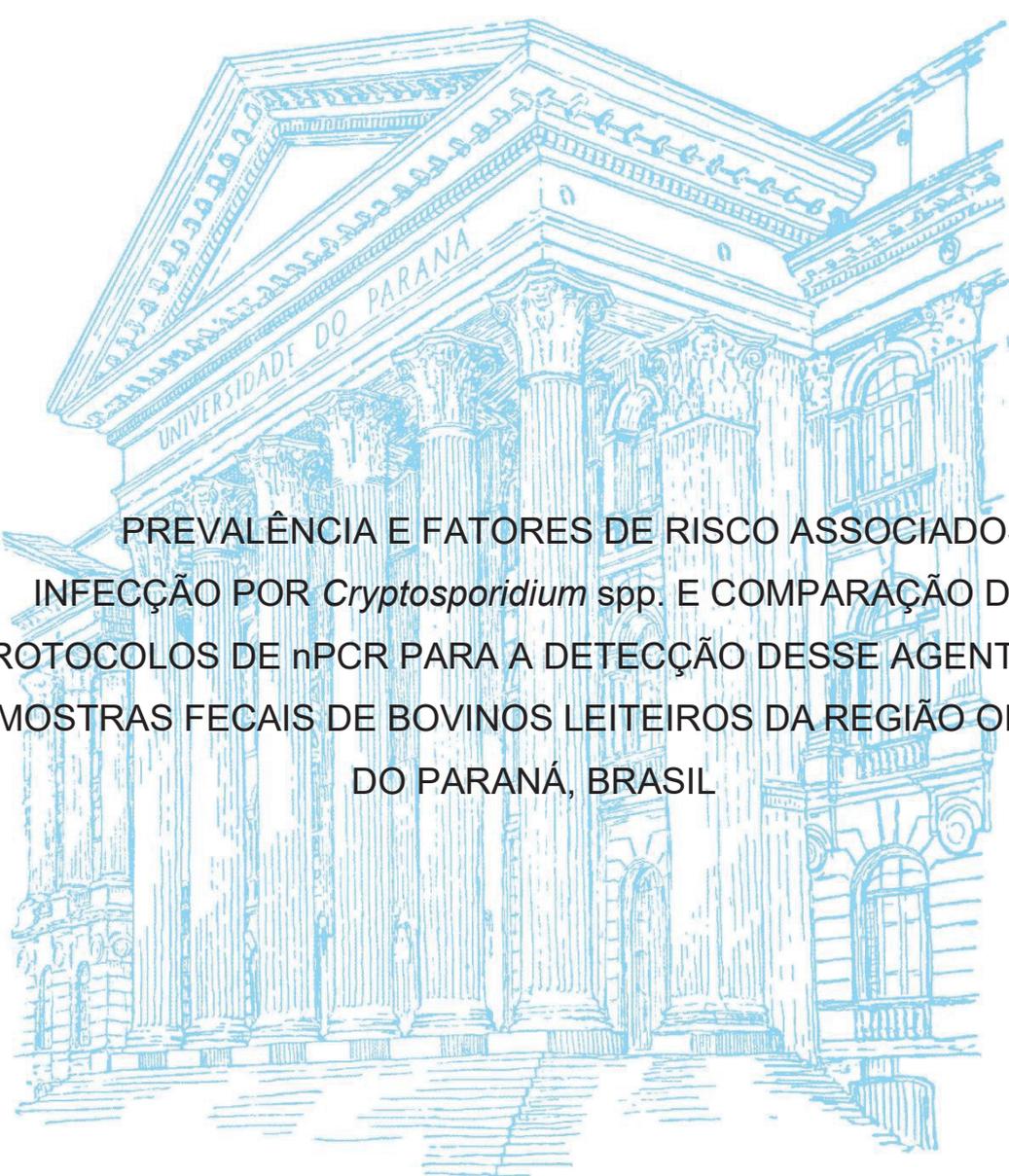


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA PAULA MOLINARI CANDEIAS



PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À  
INFECÇÃO POR *Cryptosporidium* spp. E COMPARAÇÃO DE  
PROTOCOLOS DE nPCR PARA A DETECÇÃO DESSE AGENTE EM  
AMOSTRAS FECAIS DE BOVINOS LEITEIROS DA REGIÃO OESTE  
DO PARANÁ, BRASIL

PALOTINA

2022

ANA PAULA MOLINARI CANDEIAS

PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À  
INFECÇÃO POR *Cryptosporidium* spp. E COMPARAÇÃO DE  
PROTOCOLOS DE nPCR PARA A DETECÇÃO DESSE AGENTE EM  
AMOSTRAS FECAIS DE BOVINOS LEITEIROS DA REGIÃO OESTE  
DO PARANÁ, BRASIL

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, no  
Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Setor de  
Palotina, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Luis Mello Fernandes  
Coorientadora: Profa. Dra. Adriana Fiorini Rosado

PALOTINA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

C216 Candeias, Ana Paula Molinari  
Prevalência e fatores de risco associados à infecção por *Cryptosporidium* spp. e comparação de protocolos de NPCR para a detecção desse agente em amostras fecais de bovinos leiteiros da região oeste do Paraná, Brasil / Ana Paula Molinari Candeias – Palotina, 2022.  
75f.

Orientador: Nelson Luis Mello Fernandes  
Coorientadora: Adriana Fiorini Rosado  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná,  
Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

1.Diagnóstico molecular. 2. Protozoário. 3. Zoonose. 4. Pecuária leiteira. I. Fernandes, Nelson Luis Mello. II. Rosado, Adriana Fiorini. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDU 636.2

## ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRA EM CIÊNCIA ANIMAL

No dia vinte e oito de janeiro de dois mil e vinte e dois às 09:00 horas, na sala Online, Plataforma Microsoft Teams, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação da mestranda **ANA PAULA MOLINARI CANDEIAS**, intitulada: **Prevalência e fatores de risco associados a infecção por *Cryptosporidium* spp. e comparação de protocolos de nPCR para detecção desse agente em amostras fecais de bovinos leiteiros da região Oeste do Paraná, Brasil**, sob orientação do Prof. Dr. NELSON LUIS MELLO FERNANDES. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: NELSON LUIS MELLO FERNANDES (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), SILVIA CRISTINA OSAKI (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), JOÃO LUIS GARCIA (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestra está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, NELSON LUIS MELLO FERNANDES, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

PALOTINA, 28 de Janeiro de 2022.

Assinatura Eletrônica

02/02/2022 14:01:03.0

NELSON LUIS MELLO FERNANDES

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

31/01/2022 15:29:55.0

SILVIA CRISTINA OSAKI

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

02/02/2022 13:06:19.0

JOÃO LUIS GARCIA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR PALOTINA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA ANIMAL -  
40001016077P6

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ANA PAULA MOLINARI CANDEIAS** intitulada: **Prevalência e fatores de risco associados a infecção por *Cryptosporidium* spp. e comparação de protocolos de nPCR para detecção desse agente em amostras fecais de bovinos leiteiros da região Oeste do Paraná, Brasil**, sob orientação do Prof. Dr. NELSON LUIS MELLO FERNANDES, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 28 de Janeiro de 2022.

Assinatura Eletrônica

02/02/2022 14:01:03.0

NELSON LUIS MELLO FERNANDES

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

31/01/2022 15:29:55.0

SILVIA CRISTINA OSAKI

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

02/02/2022 13:06:19.0

JOÃO LUIS GARCIA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA)

---

R. Pioneiro, 2153 - PALOTINA - Paraná - Brasil

CEP 85950-000 - Tel: (44) 3211-8529 - E-mail: ppgca.ufpr@gmail.com

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 143726

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>  
e insira o código 143726

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Ana Paula Molinari Candeias, filha de Adélia Molinari e Isildo da Silva Candeias, nasceu na cidade de Umuarama, Paraná, no dia 25 de abril de 1995.

Iniciou em abril de 2013 o curso de Medicina Veterinária, na Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, obtendo o título de Médica Veterinária em janeiro de 2018.

Em março de 2018, iniciou no Programa de Residência Multiprofissional na área de Doenças Parasitárias dos Animais, na Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, concluindo em fevereiro de 2020.

Em março de 2020, ingressou no Programa de Pós-graduação *stricto sensu* Ciência Animal, na Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina.

Aos meus pais,  
por serem meu porto seguro!  
Aos meus avós, Henrique Molinari e  
Isidoro Candeias (*in memoriam*), por todo  
amor, valores e ensinamentos deixados.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as vitórias alcançadas e pelos desafios encontrados no meio do caminho, eles contribuíram para que eu me tornasse uma pessoa melhor.

Aos meus pais, Adélia e Isildo, por me ensinarem o que realmente é valioso na vida, me amar, confiar e apoiar, em todos os momentos, sem vocês eu não teria chegado aqui.

Ao meu orientador Prof. Dr. Nelson Luis Mello Fernandes por ter me apresentado a pesquisa científica, pela orientação, apoio e incentivo recebidos desde 2015, quando iniciei o primeiro estágio no Laboratório de Doenças Parasitárias, e por toda a confiança em mim depositada. Obrigada pela contribuição ao longo de todos esses anos para a minha formação profissional e desenvolvimento pessoal.

A minha co-orientadora Adriana Fiorini Rosado e as professoras Elisabete Takiuchi e Silvia Cristina Osaki pela receptividade, atenção e suporte fornecido, vocês foram essenciais!

Agradeço a todos que ajudaram de alguma forma na realização do projeto, pelo auxílio fornecido pela equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias, principalmente a Victória e o André, por terem me ajudado nas coletas a campo e no processamento das amostras, sem a ajuda de vocês tudo seria mais difícil. Um agradecimento especial para a Ana Julia, estagiária, aluna de iniciação científica, que se tornou amiga e meu “braço direito” durante todo o período de desenvolvimento do projeto.

A Carol, Maria Victória e Geovane, pela indicação de propriedades para realização das coletas.

A todos os produtores, que mesmo durante a pandemia de COVID-2019, abriram as portas de suas propriedades para a universidade e permitiram a coleta de amostras dos seus animais, sem vocês o projeto não aconteceria!

Agradeço a Karim, amiga e colega de pós-graduação, foi muito bom partilhar esse período com alguém que possui um coração tão generoso e bondoso, obrigada por muitas vezes ter ouvido os meus apelos e me estimular a ser uma pessoa cada vez melhor.

A Alessandra, amiga e colega de profissão, que mesmo de longe sempre se fez presente, e de alguma forma, sempre esteve disposta a me ajudar e aconselhar.

Aos meus amigos que não participaram do projeto, mas que sempre me apoiaram.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, assim como seus colaboradores, por promoverem o programa e possibilitarem o meu aperfeiçoamento e inserção na rotina da pesquisa científica.

Por fim, agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo durante todo o período do mestrado.

A todos, o meu sincero muito obrigada!

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi pesquisar a prevalência de *Cryptosporidium* spp.; determinar os principais fatores de risco associados à infecção, além de comparar protocolos de nPCR por meio da amplificação do gene 18S SSU (*Small Subunit*) e 28S LSU (*Large Subunit*), a fim de testar a especificidade e a capacidade de amplificação dos primers de cada protocolo para o diagnóstico do protozoário em amostras fecais de bovinos leiteiros da região Oeste do Paraná, Brasil. Após a realização do cálculo amostral foram coletadas 576 amostras fecais de bovinos com até 12 meses de idade, provenientes de 65 propriedades de quatro municípios da região: Cascavel, Marechal Cândido Rondon, Palotina e Toledo. Em todas as propriedades foi aplicado um questionário epidemiológico a fim de detectar os principais fatores de risco associados à infecção por *Cryptosporidium* spp. As amostras foram analisadas por meio de microscopia óptica, nested-PCR (nPCR) e sequenciamento do DNA. Das amostras analisadas, 22% (128) foram positivas na análise microscópica e a idade dos animais, área total da propriedade, sistema de produção e quantidade de animais que compõem o rebanho foram os principais fatores de risco associados à infecção. Todas as amostras positivas na análise microscópica foram submetidas a dois protocolos de nPCR. Das 126 amostras analisadas, 60,32% (76/126) foram amplificadas pelo protocolo do gene SSU, enquanto, 44,4% (55/126) das amostras amplificaram o segmento do gene LSU. Todas as amostras amplificadas foram submetidas ao sequenciamento genético e analisadas para identificação das espécies por meio da consulta ao banco de dados (BLAST®). A amplificação de cada gene possibilitou a identificação de quatro espécies, sendo estas *C. parvum* (41), *C. bovis* (8), *C. ryanae* (5) e *C. muris* (1) pelo amplificado do gene 28S rRNA (LSU) e *C. parvum* (34), *C. bovis* (8), *C. ryanae* (4) e *C. andersoni* (2), pelo amplificado do gene 18S rRNA (SSU). Embora o protocolo de nPCR (LSU) tenha apresentado maior especificidade, a análise filogenética evidenciou que o protocolo de nPCR amplificando o gene SSU permitiu maior diferenciação entre as espécies de *Cryptosporidium*. Desta forma o aprimoramento dos ensaios com a utilização de novos primers deve contribuir na busca de maior especificidade no diagnóstico.

Palavras-chave: Diagnóstico molecular, protozoário, pecuária leiteira, zoonose.

## ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the prevalence of *Cryptosporidium* spp., to determine main risk factors associated with infection, and compare nPCR protocols by amplification of the 18S SSU (Small Subunit) and 28S LSU (Large Subunit) gene to test the specificity and amplification capacity of the primers of each protocol for the diagnosis of the protozoan parasite in fecal samples from dairy cattle in western Paraná, Brazil. After sample calculation, 576 fecal samples were collected from bovines up to 12 months old from 65 properties in four municipalities of the region: Cascavel, Marechal Cândido Rondon, Palotina and Toledo. An epidemiological questionnaire was applied to all properties to detect the main risk factors associated with *Cryptosporidium* spp. infection. Samples were analyzed by light microscopy, nested-PCR (nPCR) and DNA sequencing. Of the samples analyzed, 22% (128) were positive in the microscopic analysis and the age of the animals, total area of the property, production system and number of animals in the herd were the main risk factors associated with infection. All positive samples in the microscopic analysis were submitted to two nPCR protocols. Of the 126 samples analyzed, 60.32% (76/126) were amplified by the SSU gene protocol, while 44.4% (55/126) of the samples amplified the LSU gene segment. All amplified samples were submitted to genetic sequencing and analyzed for species identification by consulting the database (BLAST®). The amplification of each gene allowed the identification of four species: *C. parvum* (41), *C. bovis* (8), *C. ryanae* (5) and *C. muris* (1) using the amplified 28S rRNA gene (LSU), and *C. parvum* (34), *C. bovis* (8), *C. ryanae* (4) and *C. andersoni* (2), using the amplified 18S rRNA gene (SSU). Although the nPCR protocol (LSU) showed greater specificity, phylogenetic analysis showed that the nPCR protocol amplifying the SSU gene allowed greater differentiation between *Cryptosporidium* species. Thus, the improvement of assays with the use of new primers should contribute to the search for greater specificity in diagnosis.

Keywords: Molecular diagnosis, protozoan, dairy cattle, zoonosis.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO II

- FIGURA 1 - ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA DAS LÂMINAS CORADAS PELO MÉTODO DE ZIEHL-NEELSEN MODIFICADO..... 53
- FIGURA 2 - ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA NAS SEQUÊNCIAS PARCIAIS DA PEQUENA SUBUNIDADE DO GENE DO RNA RIBOSSÔMICO NUCLEAR (SSU) POR INFERÊNCIA BAYESIANA (IB)..... 57
- FIGURA 3 - ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA NAS SEQUÊNCIAS PARCIAIS DA GRANDE SUBUNIDADE DO GENE DO RNA RIBOSSÔMICO NUCLEAR (LSU) POR INFERÊNCIA BAYESIANA (IB)..... 58

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - OCORRÊNCIA DE <i>Cryptosporidium</i> spp. EM BOVINOS DE DIVERSOS ESTADOS DO BRASIL, DE ACORDO COM A TÉCNICA EMPREGADA PARA O DIAGNÓSTICO E A FAIXA ETÁRIA AMOSTRADA.....	18
---	----

### CAPÍTULO I

TABELA 1 - QUANTIDADE DE ANIMAIS POSITIVOS E NEGATIVOS NA DETECÇÃO MOLECULAR DE <i>Cryptosporidium</i> spp. EM AMOSTRAS FECAIS DE BOVINOS LEITEIROS DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ POR MEIO DA TÉCNICA DE nPCR.....	34
TABELA 2 - ESPÉCIES DE <i>Cryptosporidium</i> , DE ACORDO COM A IDADE DE CADA ANIMAL, IDENTIFICADAS A PARTIR DOS AMPLIFICADOS DO PROTOCOLO DE nPCR QUE VISA À AMPLIFICAÇÃO PARCIAL DO GENE 28S LSU rRNA POR MEIO DA ANÁLISE COMPARATIVA EM BANCO DE DADOS.....	35
TABELA 3 - ANÁLISE UNIVARIADA DOS FATORES ASSOCIADOS A EXCREÇÃO DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium</i> spp. EM AMOSTRAS FECAIS DE BOVINOS LEITEIROS DE 0 A 12 MESES DE IDADE PROVENIENTES DE 65 PROPRIEDADES LEITEIRAS DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ.....	35
TABELA 4 - ODDS RATIO (OR) E UM IC 95% CALCULADOS PARA OS FATORES ASSOCIADOS A EXCREÇÃO DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium</i> spp. EM AMOSTRAS FECAIS DE BOVINOS LEITEIROS DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ.....	37

## **CAPÍTULO II**

TABELA 1 - COMPARAÇÃO DE PROTOCOLOS DE NPCR POR MEIO DE DIFERENTES LOCUS GÊNICOS (SSU E LSU) E AS ESPÉCIES IDENTIFICADAS PELO SEQUENCIAMENTO DO MATERIAL GENÉTICO OBTIDO A PARTIR DE AMOSTRAS FECAIS DE BOVINOS DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ, BRASIL.....	53
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAPAR –	Agência de Defesa Agropecuária do Paraná
AIDS –	Síndrome da imunodeficiência adquirida
CE –	Ceará
CF –	Centrífugo flutuação
CS –	Centrífugo sedimentação
DEFF –	<i>Design Effect</i>
DNA –	Ácido Desoxirribonucleico
ECF –	Escore de Consistência Fecal
ELISA –	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FAO –	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
GO –	Goiás
IBGE –	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC –	Intervalo de Confiança
IFD –	Imunofluorescência Direta
LSU –	<i>Large Subunit</i>
MG –	Minas Gerais
MS –	Mato Grosso do Sul
nPCR –	Dupla reação em Cadeia pela Polimerase
pb –	Pares de base
PCR –	Reação em Cadeia da Polimerase
PR –	Paraná
qPCR –	PCR em tempo real
RJ –	Rio de Janeiro
rRNA –	Ácido Ribonucleico Ribossomal
RS –	Rio Grande do Sul
SC –	Santa Catarina
SP –	São Paulo
spp. –	Espécies
SSU –	<i>Small Subunit</i>
Taq –	DNA polimerase termoestável
UF –	Unidade da Federação
ZNM –	Ziehl-Neelsen modificado

## LISTA DE SÍMBOLOS

% -	Porcentagem
® -	Marca registrada
°C -	Graus Célsius
µL -	Microlitros
min -	Minutos
mL -	Mililitros
pmol -	Picomolar
seg -	Segundos

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1 <i>Cryptosporidium</i> spp.....	16
2.1.1 Características.....	16
2.1.2 Distribuição.....	18
2.1.3 Estrutura e Ciclo Biológico.....	19
2.1.4 Patogenia e Manifestações Clínicas.....	20
2.1.5 Métodos de Diagnóstico .....	20
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	24
<b>3 PRODUÇÃO CIENTÍFICA</b> .....	28
<b>4 CAPÍTULO I – PREVALÊNCIA DE <i>Cryptosporidium</i> spp. EM AMOSTRAS FECAIS DE BOVINOS LEITEIROS E OS PRINCIPAIS FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À INFECÇÃO</b> .....	29
<b>5 CAPÍTULO II – COMPARAÇÃO DE PROTOCOLOS DE nPCR APLICADOS PARA O DIAGNÓSTICO DE <i>Cryptosporidium</i> spp. EM AMOSTRAS FECAIS DE BOVINOS</b> .....	46
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	65
<b>7 CONTRIBUIÇÕES</b> .....	65
<b>APÊNDICE 1 – QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO PROPRIEDADE</b> .....	67
<b>APÊNDICE 2 – QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO INDIVIDUAL</b> .....	69
<b>APÊNDICE 3 – INSTRUÇÕES AOS AUTORES</b> .....	70

## 1 INTRODUÇÃO

A produção de leite apresenta grande importância para o agronegócio, atualmente o Brasil é o terceiro maior produtor de leite do mundo (FAO, 2019) e os principais estados produtores são Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, São Paulo e Santa Catarina (IBGE, 2021).

