

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE PRODUÇÃO ANIMAL E MEDICINA
VETERINÁRIA PREVENTIVA

AVALIAÇÃO MOLECULAR *PARA Fasciola hepatica* EM
BOVINOS ABATIDOS EM FRIGORÍFICO DO CENTRO-
OESTE PAULISTA E ANÁLISE ESPACIAL

ANDRESA XAVIER FRADE GOMES

Botucatu – SP

Junho - 2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE PRODUÇÃO ANIMAL E MEDICINA
VETERINÁRIA PREVENTIVA

AVALIAÇÃO MOLECULAR PARA *Fasciola hepatica* EM BOVINOS
ABATIDOS EM FRIGORÍFICO DO CENTRO-OESTE PAULISTA E
ANÁLISE ESPACIAL

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Saúde Animal, Saúde Pública
Veterinária e Segurança Alimentar.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Simone Baldini
Lucheis

Coorientadora: Dra. Maria Izabel Merino de
Medeiros

Botucatu – SP

Junho - 2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA ANDRADE CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Gomes, Andresa Xavier Frade.

Avaliação molecular para Fasciola hepatica em bovinos abatidos em frigorífico do Centro-Oeste paulista e análise espacial / Andresa Xavier Frade Gomes. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Simone Baldini Lucheis

Coorientador: Maria Izabel Merino de Medeiros

Capes: 50502000

1. Fasciola hepatica. 2. Georreferenciamento.
3. Ruminantes. 4. Saúde Pública. 5. Zoonoses.

Palavras-chave: Fasciola hepatica; Georreferenciamento;
Ruminantes; Saúde Pública; Zoonose.

Andresa Xavier Frade Gomes

AVALIAÇÃO MOLECULAR PARA *Fasciola hepatica* EM BOVINOS ABATIDOS
EM FRIGORÍFICO DO CENTRO-OESTE PAULISTA E ANÁLISE ESPACIAL.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª . Dra. Simone Baldini Lucheis

Presidente e Orientadora

Depto de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva FMVZ -
UNESP- Botucatu

Profº Dr. Fernando Paiva

Membro da Banca

Instituto de Biociências - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Profº Dr. Helio Langoni

Membro da Banca

Depto de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva FMVZ -
UNESP- Botucatu

Data da Defesa: 28 de Abril de 2023.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001".

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001".

DEDICATÓRIA

Aos meus avós, Valter e Ivone (in memoriam). Aos meus pais, Clóvis e Nilsen.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Nilsen Xavier da Silva Gomes e Clóvis Frade Gomes, pelos ensinamentos, incentivo, e pelo apoio incondicional em todas as áreas da minha vida. Ao meu pai por sempre me acompanhar nas viagens até Botucatu e Bauru, todas as vezes que precisei, sem medir esforços. À minha mãe pelo apoio financeiro, afetivo e emocional. Aos dois, por sempre me lembrarem que os estudos são o maior tesouro que eles puderam me proporcionar. Serei eternamente grata.

À minha irmã, Mayara Xavier Frade Gomes, pelo encorajamento e companheirismo mesmo à distância, durante esses dois anos.

A minha orientadora, professora Dr^a Simone Baldini Lucheis, por me acolher como sua aluna, mesmo sem me conhecer, e confiar a mim um trabalho tão importante com sua incrível orientação.

Ao laboratório da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (Apta) de Bauru e todas(os) dele, em especial à Dra. Maria Izabel Merino de Medeiros, Isabella Aires e Thaina Bertozzo, que me auxiliaram quando precisei, foram sempre gentis, compreensivas, e me ensinaram com paciência e atenção.

A Dra. Ana Paula Flamino, do Laboratório de Enfermidades Infecciosas de Botucatu, que auxiliou na realização do diagnóstico molecular em tempo real para a confecção dessa pesquisa.

A Letícia Rossi, médica veterinária do frigorífico Frigol, de Lençóis Paulista, por ceder amostras de *Fasciola* para realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da FMVZ - Unesp - Botucatu/SP, pelo auxílio prestado durante o curso de mestrado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Auxílio a Pesquisa Regular – Processo 2020/09409-2.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Procedência dos animais utilizados na pesquisa.....	26
Quadro 2. Número de animais positivos e negativos para <i>Fasciola hepatica</i> por município, segundo método e intervalo de confiança de 95% para o total de amostras positivas.	36
Quadro 3. Resultado geral da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e PCR em tempo real (qPCR) para <i>Fasciola hepatica</i> a partir de fígado de 140 bovinos abatidos em frigorífico do Centro-Oeste Paulista e municípios de procedência.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados dos testes moleculares de PCR e qPCR para <i>Fasciola hepatica</i> em bovinos abatidos em frigorífico do Centro-Oeste Paulista.....	35
--	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Eletroforese em gel de agarose a 2% para os *primers* FhCO1F e FhCO1R (405pb) para *Fasciola hepatica*. Marcador de peso molecular 100pb. Colunas 14 e 17 – amostras amplificadas; 23 – controle positivo (*Fasciola hepatica*); 24 – controle negativo (água ultra pura).31
- Figura 2. Eletroforese em gel de agarose a 2% para os *primers* COX1F e COX1R (535pb) para *Fasciola hepatica*. Marcador de peso molecular 100pb. Colunas 11 e 12 – amostras amplificadas; 34 – controle positivo (*Fasciola hepatica*); 35 – controle negativo (água ultra pura).31
- Figura 3. Eletroforese em gel de agarose a 2% para os *primers* COX1F e COX1R (535pb) para *Fasciola hepatica*. Marcador de peso molecular 100pb. Colunas 2, 5, 6, 7 e 8 – amostras amplificadas; 13 – controle positivo (*Fasciola hepatica*); 14 – controle negativo (água ultra pura).31
- Figura 4. Curva de melting para *Fasciola hepatica* pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR), amplificadas à temperatura de 82,94°C.....34
- Figura 5. Localização do Brasil na América do Sul, evidenciando o estado de São Paulo e os municípios de procedência dos animais para a pesquisa de *Fasciola hepatica*.38
- Figura 6. Mapa do estado de São Paulo evidenciando a localização dos municípios de procedência dos animais para a pesquisa de *Fasciola hepatica*.39
- Figura 7. Mapa do estado de São Paulo com destaque para amostras positivas para *Fasciola hepatica* à PCR e seu respectivo município. Em vermelho, sete amostras positivas ao *primer* COX1 - Avaré (1), Bariri (4) e Vargem (2). Em amarelo, amostras positivas ao *primer* FhCO1 – Riversul (2).40
- Figura 8. Mapa do estado de São Paulo com as amostras positivas para *Fasciola hepatica* destacando os municípios de origem das 64 amostras positivas pela técnica de qPCR – Bariri (4), Bauru (1), Itaporanga (3), Itaí (8), Lençóis Paulista (8), Presidente Alves (13), Riversul (13), Santa Cruz do Rio Pardo (6), Vargem (8).41
- Figura 9. Mapa dos municípios do estado de São Paulo e comparação das amostras positivas para *Fasciola hepatica* pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase para os dois pares de *primers* (em amarelo, o *primer* FhCO1 e em

vermelho, o *primer* COX1) e pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR), destacado na cor laranja.42

LISTA DE ABREVIACÕES

APTA - Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios

°C – Graus Celsius

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real ou Quantitativa

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

OMS – Organização Mundial da Saúde

SST – Solução Salina Tamponada

SP – São Paulo

SIF – Serviço de Inspeção Federal

PBS - Phosphate Buffer Saline

Ph – Potencial Hidrogeniônico

Pb – Pares de Base

UV – Ultravioleta

mL – Mililitros

µl – Microlitros

SUMÁRIO

Resumo.....	14
Abstract.....	15
CAPÍTULO 1	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. Epidemiologia	18
2.2. Patogenia.....	19
2.3. Diagnóstico	21
2.3.1. <i>Diagnóstico em Humanos</i>	21
2.3.2. <i>Diagnóstico em Animais</i>	21
2.4. Tratamento	22
3. JUSTIFICATIVA.....	23
CAPÍTULO 2	24
4. OBJETIVOS.....	25
4.1. Gerais	25
4.2. Específicos	25
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
5.1. Local de Realização das Técnicas	25
5.2. Aspectos éticos.....	25
5.3. Procedência das amostras e quantidade de animais	25
5.4. Amostras Biológicas	26
5.4.1. <i>Colheita e armazenamento das amostras biológicas</i>	26
5.4.2. <i>Processamento das amostras biológicas</i>	27
5.5. Exames Diagnósticos	27
5.5.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	27
5.5.1.1. <i>Extração</i>	27
5.5.1.2. <i>Amplificação do DNA</i>	28
5.5.1.3. <i>Eletroforese</i>	29

5.6. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR).....	29
6. Análise estatística	30
7. Análise espacial	30
8. RESULTADOS.....	30
8.1. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).....	30
8.2. Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (qPCR).....	32
8.3. Análise Estatística.....	35
8.4. Análise espacial.....	37
9. DISCUSSÃO.....	43
10. CONCLUSÃO	51
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*	52
ANEXOS	58
ANEXO 1.....	59
ANEXO 2.....	60
CAPÍTULO 3.	65
Artigo Científico	65
ANEXO 3.....	82

GOMES, A.X.F. **AVALIAÇÃO MOLECULAR PARA *Fasciola hepatica* EM BOVINOS ABATIDOS EM FRIGORÍFICO DO CENTRO OESTE PAULISTA E ANÁLISE ESPACIAL.** Botucatu, 2023.82p. Exame Geral de Qualificação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Resumo

Fasciola hepatica (*F. hepatica*) é um parasita trematoda que afeta os tecidos de animais e humanos. Este parasita se aloja principalmente no fígado de seus hospedeiros, e seu ciclo de transmissão envolve um hospedeiro intermediário, o caramujo do gênero *Lymnaea*. Há eliminação de ovos do parasita nas fezes de animais infectados, contaminando locais úmidos. Para o diagnóstico, realizou-se a prova molecular de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com a utilização de dois pares de *primers* para *F.hepatica*; e o exame de PCR em tempo real (qPCR), com um par de *primers*. Foram utilizadas 140 amostras de fígado de bovinos abatidos em um frigorífico da região Centro Oeste Paulista. Verificou-se que, à PCR , para os dois *primers*, nove das 140 amostras (6,4%) foram positivas, sendo duas (1,4%) com o par de *primers* FhC01, e sete (5%) com o par de *primers* COX1. Pela técnica de qPCR, com os *primers* SSCPFaF e SSCPFaR, sessenta e quatro (45,7%) amostras mostraram-se positivas para *Fasciola hepatica*. Foi possível observar amostras positivas procedentes das cidades de Vargem e Lençóis Paulista, com positividade de 80%, respectivamente. Quatro municípios apresentaram todas as amostras negativas para a detecção de *Fasciola hepatica*. A utilização das provas moleculares, em especial a qPCR, possibilitou o conhecimento de dados epidemiológicos sobre a fasciolíase no universo amostral estudado e sugerem um alerta para implementação de programas sanitários em busca da melhoria da sanidade do rebanho de bovinos de corte das propriedades avaliadas.

Palavras-chave: Diagnóstico; *Fasciola hepatica*; Zoonose; Ruminantes; Saúde Pública; Georreferenciamento.

GOMES, A.X.F. **MOLECULAR EVALUATION FOR *Fasciola hepatic* IN CATTLE SLAUGHTERED IN A REFRIGERATOR IN THE CENTRAL WEST PAULISTA AND SPATIAL ANALYSIS**. Botucatu, 2023. 82p. General Qualification Exam (Masters). Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu, São Paulo State University (UNESP).

