



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA**

LOUISE DE ASSIS RABELLO

**Ocorrência de Sarcocystis (Apicomplexa: Sarcocystidae) em búfalos da Ilha de Marajó,
Estado do Pará, Brasil.**

**BELÉM
2016**

LOUISE DE ASSIS RABELLO

**Ocorrência de Sarcocystis (Apicomplexa: Sarcocystidae) em búfalos da Ilha de Marajó,
Estado do Pará, Brasil.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia: área de concentração Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Raimundo Nonato Moraes Benigno
Co-Orientação: Prof. Dr. Gustavo Goés Cavalcante

**BELÉM
2016**

Rabello, Louise de Assis

Ocorrência de *Sarcocystis* (Apicomplexa: Sarcocystidae) em búfalos da Ilha de Marajó, Estado do Pará, Brasil. / Louise de Assis Rabello. - Belém, 2016.

36 f.

Monografia (Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2016.

Orientador: Raimundo Nonato Moraes Benigno

1. *Bubalus bubalis* – Sarcocistose 2. Coração - indicador biológico 3. Língua - indicador biológico 4. Doença parasitária I. Benigno, Raimundo Nonato Moraes, (Orient.) II. Título.

CDD – 636.2923696

LOUISE DE ASSIS RABELLO

**Ocorrência de Sarcocystis (Apicomplexa: Sarcocystidae) em búfalos da Ilha de Marajó,
Estado do Pará, Brasil.**

Dissertação apresentada à universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia: área de concentração Produção Animal.

Aprovado em ____ de _____ de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Raimundo Nonato Moraes Benigno – Orientador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Prof. Dr^a. Hilma Lúcia Tavares Dias – 1º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

Prof. Dr^a. Fernanda Martins Hatano – 2º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira – 3º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

A minha mãe por ser a grande responsável pela minha formação pessoal, por todo carinho, incentivo e apoio dado ao longo de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, o centro e o fundamento de tudo em minha vida, por renovar a cada momento a força e disposição, e pelo discernimento concedido nessa jornada.

A minha mãe responsável por tudo que sou hoje, sem você em minha vida nada disso seria possível. A você expresse meu maior agradecimento.

Ao meu noivo Lair Meneses que compartilhou comigo esta jornada, por esta ao meu lado no momento de maior angústia que passei durante a realização deste trabalho, pelo incentivo que me deu de continuar, por toda dedicação, ajuda e paciência.

Ao meu orientador professor Raimundo Benigno que me acolheu de braços abertos, me conduzindo pelos caminhos da pesquisa com paciência e maestria.

Ao Laboratório de parasitologia Animal/UFRA, em especial ao Thiago Mangas e Ricardo Souza, pela colaboração com a coleta das amostras e realização de uma das técnicas aplicadas.

Ao professor Gustavo Cavalcante por ter me mostrado os caminhos da biologia molecular, por todo acolhimento, ensinamentos e direcionamento para realização desta pesquisa. Muito obrigada por tudo!

Em nome da professora Alessandra Scolfield e dos meus grandes amigos Dantas Júnior, Diana, Flávia, Sidney e Márcio, agradeço imensamente a equipe, ou melhor, a família do Laboratório de Parasitologia/UFPA-Castanhal, vocês foram essenciais para que eu conseguisse chegar ao término deste trabalho, muito obrigada por todo acolhimento, ajuda, disponibilidade, apoio e amizade, vocês são exemplos de grande união que deve existir em todas as equipes.

Ao meu amigo Gilmar Galvão pelo apoio e ajuda nos momentos que precisei.

Ao professor Jessivaldo Galvão pela disponibilidade em me ajudar a realizar a Bioestatística.

A secretaria do programa de Pós-graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia, especialmente ao Jaime, pela disponibilidade em me ajudar sempre que precisei.

As minhas queridas amigas Priscila, Siane, Mayara, Izabela, Thais e Marcela por sempre estarem comigo me fazendo rir nos meus momentos de estresse, por me ajudarem a dar continuidade na graduação nos momentos que precisei esta ausente das aulas por causa desta pesquisa.

A equipe do IFPA/Ananindeua, em especial professor Rodrigo e Denis, pela ajuda com a estatística e pelos muitos impressos que precisei.

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis." **(José de Alencar)**.

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

ABEG – Associação Brasileira de Exportadores de Gado

DNA – Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)

dNTP's – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DP – Digestão Peptídica

HD – Hospedeiro Definitivo

HI – Hospedeiro Intermediário

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ME – Miosite eosinofílica

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

pb – Pares de Base

PV – Protrusões Vilares

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia Mediada pela Polimerase)

rDNA – recombinant DNA (recombinante DNA)

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo do Tamanho de Fragmento de Reação)

TEM – Transmission Electron Microscopy (Microscopia Eletrônica de Transmissão)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Dados resumidos da literatura	12
Figura 2.	Esporocistos (direita) e oocistos (esquerda) obtidos em fezes de voluntários humanos experimentalmente infectados por <i>Sarcocystis hominis</i> . Barra: 10µm	13
Figura 3.	Cisto de <i>Sarcocystis</i> (setas) observado na escarificação do coração (A) e da língua (B) de bovinos abatidos em Belém – PA, no período de junho a agosto de 2013. Aumento de 100X.....	14
Figura 4.	Sarcocistos (setas) em uma vaca iraniana de dois anos de idade.....	14
Figura 5.	Microscopia de luz (1) e eletrônica (2 e 3) mostrando as protrusões em forma de vilo do cisto de <i>S. cruzi</i> (v) dobradas sobre a parede do sarcocisto (g); m: músculo do hospedeiro.....	15
Figura 6.	Cisto macroscópico de <i>S. fusiformis</i> na musculatura do esôfago de búfalo. Barra = 10mm.....	16
Figura 7.	<i>S. buffalonis</i> no musculo esofagiano de búfalo (setas), algumas vezes aparecem distorcidos devido a tensão pós-morte dos músculos (cabeça de seta).....	17
Figura 8.	Sarcocisto intralesional desarranjado (seta), circundado por granulócitos eosinofílicos e fibras musculares (cabeça de seta). Coloração HE - barra = 50µm.....	19
Figura 9.	Corte da musculatura do quarto traseiro de uma vaca de corte apresentando múltiplas lesões de miosite eosinofílica, de coloração esverdeada.....	20
Figura 10.	Cisto macroscópico presente no esôfago.....	21
ARTIGO		
Figura 1.	Bradizoítos de <i>Sarcocystis</i> spp. (setas) observados em amostra de coração de búfalo.....	31
Figura 2.	Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação da PCR para detecção de DNA de <i>Sarcocystis</i> spp. em amostras de coração de búfalos. Marcador molecular de 100 pares de base (MM); Controle positivo (C+); Controle Negativo (C -); Amostras positivas (2 e 3); Amostras negativas (1 e 4); Branco da reação (B).....	32

RESUMO

O protozoário do gênero *Sarcocystis* apresenta mais de 200 espécies parasitando uma grande variedade de animais, com uma forte relação presa-predador. Os animais de produção são importantes fontes de infecção para os hospedeiros definitivos através do consumo de suas carnes e vísceras in natura ou indevidamente processadas, por apresentarem a forma cística do parasito em suas células musculares. Os bubalinos participam na cadeia epidemiológica de cinco a seis espécies, incluindo *S. homininis* que é zoonótico. Neste contexto, o presente estudo objetiva caracterizar a participação do rebanho bubalino marajoara na cadeia epidemiológica da sarcocistose, utilizando como indicador biológico amostras de coração e língua coletadas em um abatedouro estadual localizado na cidade de Belém, Estado do Pará. As amostras foram processadas no Laboratório de Parasitologia Animal da Universidade Federal Rural da Amazônia – campus Belém e da Universidade Federal do Pará – campus Castanhal, utilizando-se a técnica de digestão peptídica e PCR. A infecção foi detectada em todas as amostras de coração e língua na técnica de digestão peptídica e pela PCR foram 51% e 50% das amostras de coração e língua, respectivamente, comprovando-se a grande susceptibilidade do rebanho de búfalos marajoara, potencializando o risco zoonótico do *Sarcocystis* spp.

Palavras-chave: Sarcocistose. *Bubalus bubalis*. Coração. Língua.

ABSTRACT

The protozoan *Sarcocystis* genus has more than 200 species parasitizing a wide variety of animals, with a strong prey-predator relationship. Farm animals are important sources of infection for definitive hosts through the consumption of their meat and offal raw or improperly processed because they had the cystic form of the parasite in their muscle cells. The buffaloes participate in the epidemiological chain of five to six species, including *S. homininis* which is zoonotic. In this context, this study aims to characterize the participation of marajoara buffalo herd in the epidemiological chain sarcocystosis, using as a biological indicator samples of heart and tongue collected in a state slaughterhouse located in the city of Belem, State of Pará. The samples were processed in the laboratory Animal Parasitology of the Amazon Federal Rural University - Bethlehem campus and the Federal University of Pará - Castanhal campus, using the peptide and PCR digestion technique. The infection was detected in all heart samples and language in the peptide digestion technique and PCR was 51% and 50% of samples heart and tongue, respectively, confirming the great susceptibility of the herd marajoara buffalo, increasing the risk zoonotic of *Sarcocystis* spp.

