

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Camila Encarnação Minuzzi

**Deteção e caracterização molecular de *Sarcocystis* spp. em tecidos de  
ovinos abatidas em frigoríficos no sul do Brasil**

Santa Maria, RS, Brasil

2018

**Camila Encarnação Minuzzi**

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Sarcocystis* spp.  
EM TECIDOS DE OVINOS ABATIDAS EM FRIGORÍFICOS NO SUL  
DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**

Orientador: Fernanda Silveira Flores Vogel

Santa Maria, RS

2018

**Camila Encarnação Minuzzi**

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Sarcocystis* spp. EM  
TECIDOS DE OVINOS ABATIDAS EM FRIGORÍFICOS NO SUL DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**

**Aprovado em: 07 de fevereiro de 2018:**

---

**Fernanda Silveira Flores Vogel, Dr. (UFSM)**  
**(Presidente/Orientador)**

---

**Glauca Denise Kommers (UFSM)**

---

**Alfredo Skrebsky Cezar (UNIJUÍ)**

Santa Maria, RS

2018

## **AGRADECIMENTOS**

A concretização deste trabalho se deve principalmente ao auxílio e compreensão de muitas pessoas. Agradeço a todos que de alguma maneira participaram dessa realização.

Aos meus pais, por todo o amor e paciência. Por terem aceitado com tanta generosidade a ideia de um mestrado sem bolsa, eu sei que não foi fácil. Obrigada por depositarem em mim tanta confiança, espero poder um dia recompensar;

Ao meu irmão pelo amor e carinho;

Ao Victor por torcer sempre por mim, pela ajuda e pelos lanches nos dias que o turno se estendia no laboratório;

A minha orientadora por ser tão presente, sempre me guiando nos projetos e dando ideias e oportunidades. Obrigada pela amizade, carinho e apoio;

Ao professor Luís Antônio Sangioni pela disponibilidade e atenção que sempre dispõe;

A toda a equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias pela amizade e pelo auxílio durante o experimento. Em especial a Luiza e a Patrícia e ao Alfredo que tiveram enorme participação até a última versão deste trabalho. Obrigada pela ajuda e paciência;

A Universidade Federal de Santa Maria e ao programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária pela oportunidade de cursar o mestrado;

Por fim a toda a minha família e amigos, por compreenderem a minha ausência em alguns momentos, e por dividirem comigo esta alegria.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,  
mas lutei para que o melhor fosse feito.  
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus  
não sou o que era antes”*

*(Marthin Luther King)*

## RESUMO

### DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Sarcocystis* spp. EM TECIDOS DE OVINOS ABATIDAS EM FRIGORÍFICOS NO SUL DO BRASIL

AUTOR: Camila Encarnação Minuzzi

ORIENTADOR: Fernanda Silveira Flores Vogel

*Sarcocystis* spp. são coccídeos, intracelulares obrigatórios, de ciclo heteróximo, que são capazes de infectar uma gama grande de hospedeiros. Dentre as espécies de *Sarcocystis*, existem algumas diferenças em relação ao ciclo e patogenicidade, porém a formação de cistos teciduais é uma característica comum dentro do gênero. Em ovinos, as espécies de *Sarcocystis* que comumente estabelecem infecção são: *Sarcocystis tenella* e *Sarcocystis arieticanis* que apresentam a característica de formar cistos microscópicos e podem causar doença clínica ou infecção subclínica nesses animais, e *Sarcocystis gigantea* e *Sarcocystis medusiformis* formam cistos macroscópicos e apesar de não apresentarem potencial patogênico, podem acarretar relevantes perdas econômicas relacionadas a condenações de órgãos e carcaças em frigoríficos. As duas primeiras espécies apresentam canídeos como hospedeiros definitivos, enquanto as duas últimas tem como hospedeiros definitivos os felídeos. A sarcocistose é uma infecção disseminada por todo o mundo, apresentando altas taxas de ocorrência principalmente em países em desenvolvimento. No Brasil apesar de alguns estudos já demonstrarem a presença de *Sarcocystis* nos ovinos, os dados ainda são escassos e a epidemiologia da doença ainda é pouco conhecida. Tendo em vista a importância da infecção por *Sarcocystis* spp. nos ovinos, e a fim de preencher as lacunas existentes sobre essa questão este trabalho foi desenvolvido com intuito de pesquisar a ocorrência de *Sarcocystis* spp. em ovinos abatidos em Santa Maria e em Santiago, bem como, verificar a presença de DNA de *Sarcocystis* spp. nas amostras avaliadas, e identificar as espécies de *Sarcocystis* spp. nas amostras através da técnica de sequenciamento genético. Para a realização da reação de PCR foi selecionado o gene 18S rDNA, seguido de sequenciamento de amostras para identificar as diferentes espécies de *Sarcocystis* spp. Das 130 amostras analisadas, 10 foram positivas para presença de cistos macroscópicos, onde através da PCR se constatou *S. gigantea*, e este resultado foi confirmado pelo sequenciamento genético. Enquanto, cistos microscópicos foram encontrados em 125 animais, onde a PCR identificou a presença de *S. tenella*. Destas 125 amostras, 10 foram submetidas ao sequenciamento genético que confirmou a presença de *S. tenella*. A frequência de cistos microscópicos foi alta, embora esse não seja um dado surpreendente. Os cistos macroscópicos foram encontrados apenas no esôfago. Este trabalho traz a primeira confirmação molecular da presença de *S. gigantea* no Brasil.

**Palavras-chave:** Sarcocistose. Ovinos. Cistos

## ABSTRACT

### DETECTION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Sarcocystis* spp. IN TISSUE OF SHEEP SLAUGHTERED IN SOUTHERN BRAZIL

AUTHOR: Camila Encarnação Minuzzi

ADVISER: Fernanda Silveira Flores Vogel

*Sarcocystis* spp. are intracellular protozoan parasites with an intermediate-definitive host life cycle and can infect a wide range of animals. There are some differences among the *Sarcocystis* species related to the life cycle and pathogenicity, but the formation of tissue cysts is a common characteristic within the genus. In sheep, *Sarcocystis* species that commonly cause infection are *Sarcocystis tenella*, *Sarcocystis arieticanis*, *Sarcocystis gigantea* and *Sarcocystis medusiformis*. *S. tenella* and *S. arieticanis* present canids as definitive hosts, form microscopic cysts and can cause clinical disease or subclinical infection. On the other hand, *S. gigantea* and *S. medusiformis* which have felids as definitive hosts form macroscopic cysts and, although these *Sarcocystis* species do not have pathogenic potential in sheep, the presence of macrocysts cause condemnation of sheep meat and organs. Sarcocystosis is a widespread infection, with high occurrence rates mainly in developing countries. Although some studies have already demonstrated the presence of *Sarcocystis* species in sheep breeding in Brazil, more knowledge about sheep Sarcocystosis epidemiology is essential. Therefore, the aims of this study were to investigate the occurrence of *Sarcocystis* spp. in sheep slaughtered in Santa Maria and Santiago, as well as to check the presence of *Sarcocystis* spp. DNA in the evaluated samples and to identify the *Sarcocystis* species through genetic sequencing. A part of the 18S rDNA gene was selected for PCR amplification, followed by genetic sequencing aiming *Sarcocystis* species identification. Ten of the 130 sheep had macrocysts and all of these macrocysts were confirmed as *S. gigantea*. Micro cysts were found in 125 animals. All microcysts were of the *Sarcocystis* genus as shown by PCR amplification. Ten of these samples, randomly selected for gene sequencing, were confirmed as *S. tenella*. The frequency of microscopic cysts was high, although this is not surprising. Macroscopic cysts were found only in the esophagus. This study presents the first molecular confirmation of the presence of *S. gigantea* in Brazil.

**Keywords:** Sarcocystosis. Sheep. Cysts.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>11</b>
2.1	ETIOLOGIA	11
<b>2.1.1</b>	<b>Ciclo Biológico</b>	<b>12</b>
2.2	EPIDEMIOLOGIA	13
2.3	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	14
2.4	SINAIS CLÍNICOS	15
2.5	DIAGNÓSTICO	16
<b>2.5.1</b>	<b>Diagnóstico Indireto</b>	<b>17</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Diagnóstico Direto</b>	<b>17</b>
<b>2.5.3</b>	<b>Diagnóstico Molecular</b>	<b>19</b>
2.6	CONTROLE E PROFILAXIA	20
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO 1: Molecular identification of <i>Sarcocystis gigantea</i> macrocysts and <i>S. tenella</i> microcysts infecting sheep slaughtered in southern brazil</b>	<b>21</b>
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>36</b>
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>37</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Protozoários do filo Apicomplexa, da família Sarcocystidae que inclui os gêneros *Besnoitia*, *Cystoisospora*, *Hammondia*, *Neospora*, *Toxoplasma* e *Sarcocystis*, apresentam papel extremamente relevante como agentes etiológicos, determinando diferentes enfermidades tanto em animais como em humanos. (CORLISS, 1994).