A região Sul ganha destaque por ser considerada a maior produtora de leite do país. No Paraná, a região Oeste se destaca como a maior produtora do estado, nessa região as cidades de Cascavel, Toledo e Marechal Cândido Rondon, possuem uma grande importância, pois estão entre as 10 cidades com maior produção de leite do país (IBGE, 2018).

Diversos fatores podem colaborar para melhorar os índices zootécnicos na pecuária leiteira, algumas regiões concentram um maior nível de tecnificação e alta produção (ZOCCAL et al., 2008), contando com mão de obra e assistência qualificada, ordenhas mecanizadas, instalações, higiene e manejo geral adequados, água e alimento de qualidade (quantitativamente e qualitativamente), enquanto outras, ficam caracterizadas pela produção de subsistência com pequena produção diária de leite. Embora não exista um padrão de produção, a maioria das propriedades leiteiras do país desenvolvem a atividade familiar com pequena a média produção (ZOCCAL et al., 2008).

Apesar do Brasil ser considerado o terceiro maior produtor de leite do mundo, a produtividade por animal é baixa quando comparado com outros países (FAO, 2019). Diversos fatores podem causar impactos na produção de bovinos, entre eles estão as doenças gastrointestinais, estas podem ser decorrentes de diferentes causas, sendo infecciosas ou não infecciosas. Vários patógenos podem ocasionar distúrbios gastrointestinais, como os parasitas, vírus e bactérias (CRUVINEL et al., 2020), o que leva a prejuízos na produção, devido a diarreia, anorexia, redução na taxa de crescimento, queda na produção, alta morbidade e mortalidade, especialmente nos animais mais jovens (CRUVINEL et al., 2020; MOHTESHAMUDDIN et al., 2020).

Entre os principais agentes que causam afecções gastrointestinais nos bovinos estão os protozoários do gênero *Cryptosporidium* spp., que são considerados importantes agentes envolvidos na diarreia neonatal bovina (BERTONI, 2020), doença que causa grandes perdas nos rebanhos em todo o mundo (TAKIUCHI et al., 2006).

*Cryptosporidium* spp. frequentemente infecta os ruminantes e além de causar problemas para saúde animal e perdas econômicas na produção, esse protozoário é um problema de saúde pública devido ao elevado potencial zoonótico que apresenta (SANTIN, 2020). Diversos estudos demonstraram que o contato dos humanos com bovinos foi determinado como um fator de risco para aquisição da criptosporidiose (GOH et al., 2004; ROY et al., 2004).

Na região Oeste do estado do Paraná os únicos dados sobre a infecção por *Cryptosporidium* spp., em bovinos leiteiros, foram publicados por Dallagnol et al. (2021) e são referentes a um surto de diarreia neonatal bovina em uma unidade de criação de bezerros.

Visto a importância desse agente patogênico sobre a saúde e produção animal, o presente trabalho aborda as características do *Cryptosporidium* spp., ciclo biológico, patogenia, manifestações clínicas, métodos de diagnóstico disponíveis, prevalência e os principais fatores de risco associados à infecção na bovinocultura leiteira da região Oeste do Paraná.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Cryptosporidium* spp.

#### 2.1.1 Características

*Cryptosporidium* spp. é um protozoário do filo apicomplexa, por muito tempo foi considerado um coccídio, mas com base em análises genéticas passou por uma reclassificação, e hoje pertence a classe Gregarinomorpha e subclasse Cryptogregarina (CLODE et al., 2015). Esse protozoário foi relatado pela primeira vez em 1907 por Ernest Edward Tyzzer, que descreveu o achado de *C. muris* em glândulas gástricas de camundongos de laboratório (TYZZER, 1907). Após descrever o ciclo desse protozoário (TYZZER, 1910), Tyzzer (1912) identificou uma segunda espécie, *C. parvum*, porém essa afetava as vilosidades do intestino delgado de camundongos de laboratório e neste caso, constatou que o tamanho dos oocistos era menor.

Mesmo após a descoberta do *Cryptosporidium* spp. por muito tempo ele foi confundido com protozoários do gênero *Sarcocystis* spp., isto porque os oocistos de

*Sarcocystis* spp. possuem paredes delgadas que podem se romper, quando isso acontece os esporocistos ficam livres e em seu interior possuem quatro esporozoítos, assim como os oocistos de *Cryptosporidium* spp. (XIAO et al., 2004).

Ao longo do tempo várias espécies foram descritas e esses protozoários são capazes de infectar uma ampla gama de hospedeiros, como mamíferos, aves, répteis, peixes, anfíbios e inclusive, o homem (FAYER et al., 2010).

A importância veterinária para os bovinos surgiu na década de 1970, quando Panciera et al. (1971) descreveram o primeiro relato da doença com o diagnóstico comprovado por meio da histopatologia, que proporcionou a visualização de diferentes estágios do protozoário presentes especialmente sob o ápice das vilosidades intestinais. O *Cryptosporidium parvum* passou a ser reconhecido como um dos agentes mais importantes para a diarreia neonatal bovina, enfermidade que pode causar perdas econômicas decorrentes do retardo no crescimento dos animais, gastos com medicações e mortalidade, especialmente nos animais mais jovens, com até um mês de vida (SANTIN et al., 2008; OUAKLI et al., 2018).

Em humanos, os primeiros relatos surgiram em 1976 e a diarreia aquosa grave foi a principal manifestação clínica nas infecções (MEISEL et al., 1976; NIME et al., 1976). A doença ficou reconhecida como um problema de saúde pública por ser uma causa comum de diarreia aguda em pessoas imunocompetentes e/ou imunocomprometidas, especialmente os pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) que apresentam um quadro mais grave (não é autolimitante e dura mais tempo) (CURRENT et al., 2003). Em nível mundial, a maior parte das infecções em humanos são ocasionadas pelo *C. hominis* e *C. parvum* (XIAO e FENG, 2008). Os bovinos são considerados os principais reservatórios de espécies zoonóticas. *Cryptosporidium parvum* é um dos principais agentes que causam diarreia nessa espécie, em especial nos bezerros neonatais e, *C. hominis* já foi considerado como uma espécie restrita aos seres humanos, porém pesquisas mais recentes o identificaram em bovinos (sintomáticos e assintomáticos) (RAZAKANDRAINIBE et al., 2018).

### 2.1.2 Distribuição

*Cryptosporidium* spp. é um patógeno que apresenta distribuição global e a sua ocorrência varia de acordo com a amostragem, tamanho da população e métodos de diagnóstico empregados (SANTIN et al., 2020; WADE et al., 2000).

No Brasil, a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em bovinos varia de 1% a 87% (TABELA 1) e no estado do Paraná as taxas vão de 10% a 23% (CARDOSO et al., 2008; MUNIZ NETA et al., 2010; TOLEDO et al., 2017; HOLSBACK et al., 2018).

TABELA 1 - Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em bovinos de diversos estados do Brasil, de acordo com a técnica empregada para o diagnóstico e a faixa etária amostrada.

Referência	UF	Número de animais amostrados	Técnica	Faixa etária (meses)	% Positivos
Martins et al. (2020)	RS	45	Auramina e Kinyoun	bezerros	8,9
Holsback et al. (2018)	PR	64	nPCR (SSU)	0-36	23,4
Heckler et al. (2015)	MS	85	ZNM	0-24	63,5
Muniz Neta et al. (2010)	BA	156	ZNM	1- >12	87,2
Langoni et al (2004)	SP	203	ZNM	< 1	21,3
Cruvinel et al. (2020)	*	361	CS + verde de malaquita	< 1	51,5
Cardoso et al. (2008)	SP	849	CF com solução de sacarose	0-24	1
Toledo et al. (2017)	PR	937	ZNM	0-24	10,2

\*RS, PR, SC, RJ, SP, MG, GO e CE. CF: Centrífugo flutuação; CS: Centrífugo sedimentação; ZNM: Ziehl-Neelsen modificado.

Na região Oeste do estado do Paraná, escolhida para realização deste estudo, os únicos dados sobre a infecção por *Cryptosporidium* spp., em bovinos, foram publicados por Dallagnol et al. (2021) e são referentes a um surto de diarreia neonatal bovina em uma unidade de criação de bezerros.

Outra condição que interfere na ocorrência de *Cryptosporidium* spp. são os fatores de risco, que variam de acordo com a região e a propriedade estudada. Nos bovinos, os fatores de risco mais estudados são: idade, raça (puro vs mestiço), características macroscópicas das fezes, histórico de diarreia, colostragem, uso de substituto do leite, fonte de água, localização e tamanho da propriedade, tamanho do

rebanho, sistema de produção (familiar vs empresarial), sistema de criação, tipo de piso ou cama, tipo de comedouros/bebedouros, nível de higiene das instalações, uso de desinfetantes, uso de tratamento profilático/metafilático (halofuginona, enrofloxacino ou toltrazuril), presença de outros animais no mesmo ambiente, produção orgânica de leite, produção diária de leite, coinfeções, vacinação contra outros agentes que causam a diarreia neonatal bovina (de GRAAF et al., 1999; TOLEDO et al., 2017; DÍAZ et al., 2018; MANYAZEVAL et al., 2018; CRUVINEL et al., 2020).

### 2.1.3 Estrutura e Ciclo Biológico

*Cryptosporidium* spp. são protozoários intracelulares extracitoplasmáticos com um ciclo de vida monoxeno (hospedeiro único) (GHAZY et al. 2015). Os protozoários desse gênero são capazes de infectar uma ampla gama de hospedeiros, inclusive o homem (FAYER et al., 2010; XIAO et al., 2010).

O ciclo de vida possui apenas um estágio infeccioso, sendo iniciado com a ingestão dos oocistos esporulados por um hospedeiro susceptível (BOWMAN, 2010). Os oocistos esporulados possuem quatro esporozoítas em seu interior, mas nenhum esporocisto (BOWMAN, 2010). Devido a ação dos sais biliares e da tripsina os esporozoítos são liberados e penetram no epitélio intestinal ou gástrico, dependendo da espécie de *Cryptosporidium* envolvida e, evoluem para trofozoíto. A reprodução assexuada (esquizogonia ou merogonia) dá origem aos merontes do Tipo I e do Tipo II, que possuem merozoítos em seu interior, esses são liberados e reinvasam as microvilosidades intestinais, podendo se desenvolver em: trofozoíto, micro (gameta masculino) ou macrogametócito (gameta feminino). Posteriormente, ocorre a reprodução sexuada (gametogonia), gerando os zigotos que se transformam em oocistos (SANTIN, 2020).

Dois tipos de oocistos são formados: os de parede fina e os de parede grossa. Já esporulados (forma infectante), os oocistos de parede grossa são liberados nas fezes e os oocistos de parede fina se rompem e invadem novas células intestinais (fenômeno da autoinfecção) (PUMIPUNTU et al., 2018; SANTIN, 2020). Além dos oocistos de parede fina, os merontes do Tipo I também podem proporcionar a autoinfecção, ou seja, o *Cryptosporidium* spp. pode permanecer nos hospedeiros

mesmo sem infecções adicionais (proporcionadas pelo contato com oocistos exógenos) (de GRAAF et al., 1999).

A transmissão pela via fecal-oral pode ocorrer de forma direta entre os hospedeiros, de pessoa para pessoa (antroponose); pessoa para animal (zooantroponose); animal para pessoa (zoonose) e animal para animal (enzoose) (BOUZID et al. 2013). Na forma indireta, a infecção se dá por meio da ingestão de água, alimentos ou outros materiais contaminados (BOUZID et al. 2013).

#### 2.1.4 Patogenia e Manifestações Clínicas

As infecções por *Cryptosporidium* spp. podem ser assintomáticas ou ocasionar doenças gastrointestinais que variam de leves a graves (SANTIN et al., 2020). Os quadros de diarreia estão associados à má absorção resultante das alterações na mucosa intestinal, entre elas a atrofia das vilosidades intestinais, que podem ser observadas em graus variados, assim como o achatamento e a fusão dessas estruturas. A hiperplasia das criptas é outro achado importante e as lesões costumam se concentrar na região do íleo (SANTOS E ALESSI, 2016).

Há evidências de que as manifestações clínicas da criptosporidiose variam de acordo com a suscetibilidade do hospedeiro à infecção (BOUZID et al., 2013), as espécies infectantes, os genótipos e, até mesmo, os subtipos (SANTIN, 2013). Nos ruminantes, especialmente nos animais neonatos, a criptosporidiose é considerada uma importante doença, sendo caracterizada por ocasionar quadros agudos de diarreia aquosa e mortalidade (LI et al., 2019; SANTIN, 2013). Em cães, gatos e cavalos, já foram descritos quadros graves, entretanto, na maioria dos casos, as infecções nos animais de companhia são assintomáticas. Nas aves, as principais formas clínicas observadas envolvem os sistemas respiratório, intestinal e renal. A criptosporidiose é um problema sério nos répteis, pois as infecções são comuns, frequentemente crônicas e letais (SANTIN et al., 2013).

#### 2.1.5 Métodos de Diagnóstico

O diagnóstico da criptosporidiose pode ser realizado por meio de diversas técnicas, incluindo desde a detecção direta de oocistos pela microscopia até o imunodiagnóstico e as técnicas moleculares (GERACE et al., 2019).

Por décadas o exame microscópico foi o único método utilizado para detecção de *Cryptosporidium* spp. (SANTIN et al., 2020) e até hoje a identificação morfológica de oocistos de *Cryptosporidium* spp. por microscopia é o método mais utilizado para o diagnóstico, devido ao seu baixo custo, especialmente nos países em desenvolvimento, onde muitas vezes o acesso a equipamentos para realização de técnicas moleculares é limitado ou ausente (AHMED et al., 2018). Em contraste, nos países desenvolvidos o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. é realizado a partir do uso de diversas ferramentas diagnósticas, destinadas tanto a observar a morfologia do protozoário quanto a caracterizá-lo molecularmente ao nível de espécies, genótipos e subtipos (THOMPSON e ASH, 2016).

Os ensaios de imunofluorescência são muito utilizados como método de triagem em estudos epidemiológicos (THOMPSON e ASH, 2016; MAMMERI et al., 2019). Quando associados a anticorpos monoclonais, esses ensaios demonstraram bom desempenho na detecção dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais (ADEYEMO et al., 2018). Segundo Mirhashemi et al. (2015) a reação de imunofluorescência direta (IFD) apresentou bons níveis de especificidade em estudos realizados com fezes de bovinos e também já foi utilizada como padrão ouro para avaliar a sensibilidade e a especificidade de outros métodos utilizados para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

Os ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) também são empregados para o diagnóstico das infecções por *Cryptosporidium* spp. e a realização desse tipo de ensaio tem como vantagem ser rápido e de fácil execução (MIRHASHEMI et al., 2015). Uma variedade de kits comerciais está disponível para o uso em amostras de animais e humanos (AHMED et al., 2018), mas nem todos são capazes de identificar todas as espécies e genótipos de *Cryptosporidium* spp. (RYAN et al., 2016). Os níveis de sensibilidade e especificidade dessa técnica costumam variar bastante (SANTIN et al., 2020) e, outro fator importante é a possibilidade da ocorrência de resultados falsos positivos relatados em estudos anteriores (MIRHASHEMI et al., 2015).

Existe uma grande variação de espécies e genótipos dentro do gênero *Cryptosporidium*, que são identificáveis apenas com o auxílio de ferramentas moleculares, isso porque os oocistos do protozoário são morfológicamente indistinguíveis e não devem ser inequivocamente diferenciados pelas técnicas de coloração (AHMED et al., 2018). A utilização de técnicas moleculares proporcionou uma melhor compreensão da diversidade genética do *Cryptosporidium* spp., o que

contribuiu para conhecer melhor os seus padrões de transmissão, filogenia, potencial zoonótico, entre outros diversos impactos relacionados a saúde pública (THOMPSON e ASH, 2016).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) vem sendo cada vez mais empregada para o diagnóstico da criptosporidiose, pois esses ensaios apresentam bons níveis de sensibilidade (SANTIN et al., 2020). A PCR é uma ferramenta que apresenta bom desempenho para a genotipagem de *Cryptosporidium* spp. e oferece vantagens em relação a outros métodos disponíveis, como os métodos microscópicos e o imunodiagnóstico (AHMED et al., 2018). As amostras fecais albergam uma série de contaminantes que podem acabar dificultando a detecção do *Cryptosporidium* spp., desta forma para alcançar maiores níveis de sensibilidade e especificidade a nPCR é utilizada como ferramenta no diagnóstico do *Cryptosporidium* spp. (KOEHLER et al., 2017; MIRHASHEMI et al., 2015). Para a realização da nPCR são utilizados dois pares de primers (a primeira reação amplifica uma sequência fora do DNA alvo, que serve de molde para o segundo *round*) e a grande vantagem é que essa variação alcança maiores níveis de especificidade em relação a PCR convencional (AHMED et al., 2018).

A PCR e suas variações (Nested PCR, qPCR ou Multiplex PCR), tendo como alvo de amplificação o gene SSU, são as mais utilizadas para a identificação precisa das espécies de *Cryptosporidium* (XIAO & FENG, 2017). Embora a amplificação desse gene seja capaz de detectar todos os *Cryptosporidium* spp. e ser muito utilizada em levantamentos epidemiológicos, ainda são necessárias análises complementares para a caracterização de espécies e genótipos, por meio do sequenciamento genético (YILDIRIM et al., 2020). Um fator limitante a esse nível de identificação, quando utilizado a nPCR, é que nas infecções mistas a espécie/genótipo de *Cryptosporidium* predominante, tende a ser preferencialmente amplificada (CAMA et al., 2006).