Keywords: Sarcocystosis. *Bubalus bubalis*. Heart. Tongue.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 CONTEXTUALIZAÇÃO..... 12

REFERÊNCIAS..... 23

**2 OCORRÊNCIA DE SARCOCYSTIS (APICOMPLEXA: SARCOCYSTIDAE)
EM BÚFALOS DA ILHA DE MARAJÓ, ESTADO DO PARÁ, BRASIL..... 26**

RESUMO

ABSTRACT

2.1 Introdução..... 28

2.2 Material e Métodos..... 29

2.3 Resultados..... 30

2.4 Discussão..... 33

2.5 Conclusão..... 35

REFERÊNCIAS..... 35

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

O gênero *Sarcocystis* (Alveolata: Apicomplexa: Coccidea) é um protozoário intracelular que evoluiu em dois hospedeiros, com uma relação presa-predador, apresentando o maior número de espécies da família Sarcocystidae (TENTER; JOHNSON, 1997). São mais de 200 espécies nomeadas que infectam mamíferos, aves, marsupiais e animais poiquilotérmicos (DUBEY; LINDSAY, 2006). A maioria das espécies é descrita em hospedeiro intermediário, e um ciclo de vida completo é verificado para menos da metade deles. Várias combinações de hospedeiros intermediários/definitivos são conhecidas e são colocados em ordem do mais comum: mamíferos/mamíferos, mamíferos/répteis, répteis/répteis, mamíferos/aves, aves/mamíferos, aves/pássaros (Figura 1) (PRAKAS; BUTKAUSKAS, 2012).

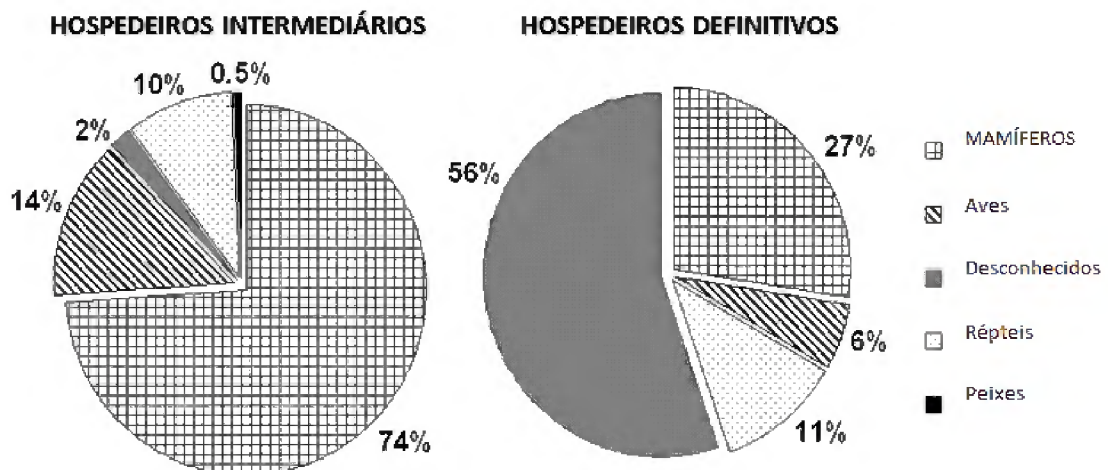


Figura 1 Dados resumidos da literatura (Fonte: PRAKAS; BUTKAUSKAS, 2012).

Os bovinos e bubalinos participam efetivamente na cadeia epidemiológica do *Sarcocystis* spp. como hospedeiros intermediários (HI), sendo reconhecidas em bovinos as espécies *S. cruzi*, *S. hirsuta* e *S. hominis* e em bubalinos as espécies *S. fusiformis*, *S. buffalonis*, *S. levinei* e *S. dubeyi* (DAPTARDARKAR et al., 2016). Experimentalmente, os bubalinos também podem atuar como hospedeiros intermediários do *S. cruzi* (CHEN; ZUO; HU, 2003).

Foi comprovado, através de infecção experimental, que os búfalos adquirem a infecção ao serem desafiados com esporocistos de *S. hominis*, gerando cistos teciduais microscópicos na musculatura esquelética. Na necropsia, 119 dias pós-infecção, foram detectados aproximadamente 5000 sarcocistos por grama de tecido. Adicionalmente, os

sarcocistos gerados pelo bubalino foram infectivos para dois voluntários humano, confirmando sua identidade como *S. hominis* (CHEN; ZUO; HU, 2003).

Através de dados obtidos em infecção experimental em bovinos, a partir de oocistos obtidos em fezes humana, Dubey et al. (2015) descreveram uma nova espécie em có-infecções com *S. hominis*, com base nos exames de microscopia óptica e eletrônica. A espécie nova foi denominada de *S. heydorni* em homenagem ao Dr. Alfred Otto Heydorne.

No seu desenvolvimento, ocorrem as fases de multiplicação típica dos protozoários Apicomplexa, cujas denominações e respectivos indivíduos gerados (entre parênteses) são: esporogonia (esporozoítos), merogonia (merozoítos), poliendodiogonia (metrócitos), endodiogonia (bradizoítos) e gametogonia (macro e microgametócitos). Os esporozoítos são indivíduos gerados no oocisto ao final do processo de multiplicação esporogônica, apresentando uma configuração 1:2:8, significando que um oocisto gera inicialmente dois esporocistos, cada um gerando quatro esporozítos, totalizando oito. Nas espécies de *Sarcocystis*, esta fase de multiplicação assexuada ocorre no hospedeiro definitivo e os oocistos gerados podem ser eliminados nas fezes íntegros (com dois esporocistos) ou, o que mais comumente ocorre, desintegrarem durante o transito intestinal, devido sua fina parede, liberando nas fezes os esporocistos (Figura 2) (FAYER, 2004).

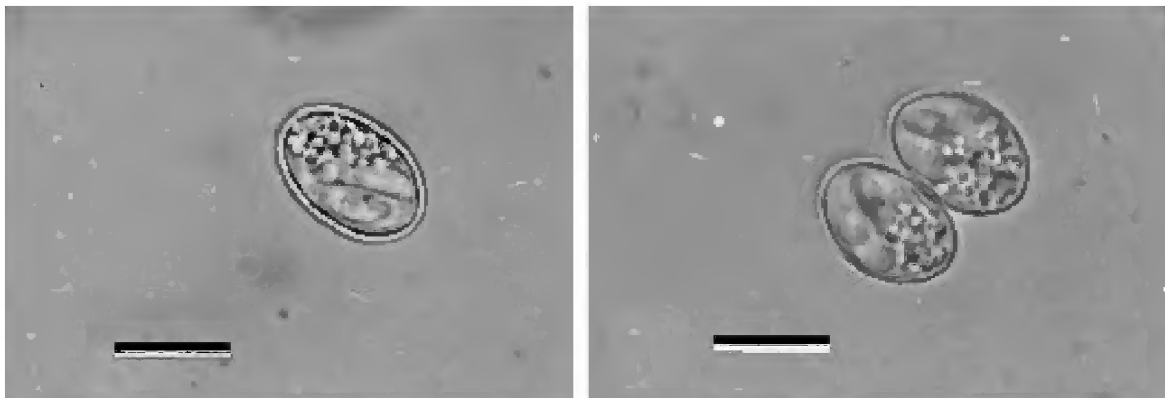


Figura 2 Esporocistos (direita) e oocistos (esquerda) obtidos em fezes de voluntários humanos experimentalmente infectados por *Sarcocystis hominis*. Barra: 10 μ m (Fonte: CHEN; ZUO; HU,2003).

A descrição geral do ciclo no hospedeiro intermediário segue as informações exaradas no trabalho de Dubey et al. (1989). Estes oocistos ou esporocisto ao ser ingerido por um hospedeiro intermediário susceptível alcança o intestino delgado, sofre rompimento liberando os quatro esporozoítos. Estes se tornam móveis, migram através do epitélio intestinal, eventualmente penetram nas células endoteliais de pequenas artérias de todo corpo, iniciando a primeira de quatro gerações assexuadas, denominadas de esquizogonia ou merogonia,

produzindo esquizontes com numerosos merozoítos, aproximadamente 15 a 16 dias pós-infecção. Gerações subsequentes de merozoítos ocorrem em arteríolas, capilares, vênulas e veias em todo corpo do hospedeiro e a última geração assexuada ocorre nos músculos. Nas células musculares de vários órgãos, estes merozoítos, tornam-se arredondados para formar os metrócitos (células mãe) e iniciam a formação da forma do cisto, denominado de sarcocisto (Figura 3 e 4).

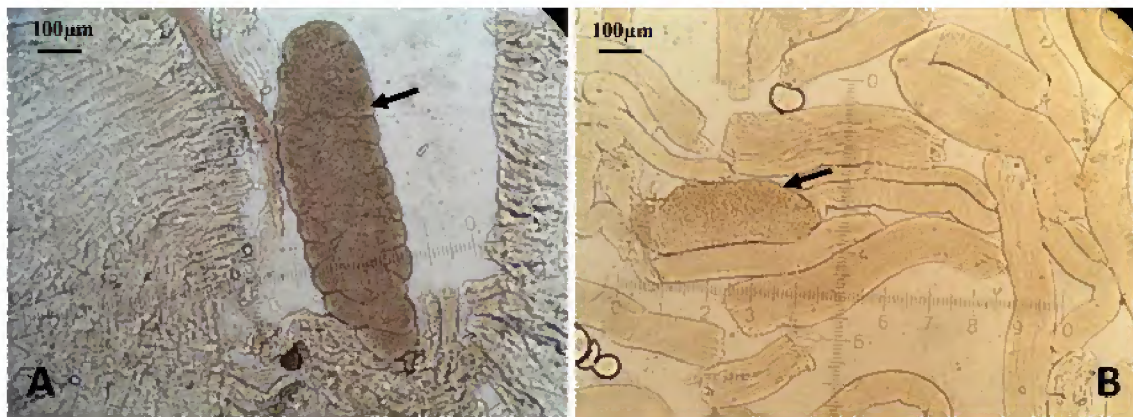


Figura 3 Cisto de *Sarcocystis* (setas) observado na escarificação do coração (A) e da língua (B) de bovinos abatidos em Belém – PA, no período de junho a agosto de 2013. Aumento de 100X. (Fonte: MANGAS et al., 2014).

