Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária
Brazilian Journal of Veterinary Parasitology
ISSN 1984-2961 (Electronic)
www.rbpv.org.br

Short Communication

Cutaneous and conjunctival habronemosis in horses treated at the Veterinary Hospital of the Santa Catarina State University, Brazil

Habronemose cutânea e conjuntival em equinos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade do Estado de Santa Catarina, Brasil

Larissa Américo[1]; Lúcia Padilha Cury Thomaz de Aquino[1]; Anderson Barbosa de Moura[1]; Gianlucca Simão Nadal Ribeiro[2]; Joandes Henrique Fonteque[2]; Andreas Lazaros Chryssafidis[1]*

[1]Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias – LAPAR, Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, Lages, SC, Brasil
[2]Hospital Veterinário, Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, Lages, SC, Brasil

How to cite: Américo L, Aquino LPCT, Moura AB, Ribeiro GSN, Fonteque JH, Chryssafidis AL. Cutaneous and conjunctival habronemosis in horses treated at the Veterinary Hospital of the Santa Catarina State University, Brazil. *Braz J Vet Parasitol* 2024; 33(3): e004224. https://doi.org/10.1590/S1984-29612024049.

Abstract

Habronemosis, also known as habronemiasis or habronematidosis, is a parasitic disease of equids caused by the larval stages of Habronematidae nematodes (*Habronema muscae*, *Habronema microstoma*, and *Draschia megastoma*) that are transmitted by muscid flies. The presence of aberrant infective larvae in the cutaneous and conjunctival tissues of these hosts results in granulomatous, exudative, and ulcerated lesions, also known as "summer sores." In this study, we present a retrospective analysis of habronemosis cases in horses from the municipality of Lages, located on the Santa Catarina Plateau, a region with high altitudes and a temperate climate that differs from regions of Brazil where such parasitosis usually occurs. The equids were examined from 2008 to 2020 at the Veterinary Hospital of Santa Catarina State University. Sixteen patients were diagnosed and treated using macrocyclic lactones and wound cleaning. Most cases were recorded in autumn in horses (10/16, 62.5%) over 15 years of age (11/16, 68.8%), and the lesions were more frequently located in the conjunctiva (11/16, 68.8%). In scientific dissemination media, this is the first report of habronemosis on the Santa Catarina Plateau, Brazil. This information will contribute to the diagnosis, treatment and prevention of skin diseases in horses in this region.

Keywords: Equine health, dermatology, vector borne diseases.

Resumo

Habronemose (sin. habronemiasis, habronematidose) é uma doença parasitária em equídeos, causada pelos estágios larvais dos nematoides Habronematidae (*Habronema muscae*, *Habronema microstomae Draschia megastoma*) que são transmitidos por moscas muscídeas. A presença de larvas infectantes aberrantes nos tecidos cutâneos e conjuntivais desses hospedeiros resulta em lesões granulomatosas, exsudativas e ulceradas, também conhecidas como "feridas de verão". No presente estudo, apresenta-se uma análise retrospectiva de casos de habronemose em equinos do município de Lages, localizado no Planalto de Santa Catarina, região com elevadas altitudes e clima temperado, diferindo das regiões do Brasil nas quais normalmente ocorre tal parasitose. Os equinos foram examinados de 2008 a 2020 no Hospital Veterinário da Universidade do Estado de Santa Catarina. Dezesseis pacientes foram diagnosticados e tratados com lactonas macrocíclicas e limpeza de feridas. A maioria dos casos foi registrada no outono em cavalos-(10/16, 62,5%) com mais de 15 anos de idade (11/16, 68,8%), e as lesões localizaram-se mais frequentemente na conjuntiva (11/16, 68,8%). Em meios de divulgação científica, este é o primeiro relato de habronemose no Planalto de Santa Catarina, Brasil. Essas informações contribuirão para o diagnóstico, tratamento e prevenção de dermatopatias em equídeos desta região.

Palavras-chave: Saúde equina, dermatologia, doenças transmitidas por vetores.

Received February 23, 2024. Accepted June 24, 2024.
*Corresponding author: Andreas Lazaros Chryssafidis. E-mail: andreas.ch@udesc.br

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

Habronemosis, also known as habronemiasis or habronematidosis, is a parasitic disease of horses and other equids such as donkeys, mules, and zebras (Traversa et al., 2008), caused by spirurid helminths of the genus *Habronema* (*Habronema muscae* and *Habronema microstoma*), and the closely related species *Draschia megatoma* (Barlaam et al., 2020). These helminths are primarily transmitted by muscids, with houseflies (*Musca domestica*) serving as the main vectors for *H. muscae* and stable flies (*Stomoxys calcitrans*) for *H. microstoma* (Schuster & Sivakumar, 2017).

In the life cycle of these helminths, infective nematode larvae are deposited by flies around the equid nostrils or mouth. These larvae are swallowed and reach the adult stage in the stomach, leading to gastric habronemosis, which is often subclinical (Pugh et al., 2014). However, when infective larvae are deposited on wounds, abraded skin or mucous membranes, they enter the tissue and do not complete their lifecycle. When the larvae persist at a cutaneous or mucous membrane level, they induce an intense inflammatory reaction, resulting in cutaneous or conjunctival habronemosis, commonly referred to as "summer sores".

Habronemosis lesions cause aesthetic damage and, depending on their extent and location, can directly interfere with animal use in sports or work activities (Bianchi et al., 2016; Assis-Brasil et al., 2015). When the larvae are released into the eyes or periocular tissue, infected animals may present with conjunctivitis, blepharitis, dermatitis with photophobia and lacrimation (Gasthuys et al., 2004; Verhaar et al., 2018).

Habronemosis displays a seasonal pattern, with climatic conditions directly impacting the proliferation of vectors, leading to the emergence of lesions during periods of heightened fly activity, typically in spring and summer seasons (Littlewood, 1999). Lesions may spontaneously regress during cool weather in the winter months; however, some infected equids may experience annual recurrences (Traversa et al., 2007; Pugh et al., 2014; Verhaar et al., 2018).

Multiple therapeutic approaches have been proposed for habronemosis, all of which aim to eliminate the parasite and reduce the lesion size and associated inflammation. Treatment involves killing existing larvae with macrocyclic lactones, with ivermectin and moxidectin being the main reported drugs used (Xiao et al., 1994; Verhaar et al., 2018; Barlaam et al., 2020). The combined use of anthelmintics, corticosteroids and/or surgical excision have been presented using individualized protocols according to the location and extension of the lesion (Pusterla et al., 2003; Down et al., 2009; Pugh et al., 2014; Verhaar et al., 2018; Devi et al., 2019; Tyrnenopoulou et al., 2019; Salant et al., 2021).

Despite the worldwide distribution of habronemosis, little is known about the occurrence of cutaneous and conjunctival forms of the disease, mainly because of diagnostic limitations (Barlaam et al., 2020). The clinical diagnosis of summer sores can be challenging since the granulomatous lesions can easily be confused with a range of equid skin diseases.

The detection of larvae by microscopic examination of deep scraping or histopathology confirms the diagnosis; however, these methods have very low sensitivity, as larvae tend to be few and may be necrotic in more chronic lesions (Gasthuys et al., 2004; Verhaar et al., 2018; Tyrnenopoulou et al., 2019; Barlaam et al., 2020); the presence of parasite in histological examination has been reported as being present in only 44% of habronemosis cases (Pusterla et al., 2003). A semi-nested PCR protocol has been used for detecting *Habronema* spp. in skin samples with cutaneous lesions (Traversa et al., 2007; Down et al., 2009; Verhaar et al., 2018), even though a false-negative result was reported using that assay (Salant et al., 2021).

Therefore, the aim of the study was to conduct a retrospective reporting of horses attended at the Veterinary Hospital of Santa Catarina State University from 2008 to 2020, focusing specifically on cases of cutaneous and conjunctival habronemosis. This information will effectively contribute to the expansion of the clinical diagnosis of skin diseases in horses in temperate climate regions, as well as the development of new research to seek new alternatives for preventing this parasite in the southern region of Brazil.

Materials and Methods

Study location

The study was carried out by analyzing the records of horses attended from 2008 to 2020, in the Veterinary Hospital of Santa Catarina State University, with the specific focus on skin disease, selecting cases of cutaneous and conjunctival habronemosis. The hospital is located in the municipality of Lages, on the Santa Catarina Plateau, which attends to animals within the entire region.

Evaluation of records and selection criteria

The medical records of all horses treated during that period were reviewed for skin disease, with subsequent selection of cutaneous and/or conjunctival lesions related to habronemosis. The criteria used to select cases included clinical suspicion, appearance of lesions compatible with cutaneous and conjunctival habronemosis, success of specific treatment and results of histopathological examinations, if any. Information regarding age, gender, lesion location, date of attendance, and treatment was compiled and analyzed. Data were evaluated using descriptive analyses of the animal care records.

Results

During the survey period, a total of sixteen horses were clinically diagnosed with cutaneous and/or conjunctival habronemosis. All animals underwent treatment with 1% ivermectin administered orally at intervals of 30 days, totaling two to four doses, depending on lesion regression and the manufacturer's recommendations. Regarding the lesions, cleaning was performed with 10% degerming iodine once or twice a day, depending on the severity of the lesion, for seven days or until its total regression. One of the animals performed a histopathological examination of the lesion, which revealed the presence of an infiltrate of eosinophils, macrophages and marked diffuse epithelioid macrophages accompanied by nematode larvae, which are in the midst of foci of caseous necrosis with mineralization. This type of histological lesion is compatible with habronemosis. All animals were monitored throughout the therapy period until complete regression of the lesions was achieved. Data obtained from the affected horses are shown in Table 1 and detailed below.

The affected horses ranged in age from 8 to 25 years or older, with the majority being over 15 years of age (11/16, 68.75%). Horses were more frequently affected (10/16, 62.50%) than mare (6/16, 37.50%).

Of the 16 identified cases, conjunctival habronemosis was diagnosed in 10 horses (62.50%), while cutaneous habronemosis was detected in five animals (31.25%), and one horse (6.25%) presented both forms of the disease.

Table 1. Horses diagnosed with cutaneous and/or conjunctival habronemosis at the Veterinary Hospital of the Santa Catarina State University, in the period from 2008 to 2020. The table contains individual data regarding age, gender, location of the lesion, season/month and year when the animals were attended, diagnosed and treated.

Animal	Age	Gender	Lesion site	Season / month	Year
1	10	F	Cutaneous	Fall / June	2008
2	8	M	Cutaneous / Conjunctival	Summer / March	2012
3	NR*	M	Conjunctival	Spring / November	2013
4	> 20	F	Conjunctival	Fall / March	2013
5	20	M	Conjunctival	Fall / March	2013
6	> 20	M	Conjunctival	Fall / May	2013
7	< 20	M	Cutaneous	Fall / April	2014
8	> 25	M	Conjunctival	Fall / May	2014
9	20	F	Conjunctival	Fall / May	2015
10	<20	F	Conjunctival	Summer / March	NR*
11	18	M	Cutaneous	Fall / April	NR*
12	12	M	Cutaneous	Fall / April	2016
13	18	M	Cutaneous	Fall / April	2018
14	11	M	Conjunctival	Fall / April	2018
15	25	F	Conjunctival	Summer / February	2019
16	16	F	Conjunctival	Summer / March	2020

*NR: not recorded.

However, all lesions identified as being caused by habronematid larvae were located on the faces of the horses, mostly under the medial canthus of the eyes (Figure 1).

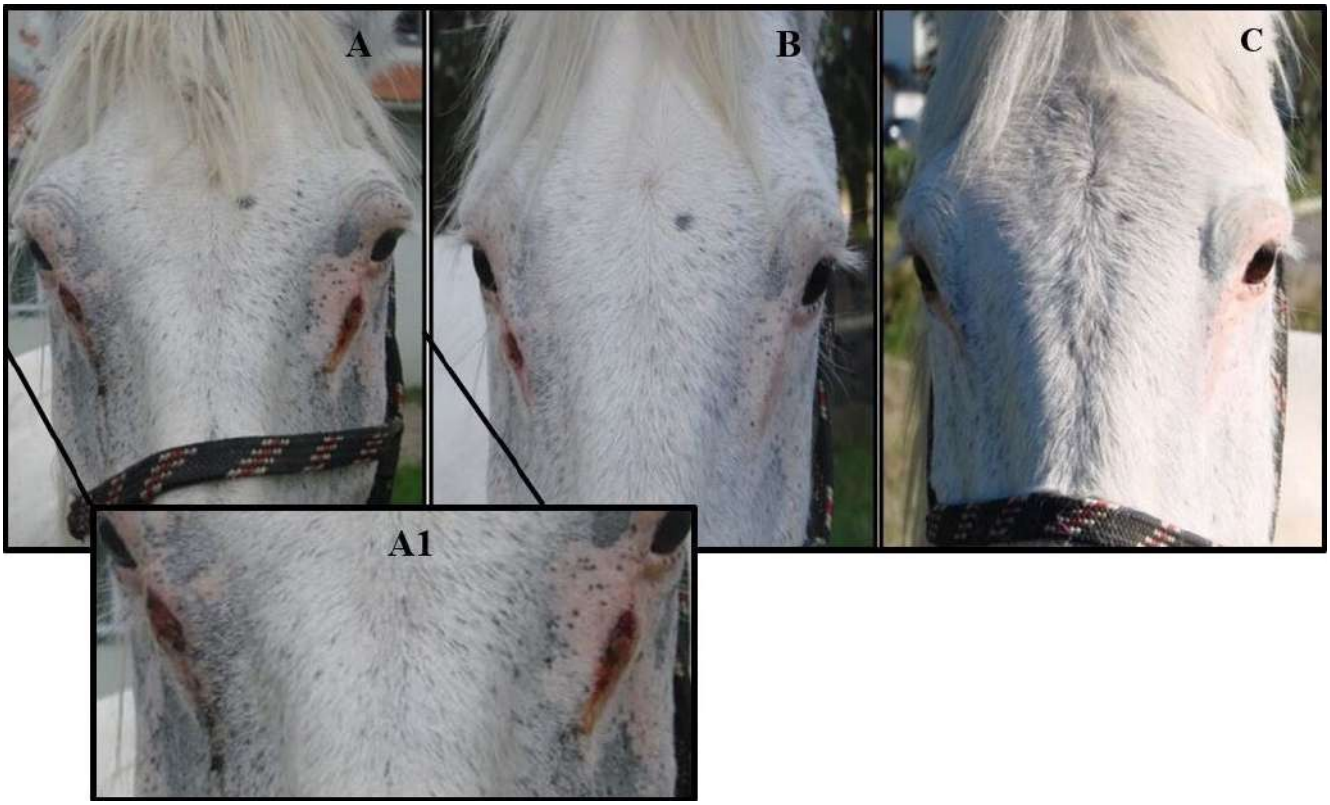

Figure 1. Horse with cutaneous habronemosis lesions, located in the medial corner of both eyes. The figure shows the regression of the lesions after treatment with Ivermectin. (A) First treatment; (A1) Enlarged image of the initial lesions; (B) During the treatment; (C) Complete healing after the end of treatment.

Regarding the season and year of medical attendance and diagnosis, 11 cases (68.75%) occurred in the fall and four cases (25.00%) occurred in summer. Only one case (6.25%) was recorded in spring.

Discussion

Despite the worldwide distribution of cutaneous and conjunctival habronemosis, significant gaps remain in our knowledge regarding its epidemiology, and the clinical and therapeutic aspects of this parasitosis, especially in areas with a temperate climate. In the present study, cutaneous and conjunctival habronemosis were diagnosed based on the clinical appearance of the lesions and their regression after anthelmintic treatment with ivermectin. The drug demonstrated to be highly effective (98–100%) in tests against gastric habronemosis (Xiao et al., 1994), as well as in a study carried out in Brazil, ivermectin demonstrated efficacies of 92.48% and 94.85% against two different *H. muscae* strains (Felippelli et al., 2015).

The determination of age prevalence in our survey was hampered by the lack of precise data in the medical records of some horses, but it was noticed that despite a wide variation in the age of the affected animals, none of them were less than eight years old. This fact is relevant in the current report, because the majority of owners did not use the animals for sport or breeding purposes, but rather for the purpose of using them as animals for transporting loads. In comparison to age, these findings are in line with those of two other reports, in which the youngest affected horses were eight and six years old (Verhaar et al., 2018; Salant et al., 2021).

In the present study, the lesions were more common in males than in females. This result corroborates the findings of two retrospective histopathological surveys conducted in the United States (Valentine, 2005) and Brazil (Bianchi et al., 2016), that reported a positive correlation between male horses and the occurrence of habronemosis.

Regarding the regions of the body most prone to summer wounds, these are the regions that are also the most susceptible to traumatic injuries linked to various factors, such as handling, sports or animal behavior. Cutaneous habronemosis has been reported most frequently on the limbs and medial corner of the eye (Pusterla et al., 2003; Down et al., 2009; Devi et al., 2019; Salant et al., 2021). Likewise, in non-cutaneous habronemosis, the most commonly diagnosed sites are the ocular conjunctiva and the urethral process of the penis (Tyrnenopoulou et al., 2019; Gasthuys et al., 2004; Pusterla et al., 2003).

Although generally not life-threatening, habronemotic lesions can lead to aesthetic and functional damage that may reduce the performance of equids in sports and work activities. Despite its importance, information on the distribution and prevalence of this disease worldwide is scarce, probably because of diagnostic limitations, which may cause an underestimation of the number of cases. Clinical diagnosis is challenging because of the similarity of habronemosis lesions to other horse skin diseases, such as cutaneous sarcoids, squamous cell carcinoma, mast cell tumors, and fungal and bacterial granulomas, which should be considered as differential diagnoses. Lesions of ocular habronemosis may resemble foreign bodies, neoplasia, onchocerciasis, and/or phycomycosis/botryomycosis (Pusterla et al., 2003; Pugh et al., 2014; Tyrnenopoulou et al., 2019).

Notably, the lesions found in the horses in this study were restricted to the face. On the Santa Catarina Plateau, it is still common to use horses for pulling carts, and almost all horses have been used for this purpose. The high proportion of conjunctival lesions observed may be due to the frequent use of blinders, which provide protection to flies, favoring their longer permanence in the ocular and periocular regions to which they are attracted by eye secretions. It is not possible to exclude the possibility that other lesions located in different body parts may have been confused with other skin diseases, as it was only possible to define a case as related to habronemosis, with clearly described and compatible lesions, and successful treatment using molecules related to such diseases.

The evaluation of seasonality showed that, except for one record in spring, all cases occurred in the summer and fall, mostly in March, April, and May (68,75%). This finding coincides with those obtained in a retrospective study based on the histopathological diagnosis of equine skin diseases conducted in southern Brazil, which identified a higher prevalence of cutaneous habronemosis from January to May (Assis-Brasil et al., 2015).

It is well known that habronemosis is prevalent in regions with tropical and subtropical climates because of the higher proliferation and activity of fly vectors. Nevertheless, summer sores have been also reported in colder climates in temperate regions of Belgium (Gasthuys et al., 2004), England (Down et al., 2009), the Netherlands (Verhaar et al., 2018), and Greece (Tyrnenopoulou et al., 2019).

These data were compared to the current retrospective study, as the climate in the Santa Catarina Plateau, is classified as temperate oceanic with constant humidity (Ricken et al., 2018). The region experiences periods of very low temperatures in winter, which can harm the proliferation of vectors. Seasonality helps to reduce cases of habronemosis in the winter and subsequent spring, as observed in this study, however it does not exclude the presence of positive cases in the summer and fall.

Conclusion

No similar survey of cutaneous and conjunctival habronemosis was previously performed in the Santa Catarina Plateau. In the present study, it was demonstrated specifically that in the horses treated at the Veterinary Hospital of Santa Catarina State University, from 2008 to 2020, habronemosis occurred mostly on the face and eyes of male horses over 15 years old during Fall and Summer. Due to the small number of cases and animals, and the limitations of a retrospective study, it is not possible to extrapolate the conclusions (prevalence) to the entire equine population in the region. However, this report confirms the occurrence of cutaneous and conjunctival habronemosis in the locality, allowing clinicians to consider this disease in the differential diagnosis of dermatopathies in equids. This study contributes for advancing the knowledge on the epidemiology of habronemosis in Brazil, and highlights areas for further investigation.

Ethics declaration

This study was approved by the ethical committee at Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV).

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

References

Assis-Brasil ND, Marcolongo-Pereira C, Stigger AL, Fiss L, Santos BL, Coelho ACB, et al. Equine dermatopathies in Southern Brazil: a study of 710 cases. *Cienc Rural* 2015; 45(3): 519-524. http://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140901.

Barlaam A, Traversa D, Papini R, Giangaspero A. Habronematidosis in equids: current status, advances, future challenges. *Front Vet Sci* 2020; 7: 358. http://doi.org/10.3389/fvets.2020.00358. PMid:32719812.

Bianchi MV, Boos GS, Mello LS, Vargas TP, Sonne L, Driemeier D, et al. A retrospective evaluation of equine cutaneous lesions diagnosed in southern Brazil. *Acta Sci Vet* 2016; 44: 1388.

Devi CN, Borthakur SK, Patra G, Singh NS, Tolenkhomba TC, Ravindran R, et al. Incidence of cutaneous habronemosis in Manipuri ponies in India. *Vet Parasitol Reg Stud Rep* 2019; 17: 100295. http://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100295. PMid:31303226.

Down SS, Hughes I, Henson FMD. Cutaneous habronemiasis in a 9-year-old Arab Gelding in the United Kingdom. *Equine Vet Educ* 2009; 21(1): 4-8. http://doi.org/10.2746/095777309X382631.

Felippelli G, Cruz BC, Gomes LVC, Lopes WDZ, Teixeira WFP, Maciel WG, et al. Susceptibility of helminth species from horses against different chemical compounds in Brazil. *Vet Parasitol* 2015; 212(3-4): 232-238. http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.07.041. PMid:26277565.

Gasthuys FMR, Van Heerden M, Vercruysse J. Conjunctival habronemiosis in a horse in Belgium. *Vet Rec* 2004; 154(24): 757-758. http://doi.org/10.1136/vr.154.24.757. PMid:15224597.

Littlewood J. Control of ectoparasites in horses. *In Pract* 1999; 21(8): 418-424. http://doi.org/10.1136/inpract.21.8.418.

Pugh DG, Hu XP, Blagburn B. Habronemiasis: biology, signs, and diagnosis, and treatment and prevention of the nematodes and vector flies. *J Equine Vet Sci* 2014; 34(2): 241-248. http://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.06.004.

Pusterla N, Watson JL, Wilson WD, Affolter VK, Spier SJ. Cutaneous and ocular habronemiasis in horses: 63 cases (1988-2002). *J Am Vet Med Assoc* 2003; 222(7): 978-982. http://doi.org/10.2460/javma.2003.222.978. PMid:12685790.

Ricken P, Hess AF, Borsoi GA. Relações Biométricas e Ambientais no Incremento Diamétrico de *Araucaria angustifolia* no Planalto Serrano Catarinense. *Cienc Florest* 2018; 28(4): 1592-1603. http://doi.org/10.5902/1980509835107.

Salant H, Rojas A, Yardeny D, Brenner O, Schvartz G, Baneth G, et al. Cutaneous habronemosis in horses: first molecular characterization of *Habronema muscae* in Israel. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2021; 75: 101608. http://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101608. PMid:33383475.

Schuster RK, Sivakumar S. The larval development of *Habronema muscae* (Nematoda: Habronematidae) affects its intermediate host, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Parasitol Res* 2017; 116(2): 503-509. http://doi.org/10.1007/s00436-016-5312-y. PMid:27817010.

Traversa D, Iorio R, Petrizzi L, De Amicis I, Brandt S, Meana A, et al. Molecular diagnosis of equid summer sores. *Vet Parasitol* 2007; 150(1-2): 116-121. http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.08.025. PMid:17904746.

Traversa D, Otranto D, Iorio R, Carluccio A, Contri A, Paoletti B, et al. Identification of the intermediate hosts of *Habronema microstoma* and *Habronema muscae* under field conditions. *Med Vet Entomol* 2008; 22(3): 283-287. http://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2008.00737.x. PMid:18816277.

Tyrnenopoulou P, Diakakis N, Psalla D, Traversa D, Papadopoulos E, Antonakakis M. Successful surgical management of eosinophilic granuloma on the urethral process of a gelding associated with *Habronema* spp. infection. *Equine Vet Educ* 2019; 31(1): e1-e4. http://doi.org/10.1111/eve.12890.

Valentine BA. Equine cutaneous non-neoplastic nodular and proliferative lesions in the Pacific Northwest. *Vet Dermatol* 2005; 16(6): 425-428. http://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2005.00485.x. PMid:16359312.

Verhaar N, Hermans H, van Rooij E, van Oldruitenborgh-Oosterbaan MS, Ensink J. Case series: periocular habronemiasis in five horses in the Netherlands. *Vet Rec* 2018; 182(26): 746. http://doi.org/10.1136/vr.104265. PMid:29695450.

Xiao L, Herd RP, Majewski GA. Comparative efficacy of moxidectin and ivermectin against hypobiotic and encysted cyathostomes and other equine parasites. *Vet Parasitol* 1994; 53(1-2): 83-90. http://doi.org/10.1016/0304-4017(94)90020-5. PMid:8091622.

Veterinary Research Communications (2024) 48:3349–3354
https://doi.org/10.1007/s11259-024-10462-5

BRIEF REPORT

Occurrence of antibodies and epidemiological significance of *Toxoplasma Gondii* and *Neospora caninum* infections in canine populations of Laguna, State of Santa Catarina

Ana Paula Remor-Sebolt[1] · Felipe Rieth de Lima[1] · Larissa Américo[1] · Mayckon Antônio Cardoso Padilha[1] · Andreas Lazaros Chryssafidis[1] · Anderson Barbosa de Moura[1]

Received: 15 March 2024 / Accepted: 1 July 2024 / Published online: 8 July 2024
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2024

Abstract

Toxoplasma gondii and *Neospora caninum* are two species of protozoa that belong to the Apicomplexa phylum and are distributed worldwide. *T. gondii* is one of the most extensively studied parasites due to its significant health implications. In this study, an investigation on the occurrence of *T. gondii* and *N. caninum* antibodies in dogs from a municipality on the southern coast of Santa Catarina, Brazil, and its associated risk factors were conducted. Blood samples were collected from 238 dogs, and a questionnaire was used to gather relevant information about the dogs, including their age, gender, breed, housing and habits. The serum samples were then subjected to indirect fluorescent antibody test (IFAT) using a cut-off of 1:64 and 1:50 to detect antibodies against *T. gondii* and *N. caninum*, respectively. The study's findings revealed that the frequency of *T. gondii* was 23.1% (55/238), and no factors associated with infection in these animals were identified. However, the frequency of *N. caninum* was 4.2% (10/238), and the study identified the type of housing and environment in which the dogs lived as the factors that were associated with the infection. Stray animals and those that lived exclusively outdoors had a greater frequency of *N. caninum*. These results indicate that dogs from Laguna, Santa Catarina, Brazil, are exposed to *T. gondii* and *N. caninum*. As such, further studies are necessary to enhance the understanding of the nature of these protozoan infections in the municipality.

Keywords Toxoplasmosis · Neosporosis · Dogs · IFAT

Introduction

Dogs are considered important hosts of several parasites, including the protozoa *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*, with *T. gondii* being of special interest to one health, (Dubey 1999; Dubey and Jones 2008). Both are distributed worldwide and can infect a wide range of animal species (Azevedo et al. 2005). It is estimated that one-third of the world's human population has already been infected by *T. gondii*, which is considered a major public health problem, due to its zoonotic potential, causing great damage to the public health system and animal production (Dubey et al. 2020). *N. caninum* affects a range of warm-blooded animals causing economic losses, especially cattle due to frequent abortions and other reproductive failures (Dubey and Schares 2011).

Dogs are the definitive hosts of *N. caninum*, while the intermediate host for *T. gondii*. Canines can get infected by both protozoan through horizontal (ingestion of raw tissues or meat containing cysts; water or food contaminated with oocysts; or contact with cat feces, for *T. gondii* infection) or vertical means. The epidemiological relevance of neosporosis in dogs is highlighted in rural settings, since it is a common cause of abortion in cattle. In urban zones, dogs can be an epidemiological indicator of the circulation of *N. caninum* and *T. gondii*, providing crucial information, especially due to the intimate contact between humans and canines, and the possibility of movement of these animals between rural and peri urban or urban zones.

✉ Ana Paula Remor-Sebolt
anapsebolt@gmail.com

[1] Center for Agroveterinary Sciences (CAV), Laboratory of Parasitology and Parasitic Diseases, Department of Veterinary Medicine, Santa Catarina State University (UDESC), 2090 Luiz de Camões Ave, Lages, SC 88520-000, Brazil

In Brazil, recent surveys have reported that the seroprevalence of *T. gondii* in dogs ranges from 7.95 to 67.02%, while for *N. caninum*, from 1.4 to 37.01% (Ratzlaff et al. 2018; Pinto-Ferreira et al. 2019). Concerning the State of Santa Catarina (SC), the overall frequency of *T. gondii* infection in dogs at the Serrana region and coastal region of the State was of 22.3% (89/400), with no significant difference between the two analyzed areas (Moura et al. 2009). Human toxoplasmosis, and the relevance of the agent in a one health approach, in SC is highlighted by reports of up to 16% of pregnant women IgG positive for anti-*T. gondii* antibodies (Quadros et al. 2015). There are few studies on serological frequency of *N. caninum* infection in dogs in SC, but one study reported that 12.3% (49/400) of the samples were positive for antibodies against *N. caninum* (Moura et al. 2011).

Thus, the objective of this study was to detect antibodies against *T. gondii* and *N. caninum* in dogs from the municipality of Laguna, a coastal municipality of the state of Santa Catarina, Brazil, and to analyze risk factors associated with infections.

Materials and methods

Study location and sample selection

The research methods received approval from the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA/UDESC) under protocol number 5001130319. The study was conducted in the municipality of Laguna, which is situated on the southern coast of the State of Santa Catarina, Brazil (28°28′57″; 48°46′51″) (Fig. 1).

According to unpublished data from the Animal Welfare Department of the municipality, the estimated canine population of Laguna is approximately 7,000 animals. The sample size was determined using the software Epiinfo 7.0, assuming an expected frequency of 14% (Anvari et al. 2020), with a margin of error of 5%, and a confidence level of 95%, with a determined sample size of 238 dogs. To minimize potential sampling errors, a simple random design was used, with a design effect of 1.5.

The blood samples were collected with the consent of the dog owners from January to July 2019 in ten neighborhoods of Laguna. All collections took place in the owner's house, except for animals without owners, in which cases the collection took place on the streets. Samples were primarily used to evaluate the occurrence of *Dirofilaria immitis* and secondarily *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. Only dogs aged six months or older were eligible for inclusion in this study (Sebolt et al. 2022).

Three milliliters (3 mL) of blood were collected from each dog via venipuncture of the jugular or cephalic veins, placed in a tube without any anticoagulant and kept refrigerated at 4 °C until processing. The blood samples were centrifuged at 1863 × *g* for 10 min, and the obtained serum was used to detect immunoglobulins (IgG) against *T. gondii* and *N. caninum* using an indirect fluorescent antibody test (IFAT). All samples were processed at the Laboratory of Parasitology and Parasitic Diseases at the Santa Catarina State University, Center for Agroveterinary Sciences (LAPAR-UDESC-CAV).

The neighborhoods of Laguna were categorized into four regions based on their geographical proximity: Region 1:

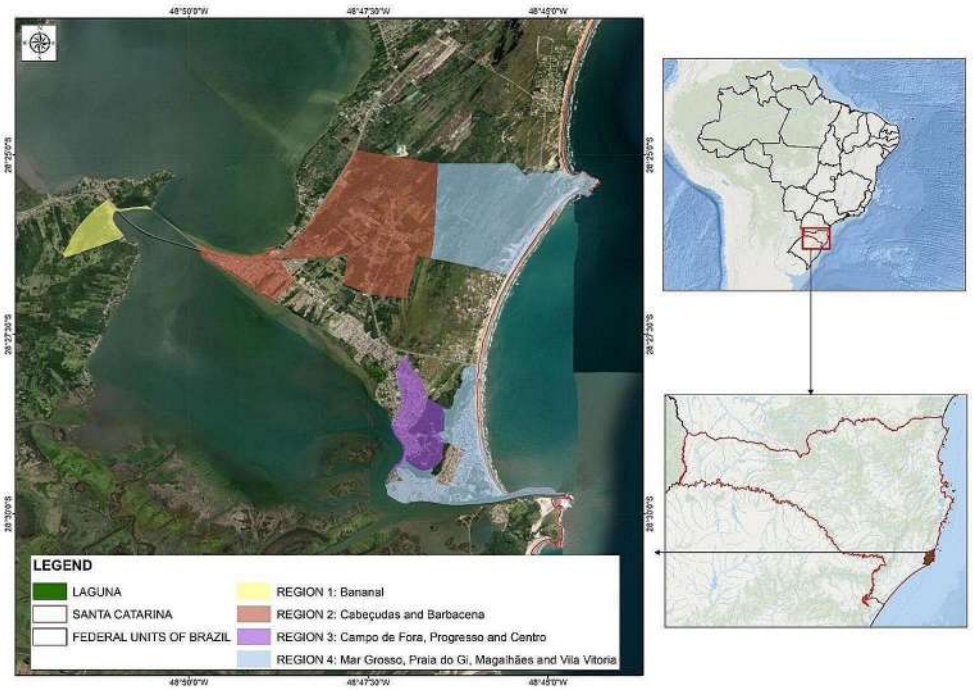

Fig. 1 Study area and sample collection points in the municipality of Laguna, SC, Brazil

Bananal; Region 2: Cabeçudas and Barbacena; Region 3: Campo de Fora, Progresso, and Centro; and Region 4: Mar Grosso, Praia do Gi, Magalhães, and Vila Vitoria. During the process of obtaining written informed consent from the dog owners, an epidemiological questionnaire was used to gather information regarding age (0–1, > 1–5, < 5–10 or > 10 years), gender (male or female), breed (pure breed or mixed breed), housing (shelter, house, apartment or streets) and habits (mostly insides, outsides/insides, outsides, all of those with owners, and wandering dog, being animals without owners, who live on the streets).

