



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MÉRCIA DE SEIXAS

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE
Cryptosporidium spp. E *Giardia* spp. EM OVINOS DA
REGIÃO NORTE DO PARANÁ**

Londrina
2020

MÉRCIA DE SEIXAS

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE
Cryptosporidium spp. E *Giardia* spp. EM OVINOS DA
REGIÃO NORTE DO PARANÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. João Luis Garcia

Londrina
2020

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

M555 Seixas, Mércia.
OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *Cryptosporidium* spp. E *Giardia* spp. EM OVINOS DA REGIÃO NORTE DO PARANÁ / Mércia Seixas.
- Londrina, 2020.
69 f. : il.

Orientador: João Luis Garcia.
Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2020.
Inclui bibliografia.

1. Ocorrência e Caracterização Genética de *Cryptosporidium* spp. em ovinos. - Tese. 2. Ocorrência e Caracterização Genética de *Giardia* spp. em ovinos. - Tese. I. Garcia, João Luis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 576.8::619

MÉRCIA DE SEIXAS

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE
Cryptosporidium spp. E *Giardia* spp. EM OVINOS DA
REGIÃO NORTE DO PARANÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Luís Garcia
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Fernando de Souza Rodrigues
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Luiz Daniel de Barros
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra Kátia Denise Saraiva Bresciani
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Profa. Dra. Liza Ogawa
Universidade Estadual do Norte do Paraná -
UENP

Londrina, 15 de Julho de 2020.

Dedico este trabalho Aos Meus Pais Isilda e José (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Isilda Carlos Seixas e José Gláucio de Seixas (*in memoriam*) pelo amor incondicional e apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos Lincoln, Giovana e André, minhas cunhadas Marcela e Carla, e meu sobrinho Luís Gabriel por toda parceria, amizade e cumplicidade.

Ao meu orientador Prof. Dr. João Luís Garcia, pela oportunidade, ensinamentos, paciência, compreensão e amizade.

Aos professores Profa. Dra Kátia Denise Saraiva Bresciane, Profa. Dra Liza Ogawa, Prof. Dr. Fernando de Souza Rodrigues, Prof. Dr. Luiz Daniel de Barros que prontamente aceitaram participar da banca de defesa, e pelas contribuições ao trabalho.

Aos professores Dr. Fernando de Souza Rodrigues, Dr. Luiz Daniel de Barros e Dr. Sérgio Tosi Cardim que prontamente aceitaram participar da banca de qualificação, e pelas contribuições ao trabalho.

Aos professores que me acompanharam durante a graduação, residência, mestrado e doutorado, pelos ensinamentos.

A todos os colegas de laboratório Miura, Beatriz, Fernanda, Thaís Cabral, Priscilla, João Pedro, Ana Sue, Hugo e Nelson pela ajuda sempre que necessário e pela amizade.

As minhas irmãs de residência Thaís Agostinho e Ana Flávia, sem elas eu não teria concluído este trabalho, muito obrigada pela paciência, amizade e risadas.

Ao meu irmão de pós Sérgio Tosi Cardim, muito obrigada pelas contribuições a este trabalho, pela amizade, risadas e incentivo desde a residência até o final deste estudo.

Aos meus colegas de trabalho que se tornaram verdadeiros amigos Felipe Martins, Ana Clécia e Winnie, muito obrigada pelas contribuições ao trabalho.

Aos funcionários dos laboratórios, secretários do DMVP, Pós, HV,

enfermeiros e o pessoal da limpeza, Dalva, Beatriz, Aldair, Helenice, Valdecir, Vilma, Rose, Maristela e Débora por estarem sempre prontos para atender nossas necessidades por facilitar nosso trabalho ao máximo possível tanto graduação, residência, mestrado e doutorado.

Aos meus amigos de Londrina, pelas risadas, confusões, passeios, alguns veterinários outros agregados, Gabriela e Stelinha, Taciane, Eduardo (*in memoriam*), Mariana, Alessandra, Joice, Carol, Cristiane e Majú, Stefani, e Gabriel, Gabriela, Iara (*in memoriam*), Simone, Laís, Carol, Negri, Anderson, Joice e Talita.

As minhas filhas caninas Mundi e Bella, pelo amor incondicional.

Ao programa de pós-graduação pela oportunidade, e auxílio na realização desse trabalho.

“A compaixão para com os animais é das mais nobres virtudes da natureza humana.”

(Charles Darwin)

SEIXAS, Mércia. **Ocorrência e caracterização genética de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em ovinos da região norte do Paraná.** 2020. 69 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

Cryptosporidium spp. e *Giardia* spp. são protozoários entéricos conhecidos mundialmente por causar quadros de diarreia, dor abdominal e perda de peso principalmente em animais jovens. Os ovinos além de terem contato com outras espécies de animais são possíveis reservatórios de protozoários com potencial zoonótico. O objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência e caracterizar geneticamente o *Cryptosporidium* spp. e a *Giardia* spp. em ovinos da região norte do Paraná. Foram coletadas 443 amostras de fezes de ovinos de diferentes idades e raças, de ambos os sexos. Após extração do DNA as amostras foram submetidas a nested PCR (n-PCR) da região 18S rDNA. As positivas foram submetidas a técnica de Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) e sequenciamento genético. Para análise da presença da *Giardia* spp. foi realizada n-PCR, as amostras positivas foram submetidas a n-PCR para o gene β -*giardina*, e as positivas nesta técnica foram enviadas para sequenciamento genético. A presença do *Cryptosporidium* spp. foi identificada em três amostras (0,7%) na n-PCR, essas amostras foram submetidas a RFLP, uma das amostras foi identificada como *C. parvum*, e as outras duas apresentaram um padrão de clivagem compatível com *C. bovis* e/ou *C. xiaoi*. No sequenciamento genético foi possível confirmar os resultados, sendo a primeira *C. parvum*, e as duas últimas como *C. xiaoi*. As análises de n-PCR para *Giardia* spp. revelaram 92 amostras positivas (20,8%), que foram submetidas ao gene β -*giardina*, destas 25 foram positivas (27,2%). Algumas amostras positivas no gene β -*giardina* foram sequenciadas, onde foi possível observar a ocorrência da *G. duodenalis* assemblage E. Este é o primeiro estudo a descrever a presença destes parasitas em ovinos na região Norte do Paraná. O presente estudo evidenciou que os ovinos podem atuar como um potencial reservatório desses protozoários, o que poderia acarretar em transmissão aos humanos e outros animais, além de causar prejuízos à sanidade animal e econômicos ao produtor.

Palavras-chave: Criptosporidiose, Giardíase, nested-PCR, PCR-RFLP, Cordeiro

SEIXAS, Mércia. **Occurrence and genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in sheep from Northern Paraná State.** 2020. 69 Pages. Thesis (PhD in Animal Science) – State University of Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

Cryptosporidium spp. and *Giardia* spp. are worldwide known enteric protozoan parasites that cause episodes of diarrhea, abdominal pain and weight loss in young animals. Sheep can be bred close to other animal species besides being feasible reservoir of potentially zoonotic protozoan. The aim of this study was to verify the occurrence and genetically characterize both *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in sheep from Northern Paraná State. Fecal samples were collected directly from the rectal ampoule of 443 sheep, from different ages, breeds and both genders. After the DNA extraction, the samples were submitted to a nested PCR (n-PCR) for region 18S rDNA. The RFLP method and genetic sequencing were performed with the positive samples from the n-PCR. To analyze the presence of *Giardia* spp., a n-PCR was done. Another nested PCR looking for the β -*giardin* gene was performed with the detected positive samples and, the β -*giardin* gene positive samples were sent for genetic sequencing. The presence of *Cryptosporidium* spp. was identified in three samples (0.7%) through the n-PCR technique. These positive samples were submitted to the RFLP, resulting in one sample identified as *C. parvum* and two other ones presented a cleavage standard compatible with *C. bovis* and/or *C. xiaoi*. Through the genetic sequencing it was possible to confirm the results, with the first sample as *C. parvum* and the others as *C. xiaoi*. The *Giardia* nested PCRs detected 92 positive samples (20.8%) that were submitted for the β -*giardin* gene identification, resulting in 25 positive samples (27.2%). A few samples were sequenced, achieving the detection of *G. duodenalis* assemblage E. This is the first study to describe the presence of these parasites in ovines from Northern Paraná State. The present study demonstrated that sheep can be potential reservoir of these protozoan parasites, which could result in their transmission for human and animal health damage.

Keywords: Criptosporidiosis, *Giardiasis*, nested-PCR, RFLP, lambs.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
CEUA	Comissão de Ética de Uso de Animais
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio Imunoenzimático Indireto
n-PCR	Reação de <i>nested</i> PCR
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
UEL	Universidade Estadual de Londrina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	CRYPTOSPORIDIUM SPP. EM OVINOS	15
2.1.1	Ciclo Biológico	16
2.1.2	Epidemiologia	17
2.1.3	Criptosporidiose Em Ovinos	18
2.1.4	Potencial Zoonótico	19
2.2	GIARDIA SPP. EM OVINOS	20
2.2.1	Classificação Taxonômica	20
2.2.2	Ciclo Biológico	21
2.2.3	Epidemiologia	21
2.2.4	Giardíase Em Ovinos.....	23
2.2.5	Potencial Zoonótico	23
	REFERÊNCIAS	24
3	OBJETIVOS	32
3.1	OBJETIVO GERAL	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
	ARTIGO A – OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE Cryptosporidium spp. EM OVINOS DA REGIÃO NORTE DO PARANÁ	33
	RESUMO	33
	ABSTRACT	34
1	INTRODUÇÃO	35
2	MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1	AMOSTRAS	36
2.2	EXTRAÇÃO DE DNA	36
2.3	TÉCNICAS MOLECULARES	37
2.4	SEQUENCIAMENTO GENÉTICO E ÁRVORE FILOGENÉTICA.....	37

3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS	44
	ARTIGO B – OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE	
	Giardia SPP. EM OVINOS DA REGIÃO NORTE DO PARANÁ	48
	RESUMO	48
	ABSTRACT	49
1	INTRODUÇÃO	50
2	MATERIAL E MÉTODOS	52
2.1	AMOSTRAS	52
2.2	QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO	52
2.3	EXTRAÇÃO DE DNA	52
2.4	AMPLIFICAÇÃO DA PCR	53
2.5	SEQUENCIAMENTO GENÉTICO E ÁRVORE FILOGENÉTICA.....	54
2.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4	CONCLUSÃO	61
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
	APÊNDICE A	66
	APÊNDICE B	67

1 INTRODUÇÃO

Os ovinos foram uma das primeiras espécies domesticadas pelo homem, justificado pela docilidade e admirável adaptabilidade aos diversos climas, proporcionando sua presença em todos os continentes, bem como uma fonte de lã, carne, leite e de couro (VIANA, 2008).

No Brasil, tem-se o relato de que as ovelhas foram transportadas pelos portugueses em meados de 1500 com a colonização para fornecer principalmente a lã e a carne (MCMANUS *et al.*, 2010). Segundo o último Censo Agropecuário, há cerca de 13,9 milhões de cabeças dispersas pelo Brasil, sendo a região Sul com a segunda maior população ovina do país, apresentando por volta de 3,3 milhões. Nesta região, o Paraná encontra-se em segundo lugar com aproximadamente 435 mil cabeças (SOUZA *et al.*, 2016).

No histórico da ovinocultura paranaense há dados de que ao término da década de 70, a criação era para a produção laneira. Em 2003, a Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado do Paraná (SEAB) lançou o Programa Estadual de Apoio à Estruturação das Cadeias Produtivas de Ovinos e Caprinos (PAECPOC), cuja finalidade era integrar os setores da ovinocultura, apesar da produção de carne ter se tornado o principal foco do programa. Dessa forma, os criadores do estado se tornaram mais qualificados dada a necessária competitividade para atender as exigências do mercado consumidor (SEAB., 2008).

Por exigir baixo investimento, a produção de ovinos é considerada uma atividade ideal para agricultores familiares, cuja economia representa 67% do total de pessoas ocupadas no campo (IBGE) (LUCENA *et al.*, 2020).

Diante de tantas vantagens, faz-se necessário ter muita atenção ao manejo sanitário dos ovinos. O maior problema enfrentado por estes animais são as infecções consequentes de endoparasitas (SILVA *et al.*, 2011).

Giardia spp. e *Cryptosporidium* spp. são protozoários causadores de diarreia em animais e humanos, e são amplamente distribuídos em diversos países. Ambos são considerados pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) como uns dos principais parasitas transmitidos por alimentos para os humanos (FAO., 2014; MI *et al.*, 2018, QI *et al.*, 2019).

Cryptosporidium apresenta aproximadamente 30 espécies diferentes nos

mais diversos hospedeiros (humanos e animais), as quais podem variar de acordo com a região onde foram estudadas. Em ovinos as principais espécies são *Cryptosporidium. parvum*, *C. xiaoi*, e *C. ubiquitum*. Os cordeiros jovens, são os mais prejudicados pela infecção do parasito, pois estes podem apresentar quadro de diarreia e perda de peso, podendo evoluir para o óbito e os ovinos mais velhos tendem a ser assintomáticos (GRAAF *et al.*, 1999; XIAO *et al.*, 1999; MONIS, THOMPSON., 2003; RYAN *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2009; MAJEED *et al.*, 2018; MI *et al.*, 2018).

G. duodenalis é considerada a principal espécie responsável por parasitar mamíferos, atualmente ela possui oito assemblages reconhecidos que vão A ao H, dos quais os genótipos de caráter zoonóticos são o A e B. Além da *G. duodenalis* outras seis espécies são atualmente reconhecidas sendo elas a *G. agilis*, *G. ardea*, *G. microti*, *G. muris*, *G. psitacci*, e *G. varani*. De acordo com as ocorrências relatadas em ovinos, *G. duodenalis* com assemblages E, A e B são os mais descritos. O assemblage E é o de maior ocorrência, devido a este fato, alguns estudos questionam a real importância dos ovinos na transmissão da *Giardia* com importância zoonótica (RYAN *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2009, CHEN *et al.*, 2019; QI *et al.*, 2019).

A presença de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em ovinos e seu potencial como reservatório dos parasitas de caráter zoonótico foram pouco estudados no Brasil, portanto estudos que visam avaliar a epidemiologia devem ser incentivados em diferentes cidades da região norte do estado do Paraná.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. EM OVINOS

Cryptosporidium spp. é um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, classe Conoidasida, subclasse Cryptogregarina, ordem Eucoccidiorida, subordem Eimeriorina, família Cryptosporidiidae, e gênero *Cryptosporidium* (CLODE *et al.*, 2015; RYAN *et al.*, 2016). Alguns trabalhos baseados em análises filogenéticas discordam desta classificação, uma vez que acreditam que o parasita apresenta maior afinidade com as Gregarinas quando comparada aos coccídeos (RYAN *et al.*, 2016). Algumas diferenças que reforçam essa discordância são a ausência de invasão celular, sua localização epicelular, capacidade de completar seu ciclo sem estar ligado a célula hospedeira e infecção de diferentes hospedeiros (CLODE., 2015; RYAN *et al.*, 2016).

