



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

SÉRGIO TOSI CARDIM

DESENVOLVIMENTO DE qPCR PARA DIAGNÓSTICO DE  
*Eimeria* spp. EM BOVINOS

---

LONDRINA - PR  
2018

SÉRGIO TOSI CARDIM

DESENVOLVIMENTO DE qPCR PARA DIAGNÓSTICO DE  
*Eimeria* spp. EM BOVINOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – Área de Concentração em Sanidade Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. João Luis Garcia

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

Cardim, Sérgio Tosi.

Desenvolvimento de qPCR para diagnóstico de Eimeria spp. em bovinos / Sérgio Tosi Cardim. - Londrina, 2019.  
69 f. : il.

Orientador: João Luis Garcia.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Eimeria bovis - Tese. 2. qPCR - Tese. 3. coccidiose - Tese. 4. Eimeria zuernii - Tese. I. Garcia, João Luis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

SÉRGIO TOSI CARDIM

DESENVOLVIMENTO DE qPCR PARA DIAGNÓSTICO DE  
*Eimeria* spp. EM BOVINOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – Área de Concentração em Sanidade Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. Dr. Andréas Lazaros Crhyssafidis  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dra. Regina Mitsuka Breganó  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. José da Silva Guimarães Junior

---

Prof. Dr. Alexey Leon Gomel Bogado

Londrina, 28 de fevereiro de 2018.

Dedico este trabalho a minha família que sempre me apoiou durante toda minha trajetória.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pela oportunidade da vida e dos aprendizados nela.

À minha esposa, Stefani, pelo apoio no dia a dia, por ser minha melhor amiga, minha companheira, a pessoa com a qual posso contar todos os dias, tanto nos momentos bons quanto nos ruins.

Ao meu filho, Gabriel, por me dar força nos momentos que preciso.

Aos meus pais, Sérgio e Ângela, por todo o apoio que me deram e ainda dão para que eu possa vencer mais uma batalha em minha vida.

À minha irmã, Andréia, por sua amizade e companheirismo.

Ao meu cunhado, Iago, por se praticamente um irmão para mim, pelos momentos de descontração.

Aos amigos Danilo, Mércia, Priscilla, João Pedro e Alessandra, por sua amizade e companheirismo em todos os momentos de minha vida. Gostaria de agradecer especialmente ao Danilo por sua amizade de longa data, por conseguir conservar nossa amizade mesmo com a distância.

Às residentes do laboratório de Parasitologia, Aline e Ana Clécia, por sua ajuda na execução do projeto e por sua amizade durante este período.

Aos demais companheiros de laboratório, Luiz Daniel, Felipe, Ana Flávia, Thais Agostinho e a todos os demais, por sua ajuda, direta ou indireta, no trabalho e por sua amizade e companheirismo no dia a dia.

Ao meu orientador, Professor Dr. João Luis Garcia, não só pela ajuda na elaboração e execução deste projeto e da elaboração dos textos, como também por acreditar em mim como profissional e por sua contribuição no meu aprendizado desde a minha residência.

Aos professores da parasitologia, Prof Dr. Ademir, Prof Dr. José Guimarães, Prof Dr. Milton, Prof Dr. Odilon, Prof. Dra. Regina por seus ensinamentos e por partilhar comigo seus conhecimentos desde o período da residência.

À todos os professores do curso pós-graduação em Ciência Animal, que contribuíram para meu aprendizado e sempre se disponibilizaram a ajudar de melhor forma possível.

Aos técnicos do Laboratório de Protozoologia da Universidade Estadual de Londrina, Beatriz, Aldair e Elisabete e a técnica do Laboratório de Parasitologia, Dalva, pelo seu auxílio na execução do projeto, cedendo espaço nos mesmos para a

realização dos exames. Gostaria de agradecer especialmente a Dalva, por ceder seu laboratório sempre que eu precisava, pela convivência do dia a dia e por todos os ensinamentos que adquiri com ela desde a residência. Gostaria de agradecer também a Bia, por sua amizade, sua ajuda nos momentos de dificuldade do projeto e pelas tardes de conversa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

**OBRIGADO**

**“O rio atinge seus objetivos  
porque aprendeu a contornar  
obstáculos.”**

Lao Tsé



CARDIM, S. T. **Desenvolvimento de qPCR para diagnóstico de *Eimeria* spp. em bovinos.** 2018. 69 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina – 2018.

## RESUMO

A coccidiose bovina é uma enfermidade de grande importância em rebanhos bovinos ao redor do mundo. Esta enfermidade é causada por protozoários, do gênero *Eimeria* e afeta principalmente animais com menos de 12 meses, sendo as espécies *E. bovis* e *E. zuernii* as de maior importância clínica, podendo causar diarreia severa com sangue em bezerros infectados. O diagnóstico de rotina desta doença é realizado através da observação morfológica dos oocistos, os quais precisam estar esporulados para identificação da espécie envolvida, o que leva em torno de 10 a 15 dias, tornando o mesmo muito laborioso e com necessidade de alto treinamento do leitor, dificultando um diagnóstico mais rápido e consequente tratamento mais rápido dos animais. Devido a estes fatores, o objetivo deste trabalho foi desenvolver técnicas de qPCR para o diagnóstico do gênero *Eimeria* e das espécies de maior patogenicidade, *E. bovis* e *E. zuernii*. Para isto foram selecionados o gene 18S rRNA para o gênero *Eimeria* e o gene ITS-1 para diferenciação das espécies, isto porque o gene 18S tem pouca variabilidade entre as espécies enquanto o gene ITS-1 tem uma alta variabilidade interespecífica, com baixa variabilidade dentro da espécie, visando assim uma alternativa de diagnóstico mais rápida e sensível. As PCRs foram realizadas utilizando SYBR Green como fonte de fluorescência. Tanto os primers desenvolvidos para o gênero, quanto os desenvolvidos para a espécie *E. zuernii* apresentaram alta sensibilidade, tendo a capacidade de amplificar amostras contendo apenas um oocisto do parasita. Já os primers desenvolvidos para *E. bovis* apresentaram uma sensibilidade inferior, sendo capazes de detectar positividade em amostras de campo contendo 50 oocistos por grama de fezes. Para avaliação da especificidade das técnicas foram utilizadas amostras contendo *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., sendo que todas as técnicas apresentaram negatividade tanto para *Giardia* spp., quanto para *Cryptosporidium* spp. Baseado nos resultados encontrados neste estudo, conclui-se que os primers desenvolvidos apresentaram alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico de *Eimeria* em bovinos.

**Palavras-chave:** *Eimeria*, qPCR, coccidiose, *E. bovis*, *E. zuernii*

CARDIM, S. T. **Development of qPCR for diagnosis of *Eimeria* spp. in cattle.** 2018. 69 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina – 2018.

### ABSTRACT

Bovine coccidiosis is a disease of great importance in cattle herds around the world. This disease is caused by protozoa of genus *Eimeria* and mainly affects animals less than 12 months old. *E. bovis* and *E. zuernii* species are the most clinically important and can cause severe diarrhea with blood in infected calves. The routine diagnosis of this disease is made through the morphological observation of oocysts, which need to be sporulated to identify the species involved, process can take around 10 to 15 days, making it very laborious and in need of high training of the reader, hindering a faster diagnosis and consequent faster treatment of the animals. Due to these factors, the objective of this study was to develop qPCR techniques for the diagnosis of genus *Eimeria* and species with greatest pathogenesis, *E. bovis* and *E. zuernii*. The 18S rRNA gene for genus *Eimeria* and the ITS-1 gene for species differentiation were selected because the 18S gene has low variability among the species while the ITS-1 gene has a high interspecific variability with low variability within species, aiming at a faster and more sensitive diagnostic alternative. The PCRs were performed using SYBR Green as a source of fluorescence. Both primers developed for genus and those developed for *E. zuernii* species presented high sensitivity, having the ability to amplify sample containing only one oocyst of the parasite. The primers developed for *E. bovis* had a lower sensitivity and were able to detect positivity in field samples containing 50 oocysts per gram of faeces. To evaluate the specificity of the techniques, samples containing *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. were used and all of which showed negativity for both. Based on the results found in this study, it was concluded that the primers developed showed high sensitivity and specificity in the diagnosis of *Eimeria* in cattle.

**Keywords:** *Eimeria*, qPCR, coccidiosis, *E. bovis*, *E. zuernii*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 – Ciclo evolutivo do gênero *Eimeria* ..... 18

### ARTIGO A

Figura 1 – Curva de amplificação da qPCR para *Eimeria* spp. baseada na região 18S rRNA ..... 49

Figura 2 – Curva de *melting* da qPCR para *Eimeria* spp. baseada na região 18S rRNA ..... 50

### ARTIGO B

Figura 1 – Curva de amplificação da qPCR para *Eimeria zuernii* em bovinos ..... 65

Figura 2 – Curva de amplificação da qPCR para *Eimeria bovis* em bovinos ..... 66

Figura 3 – Curva de *melting* da qPCR para diagnóstico da espécie *E. zuernii* em bovinos ..... 67

Figura 4 – Curva de *melting* da qPCR para diagnóstico da espécie *E. bovis* em bovinos ..... 68

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>ARTIGO DE REVISÃO</b> .....	<b>14</b>
1 <b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
2 <b>BIOLOGIA</b> .....	<b>18</b>
3 <b>COCCIDIOSE CLINICA</b> .....	<b>20</b>
4 <b>EPIDEMIOLOGIA</b> .....	<b>21</b>
5 <b>DIAGNÓSTICO</b> .....	<b>23</b>
6 <b>TRATAMENTO E CONTROLE</b> .....	<b>25</b>
7 <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>27</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>28</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
OBJETIVO GERAL.....	35
OBJETIVO ESPECÍFICO .....	35
<b>ARTIGO A</b> .....	<b>36</b>
1 <b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>39</b>
2 <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
2.1    AMOSTRAS.....	41
2.2    EXTRAÇÃO DE DNA.....	41
2.3    DESENHO DOS PRIMERS.....	42
2.4    AMPLIFICAÇÃO DA PCR .....	42
3 <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>43</b>
4 <b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>45</b>
<b>ARTIGO B</b> .....	<b>51</b>
1 <b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>54</b>
2 <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>56</b>
2.1    AMOSTRAS.....	56
2.2    EXTRAÇÃO DE DNA.....	56

2.3	DESENHO DOS PRIMERS .....	57
2.4	AMPLIFICAÇÃO DA PCR .....	57
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>61</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>62</b>
	<b>CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>69</b>

## INTRODUÇÃO

A coccidiose em bovinos é causada pelos protozoários do gênero *Eimeria*, sendo mais comum em animais com menos de um ano de idade (DAUGSCHIES; NAJDROWSKI, 2005; BRUHN et al., 2011). Das mais de 20 espécies descritas deste parasita, a *Eimeria bovis* e a *Eimeria zuernii*, são consideradas as espécies mais patogênicas, comumente associadas a casos de coccidiose clínica em animais jovens (JONSSON et al., 2011; BANGOURA et al., 2011; FLORIÃO et al., 2016).

Esta doença causa grandes perdas econômicas na bovinocultura, principalmente devido a diminuição na produção e altos gastos com tratamento dos animais (ABEBE et al., 2008), com impacto estimado de 400 milhões de dólares no mercado americano e gastos estimados com tratamento em torno de 3,8 milhões de dólares no Canadá (MATJILA & PENZHORN, 2002; REHMAN 2011). Não há estudos sobre o impacto econômico dessa enfermidade no Brasil.

O diagnóstico desta doença é realizado através de análise morfológica dos oocistos em microscópio (DAUGSCHIES AND NAJDROWSKI, 2005), e a diferenciação é feita por meio das características morfológicas dos oocistos esporulados de cada espécie, sendo que a esporulação em meio ambiente pode levar até 10 dias para ocorrer (LEVINE, 1961; ECKERT et al., 1995), tornando esse diagnóstico muito laborioso e exigindo grandes habilidades do leitor. Devido a isso, é essencial o desenvolvimento de um diagnóstico rápido e efetivo (KAWAHARA et al., 2010).

Com este intuito, iniciaram-se as pesquisas utilizando a técnica de PCR para diagnóstico do gênero *Eimeria* e das principais espécies em bovinos. Kawahara et al. (2010), desenvolveram uma PCR para diagnóstico do gênero *Eimeria* com os primers desenvolvidos iniciando-se na região 18S rRNA e terminando na região 5.8S do DNA do parasita. Estes primers visavam o sequenciamento da região ITS-1, a qual fica no interior da região amplificada pelos primers. Esse sequenciamento foi utilizado para confecção de primers específicos para as principais espécies de *Eimeria* spp. de bovinos.

Posteriormente, Kokuzawa, Ichikawa-Seki e Itagaki (2013) desenvolveram primers baseados na região 18S rRNA, visando o posterior sequenciamento e construção de uma árvore filogenética com as principais espécies de *Eimeria* spp.

Também houve o desenvolvimento de uma técnica de qPCR para diagnóstico das espécies *E. bovis* e *E. zuernii*, utilizando-se primers e probes baseados na região ITS-1, visando diagnóstico conjunto destas espécies nas diarreias de bovinos juntamente com outros agentes (TSUCHIAKA et al., 2016). É devido escassez de estudos com o objetivo de um melhor diagnóstico da *Eimeria* spp. em bovinos que o presente trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de qPCR para diagnóstico deste parasita em bovinos.

**ARTIGO DE REVISÃO**

**COCCIDIOSE BOVINA**

**COCCIDIOSIS IN CATTLE**



## RESUMO

A coccidiose bovina é uma doença causada por protozoários do gênero *Eimeria* e apresentam grande importância pelas perdas econômicas que traz aos rebanhos bovinos, em todo o mundo. Embora seja bem caracterizada, poucos estudos em bovinos no Brasil foram realizados. Das mais de 20 espécies de *Eimeria* descritas, as patogênicas são *E. bovis* e *E. zuernii*, as quais podem causar diarreia aquosa com ou sem sangue, muitas vezes fatal. Em menor grau, a *E. alabamensis* também pode ser responsável por doença clínica. O ciclo biológico desses parasitas envolve três fases, merogonia, e gametogonia que ocorrem no intestino dos bovinos e a esporogonia, à qual ocorre no meio ambiente. O animal infectado irá adquirir uma imunidade espécie específica, o que pode explicar por exemplo a menor prevalência de *Eimeria* em animais mais velhos, no entanto, a imunidade não é total e mesmo animais adultos podem eliminar oocistos nas fezes. Portanto, para um controle eficiente desta doença, o diagnóstico da espécie envolvida é fundamental, pois é necessário a confirmação da presença de espécies patogênicas, juntamente com os sinais clínicos, para que possa ser confirmada a coccidiose, e assim fazer o tratamento adequado com o uso de anticoccídicos. Nessa fase a maior parte dos danos já ocorreu, por isso, a profilaxia na propriedade deve ser prioritária, para isso, a anamnese e conhecimento do manejo da propriedade é fundamental. Desta forma, esta revisão tem como objetivo abordar a epidemiologia, a biologia do parasita, seu impacto econômico e estratégias para o seu controle.