Abstract

Fasciola hepatica (*F. hepatica*) is a fluke parasite that affects the tissues of animals and humans. This parasite lives mainly in the liver of its hosts, and its transmission cycle involves an intermediate host, the snail of the genus *Lymnaea*. There is elimination of parasite eggs in the feces of infected animals, contaminating wet places. For the diagnosis, the molecular test of Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed, using two pairs of *primers* for *F.hepatica*; and real-time PCR (qPCR) with a pair of *primers*. 140 samples of liver from cattle slaughtered in a slaughterhouse in the Midwest region of São Paulo were used. It was verified that, at PCR, for the two *primers*, nine of the 140 samples (6.4%) were positive, two (1.4%) with the FhC01 *primer* pair, and seven (5%) with the FhC01 pair of *primers*. of COX1 *primers*. By the qPCR technique, with SSCPFaF and SSCPFaR *primers*, sixty-four (45.7%) demonstrations were positive for *F. hepatica*. It was possible to observe positive positive procedures in the cities of Vargem and Lençóis Paulista, with positivity of 80%, respectively. Four municipalities had all samples negative for the detection of *F. hepatica*. The use of molecular tests, especially qPCR, allowed the knowledge of epidemiological data on fascioliasis in the studied sample universe and suggested an alert for the implementation of sanitary programs in search of the improvement of the health of the herd of beef cattle of the evaluated properties.

Keywords: Diagnosis; *Fasciola hepatica*; Zoonosis; Ruminants; Public health; Georeferencing.

1. INTRODUÇÃO

Fasciola hepatica (Linnaeus, 1758), é um parasita do Filo Platyhelminthes, Classe Trematoda (em formato de folha), Ordem Digenea e Família Fasciolidae. Possui ciclo indireto, ou seja, as gerações sexuadas ou assexuadas parasitam hospedeiros alternados (BOWMAN, 2010). Seu principal hospedeiro intermediário são caramujos, em especial os do gênero *Lymnaea*, *Galba*, *Fossaria* e *Pseudosuccinea* (CDC, 2019).

Esse parasita acomete diferentes órgãos, mas principalmente o fígado e ductos biliares de várias espécies de mamíferos, como ovinos, bubalinos, equinos, suídeos e camelídeos (WHO., OIE., FAO., 2021).

O parasita está distribuído em mais de 70 países, especialmente em locais onde há criação de ovinos ou bovinos. Casos humanos já foram relatados na América Latina, Oriente Médio, Caribe, Ásia, África, partes da Europa e raros casos na Austrália. Existem duas espécies capazes de infectar pessoas, *F. hepatica* e *Fasciola gigantica* (*F.gigantica*), sendo essa última mais comumente identificada na África e na Ásia. A doença é considerada mais comum em animais, entretanto, o número de registros de casos humanos habitantes de nações em desenvolvimento é considerado de grande importância e deve ser levado em consideração (CDC, 2019).

O Tratado de Saúde Animal do Mundo Árabe, de 865 a.C, do século IX, traz o primeiro caso já registrado de fasciolíase. Nele, cita-se a ocorrência de uma “doença do fígado” em ovinos (MENDES, 2006 apud REZENDE, 1979). O primeiro relato da circulação desse parasita no Brasil foi feito por Adolfo Lutz em 1921, que o detectou ao observar o fígado alterado de carneiros e bovinos abatidos, além de haver a presença de uma espécie de *Lymnaea*. Esses animais eram provenientes da Barra do Piraí, as margens do Paraíba, no Rio de Janeiro.

Em relação ao ciclo de vida, *F. hepatica* adulta se estabelece nos ductos biliares e fígado de mamíferos, que são os hospedeiros definitivos. Os ovos são carregados pela bile até a luz do intestino e então são eliminados nas fezes. Esses ovos, por sua vez, só tornam-se infectantes na forma de larva ciliada (miracídio), ao entrar em contato com a água (BOWMAN, 2010).

O complexo período de eclosão dos ovos só pode acontecer sob circunstâncias favoráveis, principalmente no que se refere à temperatura. Temperaturas moderadas, entre 10°C a 30°C, pH 7 (variando entre 4,2 e 9,0), ambiente anaeróbico e presença obrigatória de água são condições necessárias para o desenvolvimento embrionário e desprendimento da larva, que mede 220-500 µm por 70-80 µm com vida útil de 8 a 10 horas em ambiente aquático favorável (COSTA, 2010). O miracídio, ao encontrar um hospedeiro intermediário, penetra no caramujo do gênero *Lymnaea*, local onde perde sua superfície ciliada, e migra para as glândulas digestivas do mesmo, estabelecendo-se na forma de esporocisto.

Após múltiplas divisões celulares, os esporocistos se transformam em rédias, que possuem aparelho bucal e passam a se alimentar dos tecidos do caramujo. As formas jovens, chamadas cercárias, são a próxima fase de evolução da *Fasciola hepatica*. As cercárias saem das rédias e abandonam o caramujo para vida livre na água, nadando à procura de plantas onde possam fixar-se, na lâmina d'água. Nesse estágio, perdem a cauda e passam a ser a forma infectante para as pessoas e animais, a metacercária, que é ingerida na água contaminada ou durante o pastejo. Sob condições convenientes, o ciclo de vida da *Fasciola hepatica* pode ser considerado completo entre três a quatro meses (BOWMAN, 2010).

Diante da grande quantidade de hospedeiros definitivos, é possível observar o quão adaptável e ecologicamente versátil este helminto é, o que explica sua incrível dispersão geográfica (OLIVEIRA; RESENDE, 2017).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Epidemiologia

Considerada um sério problema de saúde pública mundial, a fasciolíase é a infecção helmíntica de maior importância em bovinos, principalmente em países tropicais, causando vários prejuízos econômicos com a condenação de fígados parasitados e perdas no rendimento de carcaças devido a baixa conversão alimentar. Em estudo recente, verificou-se o aumento no número global de casos humanos da doença. A Organização Mundial da Saúde (OMS)

admitiu que a fasciolíase é uma doença emergente, sendo observada em mais de 70 países e com relatos de 2,4 milhões de pessoas infectadas de 1990 até 2019, além de 180 milhões de pessoas em situação de risco de infecção (MASCOMAS et al., 2019; WHO, 2020).

No Brasil, apesar da prevalência da fasciolíase ser considerada baixa, ela ainda representa grande prejuízo econômico e social. Estima-se que a incidência da doença nos rebanhos do Rio Grande do Sul chegue a 91%, sendo o estado mais afetado do Brasil (MOLENTO et al., 2018).

A região Norte tem apenas registros de infecção humana, enquanto a região Nordeste tem registro dos parasitas, sem casos humanos ou animal (FURTADO et al., 2015).

A taxa de prevalência da *Fasciola hepatica* no Brasil variou entre 4-8%, tendo alcançado um pico de 11,55% em 2006, principalmente devido ao aumento da prevalência nos estados do Rio Grande do Sul (RS) e Santa Catarina (SC) (BENNEMA et al., 2014).

O uso dessa base de informações é considerado de grande valia para previsão de eventos futuros relacionados a essa e outras doenças (MOLENTO et al., 2018).

2.2. Patogenia

Casos humanos ocorrem após a ingestão da forma infectante do agente, a metacercária, em alimentos ou água contaminados. No organismo, durante a fase aguda, o parasita migra pela parede do intestino e penetra na cápsula de Glisson, chegando ao parênquima hepático, onde tornam-se adultos. Já nesta fase é caracterizada como doença crônica. Os pacientes apresentam sintomas como dor, hipereosinofilia, colecistite e pancreatite aguda (WEB; CABADA, 2018).

Em algumas situações, entretanto, não há relato de sintomas. Algumas pessoas sentem mal estar apenas no início da infecção, chamada fase aguda, quando vermes imaturos migram do intestino para a cavidade abdominal e o fígado. Nesses casos os fenômenos podem começar entre 4 a 7 dias após a exposição e durar várias semanas ou meses. Durante as duas fases da infecção,

as características clínicas podem incluir febre, mal-estar, dor abdominal, eosinofilia, hepatomegalia e testes hepáticos anormais (CDC, 2019).

Já as manifestações em animais geralmente incluem o rebanho todo, e os sintomas apresentam-se como vagos ou inespecíficos, normalmente demonstrados pela produtividade reduzida. Isso torna difícil a distinção entre o manejo inadequado dos ruminantes ou outras doenças crônicas. A fasciolíase bovina é mais comum na forma subclínica; entretanto, altas cargas parasitárias podem se manifestar com surtos da doença nas formas aguda ou subaguda (KAPLAN, 2001).

A patologia em animais ocorre da seguinte forma: as metacercárias, consideradas a forma infectante, quando imaturas, realizam migração pelo fígado antes de se alojarem no destino final, os ductos biliares. Essa movimentação na fase aguda ocasiona traços hemorrágicos no parênquima hepático necrótico, visíveis a olho nu, de cor vermelho-escura que, após certo tempo, passam a ficar descolorados em relação ao parênquima ao redor, com áreas de fibrose. As manifestações clínicas dessas movimentações são variadas e podem incluir desde peritonite aguda e abscessos hepáticos, até a morte do hospedeiro em decorrência de necrose hepática aguda difusa, caso haja migração em grandes quantidades. Pode haver ainda a multiplicação de *Clostridium haemolyticum* ou *Clostridium novyi* no tecido lesionado, com desenvolvimento consecutivo de hemoglobinúria bacilar ou hepatite necrótica infecciosa, nessa ordem (ZACHARY, 2018).

Os ductos intra e extra hepáticos, por sua vez, são colonizados pela forma adulta do parasita, causando colangite. A forma crônica da colangite, associadas a obstrução do ducto biliar, geram estenose dos ductos e ectasia, além de espessamento da parede, aumentando seu tamanho. O conteúdo encontrado nesses ductos é de aspecto viscoso, de cor castanho-escura, resultante da mistura de bile modificada, detritos celulares e excreção de pigmento porfirina dos parasitas (ZACHARY, 2018).

2.3. Diagnóstico

2.3.1. Diagnóstico em Humanos

Para humanos, há vários testes diagnósticos com o intuito da detecção de *Fasciola* spp, como testes imunológicos que recentemente vem sendo desenvolvidos (COLLETT et al., 2022).

O diagnóstico da infecção por *Fasciola* é desafiador e requer uma combinação de achados clínico-epidemiológicos e testes laboratoriais específicos. A microscopia de fezes e a sorologia são comumente utilizadas, mas apresentam limitações. Testes radiológicos podem auxiliar no diagnóstico durante a fase aguda ou parenquimatosa hepática da doença. O teste sorológico para anticorpos contra antígenos de *F. hepatica* tem alta sensibilidade e pode ser usado durante a fase aguda. Testes moleculares a partir de fezes, como o PCR em tempo real, são altamente sensíveis e específicos, permitindo distinguir entre infecções por *F. hepatica* e *F. gigantica* e entre *Fasciola* spp. e outras infecções parasitárias (WEBB & CABADA., 2018).

Exames de imagem podem ser úteis para confirmação da doença, e entre seus achados incluem-se hemorragia subcapsular, lesões parenquimatosas nodulares mal definidas que podem conectar-se em trilhas tubulares, preenchimento nas vias biliares e nódulos indistintos subcapsulares, peribiliários ou periportais e abscessos. O uso de ultrassom e tomografia computadorizada, ressonância magnética e em menor grau, medicina nuclear digitalizada também tem a mesma função. A colangiopancreatografia endoscópica retrógrada e a colangiopancreatografia por ressonância magnética (MRCP) são úteis na doença crônica quando os vermes adultos ocupam a árvore biliar (TOLAN, 2011).

2.3.2. Diagnóstico em Animais

Habitualmente, o diagnóstico de fasciolíase é feito nos animais pelo método de contagem de ovos em fezes, utilizando a técnica de sedimentação. Entretanto, essa metodologia possui sensibilidade limitada quando utilizada para um grande número de amostras ou quando realizada por pessoas inexperientes. Não obstante, essa técnica só pode ser utilizada após o período pré patente de 12 semanas. Como solução a isso, foi criado o kit comercial de ELISA

coprológico para detecção da *Fasciola* spp., assim como o teste de PCR, ambos utilizados em amostras de fezes (CALVANI et al., 2017). Os dois mostram-se mais eficazes e permitem maior eficiência na análise da amostra quando comparados à sedimentação tradicional, a qual necessita de duas sedimentações para resultados com maior sensibilidade. Além disso, os testes moleculares permitem o armazenamento do DNA para múltiplos usos (CALVANI et al., 2017 apud MEZO, 2004).