O gênero *Sarcocystis* pertence ao filo Apicomplexa, família Sarcocystidae, e possui mais de 100 espécies que infectam mamíferos, aves, marsupiais e animais poiquilotérmicos (DUBEY & LINDSAY, 2006). Existem algumas diferenças no ciclo de vida e patogenicidade das espécies que constituem esse gênero, no entanto a formação de cistos teciduais é uma aptidão que diz respeito a todas elas, e sendo assim é a principal característica do gênero *Sarcocystis* (TENTER 1995).

Os parasitas do gênero *Sarcocystis* são protozoários obrigatoriamente intracelulares que apresentam ciclo de vida heteróximo obrigatório, sendo assim necessitam tanto de hospedeiros intermediários (herbívoros ou onívoros), como hospedeiros definitivos (carnívoros) para completarem seu ciclo (TENTER, 1995). No hospedeiro intermediário, acontecem os estágios de reprodução assexuada, enquanto no hospedeiro definitivo ocorre a reprodução sexuada desse protozoário (HECKEROTH & TENTER, 1995; DUBEY & LINDSAY, 2006).

Em ovinos, as espécies de *Sarcocystis* que comumente estabelecem infecção são *Sarcocystis tenella* e *Sarcocystis arieticanis*, que possuem canídeos como hospedeiros definitivos, são formadoras de cistos microscópicos e possuem patogenicidade. Além de *Sarcocystis gigantea* e *Sarcocystis medusififormis* que apresentam felídeos como hospedeiros definitivos e formam cistos macroscópicos, no entanto não são consideradas espécies patogênicas (DUBEY & LINDSAY, 2006).

Enquanto trabalhos realizados em outros países demonstram que a presença *Sarcocystis* spp. nos ovinos é muito frequente (BORJI et al., 2012; HAMIDINEJAT et al., 2012; FARHANG-PAJUH et al., 2013; RASSOULI et al., 2014), no Brasil os dados sobre a sarcocistose ainda são extremamente escassos. Evidenciando assim a necessidade de mais estudos acerca desta infecção no país.

Tendo em vista a importância da infecção por *Sarcocystis* spp. nos ovinos, e a fim de preencher as lacunas existentes sobre essa questão este trabalho foi desenvolvido com intuito

de: i) pesquisar a ocorrência de cistos microscópicos e macroscópicos de *Sarcocystis* spp. em amostras de músculo cardíaco e músculo esofágico de ovinos abatidos em Santa Maria e em Santiago, RS; ii) detectar a presença de DNA de *Sarcocystis* spp. nos cistos teciduais coletados desses ovinos; iii) Identificar as espécies de *Sarcocystis* spp. nas amostras através da técnica de sequenciamento genético.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ETIOLOGIA

A sarcocistose foi descrita pela primeira vez em 1843 por Miescher, na musculatura esquelética de camundongos domésticos, quando foi denominada de “Túbulos de Miescher” (RUAS et al., 2001). Lankester, 1882, foi o primeiro a caracterizar o gênero *Sarcocystis* com base na presença de cistos localizados no interior das células do tecido muscular estriado (LOPES, 2004).

O gênero *Sarcocystis* pertence ao filo Apicomplexa e a família Sarcocystidae (CORLISS, 1994; PESCADOR et al., 2007). As espécies deste gênero apresentam um ciclo heteroxeno, com a participação obrigatória de pelo menos dois hospedeiros, sendo um definitivo e um intermediário (TENTER, 1995; DUBEY e LINSLEY, 2006). Esse ciclo possui predadores como hospedeiros definitivos e uma gama de vertebrados como hospedeiros intermediários (LOPES, 2004).

As espécies de *Sarcocystis* geralmente são mais específicas para os seus hospedeiros intermediários do que para os hospedeiros definitivos (DUBEY e LINSLEY, 2006). Nem todas as espécies causam doenças em seus hospedeiros, geralmente, aquelas que usam canídeos como hospedeiros definitivos são mais patogênicas do que aquelas que usam felídeos. A patogenicidade das espécies manifesta-se usualmente apenas no hospedeiro intermediário (DUBEY e LINSLEY, 2006). Dentro da grande variedade de hospedeiros intermediários se encontram herbívoros como bovinos e ovinos (BUXTON, 1998).

Ovinos são hospedeiros intermediários de quatro espécies de *Sarcocystis*: *S. tenella* (*S. ovicanis*), *S. arieticanis*, *S. gigantea* (*S. ovifelis*), e *S. medusiformes*. As duas primeiras espécies são patogênicas, enquanto as duas últimas são consideradas espécies não patogênicas (DUBEY et al, 1989). *S. tenella* e *S. arieticanis* são espécies formadoras de cistos microscópicos, que possuem os cães como hospedeiro definitivo, enquanto *S. gigantea* e *S. medusiformes* são espécies formadoras de cistos macroscópicos na musculatura dos ovinos e tem como hospedeiro definitivo os gatos (BUXTON, 1998; DUBEY e LINSLEY, 2006).

### 2.1.1 Ciclo biológico

Os parasitas do gênero *Sarcocystis* apresentam ciclo de vida heteroxeno consistindo nas seguintes fases: esquizogonia, gametogonia e esporogonia (TENTER, 1995), com um estágio assexuado nos hospedeiros intermediários e um estágio sexuado nos hospedeiros definitivos (DUBEY, 1976; TENTER, 1995). Os hospedeiros definitivos, carnívoros e homem, adquirem o protozoário pela ingestão de formas encistadas presentes na musculatura de herbívoros e o parasito desenvolve uma fase intestinal que culmina com a produção de oocistos (TENTER, 1995; DUBEY e LINSLEY, 2006). Nos hospedeiros intermediários, a infecção por *Sarcocystis* spp. leva à formação de cistos nos tecidos, que quando maduros (cistos com bradizoítos) apresentam um grande número de bradizoítos (DUBEY, 1989).

Quando o hospedeiro definitivo ingerir tecidos contendo cistos maduros de *Sarcocystis*, estes cistos liberam os bradizoítos que penetram na mucosa do intestino delgado e se transformam em gametas masculino (microgametas) e feminino (macrogametas). Os microgametas liberados se movem ativamente para a periferia do macrogameta e após a fertilização, desenvolve-se uma parede em volta do zigoto, o que determina a formação do oocisto. (GUÇLU, 2004). Todo o processo de gametogonia e fertilização pode ocorrer em 24 horas (DUBEY e LINSLEY, 2006). Os oocistos do gênero *Sarcocystis* esporulam na lâmina própria do intestino do hospedeiro, e se dividem em dois esporocistos com quatro esporozoítos cada. Esse oocisto esporulado será liberado nas fezes do hospedeiro definitivo, sendo a fase infectante para o hospedeiro intermediário (GUÇLU, 2004). Os períodos pré-patente e patente variam, mas, para a maioria das espécies de *Sarcocystis*, os oocistos são primeiramente liberados nas fezes entre 7 e 14 dias após a ingestão do cisto (DUBEY, 1976).

A infecção nos hospedeiros intermediários inicia pela ingestão de alimentos ou água contaminados com oocistos e inicia o ciclo assexuado (CAWTHORN et al., 1986; DUBEY e LINSLEY, 2006). Os esporozoítos dentro dos esporocistos se rompem no intestino delgado e 7 a 15 dias após a inoculação é formada a primeira geração de esquizontes. Estes esquizontes podem se desenvolver em uma variedade de células, incluindo células endoteliais vasculares, células somáticas, e células neuronais, dependendo da espécie de *Sarcocystis*. A segunda geração de esquizontes ocorre de 19 a 46 dias após a inoculação (DUBEY et al., 1989). O número de gerações de esquizogonia e o tipo de célula hospedeira em que esquizogonia pode ocorrer variam com cada espécie de *Sarcocystis*, mas, todas as espécies que infectam mamíferos

domésticos de produção (ovelhas, cabras, gado e porcos) formam primeira e segunda geração esquizontes no endotélio vascular (DUBEY e LINSLEY, 2006).

Os merozoítos se formam na periferia dos esquizontes, e são encontrados no sangue 24 a 46 dias após a inoculação (DUBEY e LINSLEY, 2006). Após as esquizogonias, os merozoítos são liberados e penetram nas células hospedeiras e formam um vacúolo parasitóforo. Os merozoítos intracelulares sofrem repetidas divisões formando merócitos, que dão origem aos bradizoítos. Os cistos se localizam principalmente em músculos estriados, SNC e fibras de Purkinje no coração (DUBEY et al., 1989; TENTER, 1995; DUBEY e LINSLEY, 2006).

O sarcocisto consiste de uma parede que rodeia os bradizoítos. A estrutura e espessura da parede variam entre as espécies de *Sarcocystis* (DUBEY et al., 1989). Estes cistos se tornam infecciosos aproximadamente 75 dias após a infecção, mas há considerável variação entre espécies. Sarcocistos imaturos contendo apenas merócitos e esquizontes não são infecciosos para o hospedeiro definitivo (DUBEY e LINSLEY, 2006).

