al., 2010). Em potros, o principal sinal clínico observado é a diarreia, e nos adultos saudáveis a infecção geralmente é assintomática (INÁCIO et al., 2013).

Cryptosporidium não é espécie-específico, portanto pode haver transmissão de diferentes espécies animais para humanos, através da via fecal-oral e ingestão de água e alimentos contaminados com oocistos oriundos de fezes eliminadas por hospedeiros infectados (COSENDEY et al., 2008), sendo o equino um reservatório com potencial de transmissão do agente aos humanos.

Para detecção dos oocistos de *Cryptosporidium*, pode ser utilizada a técnica de Ziehl-Neelsen modificada, a qual consiste na coloração da lâmina, contendo esfregaço fecal para melhor detecção dos oocistos de espécies do gênero *Cryptosporidium*. Embora tenha alta sensibilidade, esta técnica não é capaz de identificar a espécie presente em uma infecção. Por sua vez, a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica altamente sensível e específica, sendo capaz de apontar uma amostra como positiva a partir de um oocisto (COSENDEY et al., 2008).

Dentre as mais de 22 espécies de *Cryptosporidium* atualmente descritas, 20 foram relatadas em mamíferos, com 61 genótipos determinados de acordo com caracterização genética e a espécie hospedeira (FAYER, 2010). Os equinos parecem mais susceptíveis ao *C. horse genotype*, que foi detectada por Ryan et al. (2003) em cavalos de Przewalski's, e o *C. parvum*, que é a espécie mais frequente da criptosporidiose em equinos, e que ocasionalmente é associada à diarreia (CHALMERS et al., 2005; GRINBERG et al., 2008, 2009; IMHASLY et al., 2009; VERONESI et al., 2010).

No entanto, a prevalência de genótipos e potencial zoonótico do *Cryptosporidium* spp. em equinos ainda é mal compreendida (LAATAMNA et al., 2013), embora haja ciência da doença em equinos desde 1978, através do relato feito por Snyder et al. (1978) nos Estados Unidos.

A criptosporidiose, em cavalos oriundos de infecção natural, foi reportada nos EUA (BURTON et al., 2010); no Canadá (OLSON et al., 1997); no Brasil (INÁCIO et

al., 2012); Nova Zelândia (GRINBERG et al., 2009); Polônia (MAJEWSKA et al., 1999); Itália (VERONESI et al., 2010) e República Checa (RYAN et al., 2003). Poucos estudos da prevalência de criptosporidiose em equinos na última década foram apoiados por dados moleculares (KOSTOPOULOU et al., 2015; WAGNEROVÁ et al., 2015; LAATAMNA et al., 2013, 2015; PERRUCCI et al., 2011; BURTON et al., 2010; VERONESI et al., 2010; GRINBERG et al., 2008, 2009; IMHASLY et al., 2009; CHALMERS et al., 2005).

Sendo assim, investigações mais aprofundadas se faz necessária para compreender melhor a criptosporidiose nos cavalos e, também, avaliar o seu potencial zoonótico (LAATAMNA et al., 2013).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência e caracterizar geneticamente os isolados de *Cryptosporidium* de potros e éguas na região Noroeste do Paraná.

Material e Métodos

Animais utilizados

Foram utilizados 157 equinos assintomáticos, sendo estes, 71 éguas, 65 potros lactentes, com idade variando entre 1 a 7 meses e 21 potros desmamados entre 7 a 10 meses de idade. Dentre os potros 49 eram fêmeas e 37 eram machos. Todos os animais estudados eram da raça Quarto de Milha.

Locais de estudo

A pesquisa foi realizada em seis haras durante o período de outubro de 2012 a maio de 2013, sendo três propriedades do município de Umuarama (latitude: 23° 45' 59" S e longitude: 53° 19' 30" W), duas no município de Douradina (latitude: 23° 22' 51" S e longitude: 53° 17' 30" W) e uma do município de Xambê (latitude: 23° 44' 10" S e longitude: 53° 29' 24" W), todas localizadas na região Noroeste do Estado do Paraná. Esses municípios possuem clima subtropical úmido mesotérmico, verões quentes com tendência de concentração das chuvas (temperatura média superior a 22°C), invernos com geadas pouco frequentes com temperatura média inferior a 18° C e sem estação seca definida.

Coleta das amostras e processamento

Foram coletadas uma amostra por animal diretamente da ampola retal, com auxílio de luva de palpação retal, identificadas, acondicionadas na própria luva sob refrigeração até o seu processamento.