Indirect immunofluorescence assay (IFAT)

The IFAT was conducted based on Camargo (1964) and Conrad et al. (1993) to detect IgG against *T. gondii* and *N. caninum.* Slides adsorbed in tachyzoites from the RH and Nc1 strains of *T. gondii* and *N. caninum*, respectively, were used. The slides were prepared by the department of Parasitology at the State University of Londrina, at the State of Paraná, Brazil, and sent to our laboratory for use. All samples were submitted to a screening process, being diluted in PBS in a 1:64 and 1:50 ratio for *T. gondii* and *N. caninum*, respectively. Positive samples for *T. gondii* were then serially diluted in PBS in multiples of four, from 1:64 to 1:4096, and *N. caninum* in multiples of two, from 1:50 to 1:1600. If a sample was positive for the maximum stipulated dilution, further dilutions were realized until a negative result was found. The cutoff dilution for *T. gondii* was 1:64 (Silva et al. 2002), and for *N. caninum*, it was 1:50 (Silva et al. 2007).

The IFAT consisted on the addition of 12µL of the diluted serum to each well based on the described serial dilution and incubation for 40 min at 37 °C in a humid incubator. The slides were then washed three times with PBS, 10 min per wash, discarding the PBS after each washing, and put to dry in a humid incubator for approximately 10 min. Subsequently, 12µL of canine conjugated (1:3000 dilution) was added to each well. The slides were incubated and afterwards another round of the described washing and drying protocol took place. Thereafter, buffered glycerin was added atop the slide, as well as a coverslip. The slides were examined using an epifluorescence microscope (Axiolab, Carl Zeiss Microscopy, Germany).

Statistical analysis

The obtained data were analyzed using the software RStudio (2022.12.0 Build 353). The strength of the association between factors was determined by odds ratio (OR) analysis, with significance determined when the 95% confidence interval did not include 1. The associations between groups were assessed using both the chi-square test ($\chi 2$) and Fisher's exact test, with the significance level set at $p \leq 0.05$.

Results

Of the 238 dogs analyzed, 55 (23.1%) tested positive for antibodies against *T. gondii*, with antibody titers ranging from 64 to 16,384 (Table 1). While the breed did not demonstrate a significant association, most of the positive dogs were mixed breeds (Table 2). The highest number of positives was observed in animals that lived in a house, streets or shelters and had access to outside areas (Table 2). These animals had the habit of staying both inside and outside the residence or exclusively in the outdoor area. Although certain variables and its groups had a higher number of positive animals, no statistical significance between the risk factors and seropositivity was identified.

The frequency of *N. caninum* infection was 4.2% (10/238), with antibody titers ranging from 50 to 400. No significant associations were found regarding age, gender, or breed ($p > 0.05$). However, there was an association between the animals' housing and their living environment ($p < 0.05$), with a greater frequency of infection in stray dogs or dogs that exclusively lived outside the home (18.7%) (Table 3).

Of the total number of animals, 60 (25.2%) tested positive for antibodies against at least one parasite, and five (2.1%) were coinfected with both *T. gondii* and *N. caninum*. Although age was not statistically correlated with seropositivity for any of the agents, a higher number of positive dogs was identified over one year of age.

Discussion

The results demonstrated seropositivity for *T. gondii* and *N. caninum* in dogs at Laguna, marking the first study of these parasites in this municipality. The frequency of *T. gondii* (23.1%) was found to be greater than *N. caninum* (4,2%), which is considered a frequent finding in similar studies (Sevá et al. 2020). Similar frequencies for *T. gondii* were reported in other municipalities in the state, such as Lages

Table 1 Distribution of titers evaluated by IFAT for anti-*T. Gondii* and anti-*N. Caninum* antibodies in 238 dogs of Laguna, Santa Catarina

	Titer	*N*° of positive dogs (%)
Toxoplasma gondii	64	16 (29.1)
	256	18 (32.7)
	1024	14 (25.5)
	4096	5 (9.1)
	16,384	2 (3.6)
Total	-	**55 (100)**
Neospora caninum	50	5 (50.0)
	100	2 (20.0)
	200	2 (20.0)
	400	1 (10.0)
Total	-	**10 (100)**

Table 2 Prevalence of *Toxoplasma Gondii* by age, gender, breed, home, habits in dogs in Laguna, Santa Catarina, Brazil

		General results				
Variable	Group	N° of animals	Positives N (%)	OR	IC 95%	*P* value
Age	0–1	32	5 (15.6)	-	-	0.680
	> 1–5	161	39 (24.2)			
	> 5–10	44	11 (25.0)			
	> 10	1	0 (0.0)			
Gender	Male	89	25 (28.1)	1.549	0.841–2.856	0.159
	Female	149	30 (20.1)			
Breed	Pure breed	31	5 (16.1)	0.604	0.220–1.656	0.323
	Mixed breed	207	50 (24.2)			
Housing	Shelter	46	12 (26.1)	-	-	0.461
	Apartment	13	1 (7.7)			
	House	163	37 (22.7)			
	Streets	16	5 (31.3)			
Habits	Mostly insides	21	1 (4.8)	-	-	0.190
	Outsides/Insides	65	16 (24.6)			
	Outsides	136	33 (24.3)			
	Wandering dog	16	5 (31.3)			

Exact Fisher's test (0.05)

OR Odds Ratio

P value = chi-square test ($\chi 2$)

Table 3 Prevalence of *Neospora caninum* by age, gender, breed, housing, habits in dogs in Laguna, Santa Catarina, Brazil

		General results				
Variable	Group	N° of animals	Positives N (%)	OR	IC 95%	*P* value
Age	0–1	32	1 (3.1)	-	-	0.417
	> 1–5	161	9 (5.6)			
	> 5–10	44	0 (0.0)			
	> 10	1	0 (0.0)			
Gender	Male	89	4 (4.5)	1.122	0.308–4.088	0.862
	Female	149	6 (4.0)			
Breed	Pure breed	31	0 (0.0)	0.000	0–3.002	0.211
	Mixed breed	207	10 (4.8)			
Housing	Shelter	46 b	1 (2.2)	-	-	0.020
	Apartment	13 ab	1 (7.7)			
	House	163 b	5 (3.1)			
	Streets	16 a	3 (18.8)			
Habits	Mostly insides	21 ab	1 (4.8)	-	-	0.027
	Outsides/Insides	65 b	2 (3.1)			
	Outsides	136 b	4 (2.9)			
	Wandering dog	16 a	3 (18.8)			

Exact Fisher's test (0.05)

OR Odds Ratio

P value = chi-square test ($\chi 2$)

(26%) and Balneário Camboriú (18.5%), even though the evaluated animals in this study were all housed pets (Moura et al. 2009). However, the frequency observed in this study was considered intermediate when compared to other states of the country, such as in Paraíba (22,1%) (Fernandes et al. 2018), Rio Grande do Norte (11,5%) (Dantas et al. 2013), and São Paulo (38,1%) (Aguiar et al. 2012), all studies conducted with a 1:64 cut-off for *T. gondii.*

Brazil has high rates of *T. gondii* infection in dogs, and the varying frequency observed across regions may be attributed to geographic, socioeconomic, and health-related differences, as well as genetic variability of the parasite (Fernandes et al. 2018; Dubey et al. 2020). Clinically, canine toxoplasmosis is relevant because of its neuromuscular, respiratory and gastrointestinal symptoms (Dubey 1999; Dubey et al. 2020), with dogs as possible mechanical

shedders of the agent (Rengifo-Herrera et al. 2017) and sentinels for environmental contamination (Benitez et al. 2017). Although dogs are not a direct source of infection by *N. caninum* or *T. gondii* for humans, they can serve as bioindicators of environmental protozoa contamination, and play a crucial role in the transmission of *N. caninum* as definitive hosts, specially to livestock (Huertas-López et al. 2021).

The frequency of *N. caninum* in this study (4,2%) was considered low compared to other municipalities at the State of SC, such as Lages (13%) and Balneário Camboriú (11.5%), and other states in the country, such as Rio Grande do Sul (37,1%) (Moura et al. 2011; Ratzlaff et al. 2018).

The low frequency of detected antibodies can be justified considering that the canine populations in both studies originated from the urban zone, as the high frequency of the parasite is associated with residing in rural areas (Robbe et al. 2016). Clinically, canine neosporosis is commonly responsible for neurological symptoms in young animals who were congenitally infected, while the epidemiological relevance of infected dogs is the contact with cattle, culminating in reproductive disorders (Dubey and Lindsay 1996; Dubey 2003).

Concerning the frequency of *T. gondii* and *N. caninum* in other countries, a similar study conducted in Mexico with sheltered dogs points out a frequency of antibodies in dogs against *T. gondii* and *N. caninum* of 51,5% and 2,02%, respectively (Dubey et al. 2007), while another study at Austria, using sera collected from dogs at different laboratories and clinics, obtained a frequency of 26% and 3,6%, for *T. gondii* and *N. caninum*, respectively, with 1,7% of animals being positive for both parasites (Wanha et al. 2005). At Korea, a frequency of 12,8% and 3,6% was identified for *T. gondii* and *N. caninum*, respectively, in stray and household dogs (Nguyen et al. 2012). All findings were similar to those described in this study, especially concerning *N. caninum* frequency.

Although age was not associated with infection, that is, there was no statistical significance between age and seropositivity, a greater number of animals positive for both parasites was observed in dogs older than one year. This finding suggests that age is related to increased seroprevalence and a greater possibility of contact with sources of infection, such as the ingestion of oocysts and tissue cysts (Moura et al. 2011; Dubey et al. 2020).

No association was observed between gender and seropositivity, which is consistent with the findings of other studies (Moura et al. 2009, 2011; Caramalac et al. 2021).

Stray dogs or dogs that lived outside the house, particularly mixed breed dogs, were more likely to be seropositive, indicating a risk factor for *N. caninum* infection ($p < 0.05$). However, the housing and habits of these animals were not considered risk factors for *T. gondii* infection. Previous studies have indicated that dogs with access to streets may be more exposed to environments contaminated by oocysts from *N. caninum* and *T. gondii*, including water and food sources, and play a role in the predation of other *T. gondii* infected animals, such as birds and rodents (Moura et al. 2009, 2011; Huertas-López et al. 2021). Furthermore, some of these animals may have contact with small cattle farms close to urban areas, such as in regions 1 and 2 of study, which may allow for the perpetuation of the life cycle of *N. caninum.* These dogs may get infected by ingestion of raw tissues found on rural properties, such as those from bovine abortions. The now infected dog may move between rural and peri urban or urban areas, contaminating these environments with their feces and possible new hosts.

The data obtained in this study provide evidence of exposure of dogs to *T. gondii* and *N. caninum*. Dogs can serve as sentinels for the circulation of zoonotic pathogens, particularly *T. gondii*, and are important indicators of animal health with respect to *N.* caninum infection. Understanding the epidemiology of these agents is crucial for guiding control and prevention strategies to minimize the occurrence of human and animal infections, given that humans and dogs coexist in the same environment.

Author contributions Conceptualization: A.P.R.S., A.B.M.; Methodology: A.P.R.S., A.B.M.; Formal analysis and investigation: A.P.R.S., F.R.L.; Writing - original draft preparation: A.P.R.S.; Writing - review and editing: A.P.R.S., A.B.M., F.R.L., M.A.C.P., L.A.; Funding acquisition and Supervision: A.B.M. and A.L.C.

Funding This research was funded by the Santa Catarina State Research and Innovation Support Foundation (FAPESC) through Public Call Notice 048/2022 - Grant Term: 2023TR000236.

Data availability No datasets were generated or analysed during the current study.

Declarations

Ethics approval The research methods received approval from the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA/UDESC) under protocol number 5001130319.

Competing interests The authors declare no competing interests.

References

Aguiar DM, Amude AM, Santos LGF et al (2012) Canine distemper virus and *Toxoplasma gondii* co-infection in dogs with neurological signs. Arq Bras Med Veterinária E Zootec 64:221–224. https://doi.org/10.1590/S0102-09352012000100032

Anvari D, Saberi R, Sharif M et al (2020) Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dog population worldwide: a systematic review and meta-analysis. Acta Parasitol 65:273–290. https://doi.org/10.2478/s11686-019-00163-4

Azevedo SS, Batista CSA, Vasconcellos SA et al (2005) Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Paraíba, Northeast region of Brazil. Res Vet Sci 79:51–56. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2004.10.001

Benitez do AN, Gonçalves DD, de Nino BSL et al (2017) Seroepidemiology of toxoplasmosis in humans and dogs from a small municipality in Parana, Brazil. Ciênc Anim Bras 18. https://doi.org/10.1590/1089-6891v18e-42102

Camargo ME (1964) Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. Rev Inst Med Trop São Paulo 6:117–118

Caramalac SM, Caramalac SM, Castilho PM et al (2021) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, and *Leishmania* spp. in hunting dogs from mato grosso do Sul, Brazil. Cienc Rural 51. https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200533

Conrad PA, Barr BC, Sverlow KW et al (1993) In vitro isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine fetuses. Parasitology 106:239–249. https://doi.org/10.1017/S0031182000075065

Dantas SBA, Fernandes ARDF, Souza Neto OLD et al (2013) Ocorrência e fatores de risco associados às infecções por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em cães no município de Natal, Estado do Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil. Ciênc Rural 43:2042–2048. https://doi.org/10.1590/S0103-84782013001100020

de Moura AB, de Souza AP, Sartor AA et al (2009) Ocorrência de Anticorpos e fatores de risco para infecção por *Toxoplasma gondii* em cães, nas cidades de Lages e Balneário Camboriú, Santa Catarina, Brasil. Rev Bras Parasitol Veterinária 18:52–56. https://doi.org/10.4322/rbpv.01803009

Dubey JP (1999) Recent advances in *Neospora* and neosporosis. Vet Parasitol 84:349–367. https://doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00044-8

Dubey JP (2003) Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. Korean J Parasitol 41:1. https://doi.org/10.3347/kjp.2003.41.1.1

Dubey JP, Jones JL (2008) *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. Int J Parasitol 38:1257–1278. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.007

Dubey JP, Lindsay DS (1996) A review of *Neospora caninum* and neosporosis. Vet Parasitol 67:1–59. https://doi.org/10.1016/S0304-4017(96)01035-7

Dubey JP, Schares G (2011) Neosporosis in animals—the last five years. Vet Parasitol 180:90–108. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.031

Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM (2007) Epidemiology and control of Neosporosis and *Neospora caninum*. Clin Microbiol Rev 20:323–367. https://doi.org/10.1128/CMR.00031-06

Dubey JP, Murata FHA, Cerqueira-Cézar CK et al (2020) *Toxoplasma gondii* infections in dogs: 2009–2020. Vet Parasitol 287:109223. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109223

Fernandes ARF, Costa DF, Andrade MR et al (2018) Seropositivity and risk factors for leptospirosis, toxoplasmosis and neosporosis in the canine population of Paraiba state, northeastern Brazil. Pesqui Vet Bras 38:957–966. https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5137

Huertas-López A, Sukhumavasi W, Álvarez-García G et al (2021) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in outdoor dogs and cats in Bangkok, Thailand. Parasitology 148:843–849. https://doi.org/10.1017/S0031182021000421

Moura AB, Souza AP, Sartor AA et al (2011) *Neospora caninum* antibodies and risk factors in dogs from Lages and Balneário Camboriú, SC. Arq Bras Med Veterinária E Zootec 63:262–265. https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000100039

Nguyen T, Choe S-E, Byun J-W et al (2012) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from Korea. Acta Parasitol 57. https://doi.org/10.2478/s11686-012-0010-0

Pinto-Ferreira F, Pasquali AKS, Thomaz-Soccol V et al (2019) Epidemiological relevance of dogs for the prevention of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Leptospira* spp. Rev Bras Parasitol Vet 28:383–394. https://doi.org/10.1590/s1984-29612019043

Quadros RMD, Rocha GCD, Romagna G et al (2015) *Toxoplasma gondii* seropositivity and risk factors in pregnant women followed up by the Family Health Strategy. Rev Soc Bras Med Trop 48:338–342. https://doi.org/10.1590/0037-8682-0233-2014

Ratzlaff FR, Engelmann AM, Luz FS et al (2018) Coinfecções Por *Leishmania infantum*, *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em cães necropsiados da região central do Rio Grande do sul, Brasil. Arq Bras Med Veterinária E Zootec 70:109–116. https://doi.org/10.1590/1678-4162-9412

Rengifo-Herrera C, Pile E, García A et al (2017) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic pets from metropolitan regions of Panama. Parasite 24:9. https://doi.org/10.1051/parasite/2017009

Robbe D, Passarelli A, Gloria A et al (2016) *Neospora Caninum* seropositivity and reproductive risk factors in dogs. Exp Parasitol 164:31–35. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.02.003

Sebolt APR, Snak A, De Lima FR et al (2022) Prevalence and risk factors for *Dirofilaria immitis* in dogs from Laguna, Santa Catarina, Brazil. Vet Parasitol Reg Stud Rep 29:100697. https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2022.100697

Sevá Ada, Chiebao P, Brandão DP APD, et al (2020) Seroprevalence and incidence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infection in naturally exposed domestic dogs from a rural area of São Paulo State, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 29:1–13. https://doi.org/10.1590/S1984-29612020053

Silva NM, Lourenço EV, Silva DAO, Mineo JR (2002) Optimization of cutoff titers in *Toxoplasma gondii* specific ELISA and IFAT in dog sera using immunoreactivity to SAG-1 antigen as a molecular marker of infection. Vet J 163:94–98. https://doi.org/10.1053/tvjl.2001.0629

Silva DAO, Lobato J, Mineo TWP, Mineo JR (2007) Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. Vet Parasitol 143:234–244. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.028

Wanha K, Edelhofer R, Gabler-Eduardo C, Prosl H (2005) Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs and foxes in Austria. Vet Parasitol 128:189–193. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.11.027

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

Parasitology Research (2024) 123:70
https://doi.org/10.1007/s00436-023-08074-0

RESEARCH

The *Fasciola hepatica* egg development and hatching test (EDHT) using commercial drugs: a simple protocol for tackling anthelminthic resistance and promoting cattle productivity

Andreas Lazaros Chryssafidis[1] · Paula Maciel Arruda[1] · Larissa Américo[1] · Sandy Gabrielly Radünz Machado[1] · Felipe Rieth de Lima[1] · Josiane Matos[1] · Anderson Barbosa de Moura[1]

Received: 29 July 2023 / Accepted: 18 October 2023
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2023

Abstract

Fasciolosis is an important zoonotic disease caused by the trematode *Fasciola hepatica*, and it causes great losses in bovine production. The anthelmintic resistance is a major problem in the control of fasciolosis. In this study, the *F. hepatica* egg development and hatching test (EDHT) was used for the evaluation of the ovicidal activity of commercial drugs, commonly used for treating infected cattle, which reflects *F. hepatica* anthelminthic resistance in infected bovines, according to recent literature. Bile samples from *F. hepatica* naturally parasitized cattle were obtained from slaughterhouses in the cities of Lages and Otacílio Costa, Santa Catarina State, Brazil. The bile was washed, the eggs were recovered, quantified, and distributed in universal collectors, with a minimum of 1,000 eggs per vial. Four commercial drugs were used in this study, containing albendazole sulfoxide (ABDZ), closantel (CSTL), nitroxynil (NTXL), and triclabendazole with fenbendazole (TBZF). The drugs were diluted according to the manufacturer instructions. All drugs, and the respective control, were tested in triplicates, with the quantity of recovered eggs determining the number of drugs to be tested. The vials were incubated for 28 days at 27 °C, and the eggs were classified according to their degree of development under a stereomicroscope. In total, 121 egg samples were analyzed. Two samples were identified as resistant to TBZF. Undetermined resistance/susceptibility has been found in two isolates treated with ABDZ, one treated with NTXL and six treated with TBZF. CSTL did not present ovicidal activity and cannot be used in EDHT. This is the first time that commercial drugs were used in *F. hepatica* EDHT.

Keywords Fasciolosis · Parasitology · One health · Ruminant

Introduction

The trematode *Fasciola hepatica* is a zoonotic parasite that causes significant economic losses in ruminant production, also severely affecting public health, since it is an emerging and neglected zoonosis (Aksoy et al. 2005; Arias-Pacheco et al. 2020; Echevarria 2004). *F. hepatica* is associated with adequate climatic conditions, such as mild temperature and high humidity (Aksoy et al. 2005; Echevarria 2004), which promotes the spread of its intermediate host, snails from the Lymnaeidae family, necessary to complete its life cycle (Alba et al. 2018; Costa et al. 2019).

Fasciolosis generates a global loss in ruminant production of over 3.2 billion dollars (Mehmood et al. 2017). Santa Catarina is among the five Brazilian states with the highest number of rural properties with agricultural production. In the year 2021, the Santa Catarina cattle herd consisted of 4.61 million head, with growing production (Giehl 2021). The Santa Catarina Plateau, a region historically free from this parasitosis, is a region with favorable characteristics for the development of snails, such as high humidity and mild temperature (Albuquerque et al. 2022; Silva et al. 2020). Recently, our research group demonstrated that fasciolosis is now present in the Santa Catarina Plateau, with around 10% of bovines infected (Américo

Section Editor: David Bruce Conn

✉ Andreas Lazaros Chryssafidis
andreas.107@gmail.com

[1] Laboratory of Parasitology and Parasitic Diseases (LAPAR), Department of Veterinary Medicine, Agroveterinary Sciences Center, Santa Catarina State University, Av. Luiz de Camões, 2090, Bairro Conta Dinheiro, Lages, Santa Catarina CEP 88520-000, Brazil

et al. 2022), emphasizing the need of effective control strategies and drugs against this trematode.

There is a limited number of anthelmintics available to treat fasciolosis in ruminants, with benzimidazoles being the drugs of choice for most farmers. However, several cases of anthelminthic resistance have been described in different parts of the world (Canevari et al. 2014; Hanna et al. 2015; Kelley et al. 2016, 2020; Olaechea et al. 2011; Ortiz et al. 2013). The constant use of triclabendazole (TCBZ) has led to the development of resistance in several countries, as this is the most used drug, as it kills the immature and adult forms of *F. hepatica* (Aksoy et al. 2005; Fairweather et al. 2020; Gordon et al. 2012; Kamaludeen et al. 2019; Kelley et al. 2016; Olaechea et al. 2011).

For the evaluation of *F. hepatica* anthelmintic resistance, the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) recommends the *postmortem* examination and fluke counting in treated animals (Wood et al. 1995). Some reports on *F. hepatica* anthelmintic resistance used fecal egg count reduction test (FECRT) as a diagnostic tool, where the effectiveness of the drug was estimated by comparing the fecal egg count of the animals before and after treatment (Babják et al. 2021a; Mooney et al. 2009). However, due to the possibility of fluke eggs to be stored and eliminated by the gallbladder even after the elimination of adult worms, to confirm the resistance, it is recommended that the FECRT should be compared with the *in vivo* controlled efficacy test (CET), which involves *postmortem* examination (Coles et al. 2006; McConville et al. 2009; Ortiz et al. 2013; Wood et al. 1995).

The slaughter of cattle specifically for the evaluation of anthelmintics efficacy against *F. hepatica* can be unviable for farmers, as it is not possible to obtain robust results from just one or two animals. Recently, a number of studies focused on the development of *in vitro* alternatives using *F. hepatica* eggs (Alvarez et al. 2020; Canevari et al. 2014; Ceballos et al. 2019; Chryssafidis et al. 2015; Fairweather et al. 2012; Robles-Pérez et al. 2014). The egg development and hatching test (EDHT) is a test that quantifies the development of *F. hepatica* eggs under the presence of a determined drug, thus evaluating its ovicidal activity (Alvarez et al. 2009). The idea is to use the eggs collected from a few animals, or one single animal, to examine the resistance or susceptibility of the parasite population to the drug. It is a relatively simple test that could be included in the routine of any parasitology laboratory. Furthermore, Ceballos et al. (2019) demonstrated that there is a strong agreement between *in vitro* and *in vivo* results of *F. hepatica* albendazole resistance, reinforcing the viability of this alternative approach.

In this manuscript, a simplified EDHT protocol using commercial drugs is described for evaluating their ovicidal activity (OA), reflecting the susceptibility/resistance of *F. hepatica* isolates collected from naturally infected bovines from the Santa Catarina Plateau.

Material and methods

Origin of the samples

The researchers followed the inspection service of bovine abattoirs located in the cities of Lages and Otacílio Costa, both municipalities located at the Santa Catarina Plateau, from January 2021 to March 2022. Gallbladders were collected from livers with signs of *F. hepatica* parasitism (whitish fibrotic scars, enlarged bile ducts). After confirmation of fluke presence, by examination of bile ducts, the positive biles were collected and stored in vials with lids, identified with the tag number of each bovine. The collected material was packed in a thermal box and sent to the Laboratory of Parasitology and Parasitic Diseases, of the Agroveterinary Sciences Center, Santa Catarina State University (LAPAR-CAV-UDESC). The samples were stored in refrigeration (4 °C) until their analysis, which took between 1 and 4 days.

Collection and quantification of *Fasciola hepatica* eggs

The procedures for isolation and quantification of *F. hepatica* eggs were adapted from Chryssafidis et al. (2015). After collection, the bile was washed, and the eggs were recovered by sedimentation. The material was distributed in 500-mL conical flasks for sedimentation and egg isolation. Bile and water were placed in each conical flask in a 1:5 ratio. The number of flasks used per sample varied, according to the total volume of the sample. The sample was allowed to settle for 10 min and the supernatant was discarded by gentle and careful eversion. This procedure was performed twice and, if necessary, there was an additional repetition.

The sediments were collected from all flasks and placed in 50-mL centrifuge tubes. The number of tubes depended on the final sediment volume and number of conical flasks. The volume was adjusted with water, and the tubes were centrifuged for 10 min at $465 \times g$ (1500 rpm, centrifuge model KC8, Kindly). After centrifugation, the supernatant was discarded and the resulting pellets from all tubes were collected with a Pasteur pipette and unified in a single tube.

After that, a new centrifugation was performed for 4 min at $465 \times g$, the supernatant was carefully discarded until 5 or 10 mL were left, depending on the turbidity of the sample, which approximately indicated the number of concentrated eggs. After this last step, the pellet was resuspended with a Pasteur pipette, and the number of eggs was quantified.

For quantifying the eggs, the sample was homogenized and three aliquots of 100 µl were analyzed under an optical

microscope at × 40 magnification (4 × objective, Eclipse E200 microscope, Nikon). The average number of eggs was calculated based on a simple average calculation between the three aliquots of 100 µl, and the total volume present in the tube.

Egg development and hatching test and ovicidal activity assessment

For the standardization of the simplified *F. hepatica* EDHT, previously described protocols were consulted (Alvarez et al. 2020; Canevari et al. 2014; Chryssafidis et al. 2015; Robles-Pérez et al. 2014; Sargison 2012). The samples were distributed into aliquots of 1000 eggs, placed in universal collectors with lids, in triplicates for each drug tested and for the negative control. The number of drugs tested varied, based on the number of recovered eggs. For bile samples with a total number of eggs above 12,000, all drugs were tested; between 9000 and 12,000 eggs, two drugs were tested; and samples containing between 6000 and 9000 eggs, only one drug was tested. Samples with less than 5000 eggs were discarded.

Injectable or oral drugs, all soluble in water, were used, namely albendazole sulfoxide (ABDZ) (100 mg/mL, recommendation for fasciolicidal treatment (RFT) of 2 mL/40 kg), closantel (CSTL) (250 mg/mL, RFT 1 mL/50 kg), nitroxynil (NTXL) (340 mg/mL, RFT 2 mL/50 kg), and triclabendazole and fenbendazole association (TBZF) (100 mg/mL, RFT 6 mL/50 kg). For diluting the drugs in distilled water, the RFT was used, considering that 1 kg corresponded to 1 L. The concentrations used were as follows: ABDZ = 5.0 µg/mL, CSTL = 5.0 µg/mL, NTXL = 13.6 µg/mL, and TBZF = 12.0 µg/mL. For achieving these concentrations using the commercial formulations, the following dilutions were used per vial: ABDZ = 2.0 µL/40 mL, CSTL = 0.8 µL/40 mL, NTXL = 1.6 µL/40 mL, and TBZF = 4.8 µL/40 mL.

The tested drugs were diluted in 40 mL of distilled water, and the negative control was prepared using only distilled water. The identified vials containing the drug solution, and at least 1000 *F. hepatica* eggs, were incubated for 28 days at 27 °C, in the dark. After incubation, the lids of the flasks were removed, and the samples were exposed to artificial light for 24 h, at room temperature, to stimulate the hatching of miracidia. The light was provided through two common table lamps, with a white LED lamp (9 W), positioned approximately 20 cm away from the samples.

The analysis and counting of the eggs were performed directly in the universal collectors, under a stereomicroscope (Stemi 508, Zeiss), after careful disposal of the supernatant of the samples by simple eversion. The eggs were evaluated and quantified according to their degree of development, being classified as "undeveloped," "embryonated," or "hatched," with the last two considered as developed eggs and summed (Chryssafidis et al. 2015) (Fig. 1). At least 100 eggs were randomly counted per collector. For each collector, the percentage of development was measured according to the drug being tested, or control, and then, a simple average between the triplicates was calculated.

The OA was calculated per tested drug, comparing the percentage of developed eggs in the treatment with the result found in the control, using the following formula (Canevari et al. 2014):

$$\text{Ovicidal activity} = \frac{\%eggs_{in\ control} - \%eggs_{after\ drug\ incubation}}{\%eggs_{in\ control}} \times 100$$

The isolates were analyzed, and the OA was used to reflect the anthelminthic susceptibility/resistance, based on Canevari et al. (2014) classification as "resistant" (OA ≤ 40%), "susceptible" (OA ≥ 70%), or "undetermined" (40% < OA < 70%).

Fig. 1 Classification of *Fasciola hepatica* eggs observed in the samples under the stereomicroscope (Stemi 508, Zeiss, × 50 magnification), after incubation for 28 days at 27 °C, in the dark: undeveloped egg (**a**), embryonated egg containing the miracidium (**b**), and hatched egg (**c**)

Statistical analysis

All data were organized and stored in spreadsheets in Microsoft Excel® 2019, for evaluation and calculation of the collected samples, as well as generating the descriptive statistical analysis of the data. The *in vitro* effectiveness of each drug tested by the simplified EDHT was determined according to the equation of OA described above.

The data obtained during the study, such as the degree of resistance (Canevari et al. 2014) and distribution between municipalities, were treated and analyzed individually and jointly, by analysis of variance (ANOVA) and through the Tukey Test for statistical comparison of the development data of the eggs obtained from each treatment, considering a significance level of 5% ($p < 0.05$) for the tests performed. All statistics were performed using the Jamovi® software, version 2.2.5.

Results and discussion

Total of analyzed samples

A total of 121 bile samples were analyzed by EDHT, being 107 samples from the abattoir at Lages and 14 from the abattoir at Otacílio Costa. Due to the low number of eggs, 50 samples were discarded (44 from Lages, six from Otacílio Costa).

For standardizing the test, multiple commercial drugs were used at the same time in the samples, similarly to the procedures used in the adult immersion test of ticks (Campos Júnior and de Oliveira 2005). However, the number of tested drugs varied per sample, according to the number of eggs recovered from the biles. It was possible to determine the anthelmintic OA with the following number of samples: ABDZ (108/121), NTXL (102/121), TBZF (102/121), and CSTL (19/121). After the absence of OA detected in all samples treated with CSTL, even after repetitions were carried out in some cases, the drug was removed from the further tests.

From the best of our knowledge, this is the first study that used commercial formulations for evaluating the OA of drugs against *F. hepatica* eggs, using the EDHT. Another difference from previous literature is the use of the recommendation for fasciolicidal treatment, the recommended dosage of each drug based on the manufacturer instructions, for greater correlation with the treatment performed *in vivo* and for easy preparation of the protocol.

Closantel did not present ovicidal activity

Samples treated with CSTL showed low OA in all analysis of the study, with no difference from the control ($p > 0.05$). There is a report of CSTL treatment failure in naturally infected beef cattle (Novobilský and Höglund 2015), but after all 19 samples treated with the drug did not present OA, the drug has been removed from the tests.

It can be affirmed that it was not possible to determine the resistance/susceptibility of *F. hepatica* isolates to CSTL using the EDHT, with the RFT of the commercial formulation (5.0 µg/mL), due to repeated negative results and lack of literature on the subject. Apparently, CSTL does not present ovicidal activity *in vitro*, at least in the applied concentration (RFT).

Ovicidal activity of different anthelmintics based on the simplified egg development and hatching test

The average percentages of hatching and development of all incubated samples, expressed as mean ± standard deviation of each tested drug and the abattoir of origin of samples, are presented in Table 1.

Results from Otacílio Costa *F. hepatica* isolates treated with TBZF did not differ from the other drugs, probably due to the low number of samples and high variability of the results. On the other hand, TBZF results obtained with the isolates from Lages abattoir were different from ABDZ and NTXL, indicating the presence of resistance to this commercial compound in those isolates (Fig. 2). The results per drug will be presented and discussed further.