A identificação molecular baseada em genes, quando comparada ao uso da caracterização e morfologia para diferenciação da *Fasciola* spp., é mais segura, visto que a última só deve ser utilizada para a distinção de parasitas adultos encontrados nos ductos biliares (CWIKLINSKI; DALTON, 2018). As análises moleculares são, portanto, de caráter essencial na identificação, resolvendo discrepâncias em relação ao reconhecimento entre espécies (AMER et al., 2016).

Ademais, a técnica de PCR é um método valioso para diagnosticar infecção por vermes em fígados de ovinos. A especificidade do nested-PCR permite o seu uso como um bom método para estudos epidemiológicos. Ensaios moleculares podem ser úteis para verificar a eficácia dos anti-helmínticos após o tratamento (MARTINEZ-PEREZ, 2012).

2.4. Tratamento

Para animais, o tratamento é realizado com triclabendazol administrado por via oral, com alimentos, para melhor absorção (CDC, 2019).

No Brasil, somente albendazol e closantel estão disponíveis para uso em humanos. Todavia, o único composto que tem efeito tanto nas formas adultas quanto jovens do parasita é o triclabendazol (PRITSCH & MOLENTO apud KELLEY et al., 2016).

A resistência ao triclabendazol foi documentada em animais infectados, porém em estudo realizado por Carneiro et al., (2012), a dose de 10 mg/kg associada ao uso de abamectina, mostraram-se eficientes no combate ao parasita em caprinos no estado do Espírito Santo.

O aparecimento da doença crônica ou não, depende de mecanismos imunológicos desenvolvidos pelos vermes adultos. O fato de o sistema de ductos biliares constituir um local pouco acessível à resposta imune do hospedeiro, também contribui para dificuldade de controle. Levando tudo isso em conta, acredita-se que os esforços para o controle da fasciolíase devem ser feitos nos estágios iniciais do parasita, gerenciando assim a enfermidade de forma mais eficaz (GONZÁLEZ-MIGUEL et al., 2020).

Novos medicamentos anti-helmínticos vêm sendo estudados pois os benzimidazóis utilizados para o controle da fasciolíase apresentam certas limitações, sendo elas a atividade escassa contra estágios imaturos do verme. Além disso, há a proibição de seu uso em animais produtores de leite para consumo humano e o desenvolvimento da resistência anti-helmíntica. Há esforços da União Europeia para elaboração de uma vacina eficaz, além da tentativa de estabelecer limites máximos de resíduos no leite, permitindo sua utilização no gado leiteiro (CHARLIER et al., 2013).

Vários estudos demonstram benefícios econômicos quanto ao controle da fasciolíase, sendo as diferenças entre os estudos, principalmente a amplitude no nível do benefício. Apesar de haver alguns estudos publicados que não conseguiram demonstrar qualquer impacto econômico quanto a infecções causadas por parasitas do fígado em bovinos, a revisão da literatura disponível sugere que os benefícios econômicos do controle do verme são substanciais (KAPLAN, 2001).

3. JUSTIFICATIVA

Frente ao exposto, considerando o cenário da doença no país, sua nomeação como doença negligenciada, a identificação, consequências econômicas e impacto na saúde pública, o presente trabalho propôs realizar o diagnóstico molecular para *Fasciola hepatica* em amostras de fígado de bovinos abatidos em um frigorífico da região Centro-Oeste Paulista, bem como a distribuição geográfica dos municípios de procedência dos animais para *Fasciola hepatica*.

4. OBJETIVOS

4.1. Gerais

Diagnosticar *Fasciola hepatica* em bovinos abatidos em frigorífico localizado na região Centro-Oeste Paulista.

4.2. Específicos

- Comparar as técnicas moleculares de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e PCR em Tempo Real (qPCR) para detecção de *Fasciola hepatica*, a partir de fígado de bovinos abatidos em frigorífico da região Centro-Oeste do Estado de São Paulo;
- Plotar os locais de ocorrência a partir da procedência das amostras de fígado desses animais.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Local de Realização das Técnicas

O procedimento molecular para PCR foi realizado no Laboratório de Sanidade Animal (LASAB) da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA/SAA – Bauru. O exame molecular de qPCR foi realizado junto ao Depto. de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva da FMVZ – UNESP – Botucatu.

5.2. Aspectos éticos

O presente projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética-CEUA da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ-Unesp Botucatu , sob número 0047/2021 (Anexo 1).

5.3. Procedência das amostras e quantidade de animais

Foram utilizadas 140 amostras de fígado de bovinos previamente abatidos. As peças de fígado foram inspecionadas apenas após a coleta dos fragmentos. A escolha dos animais foi aleatória, sem discriminação de sexo, raça e idade, considerando apenas animais procedentes de propriedades localizadas

no Centro-Oeste do estado de São Paulo. Os animais eram originários de quatorze diferentes municípios (Quadro 1).

Quadro 1. Procedência dos animais utilizados na pesquisa.

Municípios	Número de animais
Bariri	10
Bauru	7
Itaporanga	7
Riversul	23
Presidente Alves	22
Lençóis Paulista	10
Vargem	10
Itaí	16
Santa Cruz do Rio Pardo	18
Colômbia	5
Avaí	7
Sabino	1
Avaré	3
São José do Barreiro	1
Total	140

5.4. Amostras Biológicas

5.4.1. Colheita e armazenamento das amostras biológicas

Tendo em vista a pandemia da Covid-19, como normativa sanitária, houve a restrição presencial em frigorífico para coleta de material com finalidade de pesquisa. Sendo assim, foram aproveitadas 140 amostras de fígado de bovinos de corte, de ambos os sexos e diferentes idades, que foram coletadas entre agosto e outubro de 2017, durante a linha de abate de um frigorífico localizado na região Centro-Oeste Paulista. As amostras foram devidamente armazenadas em freezer a -20°C no Laboratório de Sanidade Animal – LASAB - APTA Centro-Oeste – Bauru, até o momento de seu processamento para extração de DNA.

As amostras de fígado foram colhidas com tesouras e pinças de metal esterilizadas em álcool 70% no momento de cada colheita, e os fragmentos dos

tecidos eram identificados com o registro do animal e envoltos em papel alumínio, sendo acondicionados em caixa térmica refrigerada.

5.4.2. *Processamento das amostras biológicas*

Foram determinadas as taxas de 1 grama de fígado utilizando uma balança analítica dentro de uma capela de fluxo laminar. As amostras foram aliqüotadas em microtubos contendo 200 microlitros de PBS pH 7,6 e armazenadas em freezer a -20°C até o seu processamento.

Em capela de fluxo laminar, a próxima etapa no processamento das amostras foi a preparação dos inóculos para posterior extração do DNA. Desta forma, os fragmentos de fígado foram retirados dos microtubos e macerados em almofariz e pistilo estéreis. Após a maceração, adicionou-se 2 mL de Solução Salina Tamponada (SST) pH 7,6 pipetando-se 1.000 microlitros do sobrenadante para dois microtubos livres de DNase e RNase (1 mL para cada um), identificados e mantidos em freezer a -20 °C até a realização da extração de DNA.

Para a preparação da extração do DNA de *Fasciola hepatica* para controle positivo, foi utilizado o próprio parasita previamente armazenado em álcool para conservação. Em capela de fluxo laminar esterilizada durante quinze minutos na luz UV, macerou-se em almofariz estéril, duas amostras de *Fasciola hepatica* adultas, acrescentando-se 2mL de PBS pH 7,2 ao macerado.

5.5. Exames Diagnósticos

5.5.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

5.5.1.1. Extração

A extração de DNA a partir da *Fasciola hepatica* foi realizada utilizando-se o kit CellcoTM Blood-Animal-Plant DNA Preparation Kit DPK 112L para 250 preparações, conforme instruções do fabricante. As amostras de fígado foram extraídas utilizando-se o kit Illustra[®] Tissue & Cells Genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare[®]), conforme recomendações do fabricante.

5.5.1.2. Amplificação do DNA

Foram testados dois pares de *primers* na PCR. Os *primers* do primeiro par foram descritos por CUCHER et al. (2006), os quais amplificam parcialmente uma região com aproximadamente 405 pb do gene da subunidade 1 do citocromo c oxidase (posição do gene corresponde aos nucleotídeos 1888-3420 de X15613.1), como segue:

FhCO1F (5`TATGTTTTGATTTTACCCGGG-3`)

FhCO1R (5`ATGAGCAACCACAAACCATGT-3`)

O segundo par de *primers* foi descrito SARKARI et al. (2018), e foi composto por fragmentos de 438 pb do gene mitocondrial COX1, descrito a seguir:

5'-ACGTTGGATCATAAGCGTG-3'

5'-CCTCATCCAACATAACCTCT-3'

As reações de PCR foram realizadas em microtubos de 0,2 mL com volumes totais de 25µl, sendo 2,5µl de MgCl₂ (1,5mM); 0,5µl de solução de dNTP (0,2mM); 0,5µl de Taq Platinum DNA (1U) (Invitrogen®); 0,5µl de cada *primer* ou *primer* (10pM); 17,75µl de água ultrapura e 2µl de DNA da amostra obtida no final da extração a 10ng. Como controle positivo dos testes utilizou-se o DNA de *F. hepatica* adulta e como controle negativo, água ultra-pura.

Tanto a preparação do primeiro quanto do segundo par de *primers* foi realizada no termociclador Mastercycler Pro gradiente (Eppendorf®), segundo o perfil de ciclagem descrito por Cucher et al. (2006) e Sarkari et al. (2018), respectivamente. O procedimento do primeiro par consistiu em 60s desnaturação em 95°C, seguido por 60s de anelamento em 56°C e 90s de extensão a 72°C, por 30 ciclos. Foram incluídos também uma etapa inicial de 3 min a 98°C e uma etapa final de 3 min a 72°C.

O segundo par de *primers* consistiu de ciclo inicial de desnaturação com início a 94°C por 2 minutos; seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto; reaquecimento a 55°C por 1,5 minutos; extensão a 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 1 minuto.

5.5.1.3. Eletroforese

A visualização dos produtos amplificados foi realizada pela técnica de eletroforese. Para tanto foi preparado um gel de agarose a 2% acrescentado com 10µl/mL de SYBR® Safe DNA gel stain (Life Technologies®). Foram utilizados 8µl do produto de PCR e como marcadores de peso molecular 5µl de 100 pb ladder (Invitrogen®) . Para todas as amostras foram acrescentados 2µl de uma solução de Blue Juice Gel Loading (Life Technologies®).

O gel foi submetido a corrida eletroforética em uma cuba horizontal HE33 (Amersham Biosciences®) contendo TBE 1X (0,1M Tris, 0,09mL de ácido bórico e 0,001M de EDTA) e a voltagem de 80V por 60 minutos, utilizando a fonte Electrophoresis Power Supply Model EPS 301 (GE Healthcare®). O gel foi visualizado no transluminador de luz UV e a imagem capturada pelo sistema Major Science® e documentada utilizando-se o software Vision Works LS®.

5.6. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) foi realizada junto ao Depto. de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva da FMVZ – UNESP – Botucatu.

Para a reação da qPCR foi empregado o set de *primers* descritos por Calvani et al., (2017) gerando amplicons de 140 pb da *Fasciola hepatica*, descritos na sequência:

SSCPFaF [S0754] (50-TTG GTA CTC AGT TGT CAG TGT G-30)

SSCPFaR [S0755] (50-AGC ATC AGA CAC ATG ACC AAG-30)

As reações foram executadas no equipamento Applied Biosystems™ StepOne™ Real-Time PCR System da marca Thermo Fisher Scientific™. As reações de qPCR utilizaram volumes iniciais de até 10µl, que incluíram 2,5µl de DNA molde de *Fasciola hepatica* e 7,5 µl de mix. Iniciaram-se as reações a 95°C por 3 min, seguidas por 40 ciclos de 5s a 95°C e 10s a 60°C. Utilizou-se SYBR® Green e Taq DNA Polymerase®, ambos da marca ProMega - Merck®. Água foi utilizada como controle negativo, e DNA extraído de *Fasciola hepatica*, como controle positivo.