As amostras foram submetidas a técnica de Ziehl-Neelsen modificada (ZN) conforme descrito por Henriksen e Polenz (1981), com montagem de uma lâmina por animal. As lâminas foram observadas por um único observador, em microscópio óptico, em aumento de 400x, sendo considerada negativa quando não se observou oocistos e positiva quando se observou a partir de um oocisto de *Cryptosporidium*. Também foi realizada a técnica de Nested - PCR.

Para a realização da nPCR, as amostras fecais foram acondicionadas em microtubo de 1,5 ml e mantidas à temperatura de -18°C até a realização da extração do DNA.

Extração de DNA genômico de *Cryptosporidium* spp. nas amostras de fezes

A extração de DNA foi realizada, utilizando kit comercial (Nucleospin Tissue[®] Macherey - Nagel), segundo as instruções do fabricante. O DNA extraído foi armazenado a -20°C até a realização da nPCR.

Protocolo de Reação Em Cadeia Da Polimerase (PCR)

Os produtos da extração foram submetidos à técnica de Nested – PCR, utilizando-se de primers específicos para gênero *Cryptosporidium*, segundo Xiao et al. (1999). Na primeira reação, os seguintes primers foram utilizados: Fw1: TTCTAGAGCTAATACATGCG e Rv2: CCCATTTTCCTTCGAAACAGGA. Na segunda reação, os primers continham as seguintes sequências: Fw3: GGAAGGGTTGTATTTATTAGAT e Rv4: AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA. Após a amplificação da segunda reação, obteve-se um fragmento de 825pb do DNA do *Cryptosporidium* spp.

As reações foram realizadas em um volume de 25 µl contendo: 1 x PCR 29 buffers, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 µM de DNTP, 0,2 µM de cada primer, 2 U de Platinum[®] Taq 30 (Invitrogen, Califórnia, EUA), 2 µl de DNA e H₂O mili-Q estéril. Para a segunda reação, o

produto da primeira reação foi diluído em 50 µl de H₂O mili-Q estéril e utilizado 2µl na reação.

Na primeira e segunda reações, os mesmos ciclos de tempo e temperatura foram utilizados: incubação inicial 95°C por 5 minutos, desnaturação 94°C por 45 segundos, anelamento 55°C por 45 segundos, síntese 72°C por 1 minuto e extensão final 72°C por 5 minutos. A desnaturação, anelamento e síntese se repetiram 34 vezes antes do passo de extensão final. A visualização do resultado da Nested - PCR foi feita em gel de agarose a 1,5%, corado com SYBR[®] Safe (Invitrogen, Califórnia, EUA).

Sequenciamento Genético e Árvore Filogenética

Os amplicons sintetizados durante a Nested - PCR foram submetidos à purificação por meio do kit comercial QIAquick[®] gel extraction kit (Invitrogen, Califórnia, EUA). Após a purificação, foram submetidos ao sequenciamento genético, utilizando o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), por meio do ABI3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Os dados obtidos, após o sequenciamento, permitiram comparações entre amplicons complementares de uma mesma amostra, e a construção de sequências *consensus* que foram comparadas com sequências depositadas no GenBank por meio da ferramenta Blast, para determinação de espécies e genótipos.

O alinhamento das sequências foi realizado no software Bioedit Sequence Alignment Editor 7.2.5, incluindo amostras de referência para os parasitos *C. muris* (KJ469983.1), *C. sp.horse genotype China* (KM588593.1), *C. sp. horse genotype Europa* (KM926549.1), *C. sp. horse genotype Japão* (LC010215.1), *C. parvum* (AJ493198.1), *C. meleagridis* (KP730305.1), *C. bovis* (EU408317.1), *C. andersoni* (HQ259590.1) e *Eimeria bovis* (AB769586.1).

A árvore filogenética foi construída utilizando o software MEGA6 (TAMURA et al., 2013), comparando os isolados obtidos e outros isolados cujas sequências estão depositadas no GenBank. Os parâmetros utilizados para a construção da árvore filogenética foram obtidos pelo método da máxima verossimilhança com o Kimura dois parâmetros da distância (KIMURA, 1980). As análises estatísticas de árvores filogenéticas foram determinadas pelo método *bootstrap* em 1000 repetições.