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA

A infecção por *Sarcocystis* é comum em muitas espécies de animais em todo o mundo (DUBEY et al., 1989; LOPES, 2004). Várias dessas espécies são relatadas como hospedeiros intermediários, entre elas os ovinos são comumente observados albergando esta infecção (BUXTON, 1998). A sarcocistose é mais comumente relatada na fase de vida adulta dos hospedeiros intermediários, talvez devido ao maior tempo de exposição aos oocistos infectantes, ou a imunidade insuficiente, já que na reinfecção os animais não possuem imunidade prévia suficiente (SÁ e LOPES, 1988; LOPES, 2004).

Algumas condições que permitem a alta prevalência são: o fato de um hospedeiro poder abrigar mais de uma espécie de *Sarcocystis*; a presença de muitos hospedeiros definitivos envolvidos na transmissão; um grande número de esporocistos pode ser liberado pelo hospedeiro definitivo; os oocistos de *Sarcocystis* e os esporocistos desenvolvem-se na lâmina própria e são descarregados ao longo de um período de muitos meses; oocistos e esporocistos são resistentes ao congelamento e podem passar o inverno na pastagem, ou podem ser espalhados por hospedeiros de transporte invertebrados; existe pouca ou nenhuma imunidade

prévia a infecção por *Sarcocystis*; os oocistos de *Sarcocystis*, ao contrário de outras espécies de coccídeos, são liberados nas fezes já na forma infecciosa (oocisto esporulado), o que liberta-os da dependência das condições do clima para maturação e infectividade (DUBEY e LINSLEY, 2006).

Um grande fator de risco é a presença dos cães nas propriedades rurais, uma vez que na maioria dos casos existe uma grande proximidade destes hospedeiros definitivos com instalações, água e alimento dos hospedeiros intermediários (FIGUEIREDO et al., 1991; RUAS et al., 2001). Além disso, deve ser considerada também a possibilidade da disseminação de oocistos por carnívoros silvestres que possam ter acesso às instalações (CAWTHORN et al., 1986).

Um dos fatores que favorecem a propagação de doenças infecciosas, incluindo parasitos como *Sarcocystis* spp., é a globalização. Patógenos podem ser disseminados expondo populações a uma nova infecção. A introdução de animais de produção, animais de companhia, e de vida selvagem em novas áreas, podem carrear parasitos para novos locais que antes seriam considerados exóticos ou ainda, causar uma reintrodução de parasitos em áreas endêmicas, apesar das regulamentações ou diretrizes internacionais usadas para minimizar esses riscos (ROBERTSON, et al., 2014).

Os estudos de mapeamento epidemiológicos recentemente vêm investindo em várias técnicas moleculares, como a PCR e suas variantes baseadas em mudanças na sequência do DNA. Estas técnicas possuem maior sensibilidade e rapidez para determinar diversidade genética entre muitos parasitos (BUXTON, 1998; GONZALEZ et al. 2006).

### 2.3 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

A produção de ovinos tem um importante papel na economia Brasil, com uma população de mais de 17,6 milhões ovelhas, no entanto, as espécies de *Sarcocystis* que infectam pequenos ruminantes no Brasil, bem como a frequência de infecção no animais, são mal conhecidos (BITTENCOURT et al., 2016).

A infecção por *Sarcocystis* é reconhecida como ocorrendo em diversas partes do mundo, no entanto está subestimada como causa de perdas na produção (BUXTON, 1998). *Sarcocystis* é um dos protozoários mais comumente encontrado na musculatura de ruminantes domésticos,

como bovinos e ovinos. Estudos mostram que a sarcocistose nos ovinos é uma infecção extremamente comum, principalmente em países em desenvolvimento (BUXTON, 1998). No Rio Grande do Sul, um estudo mostrou que a prevalência desse protozoário chega a 76% dos ovinos (PORTELA et al., 2016).

As perdas econômicas pela sarcocistose clínica frequentemente estão associadas a doença reprodutiva (abortos) e até mesmo a mortalidade dependendo da taxa de infecção (BUXTON, 1998; DUBEY & LINDSAY, 2006). No entanto, a sarcocistose aguda não é comumente observada, e sendo assim as maiores perdas produtivas e econômicas acontecem em função da sarcocistose crônica (subclínica). A ingestão doses baixas de oocistos de *S. tenella* ou *S. arieticanis* pode resultar em infecção subclínica, causando redução da qualidade e quantidade de carne e leite e lã, além de perdas reprodutivas (HECKEROTH e TENTER, 1999).

Além, das perdas pela sarcocistose clínica e subclínica, presença de cistos macroscópicos de *Sarcocystis* na musculatura dos hospedeiros intermediários é motivo de prejuízos (DUBEY et al., 1989; MARTÍNEZ et al., 2012; PESCADOR et al., 2007). Há um grande impacto econômico em algumas regiões devido à condenação de carcaças de ovinos e caprinos contendo cistos macroscópicos de *Sarcocystis* spp (BITTENCOURT et al., 2016). Um estudo na Espanha avaliou o abate de 5720 ovinos durante um ano e encontrou cistos macroscópicos em 12% (712) das carcaças do abatedouro. Dos 712 animais que apresentaram os cistos, 564 (79%) tiveram condenação total de carcaça (MARTÍNEZ et al., 2012). Dado que os cistos de pequenos ruminantes não possuem papel zoonótico, a condenação da carcaça é justificada com base no impacto visual negativo que os cistos podem ter sobre o consumidor (MARTÍNEZ et al., 2012).

Apesar da importância dos ovinos no Brasil, pouco se sabe sobre as espécies de *Sarcocystis* que infectam pequenos ruminantes no país, sobre as perdas econômicas com doenças clínica, subclínica, bem como sobre seu potencial impacto sobre a possível condenação de carne devido à presença de cistos macroscópicos desse parasita (BITTENCOURT et al., 2016).

## 2.4 SINAIS CLÍNICOS

A infecção por *Sarcocystis* é comumente observada em ovinos e cabras, mas a ocorrência de doença por sarcocistose clínica não é frequente nestas espécies animais (BUXTON, 1998). Usualmente os sinais clínicos são discretos e quando presentes incluem anorexia, febre, diminuição do ganho de peso, sinais neurológicos em cordeiros e abortos em ovelhas prenhes (PESCADOR et al., 2007).

Apesar da sarcocistose subclínica ser mais comum, a doença aguda quando ocorre está frequentemente associada a doença reprodutiva (abortos) e até mesmo a mortalidade dependendo da taxa de infecção (quantidade de oocistos ingeridos) e da imunidade do hospedeiro. (BUXTON 1998, DUBEY & LINDSAY, 2006). Quando o sistema nervoso central é afetado os animais podem mostrar fraqueza dos membros posteriores, ataxia, paresia, miopatia, e morte (DUBEY et al., 1989; BUXTON, 1998).

*Sarcocystis tenella* é a espécie mais patogênica para os ovinos. Os sinais clínicos geralmente são vistos durante o segundo ciclo esquizogônico em vasos sanguíneos (fase aguda). Três a quatro semanas após a infecção com uma grande dose de esporocistos (50,000 ou mais), pode ocorrer febre, anorexia, anemia, emaciação e perda lã, perda de peso e até mesmo morte (BUXTON, 1998). A associação da sarcocistose com o aborto em ovelhas prenhes já confirmado por microscopia eletrônica, no entanto sem a classificação da espécie causadora (PESCADOR et al., 2007). Em outro estudo realizado recentemente o aborto foi confirmado, demonstrando a presença do DNA de *S. tenella* em dois animais (BITTENCOURT et al., 2016).

Os animais se recuperam da sarcocistose clínica quando os sarcocistos começam a amadurecer (DUBEY e LINDSAY, 2006). Entretanto é importante ressaltar que, mesmo quando os animais tem cistos de uma infecção prévia na musculatura, este fato não os torna resistentes a uma nova fase aguda, pois esta está relacionada a dose infectante e ao desenvolvimento das fases merogônicas (SÁ e LOPES, 1988).

## 2.5 DIAGNÓSTICO

A sarcocistose é uma das causas de redução na produtividade de um rebanho, e desta forma, os métodos de diagnóstico são essenciais para a detecção de *Sarcocystis* (DUBEY et al., 1989).



### 2.5.1 Diagnóstico Indireto

Testes sorológicos tem sido desenvolvidos para diagnóstico de infecções por *Sarcocystis* spp. nos hospedeiros intermediários (DUBEY, 1989). Esses testes podem servir como exames de triagem, permitindo a detecção de anticorpos, a fim de facilitar o diagnóstico da infecção por *Sarcocystis*, por isso são de extrema importância em estudos epidemiológicos (GUÇLU, 2004).