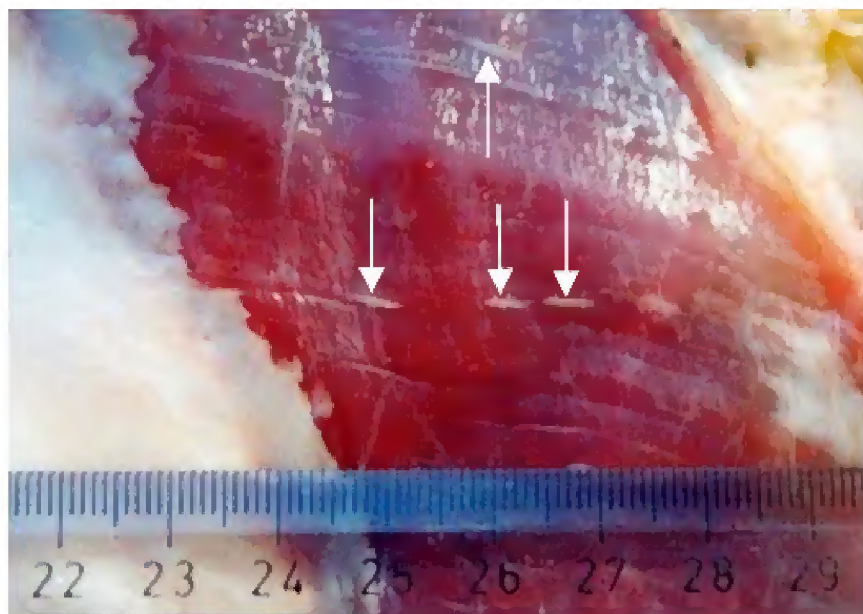


Figura 4 *Sarcocistos* (setas) em uma vaca iraniana de dois anos de idade (Fonte: SHEKARFOROUSH; RAZAVI; ABBASVALI, 2013).

Estes cistos tissulares são metabolicamente ativos, pois a atividade da fosfatase ácida analisada em sarcocistos de *S. fusiformis* de búfalos foi intensa nos septos, moderada nos metrócitos e cistozoítos e ausente na parede do sarcocisto. Já a atividade da fosfatase alcalina

foi moderada nos metrócitos e cistozoítos e ausente na parede do sarcocisto (CHAUDHRY; KUSHWAH; SHAH, 1986).

Os sarcocistos variam em tamanho e forma, dependendo da espécie do parasito. Alguns sempre permanecem microscópicos, variando de longos e estreitos a curtos e largos, enquanto outros se tornam macroscópicos, com aparência filamentosa e globular (Figura 5) (DUBEY, 1992). A estrutura e a espessura da parede cística também diferem entre as espécies de *Sarcocystis* e, dentro de cada espécie, entre cistos maduros. Histologicamente a parede do cisto pode ser lisa, estriada e filamentosa, ou pode possuir complexas protrusões ramificadas. Internamente, os grupos de bradizoítos são divididos entre compartimentos por septos, que se originam da parede do cisto e estão presentes na maioria das espécies de *Sarcocystis* (DUBEY, 1992; FAYER, 2004).

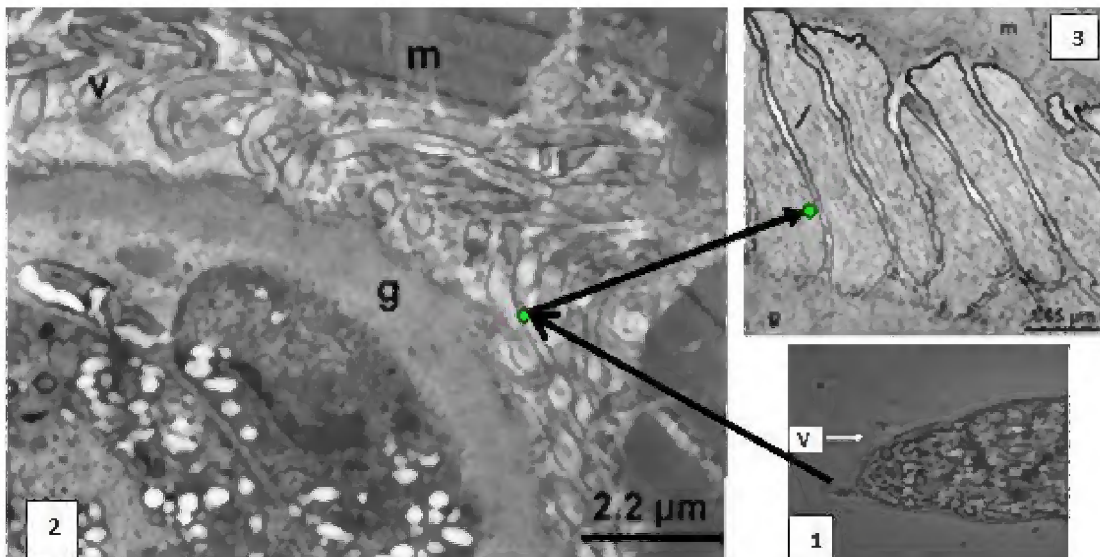


Figura 5: Microscopia de luz (1) e eletrônica (2 e 3) mostrando as protrusões em forma de vilos do cisto de *S. cruzi* (v) dobradas sobre a parede do sarcocisto (g); m: músculo do hospedeiro. (Fonte: DUBEY, 1992).

Das espécies descritas em bubalinos, três formam cistos de parede fina, espécies (*S. dubeyi*, *S. fusiformis* e *S. levinei*) e uma de parede espessa (*S. buffalonis*) (DUBEY et al., 1989; HUONG et al., 1999). Quanto ao tamanho dos cistos, as espécies *S. dubeyi* e *S. levinei* formam cistos microscópicos e as espécies *S. buffalonis* e *S. fusiformis* formam cistos macroscópicos (ORYAN; AHMADI; MOUSAVI, 2010; ABU-ELWAFI, 2015). Adicionalmente, os resultados experimentais obtidos na China por Chen, Zuo e Hu (2003) apontaram que o búfalo pode ser hospedeiro intermediário de *S. hominis* e aqueles obtidos por Metwally et al. (2014) no Egito, apontam a participação no ciclo do *S. cruzi* utilizando estudos microscópicos e sorológicos.

Ainda sobre a possibilidade de existirem espécies de *Sarcocystis* comuns aos rebanhos bovinos e bubalinos, Jehle et al. (2009) desenvolveram um método de diagnóstico de espécies para obter dados sobre a prevalência de sarcocistose em bovinos e búfalos no Vietnã, utilizando amostras de carne de animais naturalmente infectados foram examinadas pela microscopia de luz e microscopia eletrônica, bem como por métodos moleculares, através da PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase) de parte do gene 18S rDNA seguido de análise RFLP (Polimorfismo do Tamanho de Fragmento de Reação), modificado para detectar infecções com diferente espécies de *Sarcocystis* em bovinos e búfalos. Parasitando os dois rebanhos foram identificadas as espécies *S. cruzi*, *S. hirsuta* e *S. hominis*. A espécie *S. fusiformis* foi detectada apenas em búfalos.

Os cistos de *S. fusiformis* são macroscópicos, branco opaco, em forma de fuso, localizado algumas vezes abaixo da serosa ou profundamente na musculatura esofágica (Figura 6). Os cistos de *S. buffaloni* também são macroscópicos, brancos, dispostos no eixo longitudinal das fibras musculares, medindo 1-3 x 0,1-0,5mm (Figura 7) (EL-SEIFY et al., 2014).

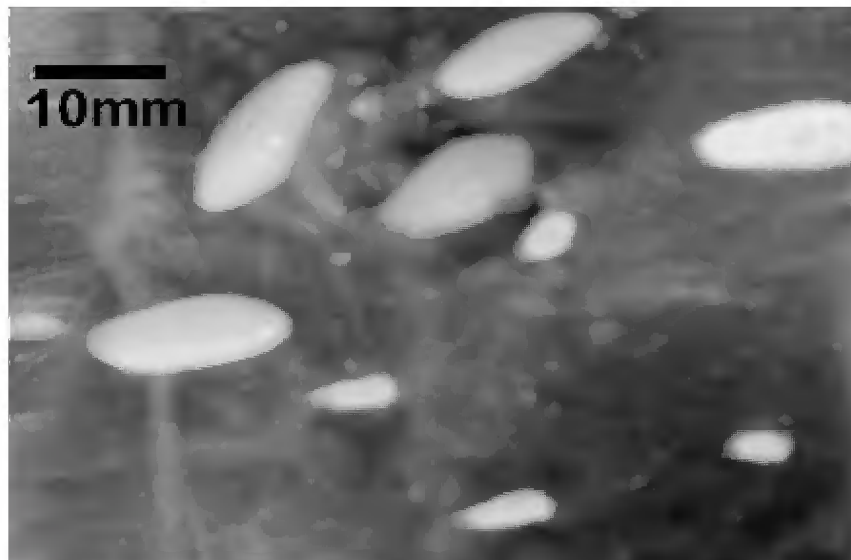


Figura 6 Cisto macroscópico de *S. fusiformis* na musculatura do esôfago de búfalo. Barra = 10mm (Fonte: EL-SEIFY et al., 2014)