O parasita possui atualmente mais de 30 espécies descritas. O Quadro 1 apresenta as principais espécies, seus hospedeiros, e sua localização.

Quadro 1. Principais espécies de *Cryptosporidium*, seus hospedeiros e sua localização.

Espécie	Hospedeiro/ Localização	Referência
<i>C. muris</i>	Roedores (E)	Tizzer, 1910
<i>C. parvum</i>	Camundongos, Ruminantes e Humanos (ID)	Tizzer, 1912
<i>C. meleagridis</i>	Aves e Humanos (ID)	Slavim, 1955
<i>C. wrairi</i>	Cobaio (<i>Cavia porcelus</i>) (ID)	Vetterling <i>et al.</i> , 1971
<i>C. serpentis</i>	Lagartos e Serpentes (E)	Brownstein <i>et al.</i> , 1977; Levine., 1980
<i>C. baileyi</i>	Aves (B, TR, C)	Current <i>et al.</i> , 1986
<i>C. felis</i>	Felinos (ID)	Iseki., 1987
<i>C. saurophilum</i>	Lagartos (E, ID)	Koudela; Modry., 1998
<i>C. andersoni</i>	Bovinos (AB)	Lindsay <i>et al.</i> , 2000
<i>C. canis</i>	Caninos (ID)	Fayer <i>et al.</i> , 2001
<i>C. hominis</i>	Humanos (ID)	Morgan-Ryan <i>et al.</i> , 2002

<i>C. molnari</i>	Peixes (E)	Alvarez - Pellietro <i>et al.</i> , 2004 & Sitjà-Bobadilla., 2002
<i>C. galli</i>	Aves (P)	Pavlassec., 1999; Ryan., 2003
<i>C. suis</i>	Suínos (ID, IG)	Ryan <i>et al.</i> , 2004
<i>C. bovis</i>	Bovinos (ID)	Fayer <i>et al.</i> , 2005
<i>C. fayeri</i>	Canguru vermelho (<i>Macropus rufus</i>)	Ryan <i>et al.</i> , 2008
<i>C. ryanae</i>	Bovinos (D*)	Fayer <i>et al.</i> , 2008
<i>C. xiaoi</i>	Ovinos (D*)	Fayer e SANTIN., 2009
<i>C. ubiquitum</i>	Ruminantes, Humanos (ID)	Fayer <i>et al.</i> , 2010
<i>C. cuniculis</i>	Coelhos (D*)	Robson <i>et al.</i> , 2010
<i>C. viatorum</i>	Humanos (D*)	Elwin <i>et al.</i> , 2012
<i>C. scrofarum</i>	Suínos (D*)	Kvác <i>et al.</i> , 2013

Localização do parasita no hospedeiro: AB- Abomaso; B- bursa de Fabrícus; C-cloaca; D- desconhecido; E- estômago; ID- intestino delgado; IG- intestino grosso; P- Proventrículo. (Adaptado de XIAO; RYAN, 2004; SMITH *et al.*, 2007; SLAPETA., 2013; RYAN *et al.*, 2014; RYAN; HIJJAW., 2015; RYAN, ZAHEDI, PAPANIM., 2016).

2.1.1 Ciclo biológico

Cryptosporidium é um protozoário monoxeno, sendo excretado na forma de oocisto esporulado nas fezes de um hospedeiro infectado. Esta forma do parasita apresenta uma parede trilaminar, conferindo resistência ao parasita no meio ambiente. O oocisto pode permanecer viável em solução aquosa por três meses aproximadamente, na temperatura variando entre 15° a 20°C, e se ele for mantido refrigerado a sua viabilidade pode chegar a um ano. Caso o oocisto seja aquecido a temperatura de 65°C por 30 minutos, ou congelado a -70°C a sua infectividade será reduzida (TZIPORI., 1983; ROBERTSON *et al.*, 1992; KING *et al.*, 2005). Esse quando excretado contamina fômites, além de água e alimentos que podem ser ingeridos pelos hospedeiros suscetíveis (FAYER., 2004; THOMPSON *et al.*, 2005).

Após a ingestão o oocisto irá sofrer excitação e liberará quatro esporozoítos, os quais são capazes de parasitar as células epiteliais do trato gastrointestinal, como as células do intestino delgado. Estes oocistos serão

englobados pelas microvilosidades intestinais formando o vacúolo parasitóforo. Após esta fase, irá ocorrer a diferenciação dos esporozoítos em trofozoítos, iniciando-se o processo de reprodução assexuada, conhecida como merogonia (FOREYT., 1990; RYAN., 2005; XIAO., 2008).

Na fase de merogonia duas gerações são formadas, os merontes tipo I, com oito merozoítos em seu interior. Estes merozoítos são capazes de infectar novas células e originar a segunda geração, os merontes tipo II irão se diferenciar nos estágios sexuais representados pelos microgametócitos e macrogametócitos (THOMPSON *et al.*, 2005, XIAO., 2008). Após a fecundação do macrogametócito pelo microgametócito é formado o zigoto ou oocisto, que conterá quatro esporozoítos no seu interior. Durante a formação dos oocistos serão formados dois tipos, os oocistos de parede espessa que representam aproximadamente 80% e serão eliminados para o meio ambiente juntamente com as fezes do hospedeiro infectado. Os outros 20% de oocistos formados serão de parede fina, sendo responsáveis pela infecção das células intestinais adjacentes por meio do mecanismo de autoinfecção (BARKER; CARBONELL., 1974; THOMPSON., 2005; XIAO., 2008).

2.1.2 Epidemiologia

Atualmente a criptosporidiose em ovinos pode ser causada por diferentes espécies de acordo com a localização geográfica estudada, porém as três espécies mais frequentes são *C. parvum*, *C. xiaoi*, *C. ubiquitum* (QI *et al.*, 2019; THOMPSON *et al.*, 2005). Além destas três espécies, estudos recentes relatam a ocorrência de mais cinco espécies de *Cryptosporidium* em ovinos, sendo *C. hominis*, *C. andersoni*, *C. fayeri*, *C. suis*, *C. Scrofarum*.

A primeira descrição da identificação do *Cryptosporidium* spp. em ovinos foi realizada no ano de 1974 por Barker e Carbonell na Austrália, em animais na faixa etária entre sete e 21 dias de idade, apresentando quadro clínico de diarreia (CONSEDEY., 2008; WANG *et al.*, 2010; SAHRAOUI *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2018; QI *et al.*, 2019).

No quadro 2 pode-se observar estudos sobre a ocorrência do parasita na população ovina em diferentes regiões do Brasil.

Quadro 2. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em ovinos de acordo com o ano, a região estudada, técnica diagnóstica e as espécies encontradas.

Autor e ano	Estado	Técnica diagnóstica	Positividade	Espécies encontradas
Tembue <i>et al.</i> , 2006	PB	Pesquisa oocistos	3,7% (3/81)	
Consendey <i>et al.</i> , 2008	RJ	Pesquisa oocistos	47% (61/130)	
Féres <i>et al.</i> , 2009	SP	PCR/ Sequenciamento genético	6,7% (31/460)	<i>C. parvum</i> e genótipo de cervídeo
Sevá <i>et al.</i> , 2010	SP	PCR/ Sequenciamento genético	0%	
Coelho <i>et al.</i> , 2016	GO, MS, MG, SP	PCR/ Sequenciamento genético	16,66% (32/192)	<i>C. parvum</i>
Fiuza <i>et al.</i> , 2011	RJ	PCR/ Sequenciamento genético	1,6% (2/90)	<i>C. ubiquitum</i>
Paz e Silva <i>et al.</i> , 2014	SP	PCR/ Sequenciamento genético	25% (25/100)	<i>C. ubiquitum</i> e <i>C. parvum</i>
Zucatto <i>et al.</i> , 2015	SP	PCR/ Sequenciamento genético	15% (28/193)	<i>C. ubiquitum</i> , <i>C. parvum</i> e <i>C. xiaoi</i>

2.1.3 Criptosporidiose em ovinos

A infecção por *Cryptosporidium* spp. é de maior importância em cordeiros jovens (BARKER; CARBONELL., 1974; KAUPÉK *et al.*, 2017). Animais da primeira até quinta semana de vida são os mais suscetíveis a infecção e apresentam um quadro clínico mais grave (FOREYT., 1990; THOMPSON *et al.*, 2005). Borregos apresentam retardo de crescimento, e os ovinos adultos tendem a ser refratários a infecção e a manifestação da doença (GRAAF.,1999;

THOMPSON *et al.*, 2005; KAUPEK *et al.*, 2017).

O período pré-patente da infecção varia de cinco dias até duas semanas. Os sinais clínicos apresentados pelos animais são diarreia amarelada fétida variando de leve a grave, depressão, anorexia, dor abdominal e perda de peso. A diarreia pode ser autolimitante em animais imunocompetentes, porém em animais com co-infecção o quadro tende a ser mais grave e aumenta as chances de óbito. Os principais patógenos associados são Rotavírus, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella*, *Giardia* e *Eimeria* (THOMPSON *et al.*, 2005; FIUZA *et al.*, 2011; SLAPETA., 2013; KOINARI *et al.*, 2014).

2.1.4 Potencial Zoonótico

Cryptosporidium spp. é de ocorrência mundial, responsável por infectar pessoas em 106 países, sendo os mais acometidos crianças e indivíduos imunodeficientes (XIAO., 2008; CACCIO; CHALMERS., 2016).

As principais espécies responsáveis por infectar humanos são *C. parvum* e *C. hominis*, porém até o presente momento as espécies *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. suis*, *C. andersoni* e *C. ubiquitum* já foram isoladas em humanos em diferentes localidades (XIAO; FENG., 2008; PEREIRA *et al.*, 2009).

A criptosporidiose em humanos está intimamente relacionada ao status imunológico. Os estudos demonstram que indivíduos imunodeficientes incluindo HIV/AIDS sem tratamento com drogas antirretrovirais são os mais infectados pelo protozoário, apresentando um quadro de diarreia crônica, podendo evoluir para o óbito. Indivíduos imunocompetentes apresentam um quadro de diarreia intermitente e autolimitante, e esse quadro pode perdurar por até duas semanas (FOREYT., 1990; MC MAUGLIN., 2000; FAYER., 2000).

Os sinais clínicos comuns nos humanos infectados pelo *Cryptosporidium* spp. são dor abdominal, febre, vômito, diarreia, síndrome da má absorção e problemas respiratórios. O período de incubação varia de dois a 10 dias, podendo ser de 28 dias (RYAN., 2016; PEREIRA *et al.*, 2009).

2.2 GIARDIA SPP. EM OVINOS

2.2.1 Classificação taxonômica

A classificação taxonômica da *Giardia* spp. passou por revisão e é controversa para alguns pesquisadores até o presente momento, sendo que a primeira descrição do parasita foi realizada por Lambl no ano de 1859 (THOMPSON; MONIS., 2011). *Giardia* pertence ao reino Excavata, filo Metamonada, classe Fornicata, ordem Diplomonadida, família Giardiinae (ADL *et al.*, 2012), e atualmente sete espécies de *Giardia* são aceitas, *Giardia agilis*, *Giardia ardea*, *Giardia microti*, *Giardia muris*, *Giardia psitacci*, *Giardia varani*, *Giardia duodenalis*, como apresentado no quadro 2 (FENG; XIAO.,2011).

Quadro 3. Principais espécies de *Giardia* e seus hospedeiros.

Espécies	Hospedeiros principais
<i>G. agilis</i> Kunstler, 1882	Anfíbios
<i>G. ardeae</i> Noller, 1920	Aves
<i>G. microti</i> Benson, 1908	Ratos e ratazanas
<i>G. muris</i> Benson, 1908	Roedores
<i>G. psitacci</i> Erlandsen e Bemrick,1987	Pássaros
<i>G. varani</i> Lavier,1923	Lagartos
<i>G. duodenalis</i> Davaine, 1875	Mamíferos

Feng e Xiao(2011)

A espécie *G. duodenalis* até o presente momento possui grupos genotípicos que vão do A ao H, como apresentado no quadro 3 (FENG; XIAO., 2011).

Quadro 4. Principais espécies de *G. duodenalis* que parasitam mamíferos.

Assemblages	Hospedeiros principais
Assemblage A	Humanos, primatas não humanos, ruminantes, cães, gatos, equinos, roedores, marsupiais e outros mamíferos

Assemblage B	Humanos, primatas não humanos, ruminantes, coelhos, equinos e roedores
Assemblage C	Caninos domésticos e selvagens
Assemblage D	Caninos domésticos e selvagens
Assemblage E	Ruminantes domésticos e suínos
Assemblage F	Gatos
Assemblage G	Roedores
Assemblage H	Mamíferos marinhos

Feng e Xiao (2011)

2.2.2 Ciclo Biológico

Giardia é um protozoário que possui dois estágios de desenvolvimento, os trofozoítos e os cistos. O cisto é considerado a forma de resistência do parasita no ambiente, podendo permanecer viável por semanas em baixas temperaturas e locais úmidos. Quando os cistos são liberados com as fezes do animal infectado, este já é considerado infectante para hospedeiros suscetíveis (FENG; XIAO., 2011; XIAO; FAYER.,2008).

O ciclo biológico da *Giardia* se inicia com ingestão de cistos presentes em água e alimentos que entraram em contato com as fezes contaminadas. Após a ingestão do parasita ocorre a excitação no duodeno por influência das enzimas pancreáticas e ácidos estomacais, liberando os trofozoítos. Os trofozoítos são simétricos bilateralmente, flagelados e apresentam disco ventral que permite a adesão nas vilosidades do intestino delgado, onde se multiplica de forma assexuada por divisão binária. Alguns trofozoítos vão se encistar e serão excretados com as fezes (THOMPSON., 2004).

2.2.3 Epidemiologia

A descrição de *Giardia* em ovinos é relatada variando de 10 a 40% de positividade, sendo a *G. duodenalis* assemblage E o mais prevalente em diferentes localidades ao redor mundo (ROBERTSON., 2009). No quadro 4 pode-se observar estudos sobre a ocorrência do parasita na população ovina em diferentes regiões do mundo.

Quadro 5. Ocorrência de *Giardia* spp. em ovinos de acordo com o ano, a região estudada, técnica diagnóstica e as espécies encontradas.

