



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ**

**HLLYTCHAIKRA FERRAZ FEHLBERG**

**OCORRÊNCIA DE PROTOZOÁRIOS ENTÉRICOS EM PEQUENOS  
MAMÍFEROS SILVESTRES NA REGIÃO SUL DA BAHIA.**

**ILHÉUS-BA  
2020**

**HLLYTCHAIKRA FERRAZ FEHLBERG**

**OCORRÊNCIA DE PROTOZOÁRIOS ENTÉRICOS EM PEQUENOS  
MAMÍFEROS SILVESTRES NA REGIÃO SUL DA BAHIA.**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Clínica e Sanidade Animal.

Orientador: Prof. Dr. George Rêgo Albuquerque.

**ILHÉUS-BA  
2020**

F296

Fehlberg, Hllytchaikra Ferraz.

Ocorrência de protozoários entéricos em pequenos mamíferos silvestres na Região Sul da Bahia / Hllytchaikra Ferraz Fehlberg. – Ilhéus, BA: UESC, 2020.  
xi, 74 f.: il.; anexo.

Orientador: George Rêgo Albuquerque.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Santa Cruz.  
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.  
Inclui referências.

1. Animais silvestres. 2. Relação hospedeiro-parasito. 3. Protozoário. 4. Doenças parasitárias. I. Título.

CDD 591.5

**HLLYTCHAIKRA FERRAZ FEHLBERG**

**OCORRÊNCIA DE PROTOZOÁRIOS ENTÉRICOS EM PEQUENOS  
MAMÍFEROS SILVESTRES NA REGIÃO SUL DA BAHIA.**

Ilhéus – BA, 28/02/2020

---

George Rêgo Albuquerque - D.Sc  
UESC/DCAA

---

Alexandre Dias Munhoz - D.Sc  
UESC/DCAA

---

Daniele de Santana Rocha – D.Sc  
UESC/DCAA

---

Flávia Regina Miranda – D.SC  
UESC/

---

Aristeu Vieira da Silva – D.Sc  
UEFS/PPPG

**ILHÉUS – BA  
2020**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sua graça, amor, dedicação, simplicidade, amizade, alegria e grandiosidade, estando presente sempre em toda minha vida, desde o meu primeiro respiro neste mundo até as futuras bênçãos reservadas por ele para o meu futuro.

A meu Pai, Ilário Fehlberg (*in memoriam*) pela dedicação, pela vontade de que os meus sonhos crescesse a cada passo dado. Amo-te muito. Minha mãe, Elita Ferraz Fehlberg o meu imenso amor por esta pessoa que me gerou e dedicou inteiramente todos os seus dias me dando amor, carinho que um filho possa querer. Dedico a você, minha rainha, essa conquista.

Aos meus irmãos, Isley Fehlberg, Ítala Fehlberg, Lula Fehlberg e Ingrid Fehlberg pelo companheirismo, carinho, atenção, amo vocês.

Aos cunhados queridos, Eric Mello e Sandra Guastti pelo carinho e força nos momentos que mais precisei.

Aos sobrinhos queridos, amores de minha vida, Amanda G. Fehlberg, Leonardo G. Fehlberg, Bianca F. Fonseca, Evelyn F. Fonseca, Khalil F. Mello e Khael F. Melo, cada momento ao lado de vocês é sempre uma festa. A tia ama-os muito.

A pessoa que entrou em minha vida durante o doutorado, obrigada Roberval Lucena (amor da minha vida) para que eu chegasse até o fim, dedicando e me ajudando em tudo. Te amo.

Aos meus amigos, Aísla Nascimento, Amanda T. S. Lopes, Daniele S. Rocha, Philippe Brito, Pedro Alcantara, Tati Harvey, Gabriela Mota, Graziela Baroni é sempre bom tê-los por perto, me dando conselhos, carinho, atenção e força.

Aos colegas dos Laboratórios, obrigado por fazer parte dessa conquista e, do bom companheirismo e boas risadas.

Ao meu orientador, George Rêgo Albuquerque que me proporcionou aprendizado, confiança e atenção em todos os momentos que precisei. Obrigada por tudo.

Aos membros da banca que aceitaram fazer parte desta finalização.

A Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) juntamente os funcionários e aos mestres que me fizeram ser a profissional que sou hoje. O meu Obrigado.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo apoio a bolsa de pesquisa.

## OCORRÊNCIA DE PROTOZOÁRIOS ENTÉRICOS EM PEQUENOS MAMÍFEROS SILVESTRES NA REGIÃO SUL DA BAHIA.

### RESUMO

Animais silvestres podem desempenhar papel importante na disseminação e transmissão de doenças parasitárias, tendo como destaque os roedores e marsupiais. Devido ao hábito alimentar generalista e antrópico, esses pequenos mamíferos são considerados como hospedeiros de vários parasitas, destacando-se *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. e *Eimeria* spp. Diante deste contexto, objetivou-se investigar a ocorrência dos protozoários *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. e *Eimeria* spp. em roedores e marsupiais capturados em áreas de Mata Atlântica, da região Sul da Bahia, Brasil. Os animais foram capturados utilizando armadilhas do modelo *Tomahawk*, *Sherman* e de interceptação-e-queda (*pitfall*). Um total de 204 animais foram capturados com subsequente coleta das amostras fecais em diferentes áreas florestais de Ilhéus, Una, Belmonte e Mascote. As amostras fecais foram submetidas ao método modificado de centrífugo-flutuação de Sheather para investigar a presença de *Eimeria* spp. As identificações foram realizadas microscopicamente com base na morfologia e morfometria dos oocistos. A análise pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e *Nested*-PCR foi realizada para detectar *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. Como resultado, cinco espécies de marsupiais: *Didelphis aurita*, *Gracilinanus agilis*, *Monodelphis americana*, *Marmosa demerarae* e *Marmosa murina* estavam parasitadas por *Eimeria philanderi* e *Eimeria gambai* e parasitismo misto foi observado em dois marsupiais. Pela técnica molecular observou-se positividade nas espécies de roedores; *Rhipidomys mastacalis*, *H. laticeps*, *Akodon cursor* e *Oecomys catherinae* e duas espécies de marsupial; *G. agilis* e *M. murina*. A prevalência total foi 5,4% (11/204) onde 2,94% (4/136) nos roedores e 2,94% (2/68) marsupiais para a presença de *Giardia duodenalis*. E *Cryptosporidium* a positividade para roedores e marsupiais foi de 1,47% (2/136) e 4,41% (3/68) respectivamente. O sequenciamento demonstrou através dos genes *gdh* e *tpi* *G. duodenalis* com subgenótipo

AI nas espécies de roedores: *Hylaeamys laticeps*, *Oecomys catherinae*, *Oligoryzomys nigripes* e *Akodon cursor* e nos marsupiais *Gracilinanus agilis* e *M. americana*. *Cryptosporidium* foi relatado nos roedores *Rhipidomys mastacalis* e *H. laticeps* e marsupial *Marmosa murina*. Através do gene *gp60* foi encontrado as espécies *C. fayeri*, *C. parvum* e *hsp-70 Cryptosporidium* sp., *C. ubiquitum*. Os subtipos IIa e IVg foram identificados pelo gene *gp60*.

**Palavras-chave:** Animais silvestres. Hospedeiros. Protozoários. Doenças parasitárias.



## OCCURRENCE OF ENTERIC PROTOZOARIES IN SMALL FOREST MAMMALS IN THE SOUTH REGION OF BAHIA.

### ABSTRACT

Wild animals can play an important role in the spread and transmission of parasitic diseases, especially rodents and marsupials. Due to the generalist and anthropic eating habits, these small mammals are considered as hosts of several parasites, especially *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. and *Eimeria* spp. In this context, the objective was to investigate the occurrence of protozoa *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. and *Eimeria* spp. in rodents and marsupials caught in areas of the Atlantic Forest, in southern Bahia, Brazil. The animals were captured using *Tomahawk*, *Sherman* and pitfall traps. A total of 204 animals were captured with subsequent collection of fecal samples in different forest areas of Ilhéus, Una, Belmonte and Mascote. Fecal samples were subjected to the modified Sheather centrifuge-flotation method to investigate the presence of *Eimeria* spp. Identifications were performed microscopically based on the morphology and morphometry of the oocysts. Polymerase Chain Reaction (PCR) and *Nested*-PCR analysis was performed to detect *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. As a result, five species of marsupials: *Didelphis aurita*, *Gracilinanus agilis*, *Monodelphis americana*, *Marmosa demerarae* and *Marmosa murina* were parasitized by *Eimeria philanderi* and *Eimeria gambai* and mixed parasitism was observed in two marsupials. Molecular technique showed positivity in rodent species; *Rhipidomys mastacalis*, *H. laticeps*, *Akodon cursor* and *Oecomys catherinae* and two species of marsupial; *G. agilis* and *M. murina*. The total prevalence was 5.4% (11/204) where 2.94% (4/136) in rodents and 2.94% (2/68) marsupials for the presence of *Giardia duodenalis*. And *Cryptosporidium* positivity for rodents and marsupials was 1.47% (2/136) and 4.41% (3/68) respectively. The sequencing demonstrated through the genes *gdh* and *tpi* *G. duodenalis* with subgenotype AI in the rodent species: *Hylaeamys laticeps*, *Oecomys catherinae*, *Oligoryzomys nigripes* and *Akodon cursor* and in the marsupials *Gracilinanus agilis* and *M. americana*. *Cryptosporidium* has been reported in rodents *Rhipidomys mastacalis* and *H. laticeps* and marsupial *Marmosa murina*. Through the *gp60* gene, the species *C.*

*fayeri*, *C. parvum* and *hsp-70* *Cryptosporidium* sp., *C. ubiquitum* were found. Subtypes IIa and IVg were identified by the *gp60* gene.

**Keywords:** Wild animals. Hosts. Protozoa. Parasitic diseases.

## SUMÁRIO

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | INTRODUÇÃO.....  | 10 |
| 2     | OBJETIVOS.....   | 11 |
| 2.1   | Geral.....   | 11 |
| 2.2   | Objetivos específicos.....   | 11 |
| 3     | REVISÃO DE LITERATURA.....   | 12 |
| 3.1   | Mata Atlântica e a fauna Silvestre.....  | 12 |
| 3.2   | Histórico e Taxonomia <i>Giardia</i> spp.....                                  | 14 |
| 3.2.1 | Características morfológicas e Ciclo evolutivo <i>Giardia</i> .....            | 15 |
| 3.2.2 | Prevalência da giardíase.....  | 16 |
| 3.2.3 | Epidemiologia molecular de <i>Giardia</i> spp. ....                            | 19 |
| 3.3   | Histórico e Taxonomia de <i>Cryptosporidium</i> spp.....                       | 21 |
| 3.3.1 | Características morfológicas e Ciclo evolutivo de <i>Cryptosporidium</i> ..... | 22 |
| 3.3.2 | Prevalência da criptosporidiose.....   | 24 |
| 3.3.3 | Epidemiologia molecular de <i>Cryptosporidium</i> spp.....                     | 26 |
| 3.4   | Histórico e taxonomia de <i>Eimeria</i> spp.....                               | 30 |
| 3.4.1 | Características morfológicas e Ciclo evolutivo de <i>Eimeria</i> .....         | 30 |
| 3.4.2 | Prevalência da eimeriose.....  | 33 |
| 3.4.3 | Epidemiologia morfológica de <i>Eimeria</i> spp.....                           | 34 |
| 8     | ARTIGO CIENTÍFICO I.....   | 36 |
| 8.1   | INTRODUÇÃO.....  | 38 |
| 8.3   | MATERIAL E MÉTODOS.....  | 38 |
| 8.4   | RESULTADOS.....  | 39 |
| 8.5   | DISCUSSÃO.....   | 40 |
| 8.6   | CONCLUSÃO.....   | 41 |
| 9     | Considerações finais.....  | 42 |
| 10    | ARTIGO CIENTÍFICO II.....  | 43 |
| 10.1  | INTRODUÇÃO.....  | 44 |
| 10.2  | MATERIAL E MÉTODOS.....  | 46 |

|      |                           |    |
|------|---------------------------|----|
| 10.3 | RESULTADOS.....           | 49 |
| 10.4 | DISCUSSÃO.....            | 51 |
| 10.5 | CONCLUSÃO.....            | 53 |
| 11   | Considerações finais..... | 54 |
|      | Referência.....           | 55 |
|      | Anexo A.....              | 71 |

## 1- INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é um bioma único rico em biodiversidade, mas altamente ameaçado, assim coloca-se como um *Hotspots* de biodiversidade do planeta, restando apenas 8% da cobertura florestal.

As alterações do meio ambiente por ação antrópica, como desmatamento, expansão das cidades, caça, exploração dos recursos naturais, entre outros, leva a aproximação da fauna silvestre ao ambiente urbano o que pode influenciar na saúde dos animais domésticos e do homem, favorecendo o surgimento de doenças parasitárias e zoonóticas. Marsupiais e roedores, muitas vezes sinantrópicos podem exercer papel importante na disseminação de agentes parasitários.

*Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. são protozoários entéricos que infectam o homem e várias espécies animais domésticas e selvagens mundialmente. Esses agentes provocam doença diarreica aguda e ou crônica, e, portanto, de grande relevância na saúde pública com potencial zoonótico. *Eimeria* spp. infecta uma ampla gama de hospedeiros vertebrados domésticos e selvagens. A infecção por este protozoário a depender do seu grau de parasitismo, pode ser assintomática ou causar sintomas como enterite leve, e a forma grave pode levar o animal a morte.

Estudos sobre a ocorrência dos protozoários supracitados em roedores e marsupiais no Brasil e, sobretudo no Estado da Bahia ainda são escassos. Assim, a investigação de protozooses nos pequenos mamíferos em áreas de mata atlântica e em áreas de agrofloretas, tais como as plantações de cacau, são importantes para avaliar se os parasitos referenciados neste estudo são observados nestes animais, e, se há diferenças na ocorrência de animais infectados em áreas de mata nativa e agrofloresta. Portanto, há a necessidade de estudos sobre a epidemiologia de agentes parasitários diante da fauna silvestre.

Perante o contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar a ocorrência dos protozoários *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. e *Eimeria* spp. em roedores e marsupiais capturados em áreas de Mata Atlântica, da região Sul da Bahia, Brasil.

## 2- OBJETIVOS

### 2.1- Geral

Identificar a ocorrência dos protozoários *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. e *Eimeria* spp em roedores e marsupiais capturados em áreas de Mata Atlântica e agroflorestas de cacau (cabruca), localizados na região Sul do estado Bahia, Brasil.

### 2.2- Objetivos específicos

- ✓ Verificar a ocorrência de protozoários em roedores silvestres e marsupiais capturados na região sul da Bahia;
- ✓ Identificar espécies, genótipos e subgenótipos dos isolados de *Giardia* spp. através das técnicas PCR, *Nested-PCR* utilizando os genes glutamato desidrogenase (*gdh*) e triose fosfato isomerase (*tpi*);
- ✓ Identificar espécies, genótipos e subgenótipos dos isolados de *Cryptosporidium* spp. através das técnicas PCR, *Nested-PCR* utilizando os genes Glicoproteína 60 KDa (*gp60*) e proteína de choque térmico 70 (*HSP-70*);
- ✓ Identificar *Eimeria* spp. através da morfologia e morfometria dos oocistos e esporocisto.

### 3- REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1- Mata atlântica e a fauna silvestre

A Mata Atlântica ocupa uma vasta área no continente americano, sendo a segunda maior em área tropical do continente (MYERS et al., 2000; TABARELLI et al., 2005). Perfaz uma área que sobrepõe um conjunto de formações florestais e estas são compostas por florestas mistas de araucária ao sul, com distinta concentração de lauráceas e florestas decíduas e semidecíduas no interior. Diversas outras formações estão associadas ao bioma, como a presença de mangues, restingas, formações campestres de altitude e formações de brejos, denominadas florestas úmidas situada no Nordeste brasileiro e outros ecossistemas, totalizando uma área de 1.110.182 km<sup>2</sup> (TABARELLI et al., 2005; CONDEZ, 2008).

Diante de toda sua extensão a Mata Atlântica vem sendo intensamente ameaçada pela perda de habitat, alteração dos remanescentes e fragmentação florestal restando apenas 8% da cobertura florestal (TABARELLI et al., 2005). Perante este cenário, coloca-se em destaque que a Mata Atlântica está entre as áreas com prioridade de conservação mundial, estando entre os 25 *hotspots* de biodiversidade do planeta (PINTO et al., 2006). Essa fragmentação da floresta é causada pela exploração ilegal de madeira, caça, extrativismo vegetal, invasão de espécies exóticas e outras ameaças contribuem, acelerando mais ainda a perda da fauna e da flora (TABARELLI et al., 2005). Mesmo que grande parte das áreas florestais tenha sido devastada, ela ainda refugia mais de 8.000 espécies de fauna e flora (FRANKE et al., 2005; CONDEZ, 2008).

Uma das maiores áreas de endemismo da Mata Atlântica está situada no Nordeste brasileiro, mais precisamente na região Sul da Bahia, onde predomina a cultura do cacau (*Theobroma cacao*). É um sistema de plantio comum da região, conhecida como agroecossistema de cacau cabruca (plantação sob sombreamento de árvores nativas) (FRANKE et al., 2005; SAMBUICHI, 2006). A principal vantagem do agroecossistema é permitir a manutenção de grandes remanescentes de floresta na região, conservando os recursos naturais, preservando várias espécies da fauna e flora e conciliando o desenvolvimento agrícola com a preservação da biodiversidade (DO HORTO, 2000; FRANKE et al., 2005).

Atualmente, o desmatamento da floresta tropical e a aproximação dos centros urbanos estão vinculados à atividade antrópica, onde as modificações ambientais constituem as influências na saúde dos animais e do homem (EPSTEIN, 1995). Assim, a dispersão de patógenos, animais sinantrópicos, vetores, pragas urbanas entre outros, proporcionam condições favoráveis para ocorrência de doenças parasitárias e zoonóticas em áreas urbanas, promovendo grande impacto na saúde pública (FRANKE et al., 2005; THOMPSON, 2013; OMS, 2018). No meio silvestre a transmissão de patógenos pode ocorrer através de vetores biológicos, contato direto, contato com urina, fezes, fômites, solos contaminados ingestão de água e alimentos contaminados, entre outros (FRANKE et al., 2005; LIMA, 2018).

Pequenos mamíferos como roedores e marsupiais podem desempenhar papel fundamental como hospedeiros de parasitoses, afetando outros animais silvestres, seres humanos e animais domésticos, constituído assim, fonte de infecção parasitária e zoonótica (LALLO et al., 2009).

Os roedores são mamíferos da ordem Rodentia com mais 2000 espécies distribuídas mundialmente e aproximadamente 236 espécies já catalogadas de ocorrência no Brasil (BONVICINO et al., 2008). São animais que possuem locomoção terrestre e hábito noturno para a maioria das espécies, a alimentação constitui em uma dieta herbívora, mas também, podem apresentar dieta onívora e insetívora (BANDOUK et al., 2013). Assim, em um meio contaminado por estágios infecciosos de agentes parasitários aumenta-se a chance destes animais se infectarem e desempenhar papel como hospedeiro, sendo transmissores de vários parasitos gastrointestinais como, por exemplo, *Giardia duodenalis* (LIMA et al., 2017).

Na Mata atlântica são reconhecidas 23 espécies de marsupiais, dentre estas espécies estão os didelfídeos que compreende um importante componente da fauna de mamíferos que ocorrem no Brasil (DAMASCHIO; PASSAMANI, 2003) Os marsupiais são animais sinantrópicos e cosmopolitas, possuindo locomoção terrestre e arborícola com hábitos noturnos e crepusculares. A alimentação destes animais é constituída de uma dieta generalista, baseada em alimentação onívora, constituída de frutos e principalmente por pequenos insetos (LESSA; DA COSTA, 2010). Com essa alimentação generalista ficam propensos a se infectarem por agentes parasitários tornando-os, desta forma,



hospedeiros capazes de transmitir e disseminar doenças (DE OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2015).

O conhecimento da diversidade de parasitos em animais selvagens é considerado um indicador da saúde dos ecossistemas no qual reflete a interação entre parasito-hospedeiro-meio ambiente (DE SEIXAS FILHO et al., 2014). Essa interação sugere que, com o tempo, a adaptação dos parasitos consiga garantir a sua permanência e perpetuação em diferentes hospedeiros e ambientes (CHOLEWINSKI et al., 2016).

### 3.2- Histórico e taxonomia de *Giardia*.

Foi descrito pela primeira vez em 1681 por Antony Van Leeuwenhoek analisando suas fezes, encontrando formas atualmente conhecida como trofozoíto (LEVINE, 1985; HORAK, 1990). Anos depois a sua descoberta foi atribuída á Vilem Lambl em 1859, relatando a presença no intestino de humanos. Grassi em 1879, observou pela primeira vez, os cistos, sugerindo serem coccídios, e anos depois (1881, 1888) os associando as formas flageladas do organismo. *Lambli*, o nome dado ao gênero, deu origem em 1888, por Blanchard. Várias outras descobertas vieram para elucidar este parasita com a presença de dois núcleos diplóides ativos e do disco de sucção ventral, e, que, atualmente conhecemos como *Giardia* (HORAK, 1990; MORRISON et al., 2007). Assim, a partir de 1952, estudos realizados através das diferenças morfológicas dividiu-os em três espécies; *Giardia agilis*, parasita de anfíbios, *Giardia muris*, de roedores e *Giardia duodenalis* (sin. *G. lamblia* e *G. intestinalis*).

É um protozoário flagelado intracelular obrigatório de distribuição mundial. Pertencente ao Reino Protista, Subreino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Subfilo Zoomastigophorasida, Ordem Diplomonadida, Subordem Diplomonadina, Família Hexamitidae e Gênero *Giardia*. Este gênero possui alto potencial de infectar o homem e uma gama de animais vertebrados como espécies de mamíferos, aves e anfíbios (HOPKINS et al., 1997; ZHAO et al., 2015).

