



AO-01

***Cryptosporidium* spp. EM AVES (*Gallus domesticus*) CRIADAS EM DIFERENTES SISTEMAS NO ESTADO DE SÃO PAULO**

NICOLETI, B.N.^{1*}; NAKAMURA, A.A.²; CAMARGO, V.S.¹; FERRARI, E.D.¹; SILVA, G.S.¹; RODRIGUES, T.F.¹; MEIRELES, M.V.¹.

¹ Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP, Araçatuba – SP/Brasil. *e-mail:brunanicoleti.ata@hotmail.com

² Centro Universitário de Adamantina – UNIFAI, Adamantina – SP/ Brasil.

A criptosporidiose é uma das principais infecções por protozoários em aves, manifestando-se como enfermidade respiratória ou digestiva. Quatro espécies de *Cryptosporidium* infectam aves: *C. avium*, *C. baileyi*, *C. galli* e *C. meleagridis*. Além dessas espécies, há vários genótipos distintos das espécies de *Cryptosporidium* já em aves, como genótipos I, II, III, IV e VI. O objetivo deste estudo foi detectar *Cryptosporidium* spp. e realizar sua caracterização molecular em amostras de fezes de galinha doméstica. Foram coletadas 190 amostras de fezes de aves de corte e de postura, em criações extensivas, semi-extensivas e industriais. As amostras foram conservadas em solução de dicromato de potássio 2,5% (concentração final) a 4°C, até o processamento. Para purificação e concentração de oocistos, foi utilizada a técnica de centrífugo-flutuação em solução de Sheather, seguida da extração do DNA genômico dos oocistos. A análise molecular foi realizada com três protocolos da reação em cadeia pela polimerase (nested-PCR), para amplificação de fragmento parcial do gene da subunidade 18S do rRNA. Considerando os três protocolos utilizados, foi observada positividade em 12,3% (24/190) das amostras, com identificação de *C. baileyi* 9,47% (18/190), *C. meleagridis* 0,53% (1/190), *C. parvum* 2,1% (4/190) e *Cryptosporidium* sp. 0,53% (1/190).

Palavras chave: Criptosporidiose, galinha doméstica, caracterização molecular.

Suporte financeiro

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.



AO-02

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii*,
Neospora caninum E *Sarcocystis neurona* EM RAPINATES DE CATIVEIRO**

SATO, A.P.^{1*}; GOULART, M.A.²; KONELL, A.L.¹; KOCH, M.O.¹; SILVA, B.R.¹; REGIO, R.R.³; KUTEQUES, M.F.³; LOCATELLI-DITTRICH, R.⁴; ¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, Paraná, Brasil. ² Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. ³ Programa de Residência em Área Profissional da Saúde em Medicina Veterinária, UFPR, Curitiba, Paraná, Brasil. ⁴ Professora Associada III do Departamento de Medicina Veterinária da UFPR, Curitiba, Paraná, Brasil. *e-mail: anasatovet@gmail.com

Biologia Molecular e Diagnóstico

Toxoplasma gondii, *Neospora caninum* e *Sarcocystis neurona* são protozoários intracelulares obrigatórios pertencentes ao filo Apicomplexa. Possuem distribuição cosmopolita e capacidade de infectar várias espécies de animais, incluindo as aves. As aves são importantes no ciclo destes protozoários uma vez que são animais sentinelas para a contaminação ambiental. Os rapinantes são um grupo de aves carnívoras classificadas em quatro ordens: Accipitriformes, Strigiformes, Falconiformes e Cathartiformes. Os dados de prevalência de *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis neurona* em aves de rapina são limitados, apesar destas aves se alimentarem de pequenos mamíferos. O objetivo do presente estudo foi detectar a presença de anticorpos contra *T. gondii*, *N. caninum* e *S. neurona* em rapinantes de cativeiro no Brasil. No período de agosto de 2014 a setembro de 2015, foram coletadas amostras de sangue de 72 rapinantes saudáveis, provenientes de zoológicos, mantenedores de vida selvagem, empresas de falcoaria, centros de triagem e indivíduos de vida livre confinados em clínicas veterinárias. Os soros e os sedimentos eritrocitários obtidos foram armazenados a -20°C até a realização da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) respectivamente. Os soros foram diluídos em PBS (pH 7,2) na diluição 1:16 para *T. gondii*, 1:50 para *N. caninum* e *S. neurona* e avaliados em lâminas de RIFI contendo taquizoítas da cepa RH de *T. gondii*, cepa NC-1 de *N. caninum* e merozoítos da cepa SN37R de *S. neurona*. O conjugado anti-IgY (IgG) (anti-chicken SIGMA®) foi utilizado na diluição 1:200. A PCR foi realizada em 12 amostras positivas na RIFI para um dos protozoários. Para a extração do DNA foi utilizado o kit comercial (PureLink® - Invitrogen) e na reação os primers B1 694 B1 887 B1 757 B1 853 para *T. gondii*, NP4/NP6/NP7 para *N. caninum* e EXT F/EXT R INT F/INT R para *S. neurona*. Das 72 amostras analisadas na RIFI, 6,9% (5/72) foram positivas para *T. gondii*, 4,1% (3/72) para *N. caninum* e 11,1% (8/72) para *S. neurona*. A PCR das 12 amostras analisadas para *T. gondii*, *N. caninum* e *S. neurona* foi negativa. Os resultados demonstram que as aves foram expostas aos parasitas, possivelmente por contaminação ambiental ou por predação de espécies infectadas, embora não apresentem parasitemia, porque foram negativas na PCR. Ressalta-se a