O sequenciamento genético é muito utilizado para o diagnóstico e contribuiu para a caracterização de espécies e genótipos de *Cryptosporidium*. A partir da sequência parcial de SSU já foram caracterizadas, pelo menos, 34 espécies e 40 genótipos do protozoário (AHMED et al., 2018; KOEHLER et al., 2017). O sequenciamento fornece dados sobre o genoma que são altamente confiáveis, entretanto, essa técnica apresenta como desvantagens o alto custo, é relativamente demorada e exige procedimentos prévios ao sequenciamento direto do amplicon (AHMED et al., 2018).

Adquirir um número suficiente de oocistos purificados, a partir de amostras fecais, é um dos principais fatores que dificulta a análise do genoma de *Cryptosporidium* spp., mesmo quando utilizando técnicas de concentração de oocistos em amostras fecais de animais. Juntamente com esse processo ocorre a copurificação de bactérias e outros contaminantes que apresentam densidade flutuante semelhante ou que estão aderidas aos oocistos e que representam um grande obstáculo na obtenção do DNA com pureza e concentração adequadas para análise utilizando o sequenciamento genético (GUO et al., 2015).

Embora muitos dados não estejam inseridos na literatura, outro fator importante que dificulta o diagnóstico molecular é que alguns ensaios de PCR não alcançam uma alta especificidade quando utilizado DNA extraído de amostras fecais de animais, o que indica que alguns primers desenvolvidos não são completamente específicos para *Cryptosporidium* spp. Alguns autores observaram amplificação cruzada do gene SSU do DNA de outros microrganismos: *Acinetobacter* spp., *Colpodella* spp., *Adelina bambarooniae*, *Eimeria reichenowi*, *Gloeodinium montanum*, *Perkinsea* sp., *Placocistasp.*, *Chlorophytes*, *Chlorococcum vacuolatum*, *Colletotrichum aculatum*, *Monoraphidium minutum*, *dioflagelado* e *Baldinia anauniensis* (CANDEIAS et al., 2022; HUSSAIN et al., 2021; KOEHLER et al., 2017).

Na tentativa de obter um diagnóstico cada vez mais específico, as sequências do genoma do *Cryptosporidium* spp. vêm sendo estudadas para a identificação de novas regiões que sirvam como alvo para o desenvolvimento de novos primers. Embora esses estudos tenham apresentado bons resultados de especificidade e sensibilidade, é necessário reavaliar os resultados obtidos por meio desses ensaios, em especial quando forem utilizados em amostras de animais de diferentes espécies, bem como em diferentes regiões geográficas (KOEHLER et al., 2017).

## REFERÊNCIAS

- BERTONI, E.; ADURIZ, M.; BOK, M.; VEGA, C.; SAIF, L.; AGUIRRE, D.; CIMINO, R. O.; MIÑO, S.; PARREÑO, V. First report of group A rotavirus and bovine coronavirus associated with neonatal calf diarrhea in the northwest of Argentina. **Saúde Animal Tropical e Produção**, v. 52, n. 5, p. 2761-2768, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02293-8>.
- BOUZID, M., HUNTER, P. R., CHALMERS, R. M., & TYLER, K. M. *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. **Clinical microbiology reviews**, v. 26, n. 1, p. 115–134, 2013.
- BOWMAN, D. D. (2010). Diagnóstico parasitológico. In D. D. Bowman, *Parasitologia veterinária de Georgis* (9a ed., pp. 279-351). São Paulo: Saunders-Elsevier.
- CAMA, V. A.; GILMAN, A.; VIVAR, E.; TICONA, Y.; ORTEGA, C.; BERN, L.; XIAO, L. Mixed *Cryptosporidium* infections and HIV. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p.1025-1028, 2006.
- CARDOSO, J. M. S.; SILVEIRA, F. L.; ARAÚJO, A. J. U. S.; DE CARVALHO, J. C.C.; YOHKO KANAMURA, H. OCORRÊNCIA DE *Cryptosporidium* SPP. EM UM REBANHO BOVINO LEITEIRO NO MUNICÍPIO DE CAÇAPAVA, ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 239-242, 2008.
- CRUVINEL, L. B.; AYRES, H.; ZAPA, D.; NICARETTA, J. E.; COUTO, L.; HELLER, L. M.; BASTOS, T.; CRUZ, B. C.; SOARES, V. E.; TEIXEIRA, W. F.; DE OLIVEIRA, J. S.; FRITZEN, J. T.; ALFIERI, A. A.; FREIRE, R. L.; LOPES, W. Prevalence and risk factors for agents causing diarrhea (Coronavirus, Rotavírus, *Cryptosporidium* spp., *Eimeria* spp., and nematodes helminthes) according to age in dairy calves from Brazil. **Tropical animal health and production**, v. 52, n. 2, p. 777–791, 2020.
- Current, W. L.; Garcia, L. S. Cryptosporidiosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 4, n. 3, p. 325–358, 1991.
- CLODE, P. L.; KOH, W. H.; THOMPSON, R. C. A. Life without a host cell: what is *Cryptosporidium*? **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 614-624, 2015.
- DALL AGNOL, A. M.; LORENZETTI, E.; LEME, R. A.; LADEIA, W. A.; MAINARDI, R. M.; BERNARDI, A.; HEADLEY, S. A.; FREIRE, R. L.; PEREIRA, U. P.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Severe outbreak of bovine neonatal diarrhea in a dairy calf rearing unit with multifactorial etiology. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 2547-2553, 2021.
- DE GRAAF, D. C.; VANOPDENBOSCH, E.; ORTEGA-MORA, L. M.; ABBASSI, H.; PEETERS, JOHAN, E. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 8, p. 1269-1287, 1999.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO STAT - Livestock Primary. Roma, Italy, 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>. Acesso em: 24 abril de 2019.

GHAZY, A. A.; ABDEL-SHAFY, S.; SHAAPAN, R. M. Cryptosporidiosis in animals and man: 1. Taxonomic classification, life cycle, epidemiology and zoonotic importance. **Asian Journal of Epidemiology**, v. 8, n. 3, p. 48–63, 2015. <https://doi.org/10.3923/aje.2015.48.63>

GOH, S.; REACHER, M.; CASEMORE, D.P.; VERLANDER, N.Q.; CHALMERS, R.; KNOWLES, M.; WILLIAMS, J.; OSBORN, K.; RICHARDS, S. Criptosporidiose esporádica, North Cumbria, Inglaterra, 1996-2000. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 6, p. 1007-1015, 2004.

HECKLER, R. P.; BORGES, D. G. L.; BACHA, F. B.; ONIZUKA, M. K. V.; TERUYA, L. S.; NEVES, J. P. L.; LEAL, C. R. B.; LEMOS, R. A. A.; MEIRELES, M. V.; BORGES, F. A. First genetic identification of *Cryptosporidium parvum* subtype IIaA14G2R1in beef cattle in Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 121, n. 3, p. 391-394, 2015.

HOLSBACK, L.; LIMA, H. E. VIDOTTO, O.; da SILVA, M. A.; PATELLI, T. H. C.; MARTINS, F. D. C.; SEIXAS, M. *Cryptosporidium* occurrence in ruminants from the North Pioneer mesoregion of Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, n. 2, p. 248-253, 2018.

IBGE. Banco de dados Agregados. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/>. Acessado em: 31 de junho de 2020.

IBGE. Banco de dados Agregados. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/>. Acessado em: 31 de janeiro de 2022.

KOEHLER, A. V.; KORHONEN, P. K.; HALL, R. S.; YOUNG, N. D.; WANG, T.; HAYDON, S. R.; GASSER, R. B. Use of a bioinformatic-assisted primer design strategy to establish a new nested PCR-based method for *Cryptosporidium*. **Parasites Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2017.

Langoni, H.; LINHARES, A. C.; de AVILA, A. F.; da SILVA, A. V.; ELIAS, A. O. Contribution to the study of diarrhea etiology in neonate dairy calves in São Paulo state, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 5, p. 313-319, 2004.

LI, N.; WANG, R.; CAI, M.; JIANG, W.; FENG, Y.; XIAO, L. Outbreak of cryptosporidiosis due to *Cryptosporidium parvum* subtype IIaA19G1 in neonatal calves on a dairy farm in China. **International Journal for Parasitology**, v. 49, n. 7, p. 569-577, 2019.

MARTINS, N.; BACCEGA, B.; LEAL DA CUNHA, L.; NUNES DA SILVA, E.; COZZA DOS SANTOS, T.; MOSCARELLI PINTO, D. PREVALÊNCIA DE CRYPTOSPORIDIUM SPP. EM BEZERROS DE APTIDÃO LEITEIRA DA REGIÃO SUL DO RS. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 8, n. 4, 14 fev. 2020.

MEISEL, J. L.; PERERA, D. R.; MELIGRO, C; RUBIN, C. E. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. **Gastroenterology**. v.70, n. 6, p. 1156-1160, 1976.

MOHTESHAMUDDIN, K.; HAMDAN, L.; ALKAABI, A. B.; BARIGYE, R. *Cryptosporidium parvum* and other enteric pathogens in scouring neonatal dairy calves from the Al Ain region, United Arab Emirates, **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 21, p. 1-5, 2020.

NETA, E. DE S. M.; SAMPAIO, D. C.; GALVÃO, G. DA S.; MUNHOZ, A. D. *Cryptosporidium* OOCYSTS (APICOMPLEXA: CRIPTOSPORIDIIDAE) IN DAIRY CATTLE OF AN ENDEMIC AREA AT MICROREGION OF ILHEUS-ITABUNA IN THE STATE OF BAHIA, BRAZIL. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 32, n. 2, p. 75–78, 2010.

NIME, F. A.; BUREK, J. D.; PAGE, D. L.; HOLSCHER, M. A.; YARDLEY, J. H. Acute enterocolitis in a human being infected with protozoan *Cryptosporidium*. **Gastroenterology**, v. 70, n. 4, p. 592-598, 1976.

OUAKLI, N.; BELKHIRI, A.; DE LUCIO, A.; KÖSTER, P.C.; DJOUDI, M.; DADDA, A.; KHELEF, D.; KAIDI, R.; CARMENA, D. *Cryptosporidium*-associated diarrhoea in neonatal calves in Algeria. **Veterinary Parasitology Regional Studies and Reports**, v. 12, n. 1, p. 78-84, 2018.

PANCIERA, R. J.; THOMASSEN, R. W.; Gardner, F. M. Cryptosporidial infection in a calf. **Veterinary Pathology**. v. 8, n. 5/6, p. 479-484, 1971.

PUMIPUNTU, N.; PIRATAE, S. Criptosporidiose: Uma preocupação com doenças zoonóticas. **Veterinary world**, v. 11, n. 5, p. 681-686, 2018. Disponível em: <http://www.veterinaryworld.org/Vol.11/May-2018/16.html>. Acesso em: 20/11/2021. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.681-686>.

RAZAKANDRAINIBE R, DIAWARA EHI, COSTA D, LE GOFF L, LEMETEIL D, BALLETT JJ, GARGALA G, FAVENNEC L. Common occurrence of *Cryptosporidium hominis* in asymptomatic and symptomatic calves in France. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 3, e0006355, 2018.

ROY, S. L.; DELONG, S. M.; STENZEL, S. A.; SHIFERAW. B.; ROBERTS, J. M., KHALAKDINA, A.; MARCUS, R.; SEGLER, S. D.; SHAH, D.; THOMAS, S.; VUGIA, D. J.; ZANSKY, S. M.; DIETZ, V.; EBEACH, M. J. Fatores de risco para criptosporidiose esporádica entre pessoas imunocompetentes nos Estados Unidos de 1999 a 2001. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n. 7, p. 2944-2951, 2004.

SANTÍN, M.; TROUT, J. M. FAYER R. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. **Veterinary Parasitology**, v. 155, n. 1-2, p. 15-23, 2008.

SANTÍN, M. Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 61, n. 1, p. 1-10, 2013.

SANTIN, M. *Cryptosporidium* and *Giardia* in ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 36, n. 1, p. 223-238, 2020.

SANTOS, R. R.; ALESSI, A. C. (2016). Sistema Digestório. In SANTOS & ALESSI, *Patologia Veterinária* (2ª ed., pp. 160-307). Rio de Janeiro: Roca.

TAKIUCHI, E.; STIPP, D. T.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Improved detection of bovine coronavirus N gene in faeces of calves infected naturally by a semi-nested PCR assay and an internal control. **Journal of Virological Methods**, v. 131, n. 2, p. 148-154, 2006.

TYZZER, E. Esporozoário encontrado nas glândulas pépticas do camundongo comum. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 5, p. 12-13, 1907.

TYZZER, E. An extracellular Coccidium, *Cryptosporidium Muris* (Gen. Et Sp. Nov.), of the gastric Glands of the Common Mouse. **The Journal of Medical Research**, v. 23, n. 3, p. 487-510, 1910.

TYZZER, E. *Cryptosporidium parvum*, a coccidium found in the small intestine of the common mouse. **Archiv für Protistenkunde**, v. 26, p. 394-412, 1912.

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.

ZOCCAL, R.; CARNEIRO, A. V.; JUNQUEIRA, R.; ZAMAGNO, M. A. **A nova pecuária leiteira brasileira**. III Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite. Recife: CCS Gráfica e Editora, v. 1, p. 85-95, 2008.

### 3 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Este trabalho, será apresentado na forma de capítulos, sendo representado por artigos científicos, submetidos às revistas da área de acordo com o índice estabelecido pelo Qualis/Capes, assim definidos:

Capítulo I: “Prevalência de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bovinos leiteiros da região Oeste do estado do Paraná e os principais fatores de risco associados à infecção”. Artigo submetido para publicação na Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.

Capítulo II: “Comparação de protocolos de nPCR aplicados para o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bovinos”. Artigo que será submetido para publicação na Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.

**4 CAPÍTULO I – PREVALÊNCIA DE *Cryptosporidium* spp. EM AMOSTRAS FECAIS DE BOVINOS LEITEIROS E OS PRINCIPAIS FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À INFECÇÃO**

**Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in fecal samples from dairy cattle and main risk factors associated with infection**

**Prevalência de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bovinos leiteiros e os principais fatores de risco associados à infecção**

***Cryptosporidium* spp. and the main risk factors**

**Abstract**

*Cryptosporidium* spp. is known worldwide as a protozoan that causes diarrhea in animals, including cattle. The latter are important carriers of *Cryptosporidium* oocysts, which give rise to cryptosporidiosis, causing substantial economic losses in cattle breeding. The purpose of this study was to determine the prevalence of *Cryptosporidium* spp. — the main risk factors associated with the excretion of oocysts in fecal samples from dairy cattle — on farms in the western region of the state of Paraná, Brazil. To this end, 576 fecal samples from cattle up to 12 months old were collected from 65 farms. An epidemiological questionnaire was applied for each sample to ascertain risk factors. Samples were analyzed by light microscopy, nested PCR (nPCR), and DNA sequencing. Of the analyzed samples, 22% (128) showed a positive result in the microscopic analysis. Of those, 56 were amplified and sequenced, revealing the presence of *C. bovis* (14.5%), *C. muris* (1.8%), *C. parvum* (74.6%), and *C. ryanae* (9.1%). The main risk factors associated with infection were the age of the animals, the total area of the farm, the production system, and the number of animals in the herd.

**Keywords:** cattle, protozoan, oocysts, Paraná, diagnosis.

**Resumo**

*Cryptosporidium* spp. é reconhecido mundialmente por ocasionar diarreia nos animais, sendo os bovinos importantes reservatórios dos oocistos, fator que deve ser levado em consideração, já que a criptosporidiose pode ocasionar graves perdas econômicas na bovinocultura. O presente estudo teve como objetivo determinar a prevalência de *Cryptosporidium* spp. e os principais fatores de risco associados à excreção

de oocistos em amostras fecais de bovinos leiteiros provenientes de propriedades da região Oeste do estado do Paraná. Para isso, após o cálculo amostral, foram coletadas 576 amostras fecais de bovinos com até 12 meses de idade provenientes de 65 propriedades. Em todas elas um questionário epidemiológico foi aplicado para a verificação dos fatores de risco utilizando a regressão logística simples e multivariada. As amostras foram analisadas por meio de microscopia óptica, nested-PCR (nPCR) e sequenciamento do DNA. Das amostras analisadas, 22% (128) foram positivas na análise microscópica, dessas, 56 foram amplificadas e, por meio do sequenciamento, foi possível identificar *C. bovis* (14,5%), *C. muris* (1,8%), *C. parvum* (74,6%) e *C. ryanae* (9,1%). A idade dos animais, área total da propriedade, sistema de produção e quantidade de animais que compõem o rebanho foram os principais fatores de risco associados à infecção.

**Palavras-chave:** bovinocultura, protozoário, oocistos, Paraná, diagnóstico.

## Introdução

*Cryptosporidium* spp. é um protozoário do filo apicomplexa, por muito tempo foi considerado um coccídeo, mas com base em análises genéticas passou por uma reclassificação, e hoje pertence a classe Gregarinomorpha e subclasse Cryptogregarina (Clode et al., 2015). Esse protozoário foi relatado pela primeira vez em 1907 por Ernest Edward Tyzzer, que descreveu o achado de *C. muris* em glândulas gástricas de camundongos (Tyzzer, 1907). Ao longo do tempo várias espécies foram descritas como capazes de infectar uma ampla gama de hospedeiros como mamíferos, aves, répteis, peixes, anfíbios e o homem (Fayer et al., 2010).

A importância veterinária desse protozoário para os bovinos surgiu na década de 1970, quando Panciera et al. (1971) descreveram o primeiro relato da doença com o diagnóstico comprovado por meio da histopatologia das vilosidades intestinais. O *C. parvum* passou a ser reconhecido como um dos agentes mais importantes para a diarreia neonatal bovina, enfermidade que pode causar perdas econômicas decorrentes do retardo no crescimento dos animais, gastos com medicações e mortalidade, especialmente nos animais mais jovens (com até um mês de vida) (Ouakli et al., 2018).

No Paraná foram realizados estudos sobre a criptosporidiose em diversas espécies, como por Snak et al. (2015); Snak et al. (2017); Toledo et al. (2017); Holsback et al. (2018), entre outros, porém, nenhum deles investigou a prevalência no rebanho leiteiro da região Oeste do estado. Há somente um relato disponível referente à região: Dall Agnol

et al. (2021) abordaram um surto de diarreia neonatal bovina em uma unidade de criação de bezerros. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo determinar a prevalência de *Cryptosporidium* spp. e os principais fatores de risco associados à excreção de oocistos em amostras fecais de bovinos leiteiros provenientes de propriedades da região Oeste do estado do Paraná.

### **Material e métodos**

Este estudo está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, com protocolo número 39/2019.