Inquérito Epidemiológico

Um questionário epidemiológico foi aplicado aos proprietários, contendo perguntas a respeito da idade, sexo, raça, sistema de criação, frequência de limpeza das cocheiras, manejo das fezes, tipos de fontes de água dos animais.

Análise Estatística

O programa Epi Info 3.5.4 (DEAN et al., 2012) foi utilizado para a análise estatística dos resultados encontrados no ZN e nPCR e as variáveis estudadas. Para avaliar uma possível associação causal foi utilizada como medida de intensidade de associação a razão de chances ou "OddsRatio" com intervalo de confiança (IC) de 95% segundo Rumel (1986), e um $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

Para a avaliação da concordância entre os dois testes foi utilizado o valor de Kappa descrito por Cohen (1960), considerando a nPCR como "padrão ouro", e para sua interpretação foi utilizada a tabela proposta por Landis e Koch (1977).

Resultados e Discussão

A ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. foi de 4,4% (7/157) pela técnica de ZN, sendo de 2,8% em éguas (2/71) e de 7,7% em potros lactentes (5/65), coincidindo apenas uma égua e seu potro com infecção concomitante e todas as amostras do haras 2 localizado no município de Umuarama, foram positivas (Tabela 4). Valores semelhantes foram encontrados por Majewska et al. (2004) em um centro de equitação na Polônia, com ocorrência de 3,5% (11/318) e Souza et al. (2009), no Brasil, que encontraram a prevalência de 0,75% (3/396) em equinos da polícia militar do Rio de Janeiro, ambos utilizando a técnica de ZN. No entanto, Marques (2010) utilizando o ZN, encontrou uma taxa de 27,8% de animais positivos (25/90) em cavalos da área urbana de Porto Alegre. Da mesma forma, através do ZN, Fujji et al. (2014) detectaram a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 18,52% (20/108) de equinos adultos em Curitiba, PR.

Já na PCR, a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. observada no presente estudo foi de 9,5% (15/157), sendo 12,6% éguas (9/71) e 9,2% potros lactentes (6/65), coincidindo apenas uma égua e seu potro com infecção concomitante, no haras 06 apenas uma égua foi positiva (1/29, 3,4%), localizado no município de Xambê e todas as outras 14 amostras positivas do haras 02, localizada no município de Umuarama, com uma taxa de

infecção para o haras 02 pela nPCR foi de 28,5% (14/49), sendo 16,3% éguas e 12,2% potros lactentes. Todas as amostras positivas na técnica de ZN também foram positivas na nPCR.

Galuppi et al. (2015) utilizaram as duas técnicas de exame (ZN e PCR), para verificar a ocorrência da criptosporidiose em potros e éguas hospitalizados na Universidade da Bolonha obtendo resultados diferentes, sendo 37 potros analisados, com 14 positivos na PCR e destes apenas oito foram positivos na técnica de ZN. A prevalência de infecção observada nestes animais foi de 19,17% (14/73), no presente estudo também foi verificada diferença nos resultados das duas técnicas, foi observado a prevalência de 4,4% para a técnica de ZN e 9,5% para a técnica de nPCR mesmo não tendo utilizado animais imunossuprimidos.

Kostopoulou et al. (2015) analisaram 398 amostras de fezes de equinos provenientes de quatro países europeus (Bélgica, Holanda, Alemanha e Grécia) e observaram uma baixa taxa de infecção por *Cryptosporidium*, na Bélgica (4,5%) e na Grécia (1,1%) utilizando a PCR. Assim como Wagnerová et al. (2015) em estudo na República Checa e na Polônia, também encontraram baixa taxa de ocorrência (3,4%, 12/352) de *Cryptosporidium* em equinos utilizando a técnica de PCR para diagnóstico. O presente estudo revelou valores superiores aos encontrados pelos autores.

Comparando as duas técnicas de diagnóstico pela concordância kappa (k), considerando a nPCR como "padrão ouro", observou-se um $k = 0,61$ ($p < 0,001$). Quando comparados os resultados isolados das éguas e potros lactentes, verificou-se um $k = 0,27$ ($p < 0,001$) e $k = 0,90$ ($p < 0,001$), respectivamente (Tabela 4), indicando uma concordância substancial entre as duas técnicas avaliadas quando se observa o número total de animais. Porém, quando se avalia apenas as éguas, a concordância diminui, mas ainda é substancial e quando se observa apenas os potros esta concordância sobe para excelente. Mirhashemi et al. (2015) encontraram correlações não significativas na análise de 17 amostras positivas de 36 equinos, sendo analisadas as correlações entre os testes de Elisa, Kinyoun, PCR e Imunofluorescência direta, sendo os valores de kappa variando de $k=0,09$ a $-0,16$, sendo a melhor correlação Kinyoun e ELISA ($k = 0,09$).