ocorrência destes protozoários nas aves e a importância do manejo sanitário e alimentar destas espécies em cativeiro.

Palavras-chave: aves, Imunofluorescência Indireta, protozoários.

Suporte financeiro: CAPES.



AO-03

DETECÇÃO DE *Sarcocystis* spp. EM ESGOTO BRUTO E TRATADO EM LONDRINA, PARANÁ, BRASIL.

LADEIA, W. A.¹; MARTINS, F. D. C.¹; VALADARES, M. F.¹; ABATE, H. L.¹; GARCIA, J. L.¹; FREIRE, R. L.^{1*}

¹Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil. *e-mail: rlfreire@uel.br

Área de conhecimento – Epidemiologia e Saúde Pública

Sarcocystis spp. é um protozoário que apresenta altas prevalências em hospedeiros intermediários, dentre eles bovinos e suínos, porém a prevalência em hospedeiros definitivos, tais como: cães, gatos e humanos, é pouco estudada e esclarecida. O esgoto é o local de convergência das excretas desses hospedeiros definitivos e poderia ser utilizado para a detecção de *Sarcocystis* spp., entre outros coccídios. Objetivou-se monitorar a presença de *Sarcocystis* spp. em esgoto bruto e tratado de uma Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) em Londrina, Paraná, Brasil. Foram realizadas 25 coletas quinzenais de 08/12/2014 a 09/11/2015 de esgoto bruto e de esgoto resultante de tratamento primário e secundário. As 25 amostras de esgoto bruto foram centrifugo-concentradas e as 25 de esgoto tratado foram filtradas em membrana de éster de celulose (1,2 µm) com posterior centrifugo-concentração do produto da raspagem da membrana. Realizou-se extração de DNA por kit comercial e nPCR para gene 18S rRNA Apicomplexa para detecção *Sarcocystis* spp., com fragmento entre 300 e 370 pb, observado por eletroforese em gel de agarose a 2,5%. Das 25 amostras de esgoto bruto, 48% (12/25) foram positivas para *Sarcocystis* spp., e em esgoto tratado 44% (11/25), sendo que 60% (15/25) das coletas apresentaram a presença do protozoário em uma ou ambas as amostras de esgoto. A presença do protozoário no esgoto evidencia que há indivíduos da população abrangida pela ETE infectados com *Sarcocystis* spp. e que podem atuar como fontes de infecção. A detecção de *Sarcocystis* spp. no esgoto tratado pode sugerir que as etapas de tratamento empregadas na ETE não sejam suficientes para a completa retenção do parasita. Porém, a viabilidade desses protozoários deve ser verificada para que se possa constatar a contaminação do recurso hídrico receptor do efluente da ETE. A alta representatividade de *Sarcocystis* spp. nas coletas indica que a eliminação do protozoário é constante na população, o que demonstra a característica endêmica do parasita. Esta foi a primeira detecção de *Sarcocystis* em esgoto no Brasil, portanto novos estudos são necessários para verificar a presença do protozoário em outras regiões do país, avaliar se há danos clínicos aos hospedeiros e os fatores de risco associados à infecção.

Palavras-chave: Águas residuais, sarcocistose, PCR.

Suporte financeiro CAPES, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal; CNPq e UEL, Bolsas de Iniciação Científica.



AO-04

**POSSÍVEL PRIMEIRO CASO AUTÓCTONE DE LEISHMANIOSE
VISCERAL CANINA EM LONDRINA, PARANÁ - INVESTIGAÇÃO DE
CASO**

CALDART, E.T.; CAMILO, C.P.²; MATOS, A.M.R.N.¹; FERREIRA, F.P.¹;
PASCHOAL, A.T.P.¹; MITSUKA-BREGANÓ, R.¹; SUHETT, W.G.²; NAVARRO,
I.T.¹

¹Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil. ²Departamento de Clínicas Veterinárias, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.