A associação dos testes sorológicos com a sintomatologia clínica dos hospedeiros intermediários, pode ser a única forma de diagnóstico da sarcocistose antes da morte do animal. Pois os outros testes necessitam da visualização dos cistos em tecidos (NDIRITU, et al., 1996).

Técnicas sensíveis e específicas podem garantir o sucesso no controle da doença (TENTER, 1995). A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA) são os testes sorológicos mais utilizados para detecção de anticorpos contra *Sarcocystis* (LOPES, 2004).

Estes testes apresentam alta sensibilidade para a fase latente da infecção, porém não são espécie-específicos, sendo assim não se conseguem diferenciar infecções com espécies patogênicas de infecções com espécies não patogênicas (TENTER, 1995; HECKEROTH e TENTER, 1999). Além disso, pode haver reatividade cruzada entre diferentes espécies de *Sarcocystis* spp. que infectam o mesmo hospedeiro intermediário, dificultando diagnóstico imunológico específico (TENTER, 1995).

### 2.5.2 Diagnóstico direto

Vários métodos são frequentemente usados para detectar *Sarcocystis* diretamente no tecido, incluindo inspeção macroscópica, exame direto do tecido (DUBEY et al., 1989). Microscopia óptica e de transmissão são ferramentas convencionais para o diagnóstico de espécies de *Sarcocystis* spp. (JEHLE et al., 2009). No entanto, a visualização do parasito nos tecidos não necessariamente estabelece que *Sarcocystis* spp. seja a causa da doença, pois o parasito pode permanecer nos tecidos por muitos anos, mas não estar causando sinais clínicos naquele momento (SAVINI et al., 1994).

Cistos de *Sarcocystis* spp. geralmente são encontrados no coração, língua, esôfago e diafragma, porém, também podem ser visualizados em outros músculos, com prevalências variáveis. A visualização destes cistos deu origem ao diagnóstico de algumas espécies, com base na sua morfologia e hospedeiro parasitado (LOPES et al., 2004). Nos ovinos, cistos macroscópicos são característicos de *Sarcocystis medusiformis* e *Sarcocystis gigantea*, enquanto cistos microscópicos são característicos de *Sarcocystis tenella* e *Sarcocystis arieticanis* (BITTENCOURT et al., 2016).

A estrutura e a espessura da parede do cisto podem diferir entre as espécies de *Sarcocystis* e dentro de cada espécie pode variar com o amadurecimento do cisto (DUBEY et al., 1989). No entanto, as características morfológicas de cada cisto (forma e estrutura de superfície), dentro do gênero, tendem a ser bastante uniformes (GJERDE, 2013). Por este motivo, nem sempre na microscopia é possível diferenciar espécies de *Sarcocystis* spp. entre elas, uma vez que são muito semelhantes morfológicamente (DUBEY et al., 1989; TENTER, 1995).

Histologicamente, a parede do sarcocisto pode ser lisa, estriada, ou pode possuir protruções ramificadas. Internamente, grupos de bradizoítos podem ser segregados em compartimentos por septos que são originários da parede dos cistos, ou podem não estar compartimentados (DUBEY e LINSLEY, 2006).

Lesões microscópicas podem ser vistas em muitos órgãos, e consistem em necrose, edema e infiltrações de células mononucleares. Durante a fase crônica, as lesões são restritas aos músculos e consistem em miosite não duradoura e degeneração de sarcocistos (DUBEY e LINSLEY, 2006). Nos ovinos podem ser encontradas lesões de miosite eosinofílica (ME). Esta uma condição inflamatória específica do músculo estriado, principalmente atribuída a acumulações de eosinófilos (DUBEY et al., 1989). Esta lesão foi relatada principalmente em bovinos e ocasionalmente em ovinos. Os animais afetados geralmente são clinicamente normais, e as lesões são encontradas na inspeção de carne após o abate (DUBEY e LINSLEY, 2006).

Em função das poucas variações morfológicas dos cistos de *Sarcocystis*, a microscopia pode não ser a maneira mais eficiente na identificação específica da espécie (YANG et al., 2002). Nesse sentido, o desenvolvimento de novas técnicas moleculares proporcionam novos métodos de diagnóstico para estas infecções e podem diferenciar as espécies patogênicas e de maior importância epidemiológica (TENTER, 1995; HAMIDINEJAT, 2014).

### 2.5.3 Diagnóstico molecular

Desde cerca de 1990, os métodos moleculares têm sido cada vez mais usados para complementar e apoiar os dados morfológicos e biológicos na identificação de várias espécies de *Sarcocystis*, particularmente aquelas que infectam animais domésticos (GJERDE, 2013).

Várias técnicas moleculares, tais como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e as suas variantes com base em alterações na sequência nucleotídica tem sido utilizadas e consideradas sensíveis e a rápidas para determinar diversidade genética entre muitos parasitas, auxiliando de forma fundamental em estudos filogenéticos, taxonômicos, e no mapeamento epidemiológico (GONZALEZ et al., 2006).

Para obtenção de maior especificidade de diagnóstico é possível realizar a Nested-PCR, a qual consiste de duas amplificações consecutivas. Essa técnica é importante para detecção e identificação em situações nas quais a PCR simples não é suficiente para chegar a um diagnóstico conclusivo (HECKEROTH e TENTER, 1999). Todavia, os resultados podem ser confirmados pela análise de sequência do gene 18S rRNA (JEHLE et al., 2009).

A identificação entre as espécies de *Sarcocystis* pode ajudar a estimar a prevalência, distribuição, fonte de infecção e fatores de risco associado a estas infecções (MORÉ et al., 2013). O alvo de diagnóstico molecular e diferenciação entre as espécies de *Sarcocystis*, mais comum é a pequena subunidade do gene de RNA ribossomal (18S rDNA), que é repetitiva e demonstra ter variabilidade considerável entre as espécies de *Sarcocystis* (MORÉ et al., 2013). A região variável do gene 18S rRNA tem demonstrado um ótimo marcador antigênico para distinção de espécies similares de *Sarcocystis*, (YANG et al., 2002; BRÄUNIG et al. 2016).).

## 2.6 CONTROLE E PROFILAXIA

Até o presente momento, não existem vacinas comerciais disponíveis para proteção dos animais contra sarcocistose e a eliminação de oocistos e esporocistos pelos hospedeiros definitivos é o fator chave para controlar a disseminação da infecção (DUBEY & LINDSAY, 2006).

Para interromper este ciclo, deve-se evitar o contato dos carnívoros com alimentação e água dos hospedeiros intermediários. Além disso, os carnívoros não devem ser alimentados com carne crua. Os animais mortos não devem ser deixados no campo, e sim enterrados ou incinerados (DUBEY & LINDSAY, 2006). O congelamento pode reduzir drasticamente ou eliminar sarcocistos infecciosos, a carne deve ser congelada se não for cozida (DUBEY & LINDSAY, 2006).

Dessa forma, maiores esforços em educação sanitária aos produtores sobre boas práticas na agricultura são necessários, além do cozimento adequado de carnes antes de ser fornecido aos carnívoros e para o próprio consumo (BUCCA et al., 2011).

### 3 CAPÍTULO 1

(Artigo a ser submetido à revista *Veterinary Parasitology*)

#### **Molecular identification of *Sarcocystis gigantea* macrocysts and *S. tenella* microcysts infecting sheep slaughtered for human consumption in southern Brazil**

Authors: Camila E. Minuzzi<sup>1</sup>, Luiza P. Portella<sup>1</sup>, Patrícia Bräunig<sup>1</sup>, Alfredo Skrebsky Cezar<sup>2</sup>, Luis Antonio Sangioni<sup>1</sup>, Fernanda Silveira Flores Vogel<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Doenças Parasitárias (Ladopar), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, prédio 44, sala 5139, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Departamento de Estudos Agrários, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ), Rua do Comércio 3000, 98700-000 Ijuí, RS, Brazil.

<sup>1\*</sup> [fefevogel@gmail.com](mailto:fefevogel@gmail.com)

#### **Abstract**

Sheep can act as intermediate hosts for at least four *Sarcocystis* species. *S. tenella* and *S. arieticanis* form microcysts in sheep muscles and can cause clinical or subclinical sarcocistosis. *S. gigantea* and *S. medusiformis* have lower pathogenic potential, but they form macrocysts that can cause condemnation of sheep meat and organs. *Sarcocystis* species identification depends on molecular or electron microscopic analysis, what difficults this evaluation in the meat industry. Sheep production is a very traditional activity in Rio Grande do Sul state, southern Brazil, but little is known on the frequency and the species of *Sarcocystis* present in these sheep. The aims of this study were to evaluate the presence of macro and microcysts and to identify the *Sarcocystis* species occurring in esophagus and hearts of sheep slaughtered for human consumption in the Rio Grande do Sul state. Samples were collected from 130 animals in two

slaughterhouses, tissue samples were analyzed by macroscopic examination, followed by direct light microscopy and molecular methods. A part of the 18S rDNA gene was selected for PCR amplification, followed by genetic sequencing for *Sarcocystis* species identification. Ten (7.7%) of the 130 sheep had *S. gigantea* muscle macrocysts in esophagus. *Sarcocystis* spp. microcysts were identified from 125 (96.1%) animals. Ten of these samples, which were randomly selected for gene sequencing, were confirmed as *S. tenella*. These results revealed a high frequency of *Sarcocystis* spp. infections in sheep slaughtered for human consumption in southern Brazil. To the authors knowledge, this is the first molecular confirmation of *S. gigantea* infection in sheep from Brazil.