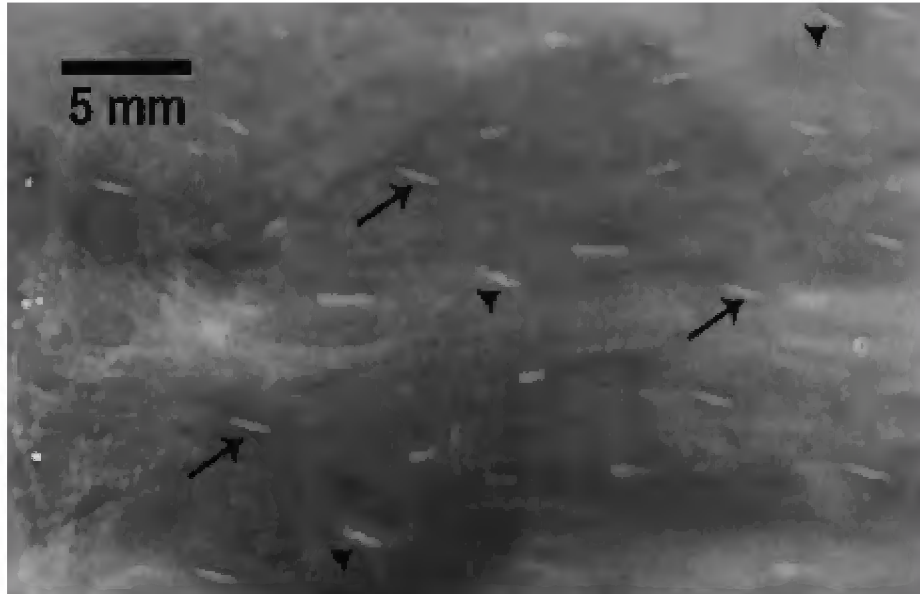


Figura 7 *S. buffalonis* no musculo esofagiano de búfalo (setas), algumas vezes aparecem distorcidos devido a tensão pós-morte dos músculos (cabeça de seta). (Fonte: EL-SEIFY et al., 2014).

Os cistos de *S. levinei* são microscópicos, medindo até 640 μm de comprimento por até 95 μm de largura e possuem parede fina ($< 1,0\mu\text{m}$) com uma superfície ondulada e lisa, com protrusões vilares. O aspecto morfológico do sarcocisto assemelha-se ao da espécie *S. cruzi* do bovino. Os cistos de *S. levinei* foram encontrados na musculatura estriada do coração, esôfago, língua e musculatura esquelética, sendo que o miocárdio de búfalos é parasitado apenas pelo *S. levinei* (HUONG et al., 1997).

Huong e Uggla (1997) examinaram 60 carcaças de búfalos do Vietnã e detectaram a infecção por uma nova espécie em 13%, denominando-a de *S. dubeyi* dedicando-a a Jitender P. Dubey. Os sarcocistos foram encontrados no musculo esquelético e esôfago. Estes mediram 60-600 μm de comprimento e 60-200 μm de largura e morfológicamente a parede do sarcocisto foi considerada espessa, com protrusões vilares (PV) inteiramente empacotadas.

Sarcocystis geralmente não é patogênico para o hospedeiro definitivo e algumas espécies também não são para o hospedeiro intermediário (LOPES; SÁ; BOTELHO, 2005). Para Dubey e Lindsay (2006), a espécie *S. cruzi* é mais patogênica para bovinos e os sinais clínicos são geralmente detectados durante o desenvolvimento da segunda geração esquizogônica do parasito nos vasos sanguíneos (fase aguda). Três a quatro semanas pós-infecção, quando apresentam uma grande quantidade de esporocistos (50.000 ou mais), os animais apresentam febre, anorexia, anemia, emagrecimento e perda de pelo (particularmente na garupa e cauda em gado) e alguns animais morrem. Lesões macroscópicas são observadas em animais que morrem durante a fase aguda, como edema, hemorragia e atrofia de gordura,

sendo as hemorragias mais evidentes na serosa das vísceras, no músculo cardíaco e esquelético e na esclerótica dos olhos. Vacas prenhas podem abortar e crescimento dos bezerras é retardado. Durante a fase crônica, as lesões são restritas aos músculos e consistem de miosite não supurativa e degeneração do sarcocisto.

A Miosite eosinofílica (ME) é uma doença relativamente rara em bovinos e ovinos, geralmente descobertos na inspeção da carne após o abate (WOUDA; SNOEP; DUBEY, 2006). Lesões decorrentes da ME contribuem para a condenação de carnes em abatedouros, podendo levar a consideráveis perdas econômicas, chegando à condenação de 5% das carcaças de bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos, como relatado na parte ocidental dos Estados Unidos (JENSEN et al., 1986).

Sobre a ocorrência da ME, Ely e Fox (1989) compararam os resultados dos exames de amostras de soros para *S. cruzi* de músculo esquelético e músculo cardíaco de 24 carcaças de bovinos condenadas devido a lesões por ME, realizada por veterinários de inspeção de carne do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, com amostras semelhantes de 35 carcaças aleatórias aprovadas para consumo humano. Os valores encontrados foram significativamente elevados em carcaças condenadas por ME em comparação com carcaças aprovada para consumo humano. Os valores elevados obtidos na análise sorológica, os resultados dos exames histopatológicos e o fato dos músculos com ME estar mais infectados por sarcocistos, sustentam a hipótese de que *S. cruzi* pode ser um agente causador da ME. No entanto, os autores afirmam que uma distinta relação causa-efeito não pode ser determinado entre o parasita e a presença de miosite eosinofílica.

De janeiro de 1994 até outubro de 2007, amostras de músculo estriado de 97 carcaças de bovinos não relacionados (determinadas pelo sistema de rastreamento de carne belga), condenados por ME, foram examinados. De cada carcaça, foram coletadas de duas a dez amostras de tecido muscular e duas sem lesões. O diagnóstico de ME na inspeção das carcaças foi confirmado na histologia quando granulócitos eosinofílicos eram o tipo de célula predominante na miopatia inflamatória multifocal. Cistos intralesionais foram coletados para determinar as espécies com a técnica de PCR-baseado em 18S rDNA. Sarcocistos intralesional ou remanescentes estavam presentes em 28 amostras. A maioria (82%) dos sarcocistos intralesionais foi de *S. hominis*. Ainda foram encontrados sarcocistos de *S. cruzi* e *S. hirsuta*, assim como de espécies não identificadas (Figura 8) (VANGEELA et al., 2013).

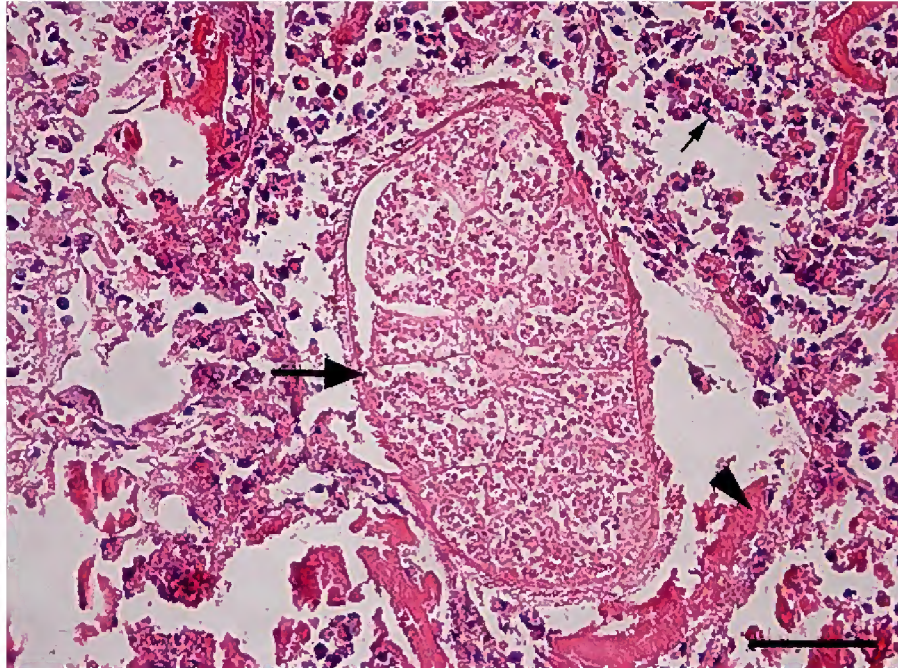


Figura 8 Sarcocisto intralesional desarranjado (seta), circundado por granulócitos eosinofílicos e fibras musculares (cabeça de seta). Coloração HE -barra = 50 μ m. (Fonte: VANGEELA et al., 2013)

Wouda, Snoep e Dubey (2006) relatam um caso de uma animal bovino abatido com 8 anos de idade, foram coletadas amostras de musculatura esquelética dos quartos traseiros e no exame patológico os músculos mostraram lesões esverdeadas bem demarcadas, oval ou alongadas, até 1cm de comprimento e 2-3mm de diâmetro e muitas vezes com um núcleo central de supuração (Figura 9). Na histologia, as lesões nos músculos foram caracterizadas como granulomas com um núcleo central de eosinófilos degenerados e restos de fibras de músculo necrótico, rodeados por uma borda de células epitelióides e tecido fibroso com um infiltrado constituído essencialmente de eosinófilos irradiando para o exterior. Sarcocistos degenerados com uma parede de espessura (7-9 mm) estavam presentes no centro supurativo da maioria das lesões. Por microscopia eletrônica de transmissão, os sarcocistos foram identificados pertencentes à espécie *S. hominis*.