*e-mail: eloiza.vet@gmail.com

Epidemiologia e Saúde Pública

A leishmaniose visceral é uma zoonose vetorial crônica de caráter insidioso e pode levar à morte. Os cães são considerados os principais reservatórios do agente para os humanos e também apresentam quadro clínico crônico e grave quando acometidos. O objetivo do presente relato foi descrever o primeiro caso possivelmente autóctone de leishmaniose visceral canina (LVC) do município de Londrina e sua investigação. Um cão de rua, fêmea, com aproximadamente um ano de idade, apresentando extensas lesões dermatológicas, onicogribose, leve anemia e leucopenia foi atendido no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina em janeiro de 2017, onde constatou-se reatividade para *Leishmania* spp. nos exames de imunofluorescência indireta (RIFI), com título de 320, e ensaio imunoenzimático (ELISA). A eutanásia do animal foi recomendada, visto que, o animal não tinha um responsável e portava uma zoonose grave em estágio avançado, oferecendo risco à saúde pública. Após a necropsia do animal foi feita a punção de medula óssea e a coleta de fragmentos de órgãos para exame citológico, PCR utilizando o gene ITS1 de *Leishmania* spp e isolamento em meio difásico composto por Blood Ágar Base (BAB) e Schneider. A identificação da espécie foi realizada por meio do sequenciamento, pelo método de Sanger, do fragmento de DNA obtido na PCR. Uma amostra de soro foi enviada para o Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN), credenciado para confirmação dos casos pelos exames de ELISA e TR-DPP. Foram positivos os exames citológico da medula óssea, PCR e cultura *in vitro* da pele, baço, fígado, linfonodo e medula óssea. No sequenciamento foi identificada a espécie *L. (L.) infantum*. O diagnóstico inicial foi confirmado pelo LACEN e com o laudo oficial iniciou-se a investigação do caso para a confirmação de autoctonia. Por ser um animal errante, não foi possível confirmar a autoctonia e segundo relato de moradores e vigilantes da região onde o mesmo foi encontrado é comum o abandono de animais no local e, por ficar próximo a uma rodovia, o cão pode, inclusive, ter sido abandonado por motorista vindo de outro Estado onde a LVC é endêmica. Armadilhas para captura do vetor foram colocadas no local (fundo de vale) e até o momento *Lutzomia longipalpis* não foi capturado. Agentes comunitários de saúde e de endemias foram treinados para realizar a busca ativa de novos casos. Um panfleto informativo foi distribuído nas residências das imediações do caso em busca de mais informações sobre a origem do animal. O diagnóstico presuntivo de LVC do presente caso foi baseado nos sinais clínicos evidentes e no exame físico e confirmado pela



citologia, PCR, isolamento e sorologias. O caso relatado é fortemente suspeito de ser autóctone do município de Londrina, no entanto, somente com a confirmação da presença do vetor *Lu. longipalpis* e/ou identificação de outros casos de LVC será possível encerrar a investigação e definir a autoctonia do mesmo para posterior notificação.

Palavras-chave: *Leishmania (L.) infantum*, *Lutzomyia longipalpis*, cão errante.

Suporte financeiro CAPES, CNPq.



AO-05

**A NEW *HEPATOZOON* SPECIES (ADELEORINA: HEPATIZOIDEAE) OF
AKODON SP. (RODENTIA: CRICETIDAE: SIGMODONTINAE) FROM
SOUTHEASTERN BRAZIL**

DEMONER, L.C.¹; MAGRO, N.M.¹; SILVA; M.R.L.¹, O'DWYER, L.H.^{1*}; ¹ Departamento de Parasitologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil. *odwyer@ibb.unesp.br

Biologia Molecular e Diagnóstico.

Species of the genus *Hepatozoon* are blood parasites found in a wide range of host species, including wild rodents; however, information about life cycle, distribution and *Hepatozoon* species diversity infecting these mammals are lacking. Here, we studied the parasite stages and DNA sequences of *Hepatozoon* spp. of seven naturally infected *Akodon* sp. captured in three forest fragments in the municipality of Botucatu, São Paulo State, southeastern Brazil. The collection of Rodents was made along terrestrial transects, using Sherman traps and Pitfalls traps. The animals were anesthetized and blood collection was performed by cardiac puncture, for preparation of blood smears and the DNA isolation. A thin blood smear was prepared of each rodent, fixed with methanol, stained with Wright-Giemsa, and screened for *Hepatozoon* gamonts. Euthanasia was performed by deep anesthesia with isoflurane, followed by removal of organs. Collected tissues were preserved either for molecular identification of *Hepatozoon* sp. and for histological examination. Three different parasite stages were found in the infected rodents: gamonts in the peripheral blood, mature and immature meronts (exclusively in the liver, within hepatocytes); and cystic forms in the lung, spleen and kidney. Out of the seven infected rodents, five were parasitized by all parasite stages, one by gamonts and meronts, and the remaining one rodent was parasitized by meronts and cystozoites. The *Akodon*-derived *Hepatozoon* sp. sequence grouped into a major clade containing *Hepatozoon* spp. sequences detected in wild rodents in several regions of the world, while sequences from carnivora formed a distinct clade. The new sequence reported in this study clustered with a *Hepatozoon* sequence previously isolated from wild rodents in the Brazilian Pantanal with <1% genetic distance between each other, which was enough to separate them into distinct organisms. Biological and morphological features of the parasite as well as the DNA sequence comparison and the phylogenetic analysis indicate that the *Hepatozoon* sp. detected in this study is distinct from those previously reported in small rodents, representing a new species of *Hepatozoon* from wild small rodents in Brazil.