**Key words:** *Sarcocystis tenella*, *Sarcocystis gigantea*, 18S rDNA, PCR, genetic sequencing.

## Introduction

*Sarcocystis* spp. are ubiquitous intracellular protozoa that have a heteroxene life-cycle (Tenter, 1995; Gjerde, 2013). Predators, as carnivores and human, act as definitive hosts (DH) harboring the sexual reproduction stage of the parasite in their intestinal mucosa and shedding oocysts/sporocysts in their feces. Preys, as small ruminants, cattle, pigs, horses, and several other species act as intermediate hosts (IH) developing muscle sarcocysts after ingestion of food or water containing *Sarcocystis* oocysts/sporocysts. DH become infected ingesting the sarcocysts present in the preys' muscles (Dubey & Lindsay, 2006; Dubey et al., 2015). Moreover, dogs, cats, and human can act as IH ingesting environmental oocysts/sporocysts of certain *Sarcocystis* species (Tenter, 1995; Dubey et al., 2015; Fayer et al., 2015). Sheep can be infected by at least four *Sarcocystis* species: *S. tenella* and *S. arieticanis* form microscopic muscle cysts (microcysts) and have canids as DH; and *S. gigantea* and *S. medusiformis* form macroscopic muscle cysts (macrocysts) and have felids as DH (Oryan et al., 1996; Dubey & Lindsay, 2006).

The sarcocysts appear specially in heart, tongue, esophagus, and diaphragm muscles, but they can also infect several skeletal muscles and the central nervous system (Oryan et al., 1996; Lopes et al., 2004; Scott, 2014). Sarcocystosis usually presents a subclinical course in small ruminants (Buxton 1998). However, microcysts-forming *Sarcocystis* can cause anorexia, fever, decreased weight gain, neurological disease, and abortion in sheep (Pescador et al., 2007; Scott, 2014). Macrocyysts are generally not pathogenic to sheep, but their presence can cause losses due to carcass condemnation (Martínez-Navalón et al., 2012). Infection by the genus *Sarcocystis* can be diagnosed by visual inspection in the presence of macrocyysts or by light microscopy for microcysts detection (Gjerde, 2013; Bittencourt et al., 2016). However, transmission electron microscopy (TEM) or molecular characterization are needed to differentiate *Sarcocystis* species (Yang et al., 2002; Gjerde, 2013; Bittencourt et al., 2016).

Sheep wool and meat production are very traditional activities in southern Brazil, specially in the Rio Grande do Sul state (RS) that holds approximately 3.5 million sheep, representing near 20% of the Brazilian sheep flock (IBGE, 2016). Recently, a high frequency (76.2%) of microscopic sarcocysts was reported in the myocardium of sheep slaughtered in RS state (Portella et al., 2016). In addition, a case of multiple nodules morphologically compatible to *S. gigantea* found in the esophagus of three sheep slaughtered in a farm from Uruguaiiana municipality (RS) was reported (Damboriarena et al., 2016). However, no studies including molecular *Sarcocystis* species identification were performed in sheep from southern Brazil. Therefore, the aims of this study were to evaluate the occurrence of macro and microscopic sarcocysts and to identify the *Sarcocystis* species infecting the heart and esophagus of sheep slaughtered for human consumption in the Rio Grande do Sul state, southern Brazil.

## **Material and Methods**

The animals included in this study were all slaughtered for human consumption in two officially inspected abattoirs. The authors were not directly involved in the animals slaughtering and evisceration. All of this procedures were performed in accordance to the Brazilian legal protocols of ethics and animal welfare under supervision of the Official Veterinary Inspection Service technicians.

#### *Animals and samples*

Esophagus and myocardium samples were collected from 130 sheep that were slaughtered for human consumption in two abattoirs located in the municipalities of Santa Maria (n =101 sheep) and Santiago (n = 39 sheep), both in the Rio Grande do Sul state, southern Brazil. The animals were slaughtered according to technical procedures established in each abattoir under the supervision of the Official Veterinary Inspection System.

During the inspection of the sheep viscera a piece of approximately 20 cm of the esophagus (including cervical and thoracic segments) and a piece of approximately 50 g of the heart ventricles apex were collected. Each sample was individually stored in a plastic bag including the sheep identity number, and maintained at 4 ° C until analysis. Collections were performed once a week during the months of June to September, 2016 to avoid concentration of many sheep from the same flock.

#### *Macroscopic and microscopic examination*

Esophagus and heart tissue samples were macroscopically examined by the naked eye searching for macrocysts and lesions. When present, two macrocysts were excised from each animal and stored at -80°C for further molecular analysis.

Fresh microscopic examination was performed after 50 g of each tissue sample was cut and minced in petri dishes with scalpel blades. Subsequently, aliquots of approximately 20g of



each tissue sample were mixed with 20 ml of PBS (pH 7.3). The solution was filtered through a gauze to a sterile petri dish for subsequent observation under light microscopy at 400x magnification. Each sample was classified as positive or negative for the presence of macro and microscopic sarcocysts. During microscopic examination, microcysts found in each sample were collected with micropipette and stored in identified microtubes at -80 °C for further DNA extraction.

#### *DNA extraction*

Genomic DNA was extracted from all the macrocysts and from a pool of the microcysts (five to 20 microcysts) collected from each sample of esophagus and heart using a commercial kit (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega, USA) according to manufacturer's instructions. Briefly, 600 µL of chilled Nuclei Lysis Solution was added to one cyst previously collected from macro and /or microscopic examination, homogenized, and incubated at 65 °C for 30 min. After incubation, 3 µL of RNase Solution was added, incubated for 30 min at 37 °C, followed by addition of 200 µL of Protein Precipitation Solution, vortexed, chilled on ice for 5 min, and centrifuged at 13000 × g for 4 min. The supernatant was transferred to a fresh new tube, added 600 µL of isopropanol, mixed and centrifuged at 13000 × g for 1 min. After centrifugation, the supernatant was removed, and 600 µL of 70% ethanol was added to the pellet and centrifuged at the same conditions described above. The ethanol was aspirated, pellet was air-dried and DNA rehydrated in 100 µL of DNA Rehydration Solution for 1 h at 65 °C. After rehydration, the concentration and quality of DNA extracted from each sample were analyzed using spectrophotometer NanoDrop 1000 (absorbance of 260/280 nm ratio for purity evaluation) (ThermoScientific, USA) and finally DNA was stored at -80 °C until PCR analysis.

#### *PCR and electrophoresis*

Nested-PCR was performed according to SILVA et al. (2009), using the following primer pairs: external Tg18s48F 5'-CCATGCATGTCTAAGTATAAGC-3'; Tg18s359R 5'-GTTACCCGTCCTACTGCCAC-3', and internal 5'-Tg18s58F-CTAAGTATAAGCTTTTATACGGC-3'; Tg18s348R 5'-TGCCACGGTAGTCCAATAC3' for amplification of a 310 bp fragment from the 18S rDNA gene. Each PCR was performed in a total volume of 25  $\mu$ L, containing 1X buffer (Promega, USA); 10 mM dNTPs (Ludwig Biotec, Brazil); 10 pmol of primer (IDT, USA); 1U Taq DNA polymerase (Promega, USA); approximately 20 ng of DNA as template in the first reaction. In the second reaction 2  $\mu$ L of the first PCR amplification product was used as DNA template. A DNA sample from a previously sequenced *S. gigantea* macrocyst was used as positive control for PCR analyses and MilliQ water was used as negative control. PCR was performed using a thermocycler (T100™ Thermalcycler, Bio-Rad, Singapore), with initial denaturation step at 94 ° C for 5 minutes; followed by 35 cycles of 94 ° C for 45 s, 55 ° C for 45 s, and 72 ° C for 45 seconds; and a final extension step at 72 ° C for 5 min. Conditions were the same for first and second Nested-PCR phases. Final (second phase) PCR products were analyzed using 2% agarosis gel stained with SYBR® safe DNA staining (Invitrogen™, USA) and visualized by UV illumination.

### *Gene sequencing*

Gene sequencing was performed for *Sarcocystis* species identification. DNA product amplified from each macrocyst found was subjected to DNA sequencing. Given the great number of samples infected by microcysts, ten *Sarcocystis* spp. DNA positive samples were randomly selected for DNA sequencing, being five of these corresponding to esophagus samples and the other five corresponding to heart samples.