**Palavras chave:** *Eimeria*, *Eimeria bovis*, *Eimeria zuernii*, epidemiologia, diagnóstico

## ABSTRACT

Bovine coccidiosis is a disease caused by protozoa of the genus *Eimeria* and have great importance for the economic losses that brings the cattle herds worldwide. Although it is well characterized, few studies in cattle in Brazil were performed. Of the more than 20 species of *Eimeria* sp. described, the most pathogenic species are *E. bovis* and *E. zuernii*, which can cause aqueous diarrhea with or without blood, often fatal. To a lesser extent, *E. alabamensis* may also be responsible for causing clinical disease. The biological cycle of these parasites involves three phases, merogony, and gametogonia that occur in the intestines of cattle and sporogony, which occurs in the environment. The infected animal will acquire a specific species immunity, which may explain for example the lower prevalence of *Eimeria* in older animals, however, immunity is not absolute and even adult animals can eliminate oocysts in feces. Therefore, for an efficient control of this disease, the diagnosis of the species involved is fundamental, since it is necessary to confirm the presence of pathogenic species, together with the clinical signs, so that coccidiosis can be confirmed, and thus to make appropriate treatment with the use of anticoccidials. At this stage most of the damage has already occurred, therefore, prophylaxis in the property must be a priority, for this, the anamnesis and knowledge of the management of the property is fundamental. Thus, this review aims to address epidemiology, parasite biology, its economic impact and strategies for its control.

**Keywords:** *Eimeria*, *Eimeria bovis*, *Eimeria zuernii*, epidemiology, diagnosis

## 1 INTRODUÇÃO

A coccidiose em bovinos é causada por protozoários do gênero *Eimeria* (DAUGSCHIES et al., 2004; DAUGSCHIES; NAJDROWSKI, 2005; BRUHN et al., 2011). Esta é uma doença que apresenta a idade dos animais como um fator importante para a patogenia da infecção, sendo os bezerros e bovinos jovens os mais suscetíveis (STOCKDALE et al., 1981; CHIBUNDA et al., 1997; JONSSON et al., 2011; BANGOURA et al., 2012). Existem mais de 20 espécies de *Eimeria* descritas em bovinos, porém apenas as espécies *E. bovis* e *E. zuernii*, são capazes de acarretar sinais clínicos agudos nos animais. Entretanto, inúmeros trabalhos têm descrito a importância de *E. alabamensis* como causadora de diarreia moderada em animais a pasto (SVENSSON et al., 1993; SVENSSON; UGGLA; PEHRSON, 1994; MARSHALL et al., 1998; SVENSSON, 2000).

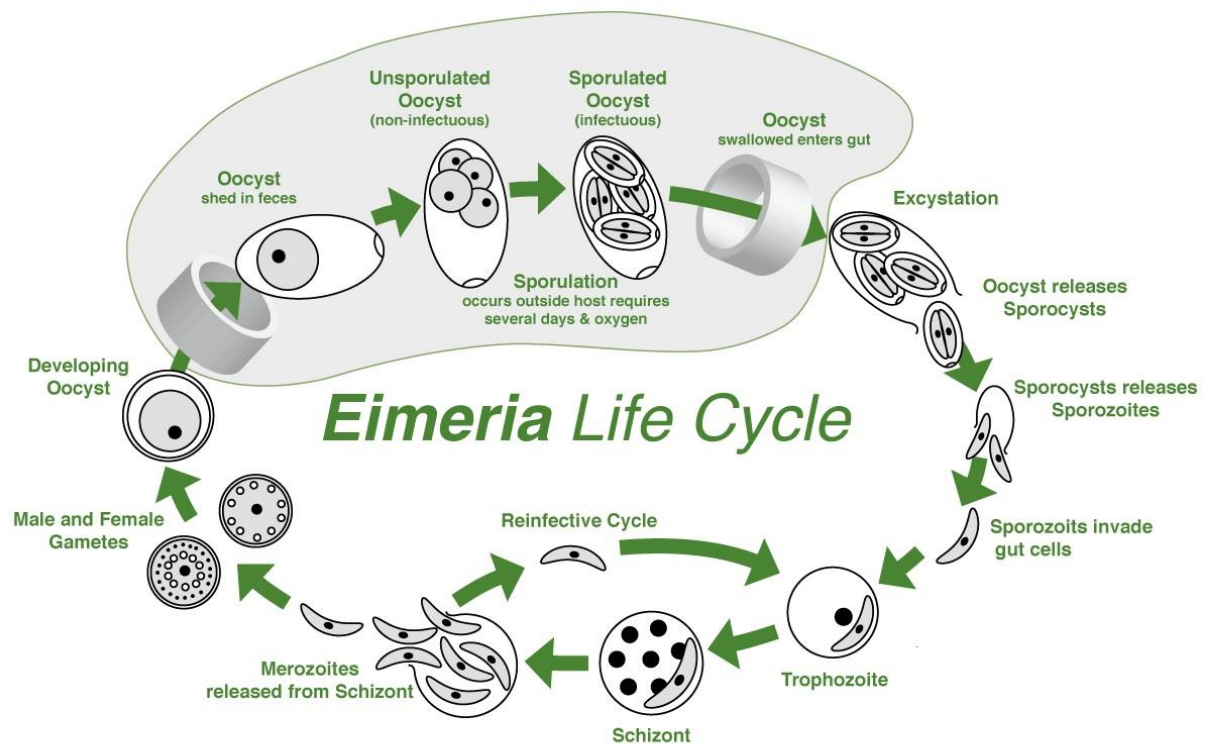
As infecções causadas por *E. bovis* e *E. zuernii* podem causar diarreia severa com sangue, fibrina e mucosa intestinal nas fezes, levando os animais a apresentar febre, dor abdominal, desidratação, fraqueza, anorexia, tenesmo, anemia, perda de peso e eventualmente morte (STOCKDALE et al., 1981; BÜRGER, 1983; DAUGSCHIES; AKIMARU; BÜRGER, 1986). No caso de infecções por *E. alabamensis*, os animais tendem a apresentar uma diarreia de moderada e aquosa sem sangue, com baixa mortalidade (SVENSSON, UGGLA, PEHRSON, 1994).

A coccidiose bovina leva a altas perdas econômicas, sendo que os gastos giram em torno de U\$ 400 milhões/ano em propriedades dos Estados Unidos (MATJILA; PENZHORN, 2002) e cerca de U\$ 3,8 milhões/ano no Canadá (REHMAN et al., 2011). No Brasil não existem estimativas das perdas financeiras nos rebanhos bovinos.

## 2 BIOLOGIA

O ciclo de vida desses protozoários consiste basicamente de um ciclo monoxeno, com uma fase interna (hospedeiro) e uma fase externa (ambiente) (Figura 1). Estes protozoários são espécie-específico e se desenvolvem obrigatoriamente dentro das células intestinais dos bovinos (DAUGSCHIES; NAJDROWSKI, 2005).

**Figura 1** – Ciclo evolutivo do gênero *Eimeria*.



Fonte: Impextraco, 2016

Existem poucos estudos sobre infecção experimental visando o estudo da biologia de *Eimeria* spp. em bovinos e a maioria dos estudos foi realizado com *E. bovis* (HERMOSILLA et al., 2002; BEHRENDT et al., 2004; BADAWY et al., 2010; HERMOSILLA et al., 2012). A forma infectante são os oocistos esporulados, contendo quatro esporocistos com dois esporozoítos cada, que completam sua esporulação dependendo das condições ambientais, com tempo de esporulação em torno de 10 a 15 dias (RIND; BROHI, 2001). Após a ingestão dos oocistos esporulados pelos bovinos, os esporozoítos são liberados e atravessam as células da mucosa, sem alterações consideráveis e finalmente invadem as células do endotélio intestinal

(BEHRENDT et al., 2004). A invasão da célula do hospedeiro é acompanhada pela liberação de antígenos a partir de organelas presentes na região anterior dos esporozoítos (micronemas e roptrias), as quais desempenham um significativo papel no reconhecimento, invasão, e formação do vacúolo parasitóforo na célula hospedeira (HEISE; PETERS; ZAHNER, 1999a, b).

Dentro do vacúolo parasitóforo, os esporozoítos se transformam em merozoítos e depois em merontes de primeira geração. Estas fases são particularmente grandes nos casos *E. bovis*, *E. zuernii* e *E. auburnensis*. Mais de  $10^5$  merozoítos são formados em cada célula através de multiplicação assexuada (DAUGSCHIES; NAJDROWSKI, 2005). Neste momento, a célula pode-se apresentar 40 vezes maior que seu tamanho original (HERMOSILLA; RUIZ; TAUBERT; 2012).

A célula parasitada finalmente se rompe e libera os merozoítos de primeira geração, que são móveis e penetram em células vizinhas, onde iniciam o desenvolvimento dos merontes de segunda geração. Depois de liberados, estes merozoítos irão se diferenciar nos microgametas (masculino) e macrogametas (feminino). Os microgametas romper as células onde estão e irão fertilizar os macrogametas, formando os oocistos (DAUGSCHIES; NAJDROWSKI, 2005).

A quantidade de oocistos liberados está relacionada com a dose infectante (quanto maior a dose infectante, mais oocistos serão liberados) até um certo nível onde, acima deste, uma maior dose não acarretará em maior eliminação de oocistos, mas podem até mesmo diminuir a produção em um fenômeno denominado de efeito "crowding" (DAUGSCHIES et al., 2002). O mesmo acontece, possivelmente, devido ao aumento da competição entre os estágios do parasita pelas células hospedeiras adequadas (DAUGSCHIES; NAJDROWSKI, 2005).

### 3 COCCIDIOSE CLINICA

A infecção por algumas espécies de *Eimeria* e a baixa infecção pelas espécies patogênicas podem causar doença subclínica ou até mesmo diarreia moderada (CORNELISSEN et al., 1995, BUSATO et al., 1998). Entretanto, as infecções em bezerros com alta quantidade de oocistos de *E. bovis* e *E. zuernii*, podem causar diarreia severa com sangue, fibrina e mucosa intestinal nas fezes. Estes animais podem ainda apresentar febre, dor abdominal, desidratação, fraqueza, anorexia, tenesmo, anemia, perda de peso e eventualmente morte (STOCKDALE et al., 1981; BÜRGER, 1983; DAUGSCHIES; AKIMARU; BÜRGER, 1986). No entanto, não ocorre alteração considerável nos valores do hematócrito e hemoglobina dos bezerros, ocorrendo alterações apenas em animais muito debilitados (DAUGSCHIES; AKIMARU; BÜRGER, 1986).

Segundo alguns estudos, a coccidiose bovina aguda pode causar uma mortalidade que varia de 7 a 20% (FOX, 1985; PILARCZYK; BALICKA-RAMISZ; PROST, 1999). Isso ocorre devido ao aumento inicial da permeabilidade na mucosa que leva a desidratação severa em bezerros, podendo chegar a óbito durante a quarta semana após infecção por *E. zuernii*. Os animais que sobrevivem a este período, tendem a se recuperar ou podem apresentar enfraquecimento gradual, levando ao estado moribundo (STOCKDALE et al., 1981) e tendem a não recuperar totalmente sua capacidade de absorção intestinal, levando assim, a um aumento da susceptibilidade a outros patógenos piorando o quadro clínico (DAUGSCHIES; NAJDROWSKI, 2005).

Para que ocorra quadro clínico em infecções por *E. alabamensis*, é necessário que o animal venha a ingerir acima 10 milhões de oocistos (HOOSHMAND-RAD; SVENSSON; UGGLA, 1994). A doença causada por esta espécie de *Eimeria* normalmente induz a uma diarreia de moderada a aquosa sem sangue, possuindo uma baixa mortalidade e geralmente está associada a infecções mistas com uma espécie patogênica. Entretanto, infecções causadas apenas por *E. alabamensis* podem apresentar quadro de desidratação, depressão e diminuição do crescimento, principalmente, em bezerros mantidos em pastagens altamente contaminadas, enquanto em pastagens menos contaminadas a infecção permanece subclínica (SVENSSON et al., 1993; SVENSSON; UGGLA; PEHRSON., 1994).

#### 4 EPIDEMIOLOGIA

Normalmente, devido à alta contaminação ambiental com oocistos, os bovinos tendem a adquirir a coccidiose ainda quando bezerros, sendo que as infecções podem ocorrer precocemente após o nascimento, com o risco aumentando até os três meses de idade (LENTZE et al., 1999). Os animais mais velhos estão geralmente protegidos da doença por indução da imunidade (DAUGSCHIES; NAJDROWSKI, 2005). É importante ressaltar que não há imunidade cruzada entre as espécies de *Eimeria* spp. em bovinos.

A prevalência da infecção pode variar consideravelmente entre as propriedades, regiões, época do ano e idade do animal (DAUGSCHIES; NAJDROWSKI, 2005). Diversos estudos ao redor do mundo têm demonstrado a alta prevalência de *Eimeria* spp. em rebanhos bovinos (ALMEIDA et al., 2011; BRUHN et al., 2011; BANGOURA et al., 2012; KOUTNY et al., 2012; ENEMARK; DAHL; ENEMARK, 2013; HILLESHEIM; FREITAS, 2016; SLOBODIAN; KYCHYLIUK; SOROKA, 2017). Na Europa, estudos demonstraram a presença de *Eimeria* spp. em 95,4% a 100% das propriedades estudadas, com a prevalência variando de 46% a 83,67% em bezerros, sendo as espécies patogênicas encontradas em 27,8% a 65,54% das amostras no caso de *E. bovis* e 11,4% a 63,85% de *E. zuernii* (CORNELISSEN et al., 1995; LASSEN et al., 2009; BANGOURA et al., 2012; KOUTNY et al., 2012; ENEMARK; DAHL; ENEMARK, 2013; SLOBODIAN; KYCHYLIUK; SOROKA, 2017).

Na Alemanha as prevalências em diferentes propriedades rurais variaram de 2% a 48% (WACKER; ROFFELS; CONRATHS, 1999). Da mesma forma, na Holanda esta prevalência variou de 10% a 100% nas propriedades e foi semelhante em novilhos (43%) e bezerros (46%), observando-se uma presença de coccidiose subclínica, que foi explicada pela separação precoce dos bezerros e pelo bom estado higiênico da maioria das fazendas estudadas (CORNELISSEN et al., 1995).