Key-words: parasite stages, molecular characterization, hemogregarina.

Research Support Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP N°. 2012/09715-0 and FAPESP N°. 2012/25197-9).



AO-06

DETECÇÃO MOLECULAR DE *Ehrlichia* spp. EM CANÍDEOS SELVAGENS E ECTOPARASITAS NO PANTANAL SUL MATOGROSSENSE

CALCHI, A.C.¹; SOUSA, K.C.M.¹; HERRERA, H.M.²; CARVALHO, G.²; BARRETO, W.T.G.; SANTOS, F.M.²; MACHADO, R.Z.¹; TINUCCI-COSTA, M.¹; ANDRÉ, M.R.^{1*}

¹ Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias / Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

² Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil

*e-mail: marcos_andre@fcav.unesp.br

Biologia molecular e diagnóstico

O gênero *Ehrlichia* spp. engloba bactérias intracelulares obrigatórias pertencentes à Família Anaplasmataceae, as quais são transmitidas pela picada de carrapatos e podem causar doenças no homem e animais. No presente estudo foi realizado o diagnóstico molecular de *Ehrlichia* spp. em amostras de sangue e ectoparasitas coletados de 62 canídeos selvagens da espécie *Cerdocyon thous* oriundos da fazenda Nhumirim da Embrapa Pantanal e circunvizinhanças, na sub-região da Nhecolândia (MS). Após extração de DNA das amostras de sangue e ectoparasitas utilizando kit comercial, procedeu-se a ensaios de PCR para o gene endógeno GAPDH de mamíferos e 16SrRNA de carrapatos. Foram coletados 93 adultos e 643 ninfas de *Amblyomma sculptum*, 57 adultos e três ninfas de *A. parvum*, sete *A. ovale* adultos, um *A. tigrinum* e um *Rhipicephalus sanguineus* adultos, e 204 larvas de *Amblyomma* spp. Todas as amostras de sangue e 303 amostras de carrapatos mostraram-se positivas para o gene endógeno, incluindo 91/93 (97,85%) adultos de *A. sculptum*, 40/57 (70,17%) adultos de *A. parvum*, 6/7 (85,71%) *A. ovale*, todas as amostras de *A. tigrinum*, *R. sanguineus* e os pools de ninfas e larvas. As amostras positivas para o gene supracitado foram submetidas a ensaios de qPCR para *Ehrlichia* spp., *E. canis* e *E. chaffeensis*, baseadas nos genes *groEL*, *dsb* e *vplt*, respectivamente. Nenhuma amostra mostrou-se positiva nesses ensaios. Posteriormente, foram realizadas reações de cPCR para *Ehrlichia* spp. baseadas nos genes 16SrRNA, *groEL*, *dsb* e *omp-1*. Duas (3,22%) amostras de sangue e 21 (6,93%) de carrapatos mostraram-se positivas nos ensaios baseados no gene 16SrRNA, sendo 8 (2,64%) adultos e 8 (2,64%) pools de ninfas de *A. sculptum*; três (0,99%) *A. parvum* e dois (0,66%) pools de larvas. Os amplicons foram purificados, sequenciados e submetidos à análise filogenética Bayesiana com modelo evolutivo GTR+G+I. As sequências obtidas das amostras sanguíneas e dos ectoparasitas dos canídeos foram posicionadas no mesmo clado de sequências de *E. canis* detectados no Brasil e em outros países, e de sequências de *Ehrlichia* spp. obtidas a partir de felinos selvagens e gansos de vida livre do Brasil, com índice de suporte de clados de 61. Nenhuma amostra mostrou-se positiva nos ensaios baseados nos genes *groEL*, *dsb* e *omp-1*. Este estudo mostrou que *Ehrlichia* spp. circula entre canídeos selvagens e carrapatos na região do Pantanal sul matogrossense. O possível papel destes artrópodes como vetores do agente necessita de maiores investigações.



Palavras-chave: *Ehrlichia* spp., carnívoros, carrapatos.

Suporte Financeiro: FAPESP (Processos número 2013/13186-5; 2015/22397-0; 2015/14896-1); CNPq (Processo 473575/2014-0).