Firstly, PCR products from the second phase amplification were purified using QIAquick PCR Purification Kit (QUIAGEN, USA) according to the manufacturer's

instructions. Briefly, 5 volumes of PB buffer was added to 1 volume of the PCR reaction and mixed. This mixture was applied to the column placed in a microtube, centrifuged for 1 min, 17,900 x g and the flow-through was discarded. After, 750 µl of Buffer PE was added to the column and centrifuged at the same conditions described above. After centrifugation, the flow-through was discarded and centrifugation step was repeated. The column was replaced in a clean new tube, added 50 µl of Buffer EB, and centrifuged for 1 min, 17,900 x g. After centrifugation, the column was discarded and the eluted DNA concentration was analyzed using spectrophotometer NanoDrop 1000 (ThermoScientific, USA).

After purification, DNA sequencing was performed using 5 pmol of external primers separately, 30-60 ng of purified PCR product and MiliQ water in a final volume of 6 µl. This was followed by dehydration at 60°C for 2 hours and finally submitted to sequencing (ACTGene - Serviço de Sequenciamento, Brazil). The results obtained were analyzed using StandenPackage software and the generated nucleotides sequences evaluated in Genbank NCBI database blast search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

### *Statistical analysis*

Frequencies of macrocysts and microcysts present in the samples taken from the sheep hearts and esophagus were compared by the Chi-Square test using the SAS software. A confidence level of 95% was considered for statistical significance ( $p < 0.05$ ).

## **Results**

As shown in the Figure 1, sarcocysts were detected in 96.1% (125/130) of the sheep. All of these positive sheep had microcysts (Figure 2) detected in at least one tissue sample. Ten of these sheep (7.7%; 10/130) had macrocysts (Figure 3) present in the esophagus. No macrocysts were found in the heart samples. These muscle macrocysts were characterized as

white oval-shaped nodules of 3 to 5 mm diameter present in the external wall of the esophagus samples. The number of macrocysts found ranged from four to 15 in the approximately 20 cm longer esophagus pieces. All sheep that had macrocysts were slaughtered in the abattoir located in Santa Maria, RS.

Microcysts were found in a higher frequency in the heart 91.5% (119/130) in comparison to the esophagus (81.5%; 106/130) samples ( $p=0.01817$ ). Microcysts were found in both heart and esophagus in 76.9% (100/130) of the animals. Thus, 14.6% (19/130) of the sheep had microcysts detected in the heart, but not in the esophagus; and six sheep (4.6%) had microcysts detected only in the esophagus. Eight of the sheep infected with macrocysts had also microcysts in both esophagus and heart, while two sheep had macro and microcysts in the esophagus, and no cysts in the heart.

All the microcysts subjected to DNA sequencing were identified as *S. tenella* given their 99% identity with *Sarcocystis tenella* sequence available in GenBank (MF039329.1). All the macrocysts found were identified as *S. gigantea* after DNA sequencing given their 98-100% identity with *Sarcocystis gigantea* sequence available in GenBank (KC209733.1).

## **Discussion**

To the authors knowledge, these results are the first molecular confirmation of the presence of *S. gigantea* in Brazil. Macrocysts found in the present study were characterized as white, oval-shaped nodules, which are morphologically compatible with macroscopic cysts of *Sarcocystis* spp., similarly to macrocysts recently described in sheep slaughtered in a farm located in Rio Grande do Sul state, Brazil (Damboriarena et al., 2016). Therefore, these results indicate that the presence of *Sarcocystis* macrocysts infecting sheep has been misdiagnosed in the sheep flock from the Rio Grande do Sul state. Currently, there are no other reports of the presence of *Sarcocystis* spp. macrocysts in sheep from the Americas, excepting one case

reported from Argentina, where one sheep was found dead with several *S. gigantea* macrocysts (confirmed by molecular identification) in the esophageal and pharyngeal muscles (Gual et al., 2017).

Detection rates of macroscopic cysts and distribution of the species *S. gigantea* and *S. medusiformis* vary among studies conducted in countries from other regions of the world as Iran (Oryan et al., 1996; Bahari et al., 2014; Hatami et al., 2017), Algeria (Dahmani et al., 2017), and Italy (Pipia et al., 2016). In general, these studies highlight the economic losses caused by the condemnation of sheep organs and carcasses due to the macrocysts presence, even these macrocysts are considered not pathogenic to the sheep (Martinez-Navalón et al., 2012; Bahari et al., 2014; Bittencourt et al., 2016). Additionally, several factors may to influence the frequency of detection of macroscopic cysts, mainly depending on the region, animals age, and organs analyzed (Dehaghi et al., 2013; Dahmani et al., 2017).

A high frequency (96.1%) of *Sarcocystis* spp. microcysts infecting the sheep studied was showed. In addition, results showed that the frequency of microcysts was higher in the heart (91.5%) in comparison to the esophagus (81.5%) samples. However, these high infection rate was not totally surprising, since a 76.2% infection rate was already reported in myocardium samples from sheep originated from the Rio Grande do Sul state (Portella et al., 2016). In the present study, microcysts subjected to DNA sequencing were identified as *S. tenella*. Although *S. tenella* was the first *Sarcocystis* species described in sheep in Brazil (Silva et al., 2009), no studies on *Sarcocystis* spp. species identification were performed in most regions of the country. Recently, microscopic sarcocysts were reported from sheep (*S. tenella* and *S. arieticanis*) and goats (*S. capracanis*) slaughtered in Bahia state, northeastern Brazil, with a prevalence of 95.8% detection of microscopic cysts evaluating sheep heart, tongue, and esophagus (Bittencourt et al. 2016).

*Sarcocystis* spp. sarcocysts can be detected using several simple laboratory techniques, as naked-eye inspection (for macrocysts only), morphological examination using light microscopy, and histological analysis. However, *Sarcocystis* species identification depends on transmission electron microscopy analysis or molecular analysis (Hamidinejat et al, 2014; Bittencourt et al. 2016). Occurrence of mixed macro and microscopic sarcocysts infection and the great difference between the high frequency of microcysts and the low frequency of macrocysts are in accordance with other studies on sheep sarcocystosis (Dehaghi et al., 2013, Bahari et al., 2014). These results suggest that *Sarcocystis* species that form microcysts tends to predominate on that species which form macrocysts. These differences could be related to definitive hosts presence, re-infection rates, and maintenance of the parasites' biological cycle (Adriana et al, 2008; Dehaghi et al. 2013).

Despite the importance of sheep industry in South America, studies on sheep sarcocystosis in Brazil and other countries of South America are currently very scarce. Anyway, available data indicate that sarcocystosis may be widespread in these sheep flocks. Therefore, further studies are important to allow a broad evaluation on the impacts of sarcocystosis in sheep production, and to contribute for epidemiology understanding as well as prevention and control measures on sheep sarcocystosis in these regions.

## **Conclusion**

A high frequency of *Sarcocysts* spp. infection was found in sheep slaughtered for human consumption in the Rio Grande do Sul state, southern Brazil. These sheep were infected mainly by microcysts, however, macrocysts were also found. The presence of the microcyst-forming species *S tenella* was molecularly confirmed in heart and esophagus samples. The presence of *S. gigantea* macrocysts was molecularly confirmed for the first time in Brazil.

## References

- Adriana, T., Mircean, V., Blaga R., Bratu C.N., Cozma, V., 2008. Epidemiology and Etiology in Sheep Sarcocystosis. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine*. 65(2), 49-54.
- Bahari, P., Salehi, M., Seyedabadi, M., Mohammadi, A., 2014. Molecular Identification of Macroscopic and Microscopic Cysts of Sarcocystis in Sheep in North Khorasan Province, Iran. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*. 3, 51-56.
- Bittencourt, M.V., Meneses, I.D.S., Andrade, M.R., Jesus, R.F., Araújo, F.R., Gondim, L.F.P., 2016. Sarcocystis spp. in sheep and goats: frequency of infection and species identification by morphological, ultrastructural, and molecular tests in Bahia, Brazil. *Parasitology Research*. 115, 1683-1689.
- Buxton, D., 1998. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. *Veterinary Research*. 29, 289–310.
- Dahmani, A., Harhoura, K., Aissi, M., Zenia, S., Saadi, A., Kadour, R., 2017. Study of ovine sarcosporidiosis invslaughterhouses of El Harrach in north of Algeria. *Veterinaria*. 66, 133-138.
- Damboriarena, P.A., Silveira, C.S., Morais, R.M., Anjos, B.L., 2016. Natural *Sarcocystis gigantea* infection in sheep from Southern Brazil. *Ciência Rural*. 46, 1229-1233.
- Dehaghi, M.M., Fallahi, M., Sami, M., Radfar, M.H., 2013. Survey of *Sarcocystis* infection in slaughtered sheep in Kerman Abattoir, Kerman, Iran. *Comparative Clinical Pathology*. 22, 343-346.
- Dubey, J. P., Calero-Bernal, R., Rosenthal, B. M., Speer, C. A., & Fayer, R., 2015. *Sarcocystosis of animals and humans*. CRC Press.
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., 2006. Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in Ruminants. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*. 22, 645-671.