Outro estudo com 150 cavalos (VERONESI et al., 2010) os autores obtiveram uma correlação entre Imunofluorescência direta e os métodos tradicionais de ensaio para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras fecais, sendo a correlação maior para a técnica de Sheather ($k = 0,45$) em comparação com a técnica de ZN ($k = 0,32$). O valor encontrado entre a Imunofluorescência e associação dos dois ensaios foi alta ($k = 1$) apenas nas amostras diarreicas. Animais com histórico de diarreia foram relatados em 21 dos 120 potros (14%) e a prevalência mais elevada (26,6%) foi observada em potros com menos de

oito semanas de idade, no presente estudo foi obtida uma concordância de $k = 0,61$ mesmo trabalhando com amostras fecais com consistência normal.

No presente estudo, somente o sequenciamento de uma amostra dentre sete apresentou qualidade satisfatória para a construção da árvore filogenética (Figura 1). De acordo com a análise filogenética, a amostra sequenciada agrupou-se com a amostra padrão de *C. parvum* (AJ493198.1) depositada no GenBank, com similaridade genética de 99% a partir do Blast. A divergência evolucionária encontra-se na Tabela 5.

Diferentes estudos com o objetivo de analisar as sequências de nucleotídeos obtidas de amostras de *Cryptosporidium* spp. têm sido descritos com o objetivo de melhor entendimento da epidemiologia deste parasita em equinos. Estes estudos têm demonstrado uma grande quantidade de espécies de *Cryptosporidium* infectando equinos, como, *C. parvum*, *C. muris*, *C. hedgehog* genotype, *C. horse* genotype, *C. tyzzeri* e *C. hominis*. Apesar dessa variabilidade de espécies as mais comuns são *C. horse* genotype e *C. parvum*, sendo a segunda considerada a espécie mais prevalente em equinos (BURTON et al., 2010; GALUPPI, et al., 2015; LAATAMNA et al., 2013; LAATAMNA et al., 2015; WAGNEROVÁ et al., 2015).

Com relação à faixa etária Laatamna et al. (2013) descreveram uma taxa de ocorrência de *Cryptosporidium* em 2,1% (3/138) dos animais adultos e de 0,7% (1/138) dos potros. Semelhante ao presente estudo onde os animais adultos apresentaram uma ocorrência de 12,7% e potros 9,2% tendo a nPCR como "padrão ouro" de diagnóstico (Tabela 4).

Perrucci et al. (2011) avaliaram amostras fecais para detectar presença de oocistos de *Cryptosporidium* em 37 éguas no pré-parto, das mesmas no pós-parto e de seus 37 potros nos dias 8, 10 e 12 de vida. Encontraram apenas uma égua infectada no pré-parto e seu potro também foi positivo com 8, 10 e 12 dias de vida, porém, não detectaram infecção no pós-parto da égua. Burton et al. (2010) encontraram maior prevalência em potros do que em suas mães, taxa de infecção dos potros de 7,4% (13/175) e 1,7% (3/174) nas éguas. Veronesi et al. (2010) também relataram maior prevalência em potros acima de 8 semanas de idade quando comparado com adultos e potros mais jovens, os autores separaram os potros em quatro grupos de 30 animais de acordo com a idade, de 0-2, 2-4, 4-8 e > 8 semanas e 30 éguas, e encontraram uma taxa de infecção de 9,3% (12/150), sendo 0% no grupo 1, 10% (3/30) no grupo 2, 3,3% (1/30) no grupo 3, 23,3% (7/30) no grupo 4 e 3,3% (1/30) de éguas infectadas por *Cryptosporidium*, sendo assim a taxa de infecção dos potros representou 7,3% e das éguas 0,6%.

A maior taxa de infecção por *Cryptosporidium*, no presente estudo, foi encontrada no haras 02 (28,5%, 15/47) pela nPCR, o que sugere estar associada aos fatores de superlotação de animais, devido à observação de uma média de 14 animais/hectare. Souza et al. (2009), relataram que provavelmente a infecção natural por *Cryptosporidium* em equinos, com diferentes tipos de manejo está relacionada ao estado imunológico e às condições sanitárias ambientais.