No Brasil, as prevalências variaram de 33,33% a 48,20%, e com relação as espécies, de 21,1% a 37,6% para *E. bovis* e de 6,83% a 22,6% para *E. zuernii* (REBOUÇAS et al., 1994; ALMEIDA et al., 2011; BRUHN et al., 2011; BRUHN et al., 2012; HILLESHEIM; FREITAS, 2016). Porém no Brasil existem poucos trabalhos de prevalência de *Eimeria* spp. em bovinos, sendo que algumas regiões e estados como,

por exemplo, a região norte ou o estado do Rio Grande do Sul não possuem nenhum dado sobre prevalência deste parasita.

É importante ressaltar que a simples presença de protozoários em um rebanho não está necessariamente associada a surtos clínicos, sendo necessária a avaliação da espécie e da dose infectante envolvidas (CORNELISSEN et al., 1995; WACKER; ROFFELS; CONRATHS, 1999). Devido à alta capacidade reprodutiva de *Eimeria* spp., nos casos de surtos de coccidiose, os bezerros infectados podem eliminar milhões de oocistos no ambiente, assim espécies patogênicas, especialmente *E. bovis* e *E. zuernii* e, ocasionalmente, *E. alabamensis* irão esporular dentro de 10 a 15 dias e continuarem infectantes por meses. Como consequência, a pressão de infecção aumenta consideravelmente no ambiente ao redor de bezerros infectados, e estas áreas permanecem contaminadas por longos períodos, mesmo que os bezerros sejam tratados com sucesso ou removidos do local (DAUGSCHIES; NAJDROWSKI, 2005).

Há um aumento no risco individual de coccidiose clínica em bezerros em propriedade com problemas com coccidiose devido à alta pressão de infecção, juntamente com fatores que causam o estresse, como por exemplo, desmame, transporte, alimentação inadequada ou outras doenças infecciosas (BOHRMANN, 1991; MARSHALL et al., 1998, JOACHIM, 2002). Em propriedades com estes problemas todos os bezerros devem ser considerados como susceptíveis a doença, pois é impossível determinar se irão desenvolver a coccidiose clínica ou não (DAUGSCHIES; NAJDROWSKI, 2005). Nestas circunstâncias é recomendável uma observação mais cuidadosa dos animais após três a quatro semanas do transporte para uma área comum (STASCHEN, 2004; MUNDT et al., 2005), pois a doença tende a se espalhar rapidamente dentro de uma a duas semanas, podendo desaparecer espontaneamente após algum tempo (STASCHEN, 2004).

Os bezerros são geralmente susceptíveis a infecção, enquanto os adultos tendem a estar protegidos pelo desenvolvimento da resposta imune após uma exposição anterior. No entanto, esta imunidade não é total, possibilitando a re-eliminação de um baixo número de oocistos por vacas adultas (DAUGSCHIES; NAJDROWSKI, 2005). Taxas de prevalência de até 36% foram observadas em vacas, juntamente com aumento na eliminação de oocistos no parto (FABER et al., 2002), demonstrando que os animais adultos podem servir de fonte de infecção para os bezerros (MATIJA; PENZHORN, 2002).



## 5 DIAGNÓSTICO

A identificação das espécies de *Eimeria* é realizado através do exame morfométrico dos oocistos. Esta técnica é utilizada pelo fato de que os oocistos de *Eimeria* spp. e suas características (dimensões, parede, micrópila) são facilmente visualizados em microscópio óptico, em um aumento de 400x, apenas com a utilização de uma das técnicas convencionais de flutuação (DAUGSCHIES; NAJDROWSKI, 2005). Entretanto, a sensibilidade destas técnicas pode ser reduzida em fezes diarreicas, principalmente em infecções severas por *E. bovis* e *E. zuernii*, as quais ainda contém sangue, tecido e fibrina. Nestes casos, os oocistos costumam ficar escondidos no meio do tecido e da fibrina, dificultando a observação dos mesmos ao microscópio (DAUGSCHIES; AKIMARU; BÜRGER 1986; BUSATO et al., 1998).

Devido a grande diferença de patogenia existente entre as espécies de *Eimeria* em bovinos, a presença de um grande número de oocistos não caracteriza exatamente uma coccidiose clínica, sem a identificação exata de espécie de *Eimeria* presente nas fezes. Também deve ser levado em consideração as infecções mistas (CORNELISSEN et al., 1995; BUSATO et al., 1998; PILARCZYK; BALICKA-RAMISZ; PROST, 1999). Desta forma, para o diagnóstico de coccidiose clínica é necessário a diferenciação entre as espécies de *Eimeria* presentes nas fezes. Até o presente momento essa diferenciação é realizada através das características morfométricas dos oocistos (DAUGSCHIES; NAJDROWSKI, 2005).

Bezerros podem sofrer de doença clínica, principalmente nos casos de *E. alabamensis*, ou subclínica, antes mesmo da eliminação dos oocistos nas fezes, durante o período pré-patente, dificultando, desta forma, o diagnóstico (HOLST; SVENSSON, 1994; MATJILA; PENZHORN, 2002). É recomendado exames repetidos do mesmo animal suspeito e exame de grupos de bezerros e não só de um animal do rebanho, diminuindo a possibilidade de erros diagnósticos. Uma exata anamnese, juntamente com o conhecimento do manejo do rebanho em análise são de extrema importância para a conclusão de um diagnóstico de coccidiose e para o diagnóstico parasitológico (DAUGSCHIES; NAJDROWSKI, 2005).

Técnicas sorológicas (ELISA e Western blot), foram desenvolvidas para o diagnóstico de infecções por *E. bovis*, porém estas técnicas estão sujeitas a alguns inconvenientes. Em bezerros jovens alimentados com colostro, os anticorpos maternos que não estão relacionados com uma infecção podem ser detectados. O

problema de reação cruzada entre as espécies também deve ser considerado. Além disso, os anticorpos não estão necessariamente ligados a uma primo-infecção (FABER et al., 2002). Apesar de não ser adequado para técnicas diagnósticas de rotina, estas técnicas podem ser úteis para estudos epidemiológicos e experimentais (FIEGE et al., 1992).

Nos últimos anos foram desenvolvidas técnicas de diagnóstico através da utilização de biológica molecular. Kawahara et al. (2010) desenvolveram uma PCR para o gênero *Eimeria* com os primers se iniciando na região 18S rRNA e finalizando na região 5.8S, sendo que a região amplificada engloba também a região ITS-1. Essa PCR foi desenvolvida visando o sequenciamento e o desenvolvimento de primers para diagnóstico das principais espécies, sendo estes primers baseados na região ITS-1. Como resultado foi possível desenvolver uma PCR para diagnóstico das principais espécies de *Eimeria* spp. com uma sensibilidade de amplificação de 20 oocistos por amostra.

Posteriormente, Kokuzawa, Ichikawa-Seki e Itagaki (2013) desenvolveram uma PCR para o diagnóstico do gênero *Eimeria* baseado na região 18S rRNA, visando o posterior sequenciamento das amostras e a construção de uma árvore filogenética para as principais espécies deste protozoário. Neste estudo, a técnica desenvolvida foi capaz de amplificar amostras contendo apenas um oocisto de *Eimeria* spp.

Mais recentemente, foi desenvolvida uma qPCR para diagnóstico das espécies *E. bovis* e *E. zuernii*, visando um diagnóstico mais rápido destas espécies patogênicas juntamente com o diagnóstico de outros agentes patógenos causadores de diarreia em bezerros. Como resultado, a técnica demonstrou uma capacidade de detecção de amostras contendo 100 cópias de DNA de cada uma das espécies (TSUCHIYAMA et al., 2016).

## 6 TRATAMENTO E CONTROLE

Vários compostos com atividade anticoccidianos vem sendo utilizados com sucesso no tratamento em bovinos. O principal alvo dessas drogas são os macrogametas e microgametas. No caso de surtos agudos os animais infectados devem ser removidos do grupo. Podem ser realizadas aplicações de eletrólitos, glicose e anti-diarreicos, para manter a hemostase (BURGUER, 1983). A administração de antibiótico também é recomendável visando o combate ou até mesmo evitar infecções bacterianas secundárias. Sendo assim, as drogas mais adequadas para o combate da coccidiose devem interromper a reprodução do parasita em uma fase precoce, ou seja, de merogonia, para uma diminuição de lesões intestinais no animal e na contaminação ambiental (DAUGSCHIES; NAJDROWSKI, 2005).

O tratamento preventivo tem como objetivo evitar lesões intestinais e conseqüentemente perdas com a coccidiose seria o ideal ao invés do tratamento terapêutico, porque no caso do tratamento terapêutico, o ciclo do parasita já está completo e os danos ao intestino já ocorreram (BOHRMANN, 1991; MUNDT et al, 2003; TAYLOR et al, 2003; MUNDT et al., 2005). Desta forma, propriedades onde os problemas com coccidiose são contínuos, o manejo do rebanho deve ser avaliado, principalmente com relação a higiene, alimentação, densidade animal, tipo de piso, limpeza de comedouros e bebedouros, entre outros, sendo que se as condições de manejo forem inadequadas, o tratamento se torna inevitável (DAUGSCHIES; NAJDROWSKI, 2005).

Entre as drogas existentes para o tratamento de coccidiose em bovinos, as sulfonamidas e os compostos benzeno acetonitrila são as mais utilizadas. As sulfonamidas atuam principalmente na fase assexuada de reprodução, ou seja, no período pré-patente de infecção, sendo que sua eficácia dependendo do período de aplicação (MUNDT, 2005). Estas drogas são muito utilizadas no tratamento terapêutico, embora não tenham ação suficiente contra os macrogametas e microgametas. Estudo experimentais demonstram apenas uma eficácia limitada de sulfonamidas contra protozoários em mamíferos (SNOEP; POTTERS, 2004). A vantagem na utilização das sulfonamidas está no fato de que estas drogas podem atuar contra certas bactérias, ajudando a suprimir infecções secundárias, e podendo

assim, explicar o benefício no tratamento com sulfonamidas nos surtos de coccidiose (DAUGSCHIES; NAJDROWSKI, 2005).

Os compostos a base de benzeno acetonitrila atuam em várias fases do ciclo de vida de *Eimeria*, sendo assim muito úteis, particularmente, para controle de coccidiose em rebanhos para eliminar ou evitar surtos (BOHRMANN, 1991). Uma dose única oral de 15 mg/kg de toltrazuril 12 dias antes de infecção experimental com *E. bovis* se mostrou eficaz no controle da doença clínica e da excreção de oocistos (MUNDT, 2003) e esta mesma dose se provou eficiente em um rebanho com surto natural de *E. zuernii* (STASCHEN, 2004). Em um estudo com 208 bezerras de 5 diferentes propriedades de diferentes regiões da Alemanha e com histórico de coccidiose natural, onde alguns foram tratados com toltrazuril e outros com placebo, a administração de toltrazuril uma semana antes do início esperado da coccidiose demonstrou-se eficaz no controle da coccidiose (MUNDT et al., 2005). Em outro estudo de infecção experimental com *E. bovis* e *E. zuernii*, alguns animais foram tratados com toltrazuril e outros com placebo 14 dias pós-infecção, sendo que o toltrazuril se mostrou eficaz no tratamento da coccidiose causada por essas espécies (JONSSON et al., 2011). Já um trabalho realizado comparando o toltrazuril (15 mg/kg) com o diclazuril (1 mg/kg) demonstrou que após 5 dias de tratamento os animais tratados com toltrazuril tem uma redução significativa na eliminação de oocistos quando comparado com o grupo controle e o grupo tratado com diclazuril, contudo os animais foram acompanhados por até 76 dias após o início do tratamento e foi observado um maior ganho de peso nos animais tratados com diclazuril quando comparado ao ganho de peso dos animais tratados com toltrazuril e o grupo controle (PHILIPPE et al., 2017).

É importante que o tratamento seja realizado com cuidado, na tentativa de que seja evitada a resistência do protozoário aos medicamentos. A aplicação contínua de anticoccidianos em aves para o controle de infecções por *Eimeria* spp., tem desenvolvido resistência a praticamente todos os fármacos por parte das mesmas (STEPHAN et al., 1997). Esta resistência não é conhecida em bovinos até o momento, mas um risco potencial não pode ser negligenciado e provavelmente irá aumentar se os compostos forem utilizados continuamente ou em frequência elevada por longos períodos no mesmo rebanho. Portanto, medidas preventivas devem não só depender de administração de drogas, sendo necessário incluir uma avaliação e, se possível, uma melhoria na gestão e manejo (DAUGSCHIES; NAJDROWSKI, 2005).

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Estudos sobre a coccidiose bovina ainda são escassos, sendo necessário um melhor conhecimento da prevalência deste protozoário em várias regiões onde não há nenhum dado. Também se torna necessária uma avaliação no Brasil dos impactos econômicos causados pela coccidiose bovina. Além disso, o desenvolvimento de técnicas mais práticas e rápidas para utilização em diagnóstico de rotina, se tornam necessárias, visando um tratamento mais rápido dos animais, resultando em menores lesões decorrentes desta doença e auxílio na realização de estudos epidemiológicos.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA V. A., MAGALHÃES V. C. S., MUNIZ NETA E. S., MUNHOZ A. D. Frequency of species of the Genus *Eimeria* in naturally infected cattle in Southern Bahia, Northeast Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 20, n. 1, p. 78 – 81, jan – mar, 2011.

BANGOURA B., MUNDT H. C., SCHMÄSCHKE R., WESTPHAL B., DAUGSCHIES A. Prevalence of *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* in German Cattle Herds and Factors Influencing Oocyst Excretion. **Parasitol. Res.** v. 109, p. 129 – 138, 2011.

BEHRENDT, J. H., MILDE, H., WEBER, W. M., KOWALIK, S., ZAHNER, H., BÜRGER, H. J., CLAUSS, W. Intracellular calcium and pH conditions of cultured cells infected with *Eimeria bovis* or *E. separata*. **Parasitol. Res.** v. 86, 294–300, 2004.

BOHRMANN, R. Treatment with toltrazuril in natural outbreak of coccidiosis in calves. **Tierärztl. Wochenschr.** v. 98, p. 343–345, 1991.

BRUHN F. R. P., LOPES M. A., DEMEU F. A., PERAZZA C. A., PEDROSA M. F., GUIMARÃES A. M. Frequency of species of *Eimeria* in females of the holstein.friesian breed at the post-weaning stage during autumn and winter. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 20, n. 4, p. 303 – 307, out – dez, 2011.