Para a definição do tamanho da amostra, a Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (ADAPAR) forneceu o número de propriedades rurais de bovinocultura de cada cidade. O cálculo de amostragem foi posteriormente realizado utilizando o programa EpiInfo (versão 7.2.0.1). A prevalência esperada adotada foi de 23,4% (Holsback et al., 2018), erro máximo esperado de 5%, nível de confiança de 95% e DEFF (*Design Effect*) de 1,5, totalizando 411 animais. Após o cálculo amostral, foram coletadas diretamente da ampola retal de 576 animais com até 12 meses de idade, provenientes de 65 propriedades de quatro municípios da região Oeste do estado do Paraná: Cascavel, Marechal Cândido Rondon, Palotina e Toledo. Em todas as propriedades foi aplicado um questionário epidemiológico a fim de detectar os principais fatores de risco associados à infecção por *Cryptosporidium* spp.

As amostras colhidas foram analisadas micro e macroscopicamente, considerando o aspecto, volume, consistência e coloração. Para a análise microscópica utilizou-se a técnica de centrífugo sedimentação e os esfregaços foram corados pelo método de Ziehl-Neelsen modificado (ZNM) (Ortolani, 2000).

As amostras positivas no exame microscópico (exceto duas amostras que não apresentaram quantidade suficiente) foram submetidas à purificação e extração de DNA (126 amostras), conforme Osaki et al. (2013) para análise molecular por meio da técnica Nested-PCR (nPCR) de acordo com o protocolo estabelecido por Koehler et al. (2017).

Ao término da purificação foi adicionado 1mL de tampão de lise (ChargeSwitch®) em cada amostra. Estas foram submetidas a 15 ciclos de congelamento e descongelamento, como determinado por Osaki et al. (2013). As demais etapas da extração de DNA foram seguidas conforme o protocolo fornecido pelo fabricante do Kit

ChargeSwitch® gDNA Mini Tissue (Invitrogen), sendo o DNA eluído em 250µL de *Elution Buffer* (E5).

Para a realização da PCR e nPCR, a região LSU foi selecionada como a sequência alvo para a amplificação de DNA. Foram utilizados os iniciadores LSU2040F/LSU3020R (5'-CGAATAGCGTTATCTTTGCTATTT-3'/5'-GTCTTCCGCGAAGATCAG-3') e LSU20065F/LSU2557R (5'-TTACCATGGAAT(C/T)AGTTCAGC-3'/5'-AACACCATTTTCTGGCCATC-3'). As reações foram realizadas conforme o protocolo descrito por Koehler et al. (2017). Para visualização, as amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,6%. Como controle negativo foi utilizada água ultrapura autoclavada, e para os controles positivos amostras de *C. parvum* e *C. ryanae*, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Setor Palotina.

As amostras positivas na nPCR foram submetidas ao sequenciamento pelo método de Sanger, utilizando o equipamento automático AB 3500 Genetic Analyzer armado com capilares de 50cm e polímero POP7 (Applied Biosystems). Os DNA-moldes foram marcados utilizando 2,5pmol dos *primers* LSU20065F/LSU2557R e 0,5µL do reagente BigDye Terminator v3. 1 Cycle Sequencing Standart (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador LGC XP Cycler com uma etapa de desnaturação inicial a 96°C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96°C por 10 seg, 55°C por 5 seg e 60°C por 4 min. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas por meio de precipitação com isopropanol a 75% e lavagem com etanol a 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10µL de formamida Hi-Fi (Applied Biosystems), desnaturados a 95°C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando o programa Data Collection 2 (Applied Biosystems) com os parâmetros: Dye Set “Z”; Mobility File “KB\_3500\_POP7\_BDTv3.mob”; BioLIMS Project “3500\_Project1”; Run Module 1 “FastSeq50\_POP7\_50cm\_cfv\_100”; e Analysis Module 1 “BC- 3500SR\_Seq\_FASTA.saz”.

Os resultados encontrados e os dados do questionário epidemiológico foram analisados no software R versão 4.0.2 (The R Foundation for Statistical Computing). A variável resposta utilizada foi a presença (codificada = 1) e a ausência (codificada = 0) de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas amostras fecais de bovinos leiteiros.

A coleta dos dados foi dividida em duas etapas e todas as variáveis foram categorizadas. A primeira etapa compreendeu a análise de informações de cada animal

amostrado: idade (até 30 dias; 31-60; 61-90 dias; 91-120 ou >120 dias), raça (holandês, jersey, gir e mestiço), diarreia, presença de muco e/ou sangue nas fezes; ECF; coloração das fezes; e município (Cascavel, Marechal Cândido Rondon, Palotina ou Toledo). Na segunda etapa foram coletados os dados referentes à fazenda onde cada animal amostrado estava alocado, como área total da propriedade, sistema de criação, sistema de produção.

Os dados foram analisados por meio da técnica de regressão logística. Inicialmente os fatores foram testados por meio da análise de regressão logística simples (univariada) para verificar a sua associação com a variável resposta, as variáveis foram ordenadas por p-valor e aquela que apresentou menor p-valor foi incluída no modelo, as demais variáveis foram incluídas no modelo por meio da avaliação do p-valor da variável em conjunto das variáveis já presentes no modelo e o seu impacto avaliado através da análise de deviance (ANODEV) (p-valor < 0.05). A odds ratio (OR) e um nível de confiança de 95% (IC95%) foram calculados para cada fator presente no modelo final.

## Resultados

Com base na análise microscópica, a prevalência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. excretados por bovinos leiteiros da região Oeste do Paraná foi de 22% (128/576). Das 65 propriedades coletadas, 72% (47) possuíam pelo menos um animal excretando oocisto. A cidade de Marechal Cândido Rondon foi a que apresentou mais propriedades positivas com o percentual de 78% (14/18). Já os municípios de Toledo, Cascavel, e Palotina, apresentaram percentuais de 72% (13/18), 70% (16/23) e 67% (4/6), respectivamente.

Todas as amostras positivas na análise microscópica foram submetidas à nPCR, destas, 44,4% (56/126) apresentaram resultado positivo (Tabela 1).

Tabela 1 – Quantidade de animais positivos e negativos na detecção molecular de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bovinos leiteiros da região Oeste do Paraná por meio da técnica de nPCR.

Município	Animais		Propriedades	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Cascavel	14	23	11	12
Marechal Cândido Rondon	18	18	10	8
Palotina	3	2	2	4
Toledo	21	27	8	10

Total	56	70	31	34
-------	----	----	----	----

Todas as amostras positivas na nPCR foram encaminhadas para sequenciamento do material genético. As sequências de nucleotídeos foram depositadas no banco de dados GenBank sob os números de acesso: OL827540-OL827543 e OL848126-OL848137.

A análise da sequência do gene 28S rRNA (LSU) foi bem-sucedida em 98% (55/56) das amostras submetidas ao sequenciamento e possibilitou a identificação de quatro espécies do gênero *Cryptosporidium*, sendo estas *C. bovis* (14,5%), *C. muris* (1,8%), *C. parvum* (74,6%) e *C. ryanae* (9,1%) (Tabela 2).

Tabela 2 – Espécies de *Cryptosporidium*, de acordo com a idade de cada animal, identificadas a partir dos amplificadores do protocolo de nPCR que visa à amplificação parcial do gene 28S LSU rRNA por meio da análise comparativa em banco de dados.

Espécie	Idade					Total
	30	31-60	61-90	91-120	>120	
<i>C. parvum</i>	5	6	12	2	16	41
<i>C. bovis</i>	0	4	1	2	1	8
<i>C. ryanae</i>	2	1	1	1	0	5
<i>C. muris</i>	0	0	0	0	1	1

Na análise univariada, as variáveis com valor de  $P < 0,20$  são descritas na tabela 3. Foi encontrada uma forte associação da excreção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. entre as variáveis: idade do animal, coloração das fezes, higiene das instalações, colostragem, tipo de bezerreiro (individual vs coletivo), tipo de piso dos bezerreiros (ripado vs não ripado), sistema de produção, quantidade de animais e tamanho da propriedade.

Tabela 3 – Análise univariada dos fatores associados a excreção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bovinos leiteiros de 0 a 12 meses de idade provenientes de 65 propriedades leiteiras da região Oeste do Paraná.

Preditor	Nível	Positivo	Negativo	%	P-valor
Idade (dias)	0-30	17	96	15,04	0.01
	31-60	18	78	18,75	
	61-90	26	102	20,31	
	91-120	18	68	20,93	
	>120	49	104	32,03	
Raça	Puro	38	105	26,57	0.15

	Mestiço	90	343	20,79	
<b>Coloração das fezes</b>	Achocolatadas	10	45	18,18	0.003
	Normais	109	323	25,23	
	Outras	9	80	10,11	
	Cascavel	38	166	18,63	
<b>Município</b>	Marechal Cândido Rondon	37	99	27,21	0.18
	Palotina	5	29	14,71	
	Toledo	48	154	23,762	
	Intensivo	25	122	17,01	
<b>Sistema de Criação</b>	Semi-intensivo	103	326	24,01	0.07
	Até 50ha	109	409	21,04	0.002
<b>Tamanho da propriedade</b>	>50ha	19	44	30,16	
	<b>Quantidade de animais</b>	0-50	26	49	34,67
51-100		47	214	18,01	
>100		55	185	22,92	
Bom		57	226	20,14	
<b>Higiene das instalações</b>	Muito bom	18	92	16,36	0.02
	Ruim	53	130	28,96	
	Não	15	31	32,61	
<b>Uso de desinfetantes</b>	Sim	113	417	21,32	0.09
	Artificial	104	397	20,76	
<b>Colostragem</b>	Natural	24	51	32	0.04
	Coletivos	73	210	25,8	
<b>Bezerreiros</b>	Individuais	55	238	18,77	0.04
	Piso não ripado	81	233	25,8	
	Piso ripado	47	215	17,94	
	Coletivos	59	174	25,32	
<b>Bebedouros/comedouros</b>	Individuais	69	274	20,12	0.14
	Não	49	207	19,14	
<b>Contato com outros animais</b>	Sim	79	241	24,69	0.11

No presente estudo, as seguintes variáveis não apresentaram associação à eliminação de oocistos: diarreia, presença de muco e/ou sangue nas fezes, ECF, coloração das fezes, sistema de ordenha (manual ou mecanizado; balde ao pé ou canalizado), quantidade de fêmeas em lactação (até 50 ou >50 animais), produção diária de leite (até 200L; 201-1000 ou >1000L), assistência veterinária (cooperativa ou assistência técnica), instalações (alvenaria, madeira ou outros), fonte de água (parada ou corrente; poço, mina ou outro), vacinação de fêmeas gestantes contra agentes que causam a diarreia neonatal bovina, tratamento profilático e/ou metafilático, fornecimento de leite de descarte para os bezerros, colostragem até seis horas após o nascimento e histórico de diarreia na propriedade.

Os fatores de risco significativamente associados à excreção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. incluíram a idade dos animais, área total da propriedade, sistema de produção e quantidade de animais (Tabela 4).

Tabela 4 – Odds ratio (OR) e um IC 95% calculados para os fatores associados a excreção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bovinos leiteiros da região Oeste do Paraná.

Covariante	Nível	OR ajustado	95%CI	P-Valor
<b>Idade dos animais (dias)</b>	> 120 vs até 30	2.65	1.39-5.06	0,01
	> 120 vs 31-60	2.32	1.22-4.41	
	> 120 vs 61-90	2.22	1.25-3.97	
	> 120 vs 91-120	2.02	1.06-3.87	
	91-120 vs até 30	1.31	0.62-2.76	
	91-120 vs 31-60	1.15	0.54-2.45	
	61-90 vs 91-120	1.10	0.54-2.23	
	61-90 vs até 30	1.19	0.59-2.40	
	31-60 vs 61-90	1.04	0.53-2.06	
	31-60 vs até 30	1.14	0.54-2.43	
<b>Área total da propriedade (ha)</b>	Até 50 vs > 50	2	1.03-3.89	0,04
<b>Sistema de produção</b>	Familiar vs empresarial	2.73	1.61-4.62	0,0003
<b>Quantidade de animais</b>	> 100 vs até 50	1.06	1.12-3.73	0,003
	51-100 vs > 100	2.17	1.61-4.62	
	Até 50 vs 51-100	2.04	1.03-3.89	

## Discussão

A ocorrência de *Cryptosporidium* spp. é estudada praticamente no mundo todo, em especial nos rebanhos leiteiros (Kabir et al. 2020; Li et al., 2019; Manyazewal et al. 2018). Na região Oeste do Paraná, o único relato disponível aborda um surto de diarreia neonatal bovina em uma unidade de criação de bezerros, onde Dall Agnol et al. (2021) pesquisaram a diversidade dos agentes envolvidos, entre eles *Cryptosporidium* spp., que foi um dos agentes mais detectados nos bezerros infectados, *C. parvum* 62,5% (5/8) e *C. ryanae* 12,5% (1/8), especialmente associado a agentes virais (37,5% dos casos).

A análise microscópica realizada em nosso estudo revelou uma prevalência de 22% de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bovinos leiteiros da região Oeste do estado do Paraná. Poucos estudos realizados no estado abordaram a pesquisa de *Cryptosporidium* spp. em bovinos leiteiros. Toledo et al. (2017), identificaram uma prevalência menor de 10,2% na região Centro-Oeste do Paraná e Holsback et al. (2018), embora tenham avaliado um baixo número de amostras (64), observaram valores próximos aos nossos resultados (23,4%).

Prevalências mais elevadas (50,41% e 38,8%) foram encontradas quando os autores amostraram apenas animais de até 30 dias (Díaz et al., 2018; Cruvinel et al. 2019). Conforme Pacheco et al. (2020), a prevalência pode apresentar variações de acordo com a faixa etária dos animais amostrados; em geral, os estudos que utilizam bovinos com até seis meses de idade revelam prevalências mais altas, como no presente trabalho.

A infecção ocasionada por *Cryptosporidium* spp. em animais mais velhos geralmente é assintomática, entretanto, esses animais podem atuar como reservatórios e contaminar o ambiente, o que pode colaborar para a infecção dos bezerros mais jovens, e, caso esses animais se infectem, podem apresentar quadros graves de diarreia, desidratação e desequilíbrio hidroeletrólítico, podendo até mesmo evoluir para a morte (Li et al., 2019). Outro fator importante é que a eliminação de oocistos por animais adultos, mesmo que em baixas concentrações, representa um risco aos outros animais e deve ser considerada. Bovinos adultos produzem uma quantidade muito maior de conteúdo fecal quando comparados com os bezerros e o número de oocistos eliminados deve ser levado em consideração para a contaminação do ambiente (Shaw et al., 2021).

*C. parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni* e *C. ryanae* são as principais espécies que acometem bovinos (Ryan et al., 2014), e, recentemente, estudos comprovaram que esses animais podem também ser infectados por *C. hominis*, apesar da infecção ter sido

subestimada por muito tempo. Razakandrainibe et al. (2018) identificaram a espécie quando analisaram amostras de bezerros sintomáticos e assintomáticos, sendo que das 15 amostras positivas para a espécie, 13 eram provenientes de animais assintomáticos. Esses animais podem ser os principais reservatórios de espécies zoonóticas, portanto, é necessário atentar-se ao controle e prevenção da infecção, a fim de evitar a transmissão mútua entre os humanos e animais.

No presente estudo, o sequenciamento genético proporcionou a identificação de quatro espécies de *Cryptosporidium*, sendo que *C. parvum* foi a espécie mais prevalente (44/55), assim como observado em diversos estudos realizados com bovinos leiteiros: Díaz et al. (2018), Kabir et al. (2020), Shaw et al. (2021) e Toledo et al. (2017).

No município de Toledo, *C. parvum* foi identificado em 81% (17/21) das amostras e a faixa etária de 181 a 240 dias foi a única em que a espécie não foi identificada. Em seguida, o município de Marechal Cândido Rondon, em que 76,5% (13/17) das amostras analisadas foram identificadas como *C. parvum*, todas eram provenientes de animais com até 240 dias de idade. No município de Cascavel, *C. parvum* foi identificado em 71,4% (10/14) das amostras sequenciadas, sendo que 60% dessas amostras eram provenientes de animais com até 120 dias de idade e a faixa-etária de 241 a 300 dias foi a única em que a espécie não foi identificada em nenhuma das amostras. No município de Palotina, *C. parvum* foi identificado em apenas 33,3% (1/3) das amostras sequenciadas, proveniente de um animal pertencente a faixa etária de 61 a 120 dias de idade.

Robertson et al. (2014) evidenciam que até os dois meses de idade os animais são infectados principalmente por *C. parvum*, o que corrobora com os resultados observados em nosso estudo, onde 67,3% (37/55) das amostras sequenciadas foram identificadas como *C. parvum* em animais com idade até 120 dias. Valores próximos aos observados em nosso estudo foram encontrados por Toledo et al. (2017) no estado do Paraná, onde os autores identificaram *C. parvum* em 64,1% (41/64) das amostras analisadas. Em contraste com os nossos resultados, na região central do estado de São Paulo, Paz e Silva et al. (2013) encontraram *C. andersoni* como a espécie mais prevalente nas amostras analisadas (85,1%), porém os autores coletaram um baixo número de amostras nas diferentes faixas etárias de bezerros com até seis meses de idade, o que pode justificar a baixa frequência de infecção pelas espécies *C. parvum* e *C. bovis*. No entanto, apesar de estar entre uma das principais espécies encontradas em bovinos, *C. andersoni* não foi identificado em nenhuma das amostras analisadas em nosso estudo.

Como mencionado anteriormente, grande parte dos estudos apontam *C. parvum* como a espécie mais prevalente. De acordo com Wade et al. (2000), as diferenças na prevalência, entre outros fatores, podem ser atribuídas a amostragem, tamanho da população e métodos de diagnóstico empregados. Paz e Silva et al. (2013) detectaram apenas uma amostra positiva para *Cryptosporidium* spp. em animais com até 30 dias, sendo que os autores utilizaram apenas seis amostras dessa faixa-etária. Esse fator pode ter influenciado a baixa ocorrência de *C. parvum*, visto que, geralmente, essa é a principal espécie que afeta os bezerros com até 60 dias de idade.

Wade et al. (2000) afirmam que é mais provável que *C. muris* seja encontrado em animais com mais de seis meses de idade, em seu estudo os animais da faixa etária de seis a 24 meses de idade apresentaram 3,3 vezes mais chances de serem infectados por essa espécie, dado que corrobora o que foi observado em nosso estudo, pois, apesar de *C. muris* ter sido identificado em apenas uma amostra (1/55), essa era proveniente de um animal com 241 a 300 dias de idade, amostrado no município de Toledo.

*C. ryanae* foi identificado em amostras provenientes dos municípios de Cascavel e Marechal Cândido Rondon, encontrado em 14,3% (2/14) e 17,6% (3/17), respectivamente, em amostras de animais com até 60 dias 16,7% (3/18) e de 61 a 120 dias 10,5% (2/19). Tais achados corroboram com o que foi encontrado em um estudo longitudinal realizado por Shaw et al. (2021), quando analisaram amostras provenientes de coletas seriadas de 38 bezerros leiteiros, desde o nascimento até a sexta semana de idade. Os autores identificaram que *C. ryanae* foi detectado a partir da terceira semana de idade.