6. Análise estatística

Foi calculado o percentual de amostras positivas por região de procedência, como também o intervalo de 95% confiança para o total de amostras positivas. Foi estimada uma prevalência de 6,32% (BENNEMA et al., 2014) com uma margem de erro de mais ou menos 5%. O cálculo do tamanho das amostras foi realizado com o programa OpenEpi, com uma população considerada de 150 animais (DEAN et al., 2015).

7. Análise espacial

Por meio de uma base de dados digital, realizou-se o geoprocessamento a partir do mapeamento das amostras, visando compreender espacialmente a distribuição na área de estudo. Para isso, o instrumento de Sistema de Informação Geográfica (SIG) foi utilizado, além do software QGIS 3.16 para confecção dos mapas.

8. RESULTADOS

8.1. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

A PCR foi realizada—conforme protocolo anteriormente descrito por CUCHER et al., (2006) e SARKARI et al., (2018). Assim, foram detectadas duas amostras de fígado positivas com o par de *primers* FhCO1, de número de identificação 125 e 128, e correspondentes a 1,4% do total de 140 amostras.

Foram detectadas duas amostras (1,4%) positivas para os *primers* FhCO1 na PCR, identificados pelos números 125 e 128 e provenientes do município de Riversul.

As amostras 86 e 87, avaliadas com o conjunto de *primers* COX1 eram provenientes do município de Vargem, enquanto que as outras cinco amostras (números 140, 143, 144, 145 e 146) eram procedentes da cidade de Bariri. O número total de amostras positivas para esse conjunto de *primers* foi de sete (4,9%).

A figura 1 mostra o resultado da PCR com o par de *primers* FhCO1, enquanto as figuras 2 e 3 demonstram a amplificação com os *primers* COX1.

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose a 2% para os *primers* FhCO1F e FhCO1R (405pb) para *Fasciola hepatica*. Marcador de peso molecular 100pb. Colunas 14 e 17 – amostras amplificadas; 23 – controle positivo (*Fasciola hepatica*); 24 – controle negativo (água ultra pura).

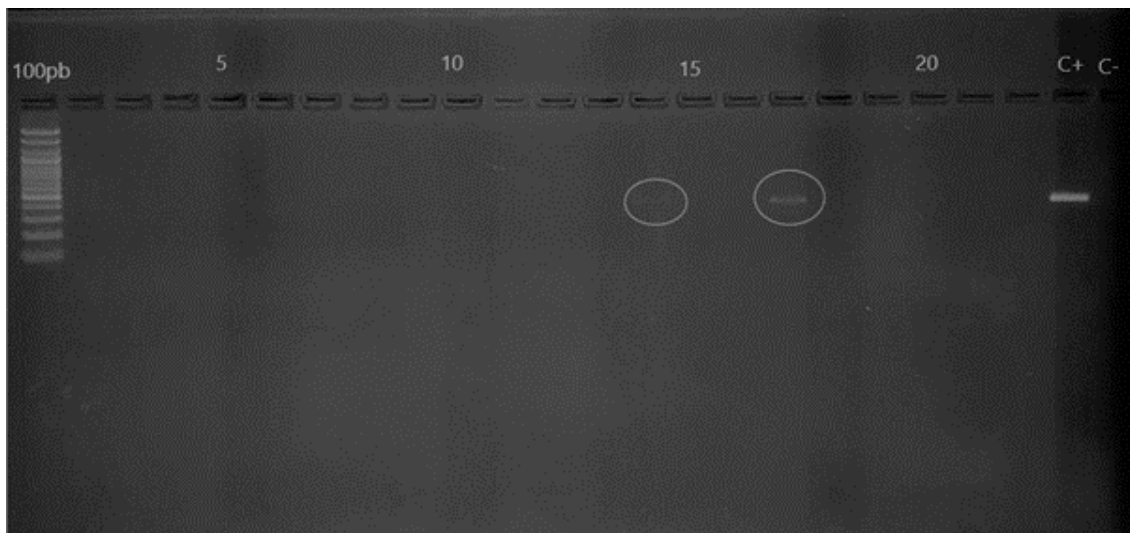


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose a 2% para os *primers* COX1F e COX1R (535pb) para *Fasciola hepatica*. Marcador de peso molecular 100pb. Colunas 11 e 12 – amostras amplificadas; 34 – controle positivo (*Fasciola hepatica*); 35 – controle negativo (água ultra pura).

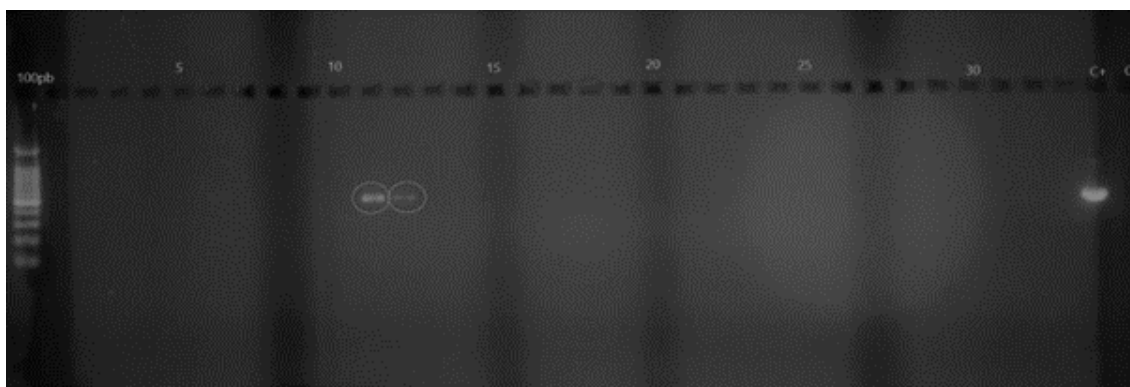


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose a 2% para os *primers* COX1F e COX1R (535pb) para *Fasciola hepatica*. Marcador de peso molecular 100pb. Colunas 2,

5, 6, 7 e 8 – amostras amplificadas; 13 – controle positivo (*Fasciola hepatica*); 14 – controle negativo (água ultra pura).



8.2 Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (qPCR)

As análises da PCR em tempo real foram realizadas segundo o protocolo anteriormente descrito por CALVANI et al., (2017).

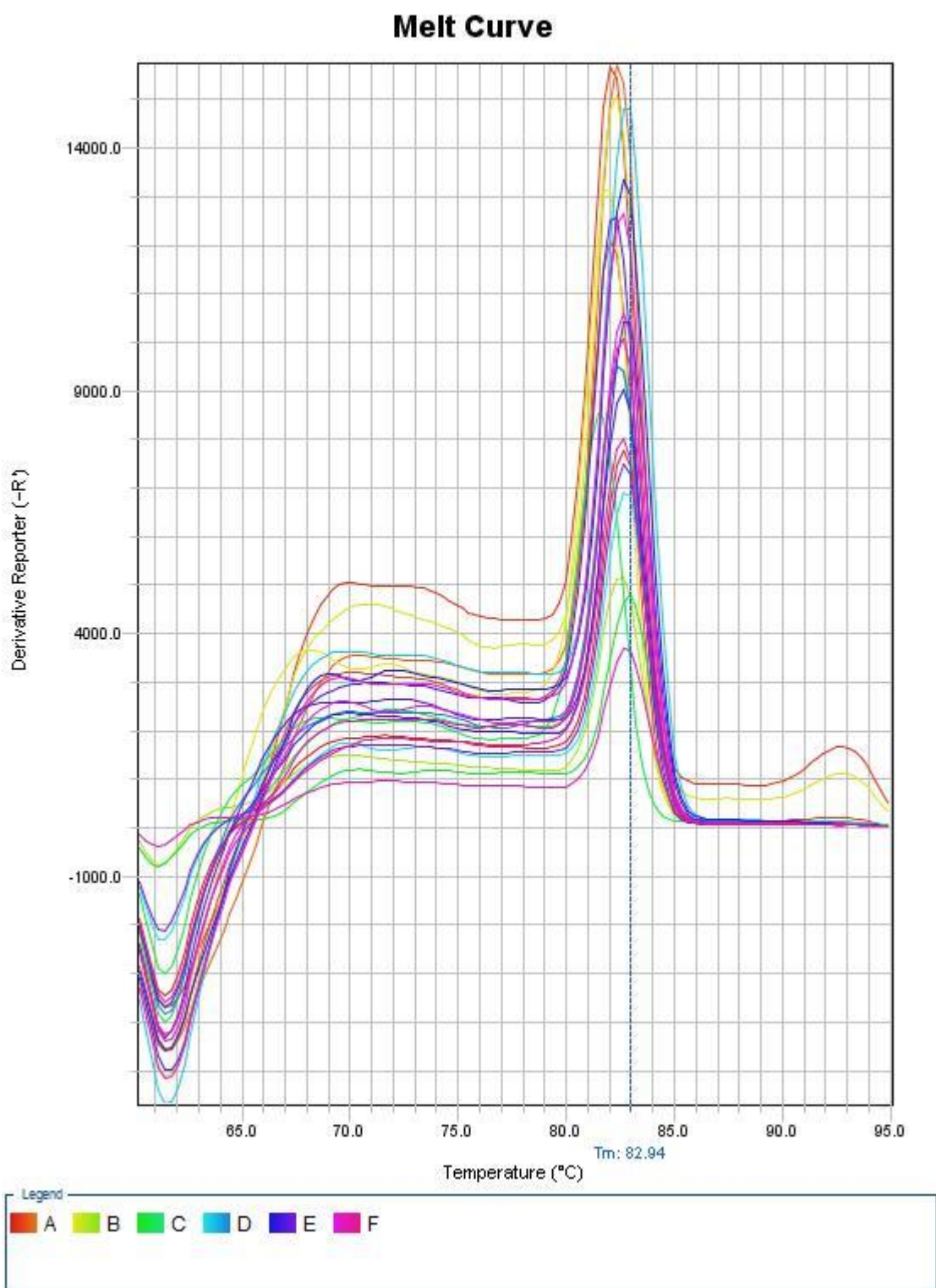
Realizou-se inicialmente a técnica de qPCR com um pool de amostras como triagem inicial e, tendo-se resultados, a técnica foi repetida para a obtenção de positivos. Desta forma, verificou-se a presença de DNA a partir da amostra 49 até a 140.

Na qPCR, observou-se sessenta e quatro amostras positivas, representando 45,7% do total nesse exame diagnóstico. A distribuição desse resultado por município foi: quatro da cidade de Bariri, uma de Bauru, oito de Itaí, três de Itaporanga, oito de Lençóis Paulista, doze de Presidente Alves, treze de Riversul, seis de Santa Cruz do Rio Pardo e oito da cidade de Vargem.

Apenas cinco municípios apresentaram resultados negativos para *Fasciola hepatica* na qPCR, sendo Avaí, Avaré, Colombia, Sabino e São José do Barreiro.

Os resultados positivos são apresentados na Figura 4 e podem ser visualizados pela curva de *melting*.

Figura 4. Curva de melting para *Fasciola hepatica* pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR), amplificadas à temperatura de 82,94°C.



A curva de desnaturação mostra a variação da fluorescência em função da temperatura. As cores da legenda A, B, C, D, E e F, correspondem aos

diferentes produtos amplificados que estão sendo analisados, permitindo a identificação e diferenciação das amostras.

A Tabela 1, a seguir, sumariza em porcentagem os resultados obtidos em cada teste utilizados.

Tabela 1. Resultados dos testes moleculares de PCR e qPCR para *Fasciola hepatica* em bovinos abatidos em frigorífico do Centro-Oeste Paulista.

	PCR <i>primer</i> COX1	PCR <i>primer</i> FhCO1	qPCR
Positivos	7 (5%)	2 (1,4%)	64 (45,7%)
Negativos	133 (95%)	138 (98,6%)	76 (54,3%)
Total	140 (100%)	140 (100%)	140 (100%)

8.2. Análise Estatística

A porcentagem de resultados positivos estimada para o *primer* COX1 ficou entre 1,4% e 8,5% com um intervalo de confiança de 95%. Da mesma forma, para o *primer* FhCO1, a porcentagem estimada de resultados positivos ficou entre 0% e 3,3% dentro de um intervalo de 95%. O teste de qPCR demonstrou uma variação de 37,5% a 54% com um intervalo de confiança de 95%.

