



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

THAIS AGOSTINHO MARTINS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp.
EM BEZERROS BUBALINOS (*Bubalus bubalis*) NA REGIÃO
DA BAIXADA MARANHENSE, BRASIL**

Londrina
2017

THAIS AGOSTINHO MARTINS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp.
EM BEZERROS BUBALINOS (*Bubalus bubalis*) NA REGIÃO
DA BAIXADA MARANHENSE, BRASIL**

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

Orientador: Professor Doutor João Luis Garcia

Londrina
2017

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

M386 Martins, Thais Agostinho.
Caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. em bezerrros bubalinos (*Bubalus bubalis*) na região da baixada Maranhense, Brasil / Thais Agostinho Martins. - Londrina, 2017.
50 f. : il.

Orientador: João Luis Garcia.
Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2017.
Inclui bibliografia.

1. Búfalo - Doenças - Maranhão - Tese. 2. Criptosporidiose - Búfalo - Maranhão - Tese. 3. *Cryptosporidium* - Aspectos moleculares - Tese. 4. Zoonoses - Tese. I. Garcia, João Luis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 619

THAIS AGOSTINHO MARTINS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp. EM
BEZERROS BUBALINOS (*Bubalus bubalis*) NA REGIÃO DA BAIXADA
MARANHENSE, BRASIL**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Katia Denise Saraiva Bresciani
Universidade Estadual de Paulista - UNESP

Profa. Dra. Roberta Lemos Freire
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 23 de fevereiro de 2017.

**A minha mãe, dona Madalena, por sempre
acreditar que era possível.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela infinita misericórdia todos os dias.

Agradeço ao meu orientador Professor Doutor João Luis Garcia pela constante orientação, mas sobretudo pela sua dedicação em sempre ensinar e por sua compreensão em todos os momentos.

Ao professora Doutora Katia Denise Saraiva Bresciani por sua disposição, participação e contribuições nesta banca.

A professora Doutora Roberta Lemos Freire por sua contribuição e participação neste trabalho, além da sua constante presença e ensinamentos durante todo meu caminho na UEL.

A minha mãe, dona Madalena Agostinho, por sua incrível força e determinação e oferecer às filhas aquilo que ele não teve oportunidade de conseguir. Por nos mostrar todos os dias que educação e sabedoria jamais serão perdidos ou retirados de nós.

A minha irmã Tatiane Martins por ser minha referência e desta forma me fazer querer cada dia mais.

Ao meu pai Jair Martins, por duvidar, e desta forma me fazer correr até conseguir.

Aos meus tios, primos e avós por sempre torcer mesmo sem saber o que eu faço direito. Em especial a minha avó, Dona Laura Agostinho, por todas as velas, orações e promessas.

A minha irmã Magda Bispo, por me aguentar, mesmo nos dias de mais mal humor.

As minhas amigas Ana Sue, Thaís e Ana Flávia, por todas as risadas, incentivos e puxões de orelha.

A minha eterna R2 Mércia Seixas, sem ela este trabalho não seria possível, e provavelmente eu não estaria aqui neste momento.

Ao amigo Sergio Tosi, por estar ao meu lado e ensinando em todo o momento.

A técnica e amiga Beatriz Nino por todo o apoio, amizade e ensinamentos. E também aos técnicos Aldair Matos e Elizabeth Marana pelos ensinamentos.

A técnica Dalva Maria Navarro Fabrício por me acompanhar e me ensinar com tanta paciência e compreensão.

Aos professores: Dr. Milton Yamamura, Dr. Itamar Navarro, Dr. Ademir Benedito da Luz Pereira e Dr. Odilon Vidotto pela constante orientação durante o período da

residência e mestrado.

Ao amigo Felipe Martins por ser o melhor em compartilhar conhecimentos, por toda a ajuda e companheirismo.

Aos amigos Joice, João Pedro, Priscila, Nelson e Hugo por todos os artigos, conteúdos e risadas.

E as minhas filhas Frida e Guta, que com olhares carinhosos e lambidas molhadas alegram meus dias.

**“São as nossas escolhas que revelam o que
realmente somos,
muito mais do que as nossas qualidades.”**
J.K. Rowling

MARTINS, Thais Agostinho. **Caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. em bezerrros bubalinos (*Bubalus bubalis*) na região da baixada Maranhense, Brasil.** 2017. 50 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

O gênero *Cryptosporidium* pertencente ao filo Apicomplexa infecta répteis, peixes, aves e mamíferos, incluindo o homem e apresenta importante papel como zoonose. Entre as espécies deste protozoário o *Cryptosporidium parvum* apresenta-se como importante agente na diarreia neonatal em ruminantes. Ainda são escassas as informações sobre a caracterização molecular do parasita em búfalos, desta forma objetivou-se caracterizar molecularmente *Cryptosporidium* spp. em búfalos (*Bubalus bubalis*), para tanto foram utilizadas 122 amostras de fezes de consistência normal, de animais de ambos os sexos com 0 a 12 meses de idade, oriundos de quatro propriedades da região da Baixada Maranhense, Brasil. As amostras foram coletados diretamente da ampola retal e mantidos em freezer a -20°C até o momento da extração de DNA. Os produtos da extração foram submetidas a técnica de nested PCR utilizando-se primers específicos para gênero *Cryptosporidium* do gene 18S rRNA, posteriormente foram realizados RFLP e sequenciamento genético para caraterização das espécies. A visualização do resultado da PCR foi realizada por meio de gel de agarose a 1,5%. Dos 122 animais analisados, 13,11% (16) amostras apresentam-se positivas. Por meio da RFLP, 15 amostras apresentaram padrões de *Cryptosporidium ryanae* e uma de *Cryptosporidium parvum*. Para a amostra identificada como *C. parvum* foi realizada nested PCR do gene gp 60 e posteriormente sequenciamento genético. A sequencia obtida para *C. parvum* identificou o subtipo IIaA20G1R1, sendo esta a primeira identificação molecular deste subtipo no Brasil. Além disso foi possível demonstrar a ocorrência de *C. ryanae* e *C. parvum* em fezes de animais sem sinais clínicos de diarreia, resaltando a importância desses animais como fonte de contaminação ambiental.

Palavras-chave: Criptosporidiose. Bubalinocultur. *Cryptosporidium ryanae*. Sequenciamento genético.

MARTINS, Thais Agostinho. **Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in buffalo calves (*Bubalus bubalis*) in the region of baixada Maranhense, Brazil.** 2017. 50 p. Dissertation (Master's degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

The genus *Cryptosporidium* belongs to the phylum Apicomplexa, described as cause of infection in reptiles, fish, birds and mammals, including man, causing an important zoonosis. Among the species of this protozoan *Cryptosporidium parvum* is important factor in neonatal diarrhea in cattle, sheep, goats and buffaloes. Several authors carried out the evaluation of the occurrence of this parasite, but information on the molecular characterization in buffaloes is scarce. The study objected identify and molecularly characterize *Cryptosporidium* spp. in buffaloes (*Bubalus bubalis*), 122 normal consistency feces samples were analyzed, from male and female with 0 to 12 months of age, from four properties in the Baixada Maranhense region of Brazil. Samples were collected directly from the rectal bulb and kept in a freezer at -20°C until DNA extraction. The extraction products were submitted to a nested PCR technique using primers specific to the genus *Cryptosporidium* of the 18S rRNA gene, later RFLP and genetic sequencing were performed to characterize the species. Visualization of the PCR result was performed by means of 1.5% agarose gel. Of the 122 animals analyzed, 13.11% (16) samples were positive. Through RFLP 15 samples showed patterns of *Cryptosporidium ryanae* and one of *Cryptosporidium parvum*. For the sample identified as *C. parvum*, nested PCR of the gp 60 gene was performed and later genetic sequencing. The sequence obtained for *C. parvum* identified subtype IIaA20G1E1. The use of the nested PCR technique and genetic sequencing enabled the first molecular identification of the IIaA20G1R1 subtype in Brazil, in addition to demonstrating the occurrence of *C. ryanae* and *C. parvum* in animal feces without clinical signs of diarrhea, highlighting the importance of these animals as source of environmental contamination.

Key words: Cryptosporidiosis. Buffalo cattle. *Cryptosporidium ryanae*. *Cryptosporidium parvum*. Genetic sequencing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Ciclo biológico do *Cryptosporidium* spp..... 18
- Figura 2** – Árvore filogenética de sequencias do gene 18S rRNA de *Cryptosporidium* de búfalos (*Bubalus Bubalis*) da baixada Maranhense e de outras espécies de *Cryptosporidium* disponíveis no GenBank..... 39
- Figura 3** – Árvore filogenética de sequencias do gene gp60 de *Cryptosporidium* de búfalos (*Bubalus Bubalis*) da baixada Maranhense e de outras espécies de *Cryptosporidium* disponíveis no GenBank..... 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ocorrência da infecção por <i>Cryptosporidium</i> em búfalos de acordo com a técnica diagnóstica utilizada e localização geográfica	21
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	<i>Cryptosporidium</i> spp	15
2.1.1	Histórico	15
2.2.2	Classificação e Taxonomia.....	16
2.2.3	Ciclo Biológico e Patogenia.....	17
2.2.4	Diagnóstico Molecular	18
2.3	<i>Cryptosporidium</i> em Búfalos	19
3	REFERENCIAS	22
4	OBJETIVOS	31
4.1	Objetivo Geral	31
4.2	Objetivos Específicos	31
5	ARTIGO	32
5.1	Introdução.....	34
5.2	MATERIAL DE MÉTODOS	35
5.2.1	Local de Estudo	35
5.2.2	Amostras.....	35
5.2.3	Extração de DNA, <i>nested</i> PCR e RFLP	36
5.2.4	Sequenciamento e construção de árvore filogenética.....	37
5.2.5	Análise estatística	37
5.3	Resultados	38
5.4	Discussão.....	40
5.4	Conclusão	42
5.5	Referências	43
	CONCLUSÃO GERAL	48
	ANEXOS	49
	PARECER ÉTICO	50

1 INTRODUÇÃO

Os bubalinos possuem importância na economia de diversos países principalmente na Ásia e América do Sul (DUBEY, 2008). No Brasil a bubalinocultura é uma atividade de importância que atrai adeptos devido ao excepcional desempenho zootécnico dos animais. Além disso são extremamente versáteis com produção de carne, leite e trabalho, em todas as latitudes e longitudes, nas mais variáveis condições climáticas (SILVA et al., 2003).