- Fayer, R., Esposito, D. H., & Dubey, J. P., 2015. Human infections with *Sarcocystis* species. *Clinical microbiology reviews*. 28(2), 295-311.
- Gjerde, B., 2013. Phylogenetic relationships among *Sarcocystis* species in cervids, cattle and sheep inferred from the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene. *International Journal for Parasitology*. v.43, p.579-591, 2013.
- Gual, I., Bartley, P.M., Katzer, F., Innes, E.A., Cantón, G.J., Moore, D.P., 2017. Molecular confirmation of *Sarcocystis gigantea* in a naturally infected sheep in Argentina: A case report. *Veterinary Parasitology*. 248, 25-27.
- Hamidinejat, H., Moetamedi, H., Alborzi, A., Hatami, A., 2012. Prevalence and distribution patterns of *Sarcocystis* in camels (*Camelus dromedarius*) in Yazd province, Iran. *Journal of Parasitic Diseases*. 37, 163-165.
- Hatami, A., Rashno, Z., Hamidinejat, H., & Youssefi, M. R., 2017. Molecular identification of macroscopic cysts of *Sarcocystis* in sheep in Babol, in the north of Iran. *Tropical Biomedicine*, 34(2), 405-411.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2016). Pesquisa da Pecuária Municipal (PPM). Available at: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>>
- Lopes, C.W.G., 2004. O gênero *Sarcocystis* (LANKESTER, 1882) (apicomplexa: sarcocystidae), uma questão a ser reavaliada no Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 13, 14-16.
- Martinez-Navalón, B. Giner, B.A., Fructuoso, MG., Martínez, P.S., Morant, A.L., Castarlenas, B.P., Goyena. E., Berriatua, E., 2012. *Sarcocystis* infection: a major cause of carcass condensation in adult sheep in Spain. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 10, 388-392.
- Oryan, A., Moghaddar, N., & Gaur, S. N. S., 1996. The distribution pattern of *Sarcocystis* species, their transmission and pathogenesis in sheep in Fars Province of Iran. *Veterinary research communications*. 20(3), 243-253.



- Pescador, C.A., Corbellini, L.G., Oliveira, E.C., Bandarra, P.M., Leal, J.S., Pedroso, P.M.O., Driemeie, D., 2007. Aborto ovino associado com infecção por *Sarcocystis* spp. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 27, 393–397.
- Portella, L.P., Cadore, G.C., Sangioni, L.A., Alves, M.E.M., Chemeris, R., Brum, L.P., Vogel, F.S.F., 2016. Detecção molecular de protozoários da família Sarcocystidae em ovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*. 46, 1613-1617.
- Pipia, A. P., Varcasia, A., Zidda, A., Dessì, G., Panzalis, R., Tamponi, C., ... & Chiesa, F., 2016. Cross-sectional investigation on sheep sarcosporidiosis in Sardinia, Italy. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 3, 13-17.
- Scott, P., 2014. Sarcocystosis in sheep. *Livestock*, 19(6), 356-359.
- Silva, R., Su, C., Langoni, H., 2009. First identification of *Sarcocystis tenella* (Railliet, 1886) Moulé, 1886 (Protozoa: Apicomplexa) by PCR in naturally infected sheep from Brazil. *Veterinary Parasitology*. 165, 332-336.
- Tenter, A.M., 1995. Current research on *Sarcocystis* species of domestic animals. *International Journal of Parasitology*. 25, 1311-1330.
- Yang, Z.Q., Li, Q.Q., Zuo, Y.X., Chen, X.W., Chen, Y.J., Nie, L., Wei, C.G., Zen, J.S., Attwood, S.W., Zhang, X.Z., Zhang, Y.P., 2002. Characterization of *Sarcocystis* species in domestic animals using a PCR-RFLP analysis of variation in the 18S rRNA gene: a cost-effective and simple technique for routine species identification. *Experimental Parasitology*. 102, 212–217.

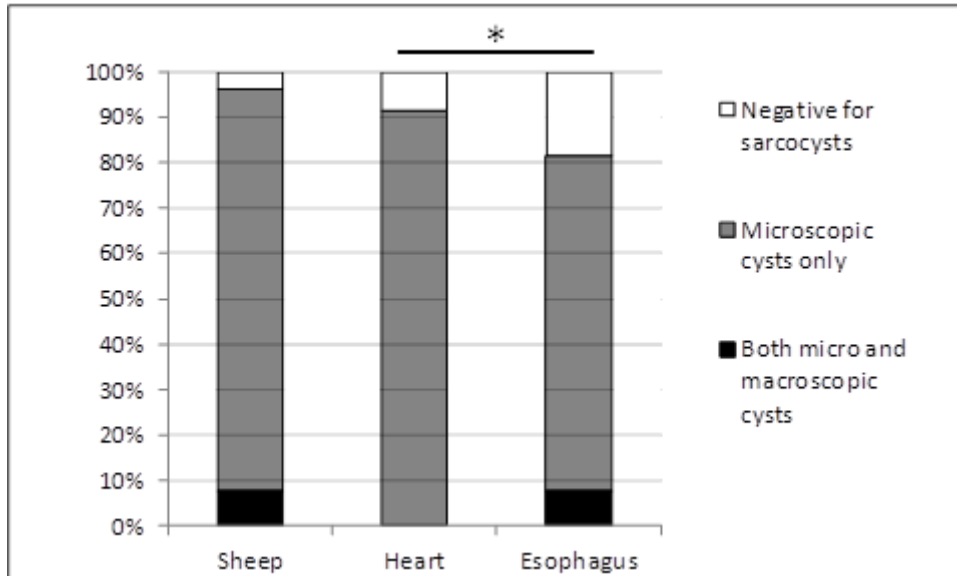


Figure 1 – Frequencies of macro and microscopic sarcocysts found per sheep and comparing heart and esophagus samples from each sheep slaughtered for human consumption in two abattoirs in the Rio Grande do Sul state, southern Brazil. The asterisk (\*) indicates significant difference between the frequencies of sarcocysts positive samples from hearts and esophagus at a 95% confidence level ( $p=0.01817$ ).



Figure 2 – Microscopic sarcocyst isolated from sheep muscle and morphologically characterized as *Sarcocystis* spp. microcyst. Light microscopy at 400 x magnification.



Figure 3 – Two white oval-shaped macroscopic sarcocysts present in sheep esophageal muscle layer and morphologically characterized as *Sarcocystis* spp. macrocysts.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do experimento realizado permitem concluir que as espécies encontradas, *S. gigantea* e *S. tenella*, foram as mais frequentemente detectadas em ovinos nessa região, como tem sido relatado em outros lugares. Além disso, a alta taxa de detecção de cistos de *Sarcocystis* spp. encontrada nesse estudo (96,1%) confirma a disseminação deste protozoário em pequenos ruminantes. Este dado é extremamente relevante uma vez que este protozoário tem sido relacionado a perdas econômicas devido a menor produtividade e condenação de carcaça. Assim, evidencia-se a necessidade de estudos envolvendo a epidemiologia bem como a medidas de prevenção e controle da sarcocistose em ovinos.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BITTENCOURT, M. V. et al., Sarcocystis spp. in sheep and goats: frequency of infection and species identification by morphological, ultrastructural, and molecular tests in Bahia, Brazil. **Parasitology Research**. v. 115, p.1683-1689. 2016. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00436-016-4909-5>. Acesso em: 14 Ago. 2017. DOI: 10.1007/s00436-016-4909-5

BORJI, H. et al A retrospective study of abattoir condemnation due to parasitic infections: Economic importance in Ahwaz, southwestern Iran. **Journal of Parasitology**., v.98, p. 954-957, 2012. Disponível em: [http://www.bioone.org/doi/10.1645/GE-2988.1?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://www.bioone.org/doi/10.1645/GE-2988.1?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed). Acesso em: 27 Set. 2016. DOI: 10.1645/GE-2988.1.

BRÄUNIG et al. DNA extraction methods and multiple sampling to improve molecular diagnosis of Sarcocystis spp. in cattle hearts. **Parasitology Research**, v.115, p.3913-3921, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27277233>. Acesso em: 02 Abr. 2017. doi: 10.1007/s00436-016-5158-3.

BUCCA, M. et al., Prevalence and distribution of Sarcocystis spp. cysts in several muscles of cattle slaughtered in Sicily, Southern Italy. **Food Control**. v.22, p.105-108. 2011. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/222624430>. Acesso em: 17 Ago. 2017. DOI: 10.1016/j.foodcont.2010.05.015.