O teste de qPCR apresentou uma positividade de 45,7%, enquanto os testes de PCR com o *primer* COX1 e PCR com o *primer* FhCO1, apenas 5% e 1,4%, respectivamente.

O valor de p foi estimado em $p < 0,001$, o que significa que a probabilidade de o resultado observado ser devido ao acaso é inferior a 0,1%. Isso evidencia que há uma diferença significativa tanto entre os testes de PCR e qPCR, quanto entre os *primers* COX1 e FhCO1.

O maior número de amostras positivas foi encontrado nas cidades de Lençóis Paulista e Vargem (80%), Presidente Alves (59%) e Itai (47,1%). Quatro cidades não obtiveram nenhum caso confirmatório para nenhuma das técnicas avaliadas, sendo Avaí, Colombia, Sabino e São José do Barreiro.

Quadro 2. Número de animais positivos e negativos para *Fasciola hepatica* por município, segundo método e intervalo de confiança de 95% para o total de amostras positivas.

Procedência	PCR primer COX1	PCR primer FhCO1	qPCR	Total de amostras
Avaiá				7
Prevalência %	0	0	0	100%
Avaré	1			3
Prevalência %	33,3%	0	0	100%
Bariri	4		4	10
Prevalência %	40%	0	40%	100%
Bauru			1	7
Prevalência %	0	0	14,3%	100%
Colombia				5
Prevalência %	0	0	0	100%
Itaí			8	16
Prevalência %	0	0	47,1%	100%
Itaporanga			3	7
Prevalência %	0	0	42,9%	100%
Lençóis Paulista			8	10
Prevalência %	0	0	80%	100%
Presidente Alves			13	22
Prevalência %	0	0	59%	100%
Riversul		2	13	23
Prevalência %	0	8,7%	56,5%	100%
Sabino				1
Prevalência %	0	0	0	100%
São José do Barreiro				1
Prevalência %	0	0	0	100%
Sta Cruz Rio do Rio Pardo			6	18
Prevalência %	0	0	33,3%	100%
Vargem	2		8	10
Prevalência %	20%	0	80%	100%
Total	7	2	64	140
Prevalência por exame %	5%	1,4%	45,7%	100%
IC de 95%	[1,4 ; 8,5]	[0,0 ; 3,3]	[37,5 ; 54]	

8.3. Análise espacial

Quatro municípios (28,6%) dentre as quatorze pesquisadas apresentaram todas as amostras negativas para as técnicas de técnicas de cPCR ou qPCR. Foram eles: Avaí, Colômbia, Sabino e São José do Barreiro. As outras dez cidades (71,42%), apresentaram uma ou mais amostras positivas para um dos exames.

Os municípios que revelaram maior número de positivos na qPCR foram Lençóis Paulista e Vargem, com 80% de suas amostras positivas (8 de 10 amostras avaliadas).

Ao comparar as duas técnicas, foi possível visualizar que as amostras 86, 87, 125, 142,143, 144 e 145 coincidiram em positividade entre as técnicas de qPCR e o *primer* COX1 da PCR. O mesmo aconteceu com as amostras 125 e 128, que foram positivas tanto na qPCR, quanto na PCR, essa última com o *primer* FhCO1.

Pelo georreferenciamento, observou-se os resultados dos exames e sua distribuição, por município, em cada mapa.

Os mapas com as localizações geográficas estão representados a partir da Figura 5 até a Figura 9.

Figura 5. Localização do Brasil na América do Sul, evidenciando o estado de São Paulo e os municípios de procedência dos animais para a pesquisa de *Fasciola hepatica*.

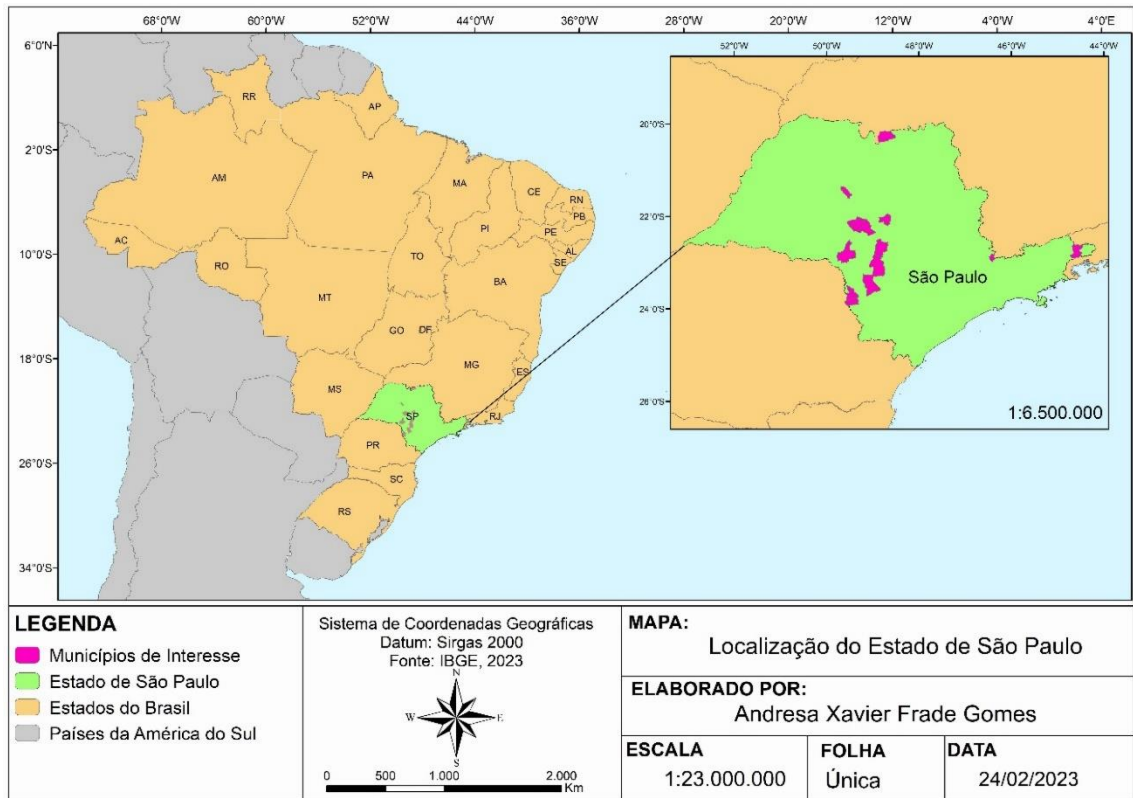


Figura 6. Mapa do estado de São Paulo evidenciando a localização dos municípios de procedência dos animais para a pesquisa de *Fasciola hepatica*.

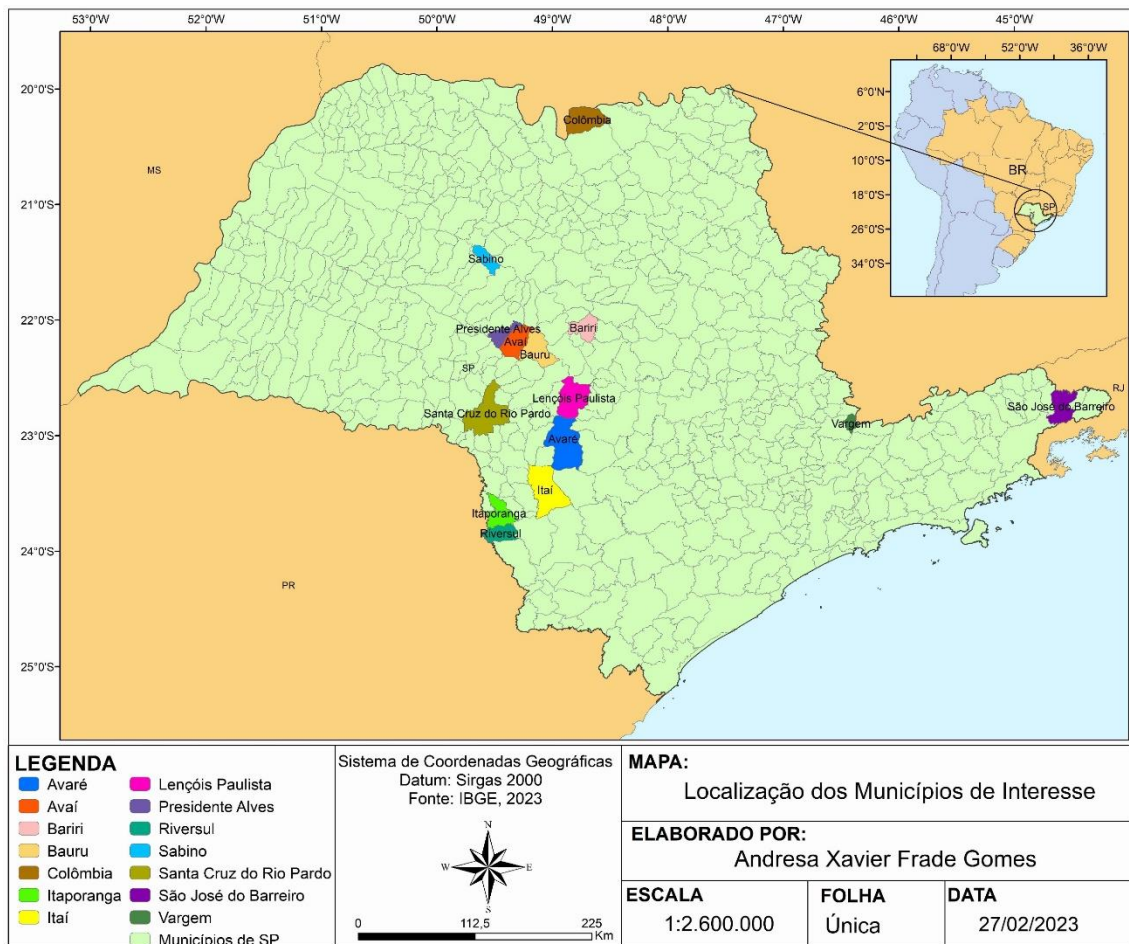


Figura 7. Mapa do estado de São Paulo com destaque para amostras positivas para *Fasciola hepatica* à PCR e seu respectivo município. Em vermelho, sete amostras positivas ao *primer* COX1 - Avaré (1), Bariri (4) e Vargem (2). Em amarelo, amostras positivas ao *primer* FhCO1 – Riversul (2).