BRUHN F. R. P., SILVA JÚNIOR, F. A., CARVALHO, A. H. O., ORLANDO, D. R., da ROCHA, C. M. B. M., GUIMARÃES, A. M. Ocorrences of *Eimeria* spp. and gastrointestinal nematodes in dairy calves in southern Minas Gerais, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v. 21, n. 2, p. 171 – 175, abr – jun, 2012.

BÜRGER, H. J. *Eimeria*-Infektionen beim Rind. **Tierärztl. Wochenschr.** v. 96, p. 350–357, 1986.

BUSATO, A., LENTZE, T., HOFER, D., BURNENS, A., HENTRICH, B., GAILLARD, C. A case control study of potential enteric pathogens for calves raised in cow-calf herds. **J. Vet. Med. B** v. 45, p. 519–528, 1998.

CHIBUNDA, R. T., MUHAIRWA, A. P., KAMBARAGE, D. M., MTAMBO, M. M. A., KUSILUKA, L. J. M., KAZWALA, R. R. Eimeriosis in dairy cattle farms in Morogoro municipality of Tanzania, **Prev. Vet. Medic.** v. 31, p. 191 – 197, 1997.

CORNELISSEN, A. W. C. A., VERSTEGEN, R., VAN DEN BRAND, H., PERIE, N. M., EYSKER, M., LAM, T. J. G. M., PIJPERS, A. An observational study of *Eimeria* species in housed cattle on Dutch dairy farms. **Vet. Parasitol.**, v. 56, p. 7 – 16, 1995.

DAUGSCHIES, A., AKIMARU, M., BÜRGER, H. J. Experimentelle *Eimeria bovis*-Infektionen beim Kalb: 1. Parasitologische und klinische Befunde. **Dtsch. Tierärztl. Wschr.** v. 93, p. 393 – 397, 1986.

DAUGSCHIES, A., BÖSE, R., MARX, J., TEICH, K., FRIEDHOFF, K. T. Development and application of a standardized assay for chemical disinfection of coccidia oocysts. **Vet. Parasitol.** v. 103, p. 299 – 308, 2002.

DAUGSCHIES, A., IMAROM, S., GANTER, M., BOLLWAHN, W. Prevalence of *Eimeria* spp. in sows at piglet producing farms in Germany. **J. Vet. Med. B.** v. 51, p. 135 – 139, 2004.

DAUGSCHIES, A., NAJDROWSKI, M. Eimeriosis in Cattle: Current Understanding. **J. Vet. Med. B.** v. 52, p. 417 – 427, 2005.

ENEMARK, H. L., DAHL, J., ENEMARK, J. M. D. Eimeriosis in Danish Dairy Calves – Correlation between Species, Oocyst Excretion and Diarrhoea. **Parasitol. Res.** v. 112, p. S169 – S176, 2013.

FABER, J. E., KOLLMANN, D., HEISE, A., BAUER, C., FAILING, K., BÜRGER, H. J., ZAHNER, H. *Eimeria* infections in cows in the periparturient phase and their calves: oocyst excretion and levels of specific serum and colostrum antibodies. **Vet. Parasitol.** v. 106, p. 1 – 17, 2002.

FIEGE, N., KLATTE, D., KOLLMANN, D., ZAHNER, H., BÜRGER, H. J. *Eimeria bovis* in cattle: colostral transfer of antibodies and immune response to experimental infections. **Parasitol. Res.** v. 78, p. 32 –38, 1992.

FITZGERALD, P. R. The economic impact of coccidiosis in domestic animals. **Adv. Vet. Sci. Comp. Med.** v. 24, p. 121 – 143, 1980.

FOX, J. E. Coccidiosis in cattle. **Mod. Vet. Pract.** v. 66, p. 113 – 116, 1985.

HEISE, A., PETERS, W., ZAHNER, H. Phosphocholine epitopes in *Eimeria bovis*. **Exp. Parasitol.** v. 92, p. 279 –282, 1999a.

HEISE, A., PETERS, W., ZAHNER, H. Microneme antigens of *Eimeria bovis* recognized by two monoclonal antibodies. **Parasitol. Res.** v. 85, p. 457 – 467, 1999b.

HERMOSILLA, C., BARBISCH, B., HEISE, A., KOWALIK, S., ZAHNER, H. Development of *Eimeria bovis* in vitro: suitability of several bovine, human and porcine endothelial cell lines, bovine fetal gastrointestinal, Madin-Darby bovine kidney (MDBK) and African green monkey (VERO) cells. **Parasitol. Res.** v. 88, p. 301 – 307, 2002.

HERMOSILLA, C., RUIZ, A., TAUBERT, A. *Eimeria bovis*: An update on parasite-host cell interactions. **Int. Journ. of Medic. Microb.** v. 302, p. 210 – 215, 2012.

HILLESHEIM, L.O., FREITAS F.L.C. Ocorrência de eimeriose em bezerros criados em propriedades de agricultura familiar – nota científica. **Ciênc Anim Bras**; v. 17, n. 3, p. 472 – 481, 2016.

HOLST, H., SVENSSON, C. Changes in the blood composition of calves during experimental and natural infections with *Eimeria alabamensis*. **Res. Vet. Sci.** v. 57, p. 377 – 383, 1994.

HOOSHMAND-RAD, P., SVENSSON, C., UGGLA, A. Experimental *Eimeria alabamensis* infection in calves. **Vet. Parasitol.** v. 53, p. 23 – 32, 1994.



IMPEXTRACO, **Xtra-Performance® Anticoccidials**, 2016. Disponível em < <https://www.impextraco.com/node/784>> Acesso em: 17 fev. 2018.

JOACHIM, A. Kokzidiose gibt es auch bei Kälbern. **DLZ Agrarmagazin** v. 8, p. 92 – 94, 2002.

JONSSON N. N., PIPER E. K., GRAY C. P., DENIZ A., CONSTANTINOIU C. C. Efficacy of Toltrazuril 5% Suspension against *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* in Calves and Observations on the Associated Immunopathology. **Parasitol. Res.** v. 109, p. 113 – 128, 2011.

KAWAHARA F., ZHANG G., MINGALA C.N., TAMURA Y., KOIWA M., ONUMA M., NUNOYA T. Genetic analysis and development of species-specific PCR assays based on ITS1 region of rRNA in bovine *Eimeria* parasites. **Vet Parasit.**, v. 174, p. 49–57, 2010.

KOKOZAWA, T., ICHIKAWA-SEKI, M., ITAGAKI, T. Determination of phylogenetic relationships among *Eimeria* species, which parasitize cattle, on the basis of nuclear 18S rDNA sequence. **The Journal of Veterinary Medicine Science**, Advance Publication, 2013.

KOUTNY, H., JOACHIM, A., TICHY, A., BAUMGARTNER, W. Bovine *Eimeria* species in Austria. **Parasitol. Res.** v. 110, p. 1893 – 1901, 2012.

LASSEN, B., VILTROP, A., RAAPERI, K., JÄRVIS, T. *Eimeria* and *Cyptosporidium* in Estonian dairy farms in regard to age, species and diarrhoea. **Vet. Parasitol.** v. 166, p. 212 – 219, 2009.

LENTZE T., HOFER D., GOTTSTEIN B., GAILLARD C., BUSATO A. Prevalence and importance of endoparasites in calves raised in Swiss cow-calf farms (Article in German.) **Dtsch TierarztlWochenschr** 106(7):275 – 281, 1999.

MARSHALL, R. N., CATCHPOLE, J., GREEN, J. A., WEBSTER, K. A. Bovine coccidiosis in calves following turnout. **Vet. Rec.** v. 143, p. 366 – 367, 1998.

MATJILA, P. T., PENZHORN, B. L. Occurrence and diversity of bovine coccidia at three localities in South Africa. **Veterinary Parasitology**, v. 104, n. 2, p. 93-102, 2002.

MUNDT, H. C., DAUGSCHIES, A., UEBE, F., RINKE, M. Efficacy of toltrazuril against artificial infections with *Eimeria bovis* in calves. **Parasitol. Res.** v.90, p. 166 – 167, 2003.

MUNDT, H. C., BANGOURA, B., MENGEL, H., KEIDEL, J., DAUGSCHIES, A. Control of clinical coccidiosis of calves due to *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* with toltrazuril (Baycox 5%) under field conditions. **Parasitol. Res.** v. 97, p. S134 – S142, 2005.

PHILIPPE, P., ALZIEU, J.P., TAYLOR, M.A., DORCHIES, PH. Comparative efficacy of diclazuril (Vecoxan®) and toltrazuril (Baycox bovis®) against natural infections of *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* in French calves. **Veterinary Parasitology**. v. 206, p. 129 – 137, 2014.

PILARCZYK, B., BALICKA-RAMISZ, A., PROST, M. Dynamics of *Eimeria* spp. infection in calves with and without Baycox® treatment. **Med. Weter.** v. 55, p. 523 – 526, 1999.

REBOUÇAS, M. M., GRASSO, L. M. P. S., SPÓSITO FILHA, E., AMARAL, V., SANTOS, S. M., SILVA, D. M. Prevalência e distribuição de protozoários do gênero *Eimeria* (apicomplexa: Eimeriidae) em bovinos nos municípios de Altinópolis, Taquaritinga, São Carlos, Guará – Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v. 3, n. 2, p. 125 – 130, 1994.

REHMAN T. U., KHAN M. N., SAJID M. S., ABBAS R. Z., ARSHAD M., IQBAL Z., IQBAL A. Epidemiology of *Eimeria* and associated risk factors in cattle of district Toba Tek Singh, Pakistan. **Parasitol Res.** v. 108, p. 1171 – 1177, 2011.

RIND R., BROHI M. A. Factors affecting the survival and sporulation of *Eimeria* oocysts of cattle. **Pakistan Journal of Biological Sciences.** v. 4, p. 487 – 491, 2001.

SLOBODIAN, R.O., KYCYLIUK, Y.V., SOROKA, N.M. Species of the family Eimeriidae (Coccidia, Apicomplexa) parasitic in cattle at dairy farms in Kyiv and Zhytomyr regions of Ukraine. **Vestnik zoologii.** v. 51, n. 2, p. 150 – 151, 2017.

SNOEP, J. J., POTTERS, J. B. B. M. Coccidiosis causes diarrhea in calves in the pasture. Pasture coccidiosis caused by *Eimeria alabamensis* (in Dutch). **Tijdschr. Diergeneeskd.** v. 129, p. 1 – 4, 2004

STASCHEN, S. Kontrolle einer natürlichen Kälberkokzidiose. **Vet. Med. Rep. V3**(special edition), v. 28, 2004.

STEPHAN, B., ROMMEL, M., DAUGSCHIES, A., HABERKORN, A. Studies of resistance to anticoccidials in *Eimeria* field isolates and pure *Eimeria* strains. **Vet. Parasitol.** v. 69, p. 19 – 29, 1997.

STOCKDALE, P. H. G. Effects of monensin on coccidiosis in ruminants. **Vet. Med. Small Anim. Clin.** v. 76, p. 1575 – 1578, 1981.

SVENSSON, C., HOOSHMAND-RAD, P., PEHRSON, B., TÖRNQUIST, M., UGGLA, A. Excretion of *Eimeria* oocysts in calves during their first three weeks after turn-out to pasture. **Acta Vet. Scand.** v. 34, p. 175 – 182, 1993.

SVENSSON, C., UGGLA, A., PEHRSON, B. *Eimeria alabamensis* infection as a cause of diarrhoea in calves at pasture. **Vet. Parasitol.** v. 53, p. 33 – 43, 1994

SVENSSON, C. Excretion of *Eimeria alabamensis* oocysts in grazing calves and young stock. **J. Vet. Med. B** v. 47, p. 105 – 110, 2000.

TAYLOR, M. A., CATCHPOLE, J. Coccidiosis of domestic ruminants. **Appl. Parasitol.** v. 35, p. 73 – 86, 1994.

TAYLOR, M. A., CATCHPOLE, J., MARSHALL, J., MARSHALL, R. N., HOEBEN, D. Histopathological observations on the activity of diclacuril (Vecoxan®) against the

endogenous stages of *Eimeria crandallis* in sheep. **Vet. Parasitol.** v. 116, p. 305 – 314, 2003

TSUCHIAKA, S., MASUDA, T., SUGIMURA, S., KOBAYASHI, S., KOMATSU, N., NAGAI, M., OMATSU, T., FURUYA, T., OBA, M., KATAYAMA, Y., KANDA, S., YOKOYAMA, T., MIZUTANI, T. Development of a novel detection system for microbes from bovine diarrhea by real-time PCR. **J. Vet. Med. Sci.** v. 78, n. 3, p. 383 – 389, 2016.

URQUHART, G.M., ARMOUR, J., DUNCAN, J.L., DUNN, A.M., JENNINGS, F.W. **Parasitologia Veterinária**. Segunda ed. Guanabara Koogan, 1998.

WACKER, K., ROFFELS, M., CONRATHS, F. J. Cow-calf herds in Eastern Germany: status quo of some parasite species and a comparison of chemoprophylaxis and pasture management in the control of gastrointestinal nematodes. **J. Vet. Med. B** v. 46, p. 475 – 483, 199.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

- Desenvolver técnicas de qPCR para diagnóstico de *Eimeria* spp. em bovinos

### OBJETIVO ESPECÍFICO

- Desenvolver primers para amplificação de DNA pela qPCR baseados nos genes 18S rRNA (gênero) e ITS-1 (*E. bovis* e *E. zuernii*).
- Avaliar a sensibilidade e especificidade dos primers desenvolvidos.
- Testar os primers desenvolvidos em amostras de animais naturalmente infectados.

## ARTIGO A

**Desenvolvimento de uma qPCR para diagnóstico do gênero *Eimeria* em bovinos**

## RESUMO

A coccidiose em bovinos é causada por protozoários do gênero *Eimeria*. Estes protozoários acometem principalmente animais jovens, causando diminuição de produção e consequente perdas econômicas. O diagnóstico de rotina é realizado através de observação morfológica dos oocistos, que possui várias limitações. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma técnica de qPCR para diagnóstico de *Eimeria* spp. em bovinos. Para isto foi selecionada a região 18S rRNA do DNA destes parasitas, pois a mesma é uma região com pouca variabilidade entre as espécies. A qPCR foi desenvolvida com a utilização de SYBR Green, tendo como resultado uma PCR com uma alta sensibilidade, capaz de amplificar amostras contendo apenas um oocisto de *Eimeria* spp de bovinos. Demonstra-se nesse estudo a viabilidade na utilização da qPCR no diagnóstico do gênero *Eimeria*, sendo esta técnica menos laboriosa e com menos necessidade de treinamento para diagnóstico quando comparada com a técnica convencionalmente utilizada em rotina (micromorfometria).