BUXTON, D., Protozoan infections (Toxoplasma gondii, Neospora caninum and Sarcocystis spp.) in sheep and goats: recent advances. **Veterinary Research**., v. 29, p.289–310, 1998. Disponível em: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00902530/document>. Acesso em: 15 out. 2016.

CAWTHORN, R. et al. In vitro excystation of Sarcocystis capracanis, Sarcocystis cruzi, and Sarcocystis tenella (Apicomplexa). **Journal of Parasitology**. v. 72, p. 880-884, 1986. Disponível em: <https://www.islandscholar.ca/islandora/object/ir%3Air-batch6-3234>. Acesso em: 16 Nov. 2017.

CORLISS, J. O. An interim utilitarian (“user-friendly”) hierarchical classification and characterization of the protists. **Acta Protozoologica**., EUA, v. 33, p. 1-51, 1994.

DUBEY, J. P. A review of Sarcocystis of domestic animals and of other coccidia of cats and dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 169, p. 1061-1078, 1976. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/824260>. Acesso em: 18 Nov. 2016.

DUBEY, J.P. et al., Sarcocystosis of animals and man. **Parasitology**, vol. 100, 1989.

DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in Ruminants. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, EUA v.22, p.645-671. 2006. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/6725742>. Acesso em 10 Out. 2017. DOI: 10.1016/j.cvfa.2006.08.001.

FARHANG-PAJUH et al., Molecular determination of abundance of infection with Sarcocystis species in slaughtered sheep of Urmia, Iran. **Veterinary Research Forum**, Iran v. 5, p.181-186. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4279651/>. Acesso em: 02 Dez. 2017.

FIGUEIREDO, P. S. et al., Espécies do gênero Sarcocystis Lankester, 1882 (Apicomplexa: Sarcocystidae) parasitas de ruminantes domésticos que tem o cão como hospedeiro definitivo. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v. 14, n. 1, p. 1-12, 1991.

GJERDE, B., Phylogenetic relationships among Sarcocystis species in cervids, cattle and sheep inferred from the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene. **International Journal for Parasitology**, v.43, p.579-591, 2013. Disponível em: [http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020-7519\(13\)00087-8](http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020-7519(13)00087-8). Acesso em: 04 Mai. 2017. DOI: 10.1016/j.ijpara.2013.02.004.

GONZALEZ, L. M, et al., Differential molecular identification of Taeniid spp. and Sarcocystis spp. cysts isolated from infected pigs and cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 95–101, 2006. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304-4017\(06\)00355-4](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304-4017(06)00355-4). Acesso em: 21 Out. 2017. DOI: [doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.06.009](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.06.009).

GUÇLU, F. et al., Differential identification of cattle Sarcocystis spp. by random amplified Polymorphic DNA-Polymerase chain reaction (RAPD-PCR). **Revue de Médecine Vétérinaire**, v.155, p.440-444. 2004. Disponível em: [http://www.revmedvet.com/2004/RMV155\\_440\\_444.pdf](http://www.revmedvet.com/2004/RMV155_440_444.pdf). Acesso em: 09 Set. 2017.

HAMIDINEJAT, H., et. Al. Prevalence and distribution patterns of Sarcocystis in camels (Camelus dromedarius) in Yazd province, Iran. **Journal of Parasitic Diseases**, v.37, p.163-165, 2012. Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3793098/pdf/12639\\_2012\\_Article\\_150.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3793098/pdf/12639_2012_Article_150.pdf). Acesso em: 14 Out. 2017. DOI: 10.1007/s12639-012-0150-z.

HECKEROTH, A. R., TENTER, A. M., Comparison of immunological and Molecular Methods for the Diagnosis of Infections Pathogenic *Sarcocystis* species in Sheep. **Tokai journal of**

**experimental and clinical medicine**, v.23, n. 6, p.293-302, 1999. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10622625>. Acesso em: 09 Nov. 2017.

JEHLE, C. et al., Diagnosis of Sarcocystis spp. in cattle (*Bos taurus*) and water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Northern Vietnam. **Veterinary Parasitology**, v.166, 314–320. 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19783101>. Acesso em: 14 Set. 2017. DOI: 10.1016/j.vetpar.2009.08.024.

LOPES, C. W. G., O gênero Sarcocystis (LANKESTER, 1882) (apicomplexa: sarcocystidae), uma questão a ser reavaliada no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, p. 14-16, 2004. Disponível em: 9 [http://www.rbpv.ufrj.br/documentos/13supl.12004/pp13s114\\_16.pdf](http://www.rbpv.ufrj.br/documentos/13supl.12004/pp13s114_16.pdf). Acesso em: 12 Set. 2017.

MARTINEZ, B. N. et al. Short communication. Sarcocystis infection: a major cause of carcass condensation in adult sheep in Spain. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.10, p.388-392, 2012. Disponível em: <file:///D:/Cliente/Downloads/2270-10315-1-PB.pdf>. Acesso em: 27 Out. 2017. DOI: 10.5424/sjar/2012102-523-11.

MORÉ, G. et al., Development of a multiplex real time PCR to differentiate Sarcocystis spp. affecting cattle. **Veterinary Parasitology**, v.197, p.85– 94. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23680541>. Acesso em: 04 Ago. 2017. DOI: 10.1016/j.vetpar.2013.04.024.

NDIRITU, W. et al., Use of genomic DNA probes for the diagnosis of acute sarcocystosis in experimentally infected cattle. **Veterinary Parasitology**, v.62, p.9-25. 1996. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8638397>. Acesso em: 05 Set. 2017.

PESCADOR, C. A., CORBELLINI, L. G., OLIVEIRA, E. C., BANDARRA, P. M., LEAL, J.S., PEDROSO, P. M. O., DRIEMEIER, D., Aborto ovino associado com infecção por Sarcocystis sp. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, p. 393–397. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/pvb/v27n10/a01v2710.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2017.

PORTELA, L.P. et. al. Detecção molecular de protozoários da família Sarcocystidae em ovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.46, p.1613-1617, 2016. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/cr/v46n9/1678-4596-cr-46-09-01613.pdf>. Acesso em: 19 Out. 2017. DOI: 10.1590/0103-8478cr20151365.

RASSOULI, M et al., Prevalence of Sarcocystis spp. and Hammondia spp. Microcysts in esophagus tissue of sheep and cattle, emphasized on their morphological differences. **Parasitology Research**, v.113, p.3801-3805, 2014. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25082016>. Acesso em: 14 Dez. 2017. DOI: 10.1007/s00436-014-4047-x.

ROBERTSON, L.J et al., Have foodborne parasites finally become a global concern? **Trends Parasitology**, v.29, p.101–103. 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492212002139?via%3Dihub>. Acesso em: 12 Nov. 2017. DOI: [doi.org/10.1016/j.pt.2012.12.004](https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.12.004).

RUAS, J.L. et al., Prevalência de *Sarcocystis* spp. (LANKESTER, 1882) em bovinos clinicamente sadios, da região sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.7 n 3, p.227-230, 2001. Disponível em: <https://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/CAST/article/viewFile/402/394>. Acesso em: 21 Out. 2017.

SÁ, W.F. de; LOPES, C.W.G. Sarcocistose bovina: aborto e outras alterações clínicas em vacas leiteiras experimentalmente infectadas com *Sarcocystis cruzi* (Hasselmann, 1926) Wenyon, 1926 (Apicomplexa: Sarcocystidae). **Arquivos Fluminenses de Medicina Veterinária**, v. 3, p. 75-80, 1988.

SAVINI, G. et al., Evaluation of a serological test system for the diagnosis of *Sarcocystis cruzi* infection in cattle using *S. cruzi* merozoite antigen. **Veterinary Parasitology**, v. 51, p.181-189. 1994. Disponível em: [https://ac.els-cdn.com/0304401794901554/1-s2.0-0304401794901554-main.pdf?\\_tid=d874331a-cec1-11e7-ab17-00000aacb362&acdnat=1511271941\\_c218737619252c591c6ce7d7b6435973](https://ac.els-cdn.com/0304401794901554/1-s2.0-0304401794901554-main.pdf?_tid=d874331a-cec1-11e7-ab17-00000aacb362&acdnat=1511271941_c218737619252c591c6ce7d7b6435973). Acesso em: 9 Set. 2017.

TENTER, A.M. Current research on *Sarcocystis* species of domestic animals. **International Journal of Parasitology**, v.25, p.1311-1330. Nov. 1995. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8635883>. Acesso em: 23 Jun. 2017. DOI: [10.1016/0020-7519\(95\)00068-D](https://doi.org/10.1016/0020-7519(95)00068-D).

YANG, Z.Q. et al., Characterization of *Sarcocystis* species in domestic animals using a PCR-RFLP analysis of variation in the 18S rRNA gene: a cost-effective and simple technique or routine species identification. **Experimental Parasitology**, v.102, p.212–217. 2002. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001448940300033X>. Acesso em: 12 Jul. 2017. DOI: 10.1016/S0014-4894(03)00033-X.