In this study, the manufacturer recommendation for treating live animals was used for treating the eggs, considering 1 kg equivalent to 1 L of distilled water volume, in order to simplify the preparation of solutions and the applicability of this protocol in the laboratory routine. The overall findings indicate adequate OA of the three commercial drugs used in the isolates from both slaughterhouses; and hence, these

Table 1 Overall results of the simplified *Fasciola hepatica* egg development and hatching test (EDHT), using different isolates collected from naturally infected cattle, treated with albendazole sulfoxide (ABDZ), nitroxynil (NTXL), and triclabendazole and fenbendazole (TBZF). The values indicate the average percentage of developed eggs (embryonated and hatched) of all incubated samples, expressed as mean ± standard deviation

Drugs (dilution*) (*n*/total)	*F. hepatica* EDHT (mean ± SD)	
	Lages	Otacílio Costa
Control (distilled water) (121/121)	88.24 ± 17.13[a]	88.92 ± 12.86[a]
ABDZ (5.0 µg/mL) (108/121)	2.40 ± 5.36[b]	1.23 ± 1.20[b]
NTXL (13.6 µg/mL) (102/121)	2.55 ± 4.02[b]	1.07 ± 1.06[b]
TBZF (12.0 µg/mL) (102/121)	4.29 ± 8.62[c]	14.10 ± 26.75[b]

Within each abattoir, values with different letters are statistically different ($p < 0.05$). *The dilution follows the recommendation for fasciolicidal treatment (RFT) of each commercial drug

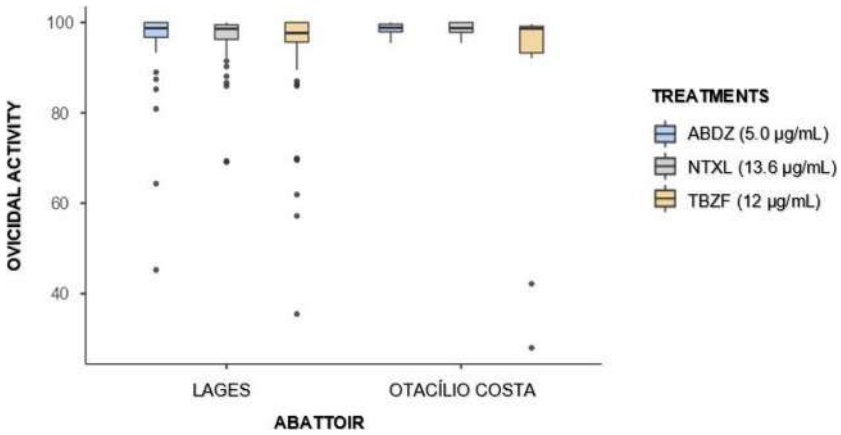

Fig. 2 Ovicidal activity (%) of the tested anthelmintics on *Fasciola hepatica* eggs isolated from naturally infected bovines, at abattoirs from Santa Catarina Plateau

three can be used for evaluating susceptibility of *F. hepatica* isolates for the treatment of parasitized animals.

Ovicidal activity of albendazole sulfoxide

The average percentage of development of eggs with ABDZ was 2.40 ± 5.36 (Lages) and 1.23 ± 1.20 (Otacílio Costa), with overall OA ranging from 45.2 to 100.0%. From the 108 samples incubated with ABDZ, only two isolates collected in the Lages abattoir presented undetermined susceptibility/resistance.

There are reports that efficacies of 71–90% can be considered sufficient for drugs like ABDZ (Fairweather et al. 2020), and it is proposed that, even if the percentage reduction does not exceed 90%, ABDZ can still reduce the parasite load to a level that will be beneficial for the animal health (Fairweather 2011).

Previous studies emphasize the importance of comparing *in vivo* and *in vitro* methods for detecting anthelmintic resistance and efficacy of ABDZ (Babják et al. 2021b; Han et al. 2017; Königová et al. 2021; Potârniche et al. 2021). However, Ceballos et al. (2019) demonstrated that results found in EDHT agreed with *in vivo* tests, indicating that *in vitro* tests are feasible for choosing the best approach for treating fasciolosis. Alvarez et al. (2009) and Canevari et al. (2014) used EDHTs on *F. hepatica* eggs recovered from the bile of experimentally infected animals and verified the inhibitory effect of ABDZ, corroborating the results found in the present study.

Effectiveness of nitroxynil

The average percentage of development of eggs with NTXL was 2.55 ± 4.02 (Lages) and 1.07 ± 1.06 (Otacílio Costa). Only one sample presented undetermined resistance. The OA of this anthelmintic ranged from 69.4 to 100.0% in the 102 incubated samples.

This study was the first to perform *in vitro* tests with NTXL, demonstrating its effectiveness against *F. hepatica* egg development. *In vivo* studies using FECRT confirmed the efficacy of NTXL against rumen flukes and *F. hepatica* and concluded that NTXL may be a feasible alternative in case of resistance to TCBZ (González-Garduño et al. 2020; Hanna et al. 2015; Romero et al. 2019). It was also found to be the most effective anthelmintic in controlling trematodes in comparison to other products (triclabendazole, ivermectin and closantel, ivermectin and clorsulon, and nitroxynil) (Ico-Gómez et al. 2021).

Tests performed *in vivo* corroborate the results found in the *in vitro* simplified EDHT of the present study, demonstrating susceptibility to treatment with this anthelmintic (Boulard et al. 1995; Coles and Stafford 2001; González-Garduño et al. 2020; Hanna et al. 2015; Ico-Gómez et al. 2021; Martínez-Valladares et al. 2010; Rapic et al. 1988; Romero et al. 2019; Zárate-Rendón et al. 2023).

Triclabendazole and fenbendazole commercial compound

The average percentage of development of eggs with TBZF was 4.29 ± 8.62 (Lages) and 14.10 ± 26.75 (Otacílio Costa). They were above the levels found with ABDZ and NTXL treatments, demonstrating a higher number of embryonated and hatched eggs. The OA ranged from 28 to 100% in the 102 samples incubated, with anthelminthic resistance detected two samples, one from each abattoir (Lages, OA = 35.5%; Otacílio Costa OA = 28.0%), and undetermined resistance in six samples, being five isolates from Lages and one from Otacílio Costa abattoir. The TBZF combination has been tested *in vivo* in experimentally infected sheep in the past, demonstrating high efficacy against *F. hepatica* infections, with no associated adverse effects (Foreyt 1988).

Triclabendazole is the most frequently used drug to fasciolosis worldwide, as it eliminates *F. hepatica* in its immature and adult forms, but resistance to the drug greatly

compromises parasite control in ruminants and humans (Aksoy et al. 2005; Fairweather et al. 2020; Gordon et al. 2012; Kamaludeen et al. 2019; Kelley et al. 2016).

In vivo studies showed no significant reduction in fecal *F. hepatica* egg counts after TCBZ treatment, indicating that anthelmintic resistance is present in different countries (Kamaludeen et al. 2019; Romero et al. 2019; Sargison 2012). Several studies demonstrate the prevalence and high resistance to treatment with TCBZ through *in vivo* and *in vitro* methods and comparative protocols (Alvarez et al. 2009; Hanna et al. 2015; Ico-Gómez et al. 2021; Olaechea et al. 2011; Ortiz et al. 2013; Romero et al. 2019), consistent with the simplified EDHT results presented here.

Final considerations

The simplified *F. hepatica* EDHT has been repeated with hundreds of samples, from different origins, proving its applicability. With the eggs collected from one infected bovine, it can be possible to test different drugs at the same time, without the need of slaughtering many animals.

An early diagnosis of anthelmintic resistance can significantly impact the decision for the most effective parasite control strategy. By doing so, it can minimize the economic consequences and the high costs associated with the use of ineffective drugs. In light of these findings, the EDHT holds great potential for further studies and implementation in laboratory routines. Its integration in veterinary in field practices can contribute to better parasite management and ultimately enhance animal health and welfare.

The protocol described in this manuscript is simple, and it can be used by parasitology laboratories anywhere, supporting veterinary doctors and cattle farmers in choosing the best treatment for bovine fasciolosis.

Author contribution ALC and ABM designed the study. PMA and JM collected the samples. PMA, LA, SGRM, FRL carried out the tests. PMA, LA, FRL and ALC wrote the main manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Funding This work was funded by Foundation for Research and Innovation of the State of Santa Catarina (FAPESC, grant number 027/2020 – grant term 793/2021). The authors are thankful for the abattoirs that kindly provided the samples used in this investigation.

Data availability The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author, ALC.

Declarations

Ethical approval The protocols used in the present study were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Agroveterinary Sciences Center (CEUA-CAV-UDESC), protocol number 6602070619.

Consent to participate and consent to publish Not applicable in this study.

Competing interests The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Aksoy DY, Kerimoglu U, Oto A, Ergwen S, Arslan S, Unal S, Batman F, Bayraktar Y (2005) Infection with *Fasciola hepatica*. Clin Microbiol Infect 11(11):859–861. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01254.x

Alba A, Vázquez AA, Sánchez J, Duval D, Hernández HM, Sabourin E, Vittecoq M, Hurtrez-Boussés S, Gourbal B (2018) *Fasciola hepatica-Pseudosuccinea columella* interaction: effect of increasing parasite doses, successive exposures and geographical origin on the infection outcome of susceptible and naturally-resistant snails from Cuba. Parasit Vectors 11:559. https://doi.org/10.1186/s13071-018-3155-3

Albuquerque RBF, Pereira SA, Melo SN, Belo VS, Arruda MM, Mazetto D, Figueiredo FB (2022) Spatial distribution analysis of bovine fascioliasis cases recorded in an abattoir in the state of Santa Catarina, Brazil. Cienc Rural 52:3. https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20210030

Alvarez L, Moreno G, Moreno L, Ceballos L, Shaw L, Fairweather I, Lanusse C (2009) Comparative assessment of albendazole and triclabendazole ovicidal activity on *Fasciola hepatica* eggs. Vet Parasitol 164(2–4):211–216. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.014

Alvarez LI, Valladares MM, Canton C, Lanusse CE, Ceballos L (2020) Testing Albendazole Resistance in *Fasciola hepatica*. In: Cancela, M., Maggioli, G. (eds) Fasciola hepatica. Methods Mol Biol 2137:213–220. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0475-5_16

Américo L, Padilha MAC, Arruda PM, Drescher G, Moura AB, Chryssafidis AL (2022) Epidemiological survey and confirmation of autochthonous cases of bovine fasciolosis in the Serrana Mesoregion of Santa Catarina, Brazil. Front Vet Sci 9:933462. https://doi.org/10.3389/fvets.2022.933462

Arias-Pacheco C, Lucas JR, Rodríguez A, Córdoba D, Lux-Hoppe EG (2020) Economic impact of the liver condemnation of cattle infected with *Fasciola hepatica* in the Peruvian Andes. Trop Anim Health Prod 4:1927–1932. https://doi.org/10.1007/s11250-020-02211-y

Babják M, Königová A, Burcáková Ľ, Komáromyová M, Dolinská MU, Várady M (2021a) Assessing the efficacy of albendazole against *Fasciola hepatica* in naturally infected cattle by in vivo and in vitro methods. Vet Sci 8(11):249–257. https://doi.org/10.3390/vetsci8110249

Babják M, Königová A, Urda Dolinská M, Kupčinskas T, Vadlejch J, von Samson-Himmelstjerna G, Petkevičius S, Várady M (2021b) Does the in vitro egg hatch test predict the failure of benzimidazole treatment in *Haemonchus contortus*? Parasite 28:62–68. https://doi.org/10.1051/parasite/2021059

Boulard C, Carreras F, Van Gool F (1995) Evaluation of nitroxynil and closantel activity using ELISA and egg counts against *Fasciola hepatica* in experimentally and naturally infected cattle. Vet Res 26(4):249–255

Campos Júnior DA, de Oliveira PR (2005) In vitro evaluation of acaricides efficiency to *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) from bovines at the region of Ilhéus, Bahia, Brazil. Ciência Rural 35(6):1386–1392. https://doi.org/10.1590/S0103-84782005000600025

Canevari J, Ceballos L, Sanabria R, Romero J, Olaechea F, Ortiz P, Cabrera M, Gayo V, Fairweather I, Lanusse C, Alvarez L (2014) Testing albendazole resistance in *Fasciola hepatica*: validation of

an egg hatch test with isolates from South America and the United Kingdom. J Helminthol 88(3):286–292. https://doi.org/10.1017/S0022149X13000163

Ceballos L, Canton C, Pruzzo C, Sanabria R, Moreno L, Sanchis J, Suarez G, Ortiz P, Fairweather I, Lanusse C, Alvarez L, Martinez-Valladares M (2019) The egg hatch test: a useful tool for albendazole resistance diagnosis in *Fasciola hepatica*. Vet Parasitol 271:7–13. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.06.001

Chryssafidis AL, Fu Y, De Waal T, Mulcahy G (2015) Standardisation of egg-viability assays for *Fasciola hepatica* and *Calicophoron daubneyi*: a tool for evaluating new technologies of parasite control. Vet Parasitol 210(1–2):25–31. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.03.005

Coles GC, Stafford KA (2001) Activity of oxyclozanide, nitroxynil, clorsulon and albendazole against adult triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. Vet Rec 148(23):723–724. https://doi.org/10.1136/vr.148.23.723

Coles GC, Jackson F, Pomroy WE, Prichard RK, von Samson-Himmelstjerna G, Silvestre A, Taylor MA, Vercruysse J (2006) The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. Vet Parasitol 136(3–4):167–185. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.11.019

Costa RA, Corbellini LG, Castro-Janer E, Riet-Correa F (2019) Evaluation of losses in carcasses of cattle naturally infected with *Fasciola hepatica*: effects on weight by age range and on carcass quality parameters. Int J Parasitol 11:867–872. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.06.005

Echevarria F (2004) Fasciolose. Rev Bras Parasitol Vet 13:100–102

Fairweather I (2011) Reducing the future threat from (liver) fluke: realistic prospect or quixotic fantasy? Vet Parasitol 180(1–2):133–143. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.034

Fairweather I, McShane DD, Shaw L, Ellison SE, O'Hagan NT, York EA, Trudgett A, Brennan GP (2012) Development of an egg hatch assay for the diagnosis of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*: proof of concept. Vet Parasitol 183(3–4):249–259. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.023

Fairweather I, Brennan GP, Hanna REB, Robinson MW, Skuce PJ (2020) Drug resistance in liver flukes. Int J Parasitol Drugs Drug Resist 12:39–59. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2019.11.003

Foreyt WJ (1988) Efficacy of a fenbendazole-triclabendazole combination against *Fasciola hepatica* and gastrointestinal nematodes in sheep. Vet Parasitol 26(3–4):265–271. https://doi.org/10.1016/0304-4017(88)90095-7

Giehl AL (2021) Desempenho da produção animal – Carne bovina. 41 Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2019–2020, (pp 93–105). Florianópolis: Ep

González-Garduño R, Ortiz-Pérez DO, Alegría-Jiménez L, Torres-Chable OM, Cruz-Tamayo AA, Zaragoza-Vera CV (2020) Evaluation of anthelmintic drugs against egg development of rumen flukes recovered from cattle raised in the humid tropics of Mexico. J Helminthol 94:e177. https://doi.org/10.1017/S0022149X20000607

Gordon D, Zadoks R, Skuce P, Sargison N (2012) Confirmation of triclabendazole resistance in liver fluke in the UK. Vet Rec 171(6):159–160. https://doi.org/10.1136/vr.e5381

Han T, Wang M, Zhang G, Han D, Li X, Liu G, Li X, Wang Z (2017) Gastrointestinal nematodes infections and anthelmintic resistance in grazing sheep in the Eastern Inner Mongolia in China. Acta Parasitol 62(4):815–822. https://doi.org/10.1515/ap-2017-0098

Hanna REB, McMahon C, Ellison S, Edgar HW, Kajugu PE, Gordon A, Irwin D, Barley JP, Malone FE, Brennan GP, Fairweather I (2015) *Fasciola hepatica*: a comparative survey of adult fluke resistance to triclabendazole, itroxinil and closantel on selected upland and lowland sheep farms in Northern Ireland using faecal egg counting, coproantigen ELISA testing and fluke histology. Vet Parasitol 207(1–2):34–43. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.11.016

Ico-Gómez R, González-Garduño R, Ortiz-Pérez D, Mosqueda-Gualito JJ, Flores-Santiago EDJ, Sosa-Pérez G, Salazar-Tapia AA (2021) Assessment of anthelmintic effectiveness to control *Fasciola hepatica* and paramphistome mixed infection in cattle in the humid tropics of Mexico. Parasitology 148(12):1458–1466. https://doi.org/10.1017/S0031182021001153

Kamaludeen J, Graham-Brown J, Stephens N, Miller J, Howell A, Beesley NJ, Hodgkinson J, Learmount J, Williams D (2019) Lack of efficacy of triclabendazole against *Fasciola hepatica* is present on sheep farms in three regions of England, and Wales. Vet Rec 184(16):502. https://doi.org/10.1136/vr.105209

Kelley JM, Elliott TP, Beddoe T, Anderson G, Skuce P, Spithill TW (2016) Current Threat of Triclabendazole Resistance in *Fasciola hepatica*. Trends Parasitol 32(6):458–469. https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.03.002

Kelley JM, Rathinasamy V, Elliott TP, Rawlin G, Beddoe T, Stevenson MA, Spithill TW (2020) Determination of the prevalence and intensity of *Fasciola hepatica* infection in dairy cattle from six irrigation regions of Victoria, South-eastern Australia, further identifying significant triclabendazole resistance on three properties. Vet Parasitol 277:109019. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.109019

Königová A, Urda Dolinská M, Babják M, von Samson-Himmelstjerna G, Komáromyová M, Várady M (2021) Experimental evidence for the lack of sensitivity of in vivo faecal egg count reduction testing for the detection of early development of benzimidazole resistance. Parasitol Res 120(1):153–159. https://doi.org/10.1007/s00436-020-06965-0

Martínez-Valladares M, del Rosario FM, Fernández-Pato N, Castañón-Ordóñez L, Cordero-Pérez C, Rojo-Vázquez FA (2010) Efficacy of nitroxynil against *Fasciola hepatica* resistant to triclabendazole in a naturally infected sheep flock. Parasitol Res 107(5):1205–1211. https://doi.org/10.1007/s00436-010-1989-5

McConville M, Brennan GP, Flanagan A, Edgar HW, Hanna RE, McCoy M, Gordon AW, Castillo R, Hernández-Campos A, Fairweather I (2009) An evaluation of the efficacy of compound alpha and triclabendazole against two isolates of *Fasciola hepatica*. Vet Parasitol 162(1–2):75–88. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.02.004

Mehmood K, Zhang H, Sabir AJ, Abbas RZ, Ijaz M, Durrani AZ, Saleem MH, Rehman UM, Iqbal MK, Wang Y, Ahmad HI, Abbas T, Hussain R, Ghori MT, Ali S, Kahn AU, Li J (2017) A review on epidemiology, global prevalence and economical losses of fasciolosis in ruminants. Microb Pathog 109:253–262. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.06.006

Mooney L, Good B, Hanrahan JP, Mulcahy G, de Waal T (2009) The comparative efficacy of four anthelmintics against a natural acquired *Fasciola hepatica* infection in hill sheep flock in the west of Ireland. Vet Parasitol 164(2–4):201–205. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.017

Novobilský A, Höglund J (2015) First report of closantel treatment failure against *Fasciola hepatica* in cattle. Int J Parasitol Drugs Drug Resist 5(3):172–177. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2015.07.003

Olaechea F, Lovera V, Larroza M, Raffo F, Cabrera R (2011) Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina). Vet Parasitol 178(3–4):364–366. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.047

Ortiz P, Scarcella S, Cerna C, Rosales C, Cabrera M, Guzmán M, Lamenza P, Solana H (2013) Resistance of *Fasciola hepatica* against Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): a clinical trial and an in vivo efficacy test in sheep. Vet Parasitol 195(1–2):118–121. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.01.001

Potârniche AV, Mickiewicz M, Olah D, Cerbu C, Spînu M, Hari A, Györke A, Moroz A, Czopowicz M, Várady M, Kaba J (2021) First report of anthelmintic resistance in gastrointestinal

nematodes in goats in Romania. Animals (Basel) 11(10):2761. https://doi.org/10.3390/ani11102761

Rapic D, Dzakula N, Sakar D, Richards RJ (1988) Comparative efficacy of triclabendazole, nitroxynil and rafoxanide against immature and mature *Fasciola hepatica* in naturally infected cattle. Vet Rec 122(3):59–62. https://doi.org/10.1136/vr.122.3.59

Robles-Pérez D, Martínez-Pérez JM, Rojo-Vázquez FA, Martínez-Valladares M (2014) Development of an egg hatch assay for the detection of anthelmintic resistance to albendazole in *Fasciola hepatica* isolated from sheep. Vet Parasitol 203(1–2):217–221. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.11.020

Romero J, Villaguala C, Quiroz F, Landaeta-Aqueveque C, Alfaro G, Pérez R (2019) Flukicide efficacy against *Fasciola hepatica* of Triclabendazole and Nitroxynil in cattle of the central valley of Chile. Rev Bras Parasitol Vet 28(1):164–167. https://doi.org/10.1590/S1984-296120180089

Sargison N (2012) Diagnosis of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*. Vet Rec 171(6):151–152. https://doi.org/10.1136/vr.e5357

Silva AEP, da Freitas CC, Dutra LV, Molento MB (2020) Correlation between climate data and land altitude for *Fasciola hepatica* infection in cattle in Santa Catarina, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 29(3):1–7. https://doi.org/10.1590/S1984-29612020065

Wood IB, Amaral NK, Bairden K, Duncan JL, Kassai T, Malone JB Jr, Pankavich JA, Reinecke RK, Slocombe O, Taylor SM et al (1995) World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). Vet Parasitol 58(3):181–213. https://doi.org/10.1016/0304-4017(95)00806-2

Zárate-Rendón DA, Briones-Montero A, Huaraca-Oré NA, Veirano GS, Levecke B, Geldhof P (2023) Comparison of the therapeutic efficacy of five anthelmintics against natural *Fasciola hepatica* infections in dairy cattle from the Mantaro Valley, Peru. Vet Parasitol Reg Stud Rep 38:100827. https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2022.100827

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

frontiers | Frontiers in Veterinary Science

ORIGINAL RESEARCH
published: 22 July 2022
doi: 10.3389/fvets.2022.933462

Epidemiological Survey and Confirmation of Autochthonous Cases of Bovine Fasciolosis in the Serrana Mesoregion of Santa Catarina, Brazil

Larissa Américo[1], *Mayckon Antonio Cardoso Padilha*[1], *Paula Maciel Arruda*[1], *Guilherme Drescher*[2], *Anderson Barbosa de Moura*[1] *and Andreas Lazaros Chryssafidis*[1]*

[1] *Laboratory of Parasitology and Parasitic Diseases (LAPAR-CAV-UDESC), Department of Veterinary Medicine, Agroveterinary Sciences Center, Santa Catarina State University, Lages, Brazil,* [2] *Laboratory of Cellular Biology, Carlos Chagas Institute, Oswaldo Cruz Foundation (ICC-FIOCRUZ), Curitiba, Brazil*

Fasciola hepatica is reported as a trematode of great importance, causing fasciolosis, one of the most neglected zoonotic parasitic diseases in the world. In Brazil, potential losses of around US$ 210 million per year were calculated, with bovine fasciolosis alone. The State of Santa Catarina is located in the South Region of Brazil, with a herd of more than 4 million ruminants. The Serrana Mesoregion, historically free of fasciolosis, is composed of 30 municipalities, which have a consolidated agricultural tradition, mainly in extensive ruminant livestock. The objective of the present work was to investigate the occurrence and distribution of autochthonous cases of bovine fasciolosis in the region. For this, different analyzes were carried out in rural properties from eight municipalities, and in three slaughterhouses under the State Inspection Service (SIE), which received animals from all the Serrana Mesoregion. The rural properties were randomly selected, and up to 20 fecal samples were collected from random cattle older than 1 year, for analysis by coproparasitological sedimentation test. The traceability records of the positives were checked, for identifying autochthonous cases. Additionally, the tracking data of cattle slaughtered between the years of 2018 and 2021, which presented liver condemnations, were analyzed for defining autochthonous cases of bovine fasciolosis. In total, there were fecal samplings in 106 farms, with 1,927 tested cattle. From these, 178 (9.2%) were positive and autochthonous, but the overall result did not reflect the heterogeneity found between the evaluated municipalities. During the analyzed period, 11,556 cattle were slaughtered, with 1,744 (15.1%) liver condemnations due to fasciolosis in animals that never left the Serrana Mesoregion. The present study confirmed the presence of autochthonous cases of bovine fasciolosis in municipalities of the Serrana Mesoregion, and verified a high rate of positivity in animals slaughtered in the regional slaughterhouses. When the prevalence of bovine fasciolosis *in vivo* was compared with the *postmortem* positivity index in five municipalities, the results disagreed in four municipalities (p-value <0.05), emphasizing the need for field investigation for the better understanding of the distribution and frequency of the parasitosis.

Keywords: ***Fasciola hepatica*, prevalence, ruminants, zoonosis, one health**

OPEN ACCESS

Edited by:
Khalid Mehmood, Islamia University of Bahawalpur, Pakistan

Reviewed by:
Krystyna Cwiklinski, University of Liverpool, United Kingdom
Shah Nawaz, University of Agriculture, Pakistan

***Correspondence:**
Andreas Lazaros Chryssafidis
andreas.ch@udesc.br

Specialty section:
This article was submitted to Parasitology, a section of the journal Frontiers in Veterinary Science

Received: *30 April 2022*
Accepted: *08 June 2022*
Published: *22 July 2022*

Citation:
Américo L, Padilha MAC, Arruda PM, Drescher G, de Moura AB and Chryssafidis AL (2022) Epidemiological Survey and Confirmation of Autochthonous Cases of Bovine Fasciolosis in the Serrana Mesoregion of Santa Catarina, Brazil. Front. Vet. Sci. 9:933462. doi: 10.3389/fvets.2022.933462

INTRODUCTION

Due to the great impact generated on human and animal health, especially in cattle, *Fasciola hepatica* is reported as a trematode of great importance, causing fasciolosis, one of the most neglected zoonotic parasitic diseases in the world (1–3). It is also integrating the list of neglected tropical diseases of the World Health Organization (WHO), in the group of trematodes caused by foodborne diseases (3).

The young parasite migrates through the liver parenchyma and the adult is located in the bile ducts of warm-blooded animals, such as sheep, goats, cattle, buffalo, swine and humans (4, 5). *F. hepatica* has an indirect life cycle, involving freshwater snails of the Lymnaeidae family as intermediate hosts (4).

An annual economic impact of more than US$3.2 billion on world ruminant production is estimated from liver condemnation due to fasciolosis (6). In Brazil, a loss of around US$ 210 million per year was calculated with bovine fasciolosis alone (7). Among the States with the highest losses, related to the decrease in carcass weight and liver condemnations, there are Rio Grande do Sul, Espírito Santo and Santa Catarina, in decreasing order (7).

The State of Santa Catarina is located in the South Region of Brazil, and has a herd of more than 4 million ruminants (8). Fasciolosis is endemic and presents a high incidence in the coastal strip of the State (9–11), mainly due to climatic factors that influence the development of gastropod vectors (9, 12, 13).

The Serrana Mesoregion, located at the center-south of Santa Catarina State, is composed of 30 municipalities (14) that have a consolidated agricultural tradition, mainly in extensive ruminant livestock (15). There are studies that reported liver condemnation due to fasciolosis in cattle slaughtered in this region, in slaughterhouses under Federal Inspection Service (9–11, 16). However, these slaughterhouses receive cattle from many different regions, eventually from the Rio Grande do Sul State, and there was no investigation about the origin or movement of such animals, thus there was no confirmation of autochthonous cases.

Given the importance of fasciolosis for the economy, animal and human health, it is essential to assess the occurrence of the disease in the animal population and define the parasite distribution, providing support for the design of control strategies. Thus, the objective of the present work was to investigate the occurrence and distribution of autochthonous cases of bovine fasciolosis in the Serrana Mesoregion, as well as to compare the *in vivo* examination with the *postmortem* analysis of bovines for the diagnostic of fasciolosis.

MATERIALS AND METHODS

The protocols used in this investigation were approved by the Ethics Committee for the Use of Animals of the Agroveterinary Sciences Center, Santa Catarina State University (protocol CEUA N° 5381070619).

General Local Characterization

The Serrana Mesoregion is composed of 30 municipalities (14). The Serrano climate is classified according to Köppen-Gelger as Temperate Oceanic Climate, that is, temperate and constantly humid (17), and the plant typology is classified as mixed ombrophilous forest, also called araucaria forest (18, 19). The municipalities included in the *in vivo* sampling were selected according to their geographic location and access limitations imposed by the pandemics of COVID-19. Thus, fecal samplings were carried out in the municipalities of Anita Garibaldi, Campo Belo do Sul, Capão Alto, Bocaina do Sul, Lages, Painel, São Joaquim and Urupema. For the *post mortem* analysis, the traceability records of cattle slaughtered from the 30 municipalities were checked.

Fecal Sampling of Bovines

For the fecal samplings and diagnosis of *F. hepatica* infection, cattle from eight municipalities of the Serrana Mesoregion were sampled between August 2019 and November 2021. Up to 20 animals aged over 12 months were randomly selected from random farms included in the study. The farms were selected from different regions within the municipalities, with the aid of technicians from Agricultural Research and Rural Extension Company of Santa Catarina (EPAGRI).

For the sample size calculation, the total number of ruminants and producers per municipality in the Serrana Mesoregion was kindly provided by the Integrated Agricultural Development Company of Santa Catarina (CIDASC). The sample size of tested cattle per municipality was calculated according to the prevalence estimate by simple random sampling (20), with the expected prevalence of 4.5% of bovine fasciolosis in Santa Catarina (9), and error of 5%, according to the formula, where n is the sample size for an infinite population, P_{exp} is the expected prevalence and d is the error:

$$n = \frac{1,96^2 P_{\exp}(1 - P_{\exp})}{d^2} \quad (1)$$

Subsequently, the correction for finite populations was applied to obtain the adjusted sample size, according to the following formula, where n_{adj} is the adjusted sample, N is the total population and n is the sample size for an infinite population:

$$n_{adj} = \frac{N * n}{N + n} \quad (2)$$

The fecal samples were collected individually, directly from the rectal ampulla, with the aid of long palpation gloves. After collection, the samples were stored in a thermal box and transported to the Laboratory of Parasitology and Parasitic Diseases, Agroveterinary Sciences Center, Santa Catarina State University, where they were stored at 4°C until their processing, which occurred within 72 h at maximum.

Coproparasitological Analysis

For the *in vivo* diagnostic of bovine fasciolosis, an adapted protocol of coproparasitological analysis by sedimentation

was used, with double of the sample quantity used in the original protocol, and reading the entire sediment under the stereomicroscope, for improving the sensitivity of the test (21–23).

Briefly, for the coproparasitological sedimentation test, 6 g of feces was homogenized in 84 mL of tap water, inside a 250 mL graduated polyethylene column, using a glass rod. The content was filtered through a tea strainer and placed in a 500 mL conical glass flask. Then, the volume was adjusted to 400 ml with tap water, and the sample was allowed to settle for 10 min. The supernatant was discarded by careful eversion, leaving approximately 50 ml with the sediment in the conical flask, and the procedure was repeated twice, to clean up the sample. After the last eversion, the remnant sample was left to settle for approximately 5 min and the supernatant was carefully removed with a disposable Pasteur pipette. For reading, the whole sediment was distributed in two Petri dishes, each one stained with three drops of 1% Methylene Blue. The entire sample was read under a stereomicroscope (Stremi 508, Zeiss) and, whenever necessary, the parasite structures were collected with a micropipette, transferred to a slide and the morphological confirmation of *F. hepatica* eggs was carried out under a microscope (E200, Nikon).

Analysis of Cattle Slaughtered in the Serrana Mesoregion, Under the State Inspection Service (SIE)

For the analysis of liver condemnations in slaughterhouses located in the Serrana Mesoregion, the CIDASC kindly provided a report of cattle slaughtered in the region between June 2018 and July 2021. The report contained the total number of slaughtered cattle in the selected abattoirs, the inspection notes, such as liver condemnations because of fasciolosis, the individual tracking tag number of every animal, and all their movement between farms or municipalities, according to the Brazilian System of Beef and Buffalo Meat Origin Identification and Certification (SISBOV) and Management System for Agricultural Defense of Santa Catarina (SIGEN+).

The analyzed data came from three slaughterhouses under the State Inspection Service (SIE) located in the municipalities of Lages, Otacílio Costa and São Joaquim. These slaughterhouses receive animals from the municipalities of the Serrana, Sul, Oeste and Vale do Itajaí Mesoregions. In the study, data from the municipalities of: Abdon Batista, Anita Garibaldi, Bocaina do Sul, Bom Jardim da Serra, Bom Retiro, Brunópolis, Campo Belo do Sul, Campos Novos, Capão Alto, Cerro Negro, Correia Pinto, Curitibanos, Frei Rogério, Lages, Otacílio Costa, Painel, Palmeira, Ponte Alta, Ponte Alta do Norte, Rio Rufino, Santa Cecília, São Cristovão do Sul, São Joaquim, São José do Cerrito, Urubici, Urupema, Vargem and Zórtea. All these municipalities are located in the Serrana Mesoregion.

Traceability and Confirmation of Autochthonous Cases of Bovine Fasciolosis

To confirm autochthonous cases of bovine fasciolosis in the Serrana Mesoregion, all animals sampled in the field and animals that had liver condemned for fasciolosis had their individual earring identification number (SISBOV) analyzed in SIGEN+ system. In this system, the complete life history of the animal was investigated, from the birth to the moment of fecal sampling or slaughtering, to assess the origin and movement of the animals. Autochthonous cases were defined when the infected bovine did not transit in any municipality outside the Serrana Mesoregion.

Frequencies of Bovine Fasciolosis

All data were stored and organized in Excel 2013 spreadsheets (Microsoft) for further analysis and tables preparation. The prevalence (P) of bovine fasciolosis was calculated with the data from the field random sampling, while the bovine liver condemnations due to fasciolosis were used to calculate the positivity index (PI). The postmortem data was not used to calculate prevalence, as we considered that the cattle sent for slaughtering would not represent the entire population of their municipalities of origin. Both P and PI were calculated according to the number of positives, being infected animals (IA) or condemned livers (CL), respectively, in relation to the total number of sampled animals (TSA) or total number of slaughtered animals (TNA) from the same municipality, according to the following formula:

$$P/IP = \frac{IA/CL}{TSA/TNA} \times 100 \quad (3)$$

Comparison Between *in vivo* and Post Mortem Analysis

In the municipalities of Bocaina do Sul, Capão Alto, Lages, Painel and Urupema, which presented positive animals in the *in vivo* and *post mortem* analysis, *Pearson's* chi-square (X^2) test and *Fisher's* exact test were applied to verify the agreement between the two approaches for investigating the frequency of *F. hepatica* in populations of cattle. All analyzes were performed using the R statistical software [version 3.6.3, (24)], with a significance level of 5%.