A introdução dos búfalos no Brasil teve início a partir do final do século XIX e sua grande adaptabilidade aos diferentes ambientes, sua elevada fertilidade e longevidade produtiva, permitiram que o rebanho experimentasse uma evolução considerável no Brasil (BERNARDES, 2007). Somente entre os anos de 2012 e 2013, houve um aumento de 5,6% deste rebanho no território nacional (IBGE, 2013).

No Brasil o efetivo de bubalinos é de 1,32 milhão de cabeças com a maior concentração localizada na região Norte com 66,5% do rebanho nacional, seguido pela região Sudeste com 11,32%, Nordeste 9,11%, Sul com 8,07% e Centro-Oeste 5% (IBGE, 2014).

A área escolhida para a introdução e desenvolvimento do búfalo, no estado Maranhão, foi a Baixada Maranhense notadamente por reunir condições naturais, tais como pastagem nativa, inverno regular com quase seis meses de chuva e campos inundados durante o período chuvoso (VASCONCELOS, 2012). Este estado possui o maior rebanho de búfalos do nordeste com 63,9%, totalizando 80.672 cabeças, distribuídos pelas cinco mesorregiões do estado (IBGE, 2013). O mais significativo da produção bubalina neste estado é o espaço geográfico que ele ocupa, com áreas disponíveis e condições favoráveis para a criação de búfalos em todo o território estadual (VASCONCELOS, 2012).

Os búfalos são conhecidos por apresentarem grande resistência ao desenvolvimento de doenças comuns aos bovinos. No entanto, o hábito de permanecerem aglomerados por longos períodos favorece as infecções parasitárias, que podem levá-los a apresentarem sinais clínicos (COCKRILL, 1981; LAÚ, 1999).

O gênero *Cryptosporidium* spp. responsável por infecções em humanos e animais, causando inflamação e atrofia das vilosidades intestinais resultando em perda da superfície de absorção e desequilíbrio no transporte de nutrientes (THOMPSON; PALMER; O'HANDLEY, 2008). Este parasita tem sido descrito como causa de surtos em humanos em diversas regiões do mundo e considerado o mais frequente agente de surtos de transmissão hídrica, responsável por 239 surtos entre os anos de 2011 e 2016 (EFSTRATIOU, ONGERTH,

KARANIS, 2017). Estima-se que a criptosporidiose é a maior causa de mortes por diarreia em crianças com menos de 5 anos de idade e como agente de grave doença entérica em pessoas imunodeficientes, podendo ocasionar a morte destes pacientes (SHOULTZ, de HOSTOS, CHOY, 2016; CURRENT, GARCIA, 1991).

Nos animais de produção a importância da criptosporidiose é traduzida tanto pelo potencial zoonótico, de algumas espécies, como também pela perda econômica que a infecção promove (OLSON et al., 2004). Para a etiologia das diarreias neonatais *C. parvum* é considerado importante por ser o enteropatógeno mais comumente encontrado durante as primeiras semanas de vida em ruminantes. O parasita frequentemente é o agente principal da doença, mas esta torna-se mais acentuada quando outros agentes estão associados (RADOSTITS et al., 2000; SILVERLÅS et al., 2013). A importância da faixa etária no estudo da criptosporidiose é descrita por Ribeiro et al. (2000), que verificaram presença de oocistos de *C. parvum* em búfalos mais frequentemente na sexta semana de idade e com maior prevalência em animais sem sinais de alterações gastrointestinais, sugerindo que bezerros bubalinos não sintomáticos são potenciais fontes de infecção.

Os isolados de origem animal, humano e ambiental têm sido usados no intuito de investigar, por meio da caracterização molecular, o potencial zoonótico das espécies ou genótipos do protozoário (XIAO, FAYER, 2008). As pesquisas sobre *Cryptosporidium* em búfalos foram, em grande parte, baseados na identificação morfológica de oocistos ou por meio de métodos imunológicos. Ambas as técnicas podem fornecer dados sobre a prevalência, porém somente a biologia molecular é capaz de identificar as espécies ou genótipos do parasita, o que é fundamental do ponto de vista de saúde pública (FAYER, 2010). São escassos os números de estudos relacionados à classificação molecular de *Cryptosporidium* em bubalinos, porém alguns autores têm identificado *C. parvum* (GOMÉZ-COUSO et al., 2005; CACCIÓ et al., 2007; FENG et al., 2012; AQUINO et al., 2015), *Cryptosporidium* genótipo suíno (AQUINO et al., 2015), *C. ryanae* (AMER et al., 2013; AQUINO et al., 2015) e *C. bovis* (HELMY et al., 2013; ABEYWARDENA et al., 2014; MA et al., 2015). Desta forma são necessários estudos de ocorrência e caracterização molecular de *Cryptosporidium* em búfalos para uma constante atualização destes animais como potenciais fontes de contaminação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Cryptosporidium* spp

2.1.1 Histórico

O parasita *Cryptosporidium* foi descrito pela primeira vez em 1907 por Tyzzer em glândulas gástricas de camundongos de laboratório. Posteriormente, em 1910, o mesmo autor descreveu o parasita com maiores detalhes e citou a semelhança deste ao grupo das gregarinas, mas caracterizando-o como coccídeo intracelular extra citoplasmático. Mesmo com a primeira descrição em 1907, somente em 1955 foi considerado como agente causador de diarreia ao ser associado como causa desta doença em perus (SLAVIN, 1955).

A primeira descrição em bovinos foi realizada por Panciera et al. (1971), que observaram diferentes estágios de desenvolvimento de *Cryptosporidium* nos microvilos do epitélio jejunal de uma fêmea de oito meses de vida com histórico de anorexia e diarreia crônica. Porém o impacto do *Cryptosporidium* como causa primária de doença foi negligenciada até ser descrita como fator primário em surtos de diarreia em animais de produção (TZIPORI et al. 1980). Desde então a criptosporidiose é considerada causa de diarreia nos bovinos, com o *C. parvum* sendo comumente encontrado nas fezes destes animais nas primeiras semanas de vida (RADOSTITS et al., 2000; SILVERLÅS et al., 2013).

Com o surgimento de pacientes com imunodeficiência causado pelo HIV a ocorrência deste parasita tomou maior interesse por causar grave doença nestes pacientes, além de acometer crianças com menos de cinco anos de idade e pessoas imunocompetentes (NIME et al., 1976; MEISEL et al., 1976).

Em búfalos a primeira descrição de *Cryptosporidium* foi realizada na Itália por Canestri-Trotti, Quesada (1983) e no Brasil por Araújo et al. (1996) que avaliaram a ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp. em 120 amostras fecais de bubalinos da região do Amapá, por meio da técnica de Sheather, constatando a presença de oocistos em 10% (12/120) das amostras. A identificação da espécie foi baseada em critérios morfométricos classificando os oocistos como *C. parvum* e *C. muris*.

A análise molecular de *Cryptosporidium* spp. foi pioneiramente realizada por Gómez-Couso et al. (2005) na Espanha, que observaram infecção em uma novilha bubalina.

Posteriormente foi descrito em diversos outros países e atualmente, tem sido objeto de estudo em bubalinos em diversas regiões do mundo (ABEYWARDENA et al., 2014; AQUINO et al., 2015; MA et al., 2015; IBRAHIM et al., 2016).

2.2.2 Classificação e Taxonomia

O gênero *Cryptosporidium* pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoasida, subclasse Coccidiasina, ordem Eucoccidiorida, subordem Eimeriorina e família Cryptosporidiidae (ADL et al., 2005; FAYER, 2008). Porém, Carreno et al. (1999), Barta, Thompson (2006) e Kuo et al. (2008) sugeriram que *Cryptosporidium* é geneticamente mais próximo da classe das Gregarinas, devido a existência de estágios extracelulares no ciclo biológico do *Cryptosporidium andersoni*, bem como, a sua multiplicação em meios de cultura livre de células (HIJJAWI et al., 2002).

A classificação de *Cryptosporidium* no filo Apicomplexa vem sendo questionado, desde 1910 Tyzzer relatava a semelhança deste parasita ao grupo das gregarinas. Ao analisar sequências genéticas foi observado que o *Cryptosporidium* não possui relação genética próxima dos outros parasitas apicomplexas (JOHNSON et al., 1990; CAI et al., 1992). E segundo Berto et al. (2014) trata-se de um parasita com características semelhantes tanto as gregarinas quanto aos coccídeos superiores, podendo se apresentar como um grupo distinto entre gregarinas e coccídeos (BARTA et al., 2012).

A partir das classificações atuais Ryan et al. (2014) descrevem 27 espécies de *Cryptosporidium* e 40 genótipos existentes, e entre as espécies de observadas em ruminantes são elencados *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. ryanae*, *C. xiaoi* e *C. ubiquitum*. Entre estas, *C. parvum* é considerada a espécie de maior importância por ser zoonótica, porém *C. ubiquitum* já foi relatado parasitando humanos e animais (LI et al., 2014). Desta forma os animais de produção são considerados as maiores reservas de espécies e genótipos zoonóticos (XIAO, 2010).

Dentro da caracterização do *C. parvum* somente alguns subtipos são considerados zoonóticos, os responsáveis por este caráter são os IIA e IID, parasitando tanto humanos quanto ruminantes (XIAO, 2010). Segundo Diaz et al. (2010) e Quilez et al. (2013), na Espanha, o subtipo IIA parasita preferencialmente bezerros enquanto o IID infectam com maior frequência cordeiros e cabritos.