**Palavras-chave:** qPCR, *Eimeria*, coccidiose, 18S rRNA, bovinos

## ABSTRACT

Bovine coccidiosis is caused by protozoa of the genus *Eimeria*. These protozoa mainly affect young animals, causing a decrease in production and consequent economic losses. The routine diagnosis is made through morphological observation of the oocysts, which has several limitations. The objective of the present study was to develop a qPCR technique for the diagnosis of *Eimeria* spp. in cattle. For this purpose, the 18S rRNA region of the DNA of these parasites was selected, since it is a region with low variability among the species. The qPCR was developed with the use of SYBR Green, resulting in a PCR with a high sensitivity, able to amplify samples containing only one oocyst of *Eimeria* spp. of bovines. The feasibility of using qPCR in the diagnosis of the *Eimeria* genus is demonstrated in this study, being this technique less laborious and with less need for diagnostic training when compared to the technique conventionally used in routine (micromorphometry).

**Keywords:** qPCR, *Eimeria*, coccidiosis, 18S rRNA, cattle



## 1 INTRODUÇÃO

A coccidiose bovina é uma doença causada por protozoários da classe coccidia, família Eimeriidae e gênero *Eimeria* (BRUHN et al., 2011). Esta doença é umas das mais comum em bovinos ao redor do mundo, principalmente em animais menores de um ano de idade (DAUGSCHIES et al., 2004, BRUHN et al., 2011).

Mais de 20 espécies de *Eimeria* já foram descritas em bovinos, sendo as espécies *Eimeria bovis* e *Eimeria zuernii* consideradas patogênicas, estando associadas a casos de coccidioses clínicas em animais jovens (JONSSON et al., 2011; BANGOURA et al., 2011; FLORIÃO et al., 2016). *Eimeria alabamensis* também tem sido associada a casos de diarreia moderada em animais criados a pasto. (SVENSSON et al., 1993, 1994; MARSHALL et al., 1998; SVENSSON, 2000). Esta doença determina grandes perdas econômicas associadas a diminuição na produção animal, aumento na susceptibilidade a outras doenças e gastos com medicamentos (ABEBE et al., 2008), com um impacto estimado de 400 milhões de dólares no mercado americano e um gasto estimado com tratamento em torno de 3,8 milhões de dólares no Canadá (MATJILA; PENZHORN, 2002; REHMAN 2011), não se conhece o impacto econômico dessa enfermidade no Brasil.

Este parasita uma ocorrência bem variada ao redor do mundo varia de 10 a 100% (LENTZE et al., 1999, STEWART et al., 2008, ALMEIDA et al., 2011, BRUHN et al., 2011, 2012; KOUTNY et al, 2012), sendo que no Brasil sua prevalência varia de 33,33% a 48,20%, em estudo realizados em diferentes regiões do país (REBOUÇAS et al., 1994; ALMEIDA et al., 2011; BRUHN et al., 2011; BRUHN et al., 2012; HILLESHEIM; FREITAS, 2016).

Foram realizados estudos visando o desenvolvimento de técnicas de PCR para o diagnóstico de *Eimeria* spp.. Kawahara et al. (2010) desenvolveram uma PCR com o primers desenvolvidos iniciando o anelamento na região 18S rRNA e terminando na região 5.8S, passando por toda a região ITS-1, visando o diagnóstico do gênero e a viabilidade de primers para o diagnóstico das espécies destes parasitas em bovinos. Posteriormente, em outro estudo, foi obtido outro primer para o gênero *Eimeria* baseado na região 18S rRNA, com o intuito de posterior confecção de uma árvore filogenética das principais espécies em bovinos (KOKOZAWA; ICHIKAWA-SEKI; ITAGAKI, 2013).

Com os avanços tecnológicos, novas técnicas, como a qPCR, estão disponíveis e possuem uma capacidade de desenvolvimento de um diagnóstico mais sensível e específico quando comparado com a PCR convencional. Por isso, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver e padronizar uma técnica de qPCR para o diagnóstico de *Eimeria* spp. em bovinos.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 AMOSTRAS

As amostras de fezes de bovinos foram encaminhadas ao laboratório de Parasitologia Veterinária da Universidade Estadual de Londrina. Foram selecionadas 10 amostras de animais naturalmente infectados positivas para *Eimeria* spp., as quais foram colocadas em microtubos de 2,0 ml e armazenadas em – 20°C para posterior extração.

Para a avaliação da sensibilidade do teste, coletou-se um oocisto de cada uma das seguintes espécies de *Eimeria* spp. de bovinos: *E. bovis*, *E. alabamensis* e *E. zuernii* para extração de DNA. Estes oocistos foram coletados através do auxílio uma pipeta de pasteur de vidro e um microscópio, sendo que cada oocisto foi colocado individualmente em um microtubo de 2,0 ml, diluídos em 300 µl de água miliQ estéril. Estas amostras foram armazenadas à -20°C para posterior extração.

Também foram utilizadas duas amostras de fezes positivas para os seguintes protozoários de bovinos: uma amostra de fezes positiva para *Giardia* spp. e uma amostra positiva para *Cryptosporidium* spp.. Estas amostras foram utilizadas para avaliação da especificidade dos primers desenvolvidos no estudo.

### 2.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Para a extração do DNA, foram diluídas 25 mg de fezes em 300 µL de água ultrapura estéril e seguiu por três ciclos de congelamento a – 80°C por 10 min e descongelamento a 55° C por 10 min, sendo posteriormente adicionado 15 µL de proteinase K (1mg/ml) e 30 µL de SDS 0,1% e incubados a 55°C *overnight*. Após isso, foi adicionado 300 µL de UltraPure™ Phenol (Invitrogen, USA) e centrifugado a 13.000 g por 5 min. A fase aquosa resultante foi transferida para outro microtubo, adicionando-se 300 µL de UltraPure™ Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol (25:24:1, v/v) (Invitrogen, USA) e novamente centrifugado a 13.000 g por 5 min. A precipitação de DNA por acetato de sódio e etanol foi realizada através do método descrito por Sambrook et al.(1989). Os microtubos contendo o DNA extraído foram armazenados em – 20°C para posterior utilização.

Já para a extração das amostras contendo um oocisto de cada espécie individualmente, os mesmos no momento da coleta foram diluídos em 300 µl de água miliQ estéril, passando posteriormente pelos ciclos de congelamento e descongelamento e a todo o processo de extração de DNA descrito anteriormente para as amostras de fezes.

### 2.3 DESENHO DOS PRIMERS

Os primers foram desenhados a partir de sequências do gene 18S rRNA de *Eimeria* spp. depositadas no GeneBank com os seguintes números de acesso: KU641163.1; KU641162.1; KU641161.1; KU641160.1; KU641159.1; KU641158.1; KU641157.1; KU641156.1; KU641155.1; KU641154.1; KU641153.1; KU641153.1; KU351737.1; KU351736.1; KU351735.1; KU351734.1; KU351733.1; KU351732.1; KU351731.1; KU351730.1; KU351729.1; KU351728.1; KU351727.1; KU351726.1; KU351725.1; KU351719.1; KU351718.1; KU351717.1; AY876932.1; AY876931.1; AY876930.1; AY876929.1; AY876928.1; AY876927.1; AY876926.1.

Após a seleção das sequências, os primers foram alinhados utilizando-se o programa BioEdit. Após o alinhamento, uma determinada região foi selecionada e utilizada posteriormente para o desenho dos primers, o qual foi realizado com o programa Primer Express 3.0.1 (Thermo Fisher Scientific, USA). Os primers obtidos foram designados Eim18SF (AGC TTT CGA CGG TAG GGT ATT G) e Eim18SR (CGA ACC CTA ATT CCC CGT TAC), com amplicon de 62 pb

### 2.4 AMPLIFICAÇÃO DA PCR

Uma reação total de 10 µL foi utilizada para a amplificação, a qual continha: 5 µL de SyBR<sup>®</sup> Select Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA), 200 nM de cada primer (Eim18SF e Eim18R), 0,4 µL de BSA (1 mg/ml) e 1 µL de DNA. O ciclo de reação consistiu em uma desnaturação inicial a 95° C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 94° C por 15 s, 57° C por 30 s e 72° C por 30 s (estágio no qual foi realizada a leitura). Posteriormente, para realização da curva de *melting* 94° C por 15 s e depois 57° C por 1 min com um aumento de temperatura até 95° C com leitura a cada 0,3° C.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o presente trabalho foi utilizada a região 18S rRNA do DNA de várias espécies de *Eimeria* spp. de bovinos para a formulação dos primers, devido ao fato de que esta é uma região bastante conservada entre as espécies (OGEDENGBE, HANNER e BARTA, 2011).

Ao analisar os resultados foi possível o diagnóstico de amostras contendo apenas um oocisto de *Eimeria* spp., conforme pode ser observado na figura abaixo (Fig. 1), demonstrando assim que a técnica possui uma alta sensibilidade e pode ser utilizada como uma ferramenta útil para o diagnóstico de rotina. Estes resultados de sensibilidade se assemelham aos resultados encontrados por Kokuzawa, Ichikawa-Seki e Itagaki (2013) que utilizaram uma PCR convencional, também baseada na região 18S rRNA, à qual foi possível amplificar apenas um oocisto do protozoário, visando o posterior sequenciamento e avaliação da variabilidade genética entre os oocistos da mesma espécie.

Para analisar a especificidade da PCR foram utilizadas amostras de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., sendo que ambas as amostras foram negativas, demonstrando assim a especificidade dos primers para o gênero *Eimeria*.

Por se tratar de uma qPCR com a utilização de SYBR Green, realizou-se a curva de *melting*, visando uma avaliação de formação de dímeros de primers ou reações inespecíficas. Nota-se que mesmo com uma diminuição significativa na concentração dos primers utilizados, ainda há uma pequena formação de dímeros de primers (Fig. 2).

Alguns trabalhos utilizam a curva de *melting* para a diferenciação da espécie do parasita presente na amostra, através das diferenças nas temperaturas de dissociação (KHADEMVATAN et al., 2011; NICOLAS, MILON e PRINA, 2002), porém, isso não pôde ser realizado no presente trabalho devido as temperaturas de dissociação semelhantes.

## 4 CONCLUSÃO

Conclui-se, portanto que a qPCR desenvolvida neste estudo pode ser utilizada como uma alternativa mais sensível no diagnóstico de rotina da *Eimeria* spp. em bovinos. Esta técnica, além de apresentar maior sensibilidade do que a morfometria utilizada rotineiramente, é menos laboriosa e apresenta um resultado mais rápido. O desenvolvimento de uma sonda para desenvolver uma TaqMan qPCR deverá ser realizada no futuro.

## REFERÊNCIAS

ABEBE, R., WOSSENE, A., KUMSA, B. Epidemiology of *Eimeria* infections in calves in Addis Ababa and Debre Zeit dairy farms, Ethiopia. **Int J Appl Res Vet Med**. V. 6 p. 24 – 30, 2008.

ALMEIDA V. A., MAGALHÃES V. C. S., MUNIZ NETA E. S., MUNHOZ A. D. Frequency of species of the Genus *Eimeria* in naturally infected cattle in Southern Bahia, Northeast Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 20, n. 1, p. 78 – 81, jan – mar, 2011

BANGOURA B., MUNDT H. C., SCHMÄSCHKE R., WESTPHAL B., DAUGSCHIES A. Prevalence of *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* in German Cattle Herds and Factors Influencing Oocyst Excretion. **Parasitol. Res.** v. 109, p. 129 – 138, 2011.

BRUHN F. R. P., LOPES M. A., DEMEU F. A., PERAZZA C. A., PEDROSA M. F., GUIMARÃES A. M. Frequency of species of *Eimeria* in females of the holstein.friesian breed at the post-weaning stage during autumn and winter. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 20, n. 4, p. 303 – 307, out – dez, 2011.

BRUHN F. R. P., SILVA JÚNIOR, F. A., CARVALHO, A. H. O., ORLANDO, D. R., da ROCHA, C. M. B. M., GUIMARÃES, A. M. Ocorrences of *Eimeria* spp. and gastrointestinal nematodes in dairy calves in southern Minas Gerais, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v. 21, n. 2, p. 171 – 175, abr – jun, 2012.

DAUGSCHIES, A., IMAROM, S., GANTER, M., BOLLWAHN, W. Prevalence of *Eimeria* spp. in sows at piglet producing farms in Germany. **J. Vet. Med. B.** v. 51, p. 135 – 139, 2004.

DAUGSCHIES, A., NAJDROWSKI, M. Eimeriosis in Cattle: Current Understanding. **J. Vet. Med. B.** v. 52, p. 417 – 427, 2005.

FLORIÃO, M.M., LOPES, B.B., BERTO, B.P., LOPES, C.W.G. New approaches for morphological diagnosis of bovine *Eimeria* species: a study on a subtropical organic

dairy farm in Brazil. **Tropical animal health and production**. v. 48, n. 3, p. 577 – 584, 2016.

GREGORY, M.W., CATCHPOLE, J. Ovine coccidiosis: pathology of *Eimeria ovinoidalis* infection. **Int. J. Parasitol.** v. 17, p. 1099 – 1111, 1987.

GREGORY, M.W., CATCHPOLE, J. Ovine coccidiosis: the pathology of *Eimeria crandallis* infection. **Int. J. Parasitol.** v. 20, p. 849 – 860, 1990.

JONSSON N. N., PIPER E. K., GRAY C. P., DENIZ A., CONSTANTINOIU C. C. Efficacy of Toltrazuril 5% Suspension against *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* in Calves and Observations on the Associated Immunopathology. **Parasitol. Res.** v. 109, p. 113 – 128, 2011.

KHADEM VATAN, S., NEISI, N., MARAGHI, S., SAKI, J. Diagnosis and identification of *Leishmania* spp. From Giemsa-stained slides, by real-time PCR and melting curve analysis in south-west of Iran. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**. v. 105, n. 8, p. 559 – 565, 2011.

KOKOZAWA, T., ICHIKAWA-SEKI, M., ITAGAKI, T. Determination of phylogenetic relationships among *Eimeria* species, which parasitize cattle, on the basis of nuclear 18S rDNA sequence. **The Journal of Veterinary Medicine Science**, Advance Publication, 2013.

KOUTNY, H., JOACHIM, A., TICHY, A., BAUMGARTNER, W. Bovine *Eimeria* species in Austria. **Parasitol. Res.** v. 110, p. 1893 – 1901, 2012.

LENTZE T., HOFER D., GOTTSTEIN B., GAILLARD C., BUSATO A. Prevalence and importance of endoparasites in calves raised in Swiss cow-calf farms (Article in German.) **Dtsch Tierarztl Wochenschr** 106(7):275 – 281, 1999.