Assessment of Potential Economic Impact

To determine the potential economic losses generated by bovine fasciolosis in the Serrana Mesoregion, the overall prevalence found in the study was extrapolated to the total herd of the analyzed region (8), and the impact calculated based on US$56.6 per animal positive for *F. hepatica* (7).

Geolocation and Distribution of Bovine Fasciolosis in the Serrana Mesoregion

Representative maps of the prevalence and positivity index of each municipality were produced with the software QGIS 3.20 (Geographic Information System), and the results were

TABLE 1 | Sample calculation based on the bovine population in eight municipalities in the Serrana Mesoregion.

Counties	Bovine population of the serrana mesoregion	*n-adjusted*	*n-collected*
Anita Garibaldi	40.100	66	216
Bocaina do Sul	21.324	66	34*
Campo Belo do Sul	35.966	66	20*
Capão Alto	40.325	66	284
Lages	112.895	66	466
Painel	44.655	66	423
São Joaquim	90.251	66	90
Urupema	23.781	66	394

*n, sample number; *The minimum sample number was not reached.*

TABLE 2 | Prevalence of *Fasciola hepatica* through egg research in fecal samples of naturally infected cattle in municipalities in the Serrana Mesoregion, between 2019 and 2021.

Counties	Sampled animals	Positive animals	Prevalence (%)
Anita Garibaldi	216	0	0, 0
Bocaina do Sul	34*	2	5, 8
Campo Belo do Sul	20*	0	0, 0
Capão Alto	284	32	11, 2
Lages	466	35	7, 5
Painel	423	103	24, 3
São Joaquim	90	0	0
Urupema	394	6	1, 5
Total	1.927	178	9, 2

**The minimum sample number was not reached.*

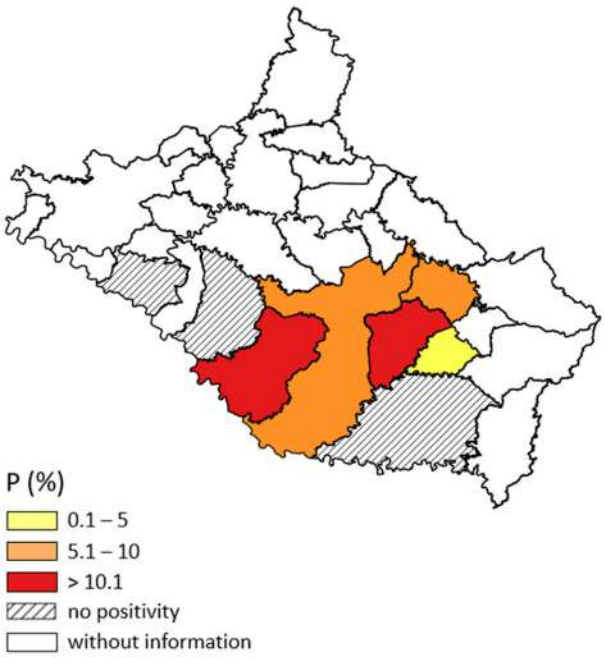

FIGURE 1 | Map of the distribution of bovine fasciolosis in the eight municipalities of the Serrana Mesoregion of Santa Catarina (SC) evaluated in the present study. Prevalence found in cattle analyzed in the field, in random properties, from 2019 to 2021.

subdivided into groups of low (0.1–5.0%), medium (5.1–10 0.0%) and high (>10.1%) positivity (25).

RESULTS

Analysis of Bovine Data *in vivo* and *post mortem*

A total of 106 livestock properties in eight municipalities in the Serrana Mesoregion were visited. The sample size for the infinite population was $n = 66.04$, given the regional prevalence of bovine fasciolosis of 4.5%, described in previous literature (9). The adjusted *n* according to the population was the same, and it is described in **Table 1**. The minimum sampling was extrapolated in most of the municipalities included in this project (**Table 1**).

In total, 1,927 cattle were tested by coproparasitological sedimentation examination, of which 178 were autochthonous, with an overall prevalence of 9.2% (178/1.927). The municipalities with high prevalence (>10.1%) were: Painel (24.3%; 103/423) and Capão Alto (11.2%; 32/284); and average prevalence: Lages (7.51%; 35/466) and Bocaina do Sul (5.88% 2/34) (**Table 2** and **Figure 1**).

Another point to be highlighted is the type of cattle breeding in the region, being observed that most producers raise their animals extensively, with the main sources of water for the animals in rivers, streams, springs and dams.

Based on data from the three slaughterhouses under SIE, located in the Serrana Mesoregion, 11,556 cattle were slaughtered between June 2018 and July 2021, with 1,744 animals with condemned livers due to the presence of the parasite and lesions generated by fasciolosis. Of the 28 municipalities included in the study, 23 of them were positive (**Table 3**). Only animals that transited in the municipalities of the Serrana Mesoregion were counted, thus characterizing all positive animals as autochthonous.

In the analysis of data from slaughterhouses, it was found that the general PI of the 23 municipalities with infected animals was 15.1% (1.744/11.556) in the Serrana region. The municipalities that showed a high rate of positivity (>10.1%) (in red, **Figure 2**) were Santa Cecília (73.9% 17/23), Bocaina do Sul (65.5% 40/61), Painel (40.9% 133/325), Urupema (33.3% 4/12), Ponte Alta (31.9% 182/569), Palmeira (27.9% 194/693), Cerro Negro (22.2% 6/ 27), Otacílio Costa (18.9% 181/956), Lages (18.6% 357/1.917), Correia Pinto (17.2% 188/1.088), Capão Alto (14.5% 93/641) and São José do Cerrito (11.8% 164/1.379). Only the municipalities of Abdon Batista, Frei Rogério, Ponte Alta do Norte, Rio Rufino and Zórtea did not present positive liver condemnation for fasciolosis.

TABLE 3 | *Fasciola hepatica* positivity index in cattle in the slaughter line of three slaughterhouses of the State inspection system in municipalities in the Serrana Mesoregion.

Counties	Sampled animals	Positive animals	Positivity index (%)
Abdon Batista	4	0	0
Anita Garibaldi	46	1	2, 1
Bocaina do Sul	61	40	65, 5
Bom Jardim da Serra	137	3	2, 1
Bom Retiro	134	3	2, 2
Brunópolis	309	11	3, 5
Campo Belo do Sul	101	3	2, 9
Campos Novos	121	9	7, 4
Capão Alto	641	93	14, 5
Cerro Negro	27	6	22, 2
Correia Pinto	1.088	188	17, 2
Curitibanos	953	60	6, 2
Frei Rogério	59	0	0
Lages	1.917	357	18, 6
Otacílio Costa	956	181	18, 9
Painel	325	133	40, 9
Palmeira	693	194	27, 9
Ponte Alta	569	182	31, 9
Ponte Alta do Norte	21	0	0
Rio Rufino	8	0	0
Santa Cecília	23	17	73, 9
São Cristovão do Sul	169	17	10
São Joaquim	1.632	67	4, 1
São José do Cerrito	1.379	164	11, 8
Urubici	100	6	6
Urupema	12	4	33, 3
Vargem	70	5	7, 1
Zórtea	1	0	0
Total	11.556	1.744	15, 1

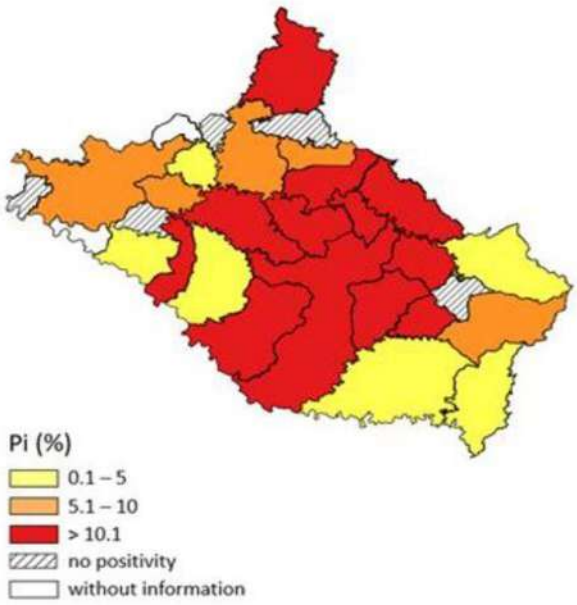

FIGURE 2 | Map of the distribution of the bovine fasciolosis positivity index from 2018 to 2021 according to data from three slaughterhouses under the State Inspection Service in 28 municipalities in the Serrana Mesoregion of Santa Catarina.

Concordance Analysis

In the study, the agreement between liver condemnation data and field sampling of positive and negative animals for *F. hepatica* in the municipalities of Bocaina do Sul, Capão Alto, Lages, Painel and Urupema was analyzed, using the chi-square test and the Fisher's exact test (**Table 4**).

As a result, a significant difference was found (p-value <0.05) with the results of the municipalities of Bocaina do Sul, Lages, Painel and Urupema. In Capão Alto, the p-value was not significant (chi-square $p = 0.22$; Fisher's $p = 0.21$) indicating agreement between the compared analyses. The results from the field samples of Anita Garibaldi, Campo Belo do Sul and São Joaquim could not be compared to the data from abattoirs using chi-square and Fisher's exact tests, as they were negative in the first analysis.

Economic Losses

Fasciolosis greatly impairs bovine production, decreasing the weight gain, the final carcass weight and causing liver condemnation. The overall prevalence of bovine fasciolosis investigated and calculated in this study is of 9.2%. Extrapolating this prevalence to the Serrana Mesoregion, considering the regional bovine herd of 765,529 animals (8), and that fasciolosis generates a loss of US$ 56.6 dollars per infected bovine (7), a total loss of approximately U$ 4 million/year (U$ 3,986,281.40/year) can be estimated for the Serrana Mesoregion.

DISCUSSION

The Serrana Mesoregion of Santa Catarina State, Brazil, is a region with a very consolidated tradition of extensive ruminant farming, historically free of fasciolosis (26). In the present study, a very large number of animals were surveyed for bovine fasciolosis, by *in vivo* investigation with coproparasitological tests, and by the *post mortem* data analysis in slaughterhouses under the SIE.

In the present study, the average prevalence of positive infected animals through coproparasitological examination in eight municipalities in the Serrana Mesoregion was 9.2% (178/1,927), a high prevalence for a region previously considered free of fasciolosis. The number of tested animals in the municipalities of Bocaina do Sul and Campo Belo do Sul did not reach the minimum sampling required, but it occurred because of the COVID-19 pandemics and its restrictions. The general prevalence of the Serrana Mesoregion does not reflect the heterogeneity in the levels of fasciolosis found among the investigated municipalities.

TABLE 4 | Comparison between the prevalence of bovine fasciolosis *in vivo* with the post mortem positivity index through chi-square and Fisher's exact test in the municipalities of Bocaina do Sul, Capão Alto, Lages, Painel and Urupema.

Counties	*p*-value chi-square	*p*-value *Fisher*
Bocaina do Sul	6,65e−08*	5,21e−06*
Capão Alto	0,2203	0,211
Lages	9,82e−06*	6,05e−07*
Painel	1,98e−06*	1,76e−03*
Urupema	1,38e−06*	8,46e−02*
General	<2,2e−16*	< 2,2e−16*

**Significant difference.*

Even though bovine fasciolosis does not commonly cause mortality in parasitized animals, it is still a highly important disease (1). Attention to infected animals is directly related to the great economic impact on production animals due to the decrease in milk production, reduction in weight gain and low fertility (16).

In the State of Santa Catarina, there were two studies with similar methodology, where live animals were analyzed by coproparasitological sedimentation examination. The first was a retrospective study with samples of cattle, buffaloes, goats and sheep sent to the laboratory of the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply, over a period of 12 years. At that time, no sample from three municipalities of the Serrana Mesoregion (Curitibanos, Campos Novos and São Joaquim) and was positive, but an overall prevalence of 27.8% (1.994/7.156) infected cattle was found in Santa Catarina, especially along the coastal region (10). However, it seems that these stool samples were from animals presenting some clinical sign, which justifies the high rate of positivity.

The second study evaluated the prevalence of *F. hepatica* in cattle from five municipalities located in the extreme South of Santa Catarina, which are Turvo, Timbé do Sul, Meleiro, Jacinto Machado and Morro Grande. A total of 290 bovine stool samples were collected in 61 properties, and a prevalence of 30.4% (88/290) was indicated in that region (27).

None of these previous studies carried out a proper investigation of animals located in the Serrana Mesoregion, emphasizing the scarcity of data and information about the fasciolosis in this location. The present study had a specific focus on the Serrana Mesoregion, prioritizing the randomness of the animals collected, for a better evaluation of the prevalence of the disease, and the investigation of the complete animal transit, from their birth until the moment of collection. This protocol proved that the bovines are becoming infected in the specific region, highlighting the importance of the obtained results for the animal health and local economy.

The adapted coproparasitological examination of sedimentation (21) was chosen because of its specificity for the identification of the dense eggs of *F. hepatica*. To increase the sensitivity of the technique, twice the recommended stool volume was used, as recommended in the literature (23). Furthermore, for the reading of the samples, drops of Methylene Blue 1% were added to the samples, and the reading of the entire sediment in Petri dishes was carried out. This technique was used to facilitate the visualization of the eggs in relation to the color of the bottom of the plate, in which the sediment acquired a blue color and contrasted with the eggs that maintained the original yellowish color, thus increasing the precision of the laboratory diagnosis (28).

Through the coproparasitological examination of the animals *in vivo*, the study also contributed directly to the epidemiological control of the parasitosis through the diagnosis and treatment of the animals before slaughter, increasing the profitability of the local producers.

The Serrana Mesoregion is historically known for its large-scale farms dedicated to livestock (29). The cattle raised in the region is kept mainly in extensive grazing, being one of the main economic activities in the region for more than 150 years (30). This type of cattle management allows the animals to have direct contact with natural water sources, such as rivers, streams, dams and swamps. These type of environments favor the proliferation of gastropods, therefore, they significantly increase the chances of cattle infection by *F. hepatica* (31). Additionally, the temperate and humid climate of the Serrana Mesoregion is ideal for the development of vector gastropods (17).

In order to expand information on fasciolosis in the Serrana Catarinense Meserregion, data from SIE slaughterhouses located in the region were compiled in search of new data on liver condemnation by *F. hepatica*. Some studies have already been carried out previously referring to data from the Federal Inspection System (7, 9, 11, 26).

The Serrana Mesoregion of Santa Catarina, Brazil, was historically free of this parasite (26). Silva (11) considered that the entire State of Santa Catarina was endemic, based on data from the Federal Inspection System in regional slaughterhouses. However, there was no analysis of the movement of cattle, or any evidence of autochthony of positive bovines. The abattoirs receive animals from several different locations, and it is not possible to identify the origin of infection without investigating the transit of the infected animals.

The information from the present study demonstrated a relevant positivity index (PI) of fasciolosis in the studied region, much higher than the data previously described in the literature (11). According to SIE data, the estimated general PI was 15.1% (1.744/11.556) of infected animals located in 28 municipalities in the Serrana Mesoregion. Data from the Federal Inspection System for the years 2004 to 2008 and 2010 estimated the PI of 8.8% (24.455/518.635) of livers infected with *F. hepatica* throughout the State of Santa Catarina (11). The results of this previous study corroborate the present study only in the cities of Palmeira, Bocaina do Sul and Ponte Alta, which presented high PI in both studies.

The prevalence of bovine fasciolosis in Anita Garibaldi and São Joaquim was so low that no infected animal was detected by fecal examination, even with a random sampling above the minimum desired sample (**Table 2**). However, some positives were detected in the records of liver condemnation from the region. This comparison also emphasizes the necessity of field studies in order to investigate the correct distribution of the

parasitosis in a determined region, as the *postmortem* data did not match the detected prevalence.

When comparing the results found in the field study (*in vivo*) with the results from the slaughterhouses (*postmortem*), a significant difference was detected between these approaches in the municipalities of Bocaina do Sul, Lages, Painel and Urupema, that is, there was no agreement between the *in vivo* and the *postmortem* analysis (**Table 4**). This lack of agreement highlights the importance of field research in search of the real epidemiological situation of animals that are in the production process.

CONCLUSION

The present study confirmed autochthonous cases of *F. hepatica* infection in cattle in the Serrana Mesoregion, combining *in vivo* tests with *postmortem* investigation. The prevalence of bovine fasciolosis was evaluated in the region through random sampling of bovines, even extrapolating the minimum sample size, providing robustness to the obtained results. A high positivity index was verified in animals slaughtered in abattoirs under the State Inspection Service (SIE). However, the positivity index verified by liver condemnation and the real prevalence of fasciolosis in animals in the field were different, emphasizing the need for the field investigation in order to determine the real prevalence of bovine fasciolosis in a population. The detection of infected animals in a historically free region is a very important information, not only for the region economy and health, but for the understanding and control of *F. hepatica* distribution. More investigations are being carried out, for the identification of the activities and epidemiological factors that contributed for the occurrence of fasciolosis in the region. They will contribute for the planning and implementation of efficient measures to control this disease, thus reducing economic losses for cattle farmers, and protecting the human health by the prevention of possible zoonotic cases.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Ethics Committee for the use of animals of the Agroveterinary Sciences Center, Santa Catarina State University (protocol CEUA N° 5381070619). Written informed consent was obtained from the owners for the participation of their animals in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AC designed the study. LA, PA, and AC carried out the field sampling and coproparasitological tests. LA, MP, and GD analyzed the post mortem data. LA, AM, and AC wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

The authors would like to thank FAPESC (grant number 027/2020−793/2021) for funding the materials used in the study. We would also like to thank CAPES for funding LA masters degree.

REFERENCES

1. Mas-Coma S. Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *J Helminthol.* (2005) 79:207–16. doi: 10.1079/JOH2005296
2. Calvani NED, Šlapeta J. Fasciola Species Introgression: Just a Fluke or Something More? *Trends Parasitol.* (2020) 37:25–34. doi: 10.1016/j.pt.2020.09.008
3. WHO. Investing to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases. *Word Helth Organ.* (2015) 368:20120144.
4. Mas-Coma S, Bargues MD. Human Liver Flukes: a Review. *Res Rev Parasitol.* (1997) 57:145–218.
5. Cuervo PF, Cataldo S Di, Fantozzi MC, Deis E, Isenrath GD, Viberti G, et al. Liver fluke (*Fasciola hepatica).* naturally infecting introduced European brown hare (Lepus europaeus) in northern Patagonia: Phenotype, prevalence and potential risk. *Acta Parasitol.* (2015) 60:536–43. doi: 10.1515/ap-2015-0076
6. Mehmood K, Zhang H, Sabir AJ, Abbas RZ, Ijaz M, Durrani AZ, et al. A review on epidemiology, global prevalence and economical losses of fasciolosis in ruminants. *Microb Pathog.* (2017) 109:253–62. doi: 10.1016/j.micpath.2017.06.006
7. Molento MB, Bennema S, Bertot J, Pritsch IC, Arenal A. Bovine fascioliasis in Brazil: Economic impact and forecasting. *Vet Parasitol Reg Stud Reports.* (2018) 12:1–3. doi: 10.1016/j.vprsr.2017.12.004
8. IBGE. *Efetivo de Rebanho*, Por Tipo de Rebanho. *Inst Bras Geogr e Estatística Pesqui da Pecuária Munic.* (2019). Available online at: https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado (accessed July 2, 2021).
9. Bennema SC, Scholte RGC, Molento MB, Medeiros C, Carvalho ODS. *Fasciola hepatica* in bovines in Brazil: data availability and spatial distribution. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* (2014) 56:35–41. doi: 10.1590/S0036-46652014000100005
10. Serra-Freire NM da, Nuernberg S. Geopolitical dispersion of the occurrence of *Fasciola hepatica* in the State of Santa Catarina, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* (1992) 87:263–9. doi: 10.1590/S0074-02761992000500050
11. Silva AEP, Freitas C da C, Dutra LV, Molento MB. Correlation between climate data and land altitude for *Fasciola hepatica* infection in cattle in Santa Catarina, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* (2020) 29:1–7. doi: 10.1590/s1984-29612020065
12. Fiss L, Adrien ML, Pereira CM, Assis-Brasil ND, Sallis ESV, Riet-Correa F, et al. Subacute and acute fasciolosis in sheep in southern Brazil. *Parasitol Res.* (2012) 112:883–7. doi: 10.1007/s00436-012-3096-2
13. Aleixo MA, Freitas DF, Dutra LH, Malone J, Martins IVF, Molento MB. *Fasciola hepatica*: epidemiology, perspectives in the diagnostic and the use of geoprocessing systems for prevalence studies. *Semin Agrar.* (2015) 36:1451–65. doi: 10.5433/1679-0359.2015v36n3p1451
14. IBGE. Divisão Regional do Brasil em mesorregioes e microrregiões geográficas. *Ministério da Econ Fazenda e Planej.* (1990) 1:1–135.
15. Pinto CE, Garogorry FC, Costa NB, Baldissera TC. *Pecuária de corte: Vocação e inovação para o desenvolvimento catarinense*. 1st eds. Florianópolis: Encarte Cultural. (2016).
16. Dutra LH, Molento MB, Naumann CRC, Biondo AW, Fortes FS, Savio D, et al. Mapping risk of bovine fasciolosis in the south of Brazil

using geographic information systems. *Vet Parasitol.* (2010) 169:76–81. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.12.015
17. Ricken P, Hess AF, Borsoi GA. Relações Biométricas e Aambientais no Incremento Diamétrico de Araucaria angustifolia no Planalto Serrano Catarinense. *Ciência Florest.* (2018) 28:1592. doi: 10.5902/1980509835107
18. Gasper AL de, Sevegnani L, Vibrans AC, Sobral M, Uhlmann A, Lingner DV, et al. Inventário florístico florestal de Santa Catarina: espécies da Floresta Ombrófila Mista. *Rodriguésia.* (2013) 64:201–10. doi: 10.1590/S2175-78602013000200001
19. Formento S, Schorn LA, Alaor R, Ramos B. Dinâmica Estrutural Arbórea de uma Floresta Ombrófila Mista em Campo Belo do Sul, SC. *CERNE.* (2004) 10:196–212.
20. OPS. Medición de las condiciones de salud y enfermedad de la pobalcion. In: Castillo-Salgado C, Mujica OJ, Loyola E, Canela J, editors. *Módulo de Principios de Epidemiología para el Control de Enfermedades (MOPECE).* Washington DC, EUA: Organización Panamericana de la Salud (2001). p. 1–96.
21. Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. The Sedimentation Concentration Method in Schistosomiasis Mansoni. *PR J Public Health Trop Med.* (1934) 9:283–9.
22. Charlier J, De Meulemeester L, Claerebout E, Williams D, Vercruysse J. Qualitative and quantitative evaluation of coprological and serological techniques for the diagnosis of fasciolosis in cattle. *Vet Parasitol.* (2008) 153:44–51. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.01.035
23. Calvani NED, George SD, Windsor PA, Bush RD, Šlapeta J. Comparison of early detection of Fasciola hepatica in experimentally infected Merino sheep by real-time PCR, coproantigen ELISA and sedimentation. *Vet Parasitol.* (2018) 251:85–9. doi: 10.1016/j.vetpar.2018.01.004
24. R-Foundation. *The R Project for Statistical Computing.* (2003). Available online at: https://www.r-project.org/ (accessed August 24, 2021)
25. Guimarães RJPS, Freitas CC, Dutra LV, Oliveira G, Carvalho OS. Multiple regression for the schistosomiasis positivity index estimates in the Minas Gerais State - Brazil at small communities and cities levels. In: El Ridi R, ed. *Parasitic Diseases – Schistosomiasis*. Cairo University, Egypt: InTech (2013). p. 3–27.
26. Agudo-Padrón AI, Veado RW. ad-V, Saalfeld K. *Moluscos e Saúde Pública em Santa Catarina:subsídios para a formulação estadual de políticas preventivas sanitaristas,* 1st ed. Dutra Duque de Caxias, RJ: Espaço Científico Livre Projetos Editoriais. (2013).
27. Botelho G, Souza AP de, Bellato V, Sartor AA. Prevalência da Fasciola hepatica em cinco municípios do Extremo Sul Catarinense. *Rev Ciências Agroveterinárias.* (2002) 1:11–5.
28. Japa O, Siriwechviriya P, Prakhammin K. Occurrence of fluke infection in beef cattle around Phayao Lake, Phayao, Thailand. *Vet World.* (2020) 13:334. doi: 10.14202/vetworld.2020.334-337
29. Costa L. *O continente das Lagens: sua história e influência no sertão da terra firme*. *FCC Edições.* (1982) 4:1401–739.
30. Boldrini II. *Biodiversidade dos Campos do Planalto das Araucárias*. *Ministério do Meio Ambiente.* (2009) 30:42–62.
31. Mas-Coma S, Bargues MD, Valero MA. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int J Parasitol.* (2005) 35:1255–78. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.07.010

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Américo, Padilha, Arruda, Drescher, de Moura and Chryssafidis. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Cryptosporidium spp. as a cause of diarrhea in calves in rural properties in the southern municipalities of the State of Santa Catarina

Larissa Américo[1*], Guilherme Drescher[2]

[1]Laboratory of Parasitology and Parasitic Diseases – LAPAR, Department of Veterinary Medicine, Agroveterinary Sciences Center, Santa Catarina State University (LAPAR-CAV-UDESC), Lages, Santa Catarina, Brazil.

[2]Laboratory of Cellular Biology, Carlos Chagas Institute, Oswaldo Cruz Foundation (ICC-FIOCRUZ), Curitiba, Brazil

*larissa_americo22@yahoo.com.br

Keywords: Cryptosporidiosis. Protozoan. Cattle farming.

Dairy production has a prominent place in the Brazilian economy, placing the country in fourth place in world production. Some diseases decrease production and lead to losses in the early stages of development of calves. Among the main pathogens that lead to diarrhea is the protozoan of the genus *Cryptosporidium* spp., which is capable of developing in the microvilli of the epithelial cells of the gastrointestinal tract. The aim of this study was to identify, through coproparasitological examination, *Cryptosporidium* spp. in properties of the dairy sector in the cities of Orleans, São Ludgero and Braço do Norte, located in the southern mesoregion of Santa Catarina. In order to carry out this study, the technique used in the diagnosis was adapted and standardized by the Health Laboratory of the Barriga Verde University (UNIBAVE – Orleans/SC). For analysis, samples were submitted to the centrifuge–flotation technique in sucrose, and later submitted to modified Ziehl-Neelsen staining. In total, samples were collected from 67 calves, aged 10 days to 3 months, from 22 farms. Oocysts of the genus *Cryptosporidium* were identified in the feces of 47.76% (32/67) of the calves in 22 properties, of which 68.18% (15/22) were positive. The highest prevalence of cryptosporidiosis in calves was observed in animals aged one month with 43.75% (14/32) of cases. Regarding the type of production system, 40.63% (13/32) of the positive animals came from the semi-intensive system. The study demonstrated the presence of a zoonotic protozoan little known by rural landowners in the region, responsible for neonatal diarrhea in calves and of great importance for public health. The identification of *Cryptosporidium* spp. emphasizes the importance of carrying out more frequent laboratory tests on calves in order to adopt more effective preventive measures, thus minimizing the economic losses caused by the protozoan.

Verifique o código de autenticidade **5441481.594237.675578.3.5505304256791944937** em https://www.even3.com.br//documentos

ARACAJU | 16 A 19 DE ABRIL DE 2023

PARASITO 2023

XXVIII CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA

CERTIFICADO
APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS

Certificamos que o trabalho intitulado **Cryptosporidium spp. as a cause of diarrhea in calves in rural properties in the southern municipalities of the State of Santa Catarina** de autoria de Larissa Américo e Guilherme Drescher, foi apresentado no evento **XXVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia**, realizado em 16/04/2023 a 19/04/2023, na cidade de Aracaju.

Aracaju, 19 de Abril de 2023

PRESIDENTE DO CONGRESSO
PROF. SILVIO SANTANA DOLABELLA

PRESIDENTE DA SBP
PROF. JOSÉ MAURO PERALTA

In vitro evaluation of the ovicidal activity of Fluopsin C on *Fasciola hepatica* eggs

Larissa Américo[1], Rafaela Gil Bossle[1], Felipe Rieth de Lima[1], Faiane Reila Sousa Centenaro Duarte[1], Josiane Matos[1], Anderson Barbosa de Moura[1], Galdino Andrade Filho[2], Andreas Lazaros Chryssafidis[1]*.

[1]Laboratory of Parasitology and Parasitic Diseases – LAPAR, Department of Veterinary Medicine, Agroveterinary Sciences Center, Santa Catarina State University (LAPAR-CAV-UDESC), Lages, Santa Catarina, Brazil.

[2]Laboratory of Microbial Ecology (LEM), Department of Microbiology, Londrina State University, Londrina, Paraná, Brazil.

*andreas.ch@udesc.br

Keywords: Fasciolosis, drug development, new technologies, anthelminthic.

The trematode *Fasciola hepatica* is distributed throughout the world, infecting, and causing disease and economic losses in animals and humans. It has been included in the list of neglected diseases by the World Health Organization. In Brazil, losses of around US$ 210 million per year were estimated only with bovine fasciolosis. The control of this parasitosis is largely based on the treatment of infected individuals, a strategy impaired by the rise of anti-helminthic resistance. Thus, the investigation of novel molecules with fasciolicidal activity is a necessary approach. Recently, the LAPAR (Laboratory of Parasitology and Parasitic Diseases) research team standardized an *in vitro* protocol for evaluating the ovicidal activity of molecules in *F. hepatica* eggs, as it reflects the fasciolicidal activity in the adult trematodes. Here, this protocol has been applied to investigate the anthelminthic potential of and organocupric compound produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain, when these bacteria are cultured in a growth medium containing copper, the Fluopsin C. *F. hepatica* eggs were collected from the bile of slaughtered bovines from the Santa Catarina Plateau, Brazil. Gallbladders were collected from four animals that had macroscopic lesions on the liver, and adult *F. hepatica* in their bile ducts, and transported to LAPAR for analysis. The bile was collected, washed, and the eggs were collected and counted. The samples were distributed in universal plastic vials with lid, each containing at least 400 eggs in 15 ml of solution. Two concentrations of Fluopsin C were tested, 5µg/ml and 20 µg/ml, and compared to a control group containing only distilled water. The treatments and control were tested in triplicates, so nine vials were prepared per sample. All samples were incubated for 28 days, at 27° C, in the dark. After this period, the samples were exposed to an artificial light source for 24 h. Then, using a microscope, the eggs were classified as "undeveloped", "embryonated" or "hatched", and the ovicidal activity evaluated. In the samples 1 and 2, no egg presented any development in both concentrations of Fluopsin C, characterizing 100% of ovicidal activity. In sample 3, the same was detected with 5 µg/ml of Fluopsin C, and 98,89% at 20 µg/ml. In sample 4, the ovicidal activities were of 98,85% and 99,62%, for 5 and 20 µg/ml, respectively. In conclusion, Fluopsin C is a compost that presented great ovicidal activity on different field isolates of *F. hepatica* eggs, which may reflect an adequate fasciolicidal activity. New studies will be carried out to investigate further the potential of this molecule.

Verifique o código de autenticidade **5441481.594237.675571.3.5505304256791944907** em https://www.even3.com.br//documentos

ARACAJU | 16 A 19 DE ABRIL DE 2023

PARASITO 2023

XXVIII CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA

CERTIFICADO
APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS

Certificamos que o trabalho intitulado **In vitro evaluation of the ovicidal activity of Fluopsin C on Fasciola hepatica eggs** de autoria de Larissa Américo, Rafaela Gil Bossle, Felipe Rieth de Lima, Faiane Reila Sousa Centenaro Duarte, Josiane Matos, Anderson Barbosa de Moura, Galdino Andrade Filho e Andreas Lazaros Chryssafidis, foi apresentado no evento **XXVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia**, realizado em 16/04/2023 a 19/04/2023, na cidade de Aracaju.

Aracaju, 19 de Abril de 2023

PRESIDENTE DO CONGRESSO
PROF. SILVIO SANTANA DOLABELLA

PRESIDENTE DA SBP
PROF. JOSÉ MAURO PERALTA

XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA
PIRENÓPOLIS - GOIÁS
10 a 13 de novembro de 2024

UDESC LAGES

LAPAR UDESC

Associação entre ectoparasitos e a infecção por *Achantocheilonema reconditum* em cães no município de Lages, Santa Catarina, Brasil

Faiane Reila Sousa Centenaro Duarte [1]; Felipe Rieth de Lima [1]; Larissa Américo [1]; Ana Paula Remor Sebolt [1]; Maria Laura Correa Nunes [1]; Julia Milena Sandri Pereira [1]; Hanna Christna Antonia Brasil [1]; Anderson Barbosa de Moura [1]; **Andreas Lazaros Chryssafidis [1,2]**

[1]Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina: Av. Luiz de Camões, 2090, Bairro Conta Dinheiro, Lages-SC, 88.520-000; [2]Apresentador.

andreas.ch@udesc.br

Introdução

A acanthocheilonemose é uma zoonose parasitária, pouco patogênica, provocada pelo filarídeo *Acanthocheilonema reconditum*. Canídeos são os principais hospedeiros definitivos, e artrópodes como pulgas (*Ctenocephalides canis*, *Ctenocephalides felis*, *Pulex irritans* e *Echidnophaga gallinacea*) e piolhos (*Linognathus setosus* e *Heterodoxus spiniger*), seus hospedeiros intermediários como ilustrado na Figura 1. Em estudo recente realizado em Lages, Santa Catarina, foi verificada alta prevalência de acanthocheilonemose canina, com 22% (98/444) de cães positivos no Teste de Knott Modificado (TKM).