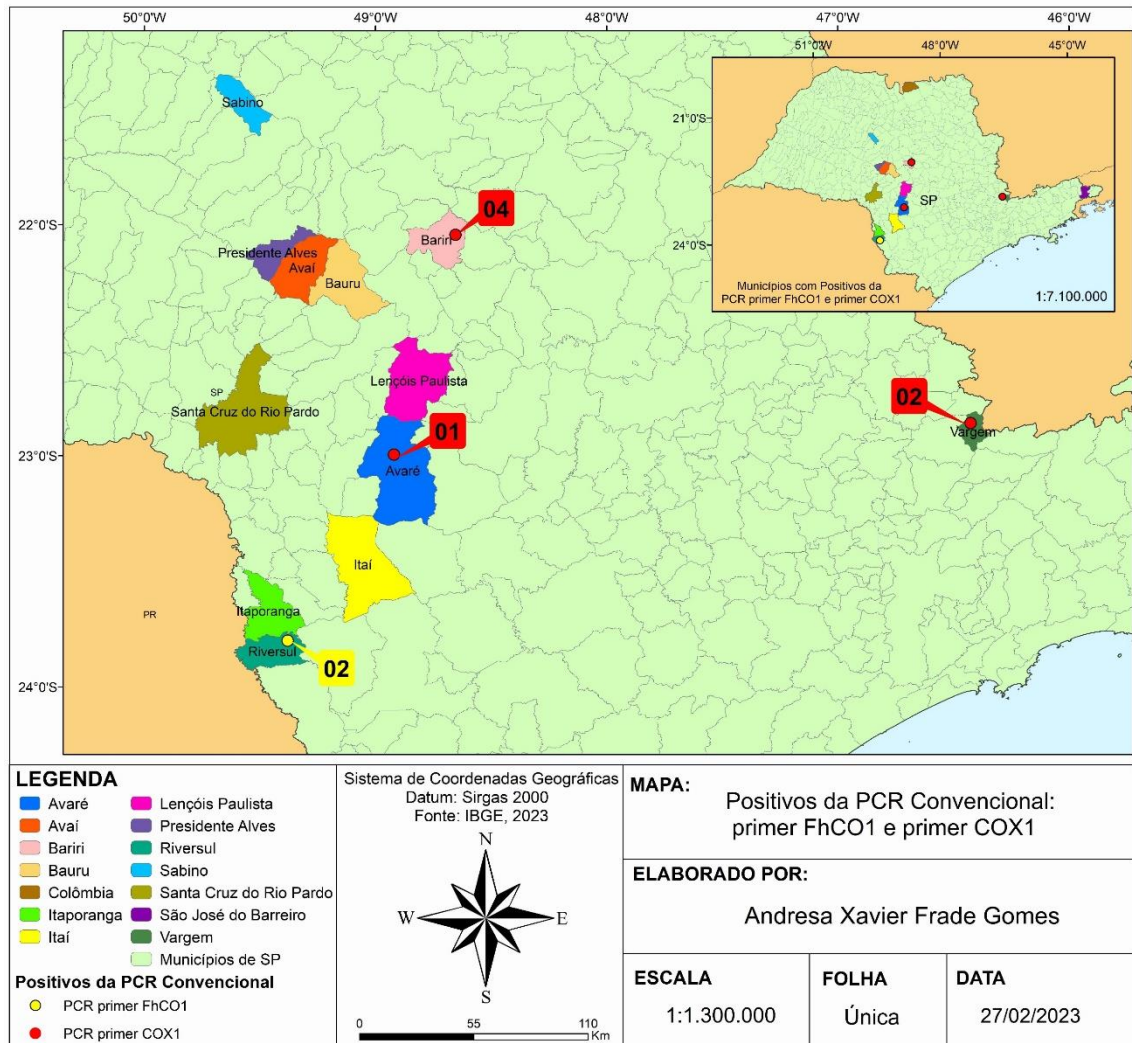


Figura 8. Mapa do estado de São Paulo com as amostras positivas para *Fasciola hepatica* destacando os municípios de origem das 64 amostras positivas pela técnica de qPCR – Bariri (4), Bauru (1), Itaporanga (3), Itai (8), Lençóis Paulista (8), Presidente Alves (13), Riversul (13), Santa Cruz do Rio Pardo (6), Vargem (8).

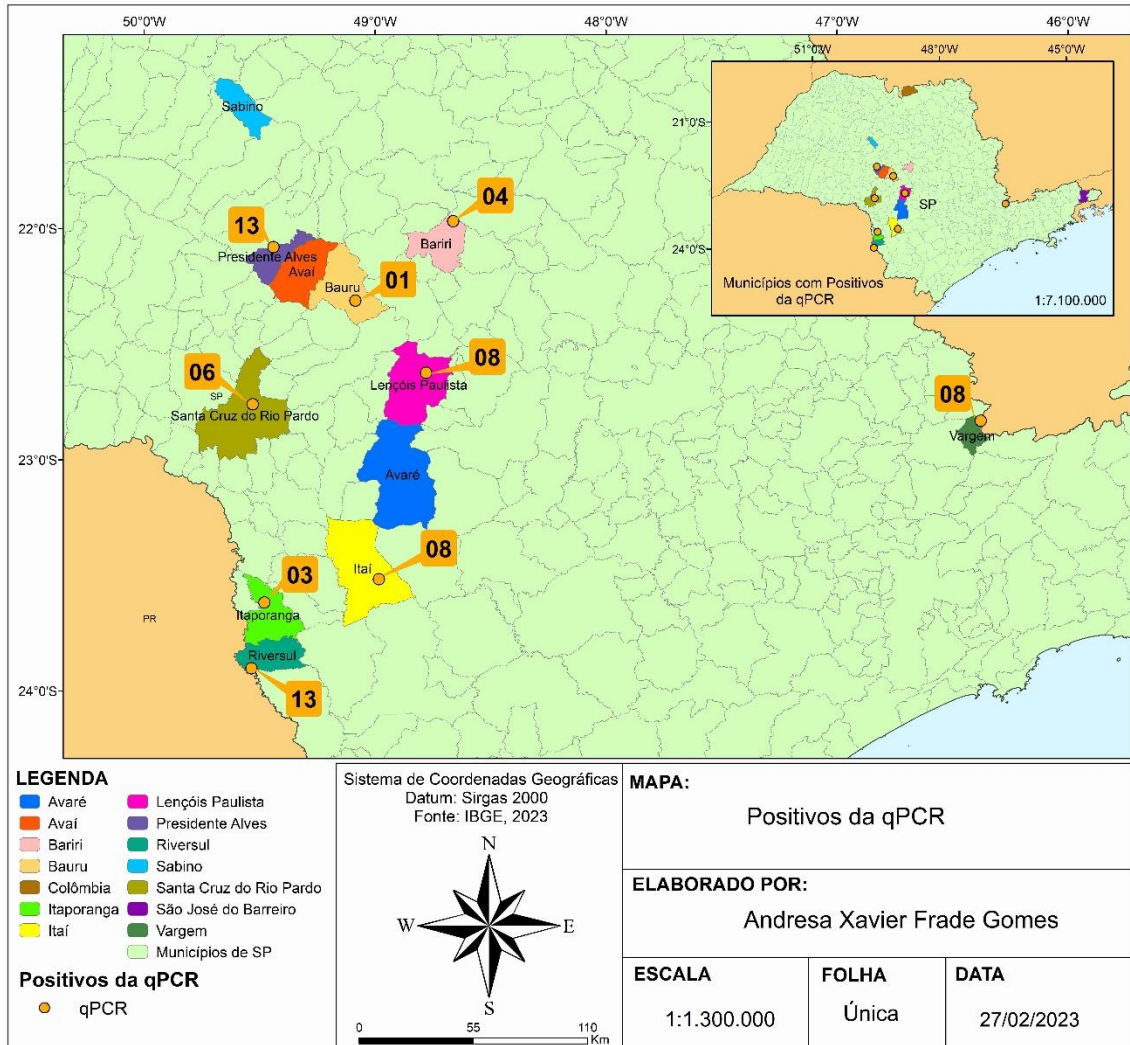
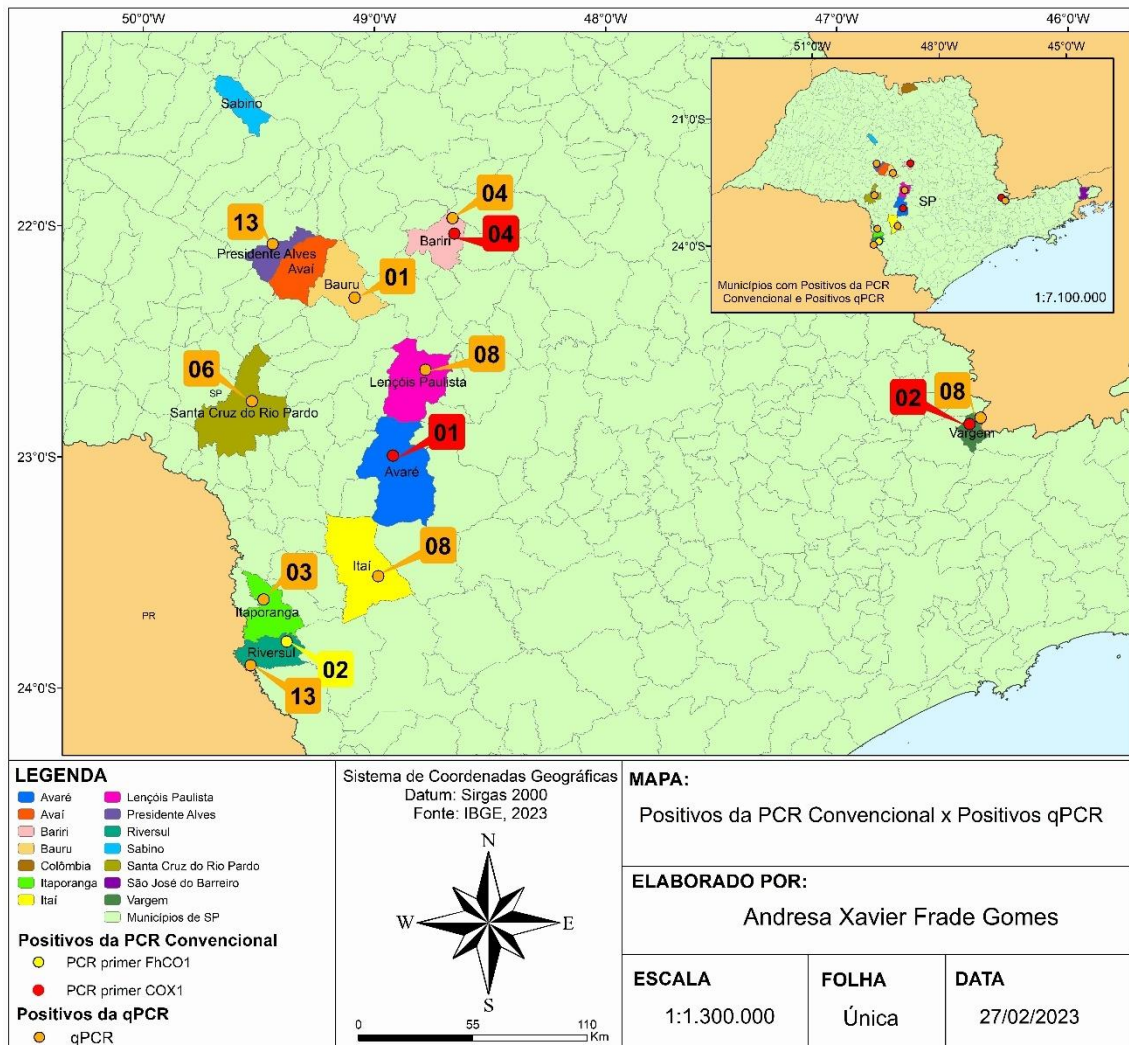


Figura 9. Mapa dos municípios do estado de São Paulo e comparação das amostras positivas para *Fasciola hepatica* pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase para os dois pares de *primers* (em amarelo, o *primer* FhCO1 e em vermelho, o *primer* COX1) e pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR), destacado na cor laranja.



9. DISCUSSÃO

As perdas econômicas e reprodutivas resultantes da infecção por *F. hepatica* frequentemente não recebem a devida atenção ou são confundidas com outras enfermidades, o que pode acarretar a subnotificação de sua ocorrência no estado de São Paulo.

A fim de auxiliar em seu diagnóstico e trazer luz à sua importância como problema de saúde pública, procedeu-se a pesquisa molecular de *F. hepatica* a partir de amostras de fígado bovino coletadas ainda na linha de abate no interior da região Centro-Oeste paulista, pela técnica de PCR e pelo exame de PCR em tempo real, bem como a distribuição dos casos pelo georreferenciamento em mapas do estado de São Paulo, Brasil.

Os resultados positivos dos exames de PCR e PCR em Tempo Real obtidos nesse estudo sugerem a dispersão da *F. hepatica* no interior do centro-oeste paulista, no universo amostral pesquisado.

Fasciola hepatica foi detectada pela primeira vez no Brasil em 1918 em bovinos e ovinos do Rio Grande do Sul (NEVES, 2005). Após isso, sua circulação em bovinos foi descrita em 1921 em trabalho publicado por Adolfo Lutz, que confirmou a suspeita de fasciolíase pelo exame de decantação de ovos extraídos da bile e das fezes desses animais, na Barra do Piraí, Rio de Janeiro. A época, Adolfo Lutz observou a ausência da *F. hepatica* e de caramujos *Lymnaea* em São Paulo e no Norte do país, o que sugere que a doença não havia se disseminado para essas regiões.

A presença do parasita no estado de SP permaneceu sem registros oficiais até 1967, quando o pesquisador França (1967), divulgou trabalho comprovando a existência de bovinos infectados com *F. hepatica* na região do Vale do Paraíba entre São Paulo e Rio de Janeiro. França verificou que 10% das fezes examinadas continham ovos do helminto, e com isso declarou pela primeira vez a presença da doença no estado.