Figura 9 Corte da musculatura do quarto traseiro de uma vaca de corte apresentando múltiplas lesões de miosite eosinofílica, de coloração esverdeada. (Fonte: WOUDA; SNOEP; DUBEY, 2006).

A prevalência da infecção por *Sarcocystis* spp. foi investigada em amostras de esôfago, coração, diafragma e músculos esqueléticos de 605 ovelhas, 826 cabras, 1080 bovinos, 580 búfalos e 36 camelos na área de Bagdá (Iraque). As amostras foram examinadas utilizando-se técnicas macroscópicas, microscópicas (digestão peptídica, compressão entre duas lâminas e por maceração) e sorológicas (anticorpos fluorescentes). Na macroscopia, a prevalência nos búfalos foi de 15,6% e nos bovinos de 0,2% e na microscopia os percentuais foram de 82,9 e 97,8%, respectivamente. Na análise da distribuição das amostras positivas em bubalinos, o órgão mais parasitado foi o esôfago (93,4%) e o menos parasitado o coração (16,4%) (LATIF et al., 1999).

No Iran, Oryan et al. (2010) analisaram amostras de esôfago, coração, diafragma, língua, masseter e músculos da coxa de 100 búfalos abatidos no Khuzistão, através do exame macroscópico e microscópico utilizando lâminas histológicas de três amostras teciduais de cada órgão e músculo coletado. A infecção por macrocistos de *Sarcocystis* foi detectada em apenas 3 (3%) das amostras de esôfago e músculo da coxa. Com base na macroscopia do cistos e espessura da parede, associada a sua localização, foram diagnosticadas como *S. buffalonis*. Infecções com cistos microscópicos foram encontradas em 83 das 100 examinadas (83%). A maior prevalência de cistos microscópicos foi encontrada no músculo masseter (57,1%), seguida da língua (44%), diafragma (43%), esôfago e coração (40% cada) e músculos da coxa (30%). Dois tipos de cistos microscópicos estiveram presentes na

musculatura, o primeiro apresentou comprimento de até 980 μm x 98 μm de largura. A parede do cisto era fina e tênue e foi diagnosticado como *S. levinei*, sendo muito comum e foi detectada em todos os tecidos examinados, sendo a única espécie encontrada no coração. O segundo tipo era 75 – 650 μm de comprimento e 68 – 220 μm de largura, com uma espessura de parede de 4.4 – 9.2 μm . Com base na sua estrutura, tamanho e espessura de parede, foi diagnosticado como *S. dubeyi* e ocorreram na língua, músculos da coxa, esôfago e músculo masseter.

No exame de 90 amostras de esôfago coletadas de búfalos do Egito, analisados sorologicamente, macro e microscopicamente, revelaram a presença de cistos de *S. fusiformis* em 23 amostras (25,5%) pelo exame macroscópico. Na microscopia, foram identificadas 25 amostras de cistos das espécies *Sarcocystis cruzi*, *Sarcocystis levinei* e *Sarcocystis hominis* (27,7%). Na sorologia, a positividade foi de 94,4%. Estes dados indicam a necessidade de ser utilizada uma combinação de técnicas para diagnosticar infecção (METWALLY et al., 2014)

Um total de 103 amostras de esôfago e musculatura esquelética de bovinos (n=61) e bubalinos (n=42) foram coletadas em diferentes matadouros das províncias de Cairo e Giza no Egito, e processadas pelas técnicas de digestão e histológica. Nos bovinos o índice de infecção por *Sarcocystis* foi de 60% (37 de 61) e nos bubalinos 69% (29 de 42). Macro e microcistos foram encontrados nos dois rebanhos, sendo que em bovinos não foram encontrados macrocistos na musculatura esquelética (Figura 10) (NAHED et al., 2014).



Figura 10 Cisto macroscópico presente no esôfago (Fonte: NAHED et al., 2014).

Amostras de esôfago, coração, língua, diafragma e músculos da garganta de 550 búfalos abatidos no matadouro de Mansoura, província de Dakahlia, Egito, foram processadas para detecção de cistos de *S. fusiformis* através do exame visual. A área parasitada foi dissecada e retirada uma amostra de 1cm³ para confecção de lâminas histológicas coradas pela hematoxilina e eosina. Para estudos ultra-estruturais, espécimes foram fixados em glutaraldeído frio a 2,5% e processadas para obtenção de imagens pela microscopia eletrônica de transmissão (MET). Cistos de *S. fusiformis* foram detectados em 58,72% (n=323) das amostras, com maior prevalência nos animais mais velhos (67,5%; 270 de 323 animais infectados). As amostras positivas ocorreram no esôfago (100%), músculo da garganta 56.35% (n=182), língua 40.25% (n=130) e diafragma 14.86% (n=48), as amostras de coração foram negativas. Ultra-estruturalmente, a parede do cisto era fina (1-3µm) exibindo altamente protusões vilares bastante ramificadas e anastomosadas semelhantes à couve-flor (ABU-ELWAFI; AL-ARABY; ABBAS, 2015).

Daptardarkar et al. (2016) examinaram amostras de coração para pesquisa do protozoário *Sarcocystis* de 152 bubalinos e 144 bovinos da região norte e oeste da Índia, utilizando os métodos de isolamento de cistos, de digestão peptídica e *Sarcocystis* 18S rRNA PCR. Pela técnica de isolamento, os cistos foram detectados em 46 % das amostras de bubalinos e 41% das amostras de bovinos. Na digestão, os índices foram de 66% e 50% em bubalinos e bovinos, respectivamente. A PCR convencional foi de menor sensibilidade, os bubalinos continuaram apresentando maiores índices, 79% contra 57% dos bovinos. A análise filogenética indicou que mais de uma espécie de *Sarcocystis* estão circulando em bovinos e búfalos de água na Índia.

Considerando que a bibliografia brasileira sobre esta infecção por *Sarcocystis* spp. em bubalinos é escassa e na Amazônia brasileira é inexistente apesar de apresentar o maior rebanho brasileiro, este trabalho tem como objetivo investigar a participação do rebanho bubalino marajoara na cadeia epidemiológica da sarcocistose, utilizando como indicador biológico amostras de coração e língua de bubalinos destinados ao abate.

REFERÊNCIAS

- ABU-ELWAFI, S. A.; AL-ARABY, M. A.; ABBAS, I. E. A. Sarcocystis fusiformis (Railliet, 1897) infecting water buffaloes (Bubalus bubalis) in Dakahlia Province, Egypt. **International Journal of Advanced Research**, v. 3, p. 116-120, 2015.
- CHEN, X. W.; ZUO, Y. X.; HU, J. J. Experimental Sarcocystis hominis infection in a water buffalo (Bubalus bubalis). **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 2, p. 393 – 394, 2003.
- CHAUDHRY, R. K.; KUSHWAH, H. S.; SHAH, H. I. Biochemical and histochemical studies of the sarcocyst of Sarcocystis fusiformis of buffalo Bubalus bubalis. **Veterinary Parasitol**, v. 17, p. 271-273, 1986.
- DAPTARDARKAR, M.; SINGH, B. B.; AULAKH, R.; GILL, J. P. S. Prevalence and first molecular identification of Sarcocystis species in cattle and water buffaloes in India. **Acta Parasitologica**, v. 61, 2016.
- DUBEY, J. P.; WILPE, E. V.; BERNAL-CALERO, R.; VERMA, S. K.; FAYER, R. Sarcocystis heydorni, n. sp. (Apicomplexa: Sarcocystidae) with cattle (Bos tauros) and human (Homo sapiens) cycle. **Parasitol Research**, v. 114, 4133-4147, 2015.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in Ruminants. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v. 22, p. 645–671, 2006.
- DUBEY J. P. Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis, and other tissue cyst-forming coccidia of humans and animals. In: KREIER, J. P. (Ed.) **Parasitic protozoa**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1992. cap. 1, p. 1 – 131.
- DUBEY, J.P.; SPEER, C.; FAYER, R. Sarcocystosis of Animals and Man. Florida, **Bocca Raton**, 1989. 215p.
- EL-SEIFY, M.; EL-MORSEY, A.; HILALI, M.; ZAYED, A.; EL-DAKHLY, K.; HARIDY, M.; SAKAI, H.; YANAI, T. Fusiformis and Sarcocystis buffalonis infecting water buffaloes (Bubalus bubalis) from Egypt. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v. 9, p. 95-104, 2014.
- ELY, R. W.; FOX, J. C. Elevated IgG antibody to Sarcocystis cruzi associated with eosinophilic myositis in cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 1, p. 53-56, 1989.
- FAYER, R. Sarcocystis spp. in Human Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 894 – 902, 2004.
- HUONG, L. T.; DUBEY, J. P.; NIKKILÄ, T.; UGGLA, A. Sarcocystis buffalonis n sp. (Protozoa: Sarcocystidae) from the water buffalo (Bubalus bubalis) in Vietnam Sp. (Protozoa: Sarcocystidae) from the water buffalo (Bubalus bubalis) in Vietnam. **Journal of Parasitology**, v. 83, p. 471–474, 1997.
- HUONG, L. T.; UGGLA, A. Sarcocystis dubeyi n. sp. (Protozoa: Sarcocystidae) in the water buffalo (Bubalus bubalis). **Journal of Parasitology**, v. 85, p. 102-104, 1999.

JEHLE, C.; DINKEL, A.; SANDER, A.; MORENT, M.; ROMIG, T.; LUC, P. V.; DE, T.V.; THAI, V. V.; MACKENSTEDT, U. Diagnosis of Sarcocystis spp. in cattle (*Bos taurus*) and water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Northern Vietnam. **Veterinary Parasitology**, n. 166, p. 314–320, 2009.