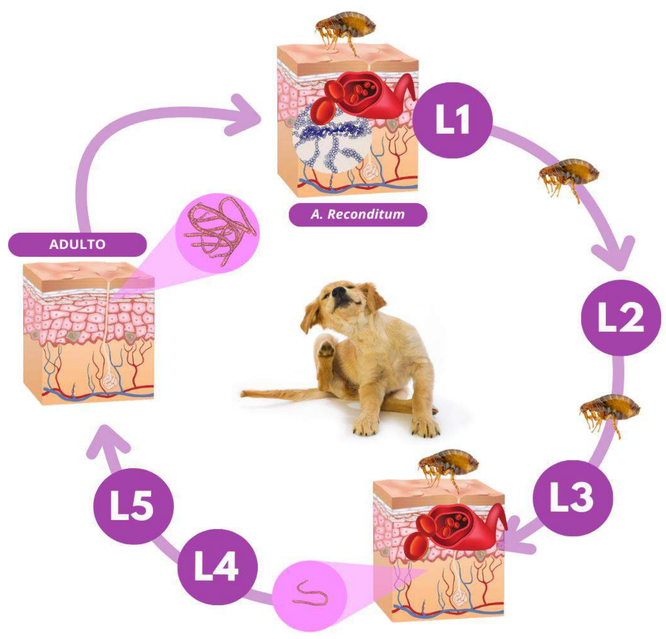

Figura 1. – Representação do ciclo biológico de *Acanthocheilonema reconditum*.

Objetivos

O objetivo do presente estudo foi avaliar a associação da ectofauna parasitária de cães à infecção por *A. reconditum* neste município.

Metodologia

Foram coletados aleatoriamente ectoparasitos de 158 cães provenientes de diferentes bairros, que foram identificados por meio de chaves pictóricas e dicotômicas.

A associação entre infecção por *A. reconditum* e espécie de ectoparasito coletado foi avaliada pelo teste de Qui-quadrado ($p \leq 0,05$).

Resultados

A tabela 1 descreve a associação entre infecção por *A. reconditum* e espécie de ectoparasito coletado nos animais avaliados no estudo.

Tabela 1. – Relação dos ectoparasitos coletados e a relação da presença da espécie em animais positivos para a infecção por *Acanthocheilonema reconditum* em cães de Lages.

Espécie de ectoparasito coletado	Percentual de animais com a espécie do ectoparasito indicado	Percentual de animais positivos em relação à espécie de ectoparasito indicado	P ($p \leq 0,05$)
Ctenocephalides felis	73,41% (116/158)	22,41% (26/116)	0,553
Ctenocephalides canis	13,92% (22/158)	40,90% (9/22)	0,060
Pulex irritans	5,69% (9/158)	66,66% (6/9)	0,008[a]
Trichodectes canis	0,63% (1/158)	100,00% (1/1)	0,077
Rhipicephalus sanguineus	0,63% (1/158)	0,00% (0/1)	0,570
Rhipicephalus microplus	3,16% (5/158)	60,00% (3/5)	0,061
Amblyomma aureolatum	2,53% (4/158)	0,00% (0/4)	0,254

Conclusão

Foi verificada associação entre infecção por *A. reconditum* e parasitismo por *P. irritans* nos animais avaliados (6/9, $p = 0,008$). Com a alta prevalência de *A. reconditum* registrada em cães no município de Lages, e a importância de *P. irritans* para a saúde animal e humana, este estudo enfatiza a necessidade da correta identificação e controle de ectoparasitos em animais de companhia, dado o caráter zoonótico desta filariose e o desconhecimento acerca de seus efeitos em humanos.

Agradecimentos:

CAPES

fapesc
Termo de outorga (2023TR000236)

CENTRO DE CONTROLE DE ZOONOSES LAGES - SC

XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA
PIRENÓPOLIS - GOIÁS

Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado

Associação entre a ectofauna parasitária e a infecção por *Acanthocheilonema reconditum* em cães no município de Lages, Santa Catarina, Brasil

de autoria de **Faiane Reila Sousa Centenaro Duarte ; Felipe Rieth de Lima ; Larissa Américo ; Ana Paula Remor Sebolt ; Maria Laura Correa Nunes ; Julia Milena Sandri Pereira ; Hanna Christna Antonia Brasil ; Anderson Barbosa de Moura ; Andreas Lazaros Chryssafidis**, foi apresentado na forma de Poster durante o **XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária (CBPV 2024)**, realizado de **10 a 13 de novembro de 2024**, no Centro de Convenções da Pousada dos Pireneus Resort, na cidade de Pirenópolis - GO

Everton Kort Kamp Fernande
Presidente do XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária

Felipe Silva Krawczak
Vice-presidente do XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária

Realização: CBPV Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária; UFG Universidade Federal de Goiás
Patrocínio Diamante: zoetis
Patrocínio Ouro: Boehringer Ingelheim; ourofino saúde animal; Elanco; MSD Saúde Animal
Patrocínio Prata: vetoquinol; Champion
Patrocínio Bronze: Biogénesis Bagó; Ceva
Expositor: PEARSON Saúde Animal
Apoio: CNPq; FAPEG; CRMV-GO; FUNAPE; Adufg

XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA
PIRENÓPOLIS - GOIÁS
10 a 13 de novembro de 2024

UDESC LAGES

LAPAR UDESC

Avaliação da acanthocheilonemose canina no município de Lages, Santa Catarina, Brasil

Faiane Reila Sousa Centenaro Duarte [1]; Felipe Rieth de Lima [1]; Larissa Américo [1]; Ana Paula Remor Sebolt [1]; Maria Laura Correa Nunes [1]; Julia Milena Sandri Pereira [1]; Hanna Christna Antonia Brasil [1]; Anderson Barbosa de Moura [2]; **Andreas Lazaros Chryssafidis [2]**

[1]Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina: Av. Luiz de Camões, 2090, Bairro Conta Dinheiro, Lages-SC, 88.520-000; [2]Apresentador.

andreas.ch@udesc.br

Introdução

A acanthocheilonemose é causada por *Acanthocheilonema reconditum* (sin. *Dipetalonema reconditum*), um nematódeo filarídeo transmitido por artrópodes (pulgas e piolhos), que parasita principalmente o tecido subcutâneo e gordura perirrenal de canídeos. Apresenta distribuição mundial, e há relatos de infecção em outras espécies, incluindo o ser humano. É considerado um parasito pouco patogênico para os cães, mas interfere diretamente no diagnóstico de dirofilariose, causada por outro filarídeo, *Dirofilaria immitis*, mais patogênico e de grande impacto à saúde canina. Não há confirmação da presença de *D. immitis* no Planalto Serrano de Santa Catarina (SC), porém, diferentes laboratórios da região verificaram a presença de microfilárias em amostras de sangue de cães, solicitando auxílio à equipe do LAPAR-UDESC-CAV na identificação do agente. A avaliação morfológica dos espécimes indicou compatibilidade com larvas de *A. reconditum.*

Objetivos

O objetivo do presente estudo foi determinar a prevalência da infecção de *A. reconditum* em cães no município de Lages, SC, cidade polo do Planalto Serrano Catarinense.

Metodologia

Foram coletadas aleatoriamente e avaliadas 444 amostras sanguíneas de cães provenientes de diferentes bairros deste município. Estas amostras foram analisadas por esfregaço sanguíneo corado com kit panótico rápido, e por teste de Knott modificado (TKM), para avaliar a presença e a morfologia das microfilárias encontradas, como ilustrado na Figura 1.

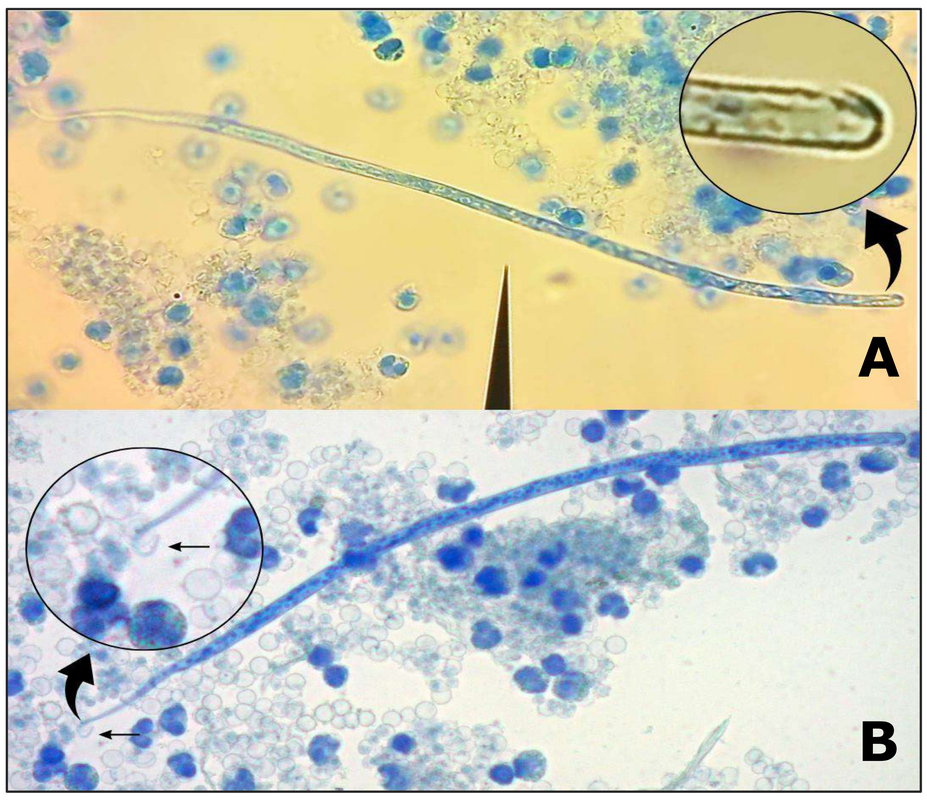

Figura 1. Morfologia de cabeça e cauda de microfilária de *Acanthocheilonema reconditum* (microscopia óptica com aumento de 40x vezes). Microfilária com detalhe aumentado, demonstrando a cabeça obtusa, com gancho cefálico. B – Microfilária com detalhe aumentado da cauda em formato de gancho.

Resultados

A prevalência encontrada da infecção por *A. reconditum* nos cães de Lages foi de 22% (98/444), de acordo com os resultados do TKM, não sendo verificada nenhuma outra espécie de filarídeo nas amostras avaliadas. Somente 4,3% (19/444) das amostras foram positivas ao teste de esfregaço sanguíneo, sendo todas essas também positivas no TKM. Houve concordância fraca a razoável entre os testes utilizados (Kappa = 0,27), confirmando a menor sensibilidade do esfregaço sanguíneo quando comparado ao TKM.

Conclusão

Este é o primeiro estudo realizado no Planalto Serrano Catarinense com foco em *A. reconditum* em cães. Foi verificada alta prevalência, quando comparada com dados de literatura, além de confirmar a ausência de *D. immitis*. Essas informações são relevantes aos médicos veterinários da região, pela alta frequência de acanthocheilonemose canina, e a indicação do melhor método para diagnóstico, além da importância de seu controle em um contexto da Saúde Única.

Agradecimentos:

CAPES

fapesc
Termo de outorga (2023TR000236)

CENTRO DE CONTROLE DE ZOONOSES LAGES - SC

XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA
PIRENÓPOLIS - GOIÁS

Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado

Avaliação da acanthocheilonemose canina no município de Lages, Santa Catarina, Brasil

de autoria de **Faiane Reila Sousa Centenaro Duarte; Felipe Rieth de Lima; Larissa Américo; Ana Paula Remor Sebolt; Maria laura Correa Nunes; Julia Milena Sandri Pereira; Hanna Christna Antonia Brasil; Anderson Barbosa de Moura; Andreas Lazaros Chryssafidis**, foi apresentado na forma de Poster durante o **XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária (CBPV 2024)**, realizado de **10 a 13 de novembro de 2024**, no Centro de Convenções da Pousada dos Pireneus Resort, na cidade de Pirenópolis - GO

Everton Kort Kamp Fernande
Presidente do XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária

Felipe Silva Krawczak
Vice-presidente do XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária

Realização: CBPV Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária; UFG Universidade Federal de Goiás

Patrocínio Diamante: Zoetis

Patrocínio Ouro: Boehringer Ingelheim; Ourofino Saúde Animal; Elanco; MSD Saúde Animal

Patrocínio Prata: Vetoquinol; Champion

Patrocínio Bronze: Biogénesis Bagó; Ceva

Expositor: Pearson Saúde Animal

Apoio: CNPq; FAPEG; CRMV-GO; FUNAPE; Adufg

12º Encontro de Pesquisa em Parasitologia ICB/UFMG

@lapar.cav.udesc

PRIMEIROS REGISTROS DE *Biomphalaria* spp. EM CINCO MUNICÍPIOS DO PLANALTO SERRANO CATARINENSE, SANTA CATARINA, BRASIL

CHRYSSAFIDIS, AL[1]*; AMÉRICO, L[1]; LIMA, FR[1]; MACHADO, SGR[1]; MOURA, AB[1]

[1]Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias, LAPAR-CAV-UDESC, Lages, SC

***andreas.ch@udesc.br**

INTRODUÇÃO

A esquistossomose, popularmente conhecida “barriga d'água”, é uma doença parasitária causada pelo trematódeo digenético *Schistosoma mansoni*. O homem é um hospedeiro definitivo do parasito, e caramujos do gênero *Biomphalaria* spp. São hospedeiros intermediários. A transmissão ocorre pelo contato com coleções de água contendo gastrópodes infectados pelo parasito, e liberando as fases larvais infectantes, chamadas cercárias, capazes de penetrar a pele íntegra.

OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo relatar pela primeira vez a presença do gênero *Biomphalaria* spp. nos municípios de Anita Garibaldi, Capão Alto, Painel, São Joaquim e Urupema, localizados no Planalto Serrano Catarinense.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas buscas ativas em propriedades rurais destes municípios, em coleções de água (Figura 1) como açudes e riachos, com avaliação visual de vegetação, matéria orgânica submersa em decomposição (limo, galhos, folhas e madeiras), além do peneiramento do solo submerso. Foram encontrados gastrópodes em vegetação, principalmente entre as raízes de plantas aquáticas, e no solo. A análise morfológica dos caramujos foi realizada sob estereomicroscópio, utilizando-se chaves pictóricas malacológicas.

RESULTADOS E CONCLUSÃO

Foram capturados 39 exemplares de caramujos planorbídeos, compatíveis com o gênero *Biomphalaria* (Figura 2). Destes, cinco foram encontrados no município de Anita Garibaldi, 11 em Capão Alto, um no município de Painel, três em São Joaquim e 19 em Urupema. Há relatos da presença de *Biomphalaria peregrina* nos municípios de Lages e Otacílio Costa, também no Planalto Serrano, porém, esta foi a primeira vez que o gênero foi encontrado nos municípios citados. Este relato enfatiza o risco de ocorrência da esquistossomose nesta região, e serve como um alerta à saúde pública, principalmente na população rural. Este estudo faz parte de um projeto de pesquisa em andamento, onde as espécies dos caramujos coletados serão confirmadas através de ensaios moleculares, bem como a presença dos parasitos nestes moluscos será investigada.

Figura 1. Caramujos planorbídeos compatíveis com o gênero *Biomphalaria*, visualizados em vegetação aquática, no município de Painel-SC.

Figura 2. Caramujos planorbídeos compatíveis com o gênero *Biomphalaria* coletados no município de Anita Garibaldi-SC.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo a Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC), pelo auxilio para o desenvolvimento da pesquisa. Termo de Outorga 2021TR793

REFERÊNCIAS

AGUDO-PADRÓN, I. Listagem Sistemática dos Moluscos Continentais Ocorrentes no Estado de Santa Catarina, Brasil. **Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay**. 91:147–179, 2008.

SCHLEMPER J. B. et al. Distribuição Geográfica de Planorbídeos em Santa Catarina, Brasil**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 29:411-418, 1996.

12º ENCONTRO DE PESQUISA EM PARASITOLOGIA

Professor Paulo Marcos Zech Coelho

Parasitologia e saúde única:
conectar conhecimentos e transcender barreiras

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho **PRIMEIROS REGISTROS DE *BIOMPHALARIA* SPP. EM CINCO MUNICÍPIOS DO PLANALTO SERRANO CATARINENSE, SANTA CATARINA, BRASIL**, de autoria de CHYSSAFIDIS, AL; AMÉRICO, L; LIMA, FR; MACHADO, SGR; MOURA, AB, foi apresentado na forma de pôster no **XII Encontro de Pesquisa em Parasitologia - Parasitologia e saúde única: conectar conhecimentos e transcender barreiras.**
O evento foi realizado nos dias 01 e 02 de dezembro de 2022 na Universidade Federal de Minas Gerais, em Belo Horizonte, MG, Brasil.

Professora Hélida Monteiro de Andrade
Coordenadora da Pós-Graduação em Parasitologia - ICB/UFMG

Chiara Cássia Oliveira Amorim
Representante da Comissão Organizadora
XII Encontro de Pesquisa em Parasitologia

PRIMEIROS REGISTROS DE *Pseudosuccinea columella* EM MUNICÍPIOS DO PLANALTO SERRANO CATARINENSE

AMÉRICO, L.; ARRUDA, P.M.; LIMA, F.R.; MACHADO S.G.R; MOURA, A.B.; *CHRYSSAFIDIS, A.L.

Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina (LAPAR-CAV-UDESC), Lages, SC.

E-mail: andreas.ch@udesc.br

Os gastrópodes da família Lymnaeidae são considerados os principais hospedeiros intermediários do ciclo biológico de *Fasciola hepatica*, agente causador da fasciolose, classificada como uma das doenças parasitárias zoonóticas mais negligenciadas no mundo. *Pseudosuccinea columella* é um dos caramujos mais frequentemente associados a esta parasitose, estando presentes em ambientes aquáticos de água doce de diversos tipos. Entretanto, existem erros na literatura relacionados à presença de *P. columella* na região Serrana do Estado de Santa Catarina. Em uma revisão sobre a distribuição de *P. columella* no Brasil, um relato sobre sua presença no município de Urubici, considerado incerto pelo próprio autor, foi utilizado para afirmar a presença do caramujo no município de Lages. Ao citar este caramujo em Urubici, os autores da revisão se equivocaram uma vez mais, relacionado esta confirmação com uma tese desenvolvida em Minas Gerais, que sequer cita Santa Catarina. Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar a presença e realizar os primeiros registros fidedignos de *P. columella* em municípios localizados no Planalto Serrano Catarinense. Foram realizadas buscas ativas em açudes, lagos, nascentes e riachos de propriedades onde foram identificados bovinos positivos para fasciolose, através da análise coproparasitológica de sedimentação. Foram coletados diversos espécimes, sendo transportados ao Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias (LAPAR-CAV-UDESC) para identificação. A avaliação morfológica e determinação taxonômica foi executada com base em informações de literatura e chaves pictóricas malacológicas. Dentre os caramujos coletados, 31 deles apresentaram concha oval, espiral curta com ápice pontiagudo, corpo expandido em espiral ocupando mais de dois terços do comprimento total da concha, periósteo com linhas espirais incisas que cortam as estrias de crescimento, e tentáculos curtos, achatados e triangulares, característicos de *P. columella*. Estes caramujos foram coletados em água doce corrente com fluxo lento, de aspecto límpido ou levemente turvo, estando aderidos principalmente em material orgânico em decomposição, como galhos, grimpas de araucária e pedras com musgo. Em uma propriedade, *P. columella* foi encontrado em uma mangueira plástica, que estava recoberta de limo. Sendo assim, o presente relato comprova os primeiros registros de *P. columella* nos municípios de Capão Alto, Lages, São Joaquim e Urupema, todos no Planalto Serrano Catarinense. Esta pesquisa é parte de uma investigação epidemiológica da fasciolose no Planalto Serrano, uma região previamente livre da parasitose. O conhecimento acerca da ocorrência da parasitose, e da distribuição de seus hospedeiros gastrópodes, permitirá o desenvolvimento de estratégias de controle e prevenção da fasciolose animal e humana.

Palavras-chave: Vetor; Zoonose; Fasciolose; One Health.

XXI Congresso Brasileiro de **Parasitologia** Veterinária

ANTIGOS PROBLEMAS NOVOS PARADIGMAS

Certificamos que ANDREAS LAZAROS CHRYSSAFIDIS e colaboradores apresentaram o trabalho "PRIMEIROS REGISTROS DE Pseudosuccinea columella EM MUNICÍPIOS DO PLANALTO SERRANO CATARINENSE" no XXI Congresso Brasileiro De Parasitologia Veterinária, realizado no período de 18 à 21 de outubro de 2022, de forma presencial em Ilhéus/BA.

Ilhéus - BA, 21 de outubro de 2022

https://cbpv.mini.app.br/validar

Código de validação:
1A65A48601B8

GEORGE REGO ALBUQUERQUE
PRESIDENTE DA COMISSÃO ORGANIZADORA

PATROCINADORES

MSD Saúde Animal

CAPES

Elanco

Boehringer Ingelheim

VI SIMPÓSIO INTERNACIONAL
CIÊNCIA, SAÚDE E TERRITÓRIO
"SAÚDE ÚNICA: Desafios e Perspectivas"
&
SIPA SUL
VI ENCONTRO DE SISTEMAS INTEGRADOS DE PRODUÇÃO AGROPECUÁRIA NO SUL DO BRASIL
PRODUÇÃO DE ALIMENTOS E SERVIÇOS ECOSSISTÊMICOS
25 a 27 de MAIO de 2021 EVENTO ONLINE www.simposioppgas.com.br

PRIMEIRO REGISTRO DE *Pseudosuccinea columella*, PRINCIPAL GASTRÓPODE VETOR DE *Fasciola hepatica*, NO MUNICÍPIO DE LAGES, SANTA CATARINA

Paula Maciel Arruda[1], Larissa Américo[1], Tiago Georg Pikart[2], Andreas Lazaros Chryssafidis[1]*

[1]Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Lages, Santa Catarina, Brasil.

[2]Departamento de Engenharia Florestal, Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Lages, Santa Catarina, Brasil.

*Prof Dr Andreas L. Chryssafidis: LAPAR-CAV-UDESC Av. Luiz de Camões, 2090. Conta Dinheiro, Lages – SC CEP: 88.520-000 Telefone (49) 3289-9108, e-mail: andreas.ch@udesc.br

RESUMO

Caramujos da família Lymnaeidae atuam como hospedeiros intermediários no ciclo biológico da *Fasciola hepatica*, uma doença parasitária zoonótica e negligenciada. *Pseudosuccinea columella* são caramujos de água doce e estão presentes em diferentes habitats aquáticos, com alta prevalência no Brasil. O objetivo do presente estudo é relatar a primeira identificação de *P. columella* no município de Lages. Há um relato prévio publicado sobre a ocorrência da espécie neste município, mas a publicação está incorreta, referenciando um achado de Urubici, ocasionando divergência e erro nas informações. Foi realizada busca ativa de gastrópodes vetores de *F. hepatica* em locais propícios aos moluscos, em propriedades com animais positivos para o parasito. Os gastrópodes capturados foram transportados ao Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias (LAPAR-CAV-UDESC) para análise. A avaliação morfológica e determinação taxonômica foi executada com base em características como o tamanho e coloração da concha e formato dos tentáculos. Dentre os caramujos coletados em Lages, 19

apresentaram concha oval, espiral curta com ápice pontiagudo, corpo expandido em espiral ocupando mais de dois terços do comprimento total da concha, periósteo com linhas espirais incisas que cortam as estrias de crescimento, e tentáculos curtos, achatados e triangulares. Os resultados comprovam o primeiro registro de *P. columella* no município de Lages, sendo a informação de fundamental importância para a confirmação de casos autóctones de fasciolose no município, contribuindo para a caracterização dos locais de ocorrência da fasciolose e o desenvolvimento de estratégias para a promoção da saúde animal e humana.

Palavras-chave: Fasciolose, doença transmitida por gastrópodes, Uma Saúde.

Verifique o código de autenticidade **3911088.3427407.355011.6.01197765435936229118** em https://www.even3.com.br//documentos

VI SIMPÓSIO INTERNACIONAL
CIÊNCIA, SAÚDE E TERRITÓRIO
"SAÚDE ÚNICA: Desafios e Perspectivas"

&

SIPA SUL
VI ENCONTRO DE SISTEMAS INTEGRADOS DE PRODUÇÃO AGROPECUÁRIA NO SUL DO BRASIL
PRODUÇÃO DE ALIMENTOS E SERVIÇOS ECOSSISTÊMICOS

Certificamos que o trabalho intitulado **PRIMEIRO REGISTRO DE Pseudosuccinea columella, PRINCIPAL GASTRÓPODE VETOR DE Fasciola hepatica, NO MUNICÍPIO DE LAGES, SANTA CATARINA** de autoria de Paula Maciel Arruda, larissa Américo, Andreas Lazaros Chryssafidis e Tiago Geord Pikart, foi submetido e apresentado no evento **VI SIMPÓSIO INTERNACIONAL CIÊNCIA, SAÚDE E TERRITÓRIO e VI SIPA SUL**, realizado em 25/05/2021 a 27/05/2021, na cidade de Lages/SC na modalidade on line, contabilizando carga horária total de 23,5 horas.

Lages, 28 de maio de 2021.

Dra Lenita Agostinetto
Coordenadora do VI Simpósio Internacional Ciência, Saúde e Território

Dr Tiago Celso Baldissera
Coordenador do VI Encontro de Sistemas Integrados de Produção Agropecuária no Sul do Brasil - SIPA SUL

Dra Lilia A. Kanan
Pró Reitora de Pesquisa, Extensão e Pós Graduação da Uniplac

Realização

Apoio

AVALIAÇÃO DE FATORES EPIDEMIOLÓGICOS RELACIONADOS À OCORRÊNCIA DE FASCIOLOSE BOVINA EM PROPRIEDADES DE CAPÃO ALTO, BOCAINA DO SUL, LAGES, SÃO JOAQUIM E URUPEMA[1]

Gabriela Azevedo Barbieri[2], Larissa Américo[3], Faiane Reila Sousa Centenaro Duarte[3], Rafaela Gil Bossle[3], Thayná Fiorentin Moreira[3], Andreas Lazaros Chryssafidis[4]

[1] Vinculado ao projeto "Avaliação de fatores epidemiológicos relacionados à ocorrência da fasciolose bovina no Planalto Serrano Catarinense"
[2] Acadêmica do Curso de graduação em Medicina Veterinária – CAV – Bolsista PROBIC/UDESC
[3] Acadêmica do Curso de pós-graduação em Ciência Animal – CAV
[4] Orientador, Departamento de Medicina Veterinária – CAV – andreas.ch@udesc.br

Fasciola hepatica é um trematódeo zoonótico de grande importância mundial que parasita o fígado de diversas espécies, sendo mais frequentemente encontrado em ruminantes. A pecuária exerce um papel fundamental na economia global, porém os produtores ainda enfrentam diversos obstáculos e entre eles, a fasciolose que é responsável por perdas principalmente relacionadas a diminuição na produção de leite e carne. Santa Catarina está em terceiro lugar entre os Estados brasileiros com maiores registros de condenação de fígados e diminuição do peso da carcaça em bovinos acometidos por *F. hepatica*, juntamente com o Rio Grande do Sul e Espírito Santo em primeiro e segundo lugar, respectivamente. O objetivo do presente trabalho foi analisar os fatores envolvidos na ocorrência de fasciolose bovina em cinco municípios localizados no Planalto Serrano Catarinense, visando delinear o perfil epidemiológico da fasciolose na região. Para isso, foi aplicado o questionário epidemiológico relacionado as características das propriedades, como: objetivo da criação, tamanho do rebanho e da propriedade, sistema de lotação, origem dos animais do rebanho, tipo de exploração pecuária, tipo de manejo usado, presença de áreas alagadas, acesso dos animais à água, uso de tratamento antiparasitário – medicamento usado e frequência de aplicação, exames fecais prévios ao projeto, conhecimento do produtor sobre a fasciolose e se havia assistência veterinária na propriedade. Todos os resultados foram compilados em planilhas do Microsoft Excel®, para posterior análise. Como resultados, foram visitadas 68 propriedades (Figura 1), nos municípios de Lages, Bocaina do Sul, São Joaquim, Capão Alto e Urupema e destas, 25% (17/68) foram positivas para *F. hepatica* no exame coproparasitógico de sedimentação (Tabela 1). Em relação ao questionário epidemiológico aplicado, foi observado que 33% (23/68) propriedades possuem uma área de até 100ha, 27% (19/68) ocupam de 100 a 200ha, 27% (19/68) tem mais de 200ha e apenas 10% (7/68) possuem acima de 500ha. Em relação ao tamanho do rebanho, 44% (30/68) das propriedades trabalham com rebanhos pequenos de até 50 animais. Das 68 propriedades, foi observado que 73% (50/68) usa animais da própria propriedade para reposição, ou compram animais do próprio município. A pecuária de corte é predominante na região, das propriedades visitadas apenas 2,9% (2/68) são dedicadas à produção leiteira; e 100% (68/68) trabalham com animais soltos a pasto onde os animais consomem água de açudes, riachos e outras fontes naturais de água encontradas na propriedade. A maior parte dos produtores recebe assistência veterinária, mas apesar disso apenas 5% (4/68) já haviam realizado exames coproparasitológicos préviamente nos animais, e 51% (35/68) dos produtores conhecia *F. hepatica.* Em relação ao histórico, apenas 13% (9/68) das propriedades já haviam recebido o diagnóstico de fasciolose anteriormente e destas, 66% (6/9) ainda eram positivas para o parasito. Considerando a importância econômica deste parasito, esse estudo demonstrou que na região existem diversos fatores que contribuem diretamente para o ciclo completo do trematódeo e infecção animal. Pesquisas epidemiológicas são de grande importância para antecipar e prevenir a

Apoio:

disseminação de doenças, permitindo a elaboração de estratégias de controle específicas para cada região.

Tabela 1. *Distribuição das propriedades visitadas de acordo com o município de origem e resultado do exame coproparasitológico de sedimentação.*

Município	Total de propriedades visitadas	Propriedades positivas para *Fasciola hepatica*	Porcentagem de propriedades positivas em relação ao total de propriedades (%)
Lages	23	7	30
Capão Alto	15	4	26
Bocaina do Sul	2	1	50
Urupema	24	5	20
São Joaquim	4	0	-
Total	68	17	25

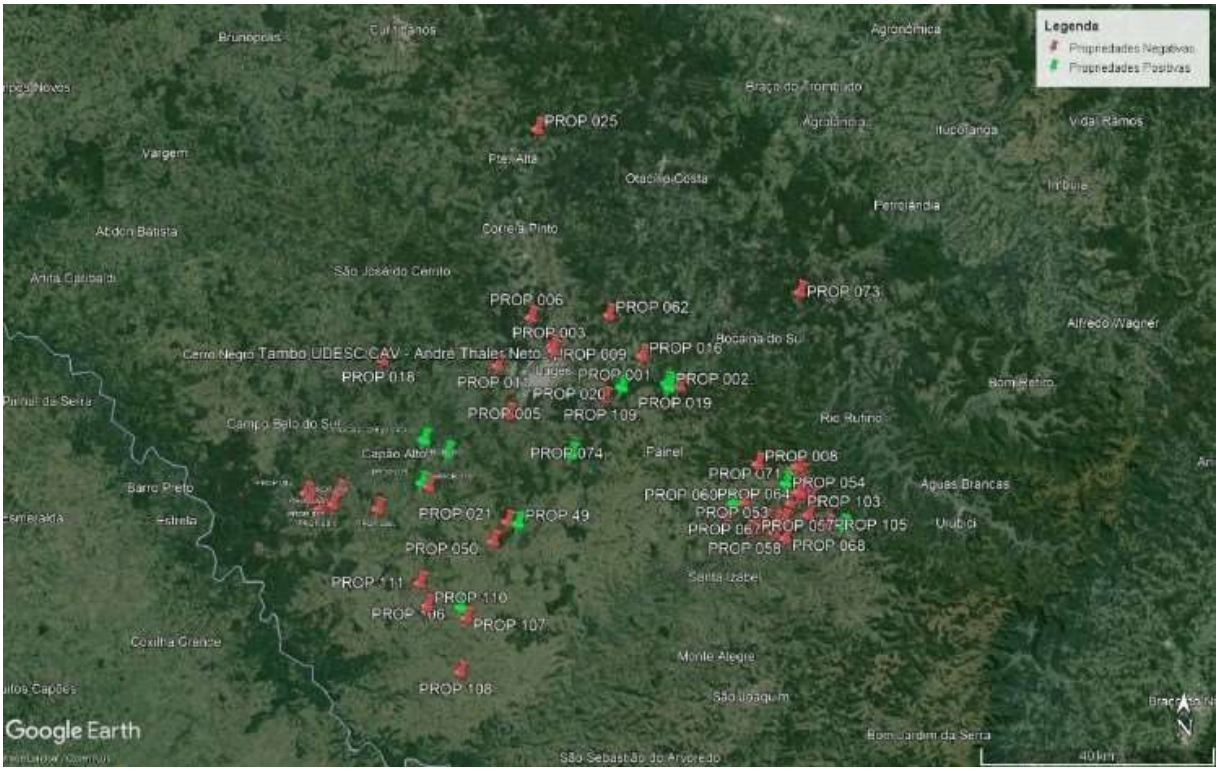

Figura 1. *Mapa das propriedades visitadas, nos municípios de Lages, Bocaina do Sul, Capão Alto, Urupema e São Joaquim, localizadas no Planalto Serrano Catarinense. Propriedades na cor vermelha negativas, propriedades na cor verde positivas.*

Palavras-chave: *Fasciola hepatica*. Zoonose. Epidemiologia. Saúde única.