Os resultados encontrados ao redor do mundo corroboram com o encontrado no presente estudo, pois a espécie encontrada no mesmo (*C. parvum*) é descrita como a mais prevalente em equinos e demonstram uma grande relevância pelo fato de o *C. parvum* ser a espécie zoonótica mais importante (BURTON et al., 2010), demonstrando que os equinos podem estar associados ao ciclo da criptosporidiose humana.

REFERÊNCIAS

- BURTON, A. J.; NYDAM, D. V.; DEAREN, T. K.; MITCHELL, K.; BOWMAN, D. D.; XIAO, L. The prevalence of *Cryptosporidium*, and identification of the *Cryptosporidium* horse genotype in foals in New York State. **Veterinary Parasitology**, v. 174, p. 139-144, 2010.
- CHALMERS, R. M.; THOMAS, A. L.; BUTLER, B. A.; MOREL, M. C. Identification of *Cryptosporidium parvum* genotype 2 in domestic horses. **Veterinary Record**, v. 156, p. 49–50, 2005.
- COHEN, J. A coefficient of agreement for nominal scale. **Educational and Psychological Measurement**, v. 20, p. 37-46, 1960.
- COSENDEY, R. I. J.; FIUZA, V. R. S.; DE OLIVEIRA, F. C. R. Importância do manejo na criptosporidiose em criações de ovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 209-214, 2008.
- DEAN, A. G.; SULLIVAN, K.; ARNER, T. G.; SANGAM, S.; SUNKI, G.; FRIEDMAN, R.; LANTINGA, M.; ZUBIETA, J.; SMITH, D.C. **Epi Info version 3.5.4: A Database and Statistics Program for Public Health Professionals**, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga, USA, 2012.
- FAYER, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 90-97, 2010.
- FUJJI, K. Y.; DITTRICH, J. R.; CASTRO, E. A.; ALMEIDA, J. C. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em dois centros de treinamento de equinos de Curitiba, Paraná. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**, São Paulo, v. 51, n. 2, p. 118-121, 2014.
- GALUPPI, R.; PIVA, S.; CASTAGNETTI, C.; IACONO, E.; TANEL, S.; PALLAVER, F.; FIORAVANTI, M. L.; ZANONI, R. G.; TAMPIERI, M. P.; CAFARRA, M. Epidemiological survey on *Cryptosporidium* in an Equine Perinatology Unit. **Veterinary Parasitology**, v. 210,

p. 10-18, 2015.

GRINBERG, A.; POMROY, W. E.; CARSLAKE, H. B.; SHI, Y.; GIBSON, I. R.; DRAYTON, B. M. A study of neonatal cryptosporidiosis of foals in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 57, p. 284-289, 2009.

GRINBERG, A.; LEARMONTH, J.; KWAN, E.; POMROY, W.; LOPEZ VILLALOBOS, N.; GIBSON, I.; WIDMER, G. Genetic diversity and zoonotic potential of *Cryptosporidium parvum* causing foal diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 2396–2398, 2008.

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

IMHASLY, A.; FREY, C. F.; MATHIS, A.; STRAUB, R.; GERBER, V. Cryptosporidiosis (*C. parvum*) in a foal with diarrhea. **Schweiz Arch Tierheilkd**, v. 151, p. 21–26, 2009.

INÁCIO, S. V.; DE BRITO, R. L. L.; BRESCIANI, K. D. S. Aspectos epidemiológicos da infecção por *Cryptosporidium* em equinos. **Acta Veterinaria Brasílica**, v. 7, n. 1, p. 1-4, 2013.

INÁCIO, S. V.; BRITO, R. L. L.; ZUCATTO, A. S.; COELHO, W. M. D.; AQUINO, M. C. C.; AGUIRRE, A. A. R.; PERRI, S. H. V.; MEIRELES, M. V.; BRESCIANI, K. D. S. *Cryptosporidium* spp. infection in mares and foals of the northwest region of São Paulo State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 4, p. 355-358, Out.-Dez. 2012.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.

KOSTOPOULOU, D.; CASAERT, S.; TZANIDAKIS, N.; VAN DOORN, D.; DEMELER, J.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SARATSI, A.; VOUTZOURAKIS, N.; EHSAN, A.; DOORNAERT, T.; LOOIJEN, M.; DE WILDE, N.; SOTIRAKI, S.; CLAEREBOU, E.; GEURDEN, T. The occurrence and genetic characterization of

Cryptosporidium and *Giardia* species in foals in Belgium, The Netherlands, Germany and Greece. **Veterinary Parasitology**, v. 211, p. 170-174, 2015.