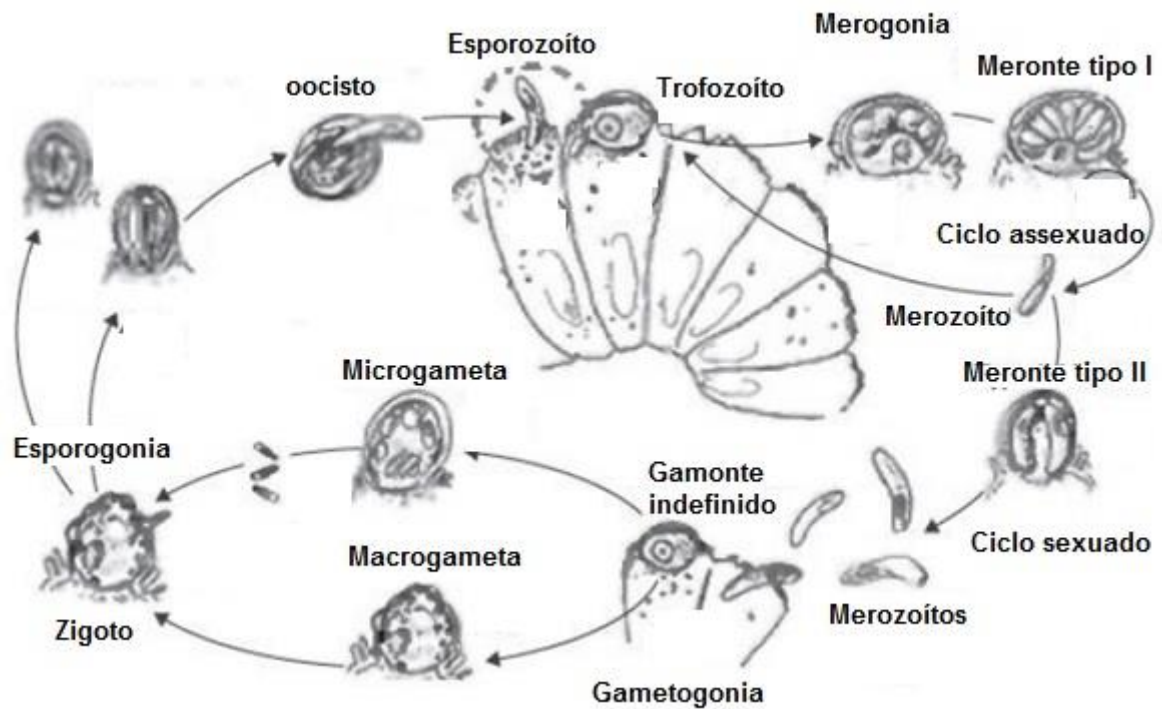
Para *C. ryanae* a classificação ocorreu por Fayer et al. (2008), com a inoculação experimental e caracterização molecular e morfológica. Os oocistos de *C. ryanae* são morfológicamente distintos dos demais observados em mamíferos por apresentar o menor tamanho e três *locus* independentes das demais espécies descritas.

2.2.3 Ciclo Biológico e Patogenia

Cryptosporidium é capaz de se desenvolver nas células epiteliais do trato gastrointestinal e respiratório de animais vertebrados (XIAO et al., 2004). A transmissão pode ocorrer de forma zooantroponótica, antropozoonótica, entre humanos e entre os animais, de forma indireta por meio de alimentos e água contaminados com oocistos e de forma direta pelo contato entre os indivíduos (SMITH et al., 2006; WIDMER et al., 2012; MAIKAI; BABA-ONOJA; ELISHA, 2013; RYAN et al., 2014).

O ciclo inicia com a ingestão de oocistos e após a excitação, os quatro esporozoítos são liberados no intestino e invadem as células epiteliais. Após a invasão o parasita se localiza de forma intracelular extra citoplasmática, na superfície das microvilosidades das células. O processo de reprodução assexuada é a primeira fase do ciclo com formação de duas gerações sucessivas de merontes liberando oito e quatro merozoítos, respectivamente. Os merozoítos liberados da segunda merogonia irão formar os micro e macro gamontes, fase sexuada do ciclo, que após a fecundação formarão o zigoto. Após ocorrer duas divisões, o zigoto completa o ciclo formando o oocisto com parede dupla. Os oocistos sofrem uma multiplicação assexuada, a esporulação, e dentro de cada oocisto formam-se quatro esporozoítos, sem presença de esporocistos. Os oocistos infectantes eliminados são resistentes às condições ambientais, garantindo desta forma a continuidade do ciclo em novos hospedeiros. São formados dois tipos de oocistos os de parede fina, responsáveis pela autoinfecção do hospedeiro (cerca de 20% dos oocistos produzidos) e os de parede espessa, liberados nas fezes, altamente resistentes (equivalente a 80% do total) (Figura 1).

Figura 1. Ciclo biológico do *Cryptosporidium* spp.



Fonte: adaptado de RYAN, XIAO, 2009.

A manifestação clínica da critosporidiose é marcada por acentuada diarreia nos animais. As formas de replicação entérica do parasita deslocam os microvilos e causam eventualmente perda do epitélio superficial, esta provoca acentuada diminuição e fusão das vilosidades e alongamento das criptas devido à aceleração da divisão celular para compensar a perda celular. A combinação entre a perda da borda e altura das vilosidades diminui a capacidade de absorção, diminuindo a absorção de fluidos, eletrólitos e nutrientes a partir do lúmen do intestino. A perda de enzimas digestivas ligadas à membrana contribui para marcada má digestão e da má absorção (TZIPORI; WARD, 2002).

2.2.4 Diagnóstico Molecular

O diagnóstico molecular está baseado nas ferramentas moleculares capazes de identificar material genético de *Cryptosporidium* spp. por meio de diferentes técnicas, que são categorizadas em genotipagem, subtipagem, tipagem multilocus e genômica comparativa (RYAN et. al., 2014)

Para a genotipagem, uma das técnicas mais utilizadas é a PCR-RFLP, que para ruminantes utiliza-se das enzimas de restrição SspI e MboII. Neste caso, o produto da PCR é clivado e apresenta um padrão distinto de bandas de acordo com a espécie presente. *C. parvum* quando clivado pela enzima MboII apresenta *amplicons* com 771 e 76 pares de bases, enquanto *C. ryanae* possui 574, 185 e 76 pares de bases (FENG et al., 2007).

A subtipagem é mais utilizada para espécies zoonóticas de *Cryptosporidium*, com análise da sequência do gene gp60. São avaliadas as repetições dos trios de nucleotídeos TCA, TCG ou TCT da porção final 5' (RYAN et al., 2014). Assim *C. parvum* recebe a denominação da subfamília como “II” com variações IIa, IIb, IIc e assim por diante de acordo com sequências já descritas e catalogadas em bancos de dados de acesso público, como GenBank, desta forma o subtipo é classificado com o número e letra atribuído seguido das repetições das trios de nucleotídeos.

2.3 *Cryptosporidium* em Búfalos

Em animais de produção a criptosporidiose apresenta grande importância tanto pelas perdas econômicas ocasionadas por esta infecção, quanto pelo potencial zoonótico que algumas espécies apresentam (OLSON et al., 2004). Particularmente sob este último aspecto, os bovinos neonatos são identificados como os maiores reservatórios de espécies de *Cryptosporidium* (PLUTZER; KARANIS, 2009; XIAO, 2010).

A idade dos búfalos, assim como para os bovinos, pode ser fator relevante na infecção parasitária. Mamun et al. (2011) relatam que búfalos jovens são 1,30 vezes mais suscetíveis a infecção do que búfalos adultos. Ao avaliar fezes de 179 bezerros de búfalos e 359 adultos, Amer et al. (2013) obtiveram 9,5% de positividade nos bezerros e nenhum animal positivo entre os adultos. Uma porcentagem maior em animais jovens foi relatada, também, por Ibrahim et al. (2016), animais com menos de dois meses de idade obtiveram 17,7% (8/45) de positividade, enquanto os animais com dois meses a um ano 10,9% (6/55) e os com mais de um ano de idade apresentaram somente 6,7% (2/30). Ainda com relação à idade, búfalos de pré desmame apresentaram prevalência de 80% enquanto os animais de pós desmame 28,8% (MA et al., 2015).

Espera-se que sejam observadas espécies de *Cryptosporidium* semelhantes entre bovinos e búfalos, todavia o padrão molecular distinto tem sido descrito (GÓMEZ-COUSO et al., 2005). Em bovinos pré desmame *C. parvum* é a principal espécie identificada, porém nos bezerros desmamados *C. bovis* e *C. ryanae* são as espécies mais encontradas

(SANTÍN et al., 2004), sendo estas últimas mais comumente identificadas em bovinos assintomáticos (SANTÍN et al., 2008). E búfalos, genótipos com 99% de similaridade a *C. ryanae* tem sido descrito com maior frequência do que outras espécies de *Cryptosporidium* (FENG et al., 2012; AMER et al., 2013).

As frequências e as espécies de *Cryptosporidium* spp em bubalinos no Brasil e algumas regiões do mundo podem diferir conforme apresentado no Quadro 1. Na primeira descrição molecular de *Cryptosporidium* em búfalos no Brasil, Aquino et al. (2015) obtiveram 48,2% de positividade, sendo *C. ryanae* a espécie mais frequente enquanto Condoleo et al. (2007), na Itália, constataram uma ocorrência de 14,7% (51/347) de coproantígenos em animais assintomáticos com idade entre uma a nove semanas, em 90 propriedades rurais e uma associação positiva entre a infecção e o número elevado de búfalos (>100) na propriedade.

Entre as espécies descritas em fezes de búfalos estão *C. parvum*, *C. ryanae*, *C. bovis* e *C. suis*. A espécie *C. ryanae* tem sido descrita frequentemente (FENG et al., 2012; ABEYWARDENA et al., 2013; AMER et al., 2013; ABEYWARDENA et al., 2014; MA et al., 2015), bem como, *C. parvum* de caráter zoonótico, portanto, esses animais podem ser considerados fonte de contaminação ambiental e infecção humana e animal (ABEYWARDENA et al., 2013; AMER et al., 2013; AQUINO et al., 2015; ZAHEDI et al., 2015; IBRAHIM et al., 2016).

Tabela 1. Ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* em búfalos de acordo com a técnica diagnóstica utilizada e localização geográfica.