Atualmente, o gênero possui várias espécies, sendo a espécie *G. duodenalis* a única capaz de infectar o homem (PLUTZER et al., 2010; FENG; XIAO, 2011). E com o avanço tecnológico, outras espécies foram identificadas, *G. varani*, isolada de lagartos,

*G. microti* infecta ratas, *G. ardeae* e *G. psittaci* infectam pássaros além de outras espécies (FAVA, 2013; LEAL, 2013; HEYWORTH, 2016; SILVA, 2017).

### 3.2.1- Características morfológicas e Ciclo evolutivo de *Giardia*.

O ciclo de *Giardia* é realizado em um único hospedeiro, no qual possui dois estágios evolutivos, trofozoítos e cistos (PAULINO, 2005). O trofozoíto é móvel, piriforme a oval com simetria bilateral, além de possuir superfície dorsal convexa e grande disco adesivo (sucção) ventral. Possui quatro pares de flagelos e um par de corpos medianos delineados (MONIS et al., 2009; VERMEULEN et al., 2015). Forma que habita o intestino delgado do hospedeiro, desencadeando a doença conhecida como giardíase ou giardiose.

Outra morfologia é o cisto fase que é encontrada no ambiente, com formato oval ou elíptico com uma fina parede hialina. Na fase inicial, o cisto é binucleado, mas quando maduro possui quatro núcleos, corpos medianos curvos e axonemas longitudinais (VERMEULEN et al., 2015; CARRANZA; LUJAN 2016; SILVA, 2017). Resistente ao meio externo e transmissível aos hospedeiros susceptíveis através da via hídrica, alimento e fômites contaminados, além de contato físico direto (FENG; XIAO, 2011; JUNIOR, 2015).

Os cistos são liberados pelas fezes de forma intermitente, e estes podem permanecer por até 12 semanas viáveis no meio ambiente em condições adequadas de temperatura e umidade do ar (NAKADA, 2018). Quando ocorre a ingestão dos cistos por um hospedeiro susceptível, ocorre o desencistamento no intestino delgado, liberando os trofozoítos que possuem predileção pela parede do duodeno e assim multiplica-se iniciando a migração até a porção final do intestino sofrendo então, a formação de cistos, e estes sendo liberados pelas fezes para o meio ambiente (Figura 1) (HUANG et al., 2006; FENG; XIAO, 2011).

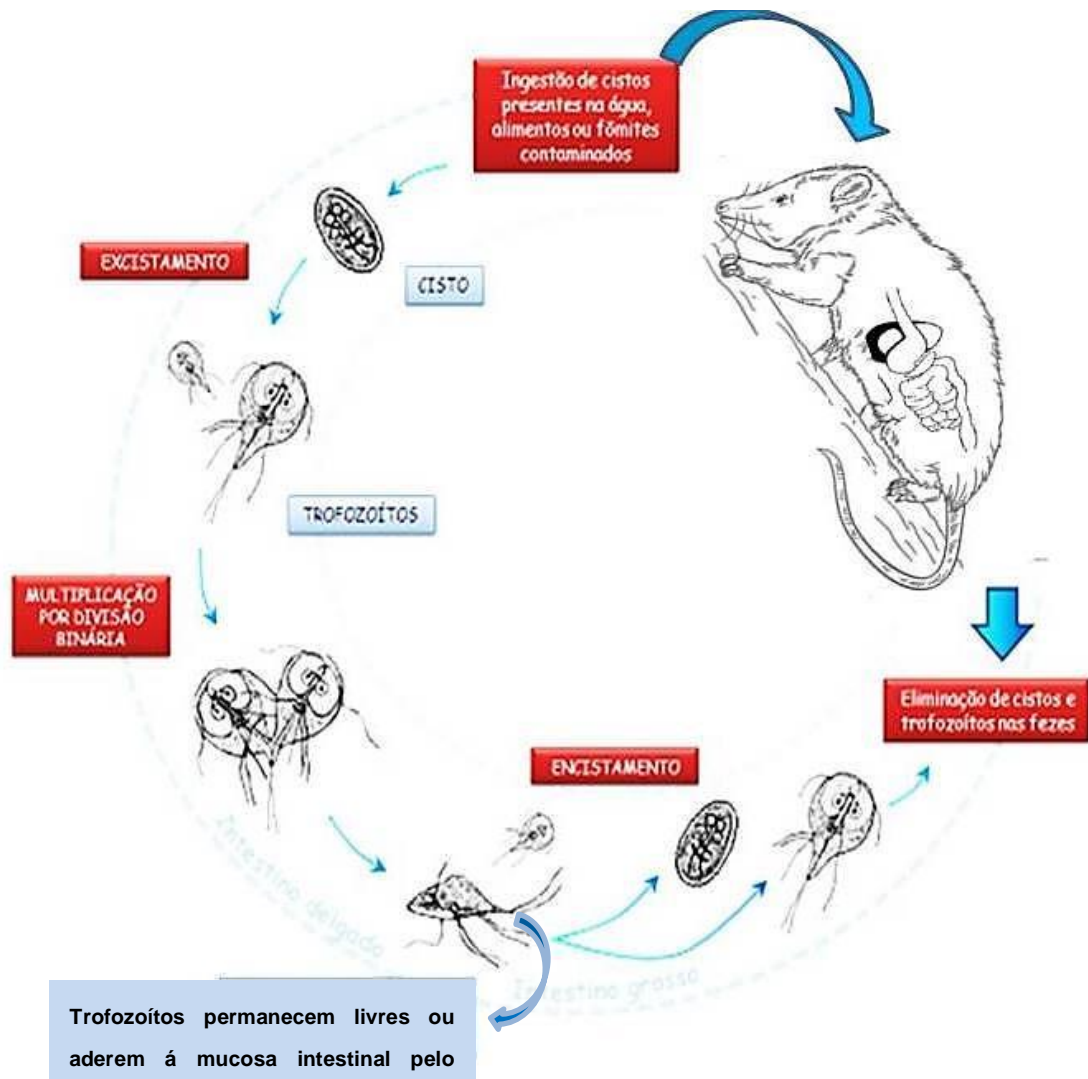


Figura 1- Ciclo evolutivo de *Giardia* spp.  
 Fonte: adaptado de Santos (2011).

### 3.2.2- Prevalência da giardiase

A giardiase possui distribuição global, acometendo diversas espécies animais, inclusive o ser humano (CACCIO et al., 2008), entretanto as taxas de prevalência podem variar entre países. Por se tratar de uma doença re-emergente, essas variações podem estar ligadas a vários fatores exemplificando, os diferentes hábitos de higiene, alimentares e infraestrutura sanitária (FAVA, 2013). Os índices também são influenciados diante do desenvolvimento econômico do país. Estima-se que nos países desenvolvidos as taxas possam chegar próximo de 2 a 7%, e países em desenvolvimento

esse valor seja superior a 50% (RYAN; CACCIO, 2013; SILVA, 2017). A Organização Mundial de Saúde (OMS, 2018) estima uma ocorrência com mais de 200 milhões de casos anuais da doença nos países da África, Ásia e América Latina com elevada morbidade, acometendo aproximadamente 280 milhões de indivíduos a cada ano.

Nos animais, principalmente nos animais silvestres, são poucos os estudos da ocorrência da giardíase. Esse fato pode estar relacionado à falta de conhecimento de espécies envolvidas, clima, hábitos alimentares, métodos de diagnóstico utilizados ou da localização geográfica. Estudos realizados sugerem que, a infecção tem maior prevalência em animais nos países subdesenvolvidos no qual a ocorrência maior do parasitismo é no período do verão (APPELBBE et al., 2005; SANTOS, 2013). O parasita já foi descrito em vários animais selvagens, destacando a ocorrência em roedores e marsupiais (Tabela 1) (ORTEGA-PIERRE, 2009).

**Tabela 1-** Ocorrência de *Giardia* spp. em roedores e marsupiais.

| Localidade                       | Hospedeiros                    | Espécie                     | Positivos (%)       | Referência              |
|----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|---------------------|-------------------------|
| São Paulo - SP                   | <i>Coendou villosus</i>        | <i>G. duodenalis</i>        | 2/98 (2%)           | Lallo et al. (2009)     |
| Rio Grande do Sul - RS           | <i>Chinchilas lanigera</i>     | <i>Giardia</i> sp.          | 20/250 (8%)         | Gurgel et al. (2008)    |
| Rio Grande do Sul - RS           | <i>Myocastor coypus</i>        | <i>Giardia</i> sp.          | 4/7 (57,1%)         | Silva et al. (2007)     |
| Cachoeira do Sul e Porto Alegre  | <i>Coendou villosus</i>        | <i>Giardia</i> sp.          | 1/2 (50%)           | Soares et al. (2008)    |
| Fernando de Noronha              | <i>Rattus rattus</i>           | <i>Giardia</i> sp.          | 3/25 (12%)          | Lima, 2017              |
| Pantanal, MS                     | <i>Myocastor coypus</i>        | <i>G. duodenalis</i>        | 7/80 (8,75%)        | Santos (2011)           |
| Viamão -RS                       | <i>Chinchilas lanigera</i>     | <i>Giardia</i> sp.          | 80/220<br>(36,36%)  | Fialho et al. (2008)    |
| Portugal                         | <i>Chinchila</i> sp.           | <i>Giardia</i> sp.          | 10/31 (32,3%)       | Teixeira (2013)         |
| Chile                            | <i>Mus musculus</i>            |                             |                     |                         |
|                                  | <i>Rattus rattus</i>           | <i>Giardia</i>              | 21/57 (36,8%)       | Franjola et al. (1995)  |
|                                  | <i>Oryzomys longicaudatus</i>  | <i>muris</i>                |                     |                         |
| Polônia                          | <i>Apodemus agrarius</i>       | <i>G. microti/ G. muris</i> | 111/266<br>(41,7%)  |                         |
|                                  | <i>Apodemus flavicollis</i>    | <i>G. microti/ G. muris</i> | 65/266<br>(24,4%)   |                         |
|                                  | <i>Myodes glareolus</i>        | <i>G. microti/ G. muris</i> | 102,1/266<br>(38,4) |                         |
| Pernambuco - PE                  | <i>Didelphis albiventris</i>   | <i>Giardia</i> sp.          | 1/15 (6,6%)         | Melo (2017)             |
| Austrália / Animais em cativeiro | <i>Macropus rufus</i>          |                             |                     |                         |
|                                  | <i>Macropus fuliginosus</i>    |                             |                     |                         |
|                                  | <i>Macropus rufus</i>          |                             |                     |                         |
|                                  | <i>Macropus parma</i>          |                             |                     |                         |
|                                  | <i>Macropus eugenii</i>        |                             |                     |                         |
|                                  | <i>Petrogale xanthopus</i>     |                             | 28/209              |                         |
|                                  | <i>Setonix brachyurus</i>      |                             | (13,4%)             |                         |
|                                  | <i>Potorous tridactylus</i>    |                             |                     |                         |
|                                  | <i>Phascolarctos cinereus</i>  | <i>G. duodenalis</i>        |                     | Thompson et al. (2008)  |
|                                  | <i>Aepyprymnus rufescens</i>   |                             |                     |                         |
| Austrália / Animais selvagens    | <i>Dasyurus maculatus</i>      |                             |                     |                         |
|                                  | <i>Lasiorhinus latifrons</i>   |                             |                     |                         |
|                                  | <i>Trichosurus cunninghami</i> |                             |                     |                         |
|                                  | <i>Trichosurus vulpecula</i>   |                             | 29/212              |                         |
|                                  | <i>Phascolarctos cinereus</i>  |                             | (13,7%)             |                         |
| Austrália / Área urbana          | <i>Wallabia bicolor</i>        |                             |                     |                         |
|                                  | <i>Macropus fuliginosus</i>    |                             |                     |                         |
|                                  | <i>Isoodon obesulus</i>        | <i>G. duodenalis</i>        | 9/14 (64,3%)        | Thompson et al. (2010)  |
| Sudeste da Austrália             | <i>Petrogale penicillata</i>   | <i>G. duodenalis</i>        | 20/318 (6,3%)       | Vermeulen et al. (2015) |
| Austrália / Área urbana          | <i>Isoodon obesulus</i>        | <i>Giardia</i> spp.         | 53/126<br>(42,3%)   | Hillman et al. (2017)   |

### 3.2.3- Epidemiologia molecular de *Giardia* spp.

Com o avanço das técnicas de diagnóstico molecular está sendo possível estudar o potencial zoonótico e diversidade genética de *G. duodenalis*. As primeiras classificações através do estudo molecular denominaram que a espécie possuía os grupos Nasg 1 a 3, genótipos “Poland” e “Belgium”, genótipos A e B divididos em subgenótipos A-I, A-II, B-II, B-III e B-IV (JUNIOR, 2015). Dentre estes subgenótipos foi possível determiná-los através da caracterização genética utilizando os genes triose fosfato isomerase (*tpi*), glutamato desidrogenase (*gdh*),  $\beta$ -giardina (*bg*), a menor subunidade ribossomal do gene do ácido ribonucleico ribossômico (*SSU rRNA*) (NG et al., 2005; LEE et al., 2006; CACCIÓ et al., 2008; HEYWORTH, 2016), além dos genes fator de alongação 1 $\alpha$  (*ef1 $\alpha$* ), genes da proteína de superfície variante (*vps*), *open reading frame* C4 (GLORF-C4) e a região espaçadora intergenômica *rRNA* (IGS) (JUNIOR, 2015).

Os estudos demonstram um nível elevado da diversidade genética de *G. duodenalis*, mostrando um complexo, subdividido em sete (7) genótipos A, B, C, D, E, F, G (THOMPSON, 2004; PLUTZER et al., 2010; CUNHA, 2017; XIAO; FENG, 2017). Até o momento somente os genótipos A com subgenótipo I e genótipo B, isolados de uma variedade de hospedeiros como mamíferos domésticos e animais selvagens, são detectados em humanos, sendo um potencial zoonótico (SANTOS, 2011; CUNHA, 2017).

Se tratando de caráter zoonótico, estudos tentam relacionar virulência e sintomas diante dos genótipos de *Giardia*. Diferentes genótipos podem ser responsáveis pela produção de metabólitos e toxinas diferentes, o que poderá influenciar a patogenicidade do protozoário, mas ainda não está totalmente elucidada mesmo com muitos estudos, em relacionar um dado genótipo com determinada sintomatologia (MARQUES, 2015). Estudos de Sahagún et al. (2008), Yaoyu e Xiao (2011) sugerem o genótipo A como o mais virulento, quando comparado com o genótipo B. No entanto, outros estudos apresentaram controvérsias em seus resultados, onde em crianças na Arábia Saudita, apresentaram sintomas estando parasitadas com o genótipo B e que os subgenótipos AI e AII foram identificados nas infecções assintomáticas (MARQUES, 2015). Também o genótipo B foi associado mais

prevalente a crianças e adultos da Etiópia com sintomas de giardíase (GELANEW et al., 2007). Algumas evidências podem tentar explicar sobre as informações descritas anteriormente, no qual fatores relacionados como o hospedeiro também são importantes no desenvolvimento ou não de sintomatologia e de sua virulência (LEBBAD et al., 2011; MARQUES, 2015).

Outros genótipos como o C e D são exclusivos de cães, o genótipo E é restrito a animais de produção como bovinos, suínos, ovinos, o genótipo F exclusivo de gatos e o genótipo G somente de roedores (Quadro 1) (HOPINKS et al., 1997; SOUZA et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008; SANTOS, 2011; LEAL, 2013).

Na literatura, alguns estudos sobre a diversidade de genótipos e subgenótipos zoonóticos de *G. duodenalis* em animais vêm sendo cada vez mais observados. Um estudo na Austrália utilizando o gene *18S rRNA* para detectar *Giardia* em amostra de espécies de marsupiais demonstrou genótipos A nas espécies *Macropus rufus*, *M. fuliginosus*, *M. parma*, *M. eugenii*, *Petrogale xanthopus*, *Setronix brachyurus*, *Potourus tridactylus* e genótipos B em *Macropus rufu*, *M. parma*, *M. eugenii* e *Dasyurus maculatus* (THOMPSON et al., 2008).

A prevalência de genótipos B foi detectada em amostras de castores, coelhos e rato almiscado (*Ondatra zibethicus*) utilizando análise molecular a partir do gene *tpi* (SULAIMAN et al., 2003). No estudo de Abe e colaboradores (2005) investigando amostra de um furão (*Mustela putorius furo*) revelou em análise molecular através dos genes *18S rRNA*, *bg* e *tpi* o subgenótipo A-I. Subgenótipos A-I, B-III e B-IV já foram identificados em animais selvagens como raposa, macacos e búfalo (CACCIO; RYAN, 2008; KARIM et al., 2015). Em populações de marsupial, uma espécie ameaçada, Canguru-da-rocha (*Petrogalle penicillata*), foi identificado através do gene *18S rRNA* os genótipos zoonóticos A e B, com subgenótipos AI e BIV pelos genes b-giardina (*bg*) e glutamato desidrogenase (*gdh*) respectivamente (VERMEULEN et al., 2015). No sul do Brasil, um estudo realizado com amostras de humanos e animais domésticos (cães), revelou nos isolados subgenótipos A-I, A-II, B-III, B-IV de *G. duodenalis* (COLLI, et al., 2015) Genótipos A e E foram identificados em cordeiros na Argélia a partir dos genes triose-fosfato isomerase (*tpi*) e *gdh* (SAHRAOUI et al., 2019).

| Espécies/ Genótipos             | Hospedeiros  | Referência                  |
|---------------------------------|--|-----------------------------|
| <i>Giardia agilis</i>           | Anfíbios   | Kunstler, 1882              |
| <i>Giardia ardea</i>            | Aves   | Noller, 1920                |
| <i>Giardia psittaci</i>         | Aves   | Erlandsen ; Bemrick, 1987   |
| <i>Giardia muris</i>            | Roedores   | Benson, 1908                |
| <i>Giardia microti</i>          | Roedores   | Benson, 1908                |
| <i>Giardia duodenalis</i>       | Mamíferos  | Davaine, 1875               |
| <i>Giardia duodenalis</i> A     | Homem e mamíferos domésticos e silvestres  |                             |
| <i>Giardia duodenalis</i> B     | Homem, primatas, cães, bovinos, equinos, roedores                                |                             |
| <i>Giardia duodenalis</i> E     | Ruminantes domésticos, suínos  | Ortega-Pierre et al., 2009; |
| <i>Giardia duodenalis</i> F     | Gatos domésticos   | Feng; Xiao, 2011            |
| <i>Giardia duodenalis</i> G     | Roedores   |                             |
| <i>Giardia duodenalis</i> C e D | Canídeos   |                             |
| <i>Giardia enterica</i> B       | Humanos e outros primatas, cães, gatos, e algumas espécies de animais silvestres |                             |
| <i>Giardia canis</i> C/D        | Cães e outros canídeos   | Thompson; ASH, 2016         |
| <i>Giardia bovis</i> E          | Bovinos e outros ungulados   |                             |
| <i>Giardia cati</i> F           | Gatos  |                             |
| <i>Giardia simondi</i> G        | Ratos  |                             |

Quadro 1- Espécies e genótipos de *Giardia* spp. e seus respectivos hospedeiro susceptíveis.

Fonte: Adaptado de Santos, (2011) e Thompson; Ash, (2016).

### 3.3- Histórico e Taxonomia de *Cryptosporidium* spp.

O gênero *Cryptosporidium* foi descrito pela primeira vez por Tyzzer (1910), em camundongos e denominado *Cryptosporidium muris*. O mesmo autor no ano de 1912 identificou uma nova espécie no intestino de camundongo, denominando-o de *C. parvum*. No ano de 1955, houve a primeira ocorrência relatada de criptosporidiose em perus com diarreia e um novo relato só ocorreu em 1971 em vitelos. Cinco anos após, os primeiros casos em humanos foram relatados, e a doença começou a ganhar importância mundial, principalmente nos casos da infecção em humanos, com mais ocorrência em crianças e indivíduos imunocomprometidos infectados pelo Vírus da imunodeficiência humana (HIV) (ABEYWARDENA et al., 2015).

Segundo Dillinghan et al. (2002), uma variedade de espécies são acometidas pelo coccídio, a saber; peixes, répteis, anfíbios, aves e mamíferos. *Cryptosporidium* spp. é um parasita intestinal comum de humanos, animais domésticos e selvagens (HUNTER; THOMPSON, 2003).

O gênero *Cryptosporidium* é classificado taxonomicamente como pertencente



ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Subclasse Coccidia, ordem Eucoccidii, Subordem Eimeriina e como único representante da Família Cryptosporidiidae (THOMPSON et al., 2003; PLUTZER; KARANIS, 2009). Vários são os questionamentos sobre sua classificação taxonômica, embora seja ainda considerado um coccidio (PINTO, 2016).

Dados moleculares recentes permitiram analisar e sugeriram que o gênero encontra-se filogeneticamente mais próximo da subclasse Gregarina, parasitos de invertebrados do que os protozoários de vertebrados (FAYER; XIAO, 2007). Este fato é baseado na existência de uma fase no ciclo evolutivo, momento que ocorre o estágio extracitoplasmático; a presença de uma organela alimentar; a presença de dois tipos de oocisto, de parede espessa e de parede fina; a capacidade de autoinfecção por meio do oocisto de parede fina; e a resistência a todos os anticoccidianos, verificado em um estudo através da multiplicação da espécie *Cryptosporidium andersoni* em meio de cultura livre de células (MEIRELES, 2010; PINTO, 2016).

É um parasita monoxeno, realizando os estágios de desenvolvimento sexual e assexual no interior de um único hospedeiro (GRECA, 2010). A via de infecção se dá através da ingestão de oocistos esporulados, a única fase do ciclo encontrado fora do hospedeiro sendo a principal forma infectante do protozoário transmitido através da água e alimentos contaminados (FAYER et al., 2000; THOMPSON et al., 2003; FAYER, 2004; FAYER, 2008). A morfologia de espécies de *Cryptosporidium* apresenta-se muito semelhante e, portanto, no estudo da taxonomia deste gênero há a necessidade da utilização de ferramentas moleculares juntamente com avaliações morfológicas, biológicas e também do conhecimento da especificidade de hospedeiros (XIAO; CAMA, 2018; HOMEM, 2016).