Autor e ano	País	Técnica diagnóstica	Positividade	Espécies encontradas
Ryan., 2005	Austrália	PCR/ Sequenciamento genético	44% (220/500)	Genótipo bovino <i>G. duodenalis</i> assemblage A
Castro-Hermida <i>et al.</i> , 2007	Espanha	PCR/ Sequenciamento genético	19,2% (86/446)	<i>G. duodenalis</i> assemblage B, E e G
SANTIN., 2007	EUA	PCR/ Sequenciamento genético	12% (4/32) 4% (2/32)	<i>G. duodenalis</i> assemblage A e E
			ovelhas cordeiros	
Tzanidakis <i>et al.</i> , 2014	Grécia	PCR/ Sequenciamento genético	37,3% (160/429)	<i>G. duodenalis</i> assemblage E
Paz e Silva <i>et al.</i> , 2014	Brasil	PCR/ Sequenciamento genético	34% (34/100)	<i>G. duodenalis</i> assemblage E
Chen <i>et al.</i> , 2019	China	PCR/ Sequenciamento genético	21,8% (71/325)	<i>G. duodenalis</i> assemblage A e E
QI <i>et al.</i> , 2019	China	PCR/ Sequenciamento genético	7,5% (24/318)	<i>G. duodenalis</i> assemblage E
			Ovelhas adultas	

2.2.4 Giardíase em ovinos

A giardíase em pequenos ruminantes reduz a eficiência alimentar, o ganho de peso, altera a consistência das fezes e acarreta perda de peso, principalmente em cordeiros jovens, levando a prejuízos econômicos. O período de incubação varia de 10 a 21 dias após a ingestão, podendo o animal se tornar um portador crônico (JIAN *et al.*, 2018; NINE *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2019).

Os estudos sobre giardíase em ovinos são realizados devido ao fato deles serem possíveis portadores de genótipos zoonóticos (GEURDEN *et al.*, 2008; JIAN *et al.*, 2018; SAHRAOUI *et al.*, 2019).

2.2.5 Potencial Zoonótico

A giardíase é uma doença zoonótica de distribuição mundial, e animais e humanos podem abrigar as mesmas espécies e assemblages. Para um maior esclarecimento dessa transmissão é necessário o rastreamento por meio de ferramentas moleculares (RYAN; CACCIO., 2013; ZHANG *et al.*, 2012).

Estudos comprovaram a presença *G. duodenalis* genótipos A, B e E em ovinos (RYAN *et al.*, 2005; SANTIN *et al.*, 2007; CASTRO-HERMIDA *et al.*, 2007). Devido à proximidade dos ovinos com os humanos, os estudos investigam a possibilidade desses animais contaminarem as águas de consumo. Alguns trabalhos discordam sobre a possibilidade de ovinos serem potenciais transmissores de patógenos zoonóticos em decorrência dos resultados apresentarem maior prevalência do genótipo E da *G. duodenalis* (RYAN *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2009).

REFERÊNCIAS

- ADL, S.M. *et al.* The revised classification of eukaryotes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.59, n.5, p.429-514, 2012.
- BARKER, I. K.; CARBONELL, P. L. *Cryptosporidium agni* sp.n. from lambs, and *Cryptosporidium bovis* sp.n. from a calf, with observations on the oocyst. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 44, n. 4, p. 289–298, 1974.
- BIANCHI, A. E.; MONTEIRO, A. L. G.; MORAIS, O. R.; BATISTA, R.; DEBORTOLI, E. D. C. Caracterização dos sistemas produtivos de ovinos de leite no Brasil. **MilkPoint**. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/162092/1/CNPC-2016-Characterizacao-dos-sistemas.pdf>>. Acesso em: 17 de junho de 2020.
- CACCIÒ, S. M.; CHALMERS, R. M. Human cryptosporidiosis in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, v.22, n.6, p. 471-480,2016.
- CASTRO-HERMIDA, J; WARLETA, M.G.; COSTA, J.M.C.; LORENZA, C.R.; MEZO, M. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in healthy adult domestic ruminants. **Parasitology Research**, v. 101, n. 5, p. 1443–1448, 2007.
- CHEN, D.; ZOU, Y.; LI, Z.; WANG, S.S.; XIE, S.C.; SHI, L.Q.; ZOU, F.C.; YANG, J.F.; ZHAO, G.H.; ZHU, X.Q. Occurrence and multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in black-boned sheep and goats in southwestern China. **Parasites and Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2019.
- LUCENA, C. C.; HOLANDA FILHO, Z. F.; MARCO AURÉLIO DELMONDES BOMFIM, M. A. D. Atuais e Potenciais Impactos do Coronavírus (Covid-19) na Caprinocultura e na Ovinocultura. **Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos**. Ano 07, Nº 10, Sobral, 2020. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1121601/1/BoletimCIMn10.pdf>>. Acesso em: 17 de junho de 2020.
- CLODE, P.L.; KOH, W.H.; THOMPSON, R.C.A. Life without a host cell: what is *Cryptosporidium*? **Trends Parasitology**, p.1-11, 2015.
- COELHO, WILLIAN.M.D.; WIDMER, G.; OLIVEIRA, AMARANTE. A. F.T.;

BRESCIANI, K.D.S. Natural Infection by *Cryptosporidium* spp. In Production Animals: First Description of Subtype iiaa15g2r1 In Goat Kids And Piglets in Brazil. **Revista de Patologia Tropical**, v 45, p.361-368, 2016.

COSENDEY, RACHEL I. J.; FIUZA, AGNER R. S.; DE OLIVEIRA, FRANCISCO CARLOS, R. Importância do Manejo Na Criptosporidiose Em Criações De Ovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 209–214, 2008.

DE GRAAF, D.C.; VANOPDENBOSCH, E.; ORTEGA-MORA, L.M. A review of importance of cryptosporidiosis in farm animals. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1269-1287, 1999.

FAYER, R. *Cryptosporidium* : A water-borne zoonotic parasite. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n. 1- 2 SPEC.ISS., p. 37–56, 2004.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium* : Transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12–13, p. 1305–1322, 2000.

FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and *Giardiasis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 110–140, 2011.

FÉRES, F. C.; LOMBARDI, A. L.; CARVALHO, M. P. P.; MENDES, L. C. N.; PEIRÓ, J. R.; CADIOLI, F. A.; MEIRELES, M. V.; PERRI, S. H. V.; FEITOSA, F. L. F. Ocorrência e caracterização molecular de *Cryptosporidium* em cordeiros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 6, n. 4, p. 1002-1005, 2009.

FIUZA, V. R. S.; COSENDEY, R. I. J.; TEIXEIRA, E. F.; SANTIN, M.; FAYER, R.; OLIVEIRA, F. C. R. Molecular characterization of *Cryptosporidium* in Brazilian sheep. **Veterinary Parasitology, Amsterdam**, v. 175, n. 3-4, p. 360-362, 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION – FAO/WHO. Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites. Rome: FAO, 2014. 302 p. (**Microbiological Risk Assessment Series**, n. 23).

FOREYT, W. J. Coccidiosis and cryptosporidiosis in sheep and goats. The Veterinary clinics of North America. **Food animal practice**, v. 6, n. 3, p. 655–670, 1990.

GEURDEN, T.; THOMAS, P.; CASAERT, S.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOUT, E. Prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* in lambs and goat kids in Belgium. **Veterinary Parasitology**, v. 155, n. 1–2, p. 142–145, 2008.

JIAN, Y. ; ZHANG, X.; XIUPING. LI.; KARANIS, G.; LIQING, M.; KARANIS, P. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* in cattle and sheep from the Qinghai-Tibetan Plateau Area (QTPA), northwestern China. **Veterinary Parasitology**, v. 250, n. January 2017, p. 40–44, 2018.

KAUPKE, A.; MICHALSKI, M. M.; RZEŻUTKA, A. Diversity of *Cryptosporidium* species occurring in sheep and goat breeds reared in Poland. **Parasitology Research**, v. 116, n. 3, p. 871–879, 2017.

KING, B.J.; KEEGAN, A.R. MONIS, P.T.; SAINT, C.P. Environmental Temperature Controls *Cryptosporidium* Oocyst Metabolic Rate and Associated Retention of Infectivity. **Applied And Environmental Microbiology**, v.71, p.3848-3857, 2005.

KOINARI, M.; LYMBERY, A. J.; RYAN, U. M. *Cryptosporidium* species in sheep and goats from Papua New Guinea. **Experimental Parasitology**, v. 141, n. 1, p. 134–137, 2014.

MAJEED, Q. A. H.; EL-AZAZY, O.M.E.; ABDU, N.E.M.I.; AL-AAL, Z.A.; EL-KABBANY, A.I.; TAHRANI, L.M.A.; ALAZAMI, M.S.; WANG, Y.; FENG, Y.; XIAO, L. Epidemiological observations on cryptosporidiosis and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in sheep and goats in Kuwait. **Parasitology Research**, v. 117, n. 5, p. 1631–1636, 2018.

MCMAUGHLIN, J.M.; AMAR, C.; PEDRAZA-DIAZ, S. Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: Results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 Fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 3984–3990, 2000.

MCMANUS, C.; PAIVA, S. R.; ARAUJO, R. O. Genetics and breeding of sheep in Brazil. **Revista Brasileira Zootecnia**, Viçosa, v. 39, supl. spe, p. 236-246, July 2010. Available from

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982010001300026&lng=en&nrm=iso>. Access on 19 June 2020.

<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982010001300026>.

MI, R.; WANG, X.; HUANG, Y.; MU, G.; ZHANG, Y.; JIA, H.; ZHANG, X.; YANG, H.; WANG, X.; HAN, X.; CHEN, Z. Sheep as a potential source of zoonotic cryptosporidiosis in China. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 18, 2018.

MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. A. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: Fact or fiction? **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, n. 4, p. 233–244, 2020.

NIINE, T. *et al.* Acute phase response in organic lambs associated with colostrum serum amyloid A, weight gain, and *Cryptosporidium* and *Giardia* infections. **Research in Veterinary Science**, v. 121, n. October, p. 117–123, 2018.

SILVA, F. M. P.; LOPES, R. S.; BRESCIANI, K. D. S.; AMARANTE, A. F. T.; ARAUJO, J. P. High occurrence of *Cryptosporidium ubiquitum* and *Giardia duodenalis* genotype E in sheep from Brazil. **Acta Parasitologica**, Warszawa, v. 59, n. 1, p. 193-196, 2014.

PEREIRA, J.T.; SOCOOL, V.T.; COSTA, A.O.; CASTRO, E.A.; OSAKI, S.C.; PAULINO, R.C. *Cryptosporidium* spp.: para controlar é necessário conhecer. **Biomedicine**, n. 1976, p. 13–25, 2009.

QI, M.; ZHANG, Z.; ZHAO, A.; JING, B.; GUAN, G.; LUO, J. LONGXIANO, Z. Distribution and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Enterocytozoon bieneusi* amongst grazing adult sheep in Xinjiang, China. **Parasitology International**, v. 71, n. 15, p. 80–86, 2019.

ROBERTSON, L. J. *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in sheep and goats: A review of the potential for transmission to humans via environmental contamination. **Epidemiology and Infection**, v. 137, n. 7, p. 913–921, 2009.

RYAN, U. M. ; CAROLINE, B.; ROBERTSON, I.; READ, C.; ELLIOT,A.; McINNES,L.; TRAUB, R.; BESIER,B. Sheep may not be an important zoonotic reservoir for *Cryptosporidium* and *Giardia* parasites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 4992–4997, 2005.

RYAN, U., HIJJAWI, N., New developments in *Cryptosporidium* research. **International Journal for Parasitology**, v45, p 367-373,2015.

RYAN, U., PAPANINI, A., MONIS, P., HIJJAWI, N. It's official – *Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry. **Water Research**, v. 105, p. 305–313, 2016.

RYAN, U.; CACCIÒ, S. M. Zoonotic potential of *Giardia*. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 12–13, p. 943–956, 2013.

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

RYAN,U.; ZAHEDI,A.; PAPANINI,A. *Cryptosporidium* in humans and animals—a one health approach to prophylaxis. **Parasite Immunology**, v38: 535–547, 2016.

SAHRAOUI, L.; THOMAS,M.; CHEVILLOT,A.; MAMMERI,M.; POLACK,B.; VALLÉE, I.; FOLLET,J.; AIN-BAAZIZ,H.; ADJOU,K.T. Molecular characterization of zoonotic *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* pathogens in Algerian sheep. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 16, n. January, p. 100280, 2019.

SANTÍM, M.; TROUT, J. M.; FAYER, R. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species and genotypes in sheep in Maryland. **Veterinary Parasitology**, v. 146, n. 1–2, p. 17–24, 2007.

SECRETARIA DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO DO ESTADO DO PARANÁ (SEAB). Ovino e Caprino – Programa Estadual de Apoio à Estruturação das Cadeias Produtivas. Curitiba, 2008.

SEVÁ, A. P.; FUNADA, M. R.; SOUZA, S. O.; NAVA, A.; RICHTZENHAIN, L. J.; SOARES, R. M. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from domestic animals in a rural area surrounding Atlantic dry

forest fragments in Teodoro Sampaio municipality, State of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, p. 249-53, 2010.

SILVA, F. M. P.; LOPES, R. S.; BRESCIANI, K. D. S.; AMARANTE, A. F. T.; ARAUJO, J. P. High occurrence of *Cryptosporidium ubiquitum* and *Giardia duodenalis* genotype E in sheep from Brazil. **Acta Parasitologica**, Warszawa, v. 59, n. 1, p. 193-196, 2014.

SILVA, S. C.; MEXIA, A. A.; GARCIA, J.; SOUZA, O. M.; BOTINI, T.; SILVA, G. M. A.; FREIRIA, L. B.; GOMES, L. A. Verminose em rebanhos ovinos. **PUBVET, Londrina**, v. 5, n. 1, ed. 148, art. 996, 2011. Disponível em: <
<https://www.pubvet.com.br/uploads/4b359a635f322213cd3035caf15dd3a5.pdf>>
. Acesso em: 17 de junho de 2020.

SLAPETA, J. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: A thirty colour rainbow? **International Journal of Parasitology**, v. 43, p. 957–970, 2013.

SMITH, H.V.; CACCIÒ, S.M.; COOK, N; NICHOLS, R.A.B.; TAIT, A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 29 – 40, 2007.

SOUZA, J. D. F.; GUIMARÃES, V. P.; MAGALHÃES, K. A.; BARBOSA, C. M. P.; MARTINS, E. C.; HOLANDA FILHO, Z. F.; MENDES, M. E. P. **Embrapa Caprinos e Ovinos. Ativos Ovinos e Caprinos**, Ano 3, Nº 02, Brasília, 2016. Disponível em: <
https://www.embrapa.br/documents/1355090/0/Ativo_Ovinos_Caprinos/2cba6db9-b704-4183-ba43-a8214b28eaa4?version=1.0>. Acesso em: 17 de junho de 2020.