Espécies	Número de animais examinados	% de positividade	Técnica	Local	Autor
-	120	10%	Sheather	Brasil	Araujo et al., 1996
-	341	0%	IFA	Espanha	Gomez-Couso et. al, 2005
-	347	14,7 %	ELISA	Itália	Condoleo et. al, 2007
<i>C. parvum</i> (6)	57	14%	IFA e PCR 18S	Itália	Cacciò et.al, 2007
-	347	14,7%	ELISA	Itália	Rinaldi et. al, 2007a
-	117	19,8%	ELISA	Itália	Rinaldi et. al, 2007b
-	250	24%	Ziehl-Neelsen	Paquistão	Nasir et. al, 2009
<i>C. ryanae</i> (16)	81	37%	Ziehl-Neelsen RFLP 18S gp60	Nepal	Feng et. al, 2012
<i>C. parvum</i> (2) <i>C. bovis</i> (1) semelhante a <i>C. ryanae</i> (54) semelhante a <i>C. suis</i> (1)	476	13%	PCR 18S	Austrália	Abeywardena et. al, 2013
<i>C. ryanae</i> (10) <i>C. parvum</i> (5)	179	9,5%	Sheather e PCR 18S	Egito	Amer et. al, 2013
-	253	2,37%	Concentração formol-éter modificado, coloração fucsina carbólica	Brasil	Destro et al., 2014
-	297	9,8%	PCR 18S	SriLanka	Abeywardena et. al, 2014
<i>C. bovis</i> (7) <i>C. ryanae</i> (33)	181	23,8%	PCR 18S	China	Ma et. al, 2015
<i>C. parvum</i> (4) <i>C. bovis</i> (1)	50	30%	PCR 18S	Austrália	Zahedi et. al, 2015
<i>C. parvum</i> (2) <i>C. bovis</i> (2)	50	12%	PCR 18S	Austrália	Zahedi et. al, 2015
<i>C. ryanae</i> (60) <i>C. parvum</i> (1) <i>C. suis</i> (2)	222	48,2%	PCR 18S	Brasil	Aquino et al., 2015
<i>C. parvum</i> (4)	130	12,3%	Ziehl-Neelsen e PCR COWP gp60	Egito	Ibrahim et. al, 2016

3 REFERENCIAS

ABEYWARDENA, H.; JEX, A. R.; SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. VON; HAYDON, S. R.; STEVENS, M. A.; GASSER, R. B. First molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* from *Bubalus bubalis* (water buffalo) in Victoria, Australia. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 20, p. 96-102, 2013.

ABEYWARDENA, H.; JEX, A. R.; KOEHLER, A. V.; RAJAPAKSE, R. J.; UDAYAWARNA, K.; HAYDON, S. R.; STEVENS, M. A.; GASSER, R. B. First molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from bovines (*Bos taurus* and *Bubalus bubalis*) in Sri Lanka: unexpected absence of *C. parvum* from pre-weaned calves. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 75, p. 1-10, 2014.

ADL, S. M. et al. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 399-451, 2005.

AQUINO, M. C. C.; WIDMER, G.; ZUCATTO, A. S.; VIOL, M. A.; INÁCIO, S. V.; NAKAMURA, A. A.; COELHO, W. M. D.; PERRI, S. H. V.; MEIRELES, M. V.; BRESCIANI, K. D. S. First Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp. Infecting Buffalo Calves in Brazil. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 657-661, 2015.

AMER, S.; ZIDAN, S.; FENG, Y.; ADAMU, H., LI, N.; XIAO, L. Identity and public health potential of *Cryptosporidium* spp. in water buffalo calves in Egypt. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 191, n. 1-2, p. 123-127, 2013.

ARAÚJO, F. A. P.; PAIVA, M. G. S.; ANTUNES, R. L.; CHAPLIN, E. L.; SILVA, N. R. S. Ocorrência de *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium muris* em búfalos (*Bubalus bubalis*) no Estado do Amapá, Brasil. **Arquivos da Faculdade de Medicina Veterinária, Rio Grande do Sul**, v. 24, n. 1, p. 85-90, 1996.

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

BARTA, J. R.; OGEDENGBE, J. D.; MARTIN, D. S.; SMITH, T. G. Phylogenetic position of the adeleorinid coccidia (Myzozoa, Apicomplexa, Coccidia, Eucoccidiorida, Adeleorina) inferred using 18S rDNA sequences. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 171-180, 2012.

BERTO, B.P.; McINTOSH, D.; LOPES, C. W. G. Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 1, 2014.

BERNARDES O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 293-299, 2007.

CACCIÓ, S. M.; RINALDI, L.; CRINGOLI, G.; CONDOLEO, R.; POZIO, E. Molecular identification of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in the Italian water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Veterinary Parasitology**, v. 150, n. 1-2, p. 146-149, 2007.

CAI, J.; COLLINS, M. D.; McDONALD, V.; THOMPSON, D. E. PCR cloning and nucleotide sequence determination of the 18S rRNA genes and internal transcribed spacer 1 of the protozoan parasites *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium muris*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1131, n. 3, p. 317-320, 1992.

CANESTRI-TROTTI, G.; QUESADA, A. First report of *Cryptosporidium* sp. in Italian water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Atti de la Societa Italiana di Scienze Veterinarie**, v.37, p. 737-740, 1983.

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

COCKRILL, W. R. O búfalo em ascensão: animal doméstico fundamental, criação, proteção e saúde animal. In: RAMOS, A. A.; VILLARES, J. B.; MOURA, J. C.(Ed.). **Os búfalos**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1981. p. 01-54.

CONDOLEO, R.U.; RINALDI, L.; SARALLI, G.; MORGOGNONE, M.E.; SCHIOPPI, M.; CONDOLEO, R.; MUSELLA, V.; CRINGOLI, G. An updating on *Cryptosporidium parvum* in the water buffalo. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, n. 2, p. 917-919, 2007.

CURRENT, W. L.; GARCIA, L. S. Criptosporidiosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, n. 3, p. 325-358, 1991.

DESTRO, K. C.; VIANA, R. B.; BENIGNO, R. N. M.; CHAVES, L. C. S.; PEREIRA, W. L. A. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em bezerros bubalinos no estado do Pará. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n.4, p. 368-371, 2014.

DÍAZ, P.; QUÍLEZ, J.; CHALMERS, R. M.; PANADERO, R.; LÓPEZ, C.; SÁNCHEZ-ACEDO, C.; MORRONGO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P. Genotype and subtype analysis of *Cryptosporidium* isolates from calves and lambs in Galicia (NW Spain). **Parasitology**, v. 137, n. 8, p. 1187-1193, 2010.

DUBEY, J. P.; WOUUDA, W.; MUSKENS, J. Fatal Intestinal Coccidiosis in a Three-Week-Old Buffalo Calf (*Bubalus bubalus*). **Journal of Parasitology**, v. 94, n. 6, p. 1289-1294, 2008.

EFSTRATIOU, A.; ONGERTH, J. E.; KARANIS, P. Waterborn transmission of protozoa parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011-2016. **Water Research**, v. 114, p. 14-22, 2017.

FAYER, R.; SANTIN, M.; TROUT, J. M. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). **Veterinary Parasitology**, v. 156, n. 1, p. 191-198, Outubro 2008.

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

FENG, Y.; ORTEGA, Y.; HE, G.; DAS, P.; XU, M.; ZHANG, X.; FAYER, R.; GATEI, W.; CAMA, V.; XIAO, L. Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and deer-like genotype in bovines. **Veterinary Parasitology**, v. 144, n. 1-2, p. 1-9, 2007.

FENG, Y.; KARNA, S. R.; DEAREN, T. K.; SINGH, D. K.; ADHIKARI, L. N.; SHRESTHA, A.; XIAO, L. Common occurrence of a unique *Cryptosporidium ryanae* variant in zebu cattle and water buffaloes in the buffer zone of the Chitwan National Park, Nepal. **Veterinary Parasitology**, v. 185, n. 2-4, p. 309-314, 2012.

GOMÉZ-COUSO, H.; AMAR, C. F.; MCLAUCHLIN, J.; ARES-MAZAS, E. Characterisation of a *Cryptosporidium* isolate from water buffalo (*Bubalus bubalis*) by sequencing of a fragment of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene (COWP). **Veterinary Parasitology**, v. 131, n. 1-2, p. 139-144, 2005.

HELMY, Y. A.; KRÜCKEN, J.; NÖCKLER, K.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; ZESSIN, K. H. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in livestock animals and humans in the Ismailia province of Egypt. **Veterinary Parasitology**, v. 193, n. 1-3, p. 15-24, 2013.

HIJJAWI, N. S. et al. Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 14, p. 1719-1726, 2002.

IBGE. Produção da Pecuária Municipal, Rio de Janeiro, v. 41, p. 1-108, 2013.

IBGE. Produção da Pecuária Municipal, Rio de Janeiro, v. 42, p. 1-39, 2014.

IBRAHIM, M. A.; ABDEL-GHANY, A. E.; ABDEL-LATEF, G. K.; ABDEL-AZIZ, S. A.; ABOELHADID, S. M. Epidemiology and public health significance of *Cryptosporidium* isolated from cattle, buffaloes, and humans in Egypt. **Parasitology Research**, v. 115, n. 6, p. 2439-2448, 2016.

JOHNSON, A. M.; FIELKE, R.; LUMB, R.; BAVERSTOCK, P.R. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* determined by ribosomal RNA sequence comparasion. **International Journal for Parasitology**, v. 20, n. 2, p. 141-147, 1990.

JORGE, A. M. Produção de Carne Bubalina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 2, p. 84-95, 2005.

KUO, C. H.; WARES, J. P.; KISSINGER, J. C. The apicomplexan whole-genome phylogeny: an analysis of incongruence among gene trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, n. 12, p. 2689-2698, 2008.

LAÚ, H. D. **Doenças em búfalos no Brasil – Diagnóstico, epidemiologia e controle**. Belém: Embrapa, 1999. 202p.

LI, N.; XIAO, L.; ALDERISIO, K.; ELWIN, K.; CEBELINSKI, E.; CHALMERS, R. SANTIN, M.; FAYER, R.; KVAC, M.; RYAN, U.; SAK, B.; STANKO, M.; GUO, Y.; WANG, L.; ZHANG, L.; CAI, J.; ROELLIG, D.; FENG, Y. Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum*, a Zoonotic Pathogen Emerging in Humans. **Emerging Infectious Diseases journal**, v. 20, n.2, p. 217-224, 2014.

MA, J.; LI, P.; ZHAO, X.; XU, H.; WU, W.; WANG, Y.; GUO, Y.; WANG, L.; FENG, Y.; XIAO, L. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Enterocytozoon bieneusi* in dairy cattle, beef cattle and water buffaloes in China. **Veterinary Parasitology**, v. 207, n. 3-4, p. 220-227, 2015.