MARSHALL, R. N., CATCHPOLE, J., GREEN, J. A., WEBSTER, K. A. Bovine coccidiosis in calves following turnout. **Vet. Rec.** v. 143, p. 366 – 367, 1998.



MATJILA, P. T., PENZHORN, B. L. Occurrence and diversity of bovine coccidia at three localities in South Africa. **Veterinary Parasitology**, v. 104, n. 2, p. 93-102, 2002.

NICOLAS, L., MILON, G., PRINA, E. Rapid differentiation of Old World *Leishmania* species by LightCycle polymerase chain reaction and melting curve analysis. **Journal of Microbiological Methods**. v. 51, p. 295 – 299, 2002.

OGEBENGBE, J.D., HANNER, R.H., BARTA, J.R. DNA barcoding identifies *Eimeria* species and contributes to the phylogenetics of coccidian parasites (Eimeriorina, Apicomplexa, Alveolata). **International Journal for Parasitology**. v. 41, p. 843 – 850, 2011.

REHMAN T. U., KHAN M. N., SAJID M. S., ABBAS R. Z., ARSHAD M., IQBAL Z., IQBAL A. Epidemiology of *Eimeria* and associated risk factors in cattle of district Toba Tek Singh, Pakistan. **Parasitol Res**. v. 108, p. 1171 – 1177, 2011.

SAMBROOK, J., FRITSHC, E.F., MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

STEWART I. D., SMITH R. P., ELLIS-IVERSEN J. *Eimeria* species in cattle on farms in England and Wales. **Vet Rec** v. 162, p. 482 – 483, 2008.

SVENSSON, C., HOOSHMAND-RAD, P., PEHRSON, B., TÖRNQUIST, M., UGGLA, A. Excretion of *Eimeria* oocysts in calves during their first three weeks after turn-out to pasture. **Acta Vet. Scand.** v. 34, p. 175 – 182, 1993.

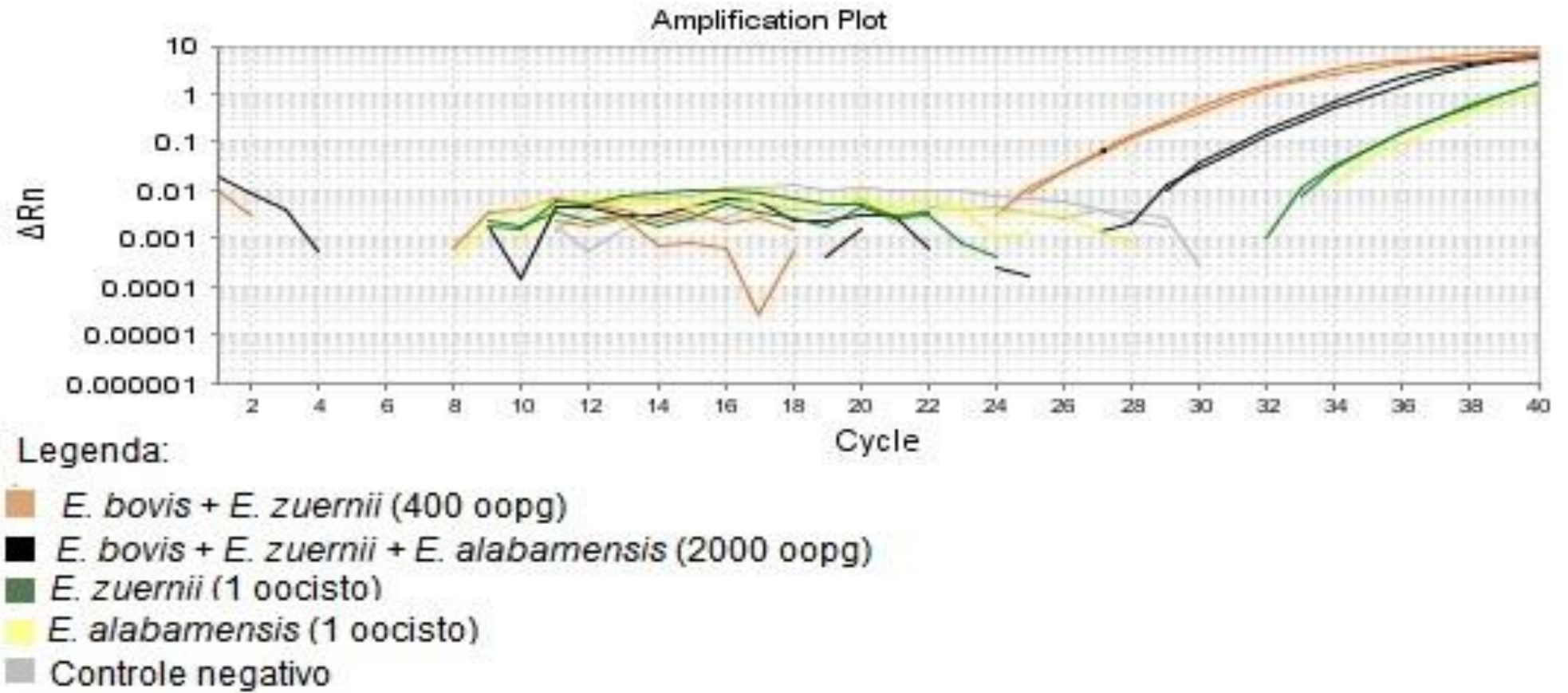
SVENSSON, C., UGGLA, A., PEHRSON, B. *Eimeria alabamensis* infection as a cause of diarrhoea in calves at pasture. **Vet. Parasitol.** v. 53, p. 33 – 43, 1994

SVENSSON, C. Excretion of *Eimeria alabamensis* oocysts in grazing calves and young stock. **J. Vet. Med. B** v. 47, p. 105 – 110, 2000.

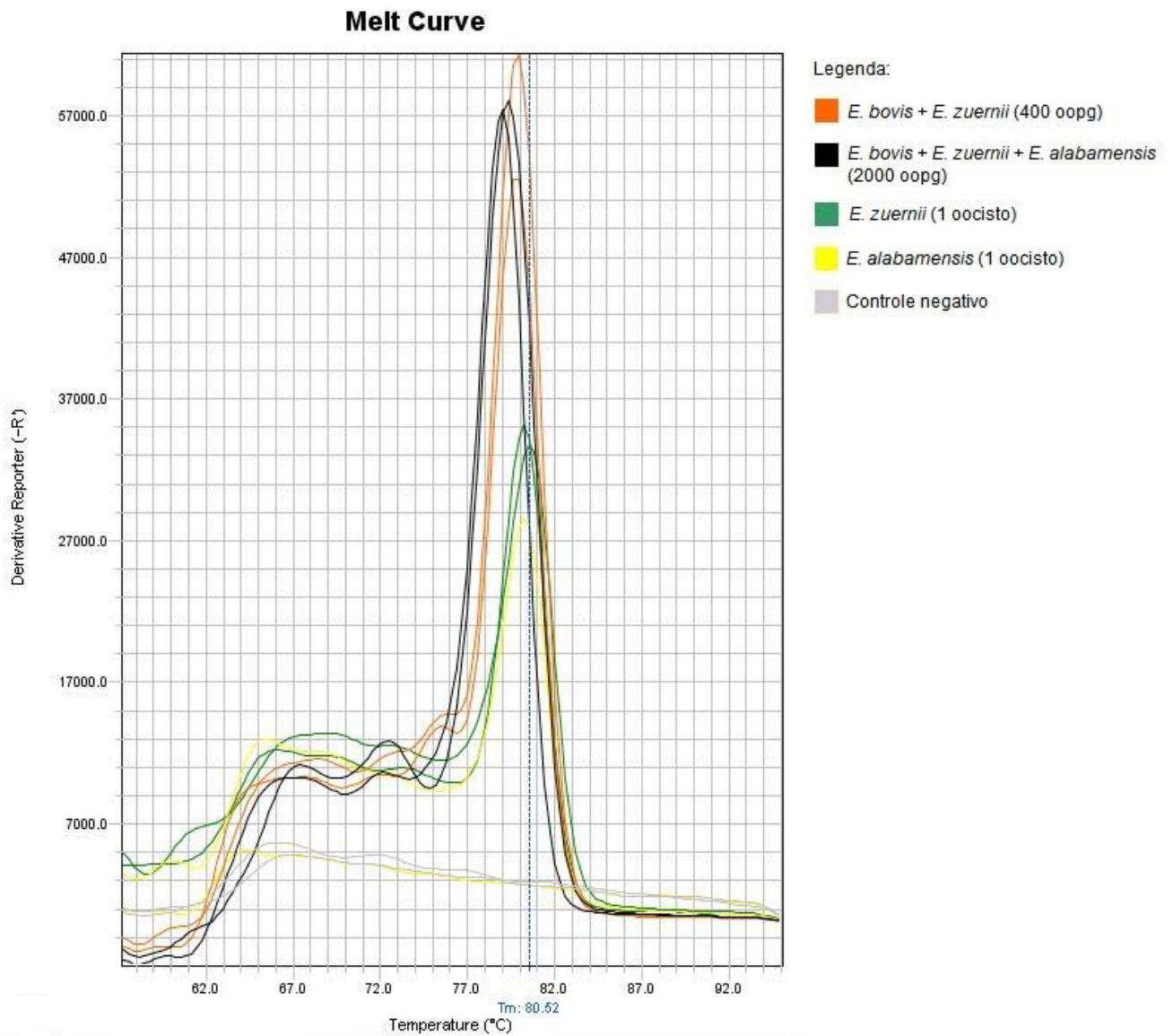
TAYLOR, M.A., CATCHPOLE, J., MARSHALL, J., MARSHALL, R.N., HOEBEN, D. Histopathological observations on the activity of diclazuril (Vecoxan®) against the

endogenous stages of *Eimeria crandallis* in sheep. **Vet. Parasitol.** v. 116, p. 305 – 314, 2003.

Figura 1. Curva de amplificação da qPCR para *Eimeria* spp. baseada na região 18S rRNA.



**Figura 3.** Curva de *melting* da qPCR para *Eimeria* spp. baseada na região 18S rRNA.



**ARTIGO B**

**Desenvolvimento de qPCR para diagnóstico das espécies *Eimeria bovis* e *Eimeria zuernii* em bovinos.**

## RESUMO

A coccidiose bovina é uma das doenças parasitárias mais comuns em bovinos ao redor do mundo, tendo maior importância em animais com menos de um ano de idade. Esta doença é causada por protozoários do gênero *Eimeria*, ocasionando grandes perdas econômicas com tratamento e diminuição na produção. Dentre as mais de 20 espécies descritas deste parasita, as espécies *Eimeria bovis* e *Eimeria zuernii* são consideradas as mais patogênicas. O diagnóstico de rotina é feito através de observação morfológica dos oocistos e para diferenciação das espécies é necessário a esporulação dos mesmos o que leva em torno de 10 dias. O objetivo deste trabalho foi desenvolver primers e padronizar uma técnica diagnóstica específica para as espécies *E. bovis* e *E. zuernii* pelo uso da qPCR, visando um diagnóstico mais rápido destas espécies em bovinos. As qPCRs foram desenvolvidas com a utilização de SYBR Green, tendo como resultado PCRs com uma alta sensibilidade, capaz de amplificar amostras contendo apenas um oocisto para *E. zuernii* e 50 oocistos para *E. bovis*. No teste visando avaliação de especificidade das técnicas ambas as qPCRs apresentaram resultados negativos para amostras contendo *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.. Foi também realizada a curva de *melting* para averiguação da formação de dímeros de primers, os quais continuaram residuais mesmo com a diminuição na concentração dos primers. Demonstra-se nesse estudo a viabilidade na utilização da qPCR no diagnóstico das espécies patogênicas de *Eimeria* spp., *E. bovis* e *E. zuernii*, sendo esta técnica menos laboriosa e com menos necessidade de treinamento para diagnóstico quando comparada com a técnica convencionalmente utilizada em rotina (micromorfometria).

**Palavras-chave:** *Eimeria bovis*, *Eimeria zuernii*, qPCR, coccidiose, ITS-1

## ABSTRACT

Bovine coccidiosis is one of the most common parasitic diseases in cattle around the world and have major importance in animals under one year of age. This disease is caused by protozoa of the genus *Eimeria*, causing major economic losses with treatment and decrease in production. Among the more than 20 described species of this parasite, *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* are considered the most pathogenic. The routine diagnosis is morphological observation of the oocysts and for species differentiation it is necessary to sporulate them, which takes around 10 days. The objective of this work was develop primers and standardize a specific diagnostic technique for the species *E. bovis* and *E. zuernii* using qPCR, aiming a faster diagnosis of these species in cattle. The qPCRs were developed with the use of SYBR Green, resulting in qPCRs with a high sensitivity, capable of amplifying sample containing only one oocyst for *E. zuernii* and 50 oocysts for *E. bovis*. In the test for specificity of the technique, both qPCRs presented negative results for samples containing *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp.. Melting curve was also performed to investigate the formation of primer dimers, which remained residual, even with the decrease in primer concentration. The feasibility of qPCR in the diagnosis of the pathogenic species of *Eimeria* spp., *E. bovis* and *E. zuernii*, is demonstrated in this study, being this technique less laborious and with less necessity of training for diagnosis when compared with the technique conventionally used in routine (micromorphometry).

**Keywords:** *Eimeria bovis*, *Eimeria zuernii*, qPCR, coccidiosis, ITS-1

## 1 INTRODUÇÃO

A coccidiose bovina é umas das parasitoses mais comuns em bovinos ao redor do mundo, com maior importância em animais com menos de um ano de idade (DAUGSCHIES et al., 2004, BRUHN et al., 2011). Esta doença está associada a elevadas perdas econômicas devido a diminuição na produtividade dos animais infectados e aos gastos com medicamentos (ABEBE et al., 2008), causando perdas estimadas de 400 milhões de dólares no mercado americano e um gasto estimado com tratamento em torno de 3,8 milhões de dólares no Canadá (MATJILA & PENZHORN, 2002; REHMAN 2011).

Esta doença é causada pelos protozoários da classe Coccidia, família Eimeriidae e gênero *Eimeria* (BRUHN et al., 2011) possui uma ocorrência bem variada ao redor do mundo (STEWART et al., 2008, ALMEIDA et al., 2011, BRUHN et al., 2011, 2012; KOUTNY et al, 2012).

Dentre as mais de 20 espécies de *Eimeria* spp. descritas em bovinos, *Eimeria bovis* e a *Eimeria zuernii* são consideradas patogênicas, estando associadas a casos de coccidiose clínica em animais jovens (JONSSON et al., 2011; BANGOURA et al., 2011; FLORIÃO et al., 2016).