TEMBUE, A. A. M.; ALVES, L. C.; BORGES, J. C. G.; FAUSTINO, M. A. G.; MACHADO, E. L. C. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em ovinos no município de Ibimirim, estado de Pernambuco. **Ciência Veterinária nos Trópicos, Recife**, v. 9, n. 1, p. 41-43, 2006.

THOMPSON, R. C. A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and *Giardiasis*. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n. 1- 2 SPEC.ISS., p. 15–35, 2004.

- THOMPSON, R. C. A.; MONIS, P. T. Taxonomy of *Giardia* Species. *Giardia*, n. 1914, p. 3–15, 2011.
- THOMPSON, R. C. A.; OLSON, M.E.; ZHU,G.; ENOMOTO,S.; ABRAHAMSEN, M.S.; HIJJAWI,N.S. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. **Advances in Parasitology**, v. 59, n. 05, p. 77–158, 2005.
- TZANIDAKIS, N.; SOTIRAKI,S.; CLAEREBOU,T.; EHSAN,A.; VOUTZOURAKIS,N.; KOSTOPOILOU,D.; STIJN,C.; VERCRUYSSSE,J.; GEURDEN,T. Occurrence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in sheep and goats reared under dairy husbandry systems in Greece. **Parasite Journal**, v. 21,p.45, 2014.
- TZIPORI, S. Cryptosporidiosis in animals and humans. **Microbiological Reviews**, v.47, n.1, p. 84-96. 1983.
- VIANA, J. G. A. Panorama Geral da Ovinocultura no Mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**, Ano 4, N° 12, Porto Alegre, 2008.
- WANG, Y.; FENG,Y.; CUI,B.; JIAN,F.; NING,C.; WANG,R.; ZHANG,L.; XIAO,L. Cervine genotype is the major *Cryptosporidium* genotype in sheep in China. **Parasitology Research**, v. 106, n. 2, p. 341–347, 2010.
- WU, Y.; CHANG, Y.; CHEN,Y.; ZHANG,X.; LI,D.; ZHENG,S.; WANG,L.; LI,J.; NING,C.; ZHANG,L. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Enterocytozoon bienersi* from Tibetan sheep in Gansu, China. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 64, n. 2017, p. 46–51, 2018.
- XIAO, L.; ESCALANTE, L.; YANG, C.; SULAIMAN, I.; ESCALANTE, A.A.; MONTALI, R.J.; FAYER, R. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small- subunit rRNA gene locus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 1578–1583, 1999.
- XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1239–1255, 2008.
- XIAO, L.; FENG, Y. Zoonotic cryptosporidiosis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 309–323, 2008.

XIAO, L.; RYAN, U. M. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. **Current opinion in infectious diseases**, v. 17, n. 5, p. 483–90, out. 2004.

YANG, R.; JACOBSON, C.; GORDON, C.; RYAN, U. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species in preweaned sheep in Australia. **Veterinary Parasitology, Amsterdam**, v. 16, n. 1-2, p. 19-24, 2009.

ZHANG, W.; ZHANG, X.; RONGJUN, W.; LIU, A.; SHEN, Y.; LING, H.; CAO, J.; YANG, F.; ZHANG, X., LONGXIAN, Z. Genetic Characterizations of *Giardia duodenalis* in sheep and goats in Heilongjiang Province, China and Possibility of Zoonotic Transmission. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 9, 2012.

ZUCATTO, A. S.; AQUINO, M. C. C.; INÁCIO, S. V.; FIGUEIREDO, R. N.; PIERUCCI, J. C.; PERRI, S. H. V.; MEIRELES, M. V.; BRESCIANI, K. D. S. Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp. in lambs in the South Central region of the State of São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 67, n. 2, p. 441-446, 2015.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a ocorrência e caracterizar molecularmente *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de fezes de ovinos da região norte do Paraná.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar as espécies de *Cryptosporidium* e os assemblages de *Giardia*.

Determinar a filogenia com as sequências obtidas de *Cryptosporidium* e *Giardia* e comparar com outros isolados caracterizados.

ARTIGO A – OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. EM OVINOS DA REGIÃO NORTE DO PARANÁ.

RESUMO

Cryptosporidium é um protozoário gastrintestinal capaz de parasitar diferentes hospedeiros incluindo os humanos. O objetivo deste estudo foi verificar a ocorrência e caracterizar geneticamente *Cryptosporidium* spp. em ovinos da região Norte do Paraná. Foram coletadas 443 amostras de fezes de ovinos de diferentes raças, idades e ambos os sexos de 12 propriedades rurais. Para a detecção de *Cryptosporidium* spp. nas fezes foi realizada a nested-PCR (n-PCR) baseado no gene 18-SSU. As amostras positivas foram submetidas a RFLP e posterior sequenciamento genético. Das 443 amostras fecais avaliadas, três animais foram positivos (0,7%) na n-PCR. Na técnica RFLP, uma amostra foi identificada como *C. parvum*, e as outras duas apresentaram um padrão de clivagem compatível com *C. bovis* e *C. xiaoi* na MBOII. De acordo com os resultados obtidos no sequenciamento genético foi possível confirmar a primeira amostra como *C. parvum*, e as duas últimas como *C. xiaoi*. Podemos observar a relevância destes resultados para saúde pública devido ao potencial zoonótico do *C. parvum*, e a importância clínica *C. xiaoi*, uma vez que este é responsável por causar diarreia e retardo no crescimento em cordeiros.

Palavras-chave: Criptosporidiose, Protozoário, Ruminantes, Epidemiologia, RFLP.

ARTICLE A – OCCURRENCE AND GENETIC CHARACTERIZATION OF CRYPTOSPORIDIUM SPP. IN SHEEP FROM NORTHERN PARANÁ STATE.

ABSTRACT

Cryptosporidium is a gastrointestinal protozoan parasite, capable for parasitizing different hosts, including human. The aim of this study was to verify the occurrence of *Cryptosporidium* spp. in sheep from the Northern Paraná State and to genetically characterize them. The collection of 443 fecal samples were done from sheep of different breeds, ages and from both genders, from 12 farms. The 18-SSU nested PCR (n-PCR) was used to detect *Cryptosporidium* spp. from stool. The positive samples were submitted to a RFLP and, after that, to a genetic sequencing. From the 443 evaluated animals, three sheep were found to be positive (0.7%) by the n-PCR. Through the RFLP method, one sample was identified as *C. parvum* and the other two presented a cleavage standard compatible with *C. bovis* and *C. xiaoi* by MBO II enzyme. According to the results from the genetic characterization, it was possible to identify the first sample as *C. parvum* and the other ones as *C. xiaoi*. The relevance of public health could be observed with these results due to the zoonotic potential of *C. parvum* and the clinical importance of *C. xiaoi*, once it is responsible for causing diarrhea and low lamb growth rates.

Keywords: Criptosporidiosis, protozoan, ruminants, Epidemiology, RFLP.

1 INTRODUÇÃO

Cryptosporidium é um protozoário capaz de infectar diferentes hospedeiros como répteis, aves e mamíferos, incluindo os humanos e roedores (FAYER, 2010; XIAO, 2004). A via de transmissão é a fecal-oral, por meio de água e alimentos contaminados com oocistos, causando principalmente a infecção do trato gastrintestinal (XIAO., 2010; XIAO; FAYER., 2008).

A criptosporidiose em ovinos é mais frequente em animais com menos de 30 dias (FOREYT., 1990; SQUIRE., 2017), nos quais é possível observar retardo no crescimento, diarreia aquosa amarelada de forte odor, dor abdominal, perda de peso, desidratação, depressão e morte (FOREYT., 1990; TEMBUE *et al.*, 2006; CASTRO-HERMIDA *et al.*, 2007; KAUPEK *et al.*, 2017; SALAS *et al.*, 2016).

Diferentes espécies de *Cryptosporidium* já foram descritas em ovinos, principalmente *C. parvum*, *C. xiaoi*, e *C. ubiquitum*, bem como, *C. bovis*, *C. fayeri*, *C. hominis*, *C. andersoni*, e *C. suis* (FAYER; SANTIN., 2009; XIAO., 2010; CORNELLY., 2013).

A ocorrência deste parasita em ovinos é variável de acordo com a região estudada, podendo encontrar uma positividade entre 0,9% e 26,2% como relatado previamente (QI *et al.*, 2019; KAUPEK *et al.*, 2017; TZANIDAKIS.,2014). No Brasil, as frequências deste protozoário alternam entre 1,6% e 25% (TEMBUE *et al.*,2006; FIUZA *et al.*, 2011; PAZ E SILVA *et al.*, 2014).

Técnicas moleculares são utilizadas para o diagnóstico do *Cryptosporidium*, dentre elas a reação em cadeia de polimerase (PCR) e genotipagem. A PCR trata-se de uma técnica cujo objetivo é a identificação do gênero, sendo possível avaliar os efeitos na espécie animal acometida, além de avaliar o potencial zoonótico (XIAO., 2010). Em relação a genotipagem, uma das técnicas mais comumente utilizada é a PCR- RFLP (Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição) onde é possível observar padrão clivagem compatível com as diferentes espécies de *Cryptosporidium* (FENG *et al.*, 2007).

O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência e caracterizar molecularmente o protozoário *Cryptosporidium* spp. em amostras de fezes de ovinos provenientes da região norte do Paraná.

2 MATERIAL E METÓDOS

2.1 AMOSTRAS

A população estudada foi composta por ovinos de raças variadas, ambos os sexos e diferentes faixas etárias. Caracterização do sujeito amostral foi realizado pelo OpenEpi versão 3.01, considerando uma prevalência de 50%, com nível de confiança de 95% e eficácia de 5%. No período de novembro de 2016 a setembro de 2018, foram coletadas 443 amostras de fezes de ovinos de 12 propriedades de oito municípios da região norte do Paraná. O presente estudo encontra-se aprovado no CEUA/UEL nº 12147.2015.53.

As amostras foram coletadas direto da ampola retal como auxílio de luva de procedimento e armazenadas em caixas térmicas e encaminhadas para o Laboratório, onde as amostras foram armazenadas em microtubos e mantidas em freezer a -20° C até o momento da extração de DNA.

2.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Para realizar a extração foi utilizado aproximadamente 200 mg de fezes diluídas em 1 mL de Tris- EDTA (TE), sendo o material filtrado com o auxílio de uma gaze para a retirada das partículas fibrosas. Este conteúdo foi submetido a três ciclos de congelamento a -80° C e descongelamento a 30° C. Ao final dos três ciclos foi adicionado 15 µL de proteinase K (1mg/ml) e 30 µL de SDS 0,1% e incubado a 55° C *overnight*. Após esta etapa, foi adicionado 300 µL de Fenol (UltraPure™ Phenol, Invitrogen, USA) e centrifugado a 13.000 g por 5 min. A fase aquosa resultante foi transferida para outro microtubo, adicionando-se 300 µL de Fenol: clorofórmio: Álcool isoamílico (UltraPure™ Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol (25:24:1, v/v), (Invitrogen, USA) e novamente centrifugado a 13.000 g por 5 min. A precipitação de DNA por acetato de sódio e etanol foi realizada através do método descrito por Sambrook *et al.* (1989). Os microtubos contendo o DNA extraído foram armazenados em - 20° C para posterior utilização.

2.3 TÉCNICAS MOLECULARES

Após a extração as amostras foram submetidos à técnica de nested- PCR (n-PCR) do gene 18 rRNA para gênero *Cryptosporidium* em duplicata, segundo XIAO *et al.* (1999). Para a realização da primeira reação foram utilizados os seguintes *primers*: Fw1: TTCTAGAGCTAATACATGCG e Rv2: CCCATTTCTTCGAAACAGGA. Na segunda reação, os *primers* continham as seguintes sequências: Fw3: GGAAGGGTTGTATTTATTAGAT e Rv4: AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA. Após a amplificação da segunda reação foi obtido um fragmento de 825 pb do DNA do *Cryptosporidium* spp. Para a realização de ambas as reações os mesmos ciclos de tempo e temperatura foram utilizados: Incubação inicial 95°C por 5 minutos, desnaturação 94°C por 45 segundos, anelamento 55°C por 45 segundos, síntese 72°C por 1 minuto e extensão final 72°C por 5 minutos. A desnaturação, anelamento e síntese repetem-se 34 vezes antes do passo de extensão final. A visualização do produto da PCR foi feita em gel de agarose a 1,5%, corado com SYBR Safe® (DNA Gel Stain; Invitrogen, Brasil), e visualizado por luz ultravioleta e fotodocumentados usando o programa LPix Imagem ST (Loccus Biotecnologia).

As amostras positivas para *Cryptosporidium* spp., foram analisadas por meio da técnica de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) com as enzimas VspI, MboII e SspI para a diferenciação das espécies (XIAO *et al.* 1999; FENG *et al.* 2007). As reações foram realizadas de forma separada com 1X NEB® Buffer, 5 U de enzima SspI e MboII e 3U da VspI, 5 µL do segundo produto da PCR e água ultrapura até completar 20 µL. Para a realização das clivagens as suspensões foram mantidas a 37° C por uma hora e 65°C durante 15 minutos. Os produtos originados na clivagem foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,5%, corados com SyBR Safe® (DNA Gel Stain; Invitrogen, Brasil) e fotodocumentados. Os padrões de ligação foram comparados com imagens padrão contidas em Cryptodb (<http://www.cryptodb.org>).

2.4 SEQUENCIAMENTO GENÉTICO E ÁRVORE FILOGENÉTICA

Os Amplicons sintetizados durante a Nested-PCR foram submetidos à

purificação por meio do kit comercial QIAquick gel extraction kit (Invitrogen). Após a purificação, foram submetidos ao sequenciamento genético utilizando o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), através do ABI3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Os dados obtidos após o sequenciamento permitiram comparações entre amplicons complementares de uma mesma amostra, o que permitiu a construção de sequências consensus que foram comparadas com depositadas no GenBank por meio do programa Blast para determinação de espécies.

O alinhamento das sequências foi realizado no software Bioedit Sequence Alignment Editor 7.2.5, incluindo amostras de referência. Por meio dos consensus, com a utilização do software MEGA6 (TAMURA *et al.*, 2013), foi construída a árvore filogenética comparando os isolados obtidos e outros isolados cujas sequências estão depositadas no GenBank. Os parâmetros utilizados para a construção da árvore filogenética foi Kimura dois parâmetros da distância (KIMURA., 1980). As análises estatísticas de árvores filogenéticas foram determinadas pelo método *bootstrap* em 1000 repetições.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 443 animais analisados três (0,7%), com faixa etária inferior a seis meses, foram positivos na n-PCR, devido à baixa ocorrência de animais positivos, optou-se por realizar uma análise descritiva e isolada de cada um deles, como segue abaixo.