34º SIC UDESC 2024
Seminário de Iniciação Científica

CERTIFICADO

A Universidade do Estado de Santa Catarina certifica que

GABRIELA AZEVEDO BARBIERI

participou do 34º SIC e apresentou o trabalho AVALIAÇÃO DE FATORES EPIDEMIOLÓGICOS RELACIONADOS À OCORRÊNCIA DE FASCIOLOSE BOVINA EM PROPRIEDADES DE CAPÃO ALTO, BOCAINA DO SUL, LAGES, SÃO JOAQUIM E URUPEMA, de autoria de Gabriela Azevedo Barbieri, Larissa Américo, Faiane Reila Sousa Centenaro Duarte, Rafaela Gil Bossle, Thayná Fiorentin Moreira e Andreas Lazaros Chryssafidis, na forma de apresentação oral no dia 23 de outubro de 2024, no Centro de Ciências Agroveterinárias.

Lages, SC, 30 de outubro de 2024

UDESC
UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA

Álvaro Luiz Mafra
Diretor de Pesquisa e Pós-Graduação
Centro de Ciências Agroveterinárias
Universidade do Estado de Santa Catarina

GOVERNO DE SANTA CATARINA

Código de autenticação: 95e77081983135cca36ac06fb590ca59
Valide em https://certificados.sistemas.udesc.br/Certificados/MeusCertificados/index?opcao=validar

34° Seminário de Iniciação Científica

Carga horária: 1 hora.

Certificado registrado pela DPPG/CAV sob Nº 10052.

Código de autenticação: 95e77081983135cca36ac06fb590ca59
Valide em https://certificados.sistemas.udesc.br/Certificados/MeusCertificados/index?opcao=validar
Gerado em 27/11/2024 20:45:47 por 50968601839

AVALIAÇÃO DE GASTRÓPODES VETORES DE *Fasciola hepatica* NOS MUNICÍPIOS DE ANITA GARIBALDI E PAINEL – SC[1]

Rafaela Gil Bossle[2], Larissa Américo[3], Faiane Reila Sousa Centenaro Duarte[3], Felipe Rieth Lima[4], Andreas Lazaros Chryssafidis[5]

[1] Vinculado ao projeto "Investigação de gastrópodes vetores de *Fasciola hepatica* no Planalto Catarinense e caracterização geoambiental das áreas infestadas".
[2] Acadêmica do Curso de graduação em Medicina Veterinária – CAV – Bolsista de Iniciação Científica PROBIC/UDESC
[3] Acadêmica do Curso de pós-graduação em Ciência Animal – CAV
[4] Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária – CAV
[5] Orientador, Departamento de Medicina Veterinária – CAV – andreas.ch@udesc.br

O agronegócio possui grande relevância na economia nacional e, deste setor, a pecuária bovina exerce um papel importante na economia e na subsistência de pequenas e grandes propriedades no estado de Santa Catarina. A região do Planalto Serrano Catarinense detém uma das maiores produções de bovinos do estado, no entanto sofre com problemas sanitários, como as parasitoses que geram redução dos índices produtivos. Nesse contexto, *Fasciola hepatica* é considerado um trematódeo de alta relevância, sendo o agente causador da fasciolose, uma das doenças parasitárias zoonóticas mais negligenciadas no mundo. Sua transmissão ocorre por meio do hospedeiro intermediário, os caramujos da família Lymnaeidae que são indispensáveis para o ciclo. Os vermes adultos parasitam os ductos biliares do fígado de animais infectados, principalmente ruminantes. Os ovos produzidos pelo parasito são liberados pelo movimento da vesícula biliar, passam pelo intestino e são eliminados pelas fezes no ambiente. Esses ovos, em meio aquático com temperatura e umidade ideais, geram miracídios que eclodem e infectam os caramujos. No interior dos gastrópodes o parasito passa por três fases: esporocistos, rédias e cercárias. As cercárias saem dos tecidos do caramujo e são liberadas em meio aquático, que nadam até a vegetação, onde realizam o processo de encistamento tornando-se metacercárias, a forma infectante do parasito. O hospedeiro vertebrado ingere as metacercárias junto com a vegetação, completando o ciclo. No Brasil, algumas espécies de Limneídeos foram relacionadas ao ciclo de *F. hepatica*, como: *Pseudosuccinea columella, Galba viatrix, Galba cubensis*, *Galba truncatula e Lymnaea rupestre*. De acordo com informações de órgãos oficiais do Estado de Santa Catarina, a fasciolose seria endêmica somente na região litorânea, portanto a região do Planalto Serrano seria livre da enfermidade. No entanto, atualmente, há registros de animais positivos abatidos na região, com confirmação de casos autóctones. Com isso, o objetivo do presente projeto, foi a realização da busca ativa por gastrópodes vetores e sua avaliação morfológica nos municípios de Anita Garibaldi e Painel, localizados no Planalto Serrano Catarinense. Em outubro de 2022, foi realizado a busca por caramujos em 4 propriedades do município de Anita Garibaldi e em 3 propriedades do município de Painel. A coleta foi executada com o uso de pinças e luvas de procedimento. Para a manutenção dos gastrópodes, foram utilizados potes de polietileno contendo água do local de coleta, transportados sob temperatura ambiente até o Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias (LAPAR-CAV-UDESC). Como resultados, no município de Anita Garibaldi foram encontrados um total de 5 gastrópodes de gênero *Biomphalaria*, 56 espécimes do gênero *Potamolithus* e em duas propriedades não encontramos nenhum exemplar de gastrópodes. Por sua vez, em Painel foram encontrados 209 caramujos do gênero *Potamolithus* e 16 exemplares de *P. columella*. Em relação ao ambiente, os

gastrópodes *Biomphalaria* spp. demonstraram preferência a locais com água parada e com alta densidade de matéria orgânica. Já os *Potamolithus* spp. eram encontrados em água limpa e corrente. Por sua vez, os *P. columella* tinham predileção a açudes e água parada com pouca matéria orgânica. A identificação foi realizada no LAPAR, por meio da avaliação morfológica com auxílio de um estéreomicroscópio, de acordo com as características como tamanho, coloração da concha e formato dos tentáculos. Os caramujos *Biomphalaria* spp. apresentavam concha em formato de disco, coloração castanha, variando entre tons claros e escuros, e tamanho bastante variável. *Potamolithus* spp. eram espécimes pequenos, não ultrapassando 6 mm, caracterizados por uma concha globosa, homogênea, coloração geralmente castanha, sem listras ou marcas, com tentáculos longos e presença de uma listra longitudinal dorsal. *Pseudosuccinea columella* mediam cerca de 20 mm, concha oval, com espiral curta e ápice pontiagudo, de coloração marrom escura com manchas arredondadas, tentáculos curtos, achatados e triangulares, com pé largo e curto. É importante ressaltar, que no estudo realizado anteriormente pelo LAPAR em Painel, foram verificados casos autóctones de bovinos positivos, correlacionando com a presença do principal hospedeiro intermediário *P. columella* encontrado no presente trabalho. Da mesma forma, nas propriedades avaliadas em Anita Garibaldi não houve animais positivos, tampouco foram encontrados gastrópodes da família Lymnaeidae. Nesta pesquisa, foram feitos os primeiros registros de *P. columella* na região, já que publicações anteriores estavam incorretas. Embora sem relação com o ciclo da fasciolose, também há os primeiros registros de *Biomphalaria* spp., hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni*. Dessa forma, este projeto traz importantes informações para a compreensão do ciclo de trematódeos zoonóticos na região do Planalto Serrano Catarinense, contribuindo diretamente na produção de conhecimentos em prol da saúde animal e humana.

Figura 1. Gastrópodes coletados através de busca ativa em propriedades rurais nos municípios de Painel e Anita Garibaldi. A) *Potamolithus* spp. B) gênero *Biomphalaria* spp. C) *Pseudosuccinea columella*

Palavras-chave: Fasciolose. Caramujos. Trematódeos. Saúde única.

Seminário de Iniciação Científica
Universidade do Estado de Santa Catarina
33° SIC UDESC 2023

CERTIFICADO

A Universidade do Estado de Santa Catarina certifica que

RAFAELA GIL BOSSLE

participou do 33º SIC e apresentou o trabalho AVALIAÇÃO DE GASTRÓPODES VETORES DE Fasciola hepatica NOS MUNICÍPIOS DE ANITA GARIBALDI E PAINEL – SC, de autoria de Rafaela Gil Bossle, Larissa Américo, Faiane Reila Sousa Centenaro Duarte, Felipe Rieth Lima e Andreas Lazaros Chryssafidis, na forma de apresentação oral no dia 25 de outubro de 2023, no Centro de Ciências Agroveterinárias - CAV/UDESC.

Lages, SC, 09 de novembro de 2023

UDESC
UNIVERSIDADE
DO ESTADO DE
SANTA CATARINA

Álvaro Luiz Mafra
Diretor de Pesquisa e Pós-Graduação
Centro de Ciências Agroveterinárias
Universidade do Estado de Santa Catarina

GOVERNO DE
SANTA
CATARINA

Código de autenticação: 8d01e4e2fcf57a1d408a453f572c3551
Valide em https://certificados.sistemas.udesc.br/Certificados/MeusCertificados/index?opcao=validar

33° Seminário de Iniciação Científica

Certificado registrado pela DPPG/CAV sob Nº 9421.

Código de autenticação: 8d01e4e2fcf57a1d408a453f572c3551
Valide em https://certificados.sistemas.udesc.br/Certificados/MeusCertificados/index?opcao=validar
Gerado em 25/11/2023 14:55:21 por 05073418050

AVALIAÇÃO DA EXCREÇÃO DE OOCISTOS EM GATOS VACINADOS CONTRA *Toxoplasma gondii*[1]

Rafaela Gil Bossle[2], Larissa Américo[3], Luisa Barreto Rippel[3], Sandy Gabrielly Radünz Machado[4], Andreas Lazaros Chryssafidis[5].

[1] Vinculado ao projeto "Pivotal study to evaluate the efficacy of a vaccine against feline toxoplasmosis"

[2] Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária – CAV – Bolsista Vaxinano
[3] Acadêmica do Curso de Pós-graduação em Ciência Animal – CAV
[4] Acadêmico(a) do Curso de Medicina Veterinária – CAV
[5] Orientador, Departamento de Medicina Veterinária – CAV – andreas.ch@udesc.br

A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo *Toxoplasma gondii* um protozoário coccidío intracelular obrigatório com ciclo heteroxeno, sendo hospedeiros intermediários qualquer animal de sangue quente, e hospedeiros definitivos somente felídeos, como os gatos domésticos. Nos felídeos ocorre a fase sexuada do ciclo de vida parasitário, com a produção de oocistos que são eliminados pelas fezes. Estes oocistos se tornam infectantes após aproximadamente 48h, sob condições ideais de temperatura e umidade. Hospedeiros intermediários e definitivos podem se infectar pela ingestão dos oocistos esporulados contaminando água e alimentos vegetais. Após a fase aguda da infecção, são formados cistos parasitários em diferentes tecidos dos hospedeiros. Para o ser humano, o maior risco de infecção é pela ingestão de carnes cruas ou mal-cozidas contendo cistos teciduais. O presente projeto objetivou avaliar uma vacina felina para toxoplasmose, em formulação por spray intranasal, com o objetivo de reduzir a quantidade de oocistos produzidos pelos felinos vacinados após a infecção, para interromper o ciclo de transmissão do parasito. O projeto, que foi aprovado pelo comitê de ética, foi desenvolvido no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias (LAPAR-CAV-UDESC) em colaboração com a empresa Vaxinano. Foram utilizados 12 gatos (8 machos e 4 fêmeas) sem raça definida com idade entre 10 e 14 semanas. Os animais estavam clinicamente saudáveis, e eram desparasitados, sendo ministrado vermífugo (pirantel, febantel, praziquantel) e pulicida (fipronil). Também eram soronegativos para toxoplasmose, testados por imunofluorescência indireta (RIFI), e negativos para FIV e FELV, testados por imunocromatografia (Alere FIV/FeLV). A vacina foi enviada pela empresa pronta para uso, consistindo em um spray intranasal, formado por antígenos totais de *T. gondii* e adjuvante baseado em nanomoléculas glicolipídicas. Os animais do grupo vacinado (G1, n = 6) foram tratados no dia 0 e no dia 21. Os animais do grupo controle (G2, n = 6) receberam spray intranasal de solução salina estéril nestes mesmos dias. No entanto, durante o estudo, a equipe responsável pelo manejo diário dos animais não sabia quais eram os animais vacinados até o fim do projeto, a fim de evitar parcialidade no momento da avaliação. Todos os animais foram inoculados com aproximadamente 200 cistos de *T. gondii*, pela via oral, em D77. Foram coletadas amostras de fezes diariamente por 21 dias após a infecção. As amostras foram testadas por exame coproparasitológico por flutuação, utilizando-se solução de sacarose (SG = 1,24). Foram realizados testes qualitativos até o início da eliminação dos oocistos, quando se passou a fazer testes quantitativos, com contagem em câmaras de McMaster. Quando o número de oocistos era muito grande, era realizada a diluição da amostra para as contagens. Os animais de ambos os grupos começaram a eliminar oocistos 6 dias pós a inoculação (6 dpi). O pico de eliminação ocorreu entre 6 e 8 dpi, com resultados acima de 500 mil oOPG (oocistos por grama de fezes) nos dois grupos. Todos os animais permaneceram positivos até 14 dpi, com redução progressiva no número de oocistos nos dois grupos. Em 19 dpi havia somente 1 animal do G1

e 3 animais do G2 eliminando poucos oocistos (<50 oOPG), e em 20 dpi todos já estavam negativos. Não houve diferença estatística significativa nos resultados de contagem de oocistos entre G1 e G2 (teste t de Student, ao nível de significância de 5%). O projeto de pesquisa continua em andamento, e uma nova fase de testes deverá ser realizada com nova formulação vacinal.

Palavras-chave: *Toxoplasma Gondii*. Vacina. Zoonose

UDESC
UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA

fapesc
Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Governo do Estado de Santa Catarina

Seminário de Iniciação Científica
Universidade do Estado de Santa Catarina
32° SIC UDESC

CERTIFICADO

A Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC certifica que

RAFAELA GIL BOSSLE

participou do 32º SIC e apresentou o trabalho intitulado " Avaliação da excreção de oocistos em gatos vacinados contra Toxoplasma gondii" de autoria de Rafaela Gil Bossle, Larissa Américo, Luisa Barreto Rippel, Sandy Gabrielly Radünz Machado, Andreas Lazaros Chryssafidis, na forma de apresentação oral, no dia 27 de outubro de 2022, no Centro de Ciências Agroveterinárias CAV/UDESC.

Lages, SC, 08 de novembro de 2022

Prof. André Thaler Neto
Diretor Geral

Prof. Álvaro Luiz Mafra
Diretor de Pesquisa e Pós-Graduação

Código de autenticação: 500bc3432b42e82c7869a89bcfdffafb
Valide em https://certificados.sistemas.udesc.br/Certificados/MeusCertificados/index?opcao=validar

32° Seminário de Iniciação Científica

Certificado registrado pela DPPG/CAV/UDESC sob Nº 8689.

Código de autenticação: 500bc3432b42e82c7869a89bcfdffafb
Valide em https://certificados.sistemas.udesc.br/Certificados/MeusCertificados/index?opcao=validar
Gerado em 17/11/2022 11:05:21 por 05073418050

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DE GATOS VACINADOS CONTRA *Toxoplasma gondii*[1]

Sandy Gabrielly Radünz Machado[2], Larissa Américo[3], Luisa Barreto Rippel[3], Rafaela Gil Bossle[4], Andreas Lazaros Chryssafidis[5].

[1] Vinculado ao projeto "Pivotal study to evaluate the efficacy of a vaccine against feline toxoplasmosis"
[2] Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária – CAV – Bolsista PROBIC
[3] Acadêmica do Curso de Pós-graduação em Ciência Animal – CAV
[4] Acadêmico(a) do Curso de Medicina Veterinária – CAV
[5] Orientador, Departamento de Medicina Veterinária – CAV – andreas.ch@udesc.br

A toxoplasmose é uma doença causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, que possui significativa importância na Saúde Única, devido ao seu caráter zoonótico. O *T. gondii* é um coccídeo de distribuição mundial, podendo infectar qualquer espécie animal de sangue quente. Os felinos domésticos e selvagens são os únicos hospedeiros definitivos, capazes de eliminar oocistos não esporulados nas fezes que, em torno de 48 horas após sua eliminação, esporulam e geram a forma infectante do parasita. Em animais de produção, principalmente ovinos e caprinos, causa prejuízo devido aos problemas reprodutivos. Em seres humanos, é responsável por alterações congênitas graves e abortamentos. O estudo foi feito com a finalidade de avaliar a eficácia da vacina anti-*Toxoplasma gondii* em reduzir a eliminação de oocistos nos animais vacinados, bem como avaliar a evolução da resposta imune dos felinos vacinados. O projeto, que foi aprovado pelo comitê de ética, foi desenvolvido no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias (LAPAR-CAV-UDESC) em colaboração com a empresa Vaxinano. Foram utilizados 12 gatos (8 machos e 4 fêmeas) sem raça definida com idade entre 10 e 14 semanas. Os animais estavam clinicamente saudáveis, e eram desparasitados, sendo ministrado vermífugo (pirantel, febantel, praziquantel) e pulicida (fipronil). Também eram soronegativos para toxoplasmose, testados por imunofluorescência indireta (RIFI), e negativos para FIV e FELV, testados por imunocromatografia (Alere FIV/FeLV). A vacina foi enviada pela empresa pronta para uso, consistindo em um spray intranasal, formado por antígenos totais de *T. gondii* e adjuvante baseado em nanomoléculas glicolipídicas. Os animais do grupo vacinado (G1, n = 6) foram tratados no dia 0 e no dia 21. Os animais do grupo controle (G2, n = 6) receberam spray intranasal de solução salina estéril nestes mesmos dias. No entanto, durante o estudo, a equipe responsável pelo manejo diário dos animais não sabia quais eram os animais vacinados até o fim do projeto, a fim de evitar parcialidade no momento da avaliação. Todos os animais foram inoculados com aproximadamente 200 cistos de *T. gondii*, pela via oral, em D77. Foram coletadas amostras de sangue dos animais em D14, D35, D56, D70, D77, D87, D91 e D98, para a realização de RIFI. Todos os animais permaneceram soronegativos até a infecção, dado que a formulação vacinal foi delineada especificamente para estimular a reação imunológica celular. Todos os animais se tornaram soropositivos 10 dias após a inoculação. Embora os títulos sorológicos tenham sido em geral mais altos nos animais vacinados, não houve diferença estatística significativa nos resultados sorológicos entre G1 e G2 (teste t de Student, ao nível de significância de 5%). Sendo assim, foi possível concluir que a os animais vacinados tiveram resposta imunológica humoral semelhante aos controles. O projeto continua em andamento, e uma nova fase de testes deverá ser realizada no próximo ano, com formulação vacinal diferente.

Palavras-chave: Toxoplasmose, vacina, felinos.

UDESC
UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA

fapesc
Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Governo do Estado de Santa Catarina

Seminário de Iniciação Científica
Universidade do Estado de Santa Catarina
32° SIC UDESC

CERTIFICADO

A Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC certifica que

SANDY GABRIELLY RADÜNZ MACHADO

participou do 32º SIC e apresentou o trabalho intitulado " Avaliação da resposta imune de gatos vacinados contra Toxoplasma gondii " de autoria de Sandy Gabrielly Radünz Machado, Larissa Américo, Luisa Barreto Rippel, Rafaela Gil Bossle, Andreas Lazaros Chryssafidis, na forma de apresentação oral, no dia 27 de outubro de 2022, no Centro de Ciências Agroveterinárias CAV/UDESC.

Lages, SC, 08 de novembro de 2022

Prof. André Thaler Neto
Diretor Geral

Prof. Álvaro Luiz Mafra
Diretor de Pesquisa e Pós-Graduação

Código de autenticação: 0e9cc45da9d4e531f813976a703c2bf4
Valide em https://certificados.sistemas.udesc.br/Certificados/MeusCertificados/index?opcao=validar

32° Seminário de Iniciação Científica

Certificado registrado pela DPPG/CAV/UDESC sob Nº 8690.

Código de autenticação: 0e9cc45da9d4e531f813976a703c2bf4
Valide em https://certificados.sistemas.udesc.br/Certificados/MeusCertificados/index?opcao=validar
Gerado em 17/11/2022 15:09:00 por 09493459977

INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA FASCIOLOSE BOVINA NO MUNICÍPIO DE SÃO JOAQUIM[1]

Thayná Fiorentin Moreira[2], Larissa Américo[3], Felipe Rieth de Lima[4], Sandy Gabrielly Radünz Machado[4], Andreas Lazaros Chryssafidis[5].

[1] Vinculado ao projeto "Investigação de gastrópodes vetores de *Fasciola hepatica* no Planalto Catarinense e caracterização geoambiental das áreas infestadas"
[2] Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária – CAV – Bolsista PROBIC
[3] Acadêmica do Curso de Pós-graduação em Ciência Animal – CAV
[4] Acadêmico(a) do Curso de Medicina Veterinária – CAV
[5] Orientador, Departamento de Medicina Veterinária – CAV – andreas.ch@udesc.br

Fasciola hepatica é um trematódeo de grande importância mundial, sendo causador da fasciolose, também conhecida na região do Planalto Serrano como "baratinha do fígado". Esta é uma zoonose que afeta diferentes espécies animais, sendo encontrada com maior frequência em ruminantes. É uma parasitose que acomete fígado e vias biliares, ocasionando grandes prejuízos econômicos à produção animal devido à condenação dos órgãos afetados, redução na produção do rebanho e em alguns casos a morte do animal. Em diversos municípios do Planalto Serrano a pecuária extensionista é consolidada, havendo relatos de animais infectados na região e registros de fígados condenados do Sistema de Inspeção Estadual (SIF), entretanto, no município de São Joaquim a coleta de material fecal para exame coproparasitológico de sedimentação de animais *in vivo* e a busca direta por gastrópodes vetores até então não havia sido realizada.

Foram incluídas no estudo, de maneira aleatória, 4 propriedades rurais da cidade de São Joaquim. No total, foram coletadas 90 amostras fecais de bovinos. Foi também realizada a busca ativa por gastrópodes limneídeos, hospedeiros intermediários do parasito. O número de propriedades e amostras a serem coletadas foi baseado no tamanho do rebanho da cidade, sendo a informação cedida pela Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC). As amostras foram coletadas de modo individual, diretamente da ampola retal, fazendo uso de luvas de palpação. As fezes eram armazenadas em caixa térmica e levadas ao Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (LAPAR-CAV-UDESC), sendo armazenadas a uma temperatura de 4°C para análise em no máximo 72 h. Para o diagnóstico de fasciolose bovina, foi utilizado o método coproparasitológico de sedimentação e a leitura dos resultados foi feita com estereomicroscópio. Na sedimentação, eram processadas 6 g de fezes de cada animal, que foram homogenizadas em uma proveta de polietileno graduada (250 mL), com 84 mL de água. O conteúdo foi filtrado em peneira comum e transferido para um frasco cônico de 500 mL, sendo o volume ajustado para 400 mL com água. Após 10 min, o sobrenadante foi descartado de forma cuidadosa, restando aproximadamente 50 mL no frasco com o sedimento, e o processo foi repetido mais duas vezes para se obter uma amostra limpa. Ao final, a amostra foi deixada em repouso por mais 5min e o sobrenadante removido com o auxílio de uma pipeta de Pasteur descartável. Cada amostra foi distribuída em duas placas de Petri, sendo coradas com três gotas de Azul de Metileno 1% para melhor visualização dos ovos do trematódeo sob estereomicroscópio.

Todas as amostras analisadas das propriedades de São Joaquim obtiveram o resultado negativo, e nenhum gastrópode foi achado durante as buscas ativas realizadas. Estes resultados compuseram o projeto de pesquisa sobre a distribuição da fasciolose bovina no Planalto Serrano, tendo sido publicado em revista especializada (Frontiers in Veterinary Science). Embora a fasciolose dificilmente gere óbitos na espécie bovina, a doença gera importante impacto à

bovinocultura, pelas perdas produtivas e condenação hepática nos frigoríficos. Esta linha de pesquisa continua em andamento, onde estão sendo investigados os fatores epidemiológicos que levaram à introdução desta parasitose no Planalto Serrano, sendo São Joaquim uma peça fundamental para esta análise, dada a baixa prevalência neste município. A avaliação comparativa entre São Joaquim e municípios com alta prevalência, como Painel, fornecerá informações fundamentais sobre as diferenças no manejo dos bovinos, o que possibilitará disseminar dados importantes que podem evitar a infecção dos animais, as perdas econômicas decorrentes da fasciolose, além de possíveis casos zoonóticos na região.

Palavras-chave: Fasciolose. Planalto Serrano. Sedimentação.

UDESC
UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA

fapesc
Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Governo do Estado de Santa Catarina

Seminário de Iniciação Científica
Universidade do Estado de Santa Catarina
32° SIC UDESC

CERTIFICADO

A Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC certifica que

SANDY GABRIELLY RADÜNZ MACHADO

participou do 32º SIC e apresentou o trabalho intitulado " Investigação epidemiológica da fasciolose bovina no município de São Joaquim " de autoria de Thayná Fiorentin Moreira, Larissa Américo, Felipe Rieth de Lima, Sandy Gabrielly Radünz Machado, Andreas Lazaros Chryssafidis, na forma de apresentação oral, no dia 27 de outubro de 2022, no Centro de Ciências Agroveterinárias CAV/UDESC.

Lages, SC, 08 de novembro de 2022

Prof. André Thaler Neto
Diretor Geral

Prof. Álvaro Luiz Mafra
Diretor de Pesquisa e Pós-Graduação

Código de autenticação: 601b66d01f7eed9fba4a9e3cf5f9ab84
Valide em https://certificados.sistemas.udesc.br/Certificados/MeusCertificados/index?opcao=validar

32° Seminário de Iniciação Científica

Certificado registrado pela DPPG/CAV/UDESC sob Nº 8758.

Código de autenticação: 601b66d01f7eed9fba4a9e3cf5f9ab84
Valide em https://certificados.sistemas.udesc.br/Certificados/MeusCertificados/index?opcao=validar
Gerado em 17/11/2022 14:47:31 por 09493459977

INVESTIGAÇÃO DE GASTRÓPODES VETORES DE *Fasciola hepatica* NO MUNICÍPIO DE PAINEL[1]

Marieli Ayumi Kaibara[2], Andreas Lazaros Chryssafidis[3], Larissa Américo[4], Ana Luiza Bilck Girardi[5], Heloísa Ottequir[5], Gustavo Néri Neuhaus[5], Larissa Godeski Moreira[5], Maria Eduarda Eltermann Albano[5]

[1] Vinculado ao projeto "Investigação de gastrópodes vetores de *Fasciola hepatica* no Planalto Catarinense e caracterização geoambiental das áreas infestadas"
[2] Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária – CAV-UDESC – Bolsista voluntária PIVIC/UDESC
[3] Orientador, Departamento de Medicina Veterinária – CAV-UDESC – andreas.ch@udesc.br
[4] Mestranda do Curso de Pós Graduação em Ciência Animal – CAV-UDESC
[5] Acadêmica (o) do Curso de Medicina Veterinária – CAV-UDESC

O agronegócio é uma das bases da economia brasileira, visto que em 2018 foi responsável por 20,8% do PIB nacional. Deste setor, a pecuária bovina, além de ter um papel importante na economia, é fundamental na subsistência de pequenas propriedades. O Estado de Santa Catarina é destaque neste segmento, sendo que, segundo dados do IBGE de 2017, a pecuária bovina está presente em pelo menos 85% das propriedades rurais catarinenses. A região do Planalto Serrano compreende 18 municípios e tem grande relevância no que diz respeito à produção bovina catarinense, pois, graças às suas características edafoclimáticas, apresenta um grande potencial produtivo. Porém, a região ainda possui baixos índices produtivos decorrentes da ineficiente nutrição, problemas sanitários, manejo inadequado e baixo potencial genético dos animais. Dentre os problemas sanitários em animais de produção, os parasitos têm grande importância, pois interferem diretamente nos índices produtivos e causam perdas econômicas, pela redução do ganho de peso e produção de leite, custo de tratamentos e condenação de vísceras em frigoríficos. Uma das parasitoses mais relevantes neste contexto é a fasciolose, doença causada pela *Fasciola hepatica*, verme trematódeo de ampla distribuição mundial, que acomete o fígado e vias biliares de ruminantes e outras espécies de mamíferos, incluindo o ser humano. Este é um parasito digenético, ou seja, necessita de hospedeiro intermediário para completar o seu ciclo, sendo estes os caramujos da família Lymnaeidae, que se desenvolvem em meio aquático e em lugares com temperaturas amenas. Os vermes adultos de *F. hepatica* parasitam os ductos biliares do fígado dos animais infectados, onde liberam os ovos que, através do ducto colédoco, alcançam o intestino. Assim, os ovos são eliminados com as fezes para o ambiente, desenvolvem-se e eclodem no meio aquático, liberando as larvas denominadas miracídios. Após a eclosão, os miracídios buscam os caramujos limneídeos, penetram nos gastrópodes e sofrem alterações sequenciais (esporocisto, rédias) até formarem as cercárias, que são liberadas na água e nadam até a vegetação, onde sofrem o processo de encistamento e se tornam metacercárias, forma infectante do parasito. O hospedeiro vertebrado se infecta ingerindo as metacercárias na vegetação. Ao passarem pelo estômago, ou abomaso, as fascíolas jovens se desencistam e penetram no duodeno, migrando através da parede intestinal até o parênquima hepático, onde permanecem por algumas semanas até atingirem os ductos biliares e evoluírem à forma adulta. Ao conhecer o ciclo de vida do parasito, entendemos que para a sua ocorrência é necessária a presença do caramujo como vetor, uma vez que, se este não estiver presente no meio ambiente, o parasito não se desenvolve para a forma infectante. De acordo com informações de órgãos oficiais do Estado de Santa Catarina, a fasciolose seria endêmica somente na região litorânea,

estando a região Serrana livre da enfermidade. Então, o presente trabalho teve como objetivo verificar a presença da *F. hepatica* em Painel, bem como identificar os caramujos limneídeos neste local.

Para tal, foram coletadas amostras fecais de bovinos e ovinos em 26 propriedades, sendo 414 amostras de bovinos e 39 de ovinos. As coletas fecais foram realizadas diretamente da ampola retal dos animais, de forma individual, sendo utilizadas luvas de palpação e de procedimento. As amostras foram armazenadas em sacos plásticos devidamente identificados, acondicionadas em caixa térmica e transportadas ao Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias (LAPAR-CAV-UDESC), onde foram mantidas sob refrigeração até o processamento. As amostras foram submetidas à análise coproparasitológica qualitativa por sedimentação, para verificar a presença dos ovos de *F. hepatica*. Para tanto, foram colocados 84 ml de água em uma coluna graduada e o volume foi completado até 90 ml com a amostra fecal, correspondendo a 6 g de fezes. Com um bastão de vidro, o material foi homogeneizado e despejado sobre uma peneira colocada em um cálice de vidro graduado de 500 ml. Então, completou-se o cálice com água até aproximadamente 400 ml, deixando o material repousar por 10 minutos. Após este tempo, descartou-se o sobrenadante e o processo foi repetido. Por fim, foram adicionadas 5 gotas de azul metileno ao sedimento, que foi homogeneizado e transferido para duas placas de Petri. A leitura das amostras foi realizada em um estereomicroscópico. Nas propriedades em que foram identificados animais positivos para *F. hepatica*, foi realizada busca ativa pelos caramujos aquáticos em áreas de banhado, açudes e riachos. Os gastrópodes coletados foram acondicionados em potes com tampa, devidamente identificados e transportados em uma caixa térmica até o LAPAR, onde ficaram armazenados em microtubos com álcool 70% e refrigerados, para posterior análise e identificação.

Das propriedades analisadas, 57,7% (15/26) apresentavam animais infectados por *F. hepatica*, com prevalência de 24,9% (103/414) bovinos positivos e nenhum ovino positivo. Foi realizada busca ativa por caramujos em quatro propriedades positivas, sendo coletados em duas delas 27 caramujos que estavam localizados em troncos de árvores e grimpas de araucária presentes em riachos limpos. Todos os caramujos encontrados eram de uma mesma espécie, mas na análise morfológica preliminar não foi possível identificá-la. O material genético será extraído e a identificação será realizada por sequenciamento. Também será pesquisada a presença do DNA do parasito nestes caramujos.

Com esta investigação, pode-se concluir que *F. hepatica* infecta bovinos naturalmente no município de Painel, sendo disseminada por caramujos da família Lymnaeidae presentes na Serra Catarinense. Com as informações resultantes deste projeto será possível delinear ações que auxiliarão os produtores rurais a reduzirem as perdas produtivas e econômicas relacionadas à fasciolose, otimizando a produtividade e o retorno financeiro. Além disto, será possível atuar na saúde pública, conscientizando a população e aplicando medidas de controle para prevenir o surgimento de casos humanos, que já foram detectados em outra região de Santa Catarina.

Palavras-chave: Fasciolose. Ruminantes. Lymnaeidae.

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA RESISTÊNCIA AO NITROXINIL EM ISOLADOS DE *Fasciola hepatica* OBTIDOS DE RUMINANTES DO ESTADO DE SANTA CATARINA[1]

Vitória Maria Petronilha Martins[2], Andreas Lazaros Chryssafidis[3], Paula Maciel Arruda[4], Larissa Américo[4], Felipe Rieth de Lima[5], Luna Silvestri Souto[5], Sandy Gabrielly Radunz Machado[5].