JENSEN, R.; ALEXANDER, A. F.; DAHLGREN, R. R.; JOLLEY, W. R.; MARQUARDT, W. C.; FLACK, D. E.; BENNETT, B. W.; COX, M. F.; HARRIS, C. W.; HOFFMANN, G. A. Eosinophilic myositis and muscular sarcocystosis in the carcasses of slaughtered cattle and lambs. **American Journal Veterinary Research**, v. 47, p. 587-593, 1986.

LATIF, B. M. A.; __, J. K.; AL-DELEMI, B. S.; MOHAMMED, S. M.; AL-BAYATI, A. M.; AL-AMIRY. Prevalence of Sarcocystis spp. in meat-producing animals in Iraq. **Veterinary Parasitology**, v. 84, p. 85–90, 1999.

LOPES, C. W. G.; SÁ, W. F.; BOTELHO, G. G. Lesões em vacas mestiças gestantes, infectadas experimentalmente com *Sarcocystis cruzi* (Hasselman, 1923) Wenyon, 1926 (Apicomplexa: Sarcocystidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 14, n. 2, p. 79-83, 2005.

MANGAS, T. P.; ROCHA, H. P. C.; FILHO, E. S.; SERRA-FREIRE, N. M.; BENIGNO, R. N. M. Efficiency of peptide digestion and scarification techniques for detecting Sarcocystis spp. in beef cattle. **Coccidia**, v. 2, p. 52-57, 2014.

METWALLY, A. M.; ABD ELLAH, M. R.; AL-HOSARY, A. A.; OMAR, M. A. Microscopical and serological studies on Sarcocystis infection with first report of *S. cruzi* in buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Assiut, Egypt. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 38, p. 378-382, 2014.

NAHED, H.; GHONEIM, W. M.; REDA, W.; NADER, M. S. Occurrence of Zoonotic Sarcosporidiosis in Slaughtered Cattle and Buffaloes in Different Abattoirs in Egypt. **Global Veterinaria**, v. 13, p. 809-813, 2014.

ORYAN, A.; AHMADI, N.; MOUSAVI, S. M. M. Prevalence, biology, and distribution pattern of Sarcocystis infection in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Iran. **Tropical Animal Health and Production**, v. 42, p. 1513–1518, 2010.

PRAKAS, P.; BUTKAUSKAS, D. Protozoan parasites from genus Sarcocystis and their investigations in Lithuania. **Ekologija**, v. 58, n. 1, p. 45 – 58, 2012.

SHEKARFOROUSH, S. S.; RAZAVI, S. M.; ABBASVALI, M. First detection of Sarcocystis hirsuta from cattle in Iran. **Parasitol Research**, v. 14, p. 155-157, 2013.

TENTER A. M.; JOHNSON A. M. Phylogeny of the tissue cyst-forming coccidia. **Advances in Parasitology**, v. 39, p. 69 – 139, 1997.

VANGEELA, L.; HOUFB, K.; GELDHOF, P.; PRETERD, K.; VERCRUYSSSEC, J.; DUCATELLEA, R.; CHIERSA, K. Different Sarcocystis spp. are present in bovine eosinophilic myositis. **Veterinary Parasitology**, v. 197, p. 543-548, 2013.

WOUDA, W.; SNOEP, J. J.; DUBEY, J. P. Eosinophilic myositis due to *Sarcocystis hominis* in a beef cow. **Journal of Comparative Pathology**, v. 135, p. 249-253, 2006.

2. Artigo

Ocorrência de *Sarcocystis* (Apicomplexa: Sarcocystidae) em búfalos da Ilha de Marajó, Estado do Pará, Brasil¹.

Occurrence of *Sarcocystis* (Apicomplexa: Sarcocystidae) in buffaloes Marajo Island, Para
State, Brazil¹.

Louise de Assis Rabello^{1*}; Francisco Dantas Sampaio Junior²; Diana Maria de Farias²; Flávia
de Nazaré Leite Barros²; Tiago Paixão Mangas¹; Rinaldo Batista Viana¹; Gustavo Goés-
Cavalcante²; Raimundo Nonato Moraes Benigno¹

RESUMO

O protozoário do gênero *Sarcocystis* apresenta mais de 200 espécies parasitando uma grande variedade de animais, com uma forte relação presa-predador. Os animais de produção são importantes fontes de infecção para os hospedeiros definitivos através do consumo de suas carnes e vísceras in natura ou indevidamente processadas, por apresentarem a forma cística do parasito em suas células musculares. Os bubalinos participam na cadeia epidemiológica de cinco a seis espécies de *Sarcocystis*, incluindo *S. homininis* que é zoonótico. Neste contexto, o presente estudo teve por objetivo caracterizar a participação do rebanho bubalino marajoara na cadeia epidemiológica da sarcocistose, utilizando como indicador biológico amostras de coração e língua coletadas em um abatedouro estadual localizado na cidade de Belém, estado do Pará. As amostras foram processadas no Laboratório de Parasitologia Animal da Universidade Federal Rural da Amazônia – campus Belém e da Universidade Federal do Pará – campus Castanhal, utilizando-se a técnica de digestão peptídica e PCR. A infecção foi detectada em todas as amostras de coração e língua na técnica de digestão peptídica e pela

¹Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Instituto de Saúde e Produção Animal da Amazônia, Laboratório de Parasitologia Animal, Belém, Pará, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: louiseassis2@gmail.com

²Universidade Federal do Pará (UFPA), Instituto de Medicina Veterinária, Laboratório de Parasitologia Animal, Castanhal, Pará, Brasil.

1 PCR foram positivos 51% das amostras de coração e 50% das de língua, comprovando-se a
2 grande susceptibilidade do rebanho de búfalos marajoara, potencializando o risco zoonótico
3 do *Sarcocystis* spp.

4

5 **Palavras-chave:** Sarcocistose, *Bubalus bubalis*, coração, língua.

6

7 **SUMMARY**

8 The protozoan *Sarcocystis* genus has more than 200 species parasitizing a wide variety of
9 animals, with a strong prey-predator relationship. Farm animals are important sources of
10 infection for definitive hosts through the consumption of their meat and offal raw or
11 improperly processed because they had the cystic form of the parasite in their muscle cells.

12 The buffaloes participate in the epidemiological chain of five to six species of *Sarcocystis*,
13 including *S. hominini* which is zoonotic. In this context, this study aimed to characterize the
14 participation of marajoara buffalo herd in the epidemiological chain Sarcocystosis, using as a
15 biological indicator samples of heart and tongue collected in a state abatedouro located in
16 the city of Belem, state of Para. The samples were processed in the laboratory Animal
17 Parasitology of the Amazon Federal Rural University - Bethlehem campus and the Federal
18 University of Pará - Castanhal campus, using the peptide and PCR digestion technique. The
19 infection was detected in all heart samples and language in the peptide digestion technique
20 and PCR positive were 51% of heart samples and 50% of speaking, confirming the great
21 susceptibility of the herd marajoara buffalo, increasing the risk zoonotic of *Sarcocystis* spp.

22

23 **Keywords:** Sarcocystosis, *Bubalus bubalis*, heart, tongue.

24

25

1 INTRODUÇÃO

2 O gênero *Sarcocystis* é um protozoário intracelular que possui um ciclo de vida
3 heteróxico, passando pelas fases gametogônica e esporogônica nos hospedeiros definitivos e
4 a esquizogônica nos hospedeiros intermediários, envolvendo uma íntima relação
5 presa/predador. Os animais de produção representam importantes fontes de contaminação
6 para os hospedeiros definitivos, desenvolvendo na fase crônica da infecção a forma cística do
7 parasito nas células musculares. De acordo com os dados literários, os bubalinos participam
8 na cadeia epidemiológica de cinco espécies e com indicativos de sua carne e vísceras serem
9 fontes de infecção de cistos da espécie *S. homininis*, como relatado por Yang et al., (2002) e
10 Chen; Zuo; Hu, (2003).

11 Além do risco zoonótico, nas infecções por *S. cruzi*, que é uma espécie altamente
12 patogênica (Dubey e Lindsay, 2006) que também infecta bubalinos (Xiang et al., 2011), os
13 sinais clínicos nos animais são geralmente detectados durante o desenvolvimento da segunda
14 geração esquizogônica do parasito nos vasos sanguíneos (fase aguda), podendo em infecções
15 experimentais, ser observada lesões macroscópicas no exame necroscópico. Vacas prenhas
16 podem abortar e o crescimento dos bezerros é retardado. Durante a fase crônica, as lesões são
17 restritas aos músculos e consistem de miosite não supurativa e degeneração do sarcocisto.

18 Considerando o indicativo de que a taxa de infecção da sarcocistose em amostras de
19 coração e língua de bovinos do Estado do Pará é elevada (Mangas et al., 2014) e que o
20 rebanho bubalino marajoara compartilha o pasto com estes animais, associado ao fato de que
21 não existe dados sobre a infecção em rebanhos bubalinos no Brasil, este trabalho tem como
22 objetivo investigar a participação do rebanho bubalino marajoara na cadeia epidemiológica da
23 sarcocistose, utilizando como indicador biológico amostras de coração e língua.

24

25

1 MATERIAL E MÉTODOS

2 Os bubalinos deste estudo foram procedentes de propriedades rurais localizadas na
3 Ilha de Marajó, Estado do Pará, criados em regime extensivo. As amostras de estudo (coração
4 e língua de 100 bubalinos), foram coletadas aleatoriamente, totalizando 200 amostras, no
5 período de maio a novembro de 2015, em um Matadouro Frigorífico com inspeção Estadual
6 situado no município de Belém-Pa, que foram acondicionadas em sacos plásticos
7 individualmente identificado a procedência e o sexo do animal e transportadas em caixa de
8 polímero contendo gelo reciclável ao Laboratório de Parasitologia Animal da Universidade
9 Federal Rural da Amazônia (LPA-UFRA), campus Belém.