MAIKAI, B. V.; BABA-ONOJA, E. B. T.; ELISHA I. A. Contamination of Fresh Vegetables with *Cryptosporidium* oocysts in markets within Zaria metropolis. **Food Control - Journal**, v. 31, n. 1, p. 45-48, 2013.

MAMUN, M. A. A.; BEGUM, N.; MONDAL, M. M. H. A coprological survey of gastrointestinal parasites of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Kurigram district of Bangladesh. **Journal of the Bangladesh Agricultural University**, v. 9, n.1, p. 103-109, 2011.

MEISEL, J. L.; PERERA, D. R.; RUBIN, C. E. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. **Gastroenterology**, v. 70, n. 6, p. 1156-1160, 1976.

NASIR, A.; AVAIS, M.; KHAN, M. S.; AHMAD, N. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* Infection in Lahore (Pakistan) and its Association with Diarrhea in Dairy Calves. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 11, n. 2, p. 221-224, 2009.

NIME, F. A.; BUREK, J. D.; HOLSCHER, M. A.; YARDLEY, J. H. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. **Gastroenterology**, v. 70, n. 4, p. 592–598, 1976.

OLSON, M. E.; O'HANDLEY, R. M.; RALSTON, B. J.; MCALLISTER, T. A.; THOMPSON, R. C. A. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 4, p. 185-191, 2004.

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

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

QUÍLEZ, J.; VERGARA-CASTIBLANCO, C.; MONTEAGUDO, L.; del CACHO, E.; SÁNCHEZ-ACEDO, C. Host Association of *Cryptosporidium parvum* Populations Infecting Domestic Ruminants in Spain. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, n.17, p. 5363-5371, 2013.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Doenças causadas pelos protozoários. In: Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p. 1176-1180.

RIBEIRO, M. G.; LANGONI, H.; JEREZ, J. A.; LEITE, D. S.; FERREIRA, F; GENNARI, S. M. Identification of enteropathogens from buffalo calves with and without diarrhoea in the Ribeira Valley, State of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 159-165, 2000.

RINALDI, L.; MUSELLA, V.; CONDELEO, R.; SARALLI, G.; VENEZIANO, V.; BRUNI, G.; CONDOLEO, R. U.; CRINGOLI, G. *Giardia* and *Cryptosporidium* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Parasitology Research**, v.100, n. 5, p. 1113-1118, 2007a.

RINALDI, L.; CONDOLEO, R. U.; CONDOLEO, R.; SARALLI, G.; BRUNI, G.; CRINGOLI, G. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water Buffaloes (*Bubalus bubalis*) of the Italian Mediterranean Bred. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 1, p. 253-255, 2007b.

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

SANTÍN, M.; TROUT, J. M.; XIAO, L.; ZHOU, L.; GREINER, E.; FAYER, R. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. **Veterinary Parasitology**, v. 122, n. 2, p. 103-117, 2004.

SANTÍN, M.; TROUT, J. M.; FAYER, R. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. **Veterinary Parasitology**, v. 155, n. 1-2, p. 15-23, 2008.

SILVA, M. s. T.; et al. Programa de incentivo a criação de búfalos por pequenos produtores – PRONAF. Pará, agosto de 2003. Disponível em: www.cpatu.br/bufalo

SILVERLÅS, C.; REINECK, H. B.; NÄSLUND, K.; BJÖRKMAN, C. Is there a need for improved *Cryptosporidium* diagnostics in Swedish calves? **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 2, p. 155-161, 2013.

SHOULTZ, D. A.; de HOSTOS, E. L.; CHOY, R. K. M. Addressing *Cryptosporidium* infection in among young children in low-income settings: The crucial role of new and existing drugs for reducing morbidity and mortality. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n.1, p. 1-7, 2016.

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

SMITH, H. V.; CACCIÒ, S. M.; TAIT, A.; McLAUHLIN, J.; THOMPSON, R. C. A. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 4, p. 160-167, 2006.

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

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

TYZZER, E. E. An Extracellular Coccidium, *Cryptosporidium muris* (Gen. Et Sp. Nov.), of the Gastric Glands of the Common Mouse. **Journal of Medical Research**, v. 23, p. 487-509, 1910.

TZIPORI, S.; ANGUS, K. W.; CAMPBELL, I.; GRAY, E. W. *Cryptosporidium*: Evidence a Single-Species Genus. **Infection and Immunity**, v. 30, n. 3, p. 884-886, 1980.

TZIPORI, S.; WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 10, p. 1047-1058, 2002.

VASCONCELOS, A.T.C. **Búfalos no Maranhão**. 1ª Edição, São Luís: copyrigt editora, 2012, 160 p.

VENU, R.; LATHA, B. R.; ABDUL BASITH, S.; DHINAKAR RAJ, G.; SREEKUMAR, S.; RAMAN, M. Molecular prevalence of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves in Southern states of India. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 1-2, p. 19-24, 2012.

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

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

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

WIDMER, G.; SULLIVAN, S. Genomics and population biology of *Cryptosporidium* species. **Parasite Immunology**, v. 34, n. 2-3, p. 61-71, 2012.

ZAHEDI, A.; PHASEY, J.; BOLAND, T.; RYAN, U. First report of *Cryptosporidium* species in farmed and wild buffalo from the Northern Territory, Australia. **Parasitology Research**, v. 115, n. 3, p. 1349-1353, 2015.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Determinar a ocorrência e caracterizar molecularmente *Cryptosporidium* spp. em bezerros bubalinos (*Bubalus bubalis*) da região da Baixada Maranhense, Brasil.

4.2 Objetivos Específicos

Detectar por meio da nested PCR baseada no gene 18S rRNA *Cryptosporidium* em fezes de bezerros bubalinos.

Identificar as espécies e avaliar filogeneticamente o distanciamento entre as sequências obtidas.

5 ARTIGO

PRIMEIRA IDENTIFICAÇÃO DE *Cryptosporidium parvum* subtipo IIaA20G1R1 EM BEZERROS BUBALINOS DO BRASIL

FIRST IDENTIFICATION OF *Cryptosporidium parvum* subtype IIaA20G1R1 IN BUFFALO CALVES FROM BRAZIL

RESUMO

O *Cryptosporidium* é o agente primário de importante zoonose de distribuição mundial. Em búfalos, a identificação deste parasita foi realizada em diferentes faixas etárias e podem ou não estar associados a quadros de diarreia. Entre as espécies já descritas no Brasil e no mundo se encontram *Cryptosporidium parvum*, *C. ryanae*, *C. bovis* e *C. suis*. O presente estudo teve por objetivo caracterizar molecularmente *Cryptosporidium* de búfalos em quatro propriedades leiteiras da região da Baixada Maranhense, Brasil. Foram avaliadas 122 amostras de fezes não diarreicas de animais na faixa etária de 0 a 12 meses de ambos os sexos, das raças murrâh, mediterrâneo e jafarabadi. Por meio da técnica de *nested* PCR 18S rRNA, RFLP e sequenciamento genético, foi observado uma ocorrência de 13,11% (16/122) de amostras positivas. Destas, por meio da RFLP, 15 amostras apresentaram padrões de *C. ryanae* e uma de *C. parvum*. A amostra identificada como *C. parvum* foi submetida a *nested* PCR do gene gp60 e posterior sequenciamento genético para subtipagem. As amostras com qualidade de sequenciamento foram identificadas como *C. ryanae* (quatro amostras) e *C. parvum* subtipo IIaA20G1R1 (uma amostra), sendo esta é a primeira identificação do subtipo IIaA20G1R1 no Brasil. A presença deste parasita em fezes não diarreicas alerta para a importância deste animal como fonte de infecção e manutenção do parasita no ambiente.

Palavras-chave: *nested*-PCR, criptosporidiose, *Cryptosporidium ryanae*, *Cryptosporidium parvum*, diagnóstico molecular.

ABSTRACT

Cryptosporidium is the primary agent of important worldwide distribution zoonosis, cryptosporidiosis. In buffaloes, the identification of this parasite was performed in different age groups and may or may not be associated with diarrhea with prevalences between 0 and 37%. Among the species already described in Brazil and in the world are *C. parvum*, *C. ryanae*, *C. bovis* and *C. suis*. In this way the present study had the objective of evaluating the occurrence and molecular characterization of buffalo *Cryptosporidium* spp. in four properties of the region of Baixada Maranhense, Brazil. Were evaluated 122 samples of non-diarrheal feces from animals aged 0 to 12 months of male and female. Through the technique of nested PCR 18S rRNA, RFLP and genetic sequencing. An occurrence of 13.11% (16/122) of positive samples was observed. Of these, through RFLP, 15 samples presented patterns of *C. ryanae* and one of *C. parvum*. The sample identified as *C. parvum* was submitted to nested PCR of the gp60 gene and subsequent genetic sequencing for subtyping. Samples with sequencing quality were identified as *C. ryanae* (four samples) and *C. parvum* subtype IIaA20G1R1 (one sample). This is the first identification of the IIaA20G1R1 subtype in Brazil. The presence of this parasite in non-diarrheal feces alerts to the importance of this animal as a source of infection and maintenance of the parasite in the environment.

Key words: nested-PCR, cryptosporidiosis, *Cryptosporidium ryanae*, *Cryptosporidium parvum*, molecular diagnosis.

5.1 Introdução

Cryptosporidium spp. é um gênero do filo Apicomplexa capaz de infectar uma grande variedade de espécies animais incluindo os seres humanos (CACCIÓ et al., 2005), entre as espécies deste parasita que são consideradas zoonóticas estão descritas, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. felis*, *C. muris*, *C. suis* (XIAO, 2010). Dentre estes, *C. parvum* assume um papel relevante na epidemiologia da doença em humanos devido a sua grande frequência de excreção em fezes de animais (DUFOUR et al., 2012). É causa de surtos em humanos em diversas regiões do mundo e considerado o mais frequente protozoário em surtos de transmissão hídrica, responsável por 239 surtos entre os anos de 2011 e 2016 (EFSTRATIOU; ONGERTH; KARANIS, 2017).