### **3.3.1- Características morfológicas e Ciclo evolutivo de *Cryptosporidium*.**

Os oocistos possuem formato esférico ou ovoide e com tamanhos variados entre as espécies (RIGO; FRANCO, 2002). O gênero de *Cryptosporidium* possui oocistos infectantes (forma esporulada), apresentando quatro esporozoítas dentro do oocisto com ausência de um esporocisto, além do resíduo do oocisto (TYZZER, 1912). Os

tamanhos dos oocistos variam um pouco entre as espécies, a saber: *C. parvum* possui variação de tamanho não ultrapassando 4,5 µm de diâmetro (TYZZER, 1912; FAYER, 2007), um pouco menor que a espécie *C. muris* (TYZZER, 1907; FAYER, 2010; COUTO; BOMFIM, 2012).

Uma vez ocorrendo à ingestão do oocisto por um hospedeiro susceptível, os quatro esporozoítos serão liberados e irão invadir e parasitar as células epiteliais do trato gastrointestinal e, posteriormente transformando-se em trofozoítos. Nesta fase, inicia-se a reprodução assexuada do parasita, no qual ocorre a merogonia dando origem aos merontes, contendo merozoítas que invadem novas células e sofrem gametogênese (micro ou macrogametócitos), e após a fertilização dão origem aos oocistos. Estes tem parede fina que promovem a autoinfecção e os de parede grossa sendo liberados pelas fezes para o meio ambiente (Figura 2) (FAYER, 2004; FAYER; XIAO, 2007).

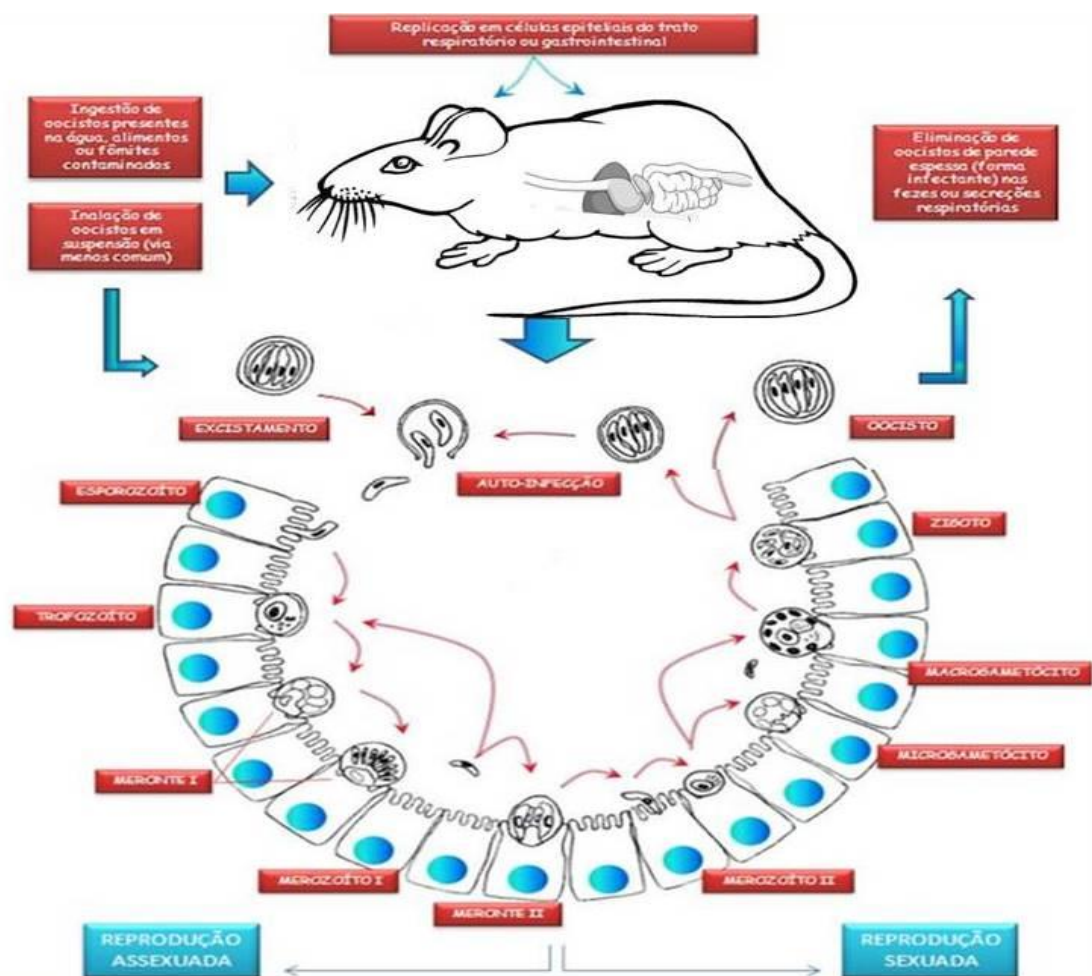


Figura 2- Ciclo evolutivo de *Cryptosporidium* spp.  
Fonte: Adaptado de Santos (2011).

### 3.3.2- Prevalência da criptosporidiose

Espécies de *Cryptosporidium* como *C. parvum* e *C. hominis* são espécies prevalentes em humanos (ZAHEDI et al., 2018), *C. ubiquitum* e *C. cuniculus* são reconhecidos como agentes emergentes em humanos (LI et al., 2015). Alguns estudos relataram em humanos as espécies *C. canis*, *C. felis*, *C. muris*, *C. suis*, *C. erinacei* e *C. scrofarum* (RYAN et al., 2017). *C. fayeri* considerado uma espécie de animais silvestres (Marsupial), já foi relatado em humanos (WALDRON et al., 2010). *Cryptosporidium* possui ocorrência mundial, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento atingindo diversas populações como urbanas e rurais.

A alta prevalência nos países em desenvolvimento deve-se a falta de saneamento, instalações inadequadas e tratamento (MEINHARDT, 1996; ABEYWARDENA et al., 2015).

Tratando-se de um agente com potencial zoonótico, a espécie *Cryptosporidium parvum* afeta preferencialmente pessoas idosas e crianças com idade de até três anos, porém, estudos realizados relataram que crianças são mais propensas a infecção chegando a 19% dos casos em domicílio (DILLINGHAN et al., 2002; FAYER, 2004). Estima-se em um estudo mundial que a ocorrência de diarreia oscile entre 1,7 e 4,6 bilhões de casos por ano, e aproximadamente 2,2 milhões de mortes associadas á criptosporidiose (ZAHEDI et al., 2018). A organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) realizaram um ranking global com 24 parasitas mais importantes transmitidos por alimentos, onde *Cryptosporidium* foi classificado em quinto lugar, dado este publicado em 2012 (SNAK et al., 2017).

Como sendo um protozoário que pode contaminar o meio ambiente e até mesmo a água, órgãos legislativos demonstraram a importância de priorizar a qualidade dos recursos hídricos para a água de abastecimento público (FRANCO et al., 2012), haja vista que não existem informações concretas sobre ocorrência deste patógenos, em rios e reservatórios, devido à carência de sistemas adequados de detecção e vigilância (RYAN et al., 2014; ALMEIDA, 2015). Mas diante da possível contaminação hídrica, a vigilância sanitária brasileira através da Portaria nº 2.914, publicada em 14 de dezembro de 2011, integra recursos de monitoramento para

assegurar a qualidade da água consumida pela população como forma de prevenção (BRASIL, 2013).

A ocorrência de Criptosporidiose em mamíferos silvestres geralmente é baixa. Essa baixa prevalência ocorre principalmente em animais de vida livre, com percentuais de 1% a 8%. No entanto, animais em cativeiro, a prevalência pode atingir até 74% (FAYER; XIAO, 2007; SANTOS, 2011). Em áreas urbanas o parasitismo em animais sinantrópicos ocorre variando de 40% a 80% (HILL et al., 2008; SILVA, 2016). Outros dados referentes à ocorrência principalmente em roedores e marsupiais são descritas na Tabela 2.

**Tabela 2-** Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em roedores e marsupias.

| Localidade               | Hospedeiros                      | Espécie  | Positivos (%)   | Referência                   |
|--------------------------|----------------------------------|--|-----------------|------------------------------|
| São Paulo - SP           | <i>Akodon montensis</i>          |  |                 |                              |
|                          | <i>Thaptomys nigrita</i>         | <i>C. muris</i>  | 3/25 (12%)      | Lallo et al., 2009           |
|                          | <i>Sciurus aestuan</i>           |  |                 |                              |
| Alegria - RS             | <i>Myocastor coypus</i>          | <i>Cryptosporidium</i>                                     | 2/7 (28,57%)    | Silva et al., 2007           |
| Umuarama - PR            | <i>Mus musculus</i>              | <i>Cryptosporidium</i> spp.                                |                 |                              |
|                          | <i>Rattus rattus</i>             | <i>C. muris</i> /<br><i>Cryptosporidium</i> spp.           | 35,5% (16/45)   | Silva, 2013                  |
| Região sudeste (MG - RJ) | <i>Akodon serrensis</i>          | <i>C. parvum</i> / <i>C. muris</i>                         | 4/39 (10,3%)    | Dall'Olio; Franco, 2004      |
|                          | <i>Oryzomys ratticeps</i>        | <i>C. parvum</i>   |                 |                              |
| Pantanal                 | <i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> | <i>C. wairi</i>  | 5/41 (12,2%)    |                              |
|                          | <i>Myocastor coypus</i>          | <i>C. wairi</i>  | 2/12 (16,6%)    | Santos, 2011                 |
|                          | <i>Oecomys catherinae</i>        | <i>C. wairi</i>  | 2/13 (15,38%)   |                              |
| São Paulo                | <i>Hamsters</i>                  | <i>C. muris</i>  | 6/386 (13,64%)  |                              |
|                          | <i>Chinchilas</i>                | <i>C. parvum</i> / <i>C. muris</i>                         | 5/386 (11,36%)  | Souza, 2015                  |
|                          | <i>Porquinho da india</i>        | <i>Cryptosporidium</i> sp.                                 | 4/386 (9,09%)   |                              |
|                          | <i>Camundongo</i>                | <i>C. tyzzeri</i> / <i>C. muris</i>                        | 4/386 (9,09%)   |                              |
| Polônia                  | <i>Apodemus agrarius</i>         | <i>C. parvum</i> / <i>C. ubiquitum</i>                     | 164/266 (61,7%) |                              |
|                          | <i>Apodemus flavicollis</i>      | <i>C. ubiquitum</i>  | 181/266 (68,3%) | Perec-Matysiak et al. (2015) |
|                          | <i>Myodes glareolus</i>          | <i>C. ubiquitum</i>  | 181/266 (68,1%) |                              |
| Japão                    | <i>Apodemus speciosus</i>        | <i>C. ubiquitum</i>  | 26,6% (4/15)    | Murakoshi et al., 2013       |
| Reino Unido              | <i>Clethrionomys glareolus</i>   | <i>C. parvum</i>   | 9/123 (9%)      |                              |
|                          | <i>Mus domesticus</i>            | <i>C. parvum</i>   | 52/242 (22%)    | Chalmers et al., 1997        |
|                          | <i>Apodemus sylvaticus</i>       | <i>C. parvum</i>   | 48/230 (21%)    |                              |
| China                    | <i>Roedores selvagens</i>        | <i>C. parvum</i>   | 83/723 (11,5%)  | Chaochao et al., 2009        |
|                          | <i>Roedores de pet</i>           | <i>C. wairi</i>  |                 |                              |
| Rio de Janeiro -RJ       | <i>Didelphis aurita</i>          | <i>Cryptosporidium</i> spp.                                | 4/5 (80%)       | Pinto, 2016                  |
| Pantanal                 | <i>Monodelphis domestica</i>     | <i>C. wairi</i>  | 2/34 (6%)       | Santos, 2011                 |
| Rio Grande do Sul -RS    | <i>Didelphis albiventris</i>     | <i>Cryptosporidium</i> sp.                                 | 3/6 (50%)       | Zanette et al., 2008         |
| Recife                   | <i>Didelphis albiventris</i>     | <i>Cryptosporidium</i> spp.                                | 5/6 (83,3%)     | Silva, 2016                  |
| Austrália                | <i>Bandicoots</i>                | <i>C. parvum</i>   | 12/98 (12,2%)   | Dowle et al., 2013           |
| Austrália                | <i>Trichosurus vulpecula</i>     | <i>C. parvum</i> / <i>C. fayeri</i> / <i>C. macropodum</i> | 7/15 (47%)      | Hill et al., 2008            |

### 3.3.3- Epidemiologia molecular de *Cryptosporidium* spp.

A classificação através da caracterização genotípica vem permitindo conhecer e identificar de forma específica o gênero *Cryptosporidium*. Considerado como espécies zoonóticas, *C. parvum* e *C. hominis* estão intimamente relacionados a surtos esporádicos em seres humanos, sendo o primeiro responsável pela maioria dos casos em humanos (HUNTER; THOMPSON, 2003; LI et al., 2014). Outra espécie considerada uma zoonose é o *C. ubiquitum*, previamente conhecido por acometer cervídeos, atualmente está sendo considerada mais uma importante espécie zoonótica emergente que infecta humanos (LI et al., 2014). Para o gênero *Cryptosporidium* atualmente já foram descritas mais de 20 espécies (Quadro 2) e 40 genótipos diferentes (FAYER, 2010).

Estudos ao longo dos anos vêm demonstrando que o protozoário possui uma significativa especificidade por hospedeiros, este fato é notado pelas características semelhantes entre os genótipos existentes em grupos de animais mais próximos, sendo mais evidenciado em mamíferos. A exemplo pode citar genótipos encontrados em canídeos silvestre, similares aos encontrados da espécie *C. canis*, de cães domésticos; outro exemplo são os genótipos de cervídeos e de bovinos pelo *C. bovis* (ZHOU et al., 2004; ORTEGA-PIERRE et al., 2009). No entanto, características de *C. parvum* vêm demonstrando controvérsia a esta análise, sendo a espécie capaz de infectar uma ampla variedade de hospedeiros, apontando esta espécie como de maior importância na transmissão em humanos, com elevado potencial zoonótico (FAYER; XIAO, 2007; SANTOS, 2011).

Dentre as espécies descritas na literatura, 34 são reconhecidas, mas somente 12 espécies tem maior ocorrência, sendo os mamíferos seus hospedeiros, são eles: *C. andersoni*, *C. hominis*, *C. parvum*, *C. canis*, *C. felis*, *C. wairi*, *C. suis*, *C. muris*, *C. bovis*, e espécies mais recentes como, *C. fayeri*, *C. ryanai* e *C. macropodum* (ORTEGA-PIERRE et al., 2009; FAYER, 2010; RYAN et al., 2014; ZAHEDI et al., 2018). Algumas outras espécies do gênero somente foram identificadas a partir de isolados de oocistos através da genotipagem pela sequência genética, sendo o mais recente relato o genótipo encontrado em cervídeos. Com base nas características biológica e molecular, este isolado foi denominado de *C. ubiquitum*, por sua

distribuição geográfica ampla e por afetar uma variedade de espécies hospedeiras (FAYER, 2010).

| Espécies              | Principais Hospedeiros                    | Referência                               |
|-----------------------|---|--|
| <i>C. andersoni</i>   | Bovinos, camelos                          | Lindsay et al., 2000                     |
| <i>C. baileyi</i>     | Aves                                      | Current et al., 1986                     |
| <i>C. bovis</i>       | Bovinos                                   | Fayer et al., 2005                       |
| <i>C. canis</i>       | Cães                                      | Fayer et al., 2001                       |
| <i>C. fayeri</i>      | Canguru vermelho                          | Ryan et al., 2008                        |
| <i>C. fragile</i>     | Anfíbios                                  | Jirku et al., 2008                       |
| <i>C. felis</i>       | Gatos                                     | Iseki, 1979                              |
| <i>C. galli</i>       | Aves                                      | Pavlašek, 1999                           |
| <i>C. hominis</i>     | Seres humanos, macacos                    | Morgan-Ryan et al., 2002                 |
| <i>C. macropodum</i>  | Canguru cinza                             | Power ; Ryan, 2008                       |
| <i>C. meleagridis</i> | Perus, seres humanos                      | Slavin, 1955                             |
| <i>C. molnari</i>     | Peixes                                    | Alvarez-Pellitero; Sitjà-Bobadilla, 2002 |
| <i>C. muris</i>       | Roedores                                  | Tyzzler, 1910                            |
| <i>C. parvum</i>      | Bovinos, outros ruminantes, seres humanos | Tyzzler, 1912                            |
| <i>C. ryanae</i>      | Bovinos                                   | Fayer et al., 2008                       |
| <i>C. scophthalmi</i> | Peixes                                    | Alvarez-Pellitero et al., 2004           |
| <i>C. serpentis</i>   | Serpentes                                 | Levine, 1980                             |
| <i>C. suis</i>        | Suínos                                    | Ryan et al., 2004                        |
| <i>C. varanii</i>     | Lagarto monitor                           | Pavlašek et al., 1995                    |
| <i>C. xiaoi</i>       | Ovinos                                    | Fayer; Santín, 2009                      |
| <i>C. wrairi</i>      | Porquinho da Índia                        | Vetterling et al., 1971                  |

Quadro2- Espécies de *Cryptosporidium* spp. e seus respectivos hospedeiro susceptíveis.

Fonte: Adaptado de Ryan et al., 2014.

O gênero *Cryptosporidium* possui uma variabilidade genética já relatada, onde, por meio de marcadores específicos, a exemplo a utilização de *primer* através do gene *18S rRNA* (SSU) pela sequência específica conservada da região permitiu detectar todos os *Cryptosporidium* spp. (XIAO; FENG, 2017). Estudos filogenéticos por polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) foram também realizado para diferenciar várias espécies e genótipos das espécies de *Cryptosporidium* (Quadro 3) (JEX; GASSER, 2010; RYAN et al., 2014; XIAO; FENG, 2017). Ressalva que a infecção por *C. parvum* em humanos está intimamente relacionada com as condições socioeconômicas do país, áreas de endemismo e atuação de animais na contaminação ambiental. Esses fatores podem refletir nas formas de transmissão do agente que possui grande importância e com elevado potencial zoonótico (FENG et al.,

2018).

O conhecimento da capacidade de virulência pode ser associado a algumas espécies, a exemplo *C. parvum* pode sofrer recombinação meiótica entre diferentes linhagens. Isso pode desempenhar um papel importante na evolução dos subtipos virulentos (AVENDAÑO; AMAYA, 2017).

| Espécies              | Subgenótipos   | Referências           |
|-----------------------|--|-----------------------|
| <i>C. hominis</i>     | Ia; Ib; Ic; Id; Ie; If; Ig; Ih; Ii; Ij                                   |                       |
| <i>C. parvum</i>      | IIa; IIb; IIc; IId; IIe; IIf; IIg<br>IIh; IIi; IIj; III; IIIm; IIIn; IIo | Xiao, 2010            |
| <i>C. meleagridis</i> | IIIa; IIIb; IIIc; IIId; IIIe; IIIf; IIIg                                 | Jex; Gasser, 2010     |
| <i>C. fayeri</i>      | IVa; IVb; IVc; IVd; IVe; IVF   |                       |
| <i>C. cuniculus</i>   | Va; VB   | Ryan et al., 2014     |
| <i>C. Wrairi</i>      | VIIa   |                       |
| Genótipo furão        | VIIIa  | Xiao; Feng, 2017      |
| <i>C. tyzzeri</i>     | IXb; IXb   |                       |
| Genótipo Mink         | Xa   | Sulaiman et al., 2005 |
| Genótipo gamba        | XIa  |                       |
| Genótipo I gambá      | XIa  | Feng et al., 2011     |
| <i>C. ubiquitum</i>   | XIIa; XIIb; XIIc; XIId; XIIE; XIIIf                                      |                       |
| <i>C. erinacei</i>    | XIIIa  | Li et al., 2014       |

Quadro 3- Espécies de *Cryptosporidium* spp. com os principais subgenótipos  
Fonte: Adaptado de Ryan et al., 2014.

Estudos na literatura descreveram genótipos e subgenótipos de *Cryptosporidium* em seres humanos e animais. Meireles et al. (2007), utilizando amplificação de genes de 18S rRNA e *gp60* permitiram identificar um isolado bovino de *C. parvum*, subgenótipo IIa em amostra fecal de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*), sendo este o primeiro relato da infecção neste roedor no Brasil.

Análise filogenética em ratos selvagens australianos permitiu identificar genótipos I e II (FOO et al., 2007). Análise molecular a partir do *gp60* permitiu identificar genótipos e subgenótipos das espécies *C. parvum* e *C. hominis* em amostras de bezerros nas regiões de Canterbury na Nova Zelândia. Ainda, novos registros de subgenótipos foram encontrados, e dois subgenótipos sendo estes frequentemente encontrados nos humanos em vários países (ABEYWARDENA et al., 2012).

No Brasil, estado do Paraná foi realizado um estudo em roedores *Mus musculus* e *Rattus rattus* capturados em área urbana, onde detectou a presença através de estudo molecular *Cryptosporium muris* e genótipos II e III (SILVA et al., 2013), sendo o genótipo II de caráter zoonótico. Um estudo realizado a partir do marcador *gp60* em amostras de humanos, bovinos e ovinos, detectou quatro espécies, *C. parvum*, *C. hominis*, *C. cuniculus* e *C. erinacei*, determinando os subgenótipos IIa, IIc, IId e IIe para *C. parvum*, e subgenótipos Ia, Ib, Id, Ie, Ig e If para *C. hominis* e as duas últimas espécies foram detectados os subgenótipos Vb e XIIIa respectivamente (GARCIA-R et al., 2017).