[1] Vinculado ao projeto "Avaliação in vitro de resistência a anti-helmínticos de isolados de *Fasciola hepatica* obtidos de ruminantes do Estado de Santa Catarina"
[2] Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária – CAV-UDESC – Voluntária PIVIC/UDESC
[3] Orientador, Departamento de Medicina Veterinária – CAV-UDESC – andreas.ch@udesc.br
[4] Mestranda do Curso de Pós-graduação em Ciência Animal – CAV-UDESC
[5] Acadêmica (o) do Curso de Medicina Veterinária – CAV-UDESC

Fasciola hepatica, conhecida na região do Planalto Serrano como "baratinha do fígado", é o trematódeo causador da fasciolose, uma parasitose encontrada com maior frequência em bovinos, mas que também pode afetar outros mamíferos, incluindo os humanos. Na produção animal é responsável por perdas econômicas devido à condenação do fígado, redução da produção de carne, leite, lã, além dos custos com tratamento. O tratamento pode ser feito utilizando benzimidazóis, porém a resistência do parasito ao Triclabendazol vem sendo registrada desde 1990 em diversos países, incluindo o Brasil. O uso do Nitroxinil, Albendazol e Closantel tem sido uma alternativa a essa crescente resistência, no entanto com a intensificação de seu uso faz se necessário mais estudos a respeito do surgimento de resistência a estes fármacos, como o presente estudo que tem como foco a avaliação do Nitroxinil *in vitro*, pois um diagnóstico precoce de resistência é essencial para se estabelecer programas de controle parasitário.

O fármaco do presente estudo é quimicamente denominado de 4-Hydroxy-3-lodo-5-NitrobenOnitrile e faz parte do grupo químico dos substitutos fenólicos. Diferentemente do Albendazol e Closantel ele é considerado específico para fasciolose, mas pode ser utilizado para tratar outras parasitoses. Sua concentração recomendada é de 34%, passa por metabolização hepática e excreção renal. Por possuir uma elevada taxa de absorção, seus resíduos podem ser encontrados na carne do animal, sendo necessário um tempo mínimo de 30 dias entre a administração e o abate. Seu mecanismo de ação pelo desacoplamento da fosforilação oxidativa, desta maneira, interferindo na obtenção de energia do parasito, matando-os por inanição.

A avaliação da ação do Nitroxinil *in vitro* é uma alternativa aos testes *in vivo*, que possuem maior custo, pois estudos recentes demonstraram uma correlação positiva entre a resistência verificada em ovos com a resistência dos vermes adultos *in vivo*. A eficácia do tratamento é analisada através da atividade ovicida do fármaco, por meio da seguinte equação:

$$Atividade\ ovicida\ = \frac{(\%ovoscontrole - \%ovostratados)}{\%ovoscontrole} * 100.$$

Desta forma, a avaliação de eficácia do fármaco, e consequente avaliação de resistência do isolado, foi feita com ovos de *F. hepatica* presentes na vesícula biliar de animais naturalmente infectados. Para a coleta deste material foram feitas visitas ao Frigorífico Fox, em Lages, Santa Catarina. Após o abate dos animais é feita a inspeção da carcaça, sendo visualizadas as lesões características e muitas vezes os vermes ainda presentes. Os animais parasitados têm o fígado descartado. As vesículas biliares dos animais positivos foram levadas ao Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias (LAPAR-CAV-UDESC) para processamento. As biles

Apoio:

coletadas eram identificadas, seguindo uma ordem numérica crescente. O processamento inicia-se com a diluição da bile em frascos de sedimentação, para se utilizar a amostra inteira proveniente de um animal ela foi fracionada em mais de um frasco, colocando 100 ml de bile e 400 ml de água em cada um, aguardando por 10 min a sedimentação dos ovos. Após cuidadoso descarte do sobrenadante, o processo foi repetido, e o sedimento restante foi transferido para tubos plásticos de 50 ml, e centrifugados a 1500 rpm por 10 min. Ao final, os sedimentos provenientes de uma mesma amostra foram reunidos em um tubo único de 50 ml, para nova centrifugação, por 4 min à 1500 rpm, sendo o sobrenadante cuidadosamente descartado. Com essa amostra final, adicionou-se água destilada até completar 5 ml e, com uma micropipeta, foram analisadas três alíquotas de 100 µl para a contagem de ovos, sob o microscópio óptico. A concentração de ovos foi calculada através da média aritmética das alíquotas, extrapolada para 5 ml. Para o teste de resistência do fármaco *in vitro*, são necessários no mínimo 400 ovos, que são incubados, por 21 dias, em potes plásticos descartáveis contendo o Nitroxinil (Nitromic®). A dosagem do fármaco foi calculada com base na indicação da bula, sendo de 2 ml / 50 kg, proporcionalmente ao volume final de 40 ml, portanto utilizou-se 1,6 µl do fármaco. A incubação dos ovos de cada amostra foi realizada em triplicata, além do grupo controle em que se utiliza apenas água destilada. Os potes foram colocados em estufa a 37 ºC e, após o período de incubação de 21 dias, foram retirados e expostos a luz por 24 h, para induzir a eclosão dos ovos. Após esse período, as amostras são avaliadas ao microscópio, sendo avaliados 100 ovos, que são classificados em: ovos eclodidos, ovos embrionados e ovos não embrionados. Foram analisadas 17 amostras no total. A partir dos resultados verificou-se quatro isolados com sugestiva resistência, com baixa atividade ovicida (Tabela 1). As 13 amostras restantes apresentaram uma boa média de atividade ovicida, podendo haver indicação do Nitroxinil para o tratamento dos animais infectados. No entanto, o estudo reforça a importância dos testes de resistência para o estabelecimento do protocolo de controle parasitário mais adequado para cada propriedade.

Tabela 1. Avaliação *in vitro* de isolados de *Fasciola hepatica* resistentes ao Nitromic® em comparação à média de 13 amostras não resistentes.

		Resultados (%)			
Nº da amostra		**Não embrionado**	**Embrionado**	**Eclodido**	**Atividade ovicida**
1	**Nitromic 34%**	14,30	21	64,66	2,65
	Controle	12	22,33	65,66	
2	**Nitromic 34%**	3	20,33	76,60	-0,96
	Controle	4	22	74	
3	**Nitromic 34%**	38	18,60	39,60	23,35
	Controle	24	30,33	45,6	
4	**Nitromic 34%**	16	25,60	58,33	23,35
	Controle	2,33	22	75,66	
□13	**Nitromic 34%**	97,34	0,99	1,68	96,90
	Controle	10,04	39,44	46,73	

Palavras-chave: Fasciolose. Resistência. Nitroxinil.

UDESC
UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA

CNPq
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

fapesc
Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina

GOVERNO DE SANTA CATARINA

Seminário de Iniciação Científica
Universidade do Estado de Santa Catarina
31° SIC UDESC

CERTIFICADO

A Universidade do Estado de Santa Catarina certifica que

VITÓRIA MARIA PETRONILHA MARTINS

participou do 31º SIC e apresentou o trabalho AVALIAÇÃO IN VITRO DA RESISTÊNCIA AO NITROXINIL EM ISOLADOS DE Fasciola hepatica OBTIDOS DE RUMINANTES DO ESTADO DE SANTA CATARINA de autoria de Vitória Maria Petronilha Martins Andreas Lazaros Chryssafidis Paula Maciel Arruda, Larissa Américo, Felipe Rieth de Lima, Luna Silvestri Souto, Sandy Gabrielly Radunz Machado , na forma resumo e apresentação em vídeo durante o mês de novembro de 2021, em evento online organizado pelo Centro de Ciências Agroveterinárias - CAV, na cidade de Lages, SC.

Lages, SC, 25 de novembro de 2021

Prof. Adelar Mantovani

Diretor de Pesquisa e Pós-Graduação

Código de autenticação: 45e3a55c4ec7d1b41b0cd157cac37def
Valide em https://certificados.sistemas.udesc.br/Certificados/MeusCertificados/index?opcao=validar

31º Seminário de Iniciação Científica

Certificado registrado pela DPPG/CAV/UDESC sob o nº 7800

Código de autenticação: 45e3a55c4ec7d1b41b0cd157cac37def
Valide em https://certificados.sistemas.udesc.br/Certificados/MeusCertificados/index?opcao=validar
Gerado em 24/01/2022 21:53:24 por 47383685830

UDESC
UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA

CNPq
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

fapesc
Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina

GOVERNO DE SANTA CATARINA

Seminário de Iniciação Científica
Universidade do Estado de Santa Catarina
30° SIC UDESC

CERTIFICADO

Certificamos que

Marieli Ayumi Kaibara

participou do 30º Seminário de Iniciação Científica e apresentou o trabalho intitulado Investigação de gastrópodes vetores de Fasciola hepatica no município de Painelno município de Painel, de autoria de Marieli A. Kaibara, Andreas L. Chryssafidis, Larissa Américo, Ana L.B. Girardi, Heloísa Ottequir, Gustavo N. Neuhaus, Larissa G. Moreira, Maria E.E. Albano na forma de apresentação em vídeo, no evento online que aconteceu no mês de novembro de 2020.

Lages, 27 de Novembro de 2020

Adelar Mantovani
Diretor de Pesquisa e Pós-graduação
CAV/UDESC

Código de autenticação: c83ece60 6efd4f02 604af916 06db4f19 - Valide em http://eventos.udesc.br/certificados

30º Seminário de Iniciação Científica

Registro DPPG/CAV/UDESC - 7695

Código de autenticação: c83ece60 6efd4f02 604af916 06db4f19 - Valide em http://eventos.udesc.br/certificados

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA RESISTÊNCIA A TRICLABENDAZOLE EM ISOLADOS DE *Fasciola hepatica* OBTIDOS DE BOVINOS DO ESTADO DE SANTA CATARINA[1]

Larissa Godeski Moreira[2], Andreas Lazaros Chryssafidis[3], Paula Maciel Arruda[4], Larissa Américo[4], Ângela Woloszyn Brum de Oliveira[5], Felipe Rieth de Lima[5], Gustavo Néri Neuhaus[5], Luna Silvestri Souto[5], Sandy Gabrielly Radünz Machado[5], Vitória Maria Petronilha Martins[5].

[1] Vinculado ao projeto "Avaliação in vitro de resistência a triclabendazole de isolados de Fasciola hepatica obtidos de ruminantes do Estado de Santa Catarina"

[2]Acadêmico (a) do Curso de Medicina Veterinária – CAV-UDESC– Bolsista PROBIC/UDESC
[3] Orientador, Departamento de Parasitologia – CAV-UDESC – andreas.ch@udesc.br
[4] Mestranda em Ciência Animal – CAV-UDESC
[5] Acadêmicos do Curso de Graduação em Medicina Veterinária – CAV-UDESC

A fasciolose é uma das parasitoses de maior importância mundial, por seu impacto na saúde animal e humana. O agente etiológico no Brasil é *Fasciola hepatica*, um trematódeo parasito de ductos biliares de diferentes espécies de mamíferos, principalmente de ruminantes. Causa grande perda econômica, muitas vezes imperceptíveis aos produtores, pois a maior parte dos casos ocorre de forma subclínica. Com o aumento na utilização de fármacos anti-helmínticos, a resistência parasitária se tornou um problema para o controle das verminoses. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a resistência parasitária ao triclabendazole, fármaco fasciolicida mais utilizado no mundo, por meio de um protocolo *in vitro* que utiliza ovos coletados de vesículas biliares de bovinos naturalmente infectados por *F. hepatica*. No decorrer do estudo, foram realizadas visitas ao frigorífico Fox, localizado na cidade de Lages, na região do Planalto Serrano de Santa Catarina. Durante o abate, quando eram detectados animais com o fígado comprometido pela presença do trematódeo, era feita a coleta da vesícula biliar em um recipiente e posteriormente, encaminhada para o laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias (LAPAR-CAV-UDESC). Para a remoção da bile e recuperação dos ovos, utilizava-se a diluição na proporção de 1:5, distribuindo-se a bile em frascos cônicos e preenchendo-os com água. Após 10 minutos, era realizado o descarte do sobrenadante, em seguida, repetia-se o processo. Após a retirada do último sobrenadante, eram deixados aproximadamente 20 ml em cada frasco, e o conteúdo era transferido para tubos de centrifugação de 50 ml. Depois de calibrados com o mesmo peso, realizava-se a centrifugação por 10 min a 1500 rpm, com o descarte do sobrenadante. Os sedimentos eram reunidos em um único tubo com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. A amostra era novamente centrifugada, por 4 min a 1500 rpm, o sobrenadante cuidadosamente descartado, e o pellet ressuspendido em água destilada até completar 5 ml. Para a quantificação dos ovos, três alíquotas de 100 µl eram analisadas, sendo calculada a média aritmética e o número extrapolado para os 5 mL de amostra. Para a análise de eficácia do triclabendazole, e eventual resistência parasitária, eram preparadas triplicatas com no mínimo 400 ovos em cada, bem como triplicata do controle não tratado, em volume final de 40 ml por frasco. O tratamento era realizado utilizando a dose terapêutica para bovinos, de acordo com as recomendações do fabricante do produto comercial (Saguaymic Plus, Microsules), sendo 12 mg/kg. Considerando-se o volume final e a relação aproximada de 1.000 g/L, 4,8 µl de triclabendazole eram transferidos com uma micropipeta para cada frasco contendo os ovos, que eram então colocados diretamente na estufa a 27°C por 28 dias. Ao final do período de

incubação, com o auxílio de um estereomicroscópio foi realizada a análise do desenvolvimento dos ovos de *F. hepatica* classificando como não embrionados, embrionados ou eclodidos nas triplicatas dos frascos tratados e dos controles. Foram contados ao total, 100 ovos em cada recipiente e então realizada a média aritmética entre os 3 resultados de cada grupo, sendo a eficácia calculada comparando-se a redução da viabilidade dos ovos tratados (tabela 1) com os grupos controle (tabela 2), considerando-se resistente qualquer amostra com redução de viabilidade abaixo de 95%. De acordo com os resultados obtidos, foi possível concluir que nenhum dos isolados analisados apresentou resistência ao fármaco utilizado. O estabelecimento deste protocolo de teste de eficácia no LAPAR-CAV-UDESC é fundamental para auxiliar os produtores de gado bovino da região e do Estado de Santa Catarina no controle da fasciolose bovina.

Tabela 1. *Desenvolvimento dos ovos de Fasciola hepatica coletados de vesículas biliares de dez bovinos naturalmente infectados, sob tratamento com fármaco a base de triclabendazole.*

Nº Animal	Ovos não embrionados (%)	Ovos embrionados (%)	Ovos eclodidos (%)
1	100	0	0
2	96,7	1,3	2
3	97,7	0,3	2
4	97	2	1
5	99	0	1
6	96,7	1	2,3
7	100	0	0
8	97,7	0,3	2
9	99,7	0	0,3
10	99,7	0	0,3

Tabela 2. *Grupo controle do desenvolvimento dos ovos de Fasciola hepatica coletados de vesículas biliares de dez bovinos naturalmente infectados.*

Nº Animal	Ovos não embrionados (%)	Ovos embrionados (%)	Ovos eclodidos (%)
1	8,7	31,7	59,6
2	6	44,5	49,5
3	2	63	35
4	7	69	24
5	3,3	43,3	53,4
6	1,7	31,3	67
7	11,3	29,3	59,4
8	1	44	55
9	22	48,7	29,3
10	12,3	38,3	49,4

Palavras-chave: Resistência. Fasciolose. Bovinos.

Apoio: CNPq Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; fapesc Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina; GOVERNO DE SANTA CATARINA

UDESC
UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA

CNPq
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

fapesc
Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina

GOVERNO DE SANTA CATARINA

Seminário de Iniciação Científica
Universidade do Estado de Santa Catarina
31° SIC UDESC

CERTIFICADO

A Universidade do Estado de Santa Catarina certifica que

LARISSA GODESKI MOREIRA

participou do 31º SIC e apresentou o trabalho AVALIAÇÃO IN VITRO DA RESISTÊNCIA A TRICLABENDAZOLE EM ISOLADOS DE Fasciola hepatica OBTIDOS DE BOVINOS DO ESTADO DE SANTA CATARINA de autoria de Larissa Godeski Moreira Andreas Lazaros Chryssafidis Paula M. Arruda, Larissa Américo, Ângela W. B. de Oliveira, Felipe R. de Lima, Gustavo N. Neuhaus, Luna S. Souto, Sandy G. R. Machado, Vitória M. P. Martins , na forma resumo e apresentação em vídeo durante o mês de novembro de 2021, em evento online organizado pelo Centro de Ciências Agroveterinárias - CAV, na cidade de Lages, SC.

Lages, SC, 25 de novembro de 2021

Prof. Adelar Mantovani

Diretor de Pesquisa e Pós-Graduação

Código de autenticação: fe86916c5af0a9c74a92f618b97b9a14
Valide em https://certificados.sistemas.udesc.br/Certificados/MeusCertificados/index?opcao=validar

31º Seminário de Iniciação Científica

Certificado registrado pela DPPG/CAV/UDESC sob o nº 7799

Código de autenticação: fe86916c5af0a9c74a92f618b97b9a14
Valide em https://certificados.sistemas.udesc.br/Certificados/MeusCertificados/index?opcao=validar
Gerado em 02/02/2022 20:10:41 por 10625957938

INVESTIGAÇÃO DE GASTRÓPODES VETORES DE *Fasciola hepatica* NO MUNICÍPIO DE ANITA GARIBALDI[1]

Marieli Ayumi Kaibara[2], Andreas Lazaros Chryssafidis[3], Larissa Américo[4], Paula Arruda Maciel[4], Larissa Godeski Moreira[5], Ângela Woloszyn Brum de Oliveira[5], Felipe Rieth Lima[5], Gustavo Néri Neuhaus[5], Sandy Gabrielly Radünz Machado[5], Vitória Maria Petronilha Martins[5]

[1] Vinculado ao projeto "Investigação de gastrópodes vetores de *Fasciola hepatica* no Planalto Catarinense e caracterização geoambiental das áreas infestadas"

[2] Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária – CAV-UDESC – Bolsista de Iniciação Científica PROBIC/UDESC
[3] Orientador, Departamento de Medicina Veterinária – CAV-UDESC – andreas.ch@udesc.br
[4] Mestranda do Curso de Pós-graduação em Ciência Animal – CAV-UDESC
[5] Acadêmica (o) do Curso de Medicina Veterinária – CAV-UDESC

A pecuária bovina tem grande relevância na economia nacional e na subsistência de pequenas propriedades. O estado de Santa Catarina é destaque neste segmento, sendo que, de acordo com dados do IBGE de 2017, a pecuária bovina está presente em pelo menos 85% das propriedades rurais catarinense. A região do planalto serrano compreende 18 municípios e representa 12,71% do rebanho efetivo do Estado. Possui grande potencial produtivo graças às suas características edafoclimáticas, entretanto, ainda apresenta baixos índices produtivos decorrentes da ineficiente nutrição, problemas sanitários, manejo inadequado e baixo potencial genético dos animais. Em relação aos problemas sanitários em animais de produção, pode-se destacar as parasitoses, que levam à redução de índices produtivos como ganho de peso e produção de leite, além de perdas econômicas relacionadas ao custo de tratamento e condenação de vísceras em abatedouros frigoríficos. Neste contexto, uma das parasitoses mais relevantes é a fasciolose, doença causada pelo trematódeo *Fasciola hepatica* que acomete fígado e vias biliares de ruminantes e outras espécies de mamíferos, incluindo o ser humano. Este é um parasita digenético, ou seja, necessita de um hospedeiro intermediário para completar seu ciclo, sendo estes os caramujos da família Lymnaeidae, que se desenvolvem no meio aquático em lugares de temperaturas amenas. Os vermes adultos de *F. hepatica* parasitam os ductos biliares do fígado dos animais infectados, onde liberam os ovos que, posteriormente, alcançam o intestino e são eliminados com as fezes para o ambiente. Então desenvolvem-se e ao entrar em contato com o meio aquático, eclodem e liberam larvas denominadas miracídios. Após a eclosão, estes miracídios buscam os caramujos limneídeos, penetram nestes gastrópodes e sofrem alterações sequenciais (esporocisto, rédias) até formarem as cercárias. Estas são liberadas na água e nadam até a vegetação, onde sofrem o processo de encistamento e se tornam metacercárias, forma infectante do parasito. Então, o hospedeiro vertebrado se infecta ingerindo as metacercárias na vegetação e, ao passarem pelo estômago ou abomaso, as fascíolas jovens excistam e penetram no duodeno, migram através da parede intestinal até o parênquima hepático, onde permanecem por algumas semanas até atingirem as vias biliares e evoluírem à forma adulta. Dessa forma, devido ao ciclo de vida do parasito, é indispensável a presença do caramujo como vetor da *F. hepatica*, uma vez que, se este não estiver presente no meio ambiente, o parasito não se desenvolve para a forma infectante. De acordo com informações de órgãos oficiais do Estado de Santa Catarina, a fasciolose seria endêmica somente na região litorânea, estando a região Serrana livre da enfermidade. No entanto, há registros de animais positivos sendo abatidos no Planalto Serrano Catarinense, porém sem confirmação de contaminação autóctone. Então, objetivou-se neste trabalho verificar a presença da *F. hepatica* no município de Anita Garibaldi. Para isso, foram coletadas amostras fecais de bovinos diretamente

Apoio:

da ampola retal destes animais, de forma individual, utilizando luvas de palpação. As amostras foram armazenadas em sacos plásticos devidamente identificados, acondicionadas em caixa térmica e transportadas ao Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias (LAPARCAV-UDESC), onde permaneceram sob refrigeração até o seu processamento. No laboratório, as amostras foram submetidas à análise coproparasitológica qualitativa por sedimentação adaptada, a fim de verificar a presença dos ovos de *F. hepatica*. Esta técnica utilizou o dobro da amostra fecal do protocolo original, objetivando aumentar a sensibilidade do diagnóstico. Então, adicionou-se 84 mL de água em uma coluna graduada e completou-o com amostra fecal até atingir o volume de 90 mL, correspondendo a 6 g de fezes. Este material foi homogeneizado, com um bastão de vidro, e despejado sobre uma peneira em um cálice graduado de 500 mL. Posteriormente, completou-se o cálice com água até aproximadamente 400 mL, deixando o material repousar por 10 minutos e, após este tempo, descartou-se o sobrenadante e repetiu-se o processo. Por fim, foram adicionadas aproximadamente 5 gotas de azul metileno ao sedimento, o qual foi homogeneizado e transferido para duas placas de Petri e, posteriormente, foi realizada a leitura das amostras em um estereomicroscópico. Durante o período do projeto, foram coletadas e analisadas 216 amostras, provenientes de 14 propriedades do município de Anita Garibaldi. Destas, nenhum animal era positivo para *F. hepatica*. Além disso, foi realizada uma busca ativa por caramujos nas áreas alagadiças de uma das propriedades, porém, não se encontrou nenhum gastrópode vetor. No entanto, é de extrema relevância ampliar a pesquisa de caramujos neste local. Com esta investigação, pode-se concluir que, até o presente momento, a *F. hepatica* não infecta bovinos naturalmente no município de Anita Garibaldi, ao menos nas áreas amostradas. Entretanto, apesar de ausente, é de suma importância conscientizar os produtores rurais sobre os prejuízos que a fasciolose acarreta no rebanho bovino, bem como aplicar medidas preventivas para evitar a contaminação dos animais.

Figura 1. Coleta de amostra fecal diretamente na ampola retal do animal.

Palavras-chave: Fasciolose. Ruminantes. Caramujos.

UDESC
UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA

CNPq
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

fapesc
Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina

GOVERNO DE SANTA CATARINA

Seminário de Iniciação Científica
Universidade do Estado de Santa Catarina
31° SIC UDESC

CERTIFICADO

A Universidade do Estado de Santa Catarina certifica que

MARIELI AYUMI KAIBARA

participou do 31º SIC e apresentou o trabalho INVESTIGAÇÃO DE GASTRÓPODES VETORES DE Fasciola hepatica NO MUNICÍPIO DE ANITA GARIBALDI de autoria de Marieli Ayumi Kaibara Andreas Lazaros Chryssafidis Larissa Américo, Paula A. Maciel, Larissa G. Moreira, Ângela W. B. Oliveira, Felipe R. Lima, Gustavo N. Neuhaus, Sandy G. R. Machado, Vitória M. P. Martins , na forma resumo e apresentação em vídeo durante o mês de novembro de 2021, em evento online organizado pelo Centro de Ciências Agroveterinárias - CAV, na cidade de Lages, SC.

Lages, SC, 25 de novembro de 2021

Prof. Adelar Mantovani

Diretor de Pesquisa e Pós-Graduação

Código de autenticação: 65314ac936cfff5bbba7490e6ee51af8
Valide em https://certificados.sistemas.udesc.br/Certificados/MeusCertificados/index?opcao=validar

31º Seminário de Iniciação Científica

Certificado registrado pela DPPG/CAV/UDESC sob o nº 7866

Código de autenticação: 65314ac936cfff5bbba7490e6ee51af8
Valide em https://certificados.sistemas.udesc.br/Certificados/MeusCertificados/index?opcao=validar
Gerado em 24/01/2022 15:27:29 por 06180101906

INVESTIGAÇÃO DE GASTRÓPODES VETORES DE *Fasciola hepatica* NO MUNICÍPIO DE LAGES[1]

Sandy Gabrielly Radünz Machado[2], Andreas Lazaros Chryssafidis[3], Larissa Américo[4], Paula Maciel Arruda[4], Ângela Woloszyn Brum de Oliveira[5]

[1]Vinculada ao projeto "Investigação de gastrópodes vetores de *Fasciola hepatica* no Planalto Catarinense e caracterização geoambiental das áreas infestadas"
[2]Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária – CAV – Bolsista PIVIC/UDESC
[3]Orientador, Departamento de Medicina Veterinária – CAV – andreas.ch@udesc.br
[4]Acadêmica do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – CAV
[5] Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária – CAV

A *Fasciola hepatica* é um trematódeo digenético que parasita os ductos biliares de diversas espécies de animais, incluindo ruminantes e seres humanos. Na bovinocultura gera grandes prejuízos econômicos para os produtores devido à diminuição no ganho de peso, queda na produção de leite e a condenação do fígado em abatedouros. Pode haver uma diminuição de até 25% na produção de animais parasitados. A região do Planalto Serrano do Estado de Santa Catarina detém uma das maiores produções de bovinos do estado e, historicamente, é apontada como livre de fasciolose, apesar de condenações em abatedouros já apontarem animais infectados na região, porém sem a confirmação de autoctonia. A falta de informação contribui para a disseminação da doença na região, pois poucos produtores têm conhecimento da existência desse parasita e, consequentemente, da maneira mais adequada para seu controle e prevenção. Para completar seu ciclo biológico e conseguir se alojar em seu hospedeiro definitivo, estes parasitas precisam passar por caramujos da família Lymnaeidae, que servem como vetores biológicos, albergando a fase larval do helminto. Após o ovo ser liberado no ambiente, através das fezes dos animais parasitados, desenvolve-se dentro dele a primeira fase larval, o miracídio. Com temperatura e umidade ideais o miracídio eclode e, em um ambiente aquático, ele infecta o caramujo. O miracídio se desenvolverá para a fase de esporocisto, gerando rédias, que darão origem às cercárias. A cercária sairá do molusco e encistará na vegetação, formando as metacercárias, que infectarão os hospedeiros definitivos que ingerirem-nas acidentalmente junto com a vegetação. O ciclo se completa quando o parasito chega à fase adulta nos ductos biliares dos hospedeiros. Assim, os caramujos são absolutamente necessários para o ciclo biológico de *F. hepatica*. Por isso, e pela ausência da confirmação de casos autóctones de fasciolose na região, o objetivo deste projeto de pesquisa foi capturar e identificar morfologicamente espécimes de Lymneídeos que vivem na região do município de Lages, bem como identificar propriedades com animais positivos para *F. hepatica* através de análise coproparasitológica por sedimentação. Foram selecionadas diversas propriedades no município e em cada uma eram selecionados, no máximo, 20 animais para a coleta de fezes e posterior análise coproparasitológica no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias (LAPAR-CAV-UDESC) a fim de encontrar ovos deste trematódeo. Eram realizadas, também, buscas ativas em açudes, rios ou áreas alagadiças do local a procura de moluscos potencialmente vetores de *F. hepatica*. Os moluscos coletados foram identificados, armazenados em um caixa térmica e levados ao LAPAR para análise morfológica. As fezes foram coletadas individualmente dos animais. As amostras identificadas eram

Apoio:

armazenadas em caixas térmicas e levadas ao laboratório, onde foram submetidas aos protocolos de análise coproparasitológica qualitativa por sedimentação (ACQLS) e análise coproparasitológica quantitativa por flutuação (ACQTF), para verificar a presença de ovos de *F. hepatica* e de helmintos gastrointestinais de ruminantes. As amostras de bovinos foram colocadas em 84 ml de água em uma proveta até a marcação atingir 90 ml, totalizando 6 g de fezes. Já as amostras de ovinos foram adicionadas a 42 ml de água em uma proveta até a marcação atingir 45 ml, totalizando 3 g de fezes. A solução era homogeneizada e 15 ml eram transferidos a um tubo de centrifugação, sendo o restante colocado em um cálice de sedimentação. O tubo foi centrifugado por 4 minutos a 1.500 rpm, o sobrenadante descartado e foi adicionada solução saturada de NaCl (G.E. = 1,2). As amostras eram lidas em microscópios ópticos no aumento de 10x em câmaras de McMaster. As amostras nos cálices de sedimentação eram diluídas com água até 400 ml, deixadas em repouso por 10 min, quando o sobrenadante era descartado e o processo repetido. O sedimento era transferido a uma placa de Petri, com a adição de 2 a 3 gotas de azul de metileno para facilitar a visualização dos ovos ao estereomicroscópio. Foram visitadas 22 propriedades no total, sendo examinadas 443 amostras, sendo 398 de bovinos e 45 de ovinos. Desse total, 14 bovinos eram positivos para *F. hepatica* (3,5%) em 6 propriedades diferentes (27,3%) e nenhuma amostra de ovino foi positiva. Foram coletados 83 caramujos em áreas alagadiças e açudes. Os espécimes foram encontrados em grimpas de araucária e madeiras que estavam sob a água. Após a análise morfológica, concluiu-se que 3 animais eram da espécie *Pseudosuccinea columela* e os outros 80 tinham características morfológicas do gênero *Potamolithus* spp. Neste estudo foi possível confirmar a presença de animais positivos e a presença do caramujo vetor na região, desta forma, é possível concluir que o município de Lages apresenta casos autóctones de fasciolose bovina.

Palavras-chave: Fasciolose. Zoonose. Malacologia.

UDESC
UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA

CNPq
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

fapesc
Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina

GOVERNO DE SANTA CATARINA

Seminário de Iniciação Científica
Universidade do Estado de Santa Catarina
31° SIC UDESC

CERTIFICADO

A Universidade do Estado de Santa Catarina certifica que

SANDY GABRIELLY RADÜNZ MACHADO

participou do 31º SIC e apresentou o trabalho INVESTIGAÇÃO DE GASTRÓPODES VETORES DE Fasciola hepatica NO MUNICÍPIO DE LAGES de autoria de Sandy Gabrielly Radünz Machado Andreas Lazaros Chryssafidis Larissa Américo, Paula Maciel Arruda, Ângela Woloszyn Brum de Oliveira , na forma resumo e apresentação em vídeo durante o mês de novembro de 2021, em evento online organizado pelo Centro de Ciências Agroveterinárias - CAV, na cidade de Lages, SC.

Lages, SC, 25 de novembro de 2021

Prof. Adelar Mantovani

Diretor de Pesquisa e Pós-Graduação

Código de autenticação: 6111979256a5245fb9470022166068e8
Valide em https://certificados.sistemas.udesc.br/Certificados/MeusCertificados/index?opcao=validar

31º Seminário de Iniciação Científica

Certificado registrado pela DPPG/CAV/UDESC sob o nº 7864

Código de autenticação: 6111979256a5245fb94700221660068e8
Valide em https://certificados.sistemas.udesc.br/Certificados/MeusCertificados/index?opcao=validar
Gerado em 24/01/2022 15:54:31 por 09493459977

INVESTIGAÇÃO DE GASTRÓPODES VETORES DE *Fasciola hepatica* NO MUNICÍPIO DE URUPEMA[1]

Ângela Woloszyn Brum de Oliveira[2], Andreas Lazaros Chryssafidis[3], Larissa Américo[4], Paula Maciel Arruda[4], Vitória Maria Petronilha Martins[5], Sandy Gabrielly Radunz Machado[5], Gustavo Néri Neuhaus[5], Felipe Rieth de Lima[5]

[1] Vinculado ao projeto "Investigação de gastrópodes vetores de *Fasciola hepatica* no Planalto Catarinense e caracterização geoambiental das áreas infestadas"
[2] Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária – CAV-UDESC – Bolsista PROBIC/UDESC
[3] Orientador, Departamento de Medicina Veterinária – CAV-UDESC – andreas.ch@udesc.br
[4] Mestranda do Curso de Pós-graduação em Ciência Animal – CAV-UDESC
[5] Acadêmica (o) do Curso de Medicina Veterinária – CAV-UDESC

Fasciola hepatica é um trematódeo digenético que parasita o fígado e as vias biliares de ruminantes, equinos, suínos, animais selvagens e humanos, causando a fasciolose. É considerada uma doença zoonótica negligenciada mundialmente, além de ser uma parasitose de grande importância na medicina veterinária, devido às elevadas perdas econômicas, principalmente na bovinocultura, com a queda na produção de leite e carne, diminuição no ganho de peso e condenação hepática em frigoríficos.

O ciclo evolutivo da fasciolose requer dois hospedeiros, o intermediário e o definitivo. O hospedeiro definitivo se infecta ao ingerir verduras ou pastagens contaminadas com metacercárias. Após a ingestão da metacercária, o parasito excista dentro do hospedeiro, perfura a parede duodenal, passa pela cavidade abdominal e penetra no parênquima hepático, onde passa um período migrando pelo tecido, até atingir os canais biliares, onde se torna adulto. Os ovos não embrionados são liberados pelo verme adulto e juntamente com fezes atingem o meio ambiente. Quando em contato com a água, os ovos iniciam o desenvolvimento embrionário com a formação de miracídios, que após seu desenvolvimento, eclodem e nadam ativamente, atraídos por quimiotaxia até caramujos limneídeos, seus hospedeiros intermediários. No molusco, o miracídio dá origem aos esporocistos, que originam várias rédeas e que, posteriormente, produzem várias cercárias. As cercárias saem através dos tecidos do caramujo e voltam para o ambiente aquático, onde nadam até um substrato e se fixam, transformando-se em metacercárias, a forma infectante.