A capacidade dos bubalinos em produzir e se reproduzir em locais onde outras espécies de ruminantes não tem apresentado índices zootécnicos satisfatórios (JORGE, 2005), faz com que estes animais desempenhem uma relevante função na economia de diversos países principalmente na Ásia e América do Sul (DUBEY, 2008). Assim no Brasil ocorreu um crescimento substancial neste rebanho, 5,6% entre os anos de 2012 e 2013 (IBGE, 2013), com um efetivo de bubalinos é de 1,37 milhão de cabeças (IBGE, 2015), com o estado do Maranhão apresentando o maior rebanho da região Nordeste com 67,75%, distribuídos pelas cinco mesorregiões (IBGE, 2015).

A criptosporidiose tem apresentado grande importância em animais de produção, tanto pelo potencial zoonótico de algumas espécies, como também pela perda econômica ocasionada por esta infecção (OLSON et al., 2004). São escassos os números de estudos relacionados à classificação molecular de *Cryptosporidium* em bubalinos, no entanto, alguns autores têm identificado *C. parvum* (GOMÉZ-COUSO et al., 2005; CACCIÓ et al., 2007; FENG et al., 2012; AQUINO et al., 2015), *Cryptosporidium* genótipo suíno (AQUINO et al., 2015), *C. ryanae* (AMER et al., 2013; AQUINO et al., 2015) e *C. bovis* (HELMY et al., 2013; ABEYWARDENA et al., 2014; MA et al., 2015). Na primeira descrição molecular de *Cryptosporidium* em búfalos no Brasil, Aquino et al. (2015) obtiveram 48,2% de positividade, sendo *C. ryanae* a espécie mais frequente. Em outras regiões, como Egito e Nepal, essa espécie também tem sido descrita em búfalos (FENG et al., 2012; AMER et al., 2013).

Desta forma, estudos para caracterização molecular de *Cryptosporidium* são fundamentais para o conhecimento da epidemiologia desse parasita em bubalinos. Assim, o presente trabalho teve como objetivos determinar a ocorrência *Cryptosporidium* spp. em

bezerros de búfalos e identificar por meio de RFLP sequenciamento genético as espécies presentes.

5.2 MATERIAL DE MÉTODOS

5.2.1 Local de Estudo

As amostras foram obtidas de quatro propriedades, sendo duas em Vitória do Mearim (03° 27' 44" S, 44° 52' 14" W), uma propriedade em Arari (03° 34' 46" S, 44° 39' 29" W) e uma propriedade em Viana (03° 11' 46" S, 45° 00' 19" W), todas na região da Baixada Maranhense, no período de setembro a dezembro de 2014.

Esta região está localizada na mesorregião norte do estado e apresenta aproximadamente seis meses de chuva (janeiro a junho) e campos inundados durante o período chuvoso, sendo a temperatura média mínima de 24° C entre março e julho e a média máxima de 29° C com pico em novembro (EL-ROBRINI; MARQUES; SILVA et al., 2006). É caracterizada como uma planície fluviolagunar, parcialmente coberta por água pluvial e vegetação de pasto (BANDEIRA, 2013).

As propriedades possuem sistemas de criação semi-intensivo, de exploração leiteira e com a raça Murrah predominante nos rebanhos. Somente as propriedades número um e quatro possuíam, também, Mediterrâneo e Jafarabadi, respectivamente.

5.2.2 Amostras

Foram coletadas 122 amostras (66 machos e 56 de fêmeas) de fezes de bezerros bubalinos (*Bubalus bubalis*) de até 12 meses de idade. Destas 54 (28 machos e 26 fêmeas) foram obtidas da propriedade número um, 16 (6 machos e 10 fêmeas) da número dois, 42 (29 machos e 13 fêmeas) da número três e 10 (3 machos e 7 fêmeas) da número quatro.

As amostras foram obtidas diretamente da ampola retal e mantidas em freezer a -20°C até o momento da extração de DNA. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Ensino e Pesquisa do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Maranhão sob o número 23249.018982.2015-73.

5.2.3 Extração de DNA, *nested* PCR e RFLP

Para realização da extração de DNA 50µl de amostra foi adicionado 1mL Tris – EDTA (TE) e centrifugada (4000xg durante 15 minutos). Em seguida o sobrenadante foi descartado e os sedimentos foram submetidos a três ciclos de congelamento/descongelamento, com congelamento a -80°C e aquecimento a 30°C em banho seco. Este material foi submetido à extração de DNA com Kit comercial Nucleospin Tissue® (Macherey – Nagel, Düren, Alemanha).

Os produtos da extração foram submetidos à técnica de *nested* PCR em triplicata para obtenção de um fragmento de 825pb do gene 18S rRNA, com utilização de *primers* específicos para gênero *Cryptosporidium* (XIAO et al., 1999). Para a primeira reação, foram utilizados os *primers*: Fw1: TTCTAGAGCTAATACATGCG e Rv2: CCCATTTTCCTTCGAAACAGGA e para a segunda reação, os *primers* continham as sequências: Fw3: GGAAGGGTTGTATTTATTAGAT e Rv4: AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA.

As reações foram realizadas em um volume de 25 µl contendo: 1 x PCR *buffer*, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 µM de DNTP, 0,2 µM de cada primer, 1,25 U de Platinum Taq (Invitrogen®), 2,5 µl de DNA e H₂O mili-Q estéril. A primeira e segunda reação foram realizadas com ciclos idênticos de tempo e temperatura: 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 repetiram-se 34 vezes antes do passo de extensão final. A visualização do resultado da PCR foi realizada em gel de agarose a 1,5%, corado com SYBR® Safe (DNA Gel Stain; Invitrogen, Brasil), visualizado por luz ultravioleta e foto documentado usando o programa LPix Imagem ST (Loccus Biotecnologia).

As amostras positivas para *Cryptosporidium* spp., foram analisadas quanto ao polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) com as enzimas SspI, AseI e MbolI para a discriminação de espécies (XIAO et al., 1999; FENG et al., 2007). Foram realizadas as reações separadas com 1X NEB® Buffer, 5U de enzima (SspI e MbolI) e 3U (AseI), 5 µl do segundo produto de reação de PCR e água ultrapura até 20 µl. Para as clivagens as suspensões foram mantidas a 37 ° C por uma hora e 65 ° C durante 15 minutos. Os produtos da clivagem foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,5% corado com SyBR Safe® (DNA Gel Stain; Invitrogen, Brasil) e foto documentados. Os padrões de ligação foram comparados com imagens padrão contidas em Cryptodb (<http://www.cryptodb.org>).

Para amostra positiva identificada como *C. parvum* na RFLP foi então realizada a *nested* PCR do gene gp60 (ALVES et al., 2003). Para a primeira reação, foram utilizados os *prímers*: F1: ATAGTCTCCGCTGTATTC e R2: GGAAGGAACGATGTATCT e para a segunda reação, os *prímers* continham as sequências: F3: TCCGCTGTATTCTCAGCC e R4: GCAGAGGAACCAGCATC.

5.2.4 Sequenciamento e construção de árvore filogenética

Os *amplicons* sintetizados durante a *nested*-PCR foram submetidos à purificação por meio do kit comercial PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, São Paulo, Brasil). 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, o que permitiu a construção de sequências consensus que foram comparadas com sequências depositadas no Genbank por meio da ferramenta Blastn, para determinação de espécies.

O alinhamento das sequências foi realizado no software Bioedit Sequence Alignment Editor 7.2.5, incluindo amostras de referência. Por meio dos consensus, com a utilização do software MEGA6 (TAMURA et al., 2013), foi construída a árvore filogenética 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.

5.2.5 Análise estatística

As variáveis estudadas foram avaliadas com o teste de qui-quadrado e adotou-se o nível de significância de 5%, utilizando o Programa OpenEpi 3.03a.

5.3 Resultados

Dos 122 animais analisados, foi observada uma positividade de 13,1% (16 amostras) para *Cryptosporidium* spp. pela técnica de *nested*-PCR do gene 18S rRNA. A positividade nas fêmeas e machos foi de 14,3% e 15,7% respectivamente ($p = 0,93$) e duas propriedades apresentaram animais positivos (propriedade 1 e 3).

As 16 amostras positivas foram submetidas a RFLP e identificadas como *C. ryanae* (15 amostras) e *C. parvum* (uma amostra). A amostra de *C. parvum*, foi submetida a *nested* PCR do gene gp 60 e posterior sequenciamento genético com identificação do subtipo IIaA20G1R1. Das amostras positivas para *C. ryanae* quatro obtiveram índices satisfatórios em quantidade e qualidade de DNA para sequenciamento genético a partir do gene 18S rRNA que se confirmaram como *C. ryanae* com identidade genética de 99% a 100% com amostras depositadas no GenBank.

A concordância dos resultados obtidos nas comparações com a ferramenta Blastn foi possível após a realização das análises filogenéticas das sequências *consensus* e construção das árvores filogenéticas apresentadas nas Figuras 2 e 3. Para *C. ryanae* somente um grupamento de espécies foi formado com todas as amostras agrupando-se com a sequência padrão *C. ryanae* (JN400880.1). A amostra de *C. parvum* se encontra no grupamento com a sequência padrão do subtipo IIaA20G1R1 (KJ158750.1).

Figura 2 – Árvore filogenética de sequências do gene 18S rRNA de *Cryptosporidium* de búfalos (*Bubalus bubalis*) da baixada Maranhense e de outras espécies de *Cryptosporidium* disponíveis no GenBank.