10 Para análises, de cada amostra, foi retirada uma alíquota de aproximadamente um
11 grama que foram acondicionadas em mini tubos estéreis de 1,5mL e mantidas a uma
12 temperatura de -20°C, identificadas e transportadas em caixa de polímero contendo gelo
13 reciclável, até ao Laboratório de Parasitologia Animal da Universidade Federal do Pará (LPA-
14 UFPA), campus Castanhal, para análise molecular.

15 Para a pesquisa de cistos de *Sarcocystis* spp., as amostras foram processadas no
16 LPA/UFRA pela técnica da digestão peptídica de acordo com Gomes e Lima (1982),
17 estabelecendo-se como critério de negatividade o exame de até quatro lâminas sem a detecção
18 de bradizoítos, e as extrações de DNA das amostras de tecido foram realizadas no LPA-UFPA
19 utilizando o kit comercial ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System (PROMEGA),
20 seguindo protocolo do fabricante, as amostras de DNA foram armazenadas em mini tubos
21 estéreis e livres de DNase's, identificadas e mantidas estocadas em freezer a -20°C para
22 posterior análise molecular.

23 Para a detecção de DNA do *Sarcocystis* spp. foi realizada uma PCR com os
24 iniciadores SarcoF (5'-CGCAAATTACCCAATCCTGA-3') e SarcoR (5'-
25 ATTTCTCATAAGGTGCAGGAG-3') que amplificam um produto de aproximadamente

1 700 pares de base (pb), como descrito por Yang et al. (2002) com modificações. A solução de
2 amplificação foi composta por tampão (100mM Tris-HCl, pH=8,5, 500mM KCl), 50mM
3 MgCl₂, 1,5U de Taq DNA polimerase (Ludwig Biotec[®]), 5mM de cada dNTP (dATP, dGTP,
4 dCTP e dTTP), 20 pmol de cada iniciador, 5µL de DNA, para um volume final de 25 µL. As
5 reações foram realizadas em um termociclador com gradiente de temperatura (Veriti 96 Well
6 Thermal Cycler – Applied Biosystems[®]) utilizando-se protocolo com uma etapa de
7 desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos, seguida por 40 ciclos a 94°C por 40 segundos,
8 62°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, com uma extensão final a 72°C por 6 minutos.

9 Em todas as reações foram utilizados um controle negativo e um controle positivo.
10 Como controle negativo utilizou-se amostra de DNA do músculo semitendinoso, e como
11 controle positivo amostra de coração com positividade para *Sarcocystis* spp. na técnica de
12 digestão peptídica.

13 Todos os produtos das reações foram analisados por eletroforese horizontal em gel de
14 agarose a 1%, corados com SYBR[®] DNA Saf. O comprimento dos produtos amplificados
15 foram estimados utilizando-se um padrão de 100 pares de base (Ladder 100 pb-Ludwig
16 Biotec) em cada gel de corrida e a visualização foi realizada em um transiluminador acoplado
17 a um sistema de fotodocumentação (BIO-RAD Molecular Imager Gel Doc[™] XR+).

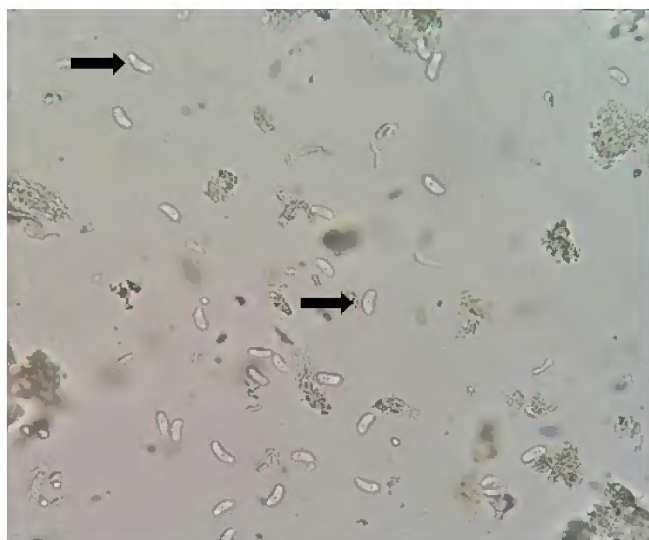
18 Para análise estatística, as frequências obtidas em cada órgão analisado foram
19 tabuladas para aplicação do teste de McNemar e o teste de qui-quadrado para avaliar a
20 significância a nível de 5%.

21

22 **RESULTADOS**

23 Na técnica de digestão peptídica, a infecção por *Sarcocystis* spp foi detectada em todas
24 as amostras de coração e língua dos bubalinos marajoara. Na microscopia óptica, foram

1 detectados bradizoítos incolores, levemente curvados em forma de “banana” com uma
2 extremidade afilada e outra romba arredondada (Figura 1).



3
4 Figura 1: Bradizoítos de *Sarcocystis* spp. (setas) observados em amostra de coração de búfalo.
5

6 Das 100 amostras positivas na técnica da digestão, foram isolados pela Reação em
7 Cadeia Mediada pela Polimerase (PCR), o DNA (Figura 2) de 73% das amostras, com taxas
8 de infecção nos órgãos examinados de 51% no coração e de 50% na língua, sem diferirem
9 significativamente ($p>0,05$). Das 49 amostras de coração negativas, 22 (44,9%) foram
10 positivas na língua, e das 50 amostras de língua negativas, 23 (46%) foram positivas no
11 coração. Estes dados demonstram que há o risco de ocorrer falsos negativos no exame de
12 apenas um dos dois órgãos, já que, das 49 amostras negativas no coração, 44,9% foram
13 positivas na língua e, das 50 amostras negativas na língua, 46% foram positivas no coração
14 (Tabela 1).

15

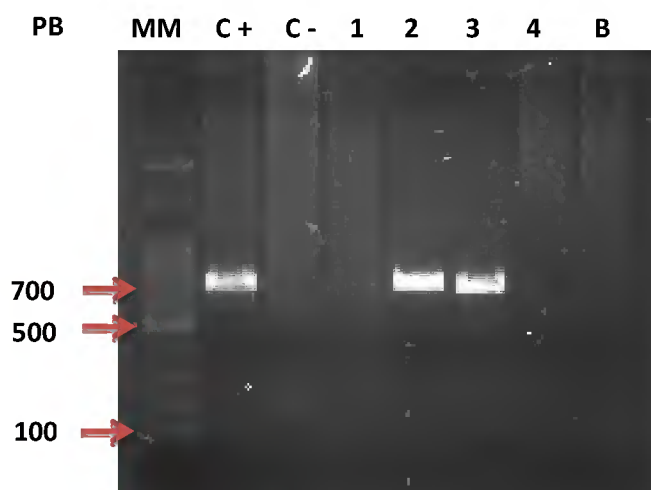
16

17

18

1 Tabela 1: Frequência absoluta de *Sarcocystis* spp. pela PCR em 100 amostras de língua e
 2 coração de bubalinos da ilha de Marajó, Pará-Brasil coletadas no período de maio a novembro
 3 de 2015.

AMOSTRAS DE CORÇÃO	AMOSTRAS DE LÍNGUA		TOTAL
	POSITIVAS	NEGATIVAS	
POSITIVAS	28	23	51
NEGATIVAS	22	27	49
TOTAL	50	50	100



4
 5
 6
 7
 8
 9
 10
 11
 12 Figura 2: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação da PCR para detecção
 13 de DNA de *Sarcocystis* spp. em amostras de coração de búfalos. Marcador molecular de 100
 14 pares de base (MM); Controle positivo (C+); Controle Negativo (C -); Amostras positivas (2 e
 15 3); Amostras negativas (1 e 4); Branco da reação (B).

16 O teste de McNemar demonstrou que não existe correlação entre a presença do
 17 parasito na língua e no coração, confirmado pelo X^2 de Pearson p-valor > 5%.

18

19

1 **DISCUSSÃO**

2 A sarcocistose apresenta uma elevada porcentagem de infecção nos rebanhos de
3 animais de produção em todo o mundo, sendo que em alguns locais da Europa a taxa de
4 infecção chega a quase 100% do rebanho (Domenis et al., 2011). Dubey e Lindsay (2006)
5 comentam que a elevada taxa de infecção por *Sarcocystis* spp. em animais de produção no
6 mundo é devido a uma grande variedade de fatores que contribuírem para sua disseminação,
7 tais como: o fato de um hospedeiro intermediário poder abrigar várias espécies desse
8 protozoário e muitos hospedeiros definitivos participarem na transmissão e os hospedeiros
9 definitivos eliminarem uma grande quantidade de esporocistos já em estágio infectivos que
10 são considerados bastante resistentes a congelação e as condições no pasto, tornando
11 independentes das condições climáticas para a maturação e infectividade.

12 Sobre esta elevada taxa do *Sarcocystis* no miocárdio pela técnica de digestão
13 peptídica, Puebla et al. (2013) comentam que as musculaturas que apresentam uma grande
14 quantidade de hemoglobina, como é o caso do músculo cardíaco, possuem características
15 especiais para captar, armazenar e ceder oxigênio, que é aproveitado pelo parasita de forma
16 anaeróbica no hospedeiro.

17 Taxas de infecções elevadas em amostras de coração e língua de bubalinos já havia
18 sido relatadas por Gomes e Lima (1982), Shekarforoush et al. (2004), Fard et al. (2009) e
19 Hamidinejat et al. (2010), sendo que apenas no primeiro trabalho o índice esteve abaixo de
20 100%, respectivamente, 97,7% e 93,3% no coração e língua.