Outro estudo na Europa com amostras de roedores das espécies *Myodes glareolus*, *Apodemus agrarius*, *Apodemus flavicollis*, *Rattus norvegicus* identificou através dos genes *18S rRNA* e *gp60* as espécies *C. parvum* com subgenótipos IIa, IIc e IId, genótipo I e II de *C. muskrat*, *C. hominis* com subgenótipo Ib, além de identificar *C. suis* e *C. scrofarum* (DANISOVÁ et al., 2017). Subgenótipos de *C. hominis* (Id; Ib), *C. fayeri* (IVg; IVa; IVf) foram encontrados em Cangurus através do gene *gp60* em um estudo na Austrália (ZAHEDI et al., 2018).

Santos (2013) identificou em espécies de roedores; *Oecomys catherinae*, *Myocastor coypus*, *H. hidrochaeris* e marsupiais; *Monodelphis domestica* com genótipos e subgenótipos através dos genes *gdh*, *bg* e *SSU rDNA G. duodenaes* com AI e *C. wrairi* com genótipos III e IV. Com base no estudo de Sahraoui e colaboradores (2019) na Argélia, identificaram em amostras fecais de cordeiros através do gene *gp60*, a espécie de *C. parvum* dois subgenótipos IIa e um subgenótipo IId, como também foi detectado a espécie de *C. ubiquitum* nas amostras.

Um estudo com amostras fecais de bovinos em três cidades de Nova York, utilizando para genotipagem o gene *18S rRNA* e para subtipagem o gene *gp60*, determinaram a espécie *C. parvum* e subgenótipo IIa respectivamente (GHARIEB et



al., 2019). Outros estudos com amostras de bovinos detectando subgenótipos IIa, IIb, IIIa a partir do gene *gp60* já foram relatados em alguns países como Estados Unidos, Canadá, Eslovênia, Ungria, Sérvia, Alemanha, Bélgica, Portugal, Espanha, Itália, Austrália, Japão e Índia (XIAO, 2010).

### **3.4- Histórico e Taxonomia de *Eimeria* spp.**

Inicialmente, Leeuwenhoek (1674), em seus estudos observando microscopicamente a bile de um coelho, identificou *Eimeria stiedai* como um dos primeiros organismos deste gênero no período do século XVII (HAMMOND et al., 1973). Assim, o gênero *Eimeria* foi proposto por Schneider em 1875; essa descoberta foi a partir de estudos morfológicos dos oocistos esporulados, observando os quatro esporocistos contendo dois esporozoítos cada um. Os Eimeriídios são pertencentes ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidia, subordem Eimeriina e família Eimeriidae (LEVINE et al., 1980).

Espécies de *Eimeria* são consideradas protozoários intracelulares que infectam uma ampla gama de hospedeiros como mamíferos domésticos e selvagens, répteis, peixes e aves (ZANETTE et al., 2008; OLIVEIRA, 2011; HILLMAN et al., 2016). Afeta o trato intestinal sendo transmitido pela ingestão de oocistos esporulados (forma infectante), através do ambiente, alimentos e água contaminada (URQUHART et al., 1986; VIEIRA 2002; ZANETTE et al., 2008).

#### **3.4.1- Características morfológicas e Ciclo evolutivo de *Eimeria*.**

Algumas metodologias são utilizadas para identificação do gênero *Eimeria*, entre elas, exames de fezes e identificação dos oocistos, estudo dos sinais clínicos dos animais doentes e de lesões macroscópicas evidentes durante a necropsia (CARVALHO et al., 2011). Outros métodos são empregados para classificar as espécies, a saber: formato dos oocistos; cor dos oocistos; formato tetrazóico com esporocisto dispórico, presença ou ausência de capuz micropilar na região polar do oocisto, tempo mínimo de esporulação; período mínimo de pré-patência; localização

preferencial dos parasitas no intestino; tipo e localização das lesões características e patogenicidade (PRADO, 2005; AVELINO, 2010).

No entanto, o método de diagnóstico através da análise morfométrica de oocistos através da avaliação de aspectos importantes por meio das características específicas do parasita continua sendo uma das mais empregadas (HASSUM et al., 2007). Outra característica importante é o índice morfométrico que consiste na divisão dos diâmetros maior e menor do oocisto e esporocisto. Essa avaliação dos índices demonstra ser mais precisa para comparação entre as espécies do que o tamanho dos oocistos, mesmo sendo variável (VIDAL et al., 2014).

Na literatura alguns trabalhos identificaram espécies do parasita com base da morfologia e morfometria. Um estudo realizado com tamanduá-bandeira no Zoológico de Bauru, município de São Paulo, demonstrou a presença de oocistos de *Eimeria* nas fezes, constatando através da morfometria que se tratavam das espécies *E. escomeli*, *E. tamanduae* e *E. marajoensis* (FREITAS et al., 2006). Outros estudos também identificaram semelhança de morfometria entre os oocistos (LAINSON, 1968; GARDNER et al., 1991; LAINSON; SHAW, 1991).

Os estudos morfológicos e morfométrico são baseados na observação morfológica e medidas, dadas em micrômetro. As características principais para identificação são, tamanho, micrópole, resíduo de oocisto grânulo polar, corpo de stieda, corpo substieda, corpo parastieda, resíduo esporocisto, esporozoíto, corpo refratário e núcleo (BERTO et al., 2009). Os esporocistos podem apresentar parede lisa ou fina com estruturas morfológicas internas variáveis de espécie para espécie como: presença ou ausência de características como corpo de stieda, sub-stieda ou parastieda, resíduo e grânulos (FREITAS et al., 2006; FEHLBERG et al., 2018). Os esporozoítos muitas vezes são de difícil visualização, mas quando observados apresentam formatos curvados, alongados, paralelos, corpo refrátil elíptico e grânulos sub-esféricos (FREITAS et al., 2006).

*Eimeria* spp. possui o ciclo de vida monoxeno, no qual os estágios evolutivos ocorrem em um único hospedeiro, apresentando-se três fases: esporogonia que ocorre no meio ambiente e as outras duas fases, merogonia (reprodução assexuada) e gametogonia (reprodução sexuada), ocorrendo nas células intestinais do hospedeiro (FAYER; REID, 1982; VIEIRA, 2005; DA SILVA, 2009). Após a ingestão de

oocistos infectantes (esporulados), ao passarem pelo aparelho digestivo sofrem ação das enzimas digestivas sensibilizando a parede do oocisto e conseqüentemente sua ruptura, no qual ocorre o processo de excitação e a liberação de esporozoítos no intestino, invadindo as células intestinais.

A fase de merogonia, ou fase assexuada, ocorre com a multiplicação formando os merontes, conseqüentemente essa geração merogônica formam os merozoítos que rompem as células e invadem novas, formando os merontes de segunda e terceira geração. A depender da espécie de *Eimeria*, no hospedeiro, a fase de merogonia pode ocorrer no intestino delgado ou no início do intestino grosso (FAYER, 1980; FAYER; REID, 1982; DA SILVA, 2009; CHARTIER; PARAUD, 2012). No entanto, a maioria dos merozoítos de segunda geração abandona a fase de merogonia e invadem nova célula intestinal iniciando a fase sexual ou gametogonia (LEVINE, 1963; SOUZA, 2014).

Os merozoítos mudam para trofozoítos, e estes se diferenciam para macrogametócitos ou microgametócitos, iniciando a fase sexual ou reprodução sexuada. A formação do zigoto ocorre com a fertilização do macrogameta pelo microgameta, originando o oocisto imaturo. A eliminação do oocisto é feita pelo rompimento da célula intestinal liberando-os no lúmen intestinal sendo posteriormente eliminados juntamente com as fezes para o meio ambiente, (FIGURA 3) (DENIZ, 2009; SOUZA, 2014; HEKER, 2015). No ambiente, esse oocisto imaturo sofre esporogonia e torna-se esporulado ou maduro, com quatro esporocistos e dois esporozoítos no interior.



Figura 3- Ciclo evolutivo de *Eimeria* spp.  
Fonte: Heker, 2015.

### 3.4.2- Prevalência da eimeriose

A infecção pelo gênero *Eimeria* causa uma doença conhecida mundialmente por eimeriose ou coccidiose (FREITAS et al., 2005). A sua ocorrência causa a destruição das células intestinais devido à multiplicação do parasito e, assim, desencadeia enterite hemorrágica, com consequente eliminação de fezes diarreicas (SOUZA, 2014). Essa doença é de importância veterinária, acometendo uma gama de animais domésticos (mamíferos e aves) e animais selvagens (OLIVEIRA, 2011; SOUZA, 2014). A infecção pode causar doença leve à moderada ou ocorrer a forma assintomática (ZANETTE et al., 2008). No entanto, há espécies de *Eimeria* que possui uma importância mundial maior, ocasionando distúrbios entéricos graves, podendo resultar na morte de animais doentes (HILLESHEIM et al., 2016).

A infecção por *Eimeria* pode acometer vários animais, apontando os pequenos mamíferos silvestres. Roedores e marsupiais possuem predisposição a infecção pelo gênero *Eimeria*, tal relato é apresentado na Tabela 3.

**Tabela 3-** ocorrência de *Eimeria* spp. em roedores e marsupiais.

| Localidade             | Espécies                 | Hospedeiros                                       | Referência                  |
|------------------------|--------------------------|---|-----------------------------|
| Flórida - EUA          | <i>Eimeria kinsellay</i> | <i>Oryzomys palustris</i>                         | Bernard et al., 1971        |
| Rio Grande do Sul - RS | <i>E. trinidadensis</i>  | <i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>                  | Gurgel, 2008                |
|                        | <i>E. ichiloensis</i>    |   |                             |
|                        | <i>E. boliviensis</i>    |   |                             |
|                        | <i>Eimeria</i> spp.      |   |                             |
| Ilhéus - Bahia         | <i>E. trinidadensis</i>  | <i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>                  | Albuquerque, 2008           |
|                        | <i>E. ichiloensis</i>    |   |                             |
| Seropédica-Brasil      | <i>E. caviae</i>         | <i>Cavia porcellus</i>                            | Flausino et al., 2014       |
| Espírito santo- Brasil | <i>Eimeria</i> spp.      | <i>Chinchilla lanigera</i>                        | Petroneto et al., 2015      |
| Brasil                 | <i>E. didelphydis</i>    | <i>Didelphis aurita</i>                           | Carini, 1936                |
|                        | <i>E. haberfeld</i>      | <i>Caluromys philander</i>                        | Carini, 1937                |
|                        | <i>E. gambai</i>         | <i>Didelphis aurita</i>                           | Carini, 1938                |
| Sul da Índia           | <i>E. indianensis</i>    | <i>Didelphis virginiana</i>                       | Joseph, 1974                |
| Pará - Brasil          | <i>E. caluromydis</i>    | <i>Caluromys philander</i>                        | Laison; Shaw, 1989          |
|                        | <i>E. philander</i>      | <i>Philander opossum</i>                          |                             |
| Bolívia                | <i>E. cochabambensis</i> | <i>Marmosops dorothea</i>                         | Heckscher et al., 1999      |
|                        | <i>E. marmosopos</i>     | <i>Marmosops dorothea</i>                         |                             |
|                        | <i>E. micouri</i>        | <i>Micoureou constantaiae</i>                     |                             |
| Rio de Janeiro -RJ     | <i>E. gambai</i>         | <i>Didelphis aurita</i>                           | Teixeira et al., 2007       |
|                        | <i>E. rugosa</i>         |   |                             |
| Rio Grande do Sul - RS | <i>Eimeria</i> spp.      | <i>Didelphis albiventris</i>                      | Zanetti et a. 2008          |
| São José - Costa Rica  | <i>E. marmosops</i>      | <i>Didelphis marsupialis</i>                      | Valerio-Campos et al., 2015 |
| Uberlândia - Brasil    | <i>Eimeria</i> spp.      | <i>Gracilinanus agilis</i>                        | Strona et a., 2015          |
| Austrália              | <i>E. augustus</i>       | <i>Isoodon obesulus</i>                           | Hillman et al., 2016        |
|                        | <i>E. kanyana</i>        |   |                             |
| Sul da Bahia - Brasil  | <i>E. philander</i>      | <i>D. aurita</i>                                  | Fehlberg et al., 2018       |
|                        |                          | <i>G. agilis</i>                                  |                             |
|                        | <i>E. gambai</i>         | <i>Monodelphis americana</i>                      |                             |
|                        |                          | <i>Marmosa demerarae</i><br><i>marmosa murina</i> |                             |

### 3.4.3- Epidemiologia morfológica de *Eimeria* spp.

Com relação às características biológicas entre as espécies de *Eimeria*, pesquisas moleculares têm sido utilizadas devido à dificuldade de diagnóstico de algumas espécies pelo método morfológico (OLIVEIRA, 2011). No entanto, mesmo

apresentando alta sensibilidade e especificidade da técnica molecular, o estudo morfológico e morfométrico de oocistos ainda são a mais utilizada para identificação de espécies de *Eimeria* (HASSUM et al., 2002; GASSER, 2006; AHID et al., 2009). Vários trabalhos permitiram identificar o parasita através dos aspectos morfológicos e morfométricos e ainda identificar várias espécies de *Eimeria* em vários animais domésticos e selvagens (CARINI, 1936; LEVINE; IVENS, 1970; JOSEPH, 1974; LAINSON; SHAW, 1989; HECKSCHER et al., 1999; TEIXEIRA et al., 2007; HASSUM et al., 2007; FREITAS et al., 2006; SILVA, 2009; DENIZ, 2009; SOUZA, 2014; VALERIO-CAMPOS et al., 2015; STRONA et al., 2015; HILLMAN et al., 2016; FEHLBERG et al., 2018). Relatos na literatura demonstra a ocorrência do gênero *Eimeria* em animais silvestre, destacando os roedores e marsupiais.

## 8. ARTIGO CIENTÍFICO I

***EIMERIA* spp. (APICOMPLEXA: EIMERIIDAE) DE MARSUPIAIS (MAMMALIA: DIDELPHIMORPHIA) NA REGIÃO SUL DA BAHIA, BRASIL.**

Publicado na Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

V. 27, N. 4 Outubro/Dezembro de 2018

## *Eimeria* spp. (Apicomplexa: Eimeriidae) of marsupials (Mammalia: Didelphimorphia) in southern Bahia, Brazil

*Eimeria* spp. (Apicomplexa: Eimeriidae) de marsupiais (Mammalia: Didelphimorphia) na região sul da Bahia, Brasil

Hllytchakra Ferraz Fehlberg<sup>1</sup>; Pedro de Alcântara Brito Junior<sup>1</sup>; Martín Roberto del Valle Alvarez<sup>2</sup>; Bruno Pereira Berto<sup>3</sup>; George Rêgo Albuquerque<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, Ilhéus, BA, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, Ilhéus, BA, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil

Received April 21, 2018

Accepted August 06, 2018

### Abstract

The occurrence of *Eimeria* Schneider, 1875 in mammals of the order Didelphimorphia indicates the infection-predisposition of these animals, which in turn is mainly determined for their eating habits. The objective of this work was to evaluate the parasitism of *Eimeria* spp. in marsupials of the Atlantic Forest of the southern region of Bahia. Fecal samples were collected from marsupials captured in the regions of Ilhéus, Una, Belmonte and Mascote, with traps of the Sherman model (23 × 8 × 9 cm), Tomahawk (50 × 17 × 17 cm) and pitfall and analyzed by Sheather's modified centrifugal-flotation method. Oocysts were identified by microscopical evaluation of their morphology and morphometry. *Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826, *Gracilinanus agilis* Burmeister, 1854, *Monodelphis americana* Müller, 1776, *Marmosa demerarae* O. Thomas, 1905 and *Marmosa murina* Linnaeus, 1758 were parasitized by *Eimeria philanderi* Lainson & Shaw, 1989 and *Eimeria gambai* Carini, 1938. Mixed parasitism for these two coccidia was observed in two of the 56 marsupials sampled. In conclusion, this work registers new hosts for *E. philanderi* and *E. gambai*, as well as the state of Bahia as a new distribution site for these coccidia.

**Keywords:** Atlantic forest, parasitism, *Eimeria philanderi*, *Eimeria gambai*.

### Resumo

A ocorrência de *Eimeria* Schneider, 1875 em mamíferos da ordem Didelphimorphia, indica a predisposição à infecção desses animais, que, por sua vez, é determinada principalmente por seus hábitos alimentares. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o parasitismo por *Eimeria* spp. em marsupiais da Mata Atlântica da região Sul da Bahia. Amostras fecais foram coletadas de marsupiais capturados nas regiões de Ilhéus, Una, Belmonte e Mascote, com armadilhas do modelo de Sherman (23 × 8 × 9 cm), Tomahawk (50 × 17 × 17 cm) e queda e analisado pelo método de centrífugo flutuação modificado de Sheather. Os oocistos foram identificados pela avaliação microscópica de sua morfologia e morfometria. *Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826, *Gracilinanus agilis* Burmeister, 1854, *Monodelphis americana* Müller, 1776, *Marmosa demerarae* O. Thomas, 1905 e *Marmosa murina* Linnaeus, 1758 foram parasitados por *Eimeria philanderi* Lainson & Shaw, 1989 e *Eimeria gambai* Carini, 1938. Parasitismo misto para esses dois coccidios foi observado em dois dos 56 marsupiais amostrados. Em conclusão, este trabalho registra novos hospedeiros para *E. philanderi* e *E. gambai*, bem como o estado da Bahia como um novo local de distribuição para esses coccidios.

**Palavras-chave:** Mata atlântica, parasitismo, *Eimeria philanderi*, *Eimeria gambai*.

\*Corresponding author: George Rego Albuquerque. Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, Rodovia Jorge Amado, Km 16, Salobrinho, CEP 45662-900, Ilhéus, BA, Brasil. e-mail: [gralbu@uesc.br](mailto:gralbu@uesc.br)





## Introduction

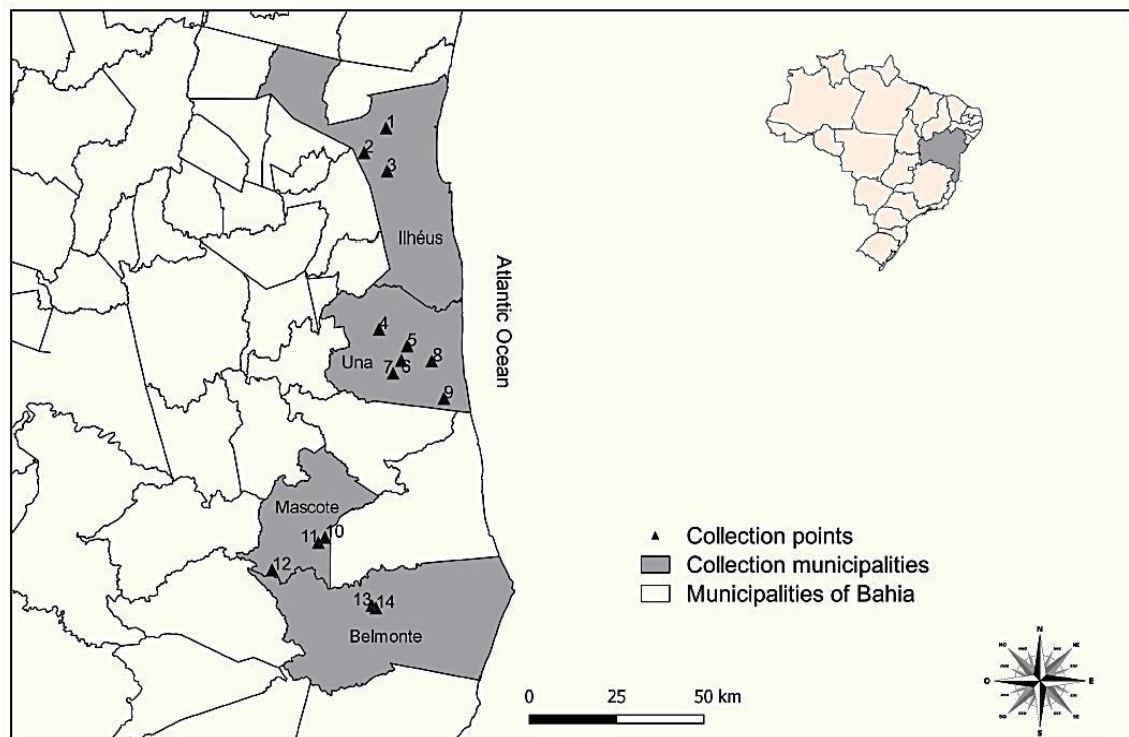
*Eimeria* Schneider, 1875 is an intracellular protozoan that infects a wide range of vertebrate hosts. Transmission occurs by ingestion of sporulated oocysts, by direct fecal/oral contact, or by ingestion of contaminated food or water (URQUHART et al., 1987; ZANETTE et al., 2008). Infection by this protozoan can be asymptomatic or cause mild to moderate disease in domestic and wild animals (ZANETTE et al., 2008).

*Eimeria* species have already been described in *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826) (CARINI, 1936, 1938; TEIXEIRA et al., 2007), *Caluromys philander* Linnaeus, 1758 (CARINI, 1937), *Didelphis virginiana* Kerr, 1792 (JOSEPH, 1974), *Philander opossum* Linnaeus, 1758 and *Caluromys philander* Linnaeus, 1758 (LAINSON & SHAW, 1989), *Marmosops noctivagus* Tschudi, 1844 and *Marmosa constantiae* O. Thomas, 1904 (HECKSCHER et al., 1999), *Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758 (FREITAS et al., 2006) and *Didelphis albiventris* Lund, 1840 (ZANETTE et al., 2008), *Didelphis marsupialis* Linnaeus, 1758 (VALERIO-CAMPOS et al., 2015) and *Gracilinanus agilis* Burmeister, 1854 (STRONA et al., 2015); however, some of these species possibly have been

erroneously identified, or at least they were not clearly described and differentiated. Furthermore, based on the scientific literature, there are no reports of *Eimeria* spp. from marsupials in the southern region of Bahia, Brazil, as well as are totally unknown their geographical distribution and host specificity. With this in mind, we designed the current study to survey coproparasites and identify *Eimeria* spp. from fecal samples of marsupials captured in forest areas of the Atlantic Forest of the Southern Bahia region.