De acordo com o padrão de infecção relacionado à espécie de *Cryptosporidium* e a idade do hospedeiro, Robertson et al. (2014) evidenciaram que *C. bovis* é encontrado especialmente nos bezerros desmamados e adultos jovens. Em nosso estudo, das 55 amostras sequenciadas, oito (14,6%) foram identificadas como *C. bovis*, sendo quatro provenientes de animais com até 60 dias (duas de Cascavel, uma de Marechal Cândido Rondon e uma de Toledo), três amostras de 61 a 120 dias (duas de Toledo e uma de Palotina), apenas uma amostra de 181 a 240 (Palotina) e nenhuma amostra identificada como *C. bovis* proveniente de animais com idade superior a 240 dias. Nossos resultados divergem do que foi encontrado por Toledo et al. (2017), que identificaram um animal com idade superior a 24 meses positivo para a espécie e uma prevalência menor de 6,3% (4/64) para *C. bovis*.

A análise multivariada de nossos dados revelou alguns fatores de risco para a infecção por *Cryptosporidium* spp. em bovinos leiteiros da região Oeste do Paraná. O risco de infecção foi significativamente maior nas propriedades em que os rebanhos eram compostos por até 100 animais. As explorações com rebanho de até 50 animais apresentaram 2,04 vezes mais chances de estes eliminarem oocistos do protozoário, assim como os rebanhos com 51 a 100 animais apresentaram 2,16 vezes mais chances de eliminarem os oocistos do protozoário em comparação aos rebanhos compostos por mais de 100 animais. Resultados semelhantes foram encontrados por Manyazewal et al. (2018), onde os rebanhos compostos por menos de 30 animais e de 31 a 100 animais apresentaram, respectivamente, 2,93 e 6,99 vezes mais chances de estarem infectados e conseqüentemente, de eliminarem os oocistos de *Cryptosporidium* spp. Esses dados divergem dos estudos realizados anteriormente, como observado por Inpankaew et al. (2014), os quais relataram maior risco de infecção em rebanhos maiores. De acordo com Manyazewal et al. (2018), um melhor manejo sanitário pode ser observado em fazendas maiores, administradas por profissionais capacitados, quando comparadas com propriedades de pequeno e médio porte, administradas somente pelos proprietários ou funcionários sem capacitação adequada, e esse fator pode ser considerado como a razão para esse achado. Esse mesmo argumento pode justificar a associação entre o sistema de produção familiar e a infecção por *Cryptosporidium* spp. Os animais do sistema de produção familiar (80/292) apresentaram 2,7 vezes mais chances de estarem eliminando oocistos de *Cryptosporidium* spp., quando comparados com o sistema de produção empresarial (48/294). A maioria das propriedades, onde foram amostrados os animais, possuíam perfil familiar e com uma área total de até 50ha. Assim como o sistema de produção, no presente estudo o tamanho das propriedades também foi estatisticamente significativo, já que nas propriedades de até 50ha, a chance de os animais eliminarem oocistos nas fezes foi duas vezes maior.

Grande parte dos trabalhos disponíveis para consulta demonstram que a infecção por *Cryptosporidium* spp. foi determinada principalmente pela idade, entre eles, Toledo et al. (2017) identificaram que a faixa etária mais acometida foi a dos animais com até 60 dias com 25,3% (37/146) das amostras positivas, sendo que esses animais apresentaram 4,29 vezes mais chances de serem positivos. O mesmo foi observado por Díaz et al. (2018), entretanto, a amostragem dos autores constituiu-se apenas de animais com menos de 35 dias de idade. A partir desta amostragem identificaram que a faixa etária de um a sete dias apresentou maior probabilidade de infecção, com 1,6 a 4,6 vezes mais chances

de serem positivos para o protozoário, quando comparados com as outras faixas etárias (sete-14 dias; 14-21 dias; >21 dias).

Em nosso estudo, a idade dos animais foi estatisticamente associada à eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. ( $p=0,01$ ), entretanto, a faixa etária mais acometida diverge das que foram observadas pelos outros autores. A análise de nossos dados revelou que os animais com idade igual ou superior a 121 dias apresentaram de 2 a 2,6 vezes mais chances de serem positivos para *Cryptosporidium* spp. quando comparados com as outras faixas etárias. Em contraste, Manyazewal et al. (2018) não observaram diferença significativa em relação à idade ( $p=0,749$ ) quando avaliaram animais com menos de 60 dias, 61 a 180 e acima de 181 dias, sendo que em seu estudo os principais fatores de risco foram associados especialmente às condições higiênicas e ao manejo dos animais.

### Conclusão

A infecção por *Cryptosporidium* spp. está amplamente distribuída na população bovina da região Oeste do estado do Paraná. A idade dos animais, área total da propriedade, sistema de produção e quantidade de animais que compõem o rebanho foram os principais fatores de risco associados à excreção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. Apesar de *C. parvum* ter sido a espécie mais prevalente nas amostras analisadas, *C. bovis*, *C. ryanae* e *C. muris* também foram detectados. A conscientização sobre os principais fatores de risco identificados nos rebanhos da região, as espécies circulantes, assim como as fontes de infecção e meios de transmissão, são fundamentais e devem ser considerados para aplicação das práticas de prevenção e controle da doença nos bovinos e humanos.

### Referências

Clode PL, Koh WH, Thompson RCA. Life without a host cell: what is *Cryptosporidium*? *Trends Parasitol* 2015; 31(12): 614-624. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2015.08.005>.

Cruvinel LB, Ayres H, Zapa DMB, Nicaretta JE, Couto LFM, Heller LM et al. Prevalence and risk factors for agents causing diarrhea (Coronavírus, Rotavírus, *Cryptosporidium* spp., *Eimeria* spp., and nematodes helminthes) according to age in dairy calves from Brazil. *Trop Anim Health Prod* 2020; 52 (2), 777–791. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-02069-9>.

Dall Agnol AM, Lorenzetti E, Leme RA, Ladeia WA, Mainardi RM, Bernardi A et al. Severe outbreak of bovine neonatal diarrhea in a dairy calf rearing unit with multifactorial etiology. *Braz J Microbiol* 2021; 9:1–7. doi: 10.1007/s42770-021-00565-5.

Díaz P, Varcasia A, Pipia AP, Tamponi C, Sanna G, Prieto A et al. Molecular characterisation and risk factor analysis of *Cryptosporidium* spp. in calves from Italy. *Parasitol Res* 2018; 117(10):3081-3090. doi: 10.1007/s00436-018-6000-x.

Fayer R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp Parasitol* 2010; 124(1): 90-7. doi: 10.1016/j.exppara.2009.03.005.

Holsback L, Lima HE, Vidotto O, Silva MA, Patelli THC, Martins FDC et al. *Cryptosporidium* occurrence in ruminants from the North Pioneer mesoregion of Paraná, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2018; 27 (02): 248-253. [https://doi: 10.1590/S1984-296120180037](https://doi.org/10.1590/S1984-296120180037).

Inpankaew T, Jiyipong T, Wongpanit K, Pinyopanuwat N, Chimnoi W, Kengradomkij C. et al. Molecular detection of *Cryptosporidium* spp. infections in water buffaloes from northeast Thailand. *Trop Anim Health Prod* 2014; 46(2): 487–490. <https://doi.org/10.1007/s11250-013-0499-8>.

Kabir MHB, Itoh M, Shehata AA, Bando H, Fukuda Y, Murakoshi F et al. Distribution of *Cryptosporidium* species isolated from diarrhoeic calves in Japan. *Parasitol Int* 2020; 78: 102153. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2020.102153>.

Koehler AV, Korhonen PK, Hall RS, Young ND, Wang T, Haydon SR et al. Use of a bioinformatic-assisted primer design strategy to establish a new nested PCR-based method for *Cryptosporidium*. *Parasites Vectors* 2017; 10(1): 1-8. doi: 10.1186/s13071-017-2462-4.

Li N, Wang R, Cai M, Jiang W, Feng Y, Xiao L. Outbreak of cryptosporidiosis due to *Cryptosporidium parvum* subtype IIdA19G1 in neonatal calves on a dairy farm in China. *Int J Parasitol* 2019; 49(7): 569-577. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.02.006>.

Manyazewal, A.; Francesca, S.; Pal, M.; Gezahegn, M.; Tesfaye, M.; Lucy, M. et al. Prevalence, risk factors and molecular characterization of *Cryptosporidium* infection in

cattle in Addis Ababa and its environs, Ethiopia. *Vet Parasitol Reg Stud Reports* 2018; 13: 79-84. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.03.005>.

Ortolani EL. Standardization of the modified ziehl-neelsen technique to stain oocysts of *Cryptosporidium* sp. *Rev Bras Parasitol Vet* 2000; 9(1): 29-31.

Osaki SC, Soccol VT, Costa AO, Oliveira-Silva MB, Pereira JT, Procópio AE. Polymerase chain reaction and nested-PCR approaches for detecting *Cryptosporidium* in water catchments of water treatment plants in Curitiba, State of Paraná, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2013; 46(3): 270-276. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0053-2013>.

Paz e Silva FM, Lopes RS, Araújo-Junior JP. Identification of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy cattle in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2013; 22(1): 22-28. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612013005000010>

Ouakli N, Belkhiri A, de Lucio A, Köster PC, Djoudi M, Dadda A et al. *Cryptosporidium*-associated diarrhoea in neonatal calves in Algeria. *Vet Parasitol Reg Stud Reports* 2018; 12: 78-84. doi: 10.1016/j.vprsr.2018.02.005.

Pacheco TA, Martins FDC, Almeida SLH, Semedo TBF, Watanabe MI, Dutra V et al. Molecular survey of *Cryptosporidium* spp. in calves from the state of Mato Grosso, Brazil. *Semina: Ciênc Agrár* 2020; 41(5). <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2020v41n5sup1p2437>.

Pancieria, R. J.; Thomassen, R. W.; Gardner, F. M. Cryptosporidial infection in a calf. *Vet Pathol* 1971; 8 (5/6): 479-484.

Razakandrainibe R, Diawara EHI, Costa D, Le Goff L, Lemeteil D, Ballet JJ et al. Common occurrence of *Cryptosporidium hominis* in asymptomatic and symptomatic calves in France. *PLoS ONE* 2018; 12 (3), e0006355. doi: 10.1371/journal.pntd.0006355.

Robertson LJ, Björkman C, Axén C, Fayer R. Cryptosporidiosis in Farmed Animals. *Cryptosporidium: parasite and disease* 2013;149-235. doi:10.1007/978-3-7091-1562-6\_4.

Ryan U, Fayer R, Xiao L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitol* (2014); 141(13), 1667–1685. doi:10.1017/s0031182014001085.

Shaw HJ, Armstrong C, Uttley K, Morrison LJ, Innes EA, Katzer F. Genetic diversity and shedding profiles for *Cryptosporidium parvum* in adult cattle and their calves. *Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases* 2021; 1: 100027. <https://doi.org/10.1016/j.crpvbd.2021.100027>.

Snak A, Smiderle FR, Fernandes NLM, Lara AA, Garcia FG, Ogawa L, et al. Ocorrência e caracterização molecular de *Cryptosporidium* sp. em ovelhas. *Semina: Ciênc Agrár* 2017; 38 (4): 1917-1924. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n4p1917>.

Snak A, Garcia FG, Delgado LES, Osaki SC. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em animais silvestres residentes no parque da cidade de Cascavel, Paraná, Brasil. *Semina: Ciênc Agrár* 2015; 36 (6): 4323-4332. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n6Supl2p4323>.

Toledo RS, Martins FDC, Ferreira FP, de Almeida JC, Ogawa L, Santos HLEPL et al. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in feces and water and the associated exposure factors on dairy farms. *PLoS ONE* 2017; 12(4): e0175311. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175311>.

Tyzzar, E. Esporozoário encontrado nas glândulas pépticas do camundongo comum. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1907; 5: 12 -13.

Wade SE, Mohammed HO, Schaaf SL. Prevalence of *Giardia* sp., *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium muris* (*C. andersoni*) in 109 dairy herds in five counties of southeastern New York. *Vet Parasitol* 2000; 93 (1): 1-11. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00337-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00337-X).

**5 CAPÍTULO II – COMPARAÇÃO DE PROTOCOLOS DE nPCR APLICADOS PARA O DIAGNÓSTICO DE *Cryptosporidium* spp. EM AMOSTRAS FECAIS DE BOVINOS**

**Comparison of nPCR protocols applied for the diagnosis of *Cryptosporidium* spp.  
in bovine faecal samples**

**Comparação de protocolos de nPCR aplicados para o diagnóstico de  
*Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bovinos**

**nPCR protocols for detection of *Cryptosporidium* spp.**

**Abstract**

Cattle are considered to be the main reservoirs for some species of *Cryptosporidium* spp. and monitoring these animals based on faecal samples is fundamental to manage the risk of transmission of cryptosporidiosis to other animals and humans. As there is no consensus for the gold standard of diagnosis, advances in molecular techniques have provided improvements for investigation of the pathogen. Several polymerase chain reaction (PCR) assays are used for this purpose, however, not all of them provide specific amplification, which has been making it difficult to identify the species and genotypes of *Cryptosporidium* spp. This study aimed to compare nPCR protocols for the amplification of the SSU (*small subunit of nuclear ribosomal RNA gene*) and LSU (*Large subunit of nuclear ribosomal RNA gene*) gene for the diagnosis of *Cryptosporidium* spp. in faecal samples from dairy cattle in the Western Region of Paraná state, Brazil and characterize the *Cryptosporidium* species by means of DNA sequencing, comparative database analysis and phylogenetic analysis. The molecular analysis revealed that 65.9% (83/126) of the analyzed samples were positive, and the amplification rate varied according to the protocol used. The amplification rate was 60.32% (76/126) for the protocol aimed at the amplification of the 18S gene locus and 44.44% (56/126) for the protocol aimed at the 28S gene locus. The primers used in the protocol that aims the amplification of a segment of the 18S gene presented lower specificity, and 23 amplified samples presented high similarity to other microorganisms. The comparative analysis provided the identification of four species in each protocol and through phylogenetic analysis, the partial sequences obtained by the amplification of the 18S gene segment provided greater differentiation among species of *Cryptosporidium*, while the sequences obtained by the protocol that aims at the 28S gene locus provided the identification of *Cryptosporidium* only at the genus level.

**Keywords:** criptosporidiosis, molecular analysis, primers, protozoa, dairy farming.

### Resumo

Os bovinos são considerados os principais reservatórios para algumas espécies de *Cryptosporidium* spp. e o monitoramento desses animais a partir de amostras fecais é fundamental para gerenciar o risco da transmissão da criptosporidiose para outros animais e o homem. Como não há um consenso para o padrão ouro do diagnóstico, os avanços nas técnicas moleculares proporcionaram melhorias para investigação do patógeno. Diversos ensaios de reação em cadeia da polimerase (PCR) são utilizados para este fim, entretanto, nem todos proporcionam uma amplificação específica, o que vem dificultando a identificação das espécies e genótipos de *Cryptosporidium* spp. Este trabalho teve como objetivo comparar protocolos de nPCR visando à amplificação do gene SSU (*small subunit of nuclear ribosomal RNA gene*) e LSU (*Large subunit of nuclear ribosomal RNA gene*) para o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bovinos leiteiros da região Oeste do estado do Paraná, Brasil e caracterizar as espécies de *Cryptosporidium* por meio do sequenciamento do DNA, análise comparativa em banco de dados e análise filogenética. A análise molecular revelou que 65,9% (83/126) das amostras analisadas apresentaram resultado positivo, sendo que a taxa de amplificação variou conforme o protocolo utilizado. Pelo protocolo que visa a amplificação do locus do gene 18S a taxa de amplificação foi de 60,32% (76/126) e 44,44% (56/126) pelo protocolo que visa o locus do gene 28S. Os primers utilizados no protocolo que visa à amplificação de um segmento do gene 18S apresentaram menor especificidade, sendo que 23 amostras amplificadas apresentaram alta similaridade para outros micro-organismos. A análise comparativa proporcionou a identificação de quatro espécies em cada protocolo e por meio da análise filogenética, as sequências parciais obtidas pela amplificação de segmento do gene 18S proporcionou maior diferenciação entre as espécies de *Cryptosporidium*, enquanto as sequências obtidas pelo protocolo que visa o locus do gene 28S proporcionou a identificação de *Cryptosporidium* apenas a nível de gênero.

**Palavras-chave:** criptosporidiose, análise molecular, primers, protozoário, pecuária leiteira.

## Introdução

A utilização de técnicas moleculares proporcionou uma melhor compreensão da diversidade genética do *Cryptosporidium* spp., o que contribuiu para conhecer melhor os seus padrões de transmissão, filogenia, potencial zoonótico, entre outros diversos impactos relacionados a saúde pública (Thompson & Ash, 2016).

O diagnóstico da criptosporidiose pode ser realizado utilizando diversas técnicas, incluindo desde a detecção direta de oocistos por meio da microscopia até o imunodiagnóstico e as técnicas moleculares (Gerace et al., 2019).

A PCR e suas variações, tendo como alvo de amplificação o gene SSU, é a mais utilizada para a identificação precisa das espécies de *Cryptosporidium* (Xiao & Feng, 2017). Embora a amplificação desse gene seja capaz de detectar todos os *Cryptosporidium* spp. e ser muito utilizada em levantamentos epidemiológicos, ainda há a necessidade do sequenciamento genético para a determinação das espécies envolvidas (Yildirim et al., 2020).

Entre os genes disponíveis para identificação de protozoários está o *small subunit ribosomal* (SSU), sendo este o mais comumente utilizado para a caracterização de espécies de *Cryptosporidium* por alcançar maior sucesso nas amplificações por ser um gene de múltiplas cópias quando comparado a genes de cópias únicas (Thompson e Ash, 2016).

Embora muitos dados não estejam inseridos na literatura, alguns ensaios de PCR não alcançam uma alta taxa de especificidade quando utilizado DNA extraído das amostras fecais dos animais, demonstrando que alguns primers, podem não ser específicos para *Cryptosporidium* spp. Koehler et al. (2017) observaram amplificação cruzada do gene SSU do DNA de outros microrganismos do Filo Apicomplexa, empregando primers originalmente projetados para *Cryptosporidium* spp. No mesmo estudo, os autores utilizaram a bioinformática como ferramenta para explorar as sequências do genoma de *Cryptosporidium* spp. e identificaram uma nova região de múltiplas cópias como alvo para o desenvolvimento de um novo primer que apresentou bons resultados de especificidade e sensibilidade. Desta forma, este trabalho teve como objetivo comparar protocolos de nPCR que visam a amplificação do gene 18S SSU rRNA e 28S LSU rRNA para o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bovinos leiteiros da região Oeste do estado do Paraná.

## Material e métodos

### *Comitê de ética em experimentação animal*

Este estudo está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, com protocolo número 39/2019.

### *Amostras*

Foram selecionadas 126 amostras de bovinos com resultado positivo para a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. por meio de análise microscópica. As amostras foram coletadas diretamente da ampola retal de bovinos com até 12 meses de idade, provenientes de 47 propriedades leiteiras de quatro municípios da região Oeste do estado do Paraná, Brasil, sendo estes Cascavel, Marechal Cândido Rondon, Palotina e Toledo.