A amostra CryOvBr 7 foi proveniente de um animal macho, cinco meses de idade, proveniente de uma propriedade voltada para pecuária, do tipo semi-intensiva, com a criação mista de animais (ovinos, caprinos, bovinos, equinos e aves), na qual também viviam cães e gatos. Em relação ao manejo era realizado o rodízio de pasto a cada 21 dias, os ovinos eram mantidos no chão com maravalha, a limpeza do aprisco era realizada semanalmente, e a higienização de comedouros e bebedouros era realizada diariamente, a água para o consumo animal era proveniente da mina. Os cordeiros eram mantidos em confinamento. Os animais não apresentavam diarreia e sangue nas fezes. Era realizado exame coproparasitológicos por meio da técnica de Gordon & Whitlock modificada.

A amostra CryOvBr 46 é proveniente de um animal macho, com menos de seis meses de idade, originário de uma propriedade com atividades tanto de agricultura como de pecuária, do tipo semi-intensiva, com a criação mista de animais (ovinos, equinos, suínos e aves), nesta propriedade também possuíam cães. Os ovinos eram tanto para corte quanto para leite, sendo eles mestiços. Nesta propriedade não é realizada a rotação de pastagens, as instalações eram de chão batido com maravalha, a limpeza do aprisco era realizada a cada 30 dias e dos bebedouros e comedouros diariamente, a água para o consumo animal era proveniente da mina. Os cordeiros eram criados no pasto. Os animais apresentaram problemas de fraqueza e alterações respiratórias. O último exame de fezes dos animais (técnica de Gordon & Whitlock modificada) foi realizado há mais de dois anos, e os animais não apresentavam diarreia e sangue nas fezes.

A amostra CryOvBr 47 é proveniente de um animal fêmea, seis meses de vida, oriundo de uma propriedade com atividades tanto de agricultura como de pecuária, do tipo semi-intensiva, sem criação mista, nem possuíam cães e gatos. A categoria deles era de corte, sendo eles mestiços. Na propriedade era realizado o rodízio de pastagem a cada 14 dias, e os animais ficavam no chão batido, onde a limpeza do ambiente era realizada semanalmente, e os

comedouros e bebedouros eram limpos diariamente, a água para o consumo animal era proveniente da companhia de abastecimento do Paraná. Não realizavam exame de fezes, e os animais não apresentavam diarreia e sangue nas fezes.

Devido ao baixo número de amostras positivas não foi possível avaliar as associações de risco.

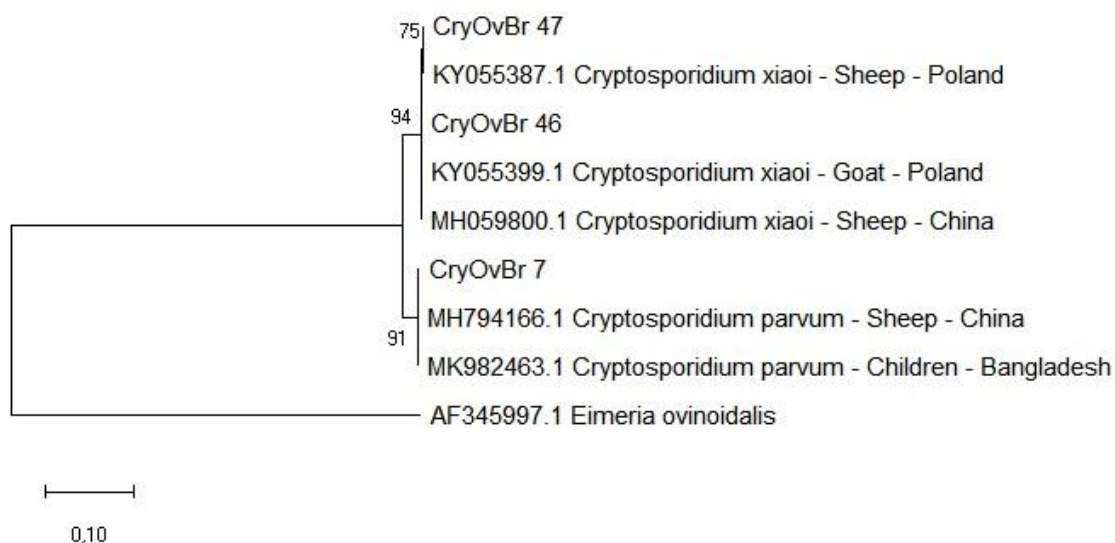
A ocorrência observada de 0,7% em nosso estudo está em concordância com outro trabalho realizado no Brasil, onde foi verificado 1,6% (2/125) positividade para *Cryptosporidium* spp. em cordeiros e ovelhas (Fiuza *et al.*, 2011). Também, na China, foi detectada ocorrência de relatam uma positividade de 0,9 % (3/318) para o parasito supramencionado em ovelhas adultas (Qi *et al.*, 2019). A baixa positividade do parasita neste estudo pode ser justificada pela idade dos cordeiros utilizados, pois a maioria dos animais já tinham mais de duas semanas de vida. Causapé *et al.* (2002), descreveu uma positividade de 59% (343/583) em cordeiros de 1 dia a 3 meses de vida. A eliminação de oocistos foi de 67,4% em cordeiros na primeira semana de vida, e o pico de positividade dos animais ocorreu na segunda semana de vida.

As três amostras positivas na n-PCR foram submetidas a RFLP, uma amostra foi identificada como *C. parvum*, e as outras duas apresentaram um padrão de clivagem compatível com *C. bovis* e *C. xiaoi*. Estudos realizados na Argélia, Egito, Romênia e no Brasil relatam uma positividade para algumas espécies do *Cryptosporidium*, por meio da técnica RFLP, como o *C. parvum*, *C. xiaoi*, e *C.ubiquitum*. *C. parvum* é uma das principais espécies desse gênero, por parasitar humanos e animais, e a sua ocorrência ressalta a importância do nosso trabalho, uma vez que os ovinos podem atuar como fonte infecção (IMRE *et al.*, 2013; PAZ E SILVA *et al.*, 2014; ELMADAWY *et al.*, 2017; BAROUDI *et al.*, 2018; SAHRAOUI *et al.*, 2019).

Os dados das análises filogenéticas das sequências *consensus* obtidos neste estudo foram concordantes com os resultados obtidos nas comparações com a ferramenta Blast. Os agrupamentos das espécies podem ser observados na Figura 1, sendo que a amostra CryOvBr46 se agrupou com sequências padrões de *C. xiaoi* (KY055399.1; MH0559800.1) com similaridade genética de 99,86%, a amostra CryOvBr47 também se agrupou com sequência padrão de *C. xiaoi* (KY055387.1) com similaridade genética de 99,86% e a amostra CryOvBr7 se

agrupou com as sequências padrões *C.parvum* (MH794166.1; MK982463.1), com 99,73% de similaridade.

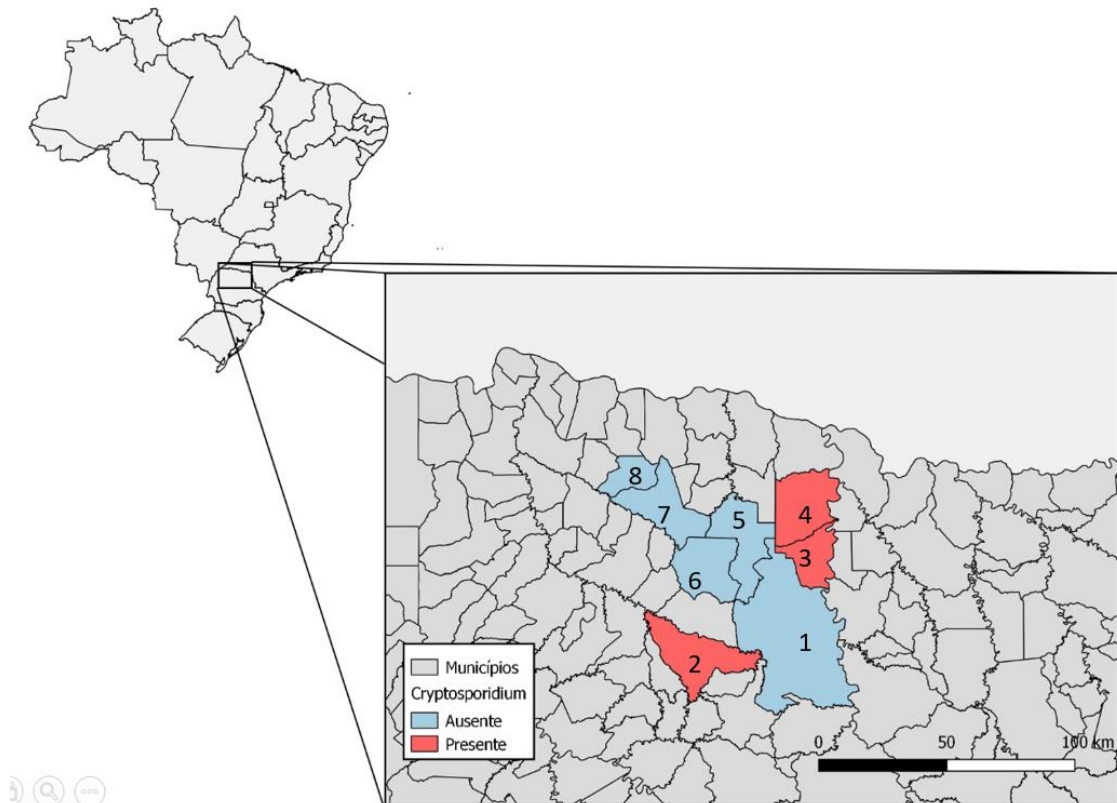
Figura 1 Árvore filogenética de sequências do gene 18S rRNA de *Cryptosporidium* de ovinos deste estudo e de outras espécies de *Cryptosporidium* disponíveis no GenBank.



Em trabalhos baseados em análises filogenéticas de *Cryptosporidium* em diversas regiões, as espécies *C. ubiquitum*, *C. xiaoi* e *C. parvum* são consideradas as de maior ocorrência em ovinos. No presente estudo, observou-se a presença das espécies *C. xiaoi* e *C. parvum*, sendo este de importância clínica em ovinos, já que podem causar diarreia, dor abdominal, perda de peso, desidratação e retardo de crescimento (DIAZ *et al.*, 2018; MAJEED *et al.*, 2018; QI *et al.*, 2019).

Os resultados da ocorrência de *Cryptosporidium* spp. associados com os locais de coleta das amostras, estão apresentados na Figura 2. Observou-se uma positividade em três propriedades distintas localizadas nas cidades de Apucarana, Sertanópolis e Ibiporã.

Figura 2 Localização das cidades com amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. deste estudo.



Cidades abordadas no estudo: 1- Londrina, 2- Apucarana, 3- Ibiporã, 4- Sertanópolis, 5- Cambé, 6- Rolândia, 7- Jaguapitã, 8- Guaraci.

4 CONCLUSÃO

Os animais não apresentavam diarreia e sinais clínicos, mas eram positivos para *Cryptosporidium*.

Este estudo realizado na região norte do Paraná detectou *C. parvum* e *C. xiaoi* em amostras de fezes de ovinos. Este fato denota uma relevância para saúde pública devido ao potencial zoonótico de *C. parvum*, bem como, a proximidade entre ovinos com os seres humanos, e a importância em relação a sanidade dos animais, devido a importância clínica do *C. xiaoi*.

REFERÊNCIAS

- BAROUDI, D.; HAKEM, A.; ADAMU, H.; AMER, S.; KHELEF, D.; ADJOU, K.; DAHMANI, H.; CHEN, X.; ROELLIG, D.; FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic *Cryptosporidium* species and subtypes in lambs and goat kids in Algeria. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–8, 2018.
- BOMFIM, T.C.B.; HUBER, F.; GOMES, R.S.; ALVES, L.L. Natural infection by *Giardia* sp. and *Cryptosporidium* sp. in dairy goats, associated with possible risk factors of the studied properties. **Veterinary Parasitology**, v.134, v.1-2, p.9-13, 2005.
- CASTRO-HERMIDA, J.; WARLETA, M.G.; COSTA, J.M.C.; LORENZA, C.R.; MEZO, M. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in healthy adult domestic ruminants. **Parasitology Research**, v. 101, n. 5, p. 1443–1448, 2007.
- CAUSAPÉ, A. C.; QUILES, J.; SÁNCHEZ-ACEDO, C.; CACHO, E.D.; LÓPEZ-BERNAD, F. Prevalence and analysis of potential risk factors for *Cryptosporidium parvum* infection in lambs in Zaragoza (northeastern Spain). **Veterinary Parasitology**, v. 104, n. 4, p. 287–298, 2002.
- CONNELLY, L.; CRAIG, B.H.; JONES, B.; ALEXANDER, C.L. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. within a remote population of soay sheep on St. Kilda Islands, Scotland. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 7, p. 2240–2246, 2013.
- COSENDEY, RACHEL I. J.; FIUZA, AGNER R. S.; DE OLIVEIRA, FRANCISCO CARLOS, R. Importância do Manejo Na Criptosporidiose Em Criações De Ovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 209–214, 2008.
- DÍAZ, P.; NAVARRO, E.; PRIETO, A.; PÉREZ-CREO, A.; VINÃ, M.; DÍAZ-CAO, J.M.; LÓPEZ, C.M.; PANADERO, R.; FERNÁNDEZ, G.; DÍEZ-BANÑOS, P.; MORRONDO, P. *Cryptosporidium* species in post-weaned and adult sheep and goats from N.W. Spain: Public and animal health significance. **Veterinary Parasitology**, v.254, p.1-5, 2018.