## Material and Methods

This study covered 14 forest areas in four municipalities in the southern region of the State of Bahia, with three areas of cocoa agroforestry (cabruca) located in the rural area of Ilhéus (areas one to three), and eleven forest areas located in the municipalities of Una, Mascote and Belmonte (areas four to 14) (Figure 1). The study region has a tropical climate and tropical forest vegetation predominates (SAMBUICHI, 2002). All areas were located between 42 m and 100 m above sea level and were georeferenced with the Global Positioning System (GPS).



**Figure 1.** Map with data and areas of capture and collection of fecal samples of marsupials in southern Bahia, Brazil. Geographical coordinates of marsupial's collection points: 01: 14°38'15.8"S 39°12'02.3"W; 02: 14°42'11.2"S 39°15'34.8"W; 03: 14°45'04.0"S 39°11'51.2"W; 04: 15°09'57.8"S 39°13'10.1"W; 05: 15°12'35.9"S 39°08'37.4"W; 06: 15°14'53.1"S 39°09'34.3"W; 07: 15°16'54.5"S 39°10'54.2"W; 08: 15°14'59.0"S 39°04'41.0"W; 09: 15°20'53.0"S 39°02'43.5"W; 10: 15°42'53.6"S 39°21'52.6"W; 11: 15°43'40.9"S 39°22'56.7"W; 12: 15°48'01.9"S 39°30'23.8"W; 13: 15°53'40.4"S 39°14'19.2"W; 14: 15°54'03.0"S 39°13'40.4"W.

Marsupial capture was from June 2015 to December 2016 using Sherman (23 × 8 × 9 cm), Tomahawk (50 × 17 × 17 cm), and pitfall traps. Each area was divided into three plots, totaling 24 traps per plot and 72 traps per area. The study was licensed by the System of Authorization and Information on Biodiversity (SISBIO) number 17131-4 of the Brazilian Institute of Environment and Natural Renewable Resources (IBAMA) and the Council of Ethics in the Use of Animals of the State University of Santa Cruz - CEUA - UESC (No. 003/2013 and 021/2014).

After identification and collection of fecal samples, euthanasia was performed carried out through the intramuscular administration in the gluteal region of ketamine hydrochloride (30 mg/kg) associated with xylazine hydrochloride (2 mg/kg) according to Cubas et al. (2007). Euthanized marsupials were housed at the Universidade Estadual de Santa Cruz - Mammal Collection (CMARF-UESC). Feces with an approximate amount of 180-200 mg were collected and stored in 1.5 mL centrifuge tubes containing 2.5% potassium dichromate (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) in a ratio of 1: 3 and transported to the Laboratory of Veterinary Parasitology of the Universidade Estadual de Santa Cruz (LAPVET-UESC).

The samples were processed and examined by the modified flotation technique with 1.43 (g/L) density sucrose solution (500 g sucrose, 350 ml water) by centrifugation (5 min at 2000 rpm) described by Sheather (1923) and modified by Duszynski & Wilber (1997). All samples were observed under an Olympus BX51 microscope on the 20× objective and confirmed with a 40× objective. Positive samples were kept at 20–24°C, allowing aeration for seven days to ensure complete oocyst sporulation. Sporulated oocysts were observed, photomicrographed and measured using a 100× objective microscope and immersion oil, coupled to a digital camera connected to a computer using the Image - Pro Express 6.0 program. For specific identification, morphological

and morphometric guidelines described by Duszynski & Wilber (1997) and Berto et al. (2014) were used.

## Results

Fifty-six samples from *Didelphis aurita*, *Gracilinanus agilis*, *Monodelphis americana*, *Marmosa demerarae* and *Marmosa murina* were analyzed, and 58.92% (33/56) were positive for *Eimeria* oocysts (Table 1). After sporulation and morphological and morphometric study of oocysts and sporocysts (Table 2), were identified *Eimeria philanderi* Lainson and Shaw, 1989 (Figure 2A, B) and/or *Eimeria gambai* Carini, 1938 (Figure 2C, D). Mixed parasitism was observed in *M. murina* and *M. demerarae*.

*Eimeria philanderi* (Figure 2A, B) was identified from *D. aurita*, *M. americana*, *M. demerarae* and *M. murina*, at Una, Belmonte and Mascote in Southern Bahia, Brazil (Figure 1). Their oocysts sporulated in 7-8 days and were observed as sub-spherical, with a double-layered wall (the inner one being dark and occupying about 1/4 of the wall, and the outer one brown, with striations and projections occupying around 3/4 of the wall). Micropyle and oocyst residue were absent, but a polar granule was present. The sporocysts were ovoid, with prominent Stieda bodies, although the sub-Stieda was barely discernible. Parastieda bodies were absent. Sporocyst residue was present in the form of a few dispersed granules. The accompanying sporozoites had two refractile bodies. The morphometrics of *E. philanderi* isolated from each host species are compared in Table 2.

*Eimeria gambai* (Figure 2C, D) was identified from *G. agilis*, *M. demerarae* and *M. murina*, at Una, Belmonte and Mascote in Southern Bahia, Brazil (Figure 1). Their oocysts sporulated in 7-8 days and were observed as ellipsoids, with a double-layered

**Table 1.** Distribution of *Eimeria* species related to marsupials and their respective collection points as indicated in Figure 1, in southern Bahia, Brazil.

| Hosts                        | <i>Eimeria</i> spp.       | Nº of samples/Positive | Locality   |
|------------------------------|---------------------------|------------------------|--|
| <i>Didelphis aurita</i>      | <i>Eimeria philanderi</i> | 06/02                  | Area 7, Area 8   |
| <i>Monodelphis americana</i> | <i>Eimeria philanderi</i> | 07/04                  | Area 4, Area 14  |
| <i>Gracilinanus agilis</i>   | <i>Eimeria gambai</i>     | 05/04                  | Area 12, Area 14   |
| <i>Marmosa demerarae</i>     | <i>Eimeria philanderi</i> | 09/05                  | Area 4, Area 7, Area 8   |
|                              | <i>Eimeria gambai</i>     |                        | Area 4, Area 7, Area 8   |
| <i>Marmosa murina</i>        | <i>Eimeria philanderi</i> | 29/18                  | Area 4, Area 6, Area 7, Area 8, Area 9, Area 10, Area 11, Area 13, Area 14 |
|                              | <i>Eimeria gambai</i>     |                        | Area 8, Area 10, Area 12   |

**Table 2.** Morphometry of oocysts and sporocysts of *Eimeria* spp. identification of fecal samples of marsupials, from southern Bahia, Brazil.

| Hosts                        | species                   | Oocyst                      |                         | sporocyst                  |                         |
|------------------------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------|
|                              |                           | Size (µm)                   | Morphometric index (µm) | Size (µm)                  | Morphometric index (µm) |
| <i>Didelphis aurita</i>      | <i>Eimeria philanderi</i> | 23.40 ± 1.42 × 22.8 ± 1.93  | 1.02 ± 0.07             | 10.76 ± 1.08 × 8.65 ± 0.51 | 1.23 ± 0.09             |
| <i>Monodelphis americana</i> | <i>E. philanderi</i>      | 20.27 ± 1.79 × 19.45 ± 1.6  | 1.04 ± 0.03             | 8.74 ± 2.06 × 7.81 ± 1.30  | 1.11 ± 0.14             |
| <i>Gracilinanus agilis</i>   | <i>Eimeria gambai</i>     | 25.67 ± 3.22 × 18.67 ± 1.11 | 1.37 ± 0.16             | 9.46 ± 1.28 × 8.0 ± 0.64   | 1.18 ± 0.15             |
| <i>Marmosa demerarae</i>     | <i>E. philanderi</i>      | 22.12 ± 1.97 × 19.71 ± 1.51 | 1.02 ± 0.11             | 9.81 ± 1.94 × 7.94 ± 0.83  | 1.22 ± 0.16             |
|                              | <i>E. gambai</i>          | 26.30 ± 2.48 × 19.54 ± 1.04 | 1.34 ± 0.12             | 9.85 ± 1.52 × 8.27 ± 1.12  | 1.20 ± 0.21             |
| <i>Marmosa murina</i>        | <i>E. philanderi</i>      | 23.71 ± 2.80 × 20.67 ± 2.91 | 1.15 ± 0.11             | 9.86 ± 1.59 × 8.06 ± 1.04  | 1.22 ± 0.15             |
|                              | <i>E. gambai</i>          | 24.11 ± 1.81 × 18.67 ± 0.87 | 1.29 ± 0.08             | 9.61 ± 1.37 × 7.48 ± 0.53  | 1.28 ± 0.17             |



**Figure 2.** Photomicrographs of recovered and identified oocysts of fecal samples from marsupials in the southern region of Bahia: *Eimeria philanderi* in *Marmosa demerarae* (A) and *Didelphis aurita* (B); and *Eimeria gambai* in *Gracilinanus agilis* (C) and *Marmosa murina* (D) (scale bar = 10µm).

wall (the inner one being dark and occupying about 1/3 of the wall and the outer one brown, with striations and projectoins occupying about 2/3 of the wall). Micropyle, polar granule and oocyst residue were absent. The sporocysts were ovoid, with discrete Stieda bodies and sub-Stieda. Parastieda bodies were absent. Sporocyst residue was present in the form of a few dispersed granules. The accompanying sporozoites had two refractile bodies. The morphometries of *E. gambai* isolated from each host species are compared in Table 2.

## Discussion

To the best of our knowledge, the marsupials captured in this study have not been reported previously as hosts for *E. philanderi* and *E. gambai*. This represents the first novel finding of the current report. The oocysts of both species had morphological and morphometric characteristics that were very similar to the original descriptions, and to subsequent follow-up studies (CARINI, 1938; LAINSON & SHAW, 1989; TEIXEIRA et al., 2007).

*Eimeriaphilanderi* was identified in four species of marsupials in the present study. Their oocysts had morphometries (Table 2) similar to those originally described by Lainson & Shaw (1989). The morphology also corroborates with the studies of Lainson & Shaw (1989) and Heckscher et al. (1999), although in the present study, the presence of sub-Stieda and some differences in

the intensity of roughness, striations, and wall projections were observed.

*Eimeria gambai* had only previously been isolated from *Didelphis aurita* (CARINI, 1938; TEIXEIRA et al., 2007). Our current study now extends the host range to *G. agilis*, *M. demerarae* and *M. murina*. The *E. gambai* oocysts had morphometry (Table 2) similar to that originally described by Carini (1938) and later by Teixeira et al. (2007). The presence of sub-Stieda in the sporocyst, the absence of polar granules, and differences in the intensity of roughness in the wall were observed in oocysts of this study. However, these differences were insufficient to warrant the announcement of a new species.

The delimitation of coccidian species has been discussed since the beginning of parasitology. Traditionally, the description of the new species follow the guidelines of Duszynski & Wilber (1997), who consider that the oocysts should be compared with coccidian species that are feature-similar and belong to the same host family.

Currently with the advent of genetic sequencing techniques, the 18S and 28S rRNA genes and the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*) gene have been recognized as useful loci to complementation of species characterization and in phylogenetic studies (YANG et al., 2015; SILVA-CARVALHO et al., 2018). However, this molecular tool has still limited ability to delimit species because there is no consensus on which genes are primordial and which percentage of genotypic difference separates the species

(SILVA et al., 2016). Anyway, none of these *Eimeria* spp. from marsupials have ever been sequenced in these loci.

In this sense, we endorse Kunz (2002), who states that the criterion for identification of new species can not be just on the basis of a certain number of base exchanges within DNA sequence; therefore, we intend in this work to identify the coccidian species evaluating all the morphological, biological and ecological (host specificity) aspects.

It is also worth mentioning that this paper shows the inconclusive and imprecise taxonomy of marsupial coccidia, since our study prioritized the identification of the species primarily described (CARINI, 1938; LAINSON & SHAW, 1989). This was to the detriment of more recently described species, which were not clearly differentiated from the predecessors (HECKSCHER et al., 1999; TEIXEIRA et al., 2007). In this sense, we emphasize the difficulty in delimiting *Eimeria* spp. from marsupials and correctly assigning them to new or already described species. Such difficulty is associated to the paucity of studies concerning *Eimeria* taxonomy, especially regarding some hosts, such as marsupials.

## Conclusion

To the best of our knowledge, this is the first identification of *Eimeria* infection in marsupials captured in the State of Bahia. Although *E. philanderi* and *E. gambai* have already been described in marsupials, there are no records in the scientific literature reporting these two species parasitizing the marsupials *D. aurita*, *G. agilis*, *M. americana*, *M. demerarae*, and *M. murina*. Therefore, this paper has identified new hosts for *E. philanderi* and *E. gambai*, and indicates that the state of Bahia is a new distribution site for these coccidia.

## References

- Berto BP, McIntosh D, Lopes CWG. Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). *Rev Bras Parasitol Vet* 2014; 23(1): 1-15. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612014001>. PMID:24728354.
- Carini A. *Eimeria didelphydis* n. sp. dell'intestino de *Didelphis aurita*. *Arch Ita di Sci Med Col* 1936; 17(2): 332-333.
- Carini A. Sur une nouvelle *Eimeria*, parasite de l'intestin Du *Caluromys philander*. *Ann Parasitol Hum Comp* 1937; 15(5): 453-455. <http://dx.doi.org/10.1051/parasite/1937155453>.
- Carini A. Mais uma *Eimeria* parasita do intestino do *Didelphis aurita*. *Arq Biol* 1938; 22(1): 61-62.
- Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. *Tratado de animais selvagens medicina veterinária*. Vol. 1. 2ª ed. São Paulo: Roca 2007.
- Duszynski DW, Wilber PG. A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. *J Parasitol* 1997; 83(2): 333-336. <http://dx.doi.org/10.2307/3284470>. PMID:9105325.
- Freitas FLC, Almeida KDS, Zanetti AS, Nascimento AA, Machado CR, Machado RZ. Espécies do gênero *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) em tamanduás bandeiras (*Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758) em cativeiro. *Rev Bras Parasitol Vet* 2006; 15(1): 29-32. PMID:16646999.
- Heckscher SK, Wickesberg BA, Duszynski DW, Gardner SL. Three new species of *Eimeria* from Bolivian marsupials. *Int J Parasitol* 1999; 29(2): 275-284. [http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00199-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00199-4). PMID:10221628.
- Joseph T. *Eimeria indianensis* sp. n. and an *Isoospora* sp. from the opossum *Didelphis virginiana* (Kerr). *J Protozool* 1974; 21(1): 12-15. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.1974.tb03609.x>. PMID:4817974.
- Kunz W. When is a parasite species a species? *Trends Parasitol* 2002; 18(3): 121-124. [http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4922\(01\)02210-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4922(01)02210-3). PMID:11854089.
- Lainson R, Shaw JJ. Two new species of *Eimeria* and three new species of *Isoospora* (Apicomplexa, Eimeriidae) from Brazilian mammals and birds. *Bull Mus Natn Hist Nat Paris* 1989; 11(2): 349-365.
- Sambuichi RHR. Fitossociologia e diversidade de espécies arbóreas em cabruca (mata atlântica raleada sobre plantação de cacau) na região sul da Bahia, Brasil. *Acta Bot Bras* 2002; 16(1): 89-101. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062002000100011>.
- Sheather AL. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technique. *J Comp Pathol Ther* 1923; 36: 266-275. [http://dx.doi.org/10.1016/S0368-1742\(23\)80052-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0368-1742(23)80052-2).
- Silva LM, Rodrigues MB, Lopes BB, Berto BP, Luz HR, Ferreira I, et al. A new coccidian, *Isoospora parnaitatiensis* n. sp. (Apicomplexa, Eimeriidae), from the white-shouldered fire-eye *Pyriglena leucoptera* (Passeriformes, Thamnophilidae) from South America. *Parasitol Res* 2016; 115(2): 745-749. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-015-4798-z>. PMID:26508009.
- Silva-Carvalho LM, Pastura DGN, Gomes JV, Siqueira PB, Rodrigues MB, Lima VM, et al. *Isoospora lopesi* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa: Eimeriidae) from the eastern white-throated spadebill *Platyrinchus mystaceus* Vieillot (Passeriformes: Tyranni: Tyrannidae) in South America. *Syst Parasitol* 2018; 95(5): 455-463. <http://dx.doi.org/10.1007/s11230-018-9795-z>. PMID:29721660.
- Strona ALS, Levenhagem M, Leiner NO. Reproductive effort and seasonality associated with male-biased parasitism in *Gnathoceros agilis* (Didelphimorphia: Didelphidae) infected by *Eimeria* spp. (Apicomplexa: Eimeriidae) in the Brazilian cerrado. *Parasitology* 2015; 142(8): 1086-1094. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182015000402>. PMID:25877479.
- Teixeira M, Rauta PD, Albuquerque GR, Lopes CWG. *Eimeria auritanensis* n. sp. and *E. gambai* Carini, 1938 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the opossum *Didelphis aurita* Wied-newied, 1826 (Marsupialia: Didelphidae) from southeastern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2007; 16(2): 83-86. PMID:17706009.
- Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dun AM, Jennings FW. *Veterinary parasitology*. New York: Longman; 1987.
- Valerio Campos I, Chinchilla-Carmona M, Duszynski DW. *Eimeria marmosopos* (Coccidia: Eimeriidae) from the Opossum *Didelphis marsupialis* L., 1758 (Didelphimorphia: Didelphidae), in Costa Rica. *Comp Parasitol* 2015; 82(1): 148-150. <http://dx.doi.org/10.1654/4693.1>.
- Yang R, Brice B, Elliot A, Ryan U. *Isoospora serinuse* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from a domestic canary (*Serinus canaria* forma domestica) (Passeriformes: Fringillidae) in Western Australia. *Exp Parasitol* 2015; 159: 59-66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2015.08.020>. PMID:26325434.
- Zanette RA, Silva AS, Lunardi F, Santurio JM, Monteiro SG. Occurrence of gastrointestinal protozoa in *Didelphis albiventris* (opossum) in the central region of Rio Grande do Sul state. *Parasitol Int* 2008; 57(2): 217-218. <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2007.10.001>. PMID:18035587.

## 9- Considerações Finais

Espécies do gênero *Eimeria* foram identificadas nesta pesquisa em animais silvestres nos municípios de Una, Belmonte e Mascote, na região sul do Estado da Bahia. O estudo demonstrou que a análise a partir do estudo morfológico e morfométrico permitiu identificar as espécies *E. philanderi* e *E. gambai* em amostras de fezes dos marsupiais *D. aurita*, *G. agilis*, *M. americana*, *M. demerarae* e *M. murina* capturados em áreas de mata atlântica.

Desta forma, este estudo confere que os marsupiais são identificados como novos hospedeiros deste protozoário, e a fauna silvestre em contato com animais domésticos pode influenciar na epidemiologia de *Eimeria* spp. na região sul da Bahia.

**10 ARTIGO CIENTÍFICO II**

**DETECÇÃO DE *CRYPTOSPORIDIUM* spp. (COCCIDIA:  
*CRYPTOSPORIDIIDAE*) E *GIARDIA DUODENALIS*  
(ZOOMASTIGOPHOREA: *HEXAMIITIDAE*) EM PEQUENOS MAMÍFEROS  
SILVESTRES NO NORDESTE, BRASIL.**

**Deteção de *Cryptosporidium* spp. (Coccidia: *Cryptosporidiidae*) e *Giardia duodenalis* (Zoomastigophorea: *Hexamitidae*) em pequenos mamíferos silvestres no Nordeste, Brasil.**

Hilytchaikra Ferraz Fehlberg<sup>1</sup>, Pedro de Alcântara Brito Junior<sup>1</sup>, Cássia Matos Ribeiro<sup>1</sup>, Camila Albano dos Santos<sup>1</sup>, Bruno César Miranda Oliveira<sup>3</sup>, Martín Roberto del Valle Alvarez<sup>2</sup>, George Rêgo Albuquerque<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, Ilhéus, BA, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, Ilhéus, BA, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Araçatuba, SP, Brasil.

\* [gralbu@uesc.br](mailto:gralbu@uesc.br)

## Resumo

Objetivou-se com este estudo investigar a ocorrência de *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em espécimes de roedores e marsupiais da Mata Atlântica da região Sul da Bahia, nordeste do Brasil. Foram coletadas 204 amostras fecais em diferentes áreas florestais dos municípios de Ilhéus, Una, Belmonte e Mascote. As identificações foram realizadas pelo diagnóstico molecular da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e *Nested*/PCR através da aplicação dos genes *gdh* e *tpi* para *G. duodenalis* e dos genes *gp60*, *hsp-70* para *Cryptosporidium*, com posterior sequenciamento. A frequência total de amostras positivas por PCR para *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. foi de 5,4% (11/204). *G. duodenalis* teve ocorrência de 2,94% (4/136) provenientes de roedores e 2,94% (2/68) de marsupiais. Para *Cryptosporidium* a prevalência em roedores e marsupiais foi de 1,47% (2/136) e 4,41% (3/68) respectivamente. Nas áreas coletadas a frequência do parasitismo foi de 50% (7/14), e somente na região de Mascote não houve animais parasitados. Foi identificado o subgenótipo AI de *G. duodenalis* nas espécies de roedores *Hylaeamys laticeps*, *Oecomys catherinae*, *Oligoryzomys nigripes* e *Akodon cursor* e nos marsupiais *Gracilinanus agilis* e *Monodelphis americana*. Nos roedores *Rhipidomys mastacalis*, *H. laticeps* e no marsupial *Marmosa murina* foram encontrados os protozoários *C. fayeri*, *C. parvum* e *C. ubiquitum* com subtipos IIa e IVg pelo gene *gp60*.