### *Análise microscópica*

Para a análise microscópica foram confeccionadas lâminas com o conteúdo resultante da centrífugo sedimentação coradas pelo método de Ziehl-Neelsen modificado (Ortolani, 2000). As lâminas foram examinadas em microscópio de luz com aumento de 1000x. As amostras positivas ainda foram classificadas semiquantitativamente de acordo com o número de oocistos identificados

### *Purificação e extração de DNA*

As amostras, positivas na microscopia foram submetidas à purificação e extração de DNA. Ao término da purificação foi adicionado 1mL de tampão de lise (ChargeSwitch®) em cada amostra e submetidas à 15 ciclos de congelamento e descongelamento, como determinado por Osaki et al. (2013). As demais etapas da extração de DNA foram seguidas conforme o protocolo fornecido pelo fabricante do Kit ChargeSwitch® gDNA Mini Tissue (Invitrogen), sendo o DNA eluído em 250µL de *Elution Buffer*. Após a preparação, 126 amostras foram submetidas a análise molecular,

comparando-se dois protocolos de nested-PCR, a fim de testar a especificidade e a capacidade de amplificação dos iniciadores de cada protocolo.

*nPCR - Large subunit of nuclear ribosomal RNA gene (LSU)*

Para a realização da PCR e nPCR com a região 28S LSU rRNA selecionada como a sequência alvo foram utilizados os iniciadores LSU2040F/LSU3020R (5'-CGAATAGCGTTA TCTTTGCTATTT-3'/5'-GTCTTCCGCGAAGATCAG-3') e LSU20065F/LSU2557R (5'-TTACCATGGAAT(C/T)AGTTCAGC-3'/5'-AACACCATTTTCTGGCCATC-3') com fragmento esperado de ~500 pb (Koehler et al., 2017). As reações foram realizadas com o volume final de 50µL contendo Taq Pol Master Mix 2X Green (Cellco®), 50pmol de cada iniciador e 2µL de DNA genômico. Na PCR (primeira reação) as amostras foram submetidas as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, 35 ciclos a 94 °C por 30 seg (desnaturação) / 58 °C por 30 seg (anelamento) / 72 °C por 50 seg (extensão) e extensão final a 72 °C por 5 min. Para a nPCR (segunda reação) foi adicionado 1µL do material amplificado na PCR e as condições de tempo e temperatura foram semelhantes, exceto o tempo da extensão, o qual foi alterado para 30 seg. (Koehler et al., 2017).

*nPCR - Small subunit ribosomal RNA gene (SSU)*

Para a realização da PCR e nPCR com a região 18 SSU rRNA selecionada como sequência alvo para amplificação de DNA, foram utilizados os iniciadores 18SiCF2/18SiCR2 (5'-GACATATCATTCAAGTTTCTGACC-3'/5'-CTGAAGGAGTAAGGAACAACC-3') e 18SiCF1/18SiCR1 (5'-CCTATCAGCTTTAGACGGTAGG-3'/5'-TCTAAGAATTTACCTCTGACTG-3') com fragmento esperado de ~587 pb (Ryan et al., 2003). As reações foram realizadas com o volume final de 25µL contendo Taq Pol Master Mix 2X Green (Cellco®), 12,5pmol de cada iniciador e 2µL de DNA genômico. Na PCR as amostras foram submetidas as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, 45 ciclos a 94 °C por 30 seg (desnaturação) / 58 °C por 30 seg (anelamento) / 72 °C por 30 seg (extensão) e extensão final a 72 °C por 10 min (Ryan et al., 2003). Para a nPCR foi adicionado 1µL do material amplificado na PCR e as condições de tempo e temperatura foram iguais.

Em ambos protocolos foram usados como controle negativo a água ultrapura autoclavada e para os controles positivos amostras de *C. parvum* e *C. ryanae*, cedidas pelo Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Setor Palotina. Para visualização, as amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,6%.

#### *Sequenciamento e análise filogenética do gene 18S rRNA SSU e 28S rRNA LSU*

Para o sequenciamento foram selecionadas todas as amostras positivas na nPCR (SSU e LSU). Foi utilizado o sequenciador automático AB 3500 Genetic Analyzer armado com capilares de 50cm e polímero POP7 (Applied Biosystems). Os DNA-moldes foram marcados utilizando-se 2,5pmol dos *primers* LSU20065F / LSU2557R e 0,5µL do reagente BigDye Terminator v3. 1 Cycle Sequencing Standart (Applied Biosystems) em um volume final de 10µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador LGC XP Cyler com uma etapa de desnaturação inicial a 96°C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96°C por 10 seg, 55°C por 5 seg e 60°C por 4min. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol a 75% e lavagem com etanol a 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10µL de formamida Hi-Fi (Applied Biosystems), desnaturados a 95°C por 5min, resfriados em gelo por 5min e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa Data Collection 2 (Applied Biosystems) com os parâmetros Dye Set “Z”; Mobility File “KB\_3500\_POP7\_BDTv3.mob”; BioLIMS Project “3500\_Project1”; Run Module 1 “FastSeq50\_POP7\_50cm\_cfv\_100”; e Analysis Module 1 “BC- 3500SR\_Seq\_FASTA.saz”.

As sequências foram montadas e avaliadas através do software Bionumerics 7.6 (Applied Math), sendo escolhidas 43 sequências do gene SSU e 36 sequências do gene LSU. Para realização do alinhamento, determinação do modelo de substituição e construção da árvore filogenética, foi utilizado o pacote de programas Phylosuit. Para obtenção do alinhamento foi utilizado o programa MAFFT e as árvores filogenéticas foram construídas pelo método de Inferência Bayesiana utilizando o programa Mr. Bayes. As árvores filogenéticas foram visualizadas e exportadas como arquivos SVG através do programa FIGTREE.

## Resultados

### *Análise microscópica*

A análise semiquantitativa das amostras revelou um número variando entre 1 e 30 oocistos por lâmina, sendo apenas uma das amostras com 30 oocistos e a grande maioria (cerca de 51%) com apenas um oocisto (Figura 1).

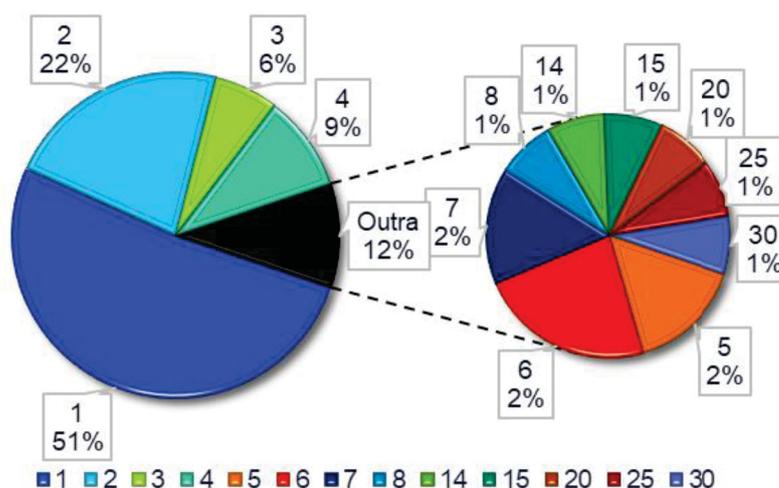


Figura 1 – Análise semiquantitativa das lâminas coradas pelo método de Ziehl-Neelsen modificado.

### *Comparação dos protocolos de nPCR visando o locus dos genes 18S SSU rRNA e 28S LSU rRNA*

No total, foi possível observar resultado positivo na amplificação de 65,9% das amostras (83/126) (em 34,1% (43/126) não houve amplificação). O sucesso de amplificação das amostras variou conforme o protocolo de nPCR utilizado e o sequenciamento genético proporcionou a identificação de espécies que apresentam alta similaridade com as identificadas no GenBank (BLAST) (Tabela 1).

Tabela 1 – Comparação de protocolos de nPCR por meio de diferentes locus gênicos (SSU e LSU) e as espécies identificadas pelo sequenciamento do material genético obtido a partir de amostras fecais de bovinos da região Oeste do Paraná, Brasil.

Animal	Protocolo 1 (SSU - 18S)		Protocolo 2 (LSU - 28S)	
	nPCR 1	Sequenciamento 1	nPCR 2	Sequenciamento 2
259	Positivo	<i>Eimeria arloingi</i>	Negativo	NR
255	Positivo	<i>C. bovis</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>

174	Positivo	<i>Uncultured fungus</i>	Negativo	NR
192	Positivo	<i>C. bovis</i>	Positivo	<i>C. bovis</i>
575	Positivo	<i>C. parvum</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
511	Positivo	<i>Colpodella</i> sp.	Negativo	NR
256	Positivo	<i>Colpodellidae</i> sp.	Positivo	<i>C. bovis</i>
267	Positivo	<i>Colpodellidae</i> sp.	Negativo	NR
385	Positivo	<i>C. parvum</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
431	Positivo	<i>C. parvum</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
27	Positivo	<i>C. parvum</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
139	Positivo	<i>C. parvum</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
326	Positivo	<i>C. parvum</i>	Negativo	NR
364	Positivo	<i>C. bovis</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
366	Positivo	<i>C. parvum</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
389	Positivo	<i>C. parvum</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
401	Positivo	<i>C. parvum</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
414	Positivo	<i>C. parvum</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
445	Positivo	<i>C. parvum</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
108	Positivo	<i>C. parvum</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
164	Positivo	<i>C. parvum</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
207	Positivo	<i>C. parvum</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
337	Positivo	<i>C. parvum</i>	Negativo	NR
367	Positivo	<i>C. bovis</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
469	Positivo	<i>C. andersoni</i>	Positivo	<i>C. muris</i>
3	Positivo	<i>C. parvum</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
6	Positivo	<i>Uncultured eukaryote</i>	Negativo	NR
309	Positivo	<i>C. parvum</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
362	Positivo	<i>C. parvum</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
363	Positivo	<i>C. bovis</i>	Negativo	NR
377	Positivo	<i>Colpodellidae</i> sp.	Negativo	NR
421	Positivo	<i>Colpodellidae</i> sp.	Positivo	<i>C. bovis</i>
430	Positivo	<i>Colpodellidae</i> sp.	Negativo	NR
433	Negativo	NR	Positivo	<i>C. bovis</i>
459	Positivo	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Positivo	<i>C. parvum</i>
502	Positivo	<i>Colpodellidae</i> sp.	Negativo	NR
503	Positivo	<i>Eimeria arloingi</i>	Negativo	NR
549	Positivo	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Positivo	<i>C. bovis</i>
12	Positivo	<i>C. parvum</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
15	Positivo	<i>C. parvum</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
18	Positivo	<i>C. parvum</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
19	Positivo	<i>C. parvum</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
25	Positivo	<i>C. parvum</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
33	Positivo	<i>C. parvum</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
39	Positivo	<i>C. parvum</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
43	Positivo	<i>C. parvum</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
44	Positivo	<i>C. ryanae</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
45	Positivo	<i>C. andersoni</i>	Negativo	NR

46	Positivo	<i>C. parvum</i>	Positivo	<i>C. ryanae</i>
47	Positivo	<i>Uncultured eukaryote</i>	Positivo	<i>C. ryanae</i>
57	Negativo	NR	Positivo	<i>Mucor racemosus</i>
64	Positivo	<i>C. ryanae</i>	Positivo	<i>C. ryanae</i>
66	Positivo	<i>C. ryanae</i>	Negativo	NR
71	Positivo	<i>Uncultured eukaryote</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
101	Negativo	NR	Positivo	<i>C. parvum</i>
106	Negativo	NR	Positivo	<i>C. parvum</i>
109	Positivo	<i>Colpodellidae</i> sp.	Negativo	NR
132	Positivo	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Negativo	NR
182	Negativo	NR	Positivo	<i>C. parvum</i>
198	Positivo	<i>Colpodellidae</i> sp.	Negativo	NR
199	Positivo	<i>Colpodellidae</i> sp.	Negativo	NR
206	Negativo	NR	Positivo	<i>C. ryanae</i>
208	Positivo	<i>C. parvum</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
212	Positivo	<i>C. bovis</i>	Positivo	<i>C. bovis</i>
217	Positivo	<i>C. bovis</i>	Negativo	NR
247	Positivo	<i>Eimeria arloingi</i>	Negativo	NR
265	Positivo	<i>Uncultured eukaryote</i>	Negativo	NR
291	Positivo	<i>Colpodellidae</i> sp.	Negativo	NR
315	Positivo	<i>C. ryanae</i>	Positivo	<i>C. ryanae</i>
333	Positivo	<i>Eimeria arloingi</i>	Negativo	NR
347	Positivo	<i>C. parvum</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
358	Positivo	<i>C. parvum</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
359	Positivo	<i>C. parvum</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
361	Positivo	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Positivo	<i>C. bovis</i>
388	Positivo	<i>C. parvum</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
409	Positivo	<i>Colpodellidae</i> sp.	Negativo	NR
426	Positivo	<i>Colpodellidae</i> sp.	Negativo	NR
451	Positivo	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Negativo	NR
452	Positivo	<i>C. parvum</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
465	Positivo	<i>C. parvum</i>	Positivo	<i>C. parvum</i>
515	Negativo	NR	Positivo	<i>C. parvum</i>
543	Positivo	<i>Eimeria arloingi</i>	Negativo	NR
576	Positivo	<i>C. bovis</i>	Positivo	<i>C. bovis</i>

Das 126 amostras submetidas a nPCR (LSU), 44,4% (55/126) foram positivas e sete amostras foram amplificadas somente pelo protocolo proposto por Koehler et al., (2017). Quando analisadas pela nPCR (SSU), 60,32% das amostras (76/126) foram amplificadas e 27 positivas exclusivamente pelo protocolo de Ryan et al. (2003).

As 55 amostras que apresentaram sucesso na amplificação do gene 28S rRNA (LSU) foram sequenciadas e a partir desses resultados, quatro espécies de *Cryptosporidium* spp. puderam ser identificadas: *C. parvum* (41), *C. bovis* (8), *C. ryanae*

(5) e *C. muris* (1), sendo essa última e mais uma amostra (que não amplificou nesse protocolo), foram identificadas como *C. andersoni* (2) no protocolo de amplificação do gene 18S SSU rRNA, as demais proporcionaram a identificação das mesmas três espécies: *C. parvum* (34), *C. bovis* (8) e *C. ryanae* (4). Cinco amostras não possibilitaram a identificação da espécie e foram caracterizadas como *Cryptosporidium* spp., além disso, a amplificação do gene 18S SSU rRNA, proporcionou a identificação de outros agentes, sendo a *Eimeria arloingi*, presente em cinco amostras e 12 identificadas como pertencentes à família Colpodellidae.

As cinco amostras que apresentaram alta similaridade para *Eimeria arloingi* foram amplificadas apenas no protocolo de nPCR do gene 18S SSU rRNA.

Das 12 amostras que apresentaram alta similaridade para *Colpodellidae* sp. através da análise da sequência obtida pela amplificação do gene 18S SSU rRNA, apenas duas foram amplificadas por meio da nPCR (28S LSU rRNA) e foram identificadas como *C. bovis* após o sequenciamento. Uma amostra com alta similaridade para *Colpodella* sp. foi amplificada apenas pelo protocolo que visa a amplificação do gene 18S SSU rRNA, semelhante ao que aconteceu para uma amostra caracterizada como *Uncultured fungus*.

Foram identificadas quatro amostras com alta similaridade para *Uncultured eukaryote* a partir da amplificação por meio do gene 18S SSU rRNA e sequenciamento genético. As mesmas amostras, quando analisadas pelo protocolo de que visa o gene 28S LSU rRNA, apresentaram sucesso de amplificação em apenas duas e quando sequenciadas foi possível caracterizar as espécies de *C. ryanae* e *C. parvum*.

Oito amostras que não foram amplificadas pelo gene 28S LSU rRNA, quando submetidas ao protocolo de nPCR visando à amplificação do gene 18S SSU rRNA apresentaram resultado positivo e identificadas como *C. parvum* (2 amostras), *C. bovis* (2), *C. andersoni* (2) e *C. ryanae* (1). Uma das amostras não possibilitou a identificação da espécie e ficou caracterizada como *Cryptosporidium* spp.

Embora os primers propostos por Koehler et al. (2017) tenham apresentado uma menor taxa de amplificação cruzada, em nosso estudo os primers propostos por Ryan et al. (2003) permitiram diferenciar mais espécies de *Cryptosporidium*. A árvore filogenética construída utilizando-se as sequências do gene SSU foram obtidas utilizando-se o modelo GTR + F+G4 e com as sequências do gene LSU utilizando-se o modelo de substituição GTR + G+I+G4. As árvores filogenéticas obtidas, respectivamente, encontram-se nas figuras 1 e 2.

As sequências de nucleotídeos foram depositadas no banco de dados GenBank sob os números de acesso: OL827540-OL827543; OL848126-OL848137; OL848138-OL848156; OL848457-OL848462; OL848471; OL848468-OL848470; OL848474-OL848475 e OL865378-OL865409.

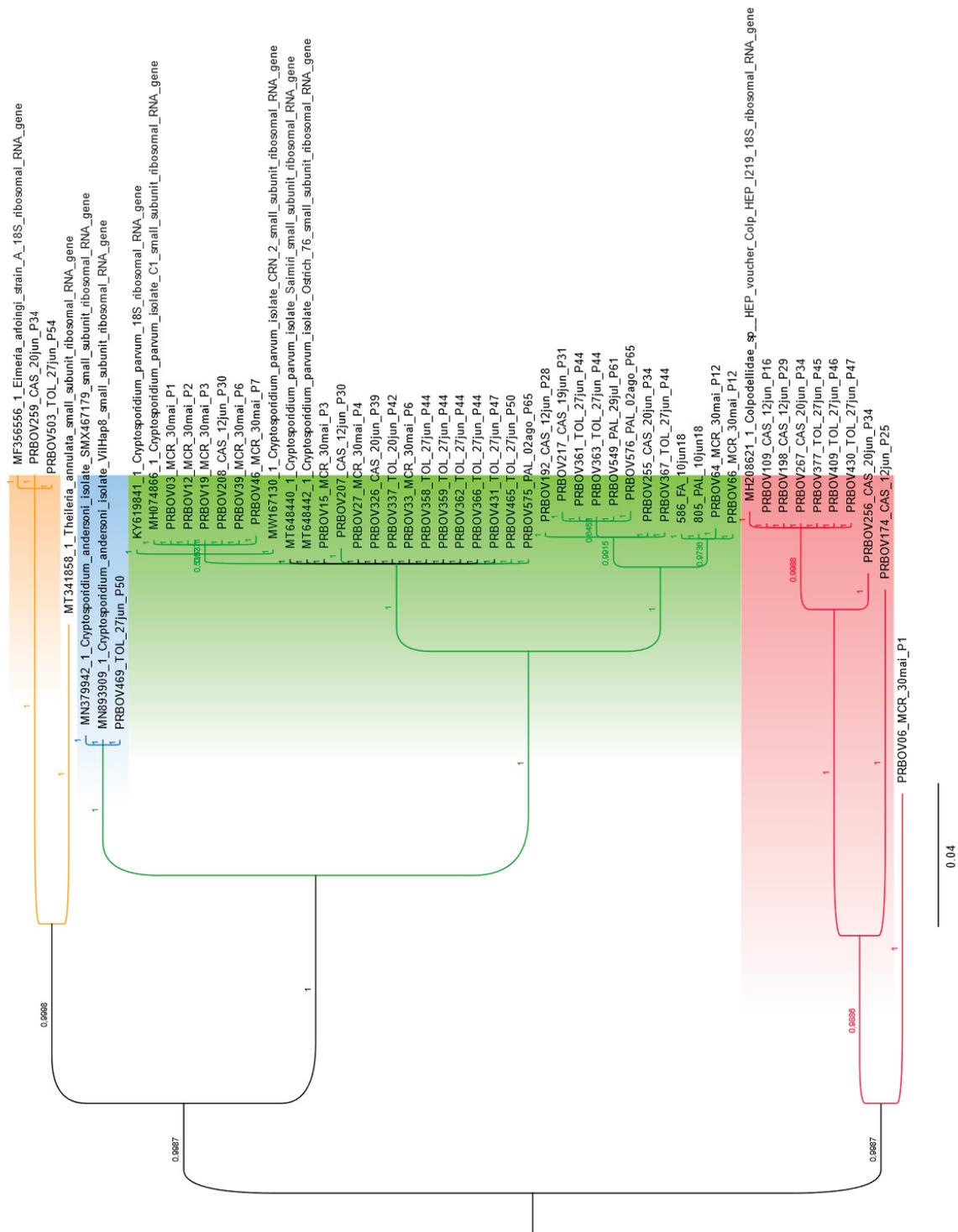


Figura 2 – Árvore filogenética baseada nas sequências parciais da pequena subunidade do gene do RNA ribossômico nuclear (SSU) por inferência Bayesiana (IB).