Para o diagnóstico destes parasitas em rotina, utiliza-se a observação morfológica dos oocistos na microscopia (DAUGSCHIES AND NAJDROWSKI, 2005), e a diferenciação é feita através das características morfológica de cada espécie, após a esporulação em meio ambiente o que pode levar até 10 dias para ocorrer (LEVINE, 1961; ECKERT et al., 1995), tornando esse diagnóstico muito laborioso e exigindo grandes habilidades do leitor. Devido a isso, é essencial desenvolver um diagnóstico que seja rápido e efetivo (KAWAHARA et al., 2010).

Com este intuito, Kawahara et al. (2010) desenvolveram um PCR convencional para o diagnóstico das principais espécies de *Eimeria* em bovinos, dentre elas, *E. bovis* e *E. zuernii*, com primer baseados na região ITS-1 do DNA deste protozoário.

Nos últimos anos, com o desenvolvimento de técnica com capacidade de maior sensibilidade e especificidade de diagnóstico, Tsuchiaka et al. (2016) desenvolveram uma técnica de qPCR para o diagnóstico de *E. bovis* e *E. zuernii* juntamente com outros patógenos causadores de diarreia em bezerros.



Acompanhando estes avanços no diagnóstico das espécies de *Eimeria*, o objetivo deste trabalho foi desenvolver primers e padronizar uma técnica diagnóstica específica para as espécies *E. bovis* e *E. zuernii* pelo uso da qPCR.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 AMOSTRAS

As amostras de fezes de bovinos foram encaminhadas ao laboratório de Parasitologia Veterinária da Universidade Estadual de Londrina. Foram selecionadas 10 amostras positivas para *Eimeria* spp., as quais foram colocadas em microtubos de 2,0 ml e armazenadas em – 20°C para posterior extração.

Para a avaliação da sensibilidade do teste, coletou-se um oocisto de cada uma das seguintes espécies de *Eimeria* spp. de bovinos: *E. bovis*, *E. alabamensis* e *E. zuernii* para extração de DNA. Estes oocistos foram coletados através do auxílio uma pipeta de pasteur de vidro e um microscópio, sendo que cada oocisto foi colocado individualmente em um microtubo de 2,0 ml, diluídos em 300 µl de água miliQ estéril. Estas amostras foram armazenadas à -20°C para posterior extração.

Para avaliação da especificidade dos primers desenvolvidos no estudo foram utilizadas duas amostras de fezes positivas para os seguintes protozoários de bovinos: uma amostra de fezes positiva para *Giardia* spp. e uma amostra positiva para *Cryptosporidium* spp..

### 2.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Para a extração do DNA foram diluídas 25 mg de fezes em 300 µL de água ultrapura estéril e seguiu por três ciclos de congelamento a – 80°C por 10 min e descongelamento a 55° C por 10 min, sendo posteriormente adicionado 15 µL de proteinase K (1mg/ml) e 30 µL de SDS 0,1% e incubados a 55°C *overnight*. Após isso, foi adicionado 300 µL de UltraPure™ Phenol (Invitrogen, USA) e centrifugado a 13.000 g por 5 min. A fase aquosa resultante foi transferida para outro microtubo, adicionando-se 300 µL de UltraPure™ Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol (25:24:1, v/v) (Invitrogen, USA) e novamente centrifugado a 13.000 g por 5 min. A precipitação de DNA por acetato de sódio e etanol foi realizada através do método descrito por Sambrook et al.(1989). Os microtubos contendo o DNA extraído foram armazenados em – 20°C para posterior utilização.

Já para a extração das amostras contendo um oocisto de cada espécie individualmente, os mesmos no momento da coleta foram diluídos em 300 µl de água miliQ estéril, passando posteriormente pelos ciclos de congelamento e descongelamento e a todo o processo de extração de DNA descrito anteriormente para as amostras de fezes.

### 2.3 DESENHO DOS PRIMERS

Tanto para *E. bovis* quanto para *E. zuernii* os primers foram desenhados baseados na região ITS-1 a partir das seguintes sequências disponíveis no GeneBank: *E. bovis* (AB557613.1; AB557614.1; AB557615.1) e *E. zuernii* (AB557622.1; AB557623.1; AB557624.1).

Após a seleção das sequências, os primers foram alinhados utilizando-se o programa BioEdit. Após o alinhamento, uma determinada região, para cada uma das espécies, foi selecionada e utilizada posteriormente para o desenho dos primers, o qual foi realizado com o programa Primer Express 3.0.1 (Thermo Fisher Scientific, USA). Os primers obtidos foram: para *E. bovis* – EimBovisF (TGC TCC CTT GTT GCA TTT CC) e EimBovisR (AGT TTA CAG GGT TTT GGA GGT GAT); para *E. zuernii* – EimZuerniiF (TGG TTG GCC TGT TGT GGA TA) e EimZuerniiR (CCA CAG TCT TGG AAA TGC CAT A).

Os primers desenvolvidos para ambas as espécies foram avaliados no Blast e apresentaram similaridade apenas com as espécies para as quais foram desenvolvidos.

### 2.4 AMPLIFICAÇÃO DA PCR

Para ambas as qPCRs, foi utilizada uma reação total de 10 µL para a amplificação, a qual continha: 5 µL de SyBR<sup>®</sup> Select Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA), 200 nM de cada primer (EimBovisF e EimBovisR para *E. bovis*; EimZuerniiF e EimZuerniiR para *E. zuernii*), 0,4 µL BSA (1 mg/ml) e 1 µL de DNA. O ciclo de reação para ambas as espécies se consistiu em uma desnaturação inicial a 95° C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 94° C por 15 s, 57° C por 30 s e 72° C por 30 s (estágio no qual foi realizada a leitura). Posteriormente, para realização da curva de

*melting* 94°C por 15 s e depois 57°C por 1 min com um aumento de temperatura até 95°C com leitura a cada 0,3°C.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o presente estudo foi selecionado o gene ITS-1 pelo fato de que este gene apresenta uma alta variabilidade interespecies e baixa variabilidade dentro da mesma espécie (KAWAHARA et al, 2010), o que torna possível o desenvolvimento de primers com uma melhor acurácia e menor risco de amplificação de espécies não desejadas.

Ao analisar a sensibilidade da técnica observou-se que a qPCR desenvolvida para *E. zuernii* apresentou a capacidade de amplificação de amostras contendo apenas um oocisto do parasita, conforme demonstrado na figura abaixo (Fig. 1). Já a qPCR desenvolvida para *E. bovis* foi capaz de amplificar amostras de campo contendo 50 oocistos do protozoários. (Fig. 2). Kawahara et al. (2010), trabalharam com o desenvolvimento de PCR convencional para *E. bovis* e *E. zuernii* utilizando o mesmo gene ITS-1 e utilizaram amostras contendo  $10^4$  oocistos/ml de uma mistura com seis diferentes espécies de *Eimeria*, tornando difícil a comparação da sensibilidade encontrada nos dois estudos.

Já Tsuchiaka et al. (2016) desenvolveram uma técnica de qPCR visando o diagnóstico de *E. bovis* e *E. zuernii* juntamente com outros patógenos encontrados em fezes de bezerros. Para o desenho dos primers e probes também foi utilizada o gene ITS-1, conseguindo-se como resultado a capacidade de amplificação de 100 cópias de DNA sintetizado comercialmente contendo as sequências genômicas de interesse para ambas as espécies, porém não foram realizados testes dos primers e probes em amostras de fezes, inviabilizando a comparação de sensibilidade com o presente estudo.

Para a avaliação da especificidade das qPCRs, utilizou-se amostras de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., sendo quem para ambas as qPCRs tanto as amostras contendo *Cryptosporidium* spp., quanto as amostras contendo *Giardia* spp. foram negativas, demonstrando assim a especificidade dos primers desenvolvidos.

Por serem técnicas desenvolvidas com SYBR Green como fonte de fluorescência, tornou-se necessário a realização de curva de melting ao final de cada PCR, para avaliação da formação de dímeros de primers. Nas duas técnicas foi possível observar uma pequena formação de dímeros de primers, principalmente nos controle negativos (Fig. 3 e 4).

Esta formação de dímeros de primers é relativamente comum em qPCR que utiliza SYBR Green (PONCHEL et al., 2003), sendo que a melhor alternativa para a não ocorrência dos mesmos seria a utilização de probes, porém optou-se neste estudo pela utilização do SYBR Green visando um custo menor para viabilização da utilização das técnicas em exames de rotina.

#### 4 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que as técnicas de qPCR desenvolvidas para as espécies *E. bovis* e *E. zuernii* apresentaram uma boa sensibilidade e especificidade, o que é viável para utilização no diagnóstico dessas espécies em rotina, visando assim um diagnóstico mais rápido destes protozoários em bovinos. O desenvolvimento de probes para uso em TaqMan qPCR no futuro deverá auxiliar no diagnóstico.

## REFERÊNCIAS

- ABEBE, R., WOSSENE, A., KUMSA, B. Epidemiology of *Eimeria* infections in calves in Addis Ababa and Debre Zeit dairy farms, Ethiopia. **Int J Appl Res Vet Med**. V. 6 p. 24 – 30, 2008.
- BANGOURA B., MUNDT H. C., SCHMÄSCHKE R., WESTPHAL B., DAUGSCHIES A. Prevalence of *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* in German Cattle Herds and Factors Influencing Oocyst Excretion. **Parasitol. Res.** v. 109, p. 129 – 138, 2011.
- BRUHN F. R. P., LOPES M. A., DEMEU F. A., PERAZZA C. A., PEDROSA M. F., GUIMARÃES A. M. Frequency of species of *Eimeria* in females of the holstein.friesian breed at the post-weaning stage during autumn and winter. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 20, n. 4, p. 303 – 307, out – dez, 2011.
- DAUGSCHIES, A., IMAROM, S., GANTER, M., BOLLWAHN, W. Prevalence of *Eimeria* spp. in sows at piglet producing farms in Germany. **J. Vet. Med. B.** v. 51, p. 135 – 139, 2004.
- DAUGSCHIES, A., NAJDROWSKI, M. Eimeriosis in Cattle: Current Understanding. **J. Vet. Med. B.** v. 52, p. 417 – 427, 2005.
- ECKERT, J., TAYLOR, M., CATCHPOLE, J., LICOIS, D., COUDERT, P., BUCKLAR, H. Morphological characteristics of oocysts. In: Eckert J, Braun R, Shirley MW, Coudert P. **Biotechnology guidelines on techniques in coccidiosis research**. 1<sup>st</sup> ed. Luxembourg: European Commission, p. 103-119, 1995.
- FLORIÃO, M.M., LOPES, B.B., BERTO, B.P., LOPES, C.W.G. New approaches for morphological diagnosis of bovine *Eimeria* species: a study on a subtropical organic dairy farm in Brazil. **Tropical animal health and production**. v. 48, n. 3, p. 577 – 584, 2016.



JONSSON N. N., PIPER E. K., GRAY C. P., DENIZ A., CONSTANTINOIU C. C. Efficacy of Toltrazuril 5% Suspension against *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* in Calves and Observations on the Associated Immunopathology. **Parasitol. Res.** v. 109, p. 113 – 128, 2011.

KAWAHARA F., ZHANG G., MINGALA C.N., TAMURA Y., KOIWA M., ONUMA M., NUNOYA T. Genetic analysis and development of species-specific PCR assays based on ITS1 region of rRNA in bovine *Eimeria* parasites. **Vet Parasit.**, v. 174, p. 49–57, 2010.

KOUTNY, H., JOACHIM, A., TICHY, A., BAUMGARTNER, W. Bovine *Eimeria* species in Austria. **Parasitol. Res.** v. 110, p. 1893 – 1901, 2012.

LEVINE, N.D. **Protozoan parasites of domestic animals and of man.** Burgess Publishing Company, p. 166-178, 1961.

MATJILA, P. T., PENZHORN, B. L. Occurrence and diversity of bovine coccidia at three localities in South Africa. **Veterinary Parasitology**, v. 104, n. 2, p. 93-102, 2002.

PONCHEL, F., TOOMES, C., BRANSFIELD, K., LEONG, F.T., DOUGLAS, S.H., FIELD, S.L., BELL, S.M., COMBARET, V., PUISIEUX, A., MIGHELL, A.J., ROBINSON, P.A., INGLEHEARN, C.F., ISAACS, J.D., MARKHAM, A.F. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. **BMC Biotechnology**. v. 3, n.18, p. 1 – 13, 2003.

REHMAN T. U., KHAN M. N., SAJID M. S., ABBAS R. Z., ARSHAD M., IQBAL Z., IQBAL A. Epidemiology of *Eimeria* and associated risk factors in cattle of district Toba Tek Singh, Pakistan. **Parasitol Res.** v. 108, p. 1171 – 1177, 2011.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

STEWART I. D., SMITH R. P., ELLIS-IVERSEN J. *Eimeria* species in cattle on farms in England and Wales. **Vet Rec** v. 162, p. 482 – 483, 2008.

TSUCHIAKA, S., MASUDA, T., SUGIMURA, S., KOBAYASHI, S., KOMATSU, N., NAGAI, M., OMATSU, T., FURUYA, T., OBA, M., KATAYAMA, Y., KANDA, S., YOKOYAMA, T., MIZUTANI, T. Development of a novel detection system for microbes from bovine diarrhea by real-time PCR. **J. Vet. Med. Sci.** v. 78, n. 3, p. 383 – 389, 2016.

Figura 1. Curva de amplificação da qPCR para *Eimeria zuernii* em bovinos.