**Palavras-chave:** Mata Atlântica, roedores, marsupiais, protozoonoses, diagnóstico molecular.

## Introdução

Pequenos mamíferos como roedores (Rodentia, Cricetidae) e marsupiais (Mammalia, Didelphimorphia) podem ser uma fonte de transmissão de patógenos para humanos e animais domésticos, e o risco que esses

animais representam para a saúde pública é pouco compreendido (SANTANA et al. 2014; PEREC-MATYSIAK et al. 2015). O desequilíbrio ambiental devido à ação humana pode influenciar no surgimento e propagação de doenças zoonóticas e parasitárias nestes animais, a exemplos, a giardíase e criptosporidiose, afetando o equilíbrio da fauna (LALLO et al. 2009).

*Giardia* Kunstler, 1882 e *Cryptosporidium* Tizzer, 1907 são protozoários mundialmente conhecidos por causar sérios problemas gastroentéricos em seres humanos, animais domésticos e selvagens (PEREC-MATYSIAK et al. 2015; THOMPSON e ASH, 2016; SIQUEIRA-CASTRO et al. 2016). Esses protozoários são responsáveis por infecções a partir da contaminação ambiental e hídrica por cistos ou oocistos (XIAO e FAYER, 2008; THOMPSON e ASH, 2016).

O papel da giardíase e criptosporidiose humana na epidemiologia em animais selvagens ainda são escassos. No entanto, estudos moleculares vêm permitindo identificar várias espécies de *Giardia* e *Cryptosporidium* em animais selvagens (HEITMAN et al. 2002; ZHOU et al. 2004; APPELBEE et al. 2005; XIAO e FAYER, 2008).

As técnicas moleculares determinam e fundamentam melhor o entendimento de processos epidemiológicos (APPELBEE et al. 2005), com a utilização de diversos genes para identificação de diferentes espécies de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., além de revelar genótipos e subgenótipos dos quais alguns são específicos para humanos e outros são zoonóticos (XIAO e FAYER, 2008).

Para determinação de genótipos e subgenótipos de *Cryptosporidium* spp. destacam-se o gene codificador da subunidade ribossomal menor *18S rRNA (SSu-rRNA)* (XIAO et al. 1999), os genes codificadores de glicoproteína 60 KDa (*gp60*) e a proteína de choque térmico 70 (*HSP-70*). Esses dois últimos são capazes de demonstrar maior polimorfismo entre diferentes espécies (KHRAMSTOV et al. 1995; PENG et al. 2001). Além desses, também são utilizados, o gene codificador de proteína de parede (*COWP*), actina, acetil-CoA sintetase e espaço interno transcrito de rDNA (*rDNA ITS 1*) (WIDMER et al. 2002; MONIS e TOMPSON, 2003).

Na detecção, genotipagem e subgenotipagem da espécie *G. duodenalis* utilizam-se genes da subunidade ribossomal menor *18S RNA (SSu-rRNA)* (HOPKINS et al. 1997; CACCIÓ et al. 2008) e genes codificares da glutamato dehidrogenase (*gdh*), triose-fosfato isomerase (*tpi*) e beta-giardina (*bg*) (SULAIMAN et al. 2003; LALLE et al. 2005; CACCIÓ et al. 2008).

Estudos moleculares para detecção de *Giardia* e *Cryptosporidium* no ambiente silvestre tem relatado a presença destes protozoários em diferentes espécies de pequenos mamíferos. No entanto, no Nordeste do Brasil, não há estudos que utilizaram biologia molecular na identificação de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. nestas espécies. Deste modo, objetivou-se identificar através da técnica molecular a nível de genótipos e

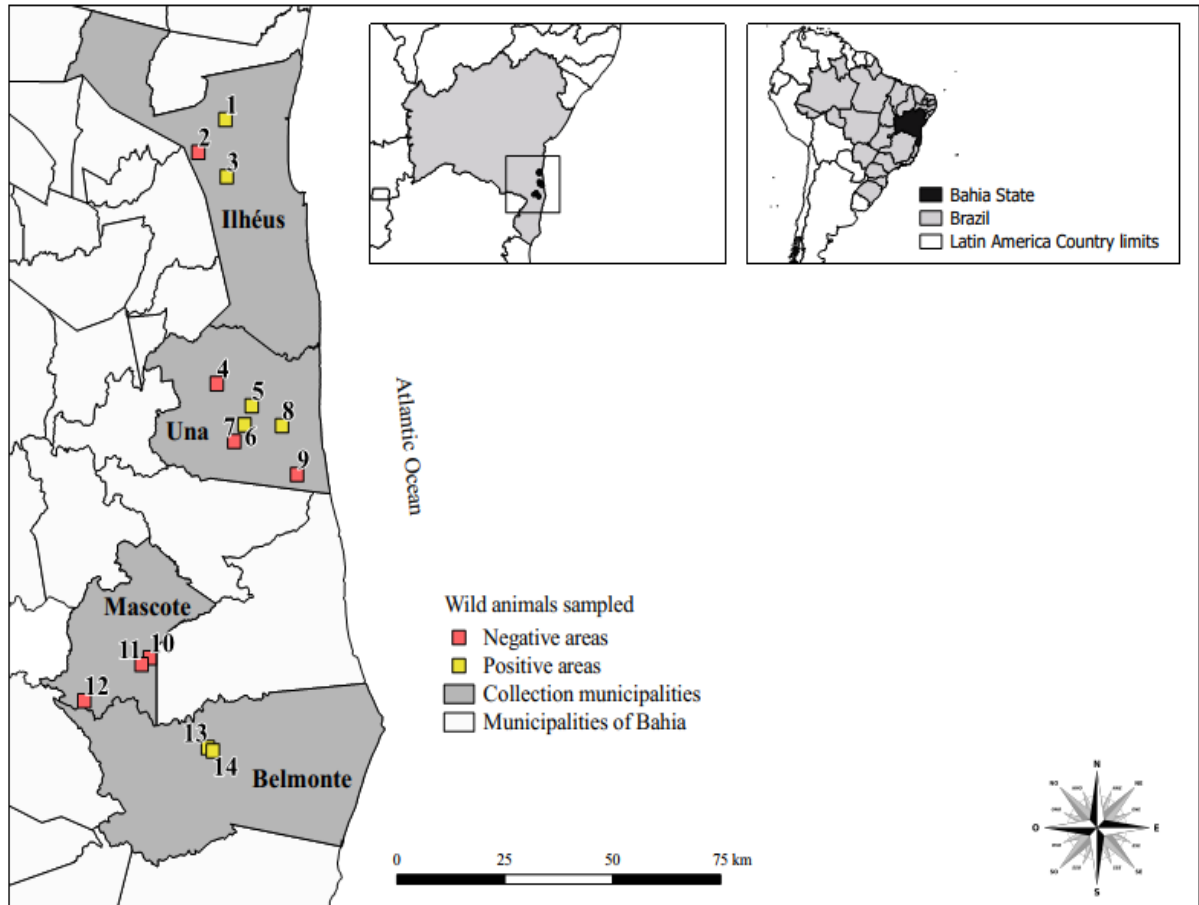


subgenótipos, *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de roedores e marsupiais capturados em áreas agroflorestais (cabruca) e florestas da Mata Atlântica no Sul da Bahia, nordeste do Brasil.

## **Material e Métodos**

### **Área de coleta**

Para a coleta, 14 áreas florestais foram estudadas, sendo distribuídas em quatro municípios da região Sul do Estado da Bahia, sendo três áreas de agroflorestas de cacau (cabruca) localizadas na zona rural de Ilhéus (áreas de um a três), e onze áreas de floresta localizadas nos municípios de Una, Mascote e Belmonte (áreas de quatro a 14) (Figura 1). A região de estudo possui um clima tropical quente e úmido, com umidade relativa média de 89-90% e temperatura média 24-25 °C, predominando uma vegetação de floresta tropical úmida e um sistema de plantio de cacau, conhecido como cabruca conservando a mata nativa (SAMBUICHI, 2002). Na região chove em média 150 dias por ano, sendo que a precipitação pode chegar a 2.000 mm/ano e, as estações de seca não são bem definidas, podendo ocorrer ocasionalmente um a três meses com menos de 100 mm de chuva (SAMBUICHI, 2006). Todas as áreas estavam localizadas entre 42m e 100m do nível do mar e foram georreferenciados com o Sistema de Posicionamento Global (GPS).



**Fig. 1** Mapa com dados e áreas de captura e coleta de amostras fecais de roedores e marsupiais no sul da Bahia, nordeste do Brasil. Coordenadas geográficas dos pontos de coletas: **01**: 14°38'15.8"S 39°12'02.3"W; **02**: 14°42'11.2"S 39°15'34.8"W; **03**: 14°45'04.0"S 39°11'51.2"W; **04**: 15°09'57.8"S 39°13'10.1"W; **05**: 15°12'35.9"S 39°08'37.4"W; **06**: 15°14'53.1"S 39°09'34.3"W; **07**: 15°16'54.5"S 39°10'54.2"W; **08**: 15°14'59.0"S 39°04'41.0"W; **09**: 15°20'53.0"S 39°02'43.5"W; **10**: 15°42'53.6"S 39°21'52.6"W; **11**: 15°43'40.9"S 39°22'56.7"W; **12**: 15°48'01.9"S 39°30'23.8"W; **13**: 15°53'40.4"S 39°14'19.2"W; **14**: 15°54'03.0"S 39°13'40.4"W.

### Captura dos animais e obtenção do material biológico

O período de captura abrangeu de Junho de 2015 a dezembro de 2016. A captura dos animais foi realizada utilizando armadilhas do modelo Sherman (23 × 8 × 9 cm), Tomahawk (50 × 17 × 17 cm) e armadilhas de interceptação-e-queda (*Pitfall*). Cada área foi dividida em três parcelas, totalizando 24 armadilhas por parcela e 72 por área. O estudo teve licença do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) sob o número 17131-4 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e pelo Conselho de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Santa Cruz - CEUA – UESC (Processo N° 003/2013).

Após a identificação das espécies foi realizado a coleta de amostras fecais com posterior soltura dos animais nos locais de origem (Tabela 1). As fezes foram coletadas, armazenadas em microtubos de 1,5mL e

conservadas refrigeradas, posteriormente foram transportados para o Laboratório de Parasitologia Veterinária da Universidade Estadual de Santa Cruz (LAPVET-UESC), pesadas e padronizadas entre 180 e 200 mg.

### **Extração de DNA e Caracterização Molecular**

Inicialmente as amostras fecais passaram por uma lavagem com PBS 7,2 pH estéril e submetidas à extração de DNA genômico, através do kit QIAamp DNA Stool Mini kit® (Qiagen), segundo as recomendações do fabricante. Após a adição do tampão de lise as amostras foram submetidas a cinco ciclos de aquecimento (96°C) e congelamento (-196°C), sendo três minutos no aquecimento e cinco minutos no congelamento e, posteriormente homogeneizadas em vórtex por cinco minutos com 0,2g de pérolas de vidro (0,5mm), após, foram seguidas as orientações do protocolo do kit. Os extraídos do DNA genômico foram quantificados em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA), armazenados em caixas e acondicionados em freezer a -20°C.

Para detectar a presença de *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. cada amostra de DNA isolada foi então submetida à *Nested* PCR. Para a amplificação dos fragmentos de *Giardia* foram utilizados os genes codificadores glutamato desidrogenase (*gdh*) (CACCIÓ et al., 2008), triose-fosfato isomerase (*tpi*) (SULAIMAN et al., 2003). E para *Cryptosporidium* fragmentos foram amplificados através dos genes glicoproteína 60 KDa (*gp60*) (PENG et al., 2001) e proteína de choque térmico 70 (*HSP-70*) (KHRAMSTOV et al., 1995) (Tabela 1).

Os ensaios foram realizados no termociclador Proflex PCR system (Applied Biosystems), utilizando para o mix o kit Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen). Foram utilizados como controles positivos amostras fecais positivas de cistos de *Giardia* e isolado no Laboratório de Parasitologia Veterinária–UESC. E *Cryptosporidium* (isolados 13F e 13C) provenientes do Laboratório de Análises Clínicas (LAC) da Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia (FEHLBERG et al. 2017) e água ultrapura como controle negativo. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% e revelados com SYBR® Safe, e purificados através do kit PureLink PCR Purification (Invitrogen), e encaminhadas para sequenciamento.

O sequenciamento foi realizado em eletroforese capilar (Sanger modificado) na plataforma ABI 3500XL *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) em ambas as direções. As análises dos cromatogramas foram realizados através do *software* FinchTV 1.4.0. As sequências de DNA foram depositadas no GenBank sob números de acesso MW202351, MW202352, MW202353, MW202354, MW202355, MW202356, MW202357, MW202358, MW202359, MW202360, MW202361, MW202362, MW202363, MW202364, MW202365, MW202366 and MW202367.

### **Análise estatística**

A análise estatística para verificação da associação entre a positividade das amostras com a variável área de captura (áreas de agrofloresta e áreas florestais) foi calculada pelo teste Exato de Fisher com intervalos de confiança de 95% utilizando o software Epi Info™7.2.0.1.

### **Resultados**

Das 204 amostras fecais coletadas, um total de 5,4% (11/204) foram positivas (Tabela 1). A ocorrência de *G. duodenalis* foi 2,94% (6/204), mesma prevalência encontrada em roedores 2,94% (4/136) e marsupiais 2,94% (2/68) (Tabela 2). Para *Cryptosporidium* a positividade foi 2,45% (5/204), sendo 1,47% (2/136) e 4,41% (3/68) em roedores e marsupiais, respectivamente (Tabela 3). Nas áreas coletadas a frequência do parasitismo foi de 50% (7/14) e não houve animais parasitados no município de Mascote (Figura 1). As áreas com maior frequência de animais infectados foram as áreas de agroflorestas, porém não houve diferença estatisticamente significativa entre a positividade e as áreas de captura ( $p > 0.05$ ).

A análise das sequências produzidas a partir dos genes *tpi* e *gdh* demonstrou 100% de similaridade genética com a espécie *G. duodenalis* do subgenótipo AI (Tabela 3). A análise genética de *Cryptosporidium* identificou as espécies *C. parvum*, *C. ubiquitum* e *C. fayeri* (Tabela 3).

**Tabela 1.** Espécies de marsupiais e roedores silvestres capturados em áreas de Mata Atlântica e Cabruca no nordeste, região Sul da Bahia, Brasil e positividade de animais infectados.

| Táxon  | Área                       | N*/Positivos  | Diagnóstico Molecular<br>(Nestad/PCR) |                |
|--|----------------------------|---------------|---------------------------------------|----------------|
|  |                            |               | <i>Cryptosporidium</i>                | <i>Giardia</i> |
| <b>ORDEM DIDELPHIMORPHIA</b>                           |                            |               |                                       |                |
| <b>Família Didelphidae</b>                             |                            |               |                                       |                |
| <i>Marmosa murina</i> (Linnaeus, 1758)                 | 3;4;6;7;8;9;10;11;12;13;14 | 26/3          | 3                                     | 0              |
| <i>Marmosa incanus</i> (Lund, 1840)                    | 11; 13                     | 7/0           | 0                                     | 0              |
| <i>Marmosa demerarae</i> (Thomas, 1905)                | 4;7;8                      | 9/0           | 0                                     | 0              |
| <i>Monodelphis americana</i> (Müller, 1776)            | 3;4;14                     | 8/1           | 0                                     | 1              |
| <i>Gracilinanus agilis</i> (Burmeister, 1854)          | 12;14                      | 10/1          | 0                                     | 1              |
| <i>Didelphis aurita</i> (Wied-Neuwied, 1826)           | 7;8                        | 8/0           | 0                                     | 0              |
| <b>TOTAL</b>   |                            | <b>68/5</b>   | <b>3</b>                              | <b>2</b>       |
| <b>ORDEM RODENTIA</b>                                  |                            |               |                                       |                |
| <b>Família Cricetidae</b>                              |                            |               |                                       |                |
| <i>Hylaeamys laticeps</i> (Lund, 1840)                 | 1;2;3;4;5;8                | 81/2          | 1                                     | 1              |
| <i>Akodon cursor</i> (Winge, 1887)                     | 1;2;3;11;14                | 13/1          | 0                                     | 1              |
| <i>Rhipidomys mastacalis</i> (Lund, 1840)              | 1;2;3;5;8;12;13            | 11/1          | 1                                     | 0              |
| <i>Thaptomys nigrita</i> (Lichtenstein, 1829)          | 1;5;8;13;14                | 9/0           | 0                                     | 0              |
| <i>Oecomys catherinae</i> (Thomas, 1909)               | 5;7;8;13                   | 5/1           | 0                                     | 1              |
| <i>Calomys expulsus</i> (Lund, 1841)                   | 12                         | 2/0           | 0                                     | 0              |
| <i>Cerradomys subflavus</i> (Percequillo et al., 2008) | 1;2;11                     | 4/0           | 0                                     | 0              |
| <i>Oligoryzomys nigripes</i> (Olfers, 1818)            | 1;2;5;7;8;12               | 7/1           | 0                                     | 1              |
| <i>Euryoryzomys russatus</i> (Wagner, 1848)            | 1;3;13                     | 4/0           | 0                                     | 0              |
| <b>TOTAL</b>   |                            | <b>136/6</b>  | <b>2</b>                              | <b>4</b>       |
| <b>TOTAL GERAL</b>                                     |                            | <b>204/11</b> | <b>5</b>                              | <b>6</b>       |

\* Número total de animais

**TABELA 2.** Espécies de *Giardia* por hospedeiro parasitado capturados em área floresta e cabruca no nordeste, sul da Bahia, Brasil.

| Espécies                     | Hospedeiro<br>Ordem | PCR marcador |            | Subgenótipo |
|------------------------------|---------------------|--------------|------------|-------------|
|                              |                     | <i>TPI</i>   | <i>GDH</i> |             |
| <i>Gracilinanus agilis</i>   | Didelphimorphia     | Gd           | Gd         | AI*         |
| <i>Monodelphis americana</i> | Didelphimorphia     | Gd           | Gd         | AI          |
| <i>Oecomys catherinae</i>    | Rodentia            | Gd           | Gd         | AI          |
| <i>Oligoryzomys nigripes</i> | Rodentia            | Gd           | Gd         | AI          |
| <i>Hylaeamys laticeps</i>    | Rodentia            | Gd           | Gd         | AI          |
| <i>Akodon cursor</i>         | Rodentia            | Gd           | Gd         | AI          |

Abreviaturas: Gd: *Giardia duodenalis*.

**TABELA 3.** Espécies de *Cryptosporidium* por hospedeiro parasitado capturados em área de floresta e cabruca no nordeste, sul da Bahia, Brasil.

| Hospedeiro                   |             | PCR marcador |      | Subgenótipos |
|------------------------------|-------------|--------------|------|--------------|
| Espécies                     | Ordem       | HSP-70       | Gp60 |              |
| <i>Marmosa murina</i>        | Didelmorpha | Cp           | Cp   | IIa*         |
| <i>M. murina</i>             | Didelmorpha | Cr           | Cf   | IVg*         |
| <i>M. murina</i>             | Didelmorpha | Cr           | Cp   | IIa          |
| <i>Rhipidomis mastacalis</i> | Rodentia    | Cp           | Cp   | IIa          |
| <i>Hylaeamys laticeps</i>    | Rodentia    | Cu           |      |              |

Abreviaturas: Cp: *Cryptosporidium parvum*; Cf: *Cryptosporidium fayeri*; Cr: *Cryptosporidium* sp.; Cu: *Cryptosporidium ubiquitum*.

### Discussão

O presente estudo investigou pela primeira vez a presença dos protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium* em roedores e marsupiais capturados na região Nordeste do Brasil. A região sul da Bahia possui uma extensa área de Mata Atlântica com grande riqueza de espécies da fauna e flora sendo uma das áreas mais importantes para a conservação da biodiversidade global (SAMBUICHI 2006). Além de possuir áreas de agroflorestas de cacau, fornecendo sombreamento para o plantio, preservando a mata nativa (PALOMO 2015).

A infecção de *Giardia duodenalis* já foi descrita em animais selvagens, como roedores e marsupiais com prevalências que variam de 2% a 12% (LALLO et al. 2009; THOMPSON et al. 2010; SANTOS 2011; VERMEULEN et al. 2015; LIMA et al. 2017; MELO 2017), demonstrando baixas prevalências em áreas florestais, diferente do que ocorre em áreas urbanas com roedores que apresentam prevalência mais altas variando de 24,4% a 64,3% (THOMPSON et al. 2010; PEREC-MATYZIAK et al. 2015; HILLMAN et al. 2017). No presente trabalho a frequência de animais positivos foi de 5,4%. Essa baixa positividade pode estar relacionada à área de coleta dos animais com riqueza e abundância de flora, baixa antropização e algumas espécies animais que possuem locomoção arborícola como *G. agilis* e *O. catherinae* com alimentação constituída de uma dieta herbívora e insetívora (PAGLIA et al. 2012; BANDOUK et al. 2013; LIMA et al. 2017), o que diminui o contato por este agente.

O subgenótipo AI, encontrado neste estudo, é o mais comumente encontrado em humanos (COLLI et al. 2015), o que caracteriza que esses animais podem participar da epidemiologia da infecção humana de *Giardia* (VERMEULEN et al. 2015). Caccio e Ryan (2008), Karim et al. (2015), Vermeulen et al. (2015) e Garcia et al. (2017) já tinham identificado o mesmo subgenótipo através dos genes *gdh* e *tpi* em animais. Marsupiais e roedores, principalmente os que possuem locomoção terrestre, como os marsupiais (*M. murina*, *M. americana*) e

roedores (*O. nigripes*, *H. laticeps*, *A. cursor* e *R. mastacalis*) se infectam com água, alimentos e fômites contaminados e assim podem desempenhar papel importante no ciclo evolutivo deste protozoário (PAGLIA et al. 2012), além de poder levar o parasito ao contato humano, representando um risco à saúde pública (COLLI et al. 2015; SAHRAOUI et al. 2019).