LAATAMNA, A. E.; WAGNEROVÁ, P.; SAK, B.; KVETONOVÁ, D.; XIAO, L.; ROST, M.; McEVOY, J.; SAADI, A. R.; AISSI, M.; KVAC, M. Microsporidia and *Cryptosporidium* in horses and donkeys in Algeria: Detection of a novel *Cryptosporidium hominis* subtype family (Ik) in a horse. **Veterinary Parasitology**, v. 208, p. 135-142, 2015.

LAATAMNA, A. E.; WAGNEROVÁ, P.; SAK, B.; KVETONOVÁ, D.; AISSI, M.; ROST, M.; KVAC, M. Equine cryptosporidial infection associated with *Cryptosporidium* hedgehog geotype in Algeria. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 350-353, 2013.

LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, p. 159, 1977.

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

MAJEWSKA, A. C., WERNER, A., SULIMA, P., LUTY, T. Survey on equine cryptosporidiosis in Poland and the possibility of zoonotic transmission. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 6, p. 161–165, 1999.

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

MIRHASHEMI, M. E.; ZINTL, A.; GRANT, T.; LUCY, F. E.; MULCAHY, G.; DE WAAL, T. Comparison of diagnostic techniques for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in animal samples. **Experimental Parasitology**, v. 151-152, p. 14-20, 2015.

OLSON, M. E.; THORLAKSON, C. L.; DESELLIERS, L.; MORCK, D. W.; McALLISTER, T. A. *Giardia* and *Cryptosporidium* in Canadian farm animals. **Veterinary Parasitology**, v. 68, p. 375-387, 1997.

PERRUCCI, S.; BUGGIANI, C.; SGORBINI, M.; CERCHIAI, I.; OTRANCO, D.; TRAVERSA, D. *Cryptosporidium parvum* infection in a mare and her foal with foal heat diarrhoea. **Veterinary Parasitology**, v. 15, n. 182, p. 2-4, dec 2011.

RUMEL, D. "Oddsratio": algumas considerações. **Revista Saúde Pública**, n. 20, p. 253-258, 1986.

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

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

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

TAMURA, K.; STECKER G.; PETERSON D.; FILIPKI A.; KUMAR S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TOSCAN, G.; PEREIRA, R. C. F.; ARAUJO, L.; SANGIONI, L. A.; VOGEL, F. S. F. Comparação da prevalência de *Cryptosporidium* spp. em equinos de tração e em atletas do jockey club de Santa Maria, RS, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 2, p. 436-440, Abri/Jun 2010.

VERONESI, F.; PASSAMONTI, F.; CACCIÒ, S.; DIAFERIA, M.; PIERGILI FIORETTI, D. Epidemiological survey on equine *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in Italy and molecular characterization of isolates. **Zoonoses Public Health**, v. 57, p. 510–517, 2010.

XIAO, L.; ESCALANTE, L.; YANG, C.; SULAIMAN, I.; ESCALANTE, A. A.; MONTALI, R. J.; FAYER, R.; LAL, A. A. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on

the small-subunit rRNA gene locus. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 1578–1583, 1999.

WAGNEROVÁ, P.; SAK, B.; McEVOY, J.; ROST, M.; MATYSIAK, A. P.; JEZKOVÁ, J.; KVÁC, M. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. including novel identification of the *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium tyzzeri* in horses in the Czech Republic and Poland. **Parasitology Research**, v. 114, p. 1619-1624, 2015.