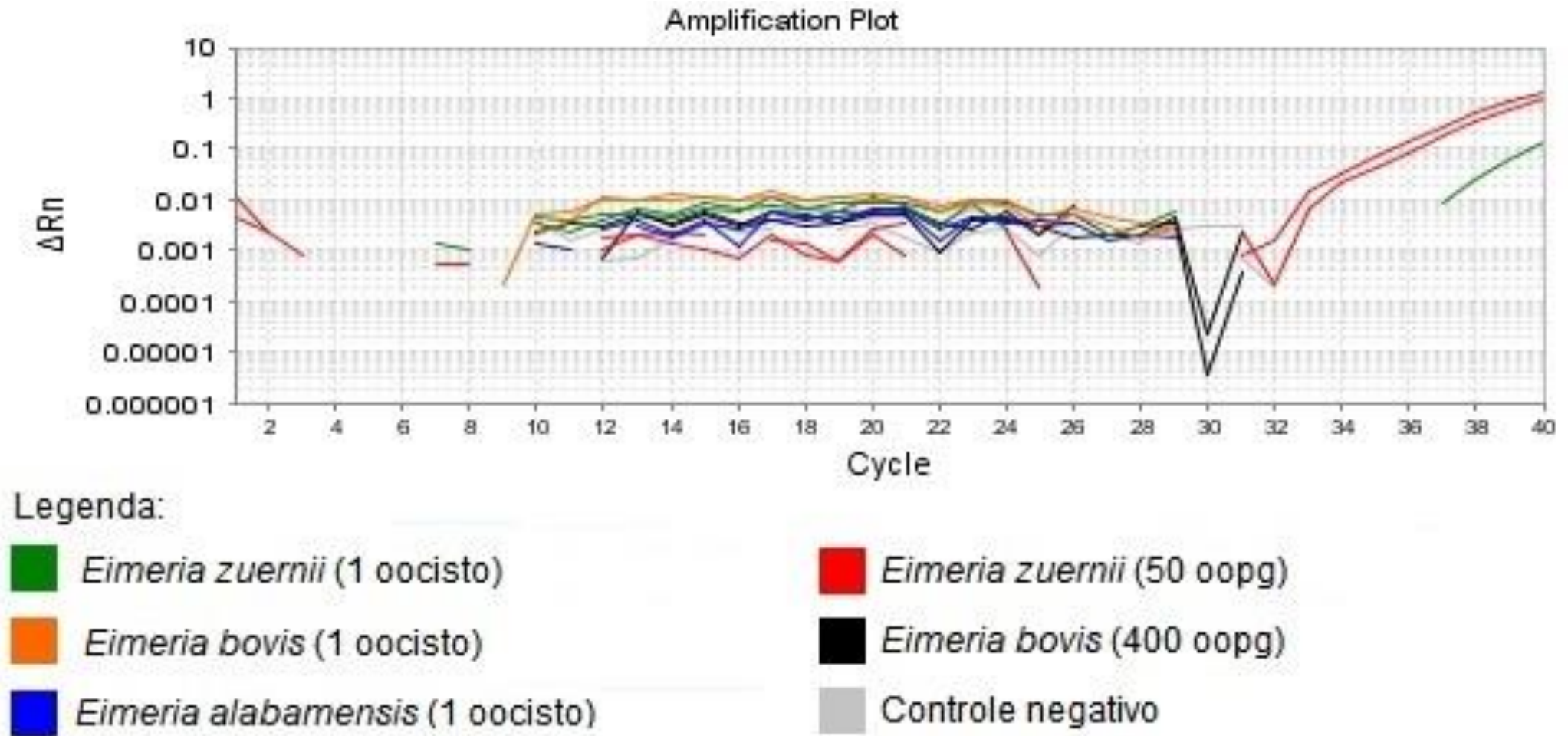


Figura 2. Curva de amplificação da qPCR para *Eimeria bovis* em bovinos.

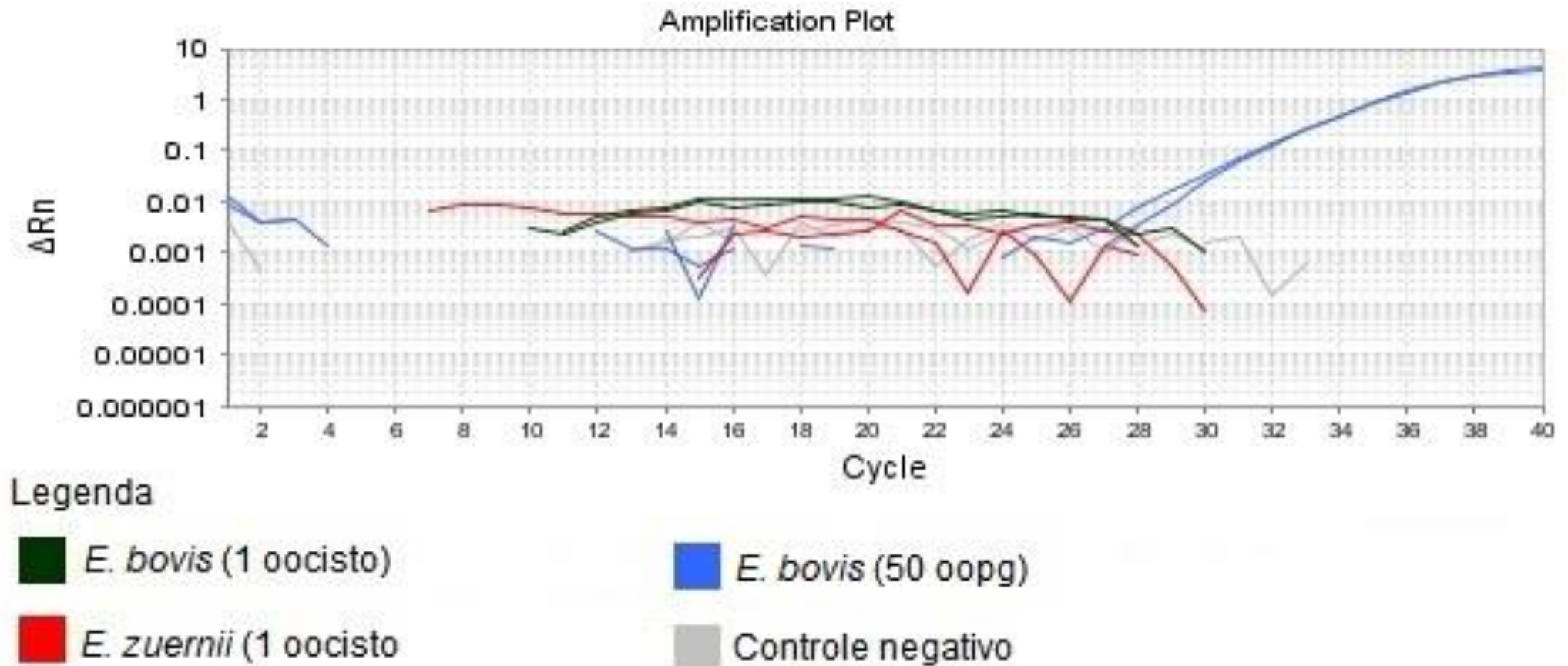


Figura 3. Curva de *melting* da qPCR para diagnóstico da espécie *E. zuernii* em bovinos.

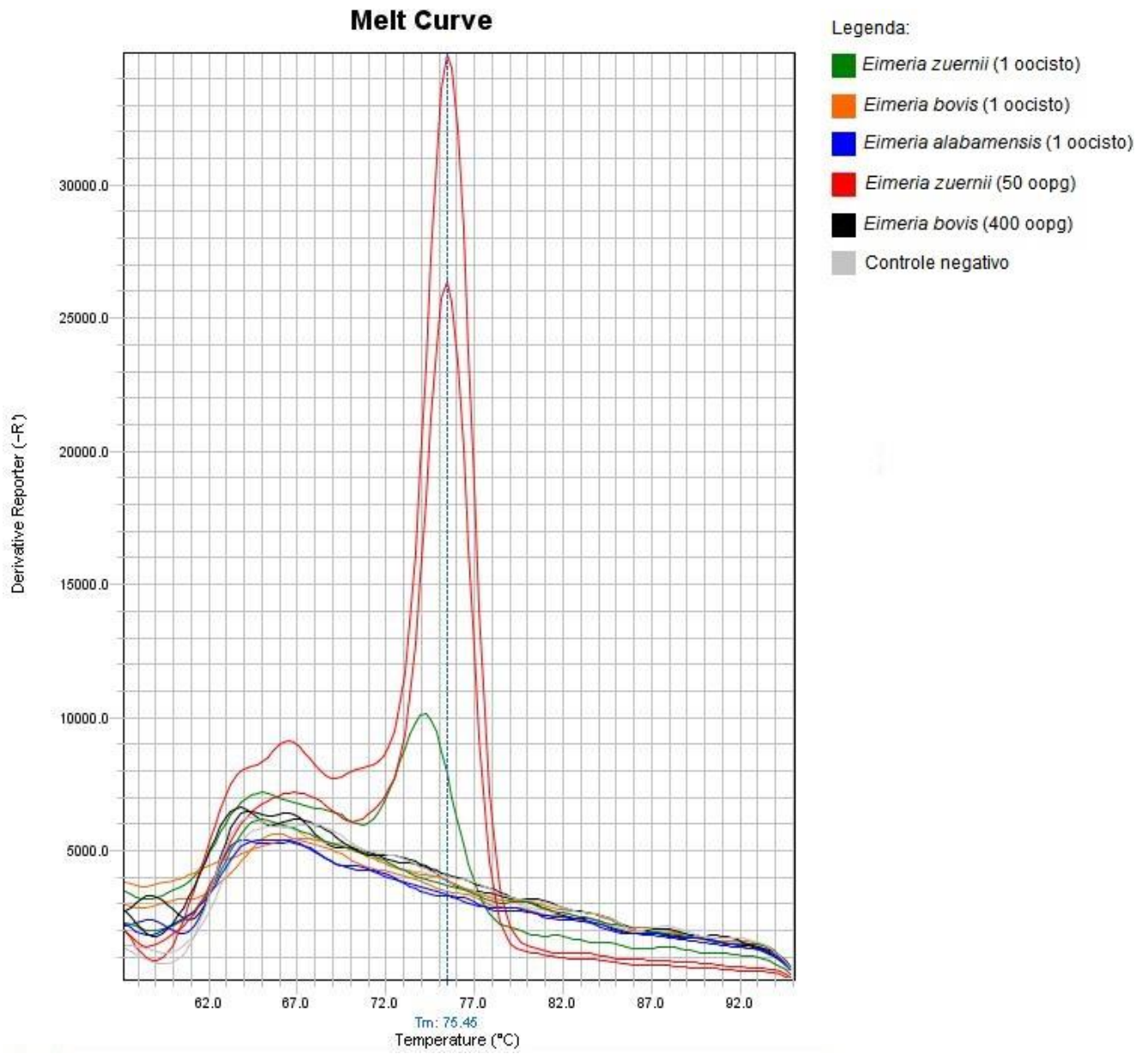
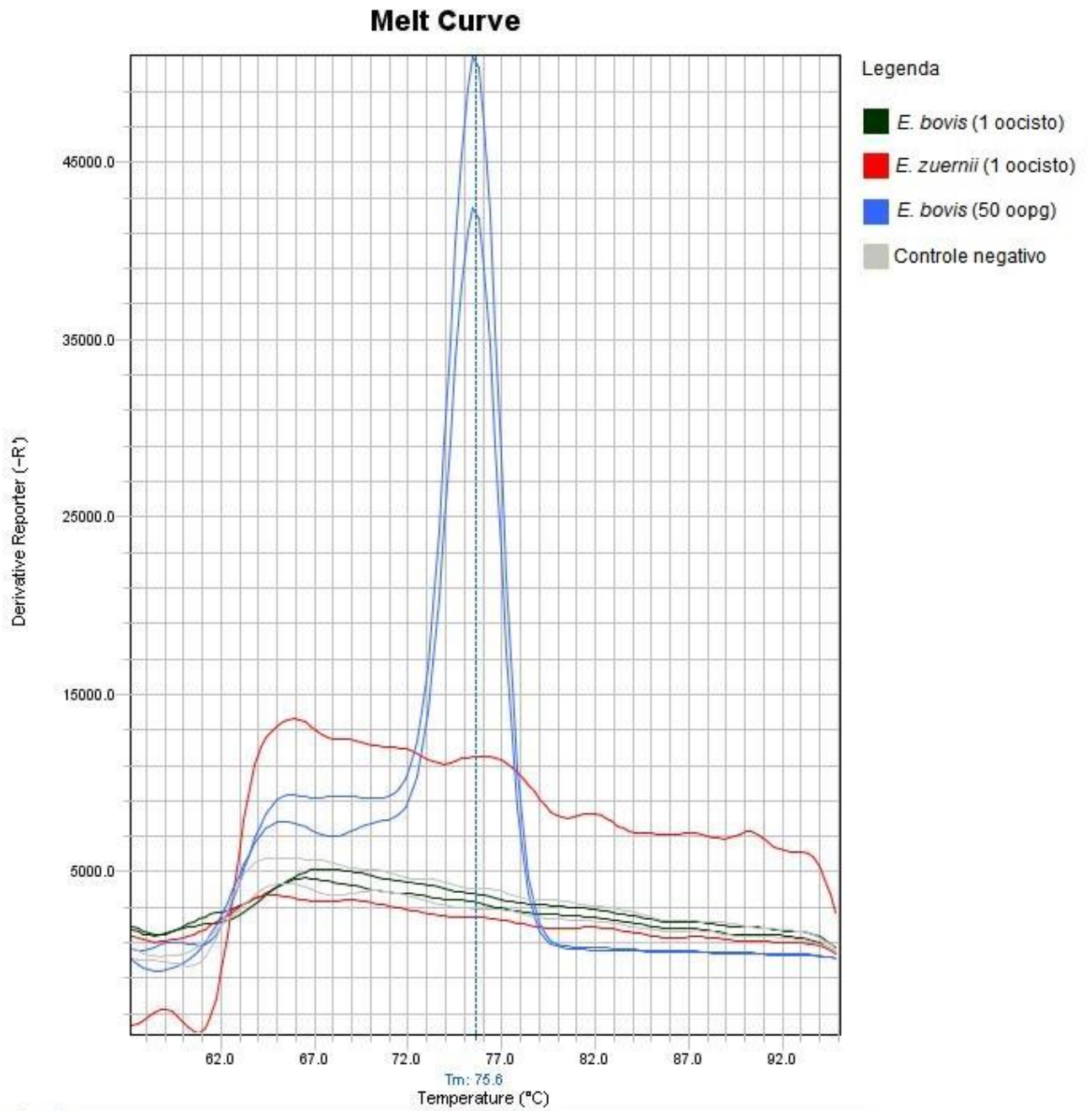


Figura 4. Curva de *melting* da qPCR para diagnóstico da espécie *E. bovis* em bovinos.



## CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Poucos estudos sobre a prevalência de *Eimeria* spp. em bovinos foram realizados no Brasil, tornando necessário mais dados, com o intuito de um maior conhecimento sobre a distribuição deste parasita no território nacional.
- Os primers desenhados foram sensíveis e específicos no diagnóstico de gênero e espécies testadas.
- A qPCR é uma técnica que irá diminuir o tempo para o diagnóstico de rotina tanto do gênero *Eimeria* quanto das espécies *E. bovis* e *E. zuernii*.
- O desenvolvimento de probes para padronizar uma TaqMan qPCR multiplex deve ser realizado no futuro, visando a realização de uma técnica capaz de diagnosticar o gênero e espécies (*E. bovis* e *E. zuernii*) em uma única reação.