Os genes *gdh* e *tpi* demonstraram boa sensibilidade permitindo pelas sequências geradas identificarem nos seis isolados a espécie *G. duodenalis* e o subgenótipo AI. Por possuir regiões conservadas, a caracterização com estes genes pode ser utilizada para identificar todos os genótipos e subgenótipos de *G. duodenalis* (SIRIPATTANAPIPONG 2011; YAOYU e XIAO 2011; MARQUES 2015).

A frequência para *Cryptosporidium* observada foi 1,47% e 4,41% em roedores e marsupiais, respectivamente, resultado semelhante ao descrito por Santos (2011). A literatura descreve a ocorrência deste protozoário infectando uma variedade de espécies de pequenos mamíferos (DALL'OLIO e FRANCO 2004; RYAN et al. 2008; LALLO et al. 2009; SANTOS 2011; MURAKOSHI et al. 2013; DANISOVÁ et al. 2017; ZAHEDI et al. 2018). Estudos em áreas urbanas também apresentam maior parasitismo deste protozoário em roedores sinantrópicos (MURAKOSHI et al. 2013; SILVA 2013; PEREC-MATYZIAK et al. 2015; HILLMAN et al. 2017). Estudos no Brasil utilizando a técnica molecular conseguiram identificar *Cryptosporidium* spp. nestes animais (SILVA et al., 2013; PINTO, 2016). Mesmo com baixa frequência, este relato é mais um indicativo que os roedores e marsupiais na região estudada podem se infectar. A presença deste protozoário pode estar associada com a ação antrópica e presença de animais domésticos, proporcionando uma interação entre humanos, animais domésticos e a fauna silvestre, favorecendo sua disseminação (FIOCRUZ, 2004).

*C. parvum* é responsável pela maioria das infecções humanas em todo o mundo (ZAHEDI et al. 2018), o subgenótipo IIa, obtido neste estudo, também é frequentemente encontrado em humanos e animais (XIÃO 2010; FENG et al. 2013; HELMY et al. 2013; DANISOVA et al. 2017; ZAHEDI et al. 2018). *C. fayeri* é comumente encontrado em espécies de marsupiais (XIAO et al. 2002; POWER et al. 2008; RYAN et al. 2008; ZAHEDI et al. 2018), porém já foi identificado em humanos (WALDRON et al. 2010; KOEHLER et al. 2014; ZAHEDI et al. 2018). Ainda não é conhecida sua patogenicidade, mas normalmente provoca infecções assintomáticas em marsupiais (RYAN et al. 2008). O subgenótipo IVg já havia sido identificado em marsupial (*Macropus giganteus*) (ZAHEDI et al. 2018).

*C. ubiquitum* foi encontrado em *Hylaeamys laticeps*, primeiro achado em roedor silvestre capturado no Brasil. Esta espécie tem baixa especificidade e é comumente relatada em animais, incluindo roedores, marsupiais e outras espécies hospedeiras (FAYER et al. 2010; MURAKOSHI et al. 2013; LI et al. 2014; DANISOVÁ et al.

2017; SAHRAOUI et al. 2019), também foi descrita casos em humanos (FENG et al. 2007; FENG et al. 2018). A via de transmissão mais comuns de *C. ubiquitum* é através da água (FENG et al. 2018).

Os dois genes (*gp60* e *Hsp-70*) utilizados tem boa sensibilidade e podem ser utilizados em estudos para identificação de *Cryptosporidium* e verificação de sua diversidade genética (DA SILVA et al. 2003; DE CARVALHO 2009; XIAO 2010; LI et al. 2014) A utilização de mais de um gene permite uma compreensão mais detalhada sobre a variabilidade genética do protozoário e dos fatores abióticos na população estudada (SANTÍN, 2013).

Neste estudo a ocorrência dos protozoários nos pequenos mamíferos foi similar no ambiente de Mata Atlântica (Una e Belmonte) e de agrofloresta (Ilhéus). Não houve diferença estatisticamente significativa entre animais positivos e áreas de captura, o que demonstra que nas áreas de agroflorestas (cabruca) mesmo com uma maior ação antrópica e trânsito de animais domésticos que ameaçam a diversidade de animais selvagens (DOS SANTOS et al. 2017), permanecem com baixa contaminação, em função de continuarem com uma grande diversidade de fauna e flora. Os animais capturados em Mascote foram todos negativos.

Nossos resultados são pioneiros identificando *Giardia* e *Cryptosporidium* em espécies de roedores e marsupiais capturados no sul da Bahia, Nordeste do Brasil, e mostram que a técnica utilizada é sensível para identificar e determinar os subgenótipos de *Giardia* e *Cryptosporidium* através dos genes *gdh*, *tpi*, *hsp-70* e *gp60* respectivamente.

**Agradecimentos** Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) – Código Financeiro 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) (concessão PNE0001/2014) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) (concessão 306308/2015-0). Agradecemos também ao Prof. Aristeu Vieira da Silva (Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS) para as cepas de *C. parvum* (13F e 13C), à Rede de Plataformas Tecnológicas Fiocruz pelo uso de sua instalação de Sequenciamento na FIOCRUZ-Bahia e ao professor Giovanni Widmer, da Tufts University, por sua ajuda no sequenciamento.



## 11- Considerações finais

A técnica *Nested*/PCR com a utilização dos genes *gdh*, *tpi*, *hsp-70* e *gp60* permitiu identificar as espécies *Giardia* e *Cryptosporidium* e determinar os subgenótipos.

Mesmo que *G. duodenalis*, *C. fayeri*, *C. parvum* e *C. ubiquitum* já serem descritos em roedores e marsupiais, não há registros na literatura científica relatando essas duas espécies parasitando os marsupiais *G. agilis*, *M. murina*, *M. americana* e roedores *O. catherinae*, *H. laticeps*, *A. cursor*, *R. mastacalis* e *O. nigripes*. Esses dados registram que as espécies de roedores e marsupiais supracitados desempenham papel como novos hospedeiros de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp.

Estes achados reforçam que a influência antrópica e animais domésticos teve papel importante na transmissão dos referidos protozoários para pequenos mamíferos silvestre em áreas agroflorestais e mata nativa, que, por outro lado, podem albergar subgenótipos dos referidos agentes mesmo em área de baixa interferência humana.

## Referência

- ABEYWARDENA, H. et al. Genetic characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* from dairy calves: discovery of species/genotypes consistent with those found in humans. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 12, n. 8, p. 1984-1993, 2012.
- ABEYWARDENA, H; JEX, A. R.; GASSER, R. B. CHAPTER SIX, A. Perspective on *Cryptosporidium* and *Giardia*, with an Emphasis on Bovines and Recent Epidemiological Findings. *Advances in parasitology*, v. 88, p. 243-301, 2015.
- ALVAREZ-PELLITERO, P.; SITJÀ-BOBADILLA, A. *Cryptosporidium molnari* n. sp.(Apicomplexa: *Cryptosporidiidae*) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *International journal for parasitology*, v. 32, n. 8, p. 1007-1021, 2002.
- ALBUQUERQUE, G. R. et al. Eimerid coccidia from capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in southern Bahia, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 28, n. 7, p. 323-328, 2008.
- ALMEIDA, J. C. et al. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in a public water-treatment system, Paraná, Southern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 24, n. 3, p. 303-308, 2015.
- APPELBEE, A. J., et al. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife—current status and future needs. *Trends in parasitology*, v. 21, n. 8, p. 370-376, 2005.
- AVELINO, D. B. **Espécies do gênero Eimeria Schneider, 1875 (Apicomplexa: Eimeriidae) parasitos de caprinos leiteiros no município de Afonso Bezerra, Rio Grande do Norte.** Embrapa Caprinos e Ovinos-Tese/dissertação (ALICE), 2010.
- AVENDAÑO, V. C; AMAYA M. A. Molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* GP60 subtypes worldwide *Revista MVZ Córdoba*, v. 22, no. 3, 2017.
- BARNARD, W. P. et al. *Eimeria kinsellai* sp. n.(Protozoa: *Eimeriidae*) in a marsh rice rat *Oryzomys palustris* from Florida. *The Journal of protozoology*, v. 18, n. 3, p. 546-547, 1971.
- BANDOUK, A. C. et al. Programa de vigilância e controle de leptospirose em roedores do município de São Paulo. Módulo I. p. 16, 2013.
- BONVICINO, C. R. et al. Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. **Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa-OPAS/OMS**, v. 120, 2008.
- BOWMAN, D. D.G. – **Parasitologia Veterinária.** Elsevier. Rio de janeiro, cap. 3, p. 95-96, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual Prático de Análise de Água.** Fundação Nacional de Saúde- FUNASA, 4ª edição. Brasília-DF, 2013.

- CARINI, A. *Eimeria didelphydis* n. sp. dell'intestino del *Didelphys ausita*. *Eimeria didelphydis* n. sp. from the intestine of *Didelphis aurita*. In Italian. **Archiv Italia Science Medical**. v.17, p. 332-5, 1936.
- CARINI, A. Sur une nouvelle *Eimeria*, parasite de l'intestin du *Caluromys philander*. **Annual Parasitology**, v.15, p.453-5, 1937.
- CARINI, A. Mais uma *Eimeria*, parasita do intestino do *Didelphis aurita*. One more *Eimeria*, parasite of the intestine of *Didelphis aurita*. In Portuguese. **Arquivo Biologia São Paulo**. V, 22, p.5-6. 1938.
- CARRANZA, P. G. et al. Specific histone modifications play critical roles in the control of encystation and antigenic variation in the early-branching eukaryote *Giardia lamblia*. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 81, p. 32-43, 2016.
- CARVALHO, F. S. et al. Diagnosis of *Eimeria* species using traditional and molecular methods in field studies. **Veterinary Parasitology**, v. 176, n. 2-3, p. 95-100, 2011.
- CACCIÒ, S. M.; RYAN, U. Molecular epidemiology of giardiasis. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 160, n. 2, p. 75-80, 2008.
- CACCIÒ, S. M. et al. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. **International journal for parasitology**, v. 38, n. 13, p. 1523-1531, 2008.
- CHALMERS, R. M. et al. The prevalence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in *Mus domesticus*, *Apodemus sylvaticus* and *Clethrionomys glareolus* in an agricultural system. **Parasitology research**, v. 83, n. 5, p. 478-482, 1997.
- CHAOCHAO L. V. et al. *Cryptosporidium* spp. in wild, laboratory, and pet rodents in china: prevalence and molecular characterization. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 24, p. 7692-7699, 2009.
- CHARTIER, C; PARAUD, C. Coccidiosis due to *Eimeria* in sheep and goats, a review. **Small Ruminant Research**, v. 103, n. 1, p. 84-92, 2012.
- CHOLEWINSKI, G. et al. Synthesis and biological activity of ester derivatives of mycophenolic acid and acridines/acridones as potential immunosuppressive agents. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 31, N. 6, P. 974-982, 2016.
- COUTO, M. C. M.; BOMFIM, T. C. B. Espécies de *Cryptosporidium* que infectam bovinos: características etiológicas e epidemiológicas. **Veterinary News**, v. 18, n. 2, p. 94-109, 2012.
- COLLI CM et al. Identical assemblage of *Giardia duodenalis* in humans, animals and vegetables in an urban area in southern Brazil indicates a relationship among them. **PLoS One**. 10: 1-12, 2015.

- CURRENT, W. L. et al. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp.(Apicomplexa, *Cryptosporidiidae*) infecting chickens. **The Journal of protozoology**, v. 33, n. 2, p. 289-296, 1986.
- CUNHA, M. J. R. **Diagnóstico e caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e *Enterocytozoon bieneusi* em aves das microrregiões de Uberlândia e Belo Horizonte, MG, Brasil.** 2017. Tese de Doutorado.
- DANIŠOVÁ, O. et al. Rodents as a reservoir of infection caused by multiple zoonotic species/genotypes of *C. parvum*, *C. hominis*, *C. suis*, *C. scrofarum*, and the first evidence of *C. muskrat* genotypes I and II of rodents in Europe. **Acta tropica**, v. 172, p. 29-35, 2017.
- DALL'OLIO, A. J.; FRANCO, R. M. B. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em pequenos mamíferos silvestres de três áreas serranas do Sudeste brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 1, p. 25-31, 2004..
- DA SILVA, A. S. et al. Parasitismo por *Giardia* sp., *Cryptosporidium* sp. e *Cystoisospora* sp. em nutria (*Myocastor coypus*) no estado do rio grande do sul, brasil. **Estudos de Biologia**, v. 29, n. 66, 2007.
- DA SILVA, R. M. **Infecção natural por *Eimeria* spp., *Cryptosporidium* spp. e *Giardia duodenalis* em cordeiros da raça mestiça Santa Inês, na região semi-árida do Estado do Rio Grande do Norte.** 2009. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais.
- DENIZ, A. Coccidiose Ovina: Revisão Bibliográfica. **Albéitar**, v.3, p.4-11, 2009.
- DE SEIXAS FILHO, J. T. et al. Parasitismo em animais silvestres do bioma mata atlântica utilizada como carne de caça. **Semioses**, v. 8, n. 1, p. 36-43, 2014.
- DE OLIVEIRA RIBEIRO, V. et al. Pesquisa de endoparasitas em fezes de gambás do gênero *Didelphis* na mata atlântica no estado de Pernambuco. **ResearchGate**, 2015.
- DILLINGHAM, Rebecca A.; LIMA, Aldo A.; GUERRANT, Richard L. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 10, p. 1059-1066, 2002.
- DO HORTO, R.; MAB, Programa. CONSELHO NACIONAL DA RESERVA DA BIOSFERA DA MATA ATLÂNTICA. **Recuperação de áreas degradadas da Mata Atlântica: uma experiência da CESP, companhia Energética de São Paulo**, n. 3, p. 50, 2000.
- DOS SANTOS CLA, SILVA AP, SANTOS SB, PARDINI R, CASSANO CR (2017). Dog invasion in agroforests: the importance of households, roads and dog population size in the surroundings. **Perspect Ecol Conser.** 15: 221-226.
- DOWLE, M. et al. *Cryptosporidium* from a free-ranging marsupial host: bandicoots in urban Australia. **Veterinary parasitology**, v. 198, n. 1-2, p. 197-200, 2013.

DUSZYNSKI, D. W.; WILBER, P. G. A guideline for the preparation of species descriptions in the *Eimeriidae*. **The Journal of Parasitology**, p. 333-336, 1997.

EINARSSON E, MA'AYEH S, SVÄRD SG An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Curr Opin Microbiol.* 34: 47-52, 2016.

EPSTEIN, J. L. School/family/community partnerships. **Phi delta kappa**, v. 76, n. 9, p. 701, 1995.

FAVA, N. M. N. **Variabilidade genotípica dos isolados de *Giardia duodenalis* em diferentes espécies de animais.** 2013. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia.

FAGUNDES GURGEL, A. C. Occurrence of intestinal protozoa in chinchilas (*Chinchilla lanigera*) and capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) bred in captivity in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Acta scientiae veterinariae**, v. 36, n. 3, p. 318-318, 2008.

FAYER, R. Epidemiology of protozoan infections: the coccidia. **Veterinary Parasitology**, v. 6, n. 1-3, p. 75-103, 1980.

FAYER, R.; REID, W. M. Control of coccidiosis. In *The biology of the Coccidia*, P. L. Long (ed.). University Park Press, **Baltimore**, p. 453- 487. 1982.

FAYER, R. et al. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International journal for parasitology**, v. 30, n. 12, p. 1305-1322, 2000.

FAYER, R. et al. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 6, p. 1415-1423, 2001.

FAYER, R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. **Veterinary parasitology**, v. 126, n. 1, p. 37-56, 2004.

FAYER, R. et al. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: *Cryptosporidiidae*) in cattle (*Bos taurus*). **The Journal of parasitology**, p. 624-629, 2005.

FAYER, R.; XIAO, L. ***Cryptosporidium* and cryptosporidiosis.** CRC press, 2007.

FAYER, R. et al. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: *Cryptosporidiidae*) in cattle (*Bos taurus*). **Veterinary Parasitology**, v.156, p.191-198, 2008.

FAYER, R.; SANTÍN, M. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: *Cryptosporidiidae*) in sheep (*Ovis aries*). **Veterinary parasitology**, v. 164, n. 2-4, p. 192-200, 2009.

FAYER, R. et al. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. **Veterinary parasitology**, v. 172, n. 1-2, p. 23-32, 2010.

FENG, Y. XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 1, p. 110-140, 2011.

- FENG, Y. et al. Subtypes of *Cryptosporidium* spp. in mice and other small mammals. **Experimental Parasitology**, 127, 238–242, 2011.
- FENG, Y. et al. Genetic diversity and population structure of *Cryptosporidium*. **Trends in parasitology**, v. 34, n. 11, p. 997-1011, 2018.
- FEHLBERG, H. F. et al. *Eimeria* spp.(Apicomplexa: *Eimeriidae*) of marsupials (Mammalia: Didelphimorphia) in southern Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, n. 4, p. 604-608, 2018.
- FIALHO, C. G. et al. Comparação da infecção por protozoários em chinchila (*Chinchilla lanigera*) de uma criação comercial do município de Viamão-RS, Brasil, e de chinchilas no seu habitat natural, Chile. **Parasitología latino americana**, v. 63, n. 1-2-3-4, p. 85-87, 2008.
- FIOCRU ZC. **Diagnóstico Urbanístico do Setor 1 da Colônia Juliano Moreira**. FIOCRUZ. 2004.
- FLAUSINO, G. et al. Aspectos biológicos de *Eimeria caviae* Sheather, 1924 (Apicomplexa: *Eimeriidae*) de uma infecção experimental em cobaios *Cavia porcellus* Linnaeus de criações rústicas. **Coccidia**. V. 2, n. 2, p. 46-51, 2014.
- FOO, C. et al. Novel *Cryptosporidium* genotype in wild Australian mice (*Mus domesticus*). **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 23, p. 7693-7696, 2007.
- FONTAINE, M.; GUILLOT, E. Development of a TaqMan quantitative PCR assay specific for *Cryptosporidium parvum*. **FEMS microbiology letters**, v. 214, n. 1, p. 13-17, 2002.
- FRANJOLA, R. et al. Prevalence of protozoa infections in synanthropic rodents in Valdivia City, Chile. **Boletín Chileno de Parasitología**, v.50, n.3-4, p.66-72, 1995.
- FREITAS, F. L. C. et al. Espécies do gênero *Eimeria* Schneider, 1875 (Apicomplexa: *Eimeriidae*) em caprinos leiteiros mantidos em sistema intensivo na região de São Jose do Rio Preto, estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinaria**, p. 7-10, 2005.
- FRANCO, R. M. B. et al. Avaliação da performance de metodologias de detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em água destinada ao consumo humano, para o atendimento às demandas da Vigilância em Saúde Ambiental no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 21, n. 2, p. 233-242, 2012.
- GARDNER, S. L. et al. Redescription of *Eimeria escomeli* (Rastegaieff, 1930) from *Myrmecophaga tridactyla*, and a first report from Bolivia. **Faculty Publications from the Harold W. Manter Laboratory of Parasitology**, p. 63, 1991.
- GASSER, R. B. Molecular Tools-advances, opportunities and prospects. **Veterinary Parasitology**. V. 136, n. 2, p. 69-89, 2006.

GARCIA–R, J. C. et al. Local and global genetic diversity of protozoan parasites: spatial distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005736, 2017.

GENNARI, S. M. et al. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 2, p. 87-91, 1999.

GHARIEB, R. M. et al. Isolation, genotyping and subtyping of single *Cryptosporidium* oocysts from calves with special reference to zoonotic significance. **Veterinary Parasitology**, 2019.

GRECA, M. P. S. **Identificação molecular e filogenia de espécies de *Cryptosporidium* em cães e em gatos de Curitiba e Região Metropolitana**. 2010. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná.

HAMMOND, D. M. et al. The coccidia. *Eimeria*, *Isospora*, *Toxoplasma*, and related genera. **Transactions of the American Microscopical Society** v. 93, n. 2, p. 296, 1973.

HASSUM, I. C. et al. Diferenciação das espécies de *Eimeria* parasitas de ovinos pelo uso da regressão linear e algoritmos morfológicos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 2, p. 97-104, 2007.

HECKSCHER, S. K. et al. Three new species of *Eimeria* from Bolivian marsupials. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 2, p. 275-284, 1999.

HEKER, M. M. **Ocorrência e caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. E *Eimeria* spp. em criações comerciais brasileiras de coelhos**. 2015. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista.

HEYWORTH, M. F. *Giardia duodenalis* genetic assemblages and hosts. **Parasite**, v. 23, 2016.

HELMY YA, KRÜCKEN J, NÖCKLERD K, SAMSON HIMMELSTJERNAC GV ZESSINB KH. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in livestock animals and humans in the Ismailia province of Egypt. **Veterinary Parasitology**. 193:15-24, 2013.

HEITMAN TL et al. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* and characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from wildlife, human, and agricultural sources in the North Saskatchewan River Basin in Alberta, Canada. **Can. Journal. Microbiology**. 48: 530-541, 2002.

HILL, N. J. et al. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* isolates from common brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*) adapted to urban settings. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 74, n. 17, p. 5549-5555, 2008.