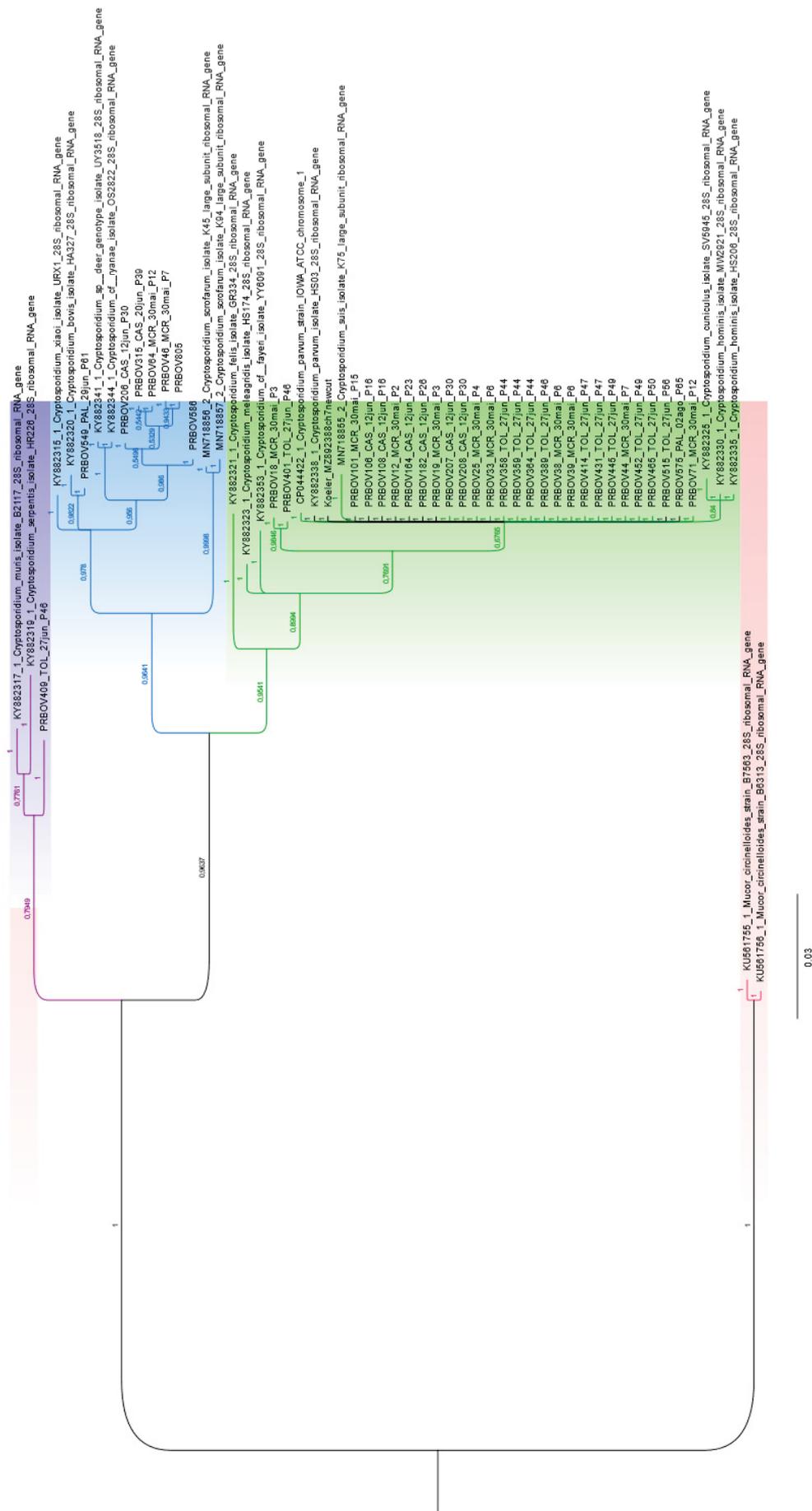


Figura 3 – Árvore filogenética baseada nas seqüências parciais da grande subunidade do gene do RNA ribossômico nuclear (LSU) por inferência Bayesiana (IB).

## Discussão

Um dos principais fatores que dificulta o diagnóstico molecular do *Cryptosporidium* spp. é a obtenção de um número suficiente de oocistos a partir de amostras fecais. Mesmo quando são utilizadas as técnicas de concentração de oocistos, juntamente com esse processo, bactérias e outros contaminantes, que apresentam densidade flutuante semelhante ou que estão aderidas aos oocistos, representam um grande obstáculo na obtenção do material genético com pureza e concentração adequadas para análise através do sequenciamento (GUO et al., 2015). Fato esse que pode explicar os outros agentes que foram identificados em nosso trabalho. Os resultados observados no estudo realizado por Leetz et al. (2007), assim como no trabalho de Mirhashemi et al. (2015), evidenciaram os obstáculos em relação a análise de amostras ambientais e fecais com uma baixa concentração de oocistos ou DNA de *Cryptosporidium* spp.

Para determinar a taxa de infecções subclínicas e as espécies de *Cryptosporidium*, Mirhashemi et al. (2015) compararam três protocolos nPCR que visam a amplificação do locus do gene 18S rRNA (Nichols et al., 2003, Nichols et al., 2010, Ryan et al., 2003, Xiao et al., 1999, Xiao et al., 2001), utilizando-os em 49 amostras fecais, provenientes de três espécies de animais (equinos: n=17; ovinos: n=10; bovinos: n=22). Os resultados obtidos evidenciaram que o melhor protocolo de nPCR para todas as espécies foi o desenvolvido por Ryan et al. (2003), sendo considerado o teste mais sensível (96%) entre os protocolos avaliados. Nesse trabalho foi observada uma taxa de amplificação de 59,1% (13/22) nas amostras de bovinos sendo identificadas quatro espécies: *C. parvum*, *C. hominis*, *C. ryanae* e *C. bovis*, semelhante ao que foi observado em nosso estudo, quando utilizamos o mesmo protocolo e obtivemos uma taxa de amplificação de 60,3% (76/126), mesmo com um número bastante superior de amostras analisadas, entretanto, as espécies identificadas foram *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. parvum* e *C. ryanae*.

No presente estudo, apesar do protocolo que visa à amplificação do gene LSU (Koehler et al., 2017) ter apresentado menor sensibilidade, 44,4% (56/126), apenas uma das amostras amplificadas apresentou alta similaridade (99,25%) para *Mucor racemosus* (AJ271061.1), enquanto todas as demais possibilitaram a identificação de espécies de *Cryptosporidium*. Já o protocolo que visa o locus do gene SSU, 30,3% (23/76) das amostras sequenciadas apresentaram ampliações cruzadas sem evidências da presença de *Cryptosporidium* spp. Os organismos identificados na análise sequencial das ampliações cruzadas foram *Eimeria arloingi*, *Colpodella* sp., *Colpodellidae* sp.,

*Uncultured eukaryote* e *Uncultured fungus*. A fim de garantir que não ocorreram erros técnicos ou variações relacionadas ao uso de equipamentos de marcas distintas, todas as amostras que apresentaram amplificação cruzada com outros agentes foram submetidas a PCR em gradiente de temperatura (53°C-58°C) e os resultados se mantiveram para os mesmos agentes.

Esses achados são semelhantes aos identificados em estudos realizados anteriormente, que evidenciam a amplificação cruzada dos entre os gêneros *Cryptosporidium* spp. e outros agentes, como *Acinetobacter* spp., *Colpodella* spp., *Adelina bambarooniae*, *Eimeria reichenowi*, *Gloeodinium montanum*, *Perkinsea* sp., *Placocista* sp., *Chlorophytes*, *Chlorococcum vacuolatum*, *Colletotrichum aculatum*, *Monoraphidium minutum*, *dioflagelado* e *Baldinia anauniensis* (Candeias et al., 2022; Hussain et al., 2021; Koehler et al., 2017). No presente estudo, foi possível identificar *Eimeria arloingi* em algumas amostras sequenciadas pela amplificação do gene 18S SSU rRNA, dados que corroboram com a pesquisa de Kokuzawa et al. (2013) que afirmam alta similaridade no filo apicomplexa, podendo chegar a 99% quando comparados entre *Cryptosporidium* spp. e *Eimeria* spp. Observando os resultados obtidos na análise semiquantitativa, chama atenção o fato dessa amostra ter sido a que continha o maior número de oocistos (30) de *Cryptosporidium* spp. no esfregaço.

Outros estudos realizados obtiveram como resultado taxas de amplificação inferiores, bem como a amplificação cruzada de outros micro-organismos, conforme foi observado em nosso estudo. Utilizando os primers propostos por Ryan et al. (2003), Hussain et al. (2021) relataram pela primeira vez a amplificação cruzada de gêneros e a identificação de *Colpodella* spp. a partir de amostras fecais em felinos de zoológico. Os autores obtiveram como resultado uma taxa de amplificação (42,9%) inferior a observada em nosso estudo (60,32%) e partir do sequenciamento, detectaram que esses primers não amplificaram apenas *Cryptosporidium* spp. (17/24), mas também *Copodella* spp. (7/24).

Amplificações cruzadas foram observadas por Koehler et al. (2017) quando utilizaram os primers propostos por Xiao et al. (1999), assim como em um estudo realizado por nossa equipe (Candeias et al., 2022), no qual identificamos bactérias do gênero *Acinetobacter* spp. e por meio da análise de bioinformática foi possível detectar cerca de 100pb semelhantes com as sequências de *Cryptosporidium* spp. Realizamos novamente, esse protocolo, com o DNA extraído de uma cultura pura de *Acinetobacter* spp. e os resultados foram confirmados.

Em nosso estudo, embora os primers propostos por Ryan et al. (2003) terem apresentado menor especificidade, eles proporcionaram maior diferenciação entre as espécies de *Cryptosporidium* na análise filogenética, uma vez que amostras foram caracterizadas como *C. parvum*, *C. andersoni*, entre outros. Em contraste, maior especificidade foi observada quando utilizamos os primers propostos por Koehler et al. (2017), entretanto, com a análise filogenética as amostras foram caracterizadas apenas a nível de gênero, ou seja, *Cryptosporidium* sp., resultados que divergem dos encontrados por Koehler et al. (2017), que conseguiram uma caracterização de espécies em níveis semelhantes com os primers propostos, por isso os autores destacam a necessidade de novos estudos para que a sensibilidade e especificidade desse ensaio seja reavaliada ao longo do tempo, especialmente se este for aplicado em amostras de espécies diferentes das utilizadas no estudo e em outras regiões geográficas.

### Conclusão

Nossos resultados evidenciam a necessidade de novos estudos para o desenvolvimento e aplicabilidade de novos primers, buscando maiores níveis de especificidade e sensibilidade, a fim de evitar resultados falsos positivos e falsos negativos no diagnóstico do *Cryptosporidium* spp. A amplificação cruzada e a identificação de outros agentes, pelos protocolos usados atualmente, puderam ser comprovadas, embora o protocolo de nPCR proposto por Koehler et al. (2017), tenha mostrado maior especificidade, ocorrendo amplificação cruzada em apenas uma das amostras analisadas.

### Referências bibliográficas

Candeias APM, Huff GM, Rosado AF, Beninca ALV, Souza LZ, Osaki SC et al. Evaluation of fecal smear methods for research on *Cryptosporidium* spp. oocysts in the feces of dairy calves. *Semina: Ciênc Agrár* 2022; 43(2):585-597. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2022v43n2p585>

Gerace E., Lo Presti VDM, Biondo C. *Cryptosporidium* Infection: Epidemiology, Pathogenesis and Differential Diagnosis. *Eur J Microbiol Immunol* 2019; 9(4):119-123. doi: 10.1556/1886.2019.00019

Guo Y, Li N, Lysen C, Frace M, Tang K, Sammons S et al. Isolation and enrichment of *Cryptosporidium* DNA and verification of DNA purity for whole genome Sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53(2):641-647. <https://doi.org/10.1128/JCM.02962-14>

Hussain S, Li X, Bukhari SM, Zhou M, Ahmad S, Ahmad S et al. Cross-genera amplification and identification of *Colpodella* sp. with *Cryptosporidium* primers in fecal samples of zoo felids from northeast China. *Braz J Biol.* 2021;83:e247181. doi: 10.1590/1519-6984.247181.

Koehler AV, Korhonen PK, Hall RS, Young ND, Wang T, Haydon SR et al. Use of a bioinformatic-assisted primer design strategy to establish a new nested PCR-based method for *Cryptosporidium*. *Parasites Vectors* 2017; 10(1): 1-8. doi: 10.1186/s13071-017-2462-4

Kokuzawa T, Ichikawa-Seki M, Itagaki T. Determination of phylogenetic relationships among *Eimeria* species, which parasitize cattle, on the basis of nuclear 18S rDNA sequence. *J Vet Med Sci.* 2013; 75(11):1427-31. doi: 10.1292/jvms.13-0273.

Leetz AS, Sitiriadou I, Ongerth J, Karanis P. An evaluation of primers amplifying DNA targets for detection of *Cryptosporidium* spp. using *C. parvum* HNJ-1 Japanese isolate in water samples. *Parasitol Res.* 2007; 101(1):951-962. doi: 10.1007/s00436-007-0567-y.

Mirhashemi ME, Zintl A, Grant T, Lucy FE, Mulcahy G, De Waal T. Comparison of diagnostic techniques for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in animal samples. *Exp Parasitol.* 2015;151-152:14-20. doi: 10.1016/j.exppara.2015.01.018.

Nichols RAB, Campbell B, Smith H. Identification of *Cryptosporidium* spp. oocysts in United Kingdom noncarbonated natural mineral waters and drinking waters by using a modified nested PCR-restriction fragment length polymorphism assay. *App. Env. Microbiol* 2003; 69(7):4183-4189. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.4183-4189.2003>

Nichols RAB, Connelly L, Sullivan CB, Smith HV. Identification of *Cryptosporidium* Species and Genotypes in Scottish Raw and Drinking Waters during a One-Year Monitoring Period. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76(17):5977-5988.<https://doi.org/10.1128/AEM.00915-10>.

Ortolani, E. L. Standardization of the modified Ziehl-Neelsen technique to stain oocysts of *Cryptosporidium* sp. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2000; 9(1), 29-31.

Ryan U, Xiao L, Read C, Zhou L, Lal AA, Pavlasek I. Identification of novel *Cryptosporidium* Genotypes from the Czech Republic. *App. Env. Microbiol.* 2003; 69(7):4302-4307. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.4302-4307.2003>

Thompson RCA, Ash A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *Infection, Genetics and Evolution* 2016; 40(1): 315-323. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.09.028>

Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ et al. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65(4): 1578-83. doi: 10.1128/AEM.65.4.1578-1583.1999.

Xiao L, Bern C, Limor J, Sulaiman I, Roberts J, Checkley W et al. Identification of 5 Types of *Cryptosporidium* Parasites in Children in Lima, Peru. *J Infect Dis* 2001; 183(3): 492–497. <https://doi.org/10.1086/318090>

Xiao L, Feng Y. Molecular epidemiologic tools for waterborne pathogens *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. *Food and Waterborne Parasitol.* 2017; 8-9(1): 14-32. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2017.09.002>

Yildirim A, Adanir R, Inci A, Yukari BA, Duzlu O, Onder Z et al. Prevalence and genotyping of bovine *Cryptosporidium* species in the Mediterranean and Central Anatolia Region of Turkey. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2020; 69:101425. doi: 10.1016/j.cimid.2020.101425

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos em nosso estudo demonstram que *Cryptosporidium* spp. está presente na população bovina da região Oeste do estado do Paraná e evidenciam a necessidade do aprimoramento nas técnicas de detecção molecular do agente, buscando maiores níveis de especificidade e sensibilidade, a fim de evitar resultados falsos positivos no diagnóstico.

A idade dos animais, área total da propriedade, sistema de produção e quantidade de animais que compõem o rebanho foram os principais fatores de risco associados à infecção na região em estudo.

A identificação de outros agentes pelos protocolos utilizados pôde ser comprovada e, embora o protocolo de nPCR proposto por Koehler et al. (2017) tenha apresentado maior especificidade, ocorrendo amplificação cruzada em apenas uma das amostras analisadas, o protocolo de nPCR proposto por Ryan et al. (2003) permitiu maior diferenciação entre as espécies de *Cryptosporidium*.

## 7 CONTRIBUIÇÕES

Pela dimensão geográfica de nosso país, os trabalhos epidemiológicos são fundamentais para avaliar a real prevalência das doenças nas mais variadas regiões. Na região Oeste do Paraná, poucos estudos epidemiológicos foram realizados com animais de produção, os quais podem ser afetados por uma série de parasitas com potencial zoonótico e que ocasionam prejuízo para a produção, entre eles o *Cryptosporidium* spp.

Nossos resultados demonstraram que *Cryptosporidium* spp. está amplamente distribuído nos rebanhos leiteiros da região Oeste do Paraná, uma vez que grande parte das propriedades estudadas apresentavam animais positivos para o protozoário. A excreção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. pelos bovinos leiteiros da região Oeste do Paraná foi associada especialmente a idade dos animais e as propriedades e rebanhos menores com sistema de produção familiar.

*Cryptosporidium parvum* apresenta grande importância na saúde pública, essa é a espécie que mais acomete os bovinos e a segunda mais envolvida nas infecções em humanos. Em nosso estudo essa foi a espécie mais prevalente nas amostras

analisadas, o que deve ganhar destaque, pois os bovinos são considerados importantes reservatórios para as infecções em humanos.