- ELMADAWY, R. S.; DIAB, M. S.; ELNAKER, Y. F. Prevalence , Electron Microscopy and Molecular Characterization of *Cryptosporidium* species Infecting Sheep in Egypt Received : Accepted : **Journal of Advanced Veterinary Research**, v. 7, n. 2, p. 47–52, 2017.
- FAYER, R.; SANTÍN, M. *Cryptosporidium* xiaoi n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). **Veterinary Parasitology**, v. 164, n. 2–4, p. 192–200, 2010.
- FENG, Y.; ORTEGA, Y.; HE, G.; DAS, P.; XU, M.; ZHANG, X.; FAYER, R.; GATEI, W., CAMA, V.; XIAO, L. Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and deer-like genotype in bovines. **Veterinary Parasitology**, v. 144, n. 1-2, p. 1-9, 2007.
- FIUZA, V. R. S.; COSENDEY, R. I. J.; TEIXEIRA, E. F.; SANTIN, M.; FAYER, R.; OLIVEIRA, F. C. R. Molecular characterization of *Cryptosporidium* in Brazilian sheep. **Veterinary Parasitology, Amsterdam**, v. 175, n. 3-4, p. 360-362, 2011.
- FOREYT, W. J. Coccidiosis and cryptosporidiosis in sheep and goats. The Veterinary clinics of North America. **Food animal practice**, v. 6, n. 3, p. 655–670, 1990.
- IMRE, K.; LUCA, C.; COSTACHE, M.; SALA, C.; MORAR, A.; MORARIU, S.; ILIE, M.S.; IMRE, M.; DARABUS, G. Zoonotic *Cryptosporidium* parvum in Romanian newborn lambs (*Ovis aries*). **Veterinary Parasitology**, v. 191, n. 1–2, p. 119–122, 2013.
- KAUPKE, A.; MICHALSKI, M. M.; RZEŻUTKA, A. Diversity of *Cryptosporidium* species occurring in sheep and goat breeds reared in Poland. **Parasitology Research**, v. 116, n. 3, p. 871–879, 2017.
- MAJEED, Q. A. H.; EL-AZAZY, O.M.E.; ABDU, N.E.M.I.; AL-AAL, Z.A.; EL-KABBANY, A.I.; TAHRANI, L.M.A.; ALAZAMI, M.S.; WANG, Y.; FENG, Y.; XIAO, L. Epidemiological observations on cryptosporidiosis and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in sheep and goats in Kuwait. **Parasitology Research**, v. 117, n. 5, p. 1631–1636, 2018.
- MAJEWSKA, A.C.; WERNER, A.; SULIMA, P.; LUTY, T. Prevalence of

Cryptosporidium in sheep and goats bred on five farms in west-central region of Poland. **Veterinary Parasitology**, v.89, n.4, p. 269-275, 2000.

QI, M.; ZHANG, Z.; ZHAO, A.; JING, B.; GUAN, G.; LUO, J. LONGXIANO, Z. Distribution and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Enterocytozoon bieneusi* amongst grazing adult sheep in Xinjiang, China. **Parasitology International**, v. 71, n. 15, p. 80–86, 2019.

SAHRAOUI, L.; THOMAS, M.; CHEVILLOT, A.; MAMMERI, M.; POLACK, B.; VALLÉE, I.; FOLLET, J.; AIN-BAAZIZ, H.; ADJOU, K. T. Molecular characterization of zoonotic *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* pathogens in Algerian sheep. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 16, p. 100280, 2019.

SALAS, D. R.; ESQUIVEL, C. A.; ROMERO, A. C.; DOMINGUEZ, M. A.; PRIEGO, N. I.; CHARREZ, J. O. M.; LÉON, A. P. L.; TINOCO, J. H. Prevalence of *Cryptosporidium* in small ruminants from Veracruz, México. **BMC Veterinary Research**, p. 1-6, 2016.

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

SILVA, F. M. P.; LOPES, R. S.; BRESCIANI, K. D. S.; AMARANTE, A. F. T.; ARAUJO, J. P. High occurrence of *Cryptosporidium ubiquitum* and *Giardia duodenalis* genotype E in sheep from Brazil. **Acta Parasitologica**, Warszawa, v. 59, n. 1, p. 193-196, 2014.

SILVA, S. C.; ALEXANDRE AGOSTINHO MEXIA, A. A.; GARCIA, J.; SOUZA, O. M.; BOTINI, T.; SILVA, G. M. A.; FREIRIA, L. B.; GOMES, L. A. Verminose em rebanhos ovinos. **PUBVET, Londrina**, V. 5, N. 1, Ed. 148, Art. 996, 2011.

Disponível em: <

https://www.embrapa.br/documents/1355090/0/Ativo_Ovinos_Caprinos/2cba6db9-b704-4183-ba43-a8214b28eaa4?version=1.0>. Acesso em: 17 de junho de 2020.

SQUIRE, S. A.; YANG, R.; ROBERTSON, I.; AYI, IRENE., RYAN, U. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in farmers and their ruminant

livestock from the Coastal Savannah zone of Ghana. *Infection*, **Genetics and Evolution**, v. 55, n. December 2016, p. 236–243, 2017.

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

TEMBUE, A. A. M.; ALVES, L. C.; BORGES, J. C. G.; FAUSTINO, M. A. G.; MACHADO, E. L. C. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em ovinos no município de Ibimirim, estado de Pernambuco. **Ciência Veterinária nos Trópicos, Recife**, v. 9, n. 1, p. 41-43, 2006.

TZANIDAKIS, N.; SOTIRAKI, S.; CLAEREBOU, E.; EHSAN, A.; VOUTZOURAKIS, N.; KOSTOPOILOU, D.; STIJN, C.; VERCRUYSSSE, J.; GEURDEN, T. Occurrence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in sheep and goats reared under dairy husbandry systems in Greece. **Parasite Journal**, v. 21, p.45, 2014.

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S.J. *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 1, p. 72–97, 2004.

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

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

ARTIGO B – OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *GIARDIA* SPP. EM OVINOS DA REGIÃO NORTE DO PARANÁ.

RESUMO

Giardia spp. é um parasita entérico responsável por causar diarreia em diferentes espécies de mamíferos, assim como nos humanos. O objetivo deste estudo foi verificar a ocorrência de *Giardia* spp. em fezes de ovinos naturalmente infectados da região Norte do Paraná. Foram coletadas 443 amostras de fezes de ovinos de ambos os sexos, de diferentes idades e raças. Após a coleta, as fezes foram armazenadas em microtubos a -20 °C, até o processamento. Para verificar a ocorrência do parasita nas fezes foi realizada a nested PCR. Em todas as amostras positivas realizou-se uma PCR para gene β - giardin com o objetivo de identificar o assemblage, e dessas 11 amostras foram enviadas para sequenciamento. Dos 443 animais estudados, 92 apresentaram-se positivos (20,77%) na n-PCR. Na PCR para gene β - giardin 25 animais (27,17%) foram considerados positivos. As 11 amostras enviadas para sequenciamento apresentaram positividade para *G. duodenalis* assemblage E, sendo este considerado um dos principais assemblages em ovinos em diversos estudos.

Palavras-chave: Diarreia, Cordeiros, Giardíase, Protozoário.

ARTICLE B – OCCURRENCE AND GENETIC CHARACTERIZATION OF *GIARDIA* SPP. IN SHEEP FROM NORTHERN PARANÁ STATE

ABSTRACT

Giardia spp. is an enteric parasite responsible for causing diarrhea in a large range of mammal species, as well as in humans. The objective of this study was to verify the occurrence of *Giardia* spp. In feces of naturally infected sheep from Northern Paraná State. Stool samples were collected from 443 sheep from both genders, different ages and breeds. After the collection, the fecal samples were stored frozen at -20 °C until processing. To verify the occurrence of this parasite, a nested PCR was performed with the samples. After, a PCR for gene β - giardin was done for all nested PCR positive samples, aiming to identify the assemblage, resulting in 11 samples sent for sequencing. From the 443 animals, 92 were considered positive (20.77%) at the n-PCR. The PCR for gene β - giardin found 25 (27.17%) positive animals. The 11 samples sequenced, showed to be from the *G. duodenalis* assemblage E, which is the main assemblage found in studies with ovine.

Keywords: Diarrhea, Lambs, *Giardiasis*, Protozoan.

1 INTRODUÇÃO

Giardia pertence ao reino Excavata, filo Metamonada, classe Fornicata, ordem Diplomonadida, família Giardiinae (ADL *et al.*, 2012), e atualmente sete espécies de *Giardia* são aceitas, *G. agilis*, *G. ardea*, *G. microti*, *G. muris*, *G. psitacci*, *G. varani*, *G. duodenalis* (FENG; XIAO.,2011; ADL., 2012). O principal agente etiológico da giardíase em mamíferos incluindo humanos é a *Giardia duodenalis* (syn. *G.lamblia* ou *G. intestinalis*), que até o presente momento possui oito assemblages descritos que vão A ao H, sendo o assemblage E o predominante em ovinos (FENG; XIAO., 2011; SANTIN., 2020).

Os sinais clínicos da giardíase em ovinos e em diferentes hospedeiros são diarreia, dor abdominal, inchaço e perda de peso, mas infecções assintomáticas também são comuns. O quadro clínico é considerado mais grave caso haja desnutrição ou deficiência imunológica no hospedeiro suscetível (JIAN *et al.*, 2018; SQUIRE *et al.*, 2017). Um estudo realizado na Austrália correlacionou a positividade para *Giardia* spp. com menor ganho de peso, menor crescimento, fezes mais amolecidas e lã suja de fezes na região perianal em cordeiros. Tais condições podem interferir no valor final da produção animal (SWEENEY *et al.*,2011). Estima-se que 250 a 300 milhões de pessoas são infectadas todo ano (RYAN *et al.*, 2019). As vias de transmissão para humanos e animais são alimentos e água contaminados com cistos ou trofozoítos do parasito presentes nas fezes de uma fonte de infecção humana ou animal (ROBERTSON., 2009; RYAN *et al.*, 2019).

Estudos relatando a ocorrência de *Giardia* em ovinos demonstram uma positividade variando de 10 a 40%, de acordo com a localização geográfica do estudo (ROBERTSON., 2009).

Robertson (2009) realizou um levantamento sobre a ocorrência de *Giardia* em ovinos de acordo com os trabalhos publicados, sendo possível observar que espécie *G. duodenalis*, assemblage E foi o mais frequente, e aproximadamente 30% de positividade para assemblage zoonótico. De acordo como Ryan *et al.* (2005), na Austrália ocidental é relatado positividade de 44% (220/500), a maior parte dos animais foram agrupados em genótipos próximos aos de bovinos e *G. duodenalis* assemblage A. Um estudo realizado na Grécia por Tzanidakis *et al.*

(2014), relataram uma positividade de 37,3% das amostras para *G. duodenalis* assemblage E. Paz e Silva *et al.* (2014), ao estudar no Brasil, amostras de 100 ovinos, foi possível observar uma positividade de 34% (34/100), sendo isolado assemblage E.

As técnicas diagnósticas baseadas na procura de cistos nas fezes por microscopia são consideradas técnicas de baixa sensibilidade e especificidade, uma vez que a eliminação de cistos pode ser pequena, e é intermitente. Técnicas moleculares como PCR veem sendo utilizadas devido a sua sensibilidade e eficácia para detecção do DNA do agente infeccioso. Trata-se de uma técnica cujo objetivo é a identificação da presença do parasita nas fezes dos animais e humanos, baseada no gene 18S rRNA. Esta técnica quando comparada a microscopia é mais sensível, porém ela não permite a diferenciação dos assemblages, para isto é necessário a utilização de marcadores genéticos como o gene *β-giardina*, que é uma proteína associada ao disco ventral do parasita (ELMENDORF *et al.*, 2003; RYAN., 2019). Porém se for comparada a sensibilidade das duas técnicas o gene 18S rRNA se mostra mais vantajosa devido as múltiplas cópias no genoma quando comparado ao gene *β-giardina*, que é um gene de cópia única (KIM *et al.*,2019).

O objetivo deste estudo foi verificar a ocorrência e caracterizar geneticamente os protozoários do gênero *Giardia* em ovinos da região norte do Paraná.

2 MATERIAL E METÓDOS

2.1 AMOSTRAS

No período de novembro de 2016 a setembro de 2018, foram coletadas 443 amostras de fezes de ovinos de 12 propriedades que continham cordeiros, elas eram localizadas em oito cidades da região norte do Paraná, sendo elas Londrina, Guaraci, Apucarana, Jaguapitã, Sertanópolis, Cambé, Ibiporã e Rolândia.

A população estudada era composta por ovinos de raças variadas, ambos os sexos e diferentes faixas etárias. O cálculo amostral foi realizado pelo OpenEpi versão 3.01, considerando uma prevalência de 50%, com nível de confiança de 95% e eficácia de 5%. O presente estudo encontra-se aprovado no CEUA/UUEL nº 12147.2015.53.

As amostras foram coletadas direto da ampola retal como auxílio de luva de procedimento e armazenadas em caixas térmicas e encaminhadas para o Laboratório de Parasitologia Veterinária da Universidade Estadual de Londrina. No laboratório as amostras foram armazenadas em microtubos e mantidas em freezer a -20° C até o momento da extração de DNA.

2.2 QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

O questionário epidemiológico abordou questões sanitárias, nutricionais e aspectos relacionados a giardíase em todas as propriedades visitadas. Os questionários foram conduzidos por forma de entrevista, e neste momento os proprietários autorizaram a utilização dos dados para este estudo.

2.3 EXTRAÇÃO DE DNA

Para realizar a extração foi necessário diluir 200 mg de fezes em 1 ml de Tris- EDTA (TE), sendo este material filtrado com o auxílio de uma gaze para a retirada das partículas fibrosas. Este conteúdo foi submetido a três ciclos de congelamento a -80° C e descongelamento a 30°C, ao final dos três ciclos foi adicionado 15 µL de proteinase K (1mg/ml) e 30 µL de SDS 0,1% e incubados a

55°C *overnight*. Após esta etapa, foi adicionado 300 µL de UltraPure™ Phenol (Invitrogen, USA) e centrifugado a 13.000 g por 5 minutos. A fase aquosa resultante foi transferida para outro microtubo, adicionando-se 300 µL de UltraPure™ Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol (25:24:1, v/v) (Invitrogen, USA) e novamente centrifugado a 13.000 g por 5 min. A precipitação de DNA por acetato de sódio e etanol foi realizada através do método descrito por Sambrook *et al.*, (1989). Os microtubos contendo o DNA extraído foram armazenados em – 20°C para posterior utilização.

2.4 AMPLIFICAÇÃO DA PCR

Os produtos originados na extração foram submetidos à técnica de PCR do gene 18s rRNA para *Giardia* em duplicata, segundo LANGKJAER *et al* (2006). Para a realização da *nested* PCR foram utilizados os seguintes *primers*: RH11: CATCCGGTCGATCCTGCC (HOPKINS *et al.*, 1997) e RH4LM: GTCGAACCCTGATTCTCCG (READ *et al*, 2002). Na segunda reação, os *primers* continham as seguintes sequências: GiarF: GACGCTCTCCCAAGGAC e GiarR: CTGCGTCACGCTGCTCG ambos segundo Read *et al.* (2002). Após a amplificação da segunda reação foi obtido um fragmento de 175 pb do DNA da *Giardia*.

Para a realização de ambas as reações os mesmos ciclos de tempo e temperatura foram utilizados: Incubação inicial 95°C por 5 minutos, desnaturação 95°C por 30 segundos, anelamento 55°C por 30 segundos, síntese 72°C por 30 segundos e extensão final 72°C por 5 minutos. A desnaturação, anelamento e síntese repetem-se 35 vezes antes do passo de extensão final.

A amplificação do gene β -*giardina* foi realizada em duplicata, segundo Lalle *et al.* (2005), para posterior classificação dos assemblages. Para a realização das reações foram utilizados os seguintes *primers*: G7: AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC E G759 AGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC. Na segunda reação foram utilizados os *primers*: GiarF: GAACGAACGAGATCGAGGTCCG e GiarR: CTCGACGAGCTTCGTGTT, obtendo um fragmento 511 pb segundo Lalle *et al.*(2005).