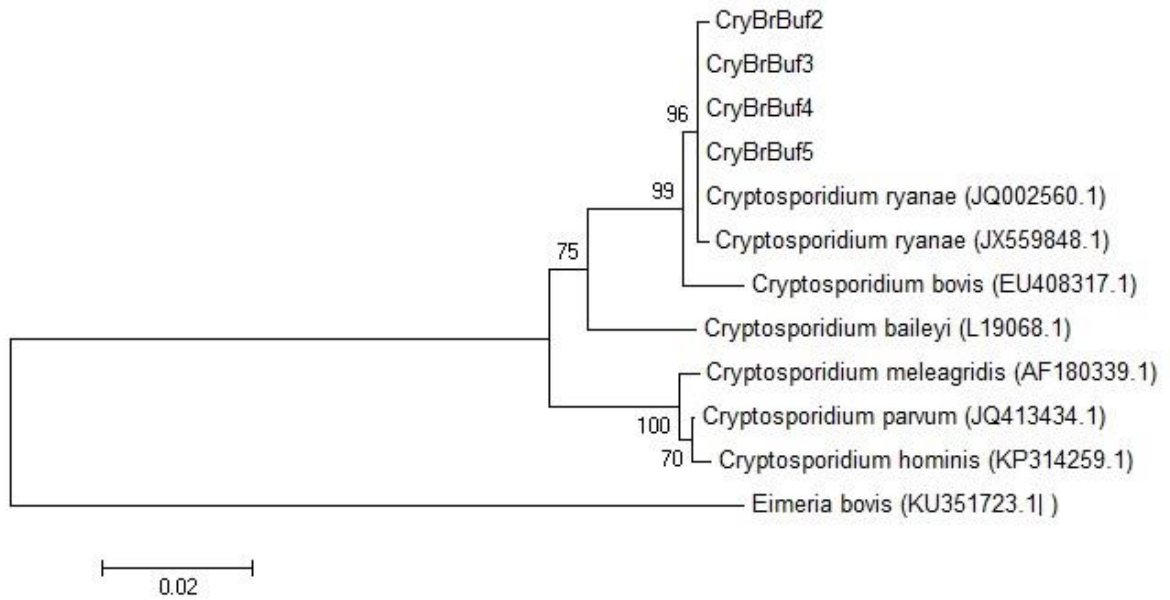
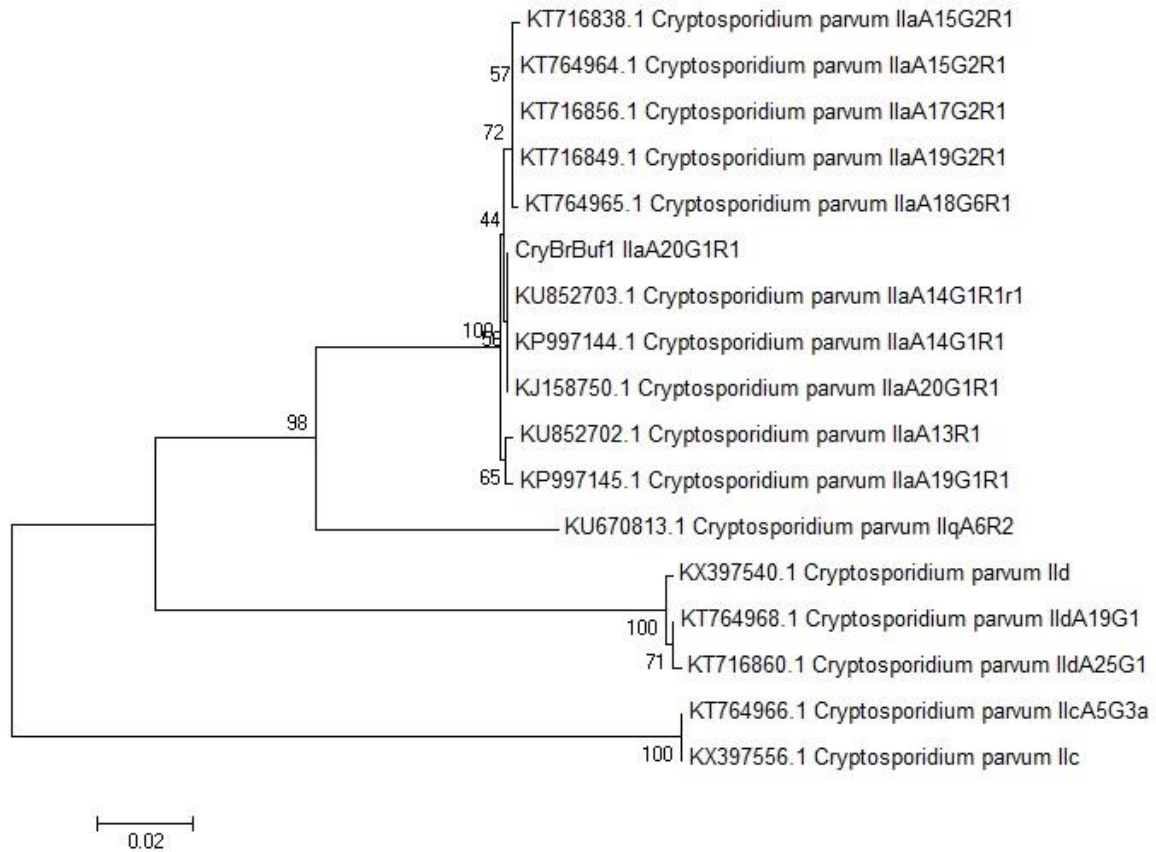


Figura 3 – Árvore filogenética de sequência do gene gp60 de *Cryptosporidium* de búfalo (*Bubalus bubalis*) da baixada Maranhense e de outras espécies de *Cryptosporidium* disponíveis no GenBank.



5.4 Discussão

Estudos de *nested* PCR em búfalos, baseados no gene 18S rRNA, tem apresentado positividade para bezerros de 8,4% no SiriLanka (ABEYWARDENA et al., 2014), 9,5% no Egito (AMER et al., 2013) e 48,2% no Brasil (AQUINO et al., 2015). Para outras técnicas como ELISA, também em bezerros, a porcentagem observada foi de 14%, 14,7% e 19,8% na Itália (CACCIÒ et al., 2007; CONDOLEO et al., 2007; RINALDI et al., 2007). Para IFI foi observado 0% na Espanha (GOMEZ-COUSO et al., 2005) e para coloração de Ziehl-Neelsen as ocorrências encontradas são de 12,3% no Egito (IBRAHIM et al., 2016), 25,6% no Paquistão (NASIR et al., 2009) e 37% no Nepal (FENG et al., 2012), desta forma os resultados acima descritos se encontram dentro das prevalências esperadas.

Assim como as prevalências, as espécies descritas no presente estudo estão entre as relatadas em búfalos no Brasil e em diferentes regiões do mundo. No Brasil, Aquino et al. (2015), avaliando, também, bezerros bubalinos, obtiveram positividade 48,2% (107/222) e

identificação de *C. ryanae* (60 amostras), *C. parvum* (uma amostra) e *C. suis* (duas amostras). Bem como no presente trabalho outros autores tem observado uma maior frequência de *C. ryanae* que outras espécies de *Cryptosporidium* em búfalos (AMER et al., 2013; FENG et al., 2012; AQUINO et al., 2015; MA et al., 2015).

Na Austrália, Abeywardena et al. (2013) e Zahedi et al. (2015) observaram resultados semelhantes ao presente trabalho, com 13% (62/476) e 12% (6/50) de positividade respectivamente. Porém com identificação de *C. bovis*, *C. suis*, *C. parvum* e *C. ryanae* no primeiro trabalho e *C. bovis* e *C. parvum* no segundo. Este resultado pode ser explicado pelo fato dos búfalos estudados no presente trabalho se encontrarem em condições climáticas semelhantes aos estudados por Zahedi et al. (2015) na Austrália.

No presente trabalho a porcentagem de positividade entre machos e fêmeas pode estar relacionado ao fato dos animais compartilharem o mesmo ambiente. Porém machos apresentam um número maior de positividade, sendo este fato também observado por Ibrahim et al. (2016) no Egito. Estes autores obtiveram 14,5% dos positivos (8/55) entre os machos e 10,7% (8/75) entre as fêmeas, com um total 12,3% (16/130) de amostras positivas para *Cryptosporidium*.

A caracterização de *C. parvum* IIAA20G1R1 é a primeira deste subtipo no Brasil, que já foi descrito em bovinos na Servia e Montenegro (MISIC, ABE, 2007), Suécia (SILVERLÅS et al., 2013) e Argentina (TOMAZIC et al., 2013; Del COCO et al., 2014). Este subtipo não apresenta até o momento descrição em humanos, porém a subfamília IIA é relatada como zoonótica (XIAO, 2010).

Desta forma a ocorrência de *Cryptosporidium* em bezerros assintomáticos já relatada em outros trabalhos (NASIR et al., 2009; AQUINO et al., 2015; IBRAHIM et al., 2016) e também descrita no presente estudo, ressalta a importância destes animais para manutenção desta parasitose nos rebanhos, servindo de fonte de infecção para búfalos recém introduzidos no mesmo ambiente. A faixa etária, se mostra como fator relevante já que búfalos jovens são 1,30 vezes mais susceptíveis a infecção do que búfalos adultos (MAMUN et al., 2011).

Assim continuam sendo necessários estudos epidemiológicos e de caracterização molecular das espécies presentes nos búfalos a fim de obter resultados do real potencial destes animais como fonte de contaminação ambiental.

5.4 Conclusão

Este trabalho apresenta a primeira caracterização molecular de *Cryptosporidium* em búfalos da região nordeste do Brasil e a primeira descrição de *C. parvum* subtipo IIaA20G1R1 no Brasil. A ocorrência desta parasitose em animais sem sinais clínicos de diarreia demonstra a importância dos assintomáticos para manutenção deste parasita nos rebanhos.

5.5 Referências

ABEYWARDENA, H.; JEX, A. R.; SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. VON; HAYDON, S. R.; STEVENS, M. A.; GASSER, R. B. First molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* from *Bubalus bubalis* (water buffalo) in Victoria, Australia. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 20, p. 96-102, 2013.

ABEYWARDENA, H.; JEX, A. R.; KOEHLER, A. V.; RAJAPAKSE, R. J.; UDAYAWARNA, K.; HAYDON, S. R.; STEVENS, M. A.; GASSER, R. B. First molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from bovines (*Bos taurus* and *Bubalus bubalis*) in Sri Lanka: unexpected absence of *C. parvum* from pre-weaned calves. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 75, p. 1-10, 2014.

ALVES, M.; XIAO, L.; SULAIMAN, I.; LAL, A. A.; MATOS, O.; ANTUNES, F. Subgenotype Analysis of *Cryptosporidium* Isolates from Humans, Cattle, and Zoo Ruminants in Portugal. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2744-2747, 2003.

AMER, S.; ZIDAN, S.; FENG, Y.; ADAMU, H.; LI, N.; XIAO, L. Identity and public health potential of *Cryptosporidium* spp. in water buffalo calves in Egypt. **Veterinary Parasitology**, v. 191, n. 1-2, p. 123-127, 2013.