A predominância de casos notificados no estado de São Paulo encontra-se no Vale do Paraíba. Esse fato é corroborado pela existência de um maior

número de pesquisas feitas nessa região (LUTZ, 1921; DOS SANTOS, VIEIRA; 1967; FRANÇA, 1967).

Após o estudo de França (1967), pessoas e animais domésticos da região do Vale do Paraíba (municípios de Taubaté, São Luiz do Paraitinga, Redenção da Serra, Caçapava, Paraibuna, Natividade da Serra e Jembeiro) foram examinadas em busca de novos casos de fasciolíase. Nesse mesmo ano, ficou comprovado por exame coproparasitológico e pela presença do caramujo do gênero *Lymnaea* nas regiões pesquisadas, a existência da *F. hepatica* e sua transmissão autóctone humana e animal, no estado de São Paulo, com sete casos humanos confirmados (DOS SANTOS; VIEIRA, 1967).

A infecção humana acontece por meio da ingestão de metacercárias em água ou hortifruti contaminados. Entretanto, não se descarta outras formas de transmissão, como por exemplo, pelo consumo de fígado cru e migração da metacercária. Essa forma costuma ocorrer em países onde há o hábito de ingestão de alimentos crus. As pessoas mais susceptíveis são aquelas que habitam zonas rurais onde geralmente compartilham a fonte de água com animais domésticos (MAS-COMAS et al., 2019).

As mudanças climáticas, atribuídas ao aquecimento global, podem estar modificando o ciclo de transmissão da doença e conseqüentemente aumentando gradativamente o número de casos em pessoas desde os anos 80. Esse fato pode ser explicado devido a modificação do ciclo natural da *Fasciola*, que sofre adaptações quando há maior disponibilidade de chuvas, além da irrigação de plantações e cultivos em locais não explorados anteriormente, sendo a água um meio essencial para propagação do parasita (MAS-COMA et al., 2009). A fasciolíase já foi reportada em 51 países ao redor do mundo, nos 5 continentes. Estima-se que 17 milhões de pessoas possam estar infectadas, com os relatos de de 2500 casos em 1990 para 2,4 milhões em 2019 (MAS-COMAS et al., 2019).

O estado de São Paulo faz divisa com os estados de Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná e Rio de Janeiro (IBGE, 2021). Essas regiões possuem características geográficas e climáticas semelhantes, podendo oferecer condições adequadas para a sobrevivência e reprodução do parasita.

A presença de animais silvestres infectados com *F. hepatica* próximos aos bovinos também é um fator importante na disseminação do helminto, fato observado por Martins et al. (2021), no estado do Estado do Espírito Santo (Brasil), onde comprovou-se a presença do parasita em fezes de capivaras. Essa, por sua vez, atua como reservatório silvestre, possivelmente contribuindo para a expansão geográfica deste agente zoonótico.

No estado de São Paulo, Labruna et al. (2018) descreveram um surto de fasciolíase em capivaras do Parque Alberto Lofgren, na cidade de São Paulo. Durante um ano, houve uma queda na população de capivaras, que contava com 12 a 13 indivíduos, para apenas dois. Seis capivaras foram submetidas a necropsia para avaliação da causa das mortes. Foi possível observar que esses animais apresentaram lesões graves no fígado e presença de vermes hepáticos da espécie *F.hepatica*. O exame de fezes das cinco capivaras restantes detectou ovos do mesmo verme. Esse resultado sugere que apesar das infecções por esse parasita não sejam comuns na região, esse grupo de animais ainda é vulnerável a surtos letais da doença.

Outro estudo realizado por Dracz et al. (2016) em Confins, Minas Gerais, Brasil, verificou a presença de ovos de *F. hepatica* a partir de fezes frescas de capivaras próximo a lagos, o que possibilita a expansão e distribuição geográfica da fasciolíase na região, necessitando-se de controle epidemiológico para esta zoonose.

Em relação ao estado do Paraná, Kouba et al. (2005), buscaram determinar a prevalência de ovos de *F. hepatica* e parasitas intestinais, e a presença de caramujos no habitat utilizado pelas ferais nútrias (*Myocastor coypus*), também conhecidas como rato-do-banhado, em uma área protegida em Curitiba, Brasil. Foram examinadas as fezes de 16 nútrias e os resultados demonstraram a prevalência geral de fezes de nove animais (56,25%) contendo ovos do parasita. Os caramujos encontrados foram *Physa cubensis*, *Physa marmorata* e *Biomphalaria tenagophyla*. Isso demonstra que as nútrias infectadas podem servir como fonte de infecção para outros animais, humanos e contaminação para a água.

A movimentação de animais entre os estados que fazem fronteira com São Paulo é comum, seja para fins de criação ou comércio. Isso aumenta o risco de disseminação da infecção, uma vez que animais infectados podem albergar o parasita e contaminar novas áreas.

A vigilância nesses locais é essencial para monitorar a presença da *F.hepatica*, identificar áreas de maior risco, implementar medidas de controle adequadas e prevenir a disseminação da infecção. Isso pode envolver a realização de exames parasitológicos em animais, monitoramento da qualidade da água e programas de educação e conscientização para os criadores de animais e a população em geral.

Há um histórico bem descrito de relatos sobre casos de infecção por *F. hepatica* humana e animal no país, datados desde o início do século XX. Foram relatados 48 casos de fasciolíase humana no Brasil desde 1958. A maioria dos casos (43,7%) ocorreu na região Sul do país, seguida pela região Sudeste (25%) e Norte (23%) (PRITSCH; MOLENTO, 2018). O caso mais recente registrado no Brasil foi descrito por Pritsch et al. (2019), que relataram o primeiro caso de fasciolíase humana no estado de Santa Catarina, Brasil. Uma paciente de 57 anos com dores abdominais foi diagnosticada com *F. hepatica* por meio de ultrassom e ELISA indireto.

Apenas 4,2% dos casos humanos ocorreram no Nordeste e Centro-Oeste. Os estados com o maior número de casos relatados foram Paraná (20), seguido por Amazonas (11) e São Paulo, com sete casos (PRITSCH; MOLENTO, 2018).

Estudos relacionados à presença e ocorrência da doença no país são desigualmente distribuídos. Existe um maior número de registros publicados nos estados do Sul do Brasil, onde o impacto econômico é mais evidente, tendo em vista que o maior número de casos concentra-se no estado do Rio Grande do Sul. Entretanto, isso reflete na baixa quantidade de publicações sobre a presença da parasitose não só no estado de São Paulo, como no restante do país (BENNEMA et al., 2014).

Em revisão de literatura sobre a expansão geográfica da *F. hepatica* e sua disseminação no Brasil, após reunir diversos estudos publicados no país,

Oliveira; Resende (2017) concluíram que o clima é uma limitação para a disseminação territorial do ciclo biológico da fasciolíase. Os primeiros casos foram notificados no início do século XX no Sul do Brasil e apenas no século XXI há os primeiros registros de sua presença na região Norte. Já a região Nordeste apresenta apenas indícios da existência de casos, ainda sem confirmação definitiva. Os dados obtidos sugerem que é uma questão de tempo até que o parasita seja encontrado em todas as regiões, visto a alta gama de hospedeiros definitivos que podem se infectar, mantendo assim, o ciclo na natureza.

Esclarecimentos quanto as condições ecológicas, epidemiológicas e climáticas nos municípios mencionados neste trabalho e também no estado de São Paulo, necessitam de maior esclarecimento, tendo em vista a influência clara desses fatores para ocorrência do ciclo completo da *Fasciola*. É sabido que a presença de água e existência do caramujo *Lymanaea* são fatores obrigatórios para a ocorrência do ciclo. A pesquisa malacológica deve ser levada em consideração ao realizar medidas de profilaxia e controle do parasita.

Mapeando a distribuição da fasciolíase no Brasil, Bennema et al., (2014), agruparam os dados disponíveis no SIF sobre o abate de bovinos entre os anos de 2002 e 2011, e encontraram discrepâncias significativas na prevalência da doença entre os estados. Observou-se que as regiões com maior prevalência de casos no Brasil são as Centro-Oeste e Sul. Nesse mesmo estudo, ficou comprovado que 192 municípios de São Paulo registraram a presença de *F. hepatica* em fígado de bovinos na inspeção *post-mortem*, o que gerou a prevalência de 0,09% no estado.

Já em 2021, o censo agropecuário do IBGE contabilizou o rebanho do estado de São Paulo em 10.718.494 milhões de cabeças de gado bovino (bois e vacas). Dados disponibilizados pelo site do MAPA (2023) mostram que de fevereiro de 2021 até fevereiro de 2023, foram notificados pelo SIF 4.552 casos de fasciolíase apenas no estado de São Paulo. Segundo esse resultado, a prevalência estimada atualmente para *F. hepatica* no estado de SP é de 0,42%.

No presente estudo, as prevalências encontradas no universo amostral pesquisado variaram de acordo com cada município, ultrapassando a média

estadual, como o caso da cidade de Lençóis Paulista e Vargem, onde 8 das 10 amostras avaliadas (80%) foram positivas para presença de *Fasciola* no exame de qPCR.

Os municípios avaliados neste trabalho, quando comparados, mostram grande variação de prevalências de uma região para outra, que vão de 14,3% à 80%. Para além da variação na quantidade de amostras coletadas em cada cidade, tal fator pode ser atribuído as diferenças ambientais, como índice pluviométrico, temperatura, clima, topografia e perfil do rebanho, além da relação do município com o nível do mar.

A relação da fasciolíase com o nível do mar foi tratada por Silva et al. (2020), e correlacionou altitude e clima no estado de Santa Catarina, demonstrando que os casos da doença mantiveram-se elevados o ano todo ao longo das estações, concluindo que a parasitose está mais relacionada à altitude dos municípios quanto ao nível do mar, do que aos índices pluviométricos. Estender esse estudo ao estado de São Paulo pode ajudar a entender a distribuição e a presença dos casos aqui encontrados.

Ao buscar pela destino final do fígado de bovinos de ambos os sexos entre fevereiro de 2021 até fevereiro de 2023 no site do Ministério da Agricultura (MAPA, 2023), houve condenação total de 4.272 fígados de bovinos acometidos por fasciolíase. O destino final dos fígados utilizados no presente estudo não foi determinado.

Condenações hepáticas totais tem alto impacto econômico para o produtor de forma direta e indireta, assim como para os frigoríficos. Diretamente, o matadouro frigorífico perde dinheiro por quilo de fígado condenado. Indiretamente, o parasitismo prejudica o ganho de peso, reduzem a fertilidade, diminuem a imunidade e assim deixam o animal susceptível a outras doenças, e em casos graves pode levar à óbito.

Ainda em relação as perdas econômicas, um estudo realizado por Rosa (2016) relativo a inspeção de fígado de bovinos em frigoríficos fiscalizados pelo SIF, entre o período de 2010 a 2014, nos estados da região Sul do Brasil, o mais afetado foi o Rio Grande do Sul. O prejuízo estimado foi de R\$ 18.461.718,00

milhões pela condenação de fígados bovino. Dos 4.062.788 milhões de bois abatidos no período, 559.446 mil foram condenados por fasciolose. À época, o valor da peça de fígado custava por volta de R\$ 33,00. Esses resultados demonstram a grande perda de potencial econômico e produtivo do rebanho em decorrência da parasitose.

Molento et al., (2018) avaliaram o impacto econômico das perdas pela doença no Brasil de 2002 a 2010, por estado. Foi possível visualizar a concentração dos danos nos três estados do Sul, sendo o Rio Grande do Sul o mais afetado, com US\$147 milhões de dólares perdidos. Em contraste, em todo o país estima-se um prejuízo de US\$ 210 milhões. O estado de São Paulo, por sua vez, teve um rombo de US\$114.615 mil por ano com a parasitose, e aparece em quarto lugar; enquanto Minas Gerais desponta em quinto, com US\$ 134.140 mil em perdas.