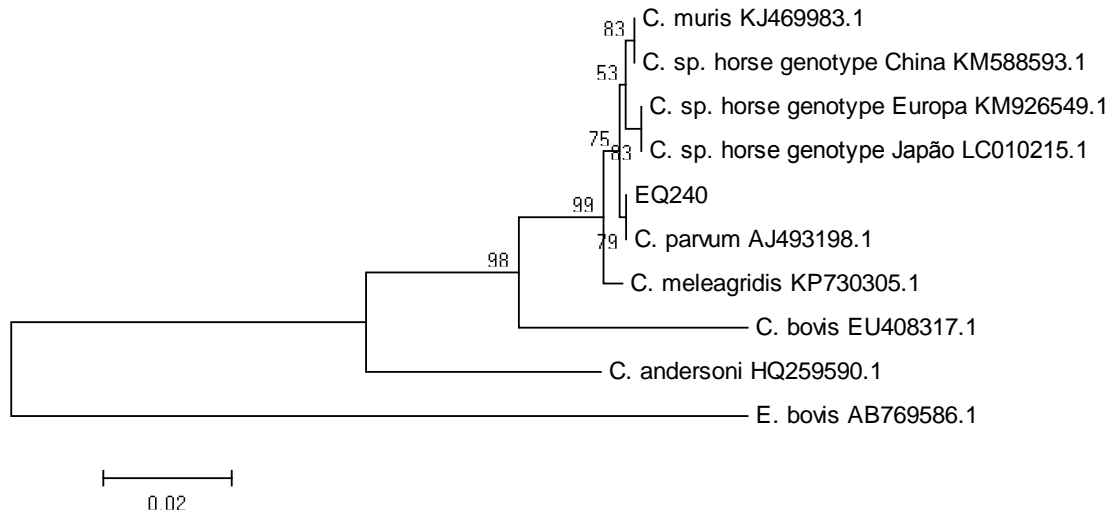
1 Tabela 4. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. pelas técnicas de Ziehl-Neelsen modificado e PCR e cálculo
 2 do coeficiente Kappa (K) em amostras fecais de equinos de haras da região Noroeste do Paraná, no ano de 2012 a 2013.

Haras	Localidade	Éguas		Potros lactentes		Potros desmamados		KAPPA (K) Total
		ZN n+/N (%)	PCR n+/N (%)	ZN n+/N (%)	PCR n+/N (%)	ZN n+/N (%)	PCR n+/N (%)	
H01	Umuarama	0/12 (0)	0/12 (0)	0/20 (0)	0/20 (0)	-	-	K=0,61 P=0<0,001
H02	Umuarama	2/29 (6,9)	8/29 (27,6)	5/20 (25,0)	6/20 (30,0)	-	-	
H03	Umuarama	0/8 (0)	0/8 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	-	-	
H04	Douradina	0/7 (0)	0/7 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)	-	-	
H05	Douradina	-	-	-	-	0/21 (0)	0/21 (0)	
H06	Xambrê	0/15 (0)	1/15 (6,7)	0/14 (0)	0/14 (0)	-	-	
Total		2/71 (2,8)	9/71 (12,7)	5/65 (7,7)	6/65 (9,2)	0/21 (0)	0/21 (0)	
Kappa (K)		K=0,27 p<0,001		K=0,90 p<0,0001		NC		

3 ZN - Ziehl-Neelsen; PCR - reação em cadeia da polimerase; n+ - número de positivos.

4
5
6
7
8
9
10

- 1 Figura 1. Árvore filogenética de sequência do gene 18S rRNA de *Cryptosporidium* deste
 2 estudo e de outras espécies de *Cryptosporidium* disponíveis no GenBank. Taxon identificado
 3 no presente estudo: EQ240.



- 4
 5
 6
 7

1 Tabela 5. Estimativa das divergências evolucionárias entre as sequências descritas abaixo obtidas no
 2 PUBMED (GENBANK). A análise evolucionária foi obtida pelo MEGA6.

3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1) EQ240										
2) <i>C. parvum</i> AJ493198.1	0,000									
3) <i>C. sp</i> horse genotype Europa KM926549.1	0,004	0,004								
4) <i>C. sp</i> horse genotype Japão LC010215.1	0,004	0,004	0,000							
5) <i>C. sp</i> horse genotype China KM588593.1	0,004	0,004	0,004	0,004						
6) <i>C. muris</i> KJ469983.1	0,004	0,004	0,004	0,004	0,000					
7) <i>C. meleagridis</i> KP730305.1	0,006	0,006	0,010	0,010	0,008	0,008				
8) <i>C. bovis</i> EU408317.1	0,051	0,051	0,056	0,056	0,053	0,053	0,051			
9) <i>C. andersoni</i> HQ259590.1	0,078	0,078	0,081	0,081	0,078	0,078	0,074	0,092		
10) <i>E. bovis</i> AB769586.1	0,213	0,213	0,210	0,210	0,208	0,208	0,212	0,233	0,206	

4

5

6

7

8

1 **5 CONCLUSÃO GERAL**

2

3 Com a presente pesquisa foi possível concluir que há baixa ocorrência de
4 *Cryptosporidium* spp em equinos da região Noroeste do Paraná.