Para a realização das duas reações foram utilizados o seguinte protocolo:

Incubação inicial 95°C por 5 minutos, desnaturação 95°C por 30 segundos, anelamento 63°C por 30 segundos, síntese 72°C por 30 segundos e extensão final 72°C por 5 minutos. A desnaturação, anelamento e síntese repetem - se 35 vezes antes do passo de extensão final.

A visualização do produto da PCR foi feita em gel de agarose a 1,5%, corado com SYBR® Safe (DNA Gel Stain; Invitrogen, Brasil), e visualizado por luz ultravioleta e fotodocumentados usando o programa LPix Imagem ST (Loccus Biotecnologia).

2.5 SEQUENCIAMENTO GENÉTICO E ÁRVORE FILOGENÉTICA

Os Amplicons sintetizados durante a Nested-PCR foram submetidos à purificação por meio do kit comercial QIAquick gel extraction kit (Invitrogen). Após a purificação, foram submetidos ao sequenciamento genético utilizando o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), através do ABI3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Os dados obtidos após o sequenciamento permitiram comparações entre amplicons complementares de uma mesma amostra, o que permitiu a construção de sequências consensus que foram comparadas com sequências depositadas no GenBank por meio do programa Blastn, para determinação de espécies.

O alinhamento das sequências foi realizado no software Bioedit Sequence Alignment Editor 7.2.5, incluindo amostras de referência. Por meio dos consensus, com a utilização do software MEGA6 (TAMURA *et al.*, 2013), foi construída a árvore filogenética comparando os isolados obtidos e outros isolados cujas sequências estão depositadas no GenBank. Os parâmetros utilizados para a construção da árvore filogenética foi Kimura dois parâmetros da distância (KIMURA, 1980). As análises estatísticas de árvores filogenéticas foram determinadas pelo método *bootstrap* em 1000 repetições.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das análises moleculares foram associados às variáveis sexo, faixa etária, presença de cães e gatos e criação mista na propriedade, que

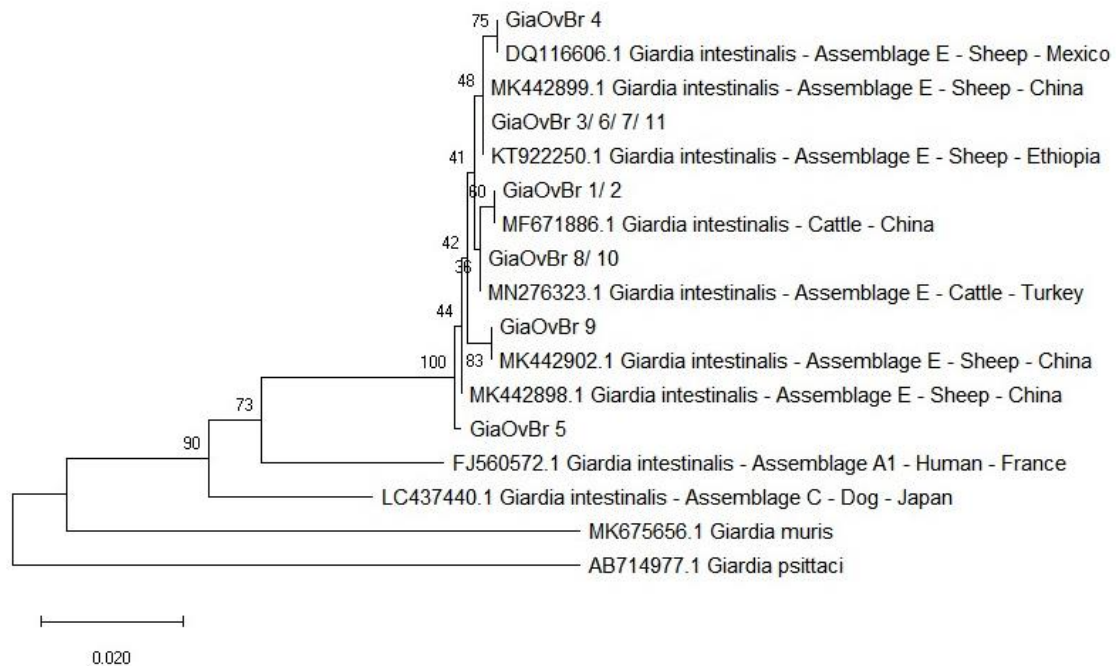
foram obtidas no questionário epidemiológico, utilizando o teste de Qui-quadrado corrigido de Yates, com intervalo de confiança de 95%, utilizando o Programa Epi Info 7.2.2.6. Um $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 443 animais analisados 92 (20,77%) foram positivos no 18S rRNA. Trabalhos semelhantes realizados em diferentes localidades como na Espanha, realizado por Castro-Hermida *et al.* (2007) onde a positividade foi de 19,2% (86/446), bem como, na China, Chen *et al.* (2019), encontraram uma ocorrência de 21,8% (71/325).

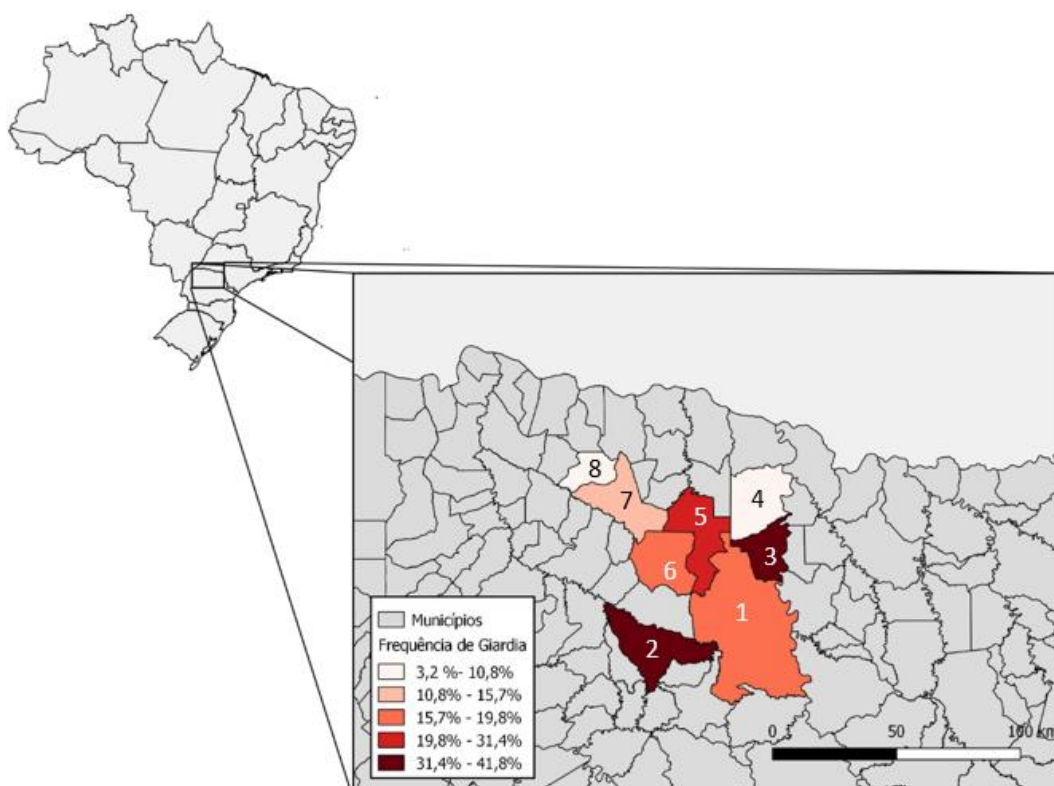
As amostras positivas na n-PCR do gene 18S rRNA, foram submetidas a PCR para o gene *β-giardina*, as quais apresentaram positividade de 27,2% (25/92). Dessas amostras 11 tiveram qualidade de DNA para sequenciamento genético. Todas as amostras se agruparam com sequências padrões de *G. duodenalis* assemblage E (Figura 5). As amostras GiaOvBr 1 e 2 apresentaram similaridade genética de 100% com a amostra MF671886.1, proveniente de um bovino na China. As amostras GiaOvBr 3, 6, 7 e 11 apresentaram similaridade genética de 100% com com as amostras MK442899.1 e KT922250.1, proveniente de ovinos da China e da Etiópia. A amostra GiaOvBr 4 apresentou similaridade genética de 100% com a amostra do DQ116606.1, proveniente de um ovino do México. A amostra GiaOvBr 5 apresentou similaridade genética de 99,60% com a amostra do MK442898.1, proveniente de um ovino da China. As amostras GiaOvBr 8 e 10 apresentaram similaridade genética de 100% com com a amostra do MN276323.1, proveniente de um bovino da Turquia. E a amostra GiaOvBr 9 apresentou similaridade genética de 100% com a amostra do blast MK442902.1, proveniente de um ovino da China. Os resultados encontrados em nosso estudo estão em concordância com estudos realizados em outras localidades como Espanha, Grécia, China, Bélgica e África (CASTRO-HERMIDA *et al.*, 2007; TZANIDAKIS *et al.*, 2014; JIN *et al.*, 2017; SQUIRE *et al.*, 2017; GEURDEN *et al.*, 2018).

Figura 3 Árvore filogenética de sequências do gene *B- giardin* de ovinos deste estudo e de outras espécies de *Giardia* disponíveis no GenBank.



Os resultados da ocorrência de *Giardia* spp. e os locais de coleta das amostras, estão apresentados na Figura 4. Observou-se uma positividade em todas as cidades participantes deste estudo, com maior frequência nas cidades de Apucarana e Ibiporã.

Figura 4 Localização das cidades com amostras positivas para *Giardia* spp. deste estudo.



Cidades abordadas no estudo: 1- Londrina, 2- Apucarana, 3- Ibiporã, 4- Sertãozinho, 5- Cambé, 6- Rolândia, 7- Jaguapitã, 8- Guaraci.

A tabela 2 ilustra os resultados da idade na ocorrência de *Giardia* spp., a faixa etária de 3 a 12 meses (44/134) mostrou a maior positividade, seguidos dos animais de > 12 meses (18/179). A ocorrência de *Giardia* é mais comumente relatada em animais jovens menores de um ano. Paz e Silva *et al.* (2014) relatam que, no Brasil, há uma maior prevalência em cordeiros. Um trabalho realizado na Grécia por Tzanidakis *et al.* (2014) com cordeiros, encontrou uma positividade de 37,3%. Squire *et al.* relatou uma maior ocorrência do parasita em animais de 0-12 meses na África (2017). Estes dados se assemelham aos encontrados neste trabalho, onde a ocorrência foi maior em animais de zero a 12 meses de vida, representando 27,65% animais positivos (73/264), quando comparado aos animais acima dos 12 meses 10,06% (18/179). Qi *et al.* (2019) na China encontrou uma positividade de 7,5% (24/318) em ovelhas adultas. Em um trabalho realizado por Wu *et al.* (2018) na China, encontrou uma prevalência de

1,7% (3/177) em ovelhas.

Tabela 1. Ocorrência de *Giardia* spp. em ovinos de acordo com a faixa etária em cidades da região norte do Paraná, no período de novembro de 2016 a setembro de 2018.

Parâmetros	Ovinos Positivos		X ²	p	
	<i>Giardia</i> 18S				
		N	%		
Idade	3 a 12 meses	73 / 264	27,65	19,17	0,00001
	> 12 meses	18 / 179	10,06		

N – Número de animais; %- Positivos; X² - Análise de qui-quadrado; P- p-valor

Os resultados da positividade de *Giardia* spp. e a associação com a presença de cães e criação mista estão apresentados na Tabela 3. Observou-se uma positividade na presença de cães de 23,04% (85/369) e criação mista 23,04% (85/369), estas associações apresentaram-se estatisticamente significantes com $p < 0,05$. Sahraoui *et al* (2019) em levantamento epidemiológico da giardíase em cordeiros na Argélia, relatou a positividade de um animal para assemblage D da *G. duodenalis*, que é frequentemente descrito em cães e canídeos silvestres. Os animais deste estudo viviam em contato intensivo com os cães da propriedade. Neste estudo a presença de cães foi estatisticamente significativa ($p < 0,003$) para a positividade da *Giardia*, ressaltando a importância de se pesquisar em ambas as espécies a presença do parasita, avaliando o risco da transmissão entre elas em estudos futuros.

Estudos realizados na Espanha, Pensilvânia, Grécia, Tibete, Gana, Bélgica descrevem a ocorrência de *Giardia* em propriedades de criação mista de animais. Os resultados obtidos nestas localidades podem justificar os resultados encontrados neste estudo, onde a presença de criação mista nas propriedades foi considerada estatisticamente significativa ($p < 0,003$) a presença da *Giardia*. (CASTRO-HERMIDA *et al.*, 2007; TZANIDAKIS *et al.*, 2014; JIN *et al.*, 2017; SQUIRE *et al.*, 2017; GEURDEN *et al.*, 2018; JIAN *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2019).

Tabela 2. Ocorrência de *Giardia* spp. em ovinos segundo a presença de cães e criação mista em propriedades da região norte do Paraná, no período de Novembro de 2016 a Setembro de 2018.

Parâmetros		Ovinos Positivos <i>Giardia</i> 18S		X ²	P
		N	%		
Cães	Sim	85 / 369	23,04	8,41	0,0037
	Não	6 / 74	8,11		
Criação Mista	Sim	85 / 369	23,04	8,41	0,0037
	Não	6 / 74	8,11		

N – Número de animais; %- Positivos; X² - Análise de qui-quadrado; P- p-valor

4 CONCLUSÃO

A elevada ocorrência de amostras positivas para a *G. duodenalis* assemblage E neste trabalho, ressalta a sua importância, pois este parasita é considerado um dos principais protozoários em ovinos jovens, levando a alterações como diarreia, dor abdominal, perda de peso, resultando em retardo de crescimento, fator este que pode contribuir para um prejuízo financeiro ao produtor rural.

REFERÊNCIAS

ADL, S.M. *et al.* The revised classification of eukaryotes. **Journal Eukaryot Microbiology**, v.59, n.5, p.429-514, 2012.

CASTRO-HERMIDA, J; WARLETA, M.G.; COSTA, J.M.C.; LORENZA, C.R.; MEZO, M. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in healthy adult domestic ruminants. **Parasitology Research**, v. 101, n. 5, p. 1443–1448, 2007.

CHEN, D.; ZOU,Y.; LI,Z.; WANG, S.S.; XIE, S.C.; SHI,L.Q.; ZOU,F.C.; YANG,J.F.; ZHAO,G.H.; ZHU,X.Q. Occurrence and multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in black-boned sheep and goats in southwestern China. **Parasites and Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2019.