A identificação de outros agentes pelos protocolos utilizados para a detecção de *Cryptosporidium* spp. reforça a necessidade do aprimoramento dos ensaios de PCR, buscando maior especificidade no diagnóstico. O desenvolvimento de primers mais específicos é uma ferramenta que vem sendo explorada, porém esses ensaios devem ser reavaliados ao longo do tempo, principalmente se forem utilizados em amostras de espécies distintas e em outras regiões geográficas.

## APÊNDICE 1 – QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO PROPRIEDADE

**Questionário Propriedade**

Propriedade [ \_\_\_\_\_ ] Data de coleta [ \_\_\_\_\_ ]

Proprietário [ \_\_\_\_\_ ] Tel ou e-mail [ \_\_\_\_\_ ]

**Cidade**

Cascavel [  Sim  Não ]

Marechal [  Sim  Não ]

Palotina [  Sim  Não ]

Toledo [  Sim  Não ]

**Tamanho da propriedade**

Até 50he [  Sim  Não ]

51 a 100he [  Sim  Não ]

101 a 150he [  Sim  Não ]

151 a 200he [  Sim  Não ]

Acima de 200he [  Sim  Não ]

**Sistema de criação**

Intensivo [  Sim  Não ]

Semi-intensiva [  Sim  Não ]

Extensiva [  Sim  Não ]

Total de animais na propriedade [ \_\_\_\_\_ ] Quantidade de vacas em lactação [ \_\_\_\_\_ ] Produção diária de leite [ \_\_\_\_\_ ] Número de partos (ano) [ \_\_\_\_\_ ]

**Sistema de Produção**

Familiar [  Sim  Não ]

Empresarial [  Sim  Não ]

**Ordenha**

Manual [  Sim  Não ]

Mecanizada [  Sim  Não ]

Balde ao pé [  Sim  Não ]

Canalizada [  Sim  Não ]

**Assistência veterinária**

Cooperativa [  Sim  Não ]

Consultoria [  Sim  Não ]

**Instalações (estábulo)**

Alvenaria [  Sim  Não ]

Madeira [  Sim  Não ]

**Fonte de água**

Parada [  Sim  Não ]

Corrente [  Sim  Não ]

**Higiene das instalações**

Ruim [  Sim  Não ]

Bom [  Sim  Não ]

Muito bom [  Sim  Não ]

Observações adicionais para fonte de água [ \_\_\_\_\_ ]

**Uso de desinfetantes**

[  Sim  Não ]

**Colostragem**

Natural

- Sim  
 Não

Artificial

- Sim  
 Não

Até 6 horas após o nascimento

- sim  não

Após 6 horas

- sim  não

Tratamento profilático (ou metafilático) - baytril, baycox...

- sim  não

Vacinação de fêmeas gestantes contra outros agentes infecciosos que causam diarreia neonatal bovina

- sim  não

Leite de descarte (com ATB)

- sim  não

Contato com outros animais

- sim  não

Histórico de diarreia

- sim  não

**Instalações dos bezerros**

Individual

- sim  não

Coletiva

- sim  não

Piso ripado

- sim  não

Piso não ripado

- sim  não

bebedouros individuais

- sim  não

Bebedouros coletivos

- sim  não

## APÊNDICE 2 – QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO INDIVIDUAL

**Formulário individual**

**Identificação do animal** [ \_\_\_\_\_ ] **Número** [ \_\_\_\_\_ ]

**Data de nascimento** [ \_\_\_\_\_ ] **Data de coleta** [ \_\_\_\_\_ ]

**Idade (dias ou meses)** [ \_\_\_\_\_ ] **Propriedade** [ \_\_\_\_\_ ]

<b>Até 30 dias</b> <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> não	<b>31 a 60 dias</b> <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> não	<b>61-90 dias</b> <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> não	<b>91-120 dias</b> <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> não	<b>121-150 dias</b> <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> não
<b>151-180</b> <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> não	<b>181-210 dias</b> <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> não	<b>211-240 dias</b> <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> não	<b>241-270 dias</b> <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> não	<b>271-300 dias</b> <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> não
<b>301-330 dias</b> <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> não	<b>331-360 dias</b> <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> não	<b>Raça</b> Holandês [ <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> não ] Jersey [ <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> não ] Mestiço [ <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> não ]		

**Cidade**

Cascavel [ <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> não ]	Marechal [ <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> não ]	Palotina [ <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> não ]	Toledo [ <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> não ]
--	--	--	--

<b>Desidratação</b> <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> não	<b>Diarreia</b> <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> não	<b>Apatia</b> <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> não
<b>Grau de desidratação Leve - Grau I (até 5%)</b> <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> não	<b>sangue nas fezes</b> <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> não	<b>Muco nas fezes</b> <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> não

**Escore de consistência de fezes (ECF)**

<b>1 - fezes líquidas</b> <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> não	<b>2 - semi-sólidas</b> <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> não	<b>3 - Equilibradas (normais)</b> <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> não
<b>4 - firmes</b> <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> não	<b>5 - duras</b> <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> não	

<b>Grau de desidratação Moderada - Grau II (6 a 10%)</b> <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> não	<b>Grau de desidratação Grave - Grau III (acima de 10%)</b> <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> não
---	--

## APÊNDICE 3 – INSTRUÇÕES AOS AUTORES

### “BRAZILIAN JOURNAL OF VETERINARY PARASITOLOGY” REVISTA BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA

#### APRESENTAÇÃO

A Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária é um órgão oficial de divulgação do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária (CBPV). Tem como objetivo publicar temas relativos a Helmintos, Protozoários, Artrópodes e agentes transmitidos por Artrópodes, bem como assuntos correlatos. A revista utiliza o sistema de fluxo contínuo de publicação de artigos, sendo o volume dividido em 4 números por ano, ou seja, periodicidade trimestral. São aceitas submissões de manuscritos, em inglês, de pesquisadores de qualquer país, associados ou não ao CBPV. Este periódico oferece a todos os pesquisadores acesso eletrônico livre para consulta de todos os trabalhos, desde seu primeiro volume publicado em 1992.

#### POLÍTICA EDITORIAL

Os artigos submetidos à Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária deverão caracterizar-se como científicos e originais, essencialmente sobre parasitas de animais em geral. A RBPV atribui a seus artigos as categorias de:

*Artigo Original:* deve relatar dados de pesquisa original, não tendo sido publicado em nenhum outro periódico.

*Comunicação Científica:* para essa categoria, o artigo submetido só será aceito desde que possua alto grau de ineditismo e originalidade, trazendo resultados novos de importância evidente, atribuindo ao Editor-chefe a continuidade da submissão ou não.

*Artigo de Revisão:* condicionado a submissão e a solicitação por convite do editor-chefe. Revisões não solicitadas serão avaliadas pelo editor-chefe ou editores científicos assistentes, desde que sejam escritas por pesquisadores especialistas no tópico escolhido.

#### **Submissão de trabalhos:**

A submissão de trabalhos na RBPV é online pelo sistema ScholarOne (<https://mc04.manuscriptcentral.com/rbpv-scielo>). O autor correspondente deve fornecer um ID ORCID (Open Researcher and Contributor ID, <http://orcid.org/>) no momento da submissão inserindo-o no perfil do usuário no sistema de submissão. Recomendamos que seja feito o mesmo para os coautores. O(s) autor(res) deverá(ão) anexar uma carta, responsabilizando-se por todo o processo de tramitação e originalidade do artigo, salvo resumo(s) apresentado(s) em eventos científicos, não submetidos à publicação em outros periódicos. Trabalhos com número excessivo de autores deverão ser avaliados pelos editores científicos assistentes, em relação ao protocolo experimental. É necessária a colaboração substancial de todos os autores no planejamento do estudo, obtenção, análise e interpretação de resultados, confecção do artigo e aprovação da versão final submetida e aceita. Colaboradores que não tiveram participação ativa em todo o processo descrito acima poderão ser listados na seção de agradecimentos. Poderá haver

agradecimento a pessoa ou instituição que forneceu auxílio técnico, sugestões, correção ou sugestão na escrita ou que de alguma forma colaborou para a elaboração do trabalho. Junto ao trabalho submetido anexar o certificado de revisão de inglês, emitido por um dos revisores credenciados pela revista (<http://rbpv.org.br/guia-do-autor>). Os pesquisadores deverão assumir os custos da revisão. Caso um dos coautores seja estrangeiro nativo da língua inglesa, este deverá revisar o inglês do trabalho. O autor correspondente deverá enviar correspondência para revista confirmando que essa revisão foi feita por um dos autores nativos da língua inglesa.

### **Processo de avaliação pelos pares**

O processo de avaliação do trabalho dependerá da observância das Normas Editoriais, dos Pareceres do Corpo Editorial e/ou do Relator ad-hoc. Nesse processo, o editor-chefe e os editores científicos assistentes poderão sugerir ou solicitar as modificações necessárias, apesar de ser de responsabilidade dos autores os conceitos emitidos. Os artigos submetidos serão avaliados por, no mínimo, 2 revisores anônimos, selecionados pelo editor-chefe. Em caso de um parecer conflitante, o artigo será enviado a um terceiro revisor. O relator deverá preencher o formulário de avaliação da RBPV, disponível no sistema on-line de submissão (<http://mc04.manuscriptcentral.com/rbpv-scielo>). Tendo recebido a avaliação de pelo menos 2 dos revisores selecionados, o(s) autor(es) receberá (ão) o formulário de avaliação e possíveis correções feitas diretamente no texto. Cabe aos autores responderem o questionamento ou correções sugeridas pelos revisores, individualmente. O avaliador poderá corrigir novamente o artigo, se necessário. Após o aceite pelos revisores ad-hocs, porém antes do aceite final, o artigo passará pela análise de um dos Editores Científicos Assistentes. Lembrando que, o Editor Científico Assistente possui autonomia para sugerir correções e/ou rejeitar a publicação do artigo, mesmo com a aprovação dos relatores. Ainda nesta etapa, caso necessário, o manuscrito é encaminhado a um dos revisores de métodos estatísticos da RBPV. Após diagramação e editoração, o editor-chefe faz as correções finais.

### **Transferência de direitos autorais:**

Se o artigo for aceito, o (s) autor (es) transfere (m) os direitos autorais para o periódico. Em qualquer uso subsequente de partes do texto, figuras e tabelas, a **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** deve ser citada como fonte.

## **ÉTICA**

Experimentos que utilizam animais deverão ser conduzidos obedecendo às normas aprovadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (<http://www.cobea.org.br>), devendo os autores apresentarem o número de protocolo de submissão e aprovação dos trabalhos em Comissão de Ética e Bem-Estar Animal. Para autores estrangeiros, experimentos com animal também são previstos no "International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals" emitido pelo "Council for the International Organizations of Medical Sciences" (<http://www.cobea.org.br>), devendo os autores apresentarem o número de protocolo de submissão e aprovação dos trabalhos.

## **APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO**

Na elaboração do texto serão observadas as seguintes normas:

Os trabalhos devem ser submetidos em inglês, de forma concisa, com linguagem impessoal e com os sinais de chamadas de rodapé em números arábicos, lançados ao pé da página em

que estiver o respectivo número e em ordem crescente. Os trabalhos deverão ser apresentados em formato Word, fonte "Times New Roman", tamanho 12, com margem superior e inferior de 2,5 cm, esquerda e direita com 3 cm e espaçamento entre linhas de 1,5 cm com as páginas numeradas. Os Artigos Originais devem ser organizados obedecendo à seguinte sequência: **Título Original (inglês), Título Traduzido (português), Título resumido (inglês), Autor(es), Filiação Institucional, Abstract (Keywords) (inglês), Resumo (Palavras-chave) (português), Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões** (ou combinação destes três últimos), **Agradecimentos** (facultativo) e **Referências Bibliográficas**. As tabelas e ilustrações deverão ser apresentadas separadas do texto e anexadas ao final do trabalho, sem legendas. As respectivas legendas deverão vir no texto logo após as referências bibliográficas. As Comunicações Científicas obedecem à sequência acima sem a necessidade de se destacar os tópicos, sendo escritas em texto corrido, conciso e limitado a 4.000 palavras, podendo incluir até 3 figuras ou tabelas, combinadas. Não mais que 25 referências devem ser citadas.

### **Características dos elementos de um trabalho científico**

#### **Título Original/Título Traduzido**

O título "cheio" e o subtítulo (se houver) não devem exceder 20 palavras. Não deverá aparecer nenhuma abreviatura, e os nomes de espécies ou palavras em latim deverão vir em itálico. Evitar (por exemplo) títulos que iniciem com: Estudos preliminares; Observações sobre. Não usar o nome do autor e data de citação em nomes científicos.

#### **Autor(es)/Filiação Institucional**

Na identificação, deve constar: nome completo e por extenso de todos os autores (sem abreviação), separados por ponto e vírgula. A Filiação Institucional deve informar os nomes próprios de todas as instituições e não suas traduções: Laboratório, Departamento, Faculdade ou Escola, Instituto, Universidade, Cidade, Estado e País, exatamente nessa ordem. No rodapé, deve constar as informações do autor para correspondência: Endereço completo, telefone, e-mail atualizado e ORCID, nessa ordem.

#### **Abstract/ Resumo**

Devem conter no máximo 200 palavras, em um só parágrafo sem deslocamento. Não devem conter citações bibliográficas. Siglas e abreviações de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso, por exemplo, Indirect Fluorescence Assay (IFA). Devem ser informativos, apresentando o objetivo do trabalho, metodologia sucinta, os resultados mais relevantes e a conclusão. O abstract redigido em língua inglesa e o resumo em língua portuguesa, ambos seguidos por keywords e palavras-chave, respectivamente.

#### **Keywords/ Palavras-chave**

As palavras-chave devem expressar com precisão o conteúdo do trabalho. São limitadas em no máximo 6 (seis), e separadas por vírgula.

#### **Introdução**

Explanação clara e objetiva do estudo, da qual devem constar a relevância e objetivos do trabalho, restringindo as citações ao necessário.

#### **Material e Métodos**

Descrição concisa, sem omitir o essencial para a compreensão e reprodução do trabalho. Métodos e técnicas já estabelecidos devem ser apenas citados e referenciados. Métodos estatísticos devem ser explicados ao final dessa seção.

### **Resultados**

O conteúdo deve ser informativo e não interpretativo: sempre que necessário devem ser acompanhados de tabelas, figuras ou outras ilustrações autoexplicativas.

### **Discussão**

Deve ser limitada aos resultados obtidos no trabalho e o conteúdo deve ser interpretativo. Poderá ser apresentada como um elemento do texto ou juntamente aos resultados e conclusão. Enfatizar a importância de novos achados e novas hipóteses identificadas claramente com os resultados.

### **Conclusões**

As conclusões podem estar inseridas na discussão ou em resultados e discussão, conforme a escolha dos autores. Nesse caso, esse item não será necessário.

### **Agradecimentos**

Quando necessário, limitados ao indispensável.

### **Referências bibliográficas**

#### *Citações*

As citações devem seguir o sistema autor-data:

*Um autor:* nome do autor e ano de publicação

Levine (1985) ou (Levine, 1985)

*Dois autores:* os nomes dos autores e ano da publicação Paim & Souza (2011) ou (Paim & Souza, 2011)

*Três ou mais autores:* nome do primeiro autor seguido de "et al." e o ano de publicação Araújo et al. (2002) ou (Araújo et al., 2002)

Só serão admitidas referências de fácil acesso aos leitores. Referências de difícil acesso poderão ser solicitadas aos autores, e em caso de não disponibilidade, deverão ser retiradas do texto. Não serão aceitas citações de trabalhos publicados em anais de congressos, e as teses devem estar disponíveis para consulta em sites oficiais, por exemplo, Banco de Teses da Capes: <http://www.capes.gov.br/servicos/banco-de-teses>. Todas as citações no texto devem ser cuidadosamente checadas em relação aos nomes dos autores e datas, exatamente como aparecem nas referências. Apresentar a lista de referências em ordem alfabética e, se necessário, em ordem cronológica. Mais de uma referência do(s) mesmo(s) autor(es) no mesmo ano deve ser identificada pelas letras "a", "b", "c", etc., inseridas após o ano de publicação. Títulos de periódicos devem ser abreviados conforme Index Medicus - <http://www2.bg.am.poznan.pl/czasopisma/medicus.php?lang=eng>. Para referências com 6 ou mais autores, apresentar os seis primeiros nomes seguidos da expressão et al.:

#### *Livros*

Levine JD. Veterinary protozoology. Ames: ISU Press; 1985.

#### *Capítulo de livro*

Menzies PI. Abortion in sheep: diagnosis and control. In: Youngquist RS, Threlfall WR. *Current therapy in large animal theriogenology*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 2007. p. 667-680.

#### *Artigo de periódico*

Munhoz AD, Simões IGPC, Calazans APF, Macedo LS, Cruz RDS, Lacerda LC, et al. Hemotropic mycoplasmas in naturally infected cats in Northeastern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2018; 27(4): 446-454. <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-296120180074>

#### *Tese e Dissertação*

Araujo MM. *Aspectos ecológicos dos helmintos gastrintestinais de caprinos do município de patos, Paraíba - Brasil* [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2002.

#### *Documento eletrônico*

Centers for Disease Control and Prevention. Epi Info [online]. 2002 [cited 2003 Jan 10]. Available from: <http://www.cdc.gov/epiinfo/ei2002.htm>.

### **Tabelas**

Elaboradas apenas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e no final. A legenda (título) é precedida da palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismos arábicos, devendo ser descritivas, concisas e inseridas acima das mesmas. As tabelas devem estar limitadas a um número mínimo necessário.

### **Figuras**

As figuras, tais como: desenho, fotografia, prancha, gráfico, fluxograma e esquema, devem ser enviadas em formato .tif, .eps ou .pdf, com no mínimo de 300 dpi de resolução e numeradas consecutivamente. Só serão admitidas figuras de alta qualidade. As legendas devem ser precedidas da palavra Figura, seguida da numeração em algarismo arábico e inseridas abaixo das mesmas. Listar as legendas numeradas com os respectivos símbolos e convenções, em folha separada em espaço duplo. Fotografias digitais deverão ser enviadas em arquivos separados, como foram obtidas. Se a escala for dada às figuras, utilizar a escala BAR em todas as ilustrações ao invés de numérica, que pode ser alterada com a redução das figuras.

### **Prova Gráfica**

O trabalho diagramado em formato pdf., será enviado por e-mail ao autor correspondente. Alterações no artigo, quando aceitos para publicação, devem ser realizadas nesse estágio, com permissão do editor-chefe. Portanto, o trabalho deve ser cuidadosamente corrigido antes de responder ao editor, pois inclusões de correções subsequentes (indicação de novo autor, mudança de parágrafos inteiros ou tabelas) não podem ser garantidas.

### **Taxa de publicação:**

Após o aceite do artigo, será cobrada as seguintes taxas de publicação:

R\$ 500,00 (associados do CBPV em dia com as anuidades);

R\$ 1.000,00 (não-associados do CBPV).

US\$ 300,00 (autores estrangeiros)

Dados bancários para depósito:

Nome: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária/ Revista

Banco do Brasil (001)

Agência: 0269-0

Conta Corrente: 28848-9

Para autores estrangeiros:

IBAN: BR4600000000002690000288489C1

SWIFT BRASBRRJSBO

Endereço: Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, Zona Rural. CEP: 14884-900.  
Jaboticabal – SP, Brasil.