- HILLMAN, A. E. et al. *Eimeria* spp. infecting quenda (*Isoodon obesulus*) in the greater Perth region, Western Australia. **Experimental parasitology**, v. 170, p. 148-155, 2016.
- HILLESHEIM, L. O.; DA COSTA FREITAS, F. L. Ocorrência de eimeriose em bezerros criados em propriedades de agricultura familiar—nota científica. **Ciência Animal Brasileira**, v. 17, n. 3, p. 472-481, 2016.
- HILLMAN, A. E. et al. Urban environments alter parasite fauna, weight and reproductive activity in the quenda (*Isoodon obesulus*). **Science of The Total Environment**, v. 607, p. 1466-1478, 2017.
- HOPKINS, R. M. et al. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. **The Journal of parasitology**, v. 83, n. 1, p. 44-51, 1997.
- HOMEM, C. G. **Identificação do gênero e espécies de *Cryptosporidium* em cães e gatos**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista.
- HORAK, P., et al. Isolation, cultivation and isoenzyme characterization of *Giardia intestinalis* strains. **Folia parasitologica**, v.37, n.2, p.105-106, 1990.
- HUNTER, P. R.; THOMPSON, R. C A. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. **International journal for parasitology**, v. 35, n. 11, p. 1181-1190, 2003.
- HUANG, D. B.; WHITE, A. C. An updated review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Gastroenterology Clinics**, v. 35, n. 2, p. 291-314, 2006.
- ISEKI, M. *Cryptosporidium felis* sp. n.(Protozoa Eimeriorina) from the domestic cat. **Jpn. Journal Parasitology.**, v. 28, p. 285, 1979.
- IVANOV AI. *Giardia* and giardiasis. **Bulg J Vet Med**. 13: 65-80, 2010.
- JEX, A. R.; GASSER, R. B. Genetic richness and diversity in *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* reveals major knowledge gaps and a need for the application of “next generation” technologies—research review. **Biotechnology advances**, v. 28, n. 1, p. 17-26, 2010.
- JIRKU, M. et al. New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. **Folia parasitologica**, v. 55, n. 2, p. 81, 2008.
- JOSEPH, T. *Eimeria indianensis* sp. n. and an *Isospora* sp. from the opossum *Didelphis virginiana* (Kerr). **The Journal of protozoology**, v. 21, n. 1, p. 12-15, 1974.
- JUNIOR, J. E. S. Epidemiologia molecular de *Giardia intestinalis* em populações humanas e animais. **Revista Eletrônica de Biologia (REB)**. ISSN 1983-7682, v. 8, n. 1, p. 114-137, 2015.



LEVINE, N. D. Coccidiosis. **Annual Review of Microbiology**. V. 17, p. 179-198, 1963.

LAINSON, R. Parasitological studies in British Honduras: IV.—Some coccidial parasites of reptiles. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 62, n. 2, p. 260-266, 1968.

LALLE M, POZIO E, CAPELLI G, BRUSCHI F, CRITTI D, CACCIÒ SM. Genetic heterogeneity at the  $\beta$ -giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol* . 35: 207-213, 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Two new species of *Eimeria* and three new species of *Isospora* (Apicomplexa, Eimeriidae) from Brazilian mammals and birds. **Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle**, v. 11, n. 2, p. 349-365, 1989.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Coccidia of Brazilian mammals: *Eimeria marajoensis* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the anteater, *Tamandua tetradactyla* (Xenarthra: Myrmecophagidae). **The Journal of protozoology**, v. 38, n. 1, p. 28-30, 1991.

LALLO, M. A. et al. Occurrence of *Giardia*, *Cryptosporidium* and microsporidia in wild animals from a deforestation area in the state of São Paulo, Brazil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 5, p. 1465-1470, 2009.

LADEIRO, M. P. et al. Bioaccumulation of human waterborne protozoa by zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): interest for water biomonitoring. **water research**, v. 48, p. 148-155, 2014.

LEVINE, N. D.; IVENS, V. **The coccidian parasites (Protozoa, Sporozoa) of ruminants 44**. Urbana, University of Illinois Press, 1970.

LEVINE, N. D. et al. Newly revised classification of the protozoa. **Journal of Protozoology**, v.27, p.37-58, 1980.

LEVINE, N. D. Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. **The Journal of parasitology**, v. 66, n. 5, p. 830-834, 1980.

LEVINE, N. D. et al. **Veterinary protozoology**. Ames: Iowa State University Press, 1985.

LEE, J. et al. Detection and genotyping of *Giardia intestinalis* isolates using intergenic spacer (IGS)-based PCR. **The Korean journal of parasitology**, v. 44, n. 4, p. 343-353, 2006.

LESSA, L. G.; DA COSTA, F. N. Diet and seed dispersal by five marsupials (Didelphimorphia: Didelphidae) in a Brazilian cerrado reserve. **Mammalian Biology**, v. 75 n.1, p.10-16. 2010.

LEAL, D. A. G. **Monitoramento de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. na cadeia produtiva de ostras (*Crassostrea brasiliensis*), depuradas para o consumo**

- humano no complexo estuário-lagunar de Cananéia.** São Paulo. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, 2013.
- LINDSAY, D. S. et al. *Cryptosporidium andersoni* n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 91-95, 2000.
- LI, N. et al. Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum*, a zoonotic pathogen emerging in humans. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 2, p. 217, 2014.
- LI, X., et al. *Cryptosporidium rubeyi* n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in multiple Spermophilus ground squirrel species. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v.4, n.3, p. 343-350 , 2015.
- LIMA, V. F. S. et al. Gastrointestinal parasites in feral cats and rodents from the Fernando de Noronha Archipelago, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 4, p. 521-524, 2017.
- LIMA, V. F. S. **Agentes parasitários em animais silvestres, sinantrópicos e domésticos: aspectos clínicos, epidemiológicos e de saúde pública.** 2018. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- MARQUES ARL. Aplicação do MLTS (multilocus sequence typing) na Genotipagem de *Giardia Lamblia*. Dissertação. Universidade de Coimbra.2015.
- MEINHARDT, P. et al. Epidemiologic aspects of human cryptosporidiosis and the role of waterborne transmission. **Epidemiologic reviews**, v. 18, n. 2, p. 118-136, 1996.
- MELO TF. Ocorrência de endoparasitas em pequenos mamíferos em um fragmento de floresta atlântica e em uma plantação de eucaliptos no Nordeste do Brasil. Tese. Universidade Federal de Pernambuco. 2017.
- MEIRELES, M. V. et al. Natural infection with zoonotic subtype of *Cryptosporidium parvum* in Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 147, n. 1-2, p. 166-170, 2007.
- MEIRELES, M. V. *Cryptosporidium* infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 4, p. 197-204, 2010.
- MORGAN-RYAN, U. M. et al. *Cryptosporidium hominis* n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from Homo sapiens. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 433-440, 2002.
- MORRISON, Hilary G., et al. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. **Science**, v.317, v.5846, p.1921-1926, 2007.
- MONIS, P. T. et al.. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. **Trends in parasitology**, v. 25, n. 2, p. 93-100, 2009.

MURAKOSHI F et al. Detection and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in large Japanese field mice, *Apodemus speciosus*. *Vet parasitol.* 196: 184-188, 2013.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, v. 403, n. 6772, p. 853, 2000.

NAKADA, L. Y. K. **Cistos de Giardia spp.: detecção em água bruta de estações de tratamento de água e avaliação de eficiência de desinfetantes químicos por Reação de Imunofluorescência Direta, Propídio Monoazida conjugado com a Reação em Cadeia da Polimerase, e ensaio in vivo.** 2018. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas.

NG, C. T. et al. Multiplex real-time PCR assay using Scorpion probes and DNA capture for genotype-specific detection of *Giardia lamblia* on fecal samples. *Journal of clinical microbiology*, v. 43, n. 3, p. 1256-1260, 2005.

OLIVEIRA, U. C. et al. Development of molecular assays for the identification of the 11 *Eimeria* species of the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Veterinary parasitology*, v. 176, n. 2-3, p. 275-280, 2011.

OMS- Organização Mundial da Saúde. **Publicações**, 2018. Disponível em: <https://www.who.int/eportuguese/countries/bra/pt/>. Acesso em 03 jul. 2019.

ORTEGA-PIERRES, G. et al. New tools provide further insights into *Giardia* and *Cryptosporidium* biology. *Trends in parasitology*, v. 25, n. 9, p. 410-416, 2009.

PAVLÁSEK, I. et al. *Cryptosporidium varanii* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Emerald monitor (*Varanus prasinus* Schlegel, 1893) in captivity in Prague zoo. *Gazella* 22, 99–108. 1995.

PAVLÁSEK, I. Cryptosporidia: biology, diagnosis, host spectrum, specificity, and the environment. *Remedia Klin. Mikrobiol*, v. 3, p. 290-301, 1999.

PAGLIA AP et al. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil 2ª Edição/Annotated Checklist of Brazilian Mammals. *Occas pap cons biol.* 6: 1-82, 2012.

PALOMO KGS. Vulnerabilidade da Mata Atlântica no Sul da Bahia frente à expansão da fronteira econômica. *Front.* 4: 70-82, 2015.

PAULINO, R. C. **Detecção molecular de Giardia sp em amostras fecais e água: extração de DNA genômico, PCR e RFLP.** 2005. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná.

PETRONETO, B. S. et al. Protozoários intestinais em chinchilas (*Chinchilla lanigera*) criadas em cativeiro, na região serrana do estado do Espírito Santo, Brasil. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 9, n. 1, p. 65-70, 2015.

PEREC-MATYSIAK, A. et al. Small rodents as reservoirs of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in south-western Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, v. 22, n. 1, 2015.

- PENG MM. et al. A comparison of *Cryptosporidium* subgenotypes from several geographic regions. *J Eukaryot Microbiol* . <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2001.tb00442.x>. 2001.
- PINTO, M. M. G. et al. **Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. na fauna silvestre e doméstica residente no campus Fiocruz da Mata Atlântica, município do Rio de Janeiro**. 2016. Tese de Doutorado. Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz.
- POWER, M. L.; RYAN, U. M. A new species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*). **Journal of Parasitology**, v. 94, n. 5, p. 1114-1118, 2008.
- PLUTZER, J.; KARANIS, P. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. **Veterinary parasitology**, v. 165, n. 3, p. 187-199, 2009.
- PLUTZER, J. et al. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 213, n. 5, p. 321-333, 2010.
- PRADO, O. R. **Ocorrência de *Eimeria acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella* e *E. mitis* em frangos de corte na região oeste de Santa Catarina**. 2005. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná.
- KARIM, Md. R. et al. Multi-locus analysis of *Giardia duodenalis* from nonhuman primates kept in zoos in China: geographical segregation and host-adaptation of assemblage B isolates. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 30, p. 82-88, 2015.
- KHRAMTSOV NV, TILLEY M, BLUNT DS, MONTELONE BA, UPTON SJ. Cloning and analysis of a *Cryptosporidium parvum* gene encoding a protein with homology to cytoplasmic form *Hsp70*. *J Eukaryot Microbiol*. 42: 416-422, 1995.
- KOEHLER AV et al. First genetic analysis of *Cryptosporidium* from humans from Tasmania, and identification of a new genotype from a traveller to Bali. *Electrophoresis*. 35: 2600-2607, 2014.
- RIGO, C. R.; FRANCO, R. M. B. Comparação entre os métodos de Ziehl-Neelsen modificado e Acid-Fast-Trichrome para a pesquisa fecal de *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2002.
- ROXSTRÖM-LINDQUIST, K. et al. *Giardia* immunity—an update. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 1, p. 26-31, 2006.
- RYAN, U. M. et al. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 4, p. 769-774, 2004.
- RYAN, U. M. et al. *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 22-26, 2008.

- RYAN, U.; CACCIÒ, S. M. Zoonotic potential of *Giardia*. **International journal for parasitology**, v. 43, n. 12-13, p. 943-956, 2013.
- RYAN, U. N. A. et al.. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. **Parasitology**, v. 141, n. 13, p. 1667-1685, 2014.
- SAMBUICHI RHR. Fitossociologia e diversidade de espécies arbóreas em cabruca (Mata Atlântica raleada sobre plantação de cacau) na região sul da Bahia, Brasil. *Acta Bot Bras*. 16: 89-101. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062002000100011>. 2002.
- SAMBUICHI, R. H. R. Estrutura e dinâmica do componente arbóreo em área de cabruca na região cacauzeira do sul da Bahia, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 943-954, 2006.
- SAHRAOUI, L. et al. Molecular characterization of zoonotic *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* pathogens in Algerian sheep. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 16, p. 100280, 2019.
- SANTOS, R. C. F. **Importância de mamíferos neotropicais na epidemiologia de protozooses: diagnóstico, caracterização molecular e aspectos ecológicos da infecção por *Giardia* e *Cryptosporidium***. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- SANTOS, E. M. **Deteção de *Cryptosporidium* spp., *Leishmania* spp. e identificação de ixodídeos e Sifonápteros em *Didelphis albiventris* Lund, 1841 (MARSUPIALIA: DIDELPHIDAE)**. 2016. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- SANTÍN, M. Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals. **N Z Vet J**. 61: 1–10, 2013.
- SHEATHER, A. L. The detection of intestinal **protozoa and mange parasites by floatation technique**. *Journal of Comparative Pathology*, v. 36, n. 4, p. 266-75. 1923.
- SIRIPATTANAPIPONG S et al. Determination of discriminatory power of genetic markers used for genotyping *giardia duodenalis*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 42: 764–771, 2011.
- SILVA, S. O. S. **Padronização de uma reação em cadeia pela polimerase em nested (nested-PCR) para deteção e diferenciação das espécies de *Cryptosporidium* spp e caracterização molecular de *Cryptosporidium* isolados de roedores sinantrópicos**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- SILVA, M. F. F. et al. **Caracterização de genótipos de *Giardia lamblia* e ferramentas de educação em saúde como estratégias de prevenção da giardiase**. 2017. Tese de Doutorado. Instituto Oswaldo Cruz.
- SIQUEIRA-CASTRO ICV, GREINERT-GOULART JA, BONATTI TR, YAMASHIRO S, FRANCO RMB. First report of predation of *Giardia* sp. cysts by

ciliated protozoa and confirmation of predation of *Cryptosporidium* spp. oocysts by ciliate species. *Environ Sci Pollut Res.* 23: 11357-11362, 2016.

SLAVIN, D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). **Journal of comparative pathology and therapeutics**, v. 65, p. 262-IN23, 1955.

SNAK, A. et al. Analises coproparasitológicas de aves silvestres cativas. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, n. 4, p. 502-507, 2014.

SNAK, A. et al. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* sp. in sheep. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 4, p. 1917-1924, 2017.

SOUZA, S. L. P. et al. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of Sao Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (*gdh*) coding gene. **Veterinary parasitology**, v. 149, n. 3, p. 258-264, 2007.

SOARES, J. F. et al. Parasitism by *Giardia* sp. and *Cryptosporidium* sp. in *Coendou villosus*. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 548-550, 2008.

SOUZA, L. E. B. **Prevalência das espécies de *Eimeria* em caprinos e ovinos criados extensivamente e a dinâmica de infecção em ovinos criados em sistema intensivo no estado da Bahia.** 2014. Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. p. 87.

SOUZA, M. S. et al. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em animais exóticos de companhia no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, p. 1321-1326, 2015.

STRONA, A. L. S. et al. Reproductive effort and seasonality associated with male-biased parasitism in *Gracilinanus agilis* (Didelphimorphia: *Didelphidae*) infected by *Eimeria* spp. (Apicomplexa: *Eimeriidae*) in the Brazilian cerrado. **Parasitology**, v. 142, n. 8, p. 1086-1094, 2015.

SULAIMAN, I. M. et al. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. **Emerging infectious diseases**, v. 9, n. 11, p. 1444-1452, 2003.

SULAIMAN, I. M. et al. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 6, p. 2805-2809, 2005.

TABARELLI, M. et al. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 132-138, 2005.

TEIXEIRA, M. et al. *Eimeria auritanensis* n. sp. and *E. gambai* Carini, 1938 (Apicomplexa: *Eimeriidae*) from the opossum *Didelphis aurita* Wied-Newied, 1826 (Marsupialia: *Didelphidae*) from southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 2, p. 83-86, 2007.

- TEIXEIRA, R. S. D. **Ocorrência de parasitas gastrointestinais em dois grupos de *Chinchilla lanigera* no norte de Portugal**. 2013. Dissertação de Mestrado. Universidade de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária
- THOMPSON, R. C. A. et al. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. **Parasitology today**, v. 16, n. 5, p. 210-213, 2000.
- THOMPSON, R. C. A. et al. Basic biology of *Cryptosporidium*. Parasitology Laboratory **Lawrence Journal**, Updated: 12 September 2003.
- THOMPSON, R. C. A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Veterinary Parasitology**. 126: 15-35, 2004.
- THOMPSON RCA et al. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Adv Parasitol*. 59: 77-158, 2005.
- THOMPSON J et al. Identification of zoonotic *Giardia* genotypes in marsupials in Australia. *Exp Parasitol*. 120: 88-93, 2008.
- THOMPSON RCA et al. *Giardia* in western Australian wildlife. *Vet. Parasitol*. 170: 207-211, 2010.
- THOMPSON, R. C. A.; SMITH, A. Zoonotic enteric protozoa. **Veterinary parasitology**, v. 182, n. 1, p. 70-78, 2011.
- THOMPSON, R. A. Parasite zoonoses and wildlife: one health, spillover and human activity. **International journal for parasitology**, v. 43, n. 12-13, p. 1079-1088, 2013.
- THOMPSON, R. C. A.; ASH, A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 40, p. 315-323, 2016.
- TYZZER, E.E. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. **Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine**, v.5, p.12-13, 1907.
- TYZZER, E. 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, 1910.
- TYZZER, E.E. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. **Archive fur Protistenkunde**, v.26, p.394- 412, 1912.
- URQUHART, G. M. et al. **Parasitologia veterinária**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 277 p. 1986.
- VALERIO-CAMPOS, I. et al. *Eimeria marmosopos* (Coccidia: *Eimeriidae*) from the Opossum *Didelphis marsupialis* L., 1758 (Didelphimorphia: *Didelphidae*), in Costa Rica. **Comparative Parasitology**, v. 82, n. 1, p. 148-151, 2015.

VETTERLING, J. M. et al. *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. **The Journal of protozoology**, v. 18, n. 2, p. 243-247, 1971.

VERMEULEN ET, ASHWORTH DL, ELDRIGDE MDB, POWER ML. Investigation into potential transmission sources of *Giardia duodenalis* in a threatened marsupial (*Petrogale penicillata*). *Infect Genet Evol.* 33: 277-280, 2015.

VIEIRA, L.S. Eimeriose de pequenos ruminantes: panorama da pesquisa no Nordeste do Brasil. **Série Documentos 28**. Sobral, CE: Embrapa Caprinos, 23p., 2002.

VIEIRA, L. S. **Endoparasitoses gastrintestinais em caprinos e ovinos**. Sobral: Embrapa Caprinos, 32p., 2005.

VIDAL, L. G. P. et al. Morfometria de oocistos de "*Eimeria*" em bezerras segundo a faixa etária e a intensidade de infecção, Município de Piraí, RJ. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 14, n. 4, 2014.

WALDRON LS, CHEUNG-KWOK-SANG C, POWER ML. Wildlife-associated *Cryptosporidium fayeri* in human, Australia. *Emerg. Infect. Dis.* 16: 2006-2007, 2010.

WIDMER G, LIN L, KAPUR V, FENG X, ABRAHAMSEN MS. Genomics and genetics of *Cryptosporidium parvum*: the key to understanding cryptosporidiosis. *Microbes Infect.* 4: 1081-1090, 2002.

XIAO L et al. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl Environ Microbiol.* 65: 1578-1583, 1999.

XIAO L et al. Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. *Int J Parasitol.* 32:1773–85. [http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00197-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00197-2). 2002.

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

XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. **Experimental parasitology**, v. 124, n. 1, p. 80-89, 2010.

XIAO, L.; FENG, Y. Molecular epidemiologic tools for waterborne pathogens *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. **Food and Waterborne Parasitology**, v. 8, p. 14-32, 2017.

XIAO, L.; CAMA, V. A. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. In: **Foodborne parasites**. Springer, Cham. p. 73-117, 2018.

YAOYU F, XIAO L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev.* 24: 110– 140, 2011.



- ZANETTE, R. A. et al. Occurrence of gastrointestinal protozoa in *Didelphis albiventris* (opossum) in the central region of Rio Grande do Sul state. **Parasitology international**, v. 57, n. 2, p. 217-218, 2008.
- ZAHEDI, A. et al. *Cryptosporidium* species and subtypes in animals inhabiting drinking water catchments in three states across Australia. **Water research**, v. 134, p. 327-340, 2018.
- ZHAO, Z. et al. Genotyping and subtyping of *Giardia* and *Cryptosporidium* isolates from commensal rodents in China. **Parasitology**, v. 142, n. 6, p. 800-806, 2015.
- ZHOU, L. et al. Host-adapted *Cryptosporidium* spp. in Canada geese (*Branta canadensis*). **Applied and Environmental Microbiology**. V. 70, 4211–4215, 2004.
- WOLFE, M. S. Giardiasis. **Clinical microbiology reviews**, v. 5, n. 1, p. 93-100, 1992.

## **Anexo A-** Regras para submissão a revista Parasitology Research (Artigo II).

- Impact Factor - 2.067
- Available - 1928 - 2020
- Volumes - 119
- Issues - 684
- Articles - 12,554
- Open Access - 320 Articles
  
- Instructions for Authors
  - Authorship Policy
  - Types of Papers
  - Manuscript Submission
  - Preprint Policy
  - Title page
  - Text
  - Scientific style
  - References
  - Tables
  - Artwork and Illustrations Guidelines
  - Electronic Supplementary Material
  - Ethical Responsibilities of Authors
  - Authorship principles
  - Compliance with Ethical Standards
  - Disclosure of potential conflicts of interest
  - Research involving human participants, their data or biological material
  - Informed consent
  - Research Data Policy
  - After acceptance
  - Open Choice
  - English Language Editing

### Manuscript Submission

#### ***Manuscript Submission***

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

### Title page

#### ***Title Page***

Please use this **template title page** for providing the following information.

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) of the author(s), i.e. institution, (department), city, (state), country
- A clear indication and an active e-mail address of the corresponding author
- If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

If address information is provided with the affiliation(s) it will also be published.

For authors that are (temporarily) unaffiliated we will only capture their city and country of residence, not their e-mail address unless specifically requested.

### ***Abstract***

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

*For life science journals only (when applicable)*

Trial registration number and date of registration

Trial registration number, date of registration followed by “retrospectively registered”

### ***Keywords***

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text

### ***Text Formatting***

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

## ***Acknowledgments***

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

References

## ***Citation***

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

## ***Reference list***

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738.  
<https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

- Book

South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California