5 A técnica da nPCR revelou maior sensibilidade que a técnica de Ziehl-
6 Neelsen modificado para diagnóstico de *Cryptosporidium* em amostras fecais de equinos.

7 Equinos da região Noroeste do Paraná podem servir como fonte de
8 contaminação ambiental por meio de eliminação de oocistos de *Cryptosporidium parvum* nas
9 fezes, o que poderia favorecer a infecção em outras espécies, incluindo humanos.

10

11

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34

ANEXOS

ANEXO A

Questionário Epidemiológico da Propriedade

Data: ___/___/___

Propriedade: _____

Município: _____ Estado: _____

Proprietário: _____ Telefone: _____

01. Quantidade de equinos na propriedade: _____

02. Quantidade de potros até 06 meses: _____

03. Quantidade de potros até 1 ano: _____

04. Quantidade de éguas: _____

05. Animais criados na propriedade:

 Somente equinos Equinos + bovinos Equinos + Peq. Ruminantes Equinos + bovinos + peq. Ruminantes

06. Raça predominante:

 Quarto de milha Paint horse PSI Mestiços

07. Animais criados em:

 Pasto Cocheira Pasto + cocheira

08. Cocheira – Material para cama:

 Serragem Pó de serra Feno Palha de arroz Areia Outro: _____

09. Cocheira – Frequência de Limpeza:

 1 vez ao dia 2 vezes ao dia 3 vezes ao dia Nenhuma vez ao dia Outra: _____

10. Cocheira – Frequência da troca de cama:

 7 dias 15 dias 20 dias 30 dias 45 dias 60 dias Outra: _____

11. Cocheira – Manejo das camas:

 Esterqueira Adubo Descarte sem tratamento

12. Alimentação volumosa:

 Pastagem Feno Alfafa Silagem Forrageira

13. Alimentação controlada:

 Ração comercial Ração produzida na propriedade Não possui alimentação controlada Outra: _____

14. Suplementação mineral:

 Sal comum Sal mineral Não tem suplementação mineral

15. Origem da Água:

 Água tratada Poço artesiano Açude

16. Vacinas efetuadas:

- () Encefalomielite () Influenza () Anti-Rábica
 () Tétano () Rinopneumonite () Aborto Equino a Vírus (EHV-1)

17. Utilização de anti-helmíntico: () Sim () Não**18. Frequência da utilização de anti-helmíntico:**

- () 1 mês () 3 meses () 4 meses () 6 meses () 1 ano () 2 anos

19. Realização de OPG: () Sim () Não**20. Frequência da realização de OPG:**

- () 1 mês () 3 meses () 6 meses () 1 ano () 2 anos
 () Sempre antes da utilização de anti-helmíntico

21. Últimos 3 princípios ativos de anti-helmínticos utilizados:

- _____

22. Rotação de anti-helmínticos: () Sim () Não**23. Presença de carrapatos:**

- () Baixa infestação () Média infestação () Alta infestação () Ausência

24. Uso de carrapaticida: () Sim () Não**25. Frequência da aplicação:**

- () 15 dias () 20 dias () 30 dias () 45 dias () 3 meses () 6 meses

26. Últimos 3 princípios ativos de carrapaticidas utilizados:

- _____

27. Rotação de carrapaticida: () Sim () Não**28. Ocorrência de diarreia:**

- () Baixa ocorrência () Média ocorrência () Alta ocorrência () Ausência

29. Animais acometidos:

- () Potros até 6 meses () Potros até 1 ano () Potros > 1 ano () Éguas

30. Realizado tratamento: () Sim () Não

Total de animais coletados: _____

1 **ANEXO B**

2 Questionário Epidemiológico Individual

3
4 **Data:** ___/___/___

5
6 Propriedade: _____
7 Município: _____ Estado: _____

8
9 **Nome potro:** _____

10
11 Data de nascimento: ___/___/___
12 Sexo: () M () F Raça: _____ Peso: _____ Kg
13 Nome égua: _____

14
15 **01. Aspecto das fezes – Potro:**

16 () Normal () Pastosa () Diarreia

17
18 **02. Aspecto das fezes – Égua:**

19 () Normal () Pastosa () Diarreia

20
21 **03. Última vermifugação – Égua:** _____

22
23 **Obs.:**

24 _____

25 _____

26
27
28 **Resultados:**

29 *Cryptosporidium* Potro: () Positivo () Negativo

30
31 *Cryptosporidium* Égua: () Positivo () Negativo

32
33
34