ELMENDORF, H.G.; DAWSON, S.C.; McCAFFERY,J.M. The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. **International Journal for Parasitology**, v.33, p.3-28, 2003.

FENG,Y.; XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and *Giardiasis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 110–140, 2011.

GEURDEN, T.; THOMAS, P.; CASAERT, S.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOUT, E. Prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* in lambs and goat kids in Belgium. **Veterinary Parasitology**, v. 155, n. 1–2, p. 142–145, 2018.

JIAN, Y. ; ZHANG, X.; XIUPING. LI.; KARANIS, G.; LIQING, M.; KARANIS, P. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* in cattle and sheep from the Qinghai-Tibetan Plateau Area (QTPA), northwestern China. **Veterinary Parasitology**, v. 250, n. January 2017, p. 40–44, 2018.

JIN, Y.; FEI, J.; CAI,J.; WANG,X.; LI,N.; GUO,Y.; FENG,Y.; XIAO,L. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in Tibetan sheep and yaks in Qinghai, China. **Veterinary Parasitology**, v. 247, n. September, p. 70–76, 2017.

KIM, H.Y.; LEE, H.; LEE, S.H.; SEO, M.G.; YI, S.; KIM, J.W.; KIM, H.C.; LEE, Y.R.; SO, B.J.; KWON, O.D.; KWAK, D. Multilocus genotyping and risk factor analysis of *Giardia duodenalis* in dogs in Korea. **Acta Tropica**, v.199, p. 105-113, 2019.

LALLE, M.; POZIO, E.; CAPELLI.; BRUSCHI, F.; CROTTI, D.; CACCIO, S.M. Genetic heterogeneity at the β -giardina locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 207–213, 2005.

LANGKJÆR, R. B.;VIGRE,H.; ENEMARK,H.L.; HYTTEL, C.M. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. **Parasitology**, v. 134, n. 3, p. 339–350, 2007.

SILVA, F. M. P.; LOPES, R. S.; BRESCIANI, K. D. S.; AMARANTE, A. F. T.; ARAUJO, J. P. High occurrence of *Cryptosporidium ubiquitum* and *Giardia*

duodenalis genotype E in sheep from Brazil. **Acta Parasitologica**, Warszawa, v. 59, n. 1, p. 193-196, 2014.

QI, M.; ZHANG, Z.; ZHAO,A.; JING,B.; GUAN, G.; LUO. J.LONGXIANO,Z. Distribution and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Enterocytozoon bienersi* amongst grazing adult sheep in Xinjiang, China. **Parasitology International**, v. 71, n. 15, p. 80–86, 2019.

READ, C., Walters, J., Robertson, I.D Thompson, R.C.A. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. **International Journal for Parasitology**, v 32. p 229-231, 2002.

ROBERTSON, L. J. *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in sheep and goats: A review of the potential for transmission to humans via environmental contamination. **Epidemiology and Infection**, v. 137, n. 7, p. 913–921, 2009.

RYAN, U. M.; CAROLINE, B.; ROBERTSON, I.; READ, C.; ELLIOT, A.; MCINNES, R.T.; BESIER, B. Sheep may not be an important zoonotic reservoir for *Cryptosporidium* and *Giardia* parasites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 4992–4997, 2005.

RYAN, U.; HIJJAWI,N.; FENG,Y.; XIAO.L. *Giardia*: an under-reported foodborne parasite. **International Journal for Parasitology**, v. 49, n. 1, p. 1–11, 2019.

SAHRAOUI, L.; THOMAS,M.; CHEVIOLLOT,A.; MAMMERI,M.; POLACK,B.; VALLÉE,I.; FOLLET,J.; AIN-BAAZIZ,H.; ADJOU,K.T. Molecular characterization of zoonotic *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* pathogens in Algerian sheep. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 16, n. January, p. 100280, 2019.

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

SANTIN, M. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Ruminantes. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v.36, p.223-238, 2020.

SILVA, F. M. P.; LOPES, R. S.; BRESCIANI, K. D. S.; AMARANTE, A. F. T.; ARAUJO, J. P. High occurrence of *Cryptosporidium ubiquitum* and *Giardia duodenalis* genotype E in sheep from Brazil. **Acta Parasitologica**, Warszawa, v. 59, n. 1, p. 193-196, 2014.

SQUIRE, S. A.; YANG, R.; ROBERTSON,I.; AYI, IRENE., RYAN,U. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in farmers and their ruminant livestock from the Coastal Savannah zone of Ghana. *Infection*, **Genetics and Evolution**, v. 55, n. December 2016, p. 236–243, 2017.

SWEENEY, J.P.A.; RYAN, U.M.; ROBERTSON.; JACOBSON,C. *Cryptosporidium* and *Giardia* associated with reduced lamb carcass productivity. **Veterinary Parasitology**, v.182, p.127-139, 2011.

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

TZANIDAKIS, N.; SOTIRAKI,S.; CLAEREBOUT,E.; EHSAN,A.; VOUTZOURAKIS,N.; KOSTOPOILOU,D.; STIJN,C.; VERCRUYSSSE,J.; GEURDEN,T. Occurrence and molecular characterization of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in sheep and goats reared under dairy husbandry systems in Greece. **Parasite Journal**, v. 21,p.45, 2014.

WU, Y.; CHANG, Y.; CHEN,Y.; ZHANG,X.; LI,D.; ZHENG,S.; WANG,L.; LI,J.; NING,C.; ZHANG,L. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Enterocytozoon bieneusi* from Tibetan sheep in Gansu, China. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 64, n. 2017, p. 46–51, 2018.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Poucos estudos sobre a prevalência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em ovinos foram realizados no norte do Paraná, dessa forma, o presente estudo adiciona um maior conhecimento sobre a distribuição destes parasitas na região.

O estudo observou que os ovinos não apresentam potencial zoonótico para *Giardia* considerando-se as amostras sequenciadas.

APÊNDICE A

Aceite do Comitê de Ética em Experimentação Animal



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 145/2016


Londrina, 14 de Julho de 2016.

Prezado Pesquisador,

A CEUA/UEL reunida em 05 de Julho de 2016 avaliou o pedido de adendo ao projeto de pesquisa intitulado “**Prevalência de Eimeria sp. em ovinos e caprinos oriundos de propriedade de leite localizadas no norte do Estado do Paraná, Brasil**”, registrado sob o processo CEUA nº 12147.2015.53, aprovado conforme OF.CIRC.CEUA nº182/2015, pesquisa do Centro de Ciências Agrárias, desenvolvido sob sua responsabilidade, julgando-o **aprovado** para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Trata-se de um adendo para utilização de 2 cordeiros para inoculação experimental visando melhores resultados.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,


Prof. Dra. Glaucia Scantamburlo Alves Fernandes
Coordenadora da CEUA/UEL

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. João Luis Garcia
Coordenador do projeto
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Centro de Ciências Agrárias

APÊNDICE B

Questionário epidemiológico

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

PERFIL SANITÁRIO DO REBANHO DE OVINOS E CAPRINOS - PARANÁ

QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

Propriedade No _____

Data: ____/____/____

Proprietário: _____		Fone: ____	
Endereço: _____	Mun.: ____		UF: ____
	-		-
Propriedade: _____		Fone: ____	
Endereço: _____	Mun.: ____		UF: ____
	-		-
Tamanho da Propriedade: ____ha			
Área destinada aos ovinos/ caprinos: _____ha			

DADOS DA PROPRIEDADE E DOS ANIMAIS

1. Atividades desenvolvidas: (1) agricultura (2) pecuária (3) mista
2. Tipo de criação: (1) subsistência (2.1) pec. intensiva (2.2) pec. semi-intensiva (2.3) pec. extensiva
3. Criação mista: (1) sim (2) não
4. Quais: (1) ovinos ____ (2) caprinos ____ (3) bovinos ____ (4) equinos ____ (5) suínos ____ (6) aves ____
5. Presença de cães: (1) sim (2) não. Quantos: ____ Presença de gatos: (1) sim (2) não. Quantos: ____
6. Quantidade de ovinos: (1) matriz ____ (2) reprodutor ____ (3) 0-6m ____ (4) 7-12m ____
7. Categoria: (1) corte (2) leite (3) lã (4) elite
8. Características raciais dos animais: (1) puro (2) mestiços
9. Raça predominante de ovinos: (1) Santa Inês (2) Texel (3) Dorper (4) White Dorper (5) Ile de France (6) Suffolk (7) Pool Dorset (8) Bergamácia (9) Crioula (10) Merino Australiano (11) Ideal (12) Hampshire Down (13) Corriedale (14) Morada nova (15) Lacaune (16) Karakul (17) Outros: ____
10. Raça predominante de caprinos: (1) Boer (2) Saanen (3) Anglo Nubiana (4) Nubiana (5) Parda Alpina (6) Toggenburg (7) Canindé (8) Angorá (9) Moxotó (10) Murciana
11. Rodizio de Pastagem: (1) sim (2) não
12. Período: (1) 7 dias (2) 14 dias (3) 21 dias (4) 30 dias (5) outros: ____
13. Recente troca de alimentos/ broto de pastagem: (1) sim (2) não
14. Suplementação de Inverno: (1) sim (2) não. Qual: ____ (ração)?
15. Fornecimento de Volumoso: (1) sim (2) não.
16. Tipo de Volumoso: (1) pastagem (2) silagem (3) forrageira (4) feno
17. Fornecimento de concentrado: (1) sim (2) não
18. Alimentação controlada: (1) ração comercial (2) ração produzida na propriedade (3) outro: ____
19. Suplementação mineral: (1) sal comum (2) sal comum + sal mineral (3) sal mineral (4) não
20. Instalação: (1) aprisco ripado (2) chão batido (3) maravalha (4) a campo
21. Limpeza do aprisco: (1) sim (2) não. Frequência: ____
21. Limpeza bebedouro: (1) sim (2) não. Frequência: ____
22. Limpeza comedouro: (1) sim (2) não. Frequência: ____

23. Vacinas efetuadas: (1) clostridiose (carbúnculo) (2) raiva (3) linfadenite caseosa (4) leptospirose (5) foot-root (6) ectima contagioso (7) diarreias víricas (8) diarreias bacterianas (9) outros: _____

24. Clostridiose: (1) Quando? _____ (2) idade atual: _____

25. Criação de cordeiros: (1) sim (2) não

26. Instalação: (1) a campo (2) confinamento (3) outros: _____

27. Fornecimento de Colostro: (1) sim (2) não

28. Tipo de colostro: (1) na ovelha (2) fresco (3) congelado

29. Alimentação: (1) leite de ovelha (2) leite em pó (3) leite de ovelha + creep-feeding (4) creep-feeding

30. Alimentação refugo: (1) mãe de leite (2) artificial-mamadeira (3) outros: _____

31. Suplementação: (1) ração (2) feno (3) outro: _____

32. Tratamento do Umbigo: (1) sim (2) não

33. Produto utilizado: (1) iodo (2) umbicura (3) outros: _____

34. Método de realização: (1) imersão (2) spray (3) aplicação direta (4) outros: _____

35. Problemas reprodutivos: (1) sim (2) não (3) Faixa etária mais acometida: _____

36. Fase da gestação acometida: (1) terço inicial (2) terço médio (3) terço final

37. Problemas reprodutivos mais frequentes: (1) metrite (2) corrimento (3) vulvovaginite (4) repetição de cio (5) aborto (6) natimortos (7) fetos mumificados (8) recém-natos debilitados (9) retenção de placenta (10) problemas durante o parto (11) prolapso vaginal (12) prolapso uterino (13) outros: _____

38. Frequência dos problemas: (1) 1ª cria (2) 2ª cria (3) 3ª cria (4) 4ª cria (5) todas as crias (6) outro: _____

39. Compra de animais? (1) sim (2) não (3) local: _____

40. Recente? (1) sim (2) não

41. Quarentena: (1) sim (2) não **Onde?** _____

42. Apresentaram problemas: (1) sim (2) não (3) qual: _____

43. Problemas neurológicos: (1) sim (2) não (3) Faixa etária afetada: _____ (4) quais: _____

44. Quais? _____

45. Problemas respiratórios: (1) sim (2) não (3) Faixa etária afetada: _____ (4) quais: _____

46. Quais? _____

47. Controle Parasitológicos: exames de fezes: (1) sim (2) não

48. Presença de diarreia: (1) sim (2) não (3) Faixa etária afetada: _____

49. Presença de sangue: (1) sim (2) não

50. Frequência: (1) 1m (2) 2m (3) 3m (4) 4m (5) 6m (6) 1 ano (7) outro: _____ (8) resultados: _____

51. Anti-helmínticos utilizados: (1) albendazol (2) ripercool (3) dectomax (4) zolvix (5) cidectin (6) endozol (7) dovenix (8) ivomec (9) closantel (10) outros: _____

52. Via de administração: (1) oral (2) injetável (3) outro: _____

53. Frequência: (1) a cada 15 dias (2) todo mês (3) outro: _____

54. Realização de método famacha: (1) sim (2) não

55. Frequência: (1) a cada 15 dias (2) a cada 30 dias

56. Rotação de anti-helmínticos: (1) sim (2) não

57. Frequência: (1) a cada 15 dias (2) todo mês (3) anual (4) teste de eficácia (5) outros: _____

58. Presença de carrapatos: (1) baixa infestação (2) média infestação (3) alta infestação (4) ausência

59. Época do ano que aparecem: mês _____ (1) primavera (2) verão (3) outono (4) inverno (5) ano todo

60. Uso de carrapaticida: (1) sim (2) não Qual? _____

61. Frequência: (1) 15 dias (2) 20 dias (3) 30 dias (4) 2 m (5) 4 m (6) 6 m (7) outro: _____ (8) Qual? _____

62. Rotação de princípio ativo: (1) sim (2) não
63. Frequência: (1) a cada 15 dias (2) todo mês (3) anual (4) outros: __
64. Tipo de aplicação: (1) pulverização (2) pour on (3) aspersão (4) injetável (5) Vol. Méd. p/ animal __ (6) outro: _____
65. Presença de sarna: (1) sim (2) não
66. Uso de mosquicidas: (1) sim (2) não (3) Qual? __
67. Aplicação: (1) animal (2) instalações (3) esterco (4) outro: _____
68. Procedência da água de consumo animal: (1) mina (2) poço comum (3) poço semi-artesiano (4) sanepar (5) rio (6) represa (7) açude (pluvial) (8) outro: _____
69. Destino dos excrementos dos animais: (1) amontoado (2) enterrado (3) esterqueira (4) adubo (5) outros:
70. Distância da fossa ou depósito de fezes em relação a fonte de água: (1) 25m (2) maior que 25m (3) menor que 25 (4) outro
71. Localização da fossa ou depósito de fezes em relação a fonte de água: (1) acima (2) abaixo (3) ao lado