21 A técnica da digestão peptídica é um método bastante utilizado em estudos
22 epidemiológicos da infecção por *Sarcocystis* spp., sendo considerada uma técnica seletiva
23 para detecção de sarcocistos em função do baixo custo operacional e da sua elevada
24 sensibilidade, como já demonstrado no trabalho de Latif et al. (1999) que compararam com as
25 técnicas de Imunofluorescência Indireta, compressão tecidual entre duas lâminas de vidro e

1 maceração tecidual. Adicionalmente, Hamidinejat et al. (2010) afirmam que a maior
2 sensibilidade da técnica de digestão por detectar a infecção em amostras de baixa e média
3 intensidade parasitaria e Chiesa et al. (2013) relatam que essa sua característica seletiva é
4 importante para posterior identificação das espécies pela técnica de PCR.

5 Huong et al., (1997) ao investigar a prevalência de *Sarcocystis* spp. de 502 bubalinos
6 abatidos no Vietnã, utilizando a microscopia, detectou índices de parasitismo inferiores, sendo
7 de 60,6% no coração e 62,4% na língua, sem diferirem estatisticamente ($p>0,05$). Este
8 contraste de valores de índices de infecção foi ainda mais marcante se comparados aos dados
9 obtidos por Latif et al. (2013), que detectaram o bioagente apenas nas amostras de coração de
10 18 bubalinos (66,7%).

11 O índice máximo de infecção detectado nas amostras de coração e língua em búfalos
12 marajoara, assemelham-se aos dados obtidos por Mangas et al. (2014), utilizando as técnicas
13 de digestão e escarificação, detectaram elevados índices de infecção por *Sarcocystis* spp. no
14 coração (100%) e língua (91%) de bovinos de cinco mesorregiões do estado do Pará incluindo
15 dentre estas a Ilha de Marajó, nesta região é comum os animais (bovinos e bubalinos) se
16 alimentar do mesmo pasto.

17 Em amostras de língua, musculatura cervical, esôfago e diafragma de 30 búfalos do
18 Norte do Vietnã, Jelhe et al. (2009) encontraram um índice de infecção de 90% através da
19 PCR, já Nahed et al. (2014), detectaram um índice de infecção de 69% em amostras de
20 esôfago e musculatura esquelética de bubalinos das províncias de Cairo e Giza, Egito ($n=42$),
21 através das técnicas de digestão e histologia. O índice de infecção com combinações de
22 amostras de tecidos muscular de bubalinos foi bastante diversificado.

23 A taxa de infecção de 51% detectada através da PCR em 100 amostras de coração de
24 búfalos marajoara está compatível com a taxa de 57% encontrada por Daptardarkar et al.
25 (2016) em 296 amostras do coração de búfalos indianos.

1 CONCLUSÃO

2 Considerando os resultados encontrados nas duas técnicas parasitológicas podemos
3 concluir que os bubalinos marajoara são hospedeiros com elevada susceptibilidade a infecção
4 por *Sarcocystis* spp. e que o coração e língua são potenciais indicadores da infecção para
5 estudos epidemiológicos, e que a técnica de digestão foi eficaz para detectar o parasito em
6 coração e língua.

7

8 REFERÊNCIAS

9 CHIESA, F.; MURATORE, E.; DALMASSO, A.; CIVERA, T. A new molecular approach to
10 assess the occurrence of *Sarcocystis* spp. in cattle and products thereof: preliminary data.
11 **Italian Journal of Food Safety**, v. 2, p. 148-141, 2013.

12 CHEN, X. W.; ZUO, Y. X; HU, J.J. Experimental *Sarcocystis hominis* infection in a water
13 buffalo (*Bubalus bubalis*). **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 2, p. 393 – 394, 2003.

14
15 DAPTARDARKAR, M.; SINGH, B. B.; AULAKH, R.; GILL, J. P. S. Prevalence and first
16 molecular identification of *Sarcocystis* species in cattle and water buffaloes in India. **Acta**
17 **Parasitologica**, v. 61, 2016.

18
19 DOMENIS, L.; PELETTO, S.; MODESTO, P.; ZUCCON, F.; CAMPANELLA, C.
20 MAURELLA, C.; GUIDETTI, C.; ACUTIS P.L. Detection of a morphogenetically novel
21 *Sarcocystis hominis*-like in the context of a prevalence study in semiintensively bred cattle in
22 Italy. **Parasitol Research**, v. 109, p. 1677-1687, 2011.

23
24 DUBEY, J.P.; LINDSAY, D. S. Neosporosis, Toxoplasmosis, and *Sarcocystis* in Ruminants.
25 **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v. 22, p. 645 – 671, 2006.

26
27 FARD, S. R. N.; ASGHARI, M.; NOURI, F. Survey of *Sarcocystis* infection in slaughtered
28 cattle in Kerman, Iran. **Tropical Animal Health Production**, v. 41, p. 1633-1636, 2009.

29
30 GOMES, A. G.; LIMA, J.D. *Sarcocystis* (Lankester, 1982) em bovinos de Minas Gerais:
31 ocorrência e métodos de diagnóstico. **Arquivos da Escola de Veterinária da UFMG**, Belo
32 Horizonte, v. 34, n.1, p. 83-92, 1982.

33
34 HAMIDINEJAT, H.; JALALI, M. H. R.; NABAVI, L. Survey on *Sarcocystis* infection in
35 slaughtered cattle in south-west of Iran, emphasized of muscle squash in comparison with
36 digestion method. **Journal of Animal and Veterinary Advances**. v. 9. n. 12. p. 1724 – 1726,
37 2010.

38
39 HUONG, L. T.; DUBEY, J. P.; NIKKILÄ, T.; UGGLA, A. *Sarcocystis buffalonis* sp.
40 (Protozoa: Sarcocystidae) from the water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Vietnam Sp. (Protozoa:

- 1 Sarcocystidae) from the water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Vietnam. **The Journal of**
2 **Parasitology**, v. 83, p. 471–474, 1997.
- 3
- 4 JEHLER, C.; DINKEL, A.; SANDER, A.; MORENT, M.; ROMIG, T.; LUC, P. V.; DE, T.V.;
5 THAI, V. V.; MACKENSTEDT, U. Diagnosis of *Sarcocystis* spp. in cattle (*Bos taurus*) and
6 water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Northern Vietnam. **Veterinary Parasitology**, n. 166, p.
7 314–320, 2009.
- 8
- 9 LATIF, B.; VELLAYAN, S.; HEO, C. C.; KANNAN KUTTY, M.; OMAR, E.;
10 ABDULLAH, S.; TAPPE, D. High prevalence of muscular sarcocystosis in cattle and water
11 buffaloes from Selangor, Malaysia. **Tropical Biomedicine**, v. 30, n. 4, p. 699-705, 2013.
- 12
- 13 LATIF, B. M. A.; AL-DELEMI, J. K.; MOHAMMED, B. S.; AL-BAYATI, S. M.; AL-
14 AMIRY, A. M. Prevalence of *Sarcocystis* spp. in meat-producing animals in Iraq. **Veterinary**
15 **Parasitology**, v. 84, p. 85-90, 1999.
- 16
- 17 MANGAS, T.P.; ROCHA, H.P.C.; FILHO, E.S.; SERRA-FREIRE, N.M.; BENIGNO,
18 R.N.M. Efficiency of peptide digestion and scarification techniques for detecting *Sarcocystis*
19 spp. in beef cattle. **Coccidia**, v.2, p. 52-57, 2014.
- 20
- 21 NAHED, H.; GHONEIM, W. M.; REDA, W.; NADER, M. S. Occurrence of Zoonotic
22 Sarcosporidiosis in Slaughtered Cattle and Buffaloes in Different Abattoirs in Egypt. **Global**
23 **Veterinaria**, v. 13, p. 809-813, 2014.
- 24
- 25 PUEBLA, D. H.; ZALDIVAR, Q. N.; FONT, P. H.; RODRÍGUEZ, V. Y.; MENDOZA, T. N.
26 Variabilidad invasiva del *Sarcocystis* en bovino, según la pigmentación de la fibra muscular
27 parasitada. **Revista Veterinaria Argentina**, v. 30, n. 300, p. 1 – 5, 2013.
- 28
- 29 SHEKARFOROUSH, S. S.; RAZAVI, S. M.; AHMADI, H.; SARIHI, K. Study on
30 prevalence of *Sarcocystis* in slaughtered cattle in Shiraz. **Journal of Faculty of Veterinary**
31 **Medicine**, University of Tehran, n. 59: p. 33 – 37, 2004.
- 32
- 33 XIANG, Z.; HE, Y.; ZHAO, H.; ROSENTHAL, B. M.; DUNAMS, D. B.; LI, X.; ZUO, Y.;
34 FENG, G.; CUI, L.; YANG, Z. *Sarcocystis cruzi*: Comparative studies confirm natural
35 infections of buffaloes. **Experimental Parasitology**, n. 127, p. 460–466, 2011.
- 36
- 37 YANG, Z. Q.; LI, Q. Q.; ZUO, Y. X.; CHEN, X. W.; CHEN, Y. J.; NIE, L.; WEI, C. G.;
38 ZEN, J. S.; ATTWOOD, S. W.; ZHANG, X. Z.; ZHANG, Y. P. Characterization of
39 *Sarcocystis* species in domestic animals using a PCR-RFLP analysis of variation in the 18S
40 rRNA gene: a cost-effective and simple technique for routine species identification.
41 **Experimental Parasitology**, n. 102, p. 212–217, 2002.