A presença do hospedeiro intermediário é indispensável para completar o ciclo da parasitose e o surgimento da doença. No Brasil, algumas espécies de limneídeos foram relacionadas ao ciclo de *F. hepatica*, como: *Pseudosuccinea columella, Galba viatrix, Galba cubensis, Galba truncatula* e *Lymnaea rupestres*. Esses caramujos são geralmente encontrados em locais alagados, em temperaturas entre 10 e 25 graus, com presença de vegetação. O presente trabalho teve como objetivo investigar a presença de *F. hepatica* através da análise coproparasitológica nas propriedades do município de Urupema, bem como a busca ativa pelos gastrópodes vetores.

As amostras fecais foram coletadas individualmente dos ruminantes, diretamente da ampola retal, utilizando luvas de palpação. Cada amostra foi identificada, armazenada e levada ao Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias (LAPAR) para análise coproprasitológica por sedimentação. No laboratório, as amostras fecais foram analisadas com o dobro da quantidade total de protocolos previamente descritos, para aumentar a sensibilidade do diagnóstico, a fim de

Apoio:

avaliar a presença de ovos de *F. hepatica*. A técnica quantitativa por flutuação também foi realizada, para verificar a presença de outras parasitoses gastrintestinais.

Para a análise de sedimentação, primeiramente foi adicionado 84 mL de água em uma coluna graduada e, com o auxílio de uma espátula, adicionou-se o material fecal da amostra até completar o volume de 90 mL, que consiste em aproximadamente 6 g de fezes. Em seguida, a amostra foi homogeneizada com o auxílio de um bastão de vidro e, com uma peneira, o conteúdo foi transferido para um recipiente plástico, onde 15 mL foram utilizados para a técnica de flutuação, enquanto o restante foi despejado em um cálice de vidro graduado de sedimentação. No cálice, adicionou-se água até atingir o volume de 400 mL. Este conteúdo permaneceu em repouso por 10 minutos e, após esse período, foi desprezado o sobrenadante. O processo foi repetido duas vezes, e cinco gotas de azul de metileno foram adicionadas ao sedimento. O material resultante foi dividido em duas placas de Petri, onde estas posteriormente foram analisadas com o auxílio do estereomicroscópio para a verificação da presença de ovos de *F. hepatica*.

Durante a pesquisa, 25 propriedades foram amostradas e 3 delas apresentaram animais positivos, com prevalência de 12% (3/25). Foram coletadas amostras de fezes de 454 animais, sendo 394 de bovinos e 60 de ovinos. Com relação aos bovinos, apenas 1,26% (5/394) dos animais apresentaram positividade para *Fasciola hepatica* e nenhum ovino positivou no exame parasitológico.

A busca ativa por gastrópodes vetores foi realizada nas propriedades em áreas com a presença de água corrente, pedras e vegetação, a fim de identificar a presença do hospedeiro intermediário. Os caramujos coletados foram armazenados em potes plásticos e encaminhados para o LAPAR para análise morfológica. Ao longo do projeto no município, foi verificada a presença de 205 caramujos do gênero *Potamolithus* e 19 caramujos do gênero *Biomphalaria*.

Após a realização desse estudo, foi possível constatar que a fasciolose está presente no município de Urupema, uma vez que foi possível detectar o parasito em animais da região. Com isso, será possível ampliar informações, medidas de controle e prevenção da parasitose aos produtores, para que a doença, se presente, possa ser identificada e tratada de maneira adequada, contribuindo assim de forma direta para aumento da produtividade do município de Urupema, e enfatizando a importância do diagnóstico e prevenção de doenças zoonóticas em prol da saúde única.

Figura 1. *Local de coleta de caramujos*.

Palavras-chave: Fasciolose. Zoonose. Caramujo.

UDESC
UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA

CNPq
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

fapesc
Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina

GOVERNO DE SANTA CATARINA

Seminário de Iniciação Científica
Universidade do Estado de Santa Catarina
31° SIC UDESC

CERTIFICADO

A Universidade do Estado de Santa Catarina certifica que

ÂNGELA WOLOSZYN BRUM DE OLIVEIRA

participou do 31º SIC e apresentou o trabalho INVESTIGAÇÃO DE GASTRÓPODES VETORES DE Fasciola hepatica NO MUNICÍPIO DE URUPEMA de autoria de Ângela Woloszyn Brum de Oliveira Andreas Lazaros Chryssafidis Larissa Américo, Paula Maciel Arruda, Vitória Maria Petronilha Martins, Sandy Gabrielly Radunz Machado, Gustavo Néri Neuhaus, Felipe Rieth de Lima , na forma resumo e apresentação em vídeo durante o mês de novembro de 2021, em evento online organizado pelo Centro de Ciências Agroveterinárias - CAV, na cidade de Lages, SC.

Lages, SC, 25 de novembro de 2021

Prof. Adelar Mantovani

Diretor de Pesquisa e Pós-Graduação

Código de autenticação: 23f5742476b161435e2b70b186933e2a
Valide em https://certificados.sistemas.udesc.br/Certificados/MeusCertificados/index?opcao=validar

31º Seminário de Iniciação Científica

Certificado registrado pela DPPG/CAV/UDESC sob o nº 7865

Código de autenticação: 23f5742476b161435e2b70b186933e2a
Valide em https://certificados.sistemas.udesc.br/Certificados/MeusCertificados/index?opcao=validar
Gerado em 24/01/2022 18:34:58 por 09270660923

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA RESISTÊNCIA A ALBENDAZOLE DE ISOLADOS DE *Fasciola hepatica* OBTIDOS DE RUMINANTES DO ESTADO DE SANTA CATARINA[1]

Ana Luiza Bilck Girardi[2], Andreas Lazaros Chryssafidis[3], Larissa Américo [4], Heloisa Ottequir[5], Larissa Godeski Moreira[5], Maria Eduarda Albano[5], Marieli Ayumi Kaibara[5]

[1] Vinculado ao projeto "Avaliação *in vitro* de resistência a anti-helmínticos de isolados de *Fasciola hepatica* obtidos de ruminantes do Estado de Santa Catarina"
[2] Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária – CAV-UDESC – Bolsista PIBIC/CNPq
[3] Orientador, Departamento de Medicina Veterinária – CAV-UDESC – andreas.ch@udesc.br
[4] Mestranda do Curso de Pós Graduação em Ciência Animal – CAV-UDESC
[5] Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária – CAV-UDESC

A fasciolose é causada pelo trematódeo *Fasciola hepatica*, um parasito encontrado em ruminantes de algumas regiões do Brasil. Além de ser considerada uma zoonose negligenciada, também gera grande prejuízo aos produtores rurais. A resistência anti-helmíntica é um problema crescente no controle da fasciolose. Na região Sul do Brasil, diversas características geoambientais são favoráveis ao desenvolvimento dos caramujos limneídeos, que atuam como hospedeiros intermediários de *F. hepatica*. Uma das drogas mais empregadas para o tratamento de *F. hepatica* pelos produtores da região é o albendazole. Recentemente, foi demonstrada a correlação entre a resistência detectada em ovos tratados *in vitro* com a resistência dos vermes adultos tratados *in vivo*. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi comparar dois protocolos para avaliação *in vitro* da resistência de *F. hepatica* ao albendazole, utilizando um protocolo desenvolvido no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias (LAPAR-CAV-UDESC) e outro descrito em literatura. Para isso, foi utilizado um pool de ovos coletados das vesículas biliares de quatro bovinos abatidos na região do Planalto Serrano, com origem nos municípios de Lages, Painel e Chapecó. Os animais foram verificados na linha de inspeção do Frigorífico Fox, em Lages, Santa Catarina e, após detecção da *F. hepatica* adulta nos ductos biliares, a vesícula biliar era coletada e transportada ao LAPAR para processamento. A bile foi coletada e diluída em frascos de sedimentação, na proporção de 1:10, sedimentando por 10 min, e em seguida o sobrenadante foi descartado. Repetiu-se o procedimento e os sedimentos foram transferidos para tubos de centrifugação de 50 ml, sendo centrifugados por 10 min a 1.500 rpm, descartando-se o sobrenadante. Com uma pipeta de Pasteur, os sedimentos de todos os tubos foram unificados em um único tubo de centrifugação de 50 ml. A amostra foi novamente centrifugada por 4 min a 1500 rpm, sendo o volume total reduzido para 20 ml. A quantificação aproximada de ovos/ml foi realizada através da contagem do total de ovos presentes em três alíquotas de 100 µl diluídas em 1:10, sendo calculada a média aritmética. Da vesícula biliar dos quatro animais, foi recuperado um total de 112 mil ovos de *F. hepatica*. Foram formados oito grupos experimentais, com seis repetições por grupo, utilizando aproximadamente 1000 ovos por repetição e volume total final de 40 ml. Os tratamentos foram: G1 (dose terapêutica correspondente de Endazol 10%), G2 (dose terapêutica correspondente de Meltra 18,75%), G3 (dose terapêutica correspondente de RICOFarm 10 %), G5 (0,5 µmol/ml de Endazol 10%), G6 (0,5 µmol/ml de Meltra 18,75%), e G7 (0,5 µmol/ml de RICOFarm 10 %). Os grupos G4 e G8 eram os controles, tratados somente com água destilada. Nos grupos G1 a G4, a solução de tratamento foi preparada, adicionada aos ovos e

Apoio:

os frascos colocados diretamente na estufa a 27 ^{o}C por 28 dias. Em G5, G6 e G7, os ovos foram colocados em 20 ml de solução com 0,5 µmol/ml de albendazole, concentração descrita em literatura como a melhor para detecção de resistência, sendo incubadas por 12 horas na estufa a 27 ºC. Após incubação, foram adicionados 20 ml de água destilada, e as amostras centrifugadas a 1.500 rpm por 4 min, descartando-se o sobrenadante e repetindo a operação duas vezes para lavagem. Então, foi adicionado água destilada até o volume de 40 ml e as amostras foram transferidas para estufa a 27 ^{o}C, sendo incubadas por 28 dias. Ao final da incubação, os ovos foram examinados sob estereomicroscópio, sendo anotado o estágio de evolução, como não desenvolvidos (conteúdo indissociado) e desenvolvidos (embrionados, com miracídio móvel, ou eclodidos). Os resultados das análises estão apresentados na Tabela 1. Como conclusão do estudo, não houve detecção de resistência ao albendazole nos animais amostrados, e ambos os protocolos apresentaram resultados muito semelhantes, portanto, o protocolo simplificado desenvolvido no LAPAR pode ser utilizado na avaliação *in vitro* da resistência de *F. hepatica* a antiparasitários. Esta análise será aplicada em amostras provenientes de diferentes regiões de Santa Catarina, possibilitando o mapeamento da resistência do parasito no Estado.

Tabela 1. *Desenvolvimento dos ovos de Fasciola hepatica coletados de vesícula biliar de bovinos, incubados por 28 dias na estufa a 27 ºC, sob diferentes tratamentos*

GRUPO	FÁRMACO	TOTAL DE OVOS EXAMINADOS	OVOS NÃO DESENVOLVIDOS *n* (%)	OVOS EMBRIONADOS OU ECLODIDOS *n* (%)
G1	Endazol 10% 4µl / 40ml	600	596 (99,3)	4 (0,7)
G2	Meltra 18,75% 1,2µl / 40ml	600	600 (100,0)	0
G3	RICOFarm 10% 2µl / 40ml	600	600 (100,0)	0
G4	Controle	600	38 (6,3)	562 (93,7)
G5	Endazol 10% 0,5 µmol/ml	542	541 (99,8)	1 (0,2)
G6	Meltra 18,75% 0,5 µmol/ml	600	597 (99,5)	3 (0,5)
G7	RICOFarm 10% 0,5 µmol/ml	600	600 (100,0)	0
G8	Controle	592	0	592 (100,0)

Palavras-chave: Fasciolose. Resistência anti-helmíntica. Controle parasitário.

UDESC
UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA

CNPq
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

fapesc
Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina

GOVERNO DE SANTA CATARINA

Seminário de Iniciação Científica
Universidade do Estado de Santa Catarina
30° SIC UDESC

CERTIFICADO

Certificamos que

Ana Luiza Bilck Girardi

participou do 30º Seminário de Iniciação Científica e apresentou o trabalho intitulado Avaliação in vitro da resistência a albendazole de isolados de Fasciola hepatica obtidos de ruminantes do Estado de Santa Catarina, de autoria de Ana Luiza Bilck Girardi, Andreas Lazaros Chryssafidis, Larissa Américo, Heloisa Ottequir, Larissa Godeski Moreira, Maria Eduarda Albano e Marieli Ayumi Kaibara na forma de apresentação em vídeo, no evento online que aconteceu no mês de novembro de 2020.

Lages, 27 de Novembro de 2020

Adelar Mantovani
Diretor de Pesquisa e Pós-graduação
CAV/UDESC

Código de autenticação: 7b2e6c27 e14e774c 79935fd0 07804ec4 - Valide em http://eventos.udesc.br/certificados

30º Seminário de Iniciação Científica

Registro DPPG/CAV/UDESC - 7686

Código de autenticação: 7b2e6c27 e14e774c 79935fd0 07804ec4 - Valide em http://eventos.udesc.br/certificados

CARACTERIZAÇÃO GEOAMBIENTAL DE PROPRIEDADES POSITIVAS PARA *Fasciola hepatica* NOS MUNICÍPIOS DE LAGES E PAINEL[1]

Heloísa Ottequir[2], Andreas Lazaros Chryssafidis[3], Larissa Américo[4], Ana Luiza Bilck Girardi[5], Larissa Godeski Moreira[5], Gustavo Néri Neuhaus[5], Maria Eduarda Eltermann Albano[5], Marieli Ayumi Kaibara[5]

[1] Vinculado ao projeto "Investigação de gastrópodes vetores de *Fasciola hepatica* no Planalto Catarinense e caracterização geoambiental das áreas infestadas"
[2] Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária – CAV-UDESC – Bolsista voluntária PIVIC/UDESC
[3] Orientador, Departamento de Medicina Veterinária – CAV-UDESC – andreas.ch@udesc.br
[4] Mestranda do Curso de Pós Graduação em Ciência Animal – CAV-UDESC
[5] Acadêmica (o) do Curso de Medicina Veterinária – CAV-UDESC

A fasciolose é uma doença zoonótica causada pelo trematódeo *Fasciola hepatica*, popularmente conhecida como "baratinha do fígado", que acomete diferentes espécies de mamíferos, principalmente ruminantes. O parasito depende de seus hospedeiros intermediários, caramujos da família Lymnaeidae, para completar seu ciclo biológico. O trematódeo adulto parasita os ductos biliares do fígado de seus hospedeiros definitivos, o que causa alterações significativas no órgão. Em decorrência deste parasitismo, ocorrem quedas nos índices de produtividade dos animais infectados, além da condenação de fígados em abatedouros, levando a grandes perdas econômicas. Foi realizado um estudo nos municípios do Planalto Catarinense de Lages e Painel, entre os meses de agosto de 2019 e agosto de 2020, buscando detectar propriedades com animais positivos para *F. hepatica*, e caracterizá-las geoambientalmente. Fizeram parte do projeto 42 fazendas, sendo examinados um total 696 bovinos e 51 ovinos. Amostras fecais individuais destes animais foram coletadas para análise coproparasitológica no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias (LAPAR-CAV-UDESC). Também foram coletados dados geográficos e de manejo das fazendas através da aplicação de um questionário, além da verificação da localização exata (latitude e longitude) das propriedades através do sistema de posicionamento por satélite (GPS).

Das propriedades analisadas, 47,62% (20/42) apresentavam animais infectados, com prevalência geral de 17,67% (132/747) de animais positivos para a presença do trematódeo. Em Lages, 31,25% (5/16) das propriedades foram positivas, enquanto 57,69% (15/26) das propriedades de Painel tinham animais infectados. No questionário aplicado aos proprietários das fazendas, em 100% das propriedades havia a presença de açudes, banhados, rios, riachos, nascentes ou áreas alagadiças, todas sem proteção quanto ao acesso dos animais a estas áreas. A vegetação em ambos os municípios é equivalente, com ampla presença de araucárias. No levantamento dos dados deste estudo, diversos fatores entre os municípios estudados se assemelham, como condições climáticas (umidade, pluviosidade, temperatura), altitude e vegetação característica da região do Planalto Catarinense.

Sobre os aspectos epidemiológicos desta parasitose, sabe-se que sua ocorrência está associada a características geoambientais, como a ocorrência de alta umidade e áreas alagadiças necessárias ao desenvolvimento dos caramujos limneídeos. Sobre as características geoambientais dos municípios estudados, Lages e Painel possuem vegetação conhecida como Floresta Ombrófila Mista ou Floresta de Araucárias, tendo o clima úmido e moderadamente

Apoio:

quente, com temperaturas anuais de 18°C. De acordo com a classificação climática de Köppen-Geiger, o clima das regiões de Lages e Painel são consideradas Cfb – clima temperado, com verão ameno. Ambos os municípios possuem altos índices de pluviosidade ao longo do ano (Tabela 1), tendo Lages uma pluviosidade média anual de 1.441 mm, e Painel, 1.543 mm. Esta variável é bastante abordada em diversos estudos de fasciolose em todo o mundo, visto que índices pluviométricos elevados proporcionam um adequado ambiente ao desenvolvimento do hospedeiro intermediário, indispensável para que o ciclo da doença seja completado.

A altitude também apresenta grande importância para o mapeamento de regiões positivas para a ocorrência de fasciolose, visto que regiões de menor altitude são consideradas mais propícias ao aparecimento e desenvolvimento da *F. hepatica* e seu hospedeiro intermediário, por favorecer o acúmulo de água em terrenos mais planos e menos montanhosos, de elevações mais baixas. Porém, estes dados discordam dos achados no presente estudo, dado que Lages e Painel apresentam altas altitudes, onde Lages possui 937 metros de altitude e Painel 1.228 metros de altitude, e a prevalência da fasciolose nos bovinos analisados foi de 10,28% (29/282) em Lages e 24,88% (103/414) em Painel. Nenhum ovino foi positivo nos dois municípios. Por outro lado, em países onde a fasciolose é endêmica, como Peru e Bolívia, esta parasitose é encontrada em altitudes de 1.500 metros acima do nível do mar, inclusive com grande número de casos humanos.

Também foram coletados caramujos em algumas propriedades positivas para *F. hepatica*. Estes gastrópodes limneídeos são anfíbios, sendo atraídos por água fresca e áreas de vegetação úmida. Os caramujos foram encontrados em pedaços de tronco em decomposição, e em grimpas de araucárias que estavam dentro de água fresca e corrente advinda de nascentes da propriedade.

Conclui-se então que, apesar da alta altitude presente no Planalto Serrano, ocorre a presença de fasciolose devido à alta umidade, áreas alagadiças e períodos de alta pluviosidade, que são de extrema importância à manutenção do ciclo dos limneídeos responsáveis pela transmissão de *F. hepatica* e sua ocorrência.

Tabela 1. *Soma mensal da precipitação em 1 hora (mm) e média da umidade relativa mensal (%) para as regiões de Painel e Lages – Dados fornecidos pela CIRAM/EPAGRI.*

Mês / Ano	Precipitação 1 hora (mm) – soma mensal – Painel	Média da umidade relativa mensal (%) – Painel	Precipitação 1 hora (mm) – soma mensal – Lages	Média da umidade relativa mensal (%) – Lages
Agosto / 2019	40,00	83,54	29,20	83,14
Setembro / 2019	51,40	82,70	97,60	83,46
Outubro / 2019	200,40	84,11	202,40	85,45
Novembro / 2019	153,20	84,16	100,20	83,53
Dezembro / 2019	83,20	79,15	84,20	77,83
Janeiro / 2020	54,40	81,61	24,80	81,12
Fevereiro / 2020	68,80	83,16	143,40	91,13
Março / 2020	28,40	79,37	19,60	-
Abril / 2020	50,40	81,77	48,80	-
Maio / 2020	37,40	78,89	73,60	76,99
Junho / 2020	152,40	89,84	90,40	85,58

Palavras-chave: Fasciolose. Planalto Serrano. Meio ambiente.

Apoio: CNPq Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; fapesc Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina; GOVERNO DE SANTA CATARINA

UDESC
UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA

CNPq
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

fapesc
Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina

GOVERNO DE SANTA CATARINA

Seminário de Iniciação Científica
Universidade do Estado de Santa Catarina
30° SIC UDESC

CERTIFICADO

Certificamos que

Heloísa Ottequir

participou do 30º Seminário de Iniciação Científica e apresentou o trabalho intitulado Caracterização geoambiental de propriedades positivas para Fasciola hepatica nos municípios de Lages e Painel, de autoria de Heloísa Ottequir, Andreas L. Chryssafidis, Larissa Américo, Ana Luiza Girardi, Larissa G. Moreira, Gustavo N. Neuhaus, Maria Eduarda Albano e Marieli Kaibara na forma de apresentação em vídeo, no evento online que aconteceu no mês de novembro de 2020.

Lages, 27 de Novembro de 2020

Adelar Mantovani
Diretor de Pesquisa e Pós-graduação
CAV/UDESC

Código de autenticação: c7f2e1ca 89935640 ec4fc8b1 e40a399d - Valide em http://eventos.udesc.br/certificados

30º Seminário de Iniciação Científica

Registro DPPG/CAV/UDESC - 7688

Código de autenticação: c7f2e1ca 89935640 ec4fc8b1 e40a399d - Valide em http://eventos.udesc.br/certificados

INVESTIGAÇÃO DE GASTRÓPODES VETORES DE *Fasciola hepatica* NO MUNICÍPIO DE LAGES[1]

Larissa Godeski Moreira[2], Andreas Lazaros Chryssafidis[3], Larissa Américo[4], Ana Luiza Bilck Girardi[5], Heloísa Ottequir[5], Gustavo Néri Neuhaus[5], Maria Eduarda Eltermann Albano[5], Marieli Ayumi Kaibara[5]

[1] Vinculado ao projeto "Investigação de gastrópodes vetores de *Fasciola hepatica* no Planalto Catarinense e caracterização geoambiental das áreas infestadas"
[2] Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária – CAV-UDESC – Bolsista PROBIC/UDESC
[3] Orientador, Departamento de Medicina Veterinária – CAV-UDESC – andreas.ch@udesc.br
[4] Mestranda do Curso de Pós Graduação em Ciência Animal – CAV-UDESC
[5] Acadêmica (o) do Curso de Medicina Veterinária – CAV-UDESC

A fasciolose, assim como outras parasitoses de ruminantes, têm grande importância na pecuária, considerando as perdas econômicas que muitas vezes são imperceptíveis ao produtor, visto que na maioria das vezes causa uma infecção subclínica em bovinos. O agente etiológico no Brasil é a *Fasciola hepatica*, que pode infectar diversas espécies animais de interesse econômico, além do ser humano. Sua importância na produção deve-se principalmente às perdas associadas à redução em produção de carne, lã e leite, às infecções bacterianas secundárias, interferência na fertilidade, condenações de fígado e custos com tratamentos anti-helmínticos. Para completar seu ciclo de vida, o parasito necessita de um hospedeiro intermediário, que são os caramujos da família Lymnaeidae. O ciclo inicia com a eliminação dos ovos nas fezes do hospedeiro infectado e, em ambiente aquático, estes ovos darão origem à primeira fase larval, os miracídios. Em áreas alagadas, estas larvas encontram os caramujos limneídeos, penetrando em seus corpos ativamente. Dentro do caramujo, o parasito passa por mais 3 fases larvais: esporocisto, rédia e cercária. Esta última deixa o corpo do gastrópode e adere-se na vegetação ribeirinha, dando origem à forma infectante, que é a metacercária. Os animais que pastejam nestes locais se contaminam ao ingeri-las, dando continuidade ao ciclo. Considerando a importância da fasciolose e a ausência de relatos confirmatórios da doença na região do Planalto Serrano, este trabalho teve como objetivo detectar propriedades no município de Lages positivas para fasciolose, verificar os locais em que o caramujo poderia estar presente no ambiente, e coletar e identificar as espécies presentes nestas propriedades. Durante a pesquisa, foram realizadas coletas em dezesseis propriedades no município de Lages, obtendo-se amostras fecais em cerca de vinte animais por propriedade, totalizando 294 amostras, sendo 282 bovinos e 12 ovinos. Com o auxílio de luvas de toque e luvas de procedimento, as fezes foram colhidas individualmente, diretamente da ampola retal dos animais. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, que eram identificados e levados ao Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias (LAPAR-CAV-UDESC) para análise. No laboratório, as amostras fecais foram examinadas através dos protocolos de análise coproparasitológica qualitativa por sedimentação, para verificar a presença dos ovos de *F. hepatica*, e quantitativa por flutuação, para avaliar a presença de outras parasitoses gastrintestinais. As análises iniciavam por um processamento único, que consistia em colocar 84 ml de água em uma coluna graduada, e, com uma espátula, era adicionada matéria fecal até completar o volume de 90 ml, o que corresponde a aproximadamente 6 g de fezes. A amostra era homogeneizada e, através de uma peneira, era

Apoio:

transferida para outro recipiente plástico. Da solução peneirada, 15 mL eram utilizados para a técnica de flutuação, e o restante era colocado em um frasco cônico de sedimentação. A este frasco, eram adicionados 400 ml de água, aguardados 10 minutos, e desprezado o sobrenadante. Após repetição do processo, 5 gotas de azul de metileno eram adicionadas ao sedimento, que era dividido em duas placas de Petri, examinadas sob um estereomicroscópio para verificação da presença de ovos de *F. hepatica*. Das propriedades analisadas, 31,25% (5/16) apresentavam animais infectados, com 10,28% (29/282) de prevalência detectada nos bovinos. Nenhum ovino analisado se mostrou infectado. Nas propriedades positivas, foram realizadas buscas ativas pelos caramujos limneídeos em áreas alagadas. Foram coletados 83 caramujos, dentro da água de açudes e riachos, sempre fixados a grimpas e fragmentos de madeira em decomposição. Foi realizada uma prévia análise morfológica e, dos caramujos coletados nestas propriedades, 3 aparentam ser da espécie *Pseudosuccinea columella* e 80 são de uma espécie que não foi identificada morfologicamente. Dada a epidemiologia da doença, propriedades em que os animais têm acesso a fontes de água natural apresentam maior probabilidade de apresentarem casos de fasciolose. Um dos principais problemas relacionados ao controle da parasitose está relacionado à capacidade de multiplicação do parasito nos hospedeiros intermediários e ampla disseminação das formas infectantes no ambiente. Um único miracídio que infecte um caramujo é capaz de gerar centenas de cercárias, que se espalham na vegetação. O objetivo do controle é a redução da infestação das pastagens pelas metacercárias, pelo correto tratamento dos animais infectados, gerando uma diminuição no número de ovos depositados no ambiente. A realização do diagnóstico parasitológico fecal periódico, para a identificação de animais positivos, é fundamental para o estabelecimento das medidas de controle. Também é recomendado que seja fornecida água aos animais em caixas d'água ou contêineres livres de material vegetal em putrefação, evitando assim a presença dos caramujos. A presença de aves aquáticas anseriformes, que são predadores naturais de caramujos, também é um fator positivo ao controle da fasciolose. Com o presente estudo, provou-se que a *F. hepatica* está presente na região de Lages, dada a presença dos animais infectados e dos caramujos hospedeiros do helminto. Com isso, há a possibilidade de contribuição aos produtores, que poderão identificar e tratar os animais infectados, aumentando assim a produtividade de suas propriedades, bem como à saúde pública do município, evitando a incidência de casos zoonóticos pelo controle da doença nos animais.

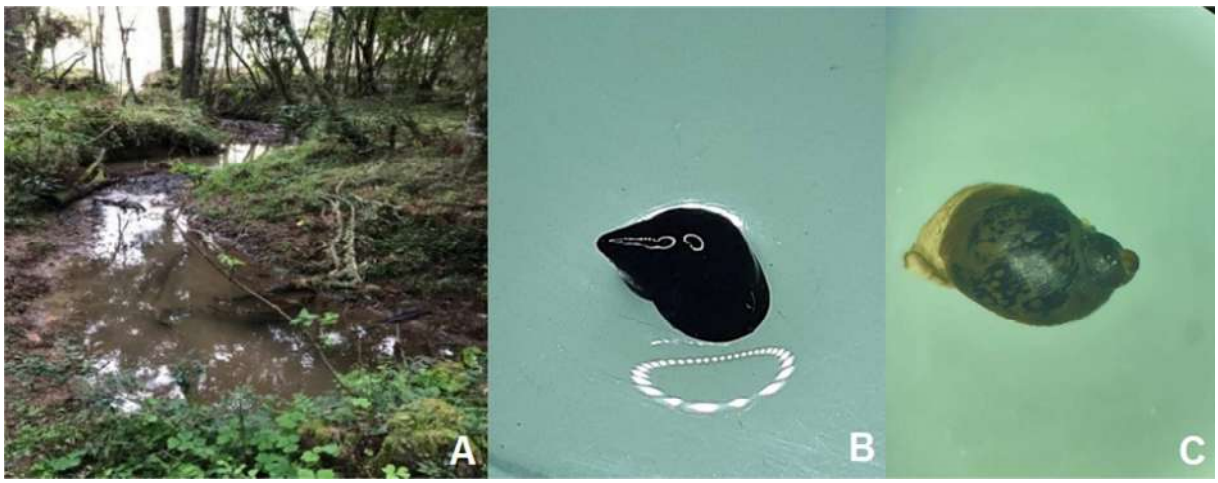

Figura 1. *A- Local de coleta dos caramujos; B - Caramujo não identificado; C - P. columella*

Palavra-chave: Fasciolose. Epidemiologia. Zoonose.

UDESC
UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA

CNPq
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

fapesc
Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina

GOVERNO DE SANTA CATARINA

Seminário de Iniciação Científica
Universidade do Estado de Santa Catarina
30° SIC UDESC

CERTIFICADO

Certificamos que

Larissa Godeski Moreira

participou do 30º Seminário de Iniciação Científica e apresentou o trabalho intitulado Investigação de gastrópodes vetores de Fasciola hepatica no município de Lages, de autoria de Larissa Godeski Moreira, Andreas L. Chryssafidis, Larissa Américo, Ana Luiza Girardi, Heloísa Ottequir, Gustavo Neuhaus, Maria E. Albano e Marieli Kaibara na forma de apresentação em vídeo, no evento online que aconteceu no mês de novembro de 2020.

Lages, 27 de Novembro de 2020

Adelar Mantovani
Diretor de Pesquisa e Pós-graduação
CAV/UDESC

Código de autenticação: 5bc77fa2 af47b499 4c6c11e2 c9bc9200 - Valide em http://eventos.udesc.br/certificados

30º Seminário de Iniciação Científica

Registro DPPG/CAV/UDESC - 7694

Código de autenticação: 5bc77fa2 af47b499 4c6c11e2 c9bc9200 - Valide em http://eventos.udesc.br/certificados

Verifique o código de autenticidade **5441487.594237.678630.3.5505394256791931787** em https://www.even3.com.br//documentos

ARACAJU | 16 A 19 DE ABRIL DE 2023

PARASITO 2023

XXVIII CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA

CERTIFICADO
DE ATIVIDADE

Certificamos que **Larissa Américo**, participou com êxito da atividade **- Minicurso - presencial: Larvas de Trematódeos em Moluscos.** realizada em 16/04/2023, durante o XXVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia, contabilizando carga horária total de 8 horas.

Aracaju, 19 de Abril de 2023

PRESIDENTE DO CONGRESSO
PROF. SILVIO SANTANA DOLABELLA

PRESIDENTE DA SBP
PROF. JOSÉ MAURO PERALTA

DECLARAÇÃO DE CONCLUSÃO

Declaramos, para os devidos fins, que **Larissa Américo**, portador do CPF **070.101.149-19**, concluiu o curso "**Fundamentos Básicos de Biossegurança e Bioproteção**", ofertado pela instituição **Instituto Aggeu Magalhães** por meio da Universidade Aberta do Sistema Único de Saúde (UNA-SUS), na categoria **Qualificação Profissional**, Ensino a Distância, com carga horária total de **45** horas.

Maria Fabiana Damásio Passos
Secretária Executiva da UNA-SUS
Diretora da Gerência Regional de Brasília
Fundação Oswaldo Cruz

Código Arouca do Curso: **47012**
Código Arouca da Oferta: **420015**
Período de realização do curso: **30/07/2024 - 23/09/2024**

Código da declaração: **4pnqKLAv2TvkKPju97kZXV**
Emitida conforme dados registrados na Plataforma Arouca.

Verifique a autenticidade deste documento utilizando o QRCode ou o link:
https://declaracao.unasus.gov.br/dec/4pnqKLAv2TvkKPju97kZXV

Declaração emitida em: 23/09/2024

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Comissão Interna de Biossegurança

DECLARAÇÃO

Declaro que **LARISSA AMÉRICO** concluiu, em 02 de fevereiro de 2024, o "**QBA/On-line** - Sensibilização em Gestão da Qualidade, Biossegurança e Ambiente", que contém instruções técnicas e operacionais básicas visando ao ingresso e desenvolvimento de atividades laboratoriais na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), dentro das diretrizes da Gestão da qualidade, biossegurança e proteção ambiental. Informo ainda que estou ciente que o QBA/On-line **NÃO SUBSTITUI** os cursos presenciais relacionados a estas temáticas, e que estes são fortemente recomendados.

_____
Chefia do Laboratório/Serviço (assinatura e carimbo)

_____, ____/____/____
(Local e Data)

Declaro que realizei o **QBA/On-line** e que estou ciente do conteúdo e das diretrizes de segurança para realização das minhas atividades e da importância de participação em cursos presenciais para complementar a minha formação.

_____
(nome em letras de forma)

_____, ___/___/_____
(local e data)

_____
(assinatura do participante)

IOC iBio
Comissão Interna de Biossegurança - IOC

CTBi
Comissão Técnica de Biossegurança e Bioproteção