AQUINO, M. C. C.; WIDMER, G.; ZUCATTO, A. S.; VIOL, M. A.; INÁCIO, S. V.; NAKAMURA, A. A.; COELHO, W. M. D.; PERRI, S. H. V.; MEIRELES, M. V.; BRESCIANI, K. D. S. First Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp. Infecting Buffalo Calves in Brazil. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 657-661, 2015.

BANDEIRA, I. C. N. Geodiversidade do estado do Maranhão. Programa Geologia do Brasil. Levantamento da Geodiversidade. 294p. 2013. Disponível em: <http://www.terrabrasilis.org.br/ecotecadigital/pdf/geodiversidade-do-estado-do-maranhao.pdf>

CACCIÒ, S. M.; RINALDI, L.; CRINGOLI, G.; CONDOLEO, R.; POZIO, E. Molecular identification of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in the Italian water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Veterinary Parasitology**, v. 150, n. 1-2, p. 146-149, Novembro 2007.

CONDOLEO, R.U.; RINALDI, L.; SARALLI, G.; MORGOGNONE, M.E.; SCHIOPPI, M.; CONDOLEO, R.; MUSELLA, V.; CRINGOLI, G. An updating on *Cryptosporidium parvum* in the water buffalo. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, n. 2, p. 917-919, 2007.

Del COCO, V. F.; CORDÓBA, M. A.; BILBAO, G.; CASTRO, A. P. A.; BASUALDO, J. A.; FAYER, R.; SANTIN, M. *Cryptosporidium parvum* GP60 subtypes in dairy cattle from Buenos Aires, Argentina. **Research in Veterinary Science**, v. 96, n. 2, p. 311-314, 2014.

DUBEY, J. P.; WOUDA, W.; MUSKENS, J. Fatal Intestinal Coccidiosis in a Three-Week-Old Buffalo Calf (*Bubalus bubalus*). **Journal of Parasitology**, v. 94, n. 6, p. 1289-1294, 2008.

DUFOUR, A.; BARTAM, J.; BOS, R.; GANNON, V. **Animal Waste, Water Quality and Human Health**. World Health Organization and IWA Publishing titles, 2012. 476p.

EI-ROBRINI, M.; MARQUES, J. V.; SILVA, M. A. M. A.; EL-ROBRINI, M. H. S.; FEITOSA, A. C.; TAROUÇO, J. E. F.; SANTOS, J. H. S.; VIANA, J. R. Erosão e progradação do litoral brasileiro – Maranhão. 2006. Disponível em: http://www.mma.gov.br/estruturas/sqa_sigercom/_arquivos/ma_erosao.pdf

EFSTRATIOU, A.; ONGERTH, J. E.; KARANIS, P. Waterborn transmission of protozoa parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011-2016. **Water Research**, v. 114, p. 14-22, 2017.

FENG, Y.; ORTEGA, Y.; HE, G.; DAS, P.; XU, M.; ZHANG, X.; FAYER, R.; GATEI, W.; CAMA, V.; XIAO, L. Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and deer-like genotype in bovines. **Veterinary Parasitology**, v. 144, n. 1-2, p. 1-9, 2007.

FENG, Y.; KARNA, S. R.; DEAREN, T. K.; SINGH, D. K.; ADHIKARI, L. N.; SHRESTHA, A.; XIAO, L. Common occurrence of a unique *Cryptosporidium ryanae* variant in zebu cattle and water buffaloes in the buffer zone of the Chitwan National Park, Nepal. **Veterinary Parasitology**, v. 185, n. 2-4, p. 309-314, 2012.

GOMÉZ-COUSO, H.; AMAR, C. F.; MCLAUCHLIN, J.; ARES-MAZAS, E. Characterisation of a *Cryptosporidium* isolate from water buffalo (*Bubalus bubalis*) by sequencing of a fragment

of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene (COWP). **Veterinary Parasitology**, v. 131, n. 1-2, p. 139-144, 2005.

HELMY, Y. A.; KRÜCKEN, J.; NÖCKLER, K.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; ZESSIN, K. H. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in livestock animals and humans in the Ismailia province of Egypt. **Veterinary Parasitology**, v. 193, n. 1-3, p. 15-24, 2013.

IBGE. Produção da Pecuária Municipal, Rio de Janeiro, v. 41, p. 1-108, 2013.

IBGE. Produção da Pecuária Municipal, Rio de Janeiro, v. 43, p. 1-49, 2015.

IBRAHIM, M. A.; ABDEL-GHANY, A. E.; ABDEL-LATEF, G. K.; ABDEL-AZIZ, S. A.; ABOELHADID, S. M. Epidemiology and public health significance of *Cryptosporidium* isolated from cattle, buffaloes, and humans in Egypt. **Parasitology Research**, v. 115, n. 6, p. 2439-2448, 2016.

JORGE, A. M. Produção de Carne Bubalina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 2, p. 84-95, 2005.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v.16, n. 2, p.111-120, 1980.

MA, J.; LI, P.; ZHAO, X.; XU, H.; WU, W.; WANG, Y.; GUO, Y.; WANG, L.; FENG, Y.; XIAO, L. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Enterocytozoon bieneusi* in dairy cattle, beef cattle and water buffaloes in China. **Veterinary Parasitology**, v. 207, n. 3-4, p. 220-227, 2015.

MAMUN, M. A. A.; BEGUN, N.; MONDAL, M. M. H. A coprological survey of gastrointestinal parasites of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Kurigram district of Bangladesh. **Journal of the Bangladesh Agricultural University**, v. 9, n. 1, p. 103-109, 2011.

MISIC, Z.; ABE, N. Subtype analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from calves on farms around Belgrade, Serbia and Montenegro, using the 60 kDa glycoprotein gene sequences. **Parasitology**, v. 134, n. 3, p. 351–358, 2007.

NASIR, A.; AVAIS, M.; KHAN, M. S.; AHMAD, N. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* Infection in Lahore (Pakistan) and its Association with Diarrhea in Dairy Calves. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 11, n. 2, p. 221-224, 2009.

OLSON, M. E.; O'HANDLEY, R. M.; RALSTON, B. J.; MCALLISTER, T. A.; THOMPSON, R. C. A. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 4, p. 185-191, 2004.

RINALDI, L.; CONDOLEO, R. U.; CONDOLEO, R.; SARALLI, G.; BRUNI, G.; CRINGOLI, G. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water Buffaloes (*Bubalus bubalis*) of the Italian Mediterranean Bred. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 1, p. 253-255, 2007.

SILVERLÅS, C.; REINECK, H. B.; NÄSLUND, K.; BJÖRKMAN, C. Is there a need for improved *Cryptosporidium* diagnostics in Swedish calves? **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 2, p. 155-161, 2013.

TAMURA, K.; MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

TOMAZIC, M. L.; MAIDANA, J.; DOMINGUEZ, M.; URIARTE, E. L.; GALARZA, R.; GARRO, C.; FLORIN-CHRISTENSEN, M.; SCHNITTGER, L. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from calves in Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 198, n. 3-4, p.382-386, 2013.

XIAO, L.; MORGAN, U. M.; LIMOR, J.; ESCALANTE, A.; ARROWOOD, M.; SHULAW, W.; THOMPSON, R. C.; FAYER, R.; LAL, A. A. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3386-3391, 1999.

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

ZAHEDI, A.; PHASEY, J.; BOLAND, T.; RYAN, U. First report of *Cryptosporidium* species in farmed and wild buffalo from the Northern Territory, Australia. **Parasitology Research**, v. 115, n. 3, p. 1349-1353, 2015.

6 CONCLUSÃO GERAL

- O trabalho apresenta a primeira descrição de caracterização molecular de *Cryptosporidium* em bezerros de búfalos da região nordeste e de *C. parvum* subtipo IIAA20G1R1 no Brasil.
- A técnica de Nested PCR do gene 18S foi eficiente na identificação de *Cryptosporidium* em fezes de búfalos.
- Foi possível a construção de árvore filogenética com formação de somente um grupamento com a espécie *C. ryanae*.
- Os bubalinos agem como fonte de infecção e manutenção do parasita no rebanho.

ANEXOS



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO MARANHÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS EM ENSINO E PESQUISA - CEUA**

**PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO ENVIADO A
CEUA/IFMA**

I. IDENTIFICAÇÃO:

NÚMERO DO PROCESSO: 23249.018982.2015-73

UNIDADE/ÓRGÃO: Instituto Federal do Maranhão-IFMA/Campus Maracanã

UNIDADE ONDE SERÁ REALIZADO: Campus São Luis-Maracanã

DATA DE APRESENTAÇÃO DO PROTOCOLO À CEUA: 25/05/2015

II. PROPOSTA:

TÍTULO DO PROJETO: Caracterização genética do vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) em búfalos (*Bubalus bubalis*) persistentemente infectados (P.I) na Baixada Maranhense, MA, Brasil.

OBJETIVO: Caracterizar geneticamente o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) isolado em búfalos (*Bubalus bubalis*), persistentemente infectados (PI), em propriedades leiteiras localizadas na região da baixada maranhense, Brasil.

CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA: Bubalinos (*Bubalus bubalis*) localizados em fazendas da Região da Baixada Maranhense

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Amauri Alcino Alfieri

PESQUISADORES PARTICIPANTES: Sonália Ferreira da Paixão Guterres

III. PARECER:

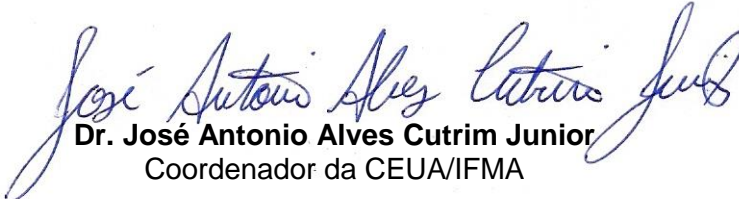
NÚMERO DO PARECER: 01/2015

DATA DO PARECER: 30/09/2015

SITUAÇÃO: APROVADO

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, consideramos o projeto APROVADO por estar de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA.

Para fins de publicação, é necessário fazer menção do parecer emitido por esta Comissão.


Dr. José Antonio Alves Cutrim Junior
Coordenador da CEUA/IFMA