Sobre os métodos diagnósticos acessíveis, de acordo com Álvarez et al., (2014), é possível notar que ainda não há métodos sensíveis disponíveis para detecção da infecção por *F.hepatica* e a diferenciação do estado pré-patente de patente. O exame de PCR em amostras de fezes, considerado altamente sensível e muito específico, é capaz de discriminar infecção atual, porém apenas quando há formas adultas da *Fasciola*.

O diagnóstico definitivo e de alta acurácia para comprovação de *F.hepatica* é a visualização do parasita no exame *post-mortem*. Entretanto, esse não é um método de escolha sempre viável, visto que só pode ser utilizado em animais mortos, impedindo a realização do diagnóstico em rebanhos. Outras formas de detecção do parasita podem ser utilizadas, como contagem de ovos nas fezes, copro-ELISA, contagem de ovos em bile, anticorpo sérico ELISA (sELISA) e teste de ELISA para leite (SABATINI et al., 2023; MAZERI et al., 2017).

A Reação em Cadeia da Polimerase é comumente utilizada em diferentes países para diferenciar híbridos de *F. hepatica* e *F. gigantica* devido a morfometria e aferimento pela localização geográfica do parasita não serem completamente confiáveis (PENG et al., 2009; ICHIKAWA et al., 2016; THANG et al., 2019; KASAHARA et al., 2021).

Técnicas moleculares também parecem ser úteis como ferramentas de diagnóstico (MAS-COMAS, 2005).

Há vários trabalhos sobre a utilização da qPCR e desenvolvimento de probes para detecção de caramujos infectados com miracídio ou outras formas da *F.hepatica* (SHUBKIN et al., 1992; HEUSSELER et al., 1993; CUCHER et al., 2006).

Apesar de caro, o teste de qPCR oferece alta sensibilidade e especificidade. Cabada et al., (2016) realizaram experimentos que utilizaram qPCR e PCR em amostras de fezes com baixas cargas parasitárias. Os resultados mostraram sensibilidade de 87% e 66% respectivamente. Ambos foram 100% específicos. Os testes ainda mostraram-se eficientes por não ocasionar reação cruzada com outros parasitas cestódeos, trematódeos ou nematódeos, além de detectarem 47% e 26% de infecções que não foram diagnosticadas na microscopia.

Semelhante ao encontrado por Cabada et al., (2016), observou-se uma eficácia superior no exame de qPCR quando comparado a PCR. Enquanto a prevalência com a técnica convencional conseguiu detectar entre 14,4% e 5% de amostras positivas (para o *primer* FhCO1 e COX1, respectivamente), na PCR em tempo real a média de prevalência foi de 45,7%. Esse resultado sugere uma maior acurácia no teste em tempo real.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) preconiza o uso de saneante, como o hipoclorito de sódio (água sanitária), na proporção de 20mL em 1000L de água, para desinfecção de verduras e legumes antes de consumo humano, como forma de prevenção contra patógenos, de acordo com a Lei n° 6.360, de 23 de setembro de 1976 e a Resolução RDC n°59, de 17 de dezembro de 2010. Entretanto, de acordo com estudo realizado por Costa (2020), a utilização de água sanitária em concentrações até dez vezes maior do que a recomendada, não surtiu efeito quanto a destruição e viabilidade das metacercárias, sendo que estas continuaram infectantes para camundongos. Ainda são necessários mais estudos para se encontrar produtos capazes de destruir o parasita nos alimentos.

A prevalência da fasciolíase e a detecção molecular de *F. hepatica* em amostras de fígados de bovinos procedentes de fazendas localizadas em diferentes municípios da região Centro-Oeste Paulista, reforça a necessidade de novas pesquisas sobre o assunto na região, além de programas de controle de moluscos em áreas alagadas próximas ao convívio dos animais. É necessário fortalecer a qualidade e sanidade dos rebanhos para diminuir as perdas econômicas e melhorar as condições sanitárias dos mesmos. Além disso, também indica que pode haver casos subnotificados de infecções humanas nessas regiões, reforçando a necessidade de ações de vigilância epidemiológica rígidas, para o controle desta zoonose.

10. CONCLUSÃO

- Os resultados obtidos revelam a importância da avaliação diagnóstica para *Fasciola hepatica* em bovinos de corte procedentes dos municípios avaliados neste estudo, bem como em outras regiões da federação;

- O uso das provas moleculares, em especial a qPCR, foi uma ferramenta diagnóstica efetiva para a identificação dos animais parasitados;

- A distribuição a partir dos casos demonstrou que a fasciolíase está amplamente disseminada nos municípios avaliados e sugere um alerta para implementação de programas sanitários em busca da melhoria da sanidade do rebanho de bovinos de corte.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ALVAREZ ROJAS, C. A.; JEX, A. R.; GASSER, R. B.; SCHEERLINCK, J.-P. Y. Techniques for the diagnosis of *Fasciola* infections in animals. **Advances in Parasitology**, London, v. 85, p. 65-107, 2014. DOI 10.1016/b978-0-12-800182-0.00002-7.

AMER, S.; ELKHATAM, A.; ZIDAN, S.; FENG, Y.; XIAO, L. Identity of *Fasciola* spp. in sheep in Egypt. **Parasite and Vectors**, London, v. 9, p. 623, 2016. DOI 10.1186/s13071-016-1898-2.

BENNEMA, S. C.; SCHOLTE, R. G. C.; MOLENTO, M. B.; MEDEIROS, C.; CARVALHO, O. S. *Fasciola hepatica* in bovines in Brazil: data availability and spatial distribution. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 56, n. 1, p. 35-41, 2014. DOI 10.1590/s0036-46652014000100005.

BOWMAN, D. D. **Georgis parasitologia veterinária**. 9. ed. Rio De Janeiro: Elsevier, 2010. cap. 4, p. 284-290.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Quantitativo de doença por procedência**. Brasília: MAPA, 2023. Disponível em: https://sistemas.agricultura.gov.br/pgs_sigsif/pages/view/sigsif/relatoriadoencaanimal/index.xhtml. Acesso em: 8 mar. 2023.

CABADA, M. M.; MALAGA, J. L.; CASTELLANOS-GONZALEZ, A.; BAGWELL, K. A.; NAEGER, P. A.; ROGERS, H. K.; MAHARSI, S.; MBAKA, M.; WHITE JÚNIOR, A. C. Recombinase polymerase amplification compared to real-time polymerase chain reaction test for the detection of *Fasciola hepatica* in human stool. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 96, n. 2, p. 341-346, 2016. DOI 10.4269/ajtmh.16-0601.

CALVANI, N. E. D.; WINDSOR, P. A.; BUSH, R. D.; ŠLAPETA, J. Scrambled eggs: a highly sensitive molecular diagnostic workflow for *Fasciola* species specific detection from faecal samples. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 11, n. 9, p. e0005931, 2017. DOI 10.1371/journal.pntd.0005931.

CARNEIRO, M. B.; LIMA, A. G.; FAZIO JUNIOR, P. I.; TAVARES, P. V.; MAGALHÃES, V. S.; MARTINS, I. V. F.; NUNES, L. C. Triclabendazole effectiveness of treatment in fasciolosis clinical goats in Jerônimo Monteiro, ES. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 34, p. 1-4, 2012. Supl. 1.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Fascioliasis**. Atlanta: CDC, DPDx, 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/fascioliasis/index.html>. Acesso em: 8 mar. 2023.

CHARLIER, J.; VERCRUYSSSE, J.; MORGAN, E.; VAN DIJK, J.; WILLIAMS, D. J. L. Recent advances in the diagnosis, impact on production and prediction of

Fasciola hepatica in cattle. **Parasitology**. London, v. 141, n. 3, p. 326-335, 2013. DOI 10.1017/s0031182013001662.

COSTA, A. L. O. **Ação do hipoclorito de sódio sobre metacercárias de *Fasciola hepatica***. 2020. 87 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1843/42512>. Acesso em: 6 mar. 2023.

COSTA, A. M. C. B. **Fasciolose bovina: aspectos clínicos e epidemiológicos no Alentejo**. 2010. 102 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10400.5/2485>. Acesso em: 6 ago. 2022.

CUCHER, M. A.; CARNEVALE, S.; PREPELITCHI, L.; LABBÉ, J. H.; WISNIVESKY-COLLI, C. PCR diagnosis of *Fasciola hepatica* in field-collected *Lymnaea columella* and *Lymnaea viatrix* snails. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 137, n. 1-2, p. 74-82, 2006. DOI 10.1016/j.vetpar.2005.12.013.

CWIKLINSKI, K.; DALTON, J. P. Advances in *Fasciola hepatica* research using 'omics' technologies, **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 48, n. 5, p. 321-331, 2018. DOI 10.1016/j.ijpara.2017.12.001.

DRACZ, R. M. Aspectos epidemiológicos de *Fasciola hepatica* nos municípios de Pedro Leopoldo e São José da Lapa - Minas Gerais, e avaliação da infecção experimental em ovinos da raça Santa Inês. **Repositorio UFMG**, 18 mar. 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/BUBD-AP7NCT>

DEAN, A. G.; SULLIVAN, K. M.; SOE, M. M. **OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Version**. Atlanta: OpenEpi, 2015. Disponível em: www.OpenEpi.com. Acesso em: 5 abr. 2023. Acesso em 01. Jan.2023.

FRANÇA, I. *Fasciola hepatica* em bovinos no Vale do Paraíba, Estado de São Paulo-Brasil. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 19, p. 157-159, 1967.

GONZÁLEZ-MIGUEL, J.; BECERRO-RECIO, D.; SILES-LUCAS, M. Insights into *Fasciola hepatica* Juveniles: crossing the Fasciolosis Rubicon. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 37, n. 1, p. 35-47, 2020. DOI 10.1016/j.pt.2020.09.007.

HEUSSLER V, KAUFMANN H, STRAHM D, LIZ J, DOBBELAERE D. DNA probes for the detection of *Fasciola hepatica* in snails. **Molecular Cell Probes**. 1993 Aug;7(4):261-7. doi: 10.1006/mcpr.1993.1039. PMID: 8232342. Aceso em: 10. Abr.2023.

ICHIKAWA-SEKI, M.; ORTIZ, P.; CABRERA, M.; HOBÁN, C.; ITAGAKI, T. Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Fasciola hepatica* from Peru. **Parasitology International**, Amsterdam, v. 65, n. 3, p. 171-174, 2016. DOI 10.1016/j.parint.2015.11.010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Cidades e Estados**: São Paulo. Rio de Janeiro: IBGE, 2021. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/sp.html>. Acesso em: 4 mar. 2023.

KAPLAN, R. M. *Fasciola hepatica*: a review of the economic impact in cattle and considerations for control. **Veterinary Therapeutics: Research in Applied Veterinary Medicine**, Yardley, v. 2, n. 1, p. 40-50, 2001.

KASAHARA, S.; OHARI, Y.; JIN, S.; CALVOPINA, M.; TAKAGI, H.; SUGIYAMA, H.; ITAGAKI, T. Molecular characterization revealed *Fasciola* specimens in Ecuador are all *Fasciola hepatica*, none at all of *Fasciola gigantica* or parthenogenic *Fasciola* species. **Parasitology International**, Amsterdam, v. 80, p. 102215, 2021. DOI 10.1016/j.parint.2020.102215.

KOUBA, M. M. A. N. E. Aspectos gerais da fasciolose e das endoparasitoses em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris* - linnaeus - 1766) e ratões do banhado (*Myocator coytus* - molina, 1782) residentes em três parques do estado do Paraná. **Biblioteca Virtual em Medicina Veterinária e Zootecnia**, p. 75–75, 2005.

LABRUNA, M. B. et al. Lethal Fascioliasis in Capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in Brazil. **The Journal of Parasitology**, v. 104, n. 2, p. 173–176, 1 abr. 2018. doi: 10.1645/17-114

LUTZ, A. Sobre a ocorrência da *Fasciola hepatica* no Estado do Rio de Janeiro. In: BENCHIMOL, J. L.; SÁ, M. R. (ed.). **Adolpho Lutz**: Helmintologia. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2007. v. 3, livro 2, p. 665-668. Disponível em: <https://books.scielo.org/id/sqn87/pdf/benchimol-9788575412312-66.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2023.

MARTINELLI, M. Clima do estado de São Paulo. **Confins**, São Paulo, n. 8, 2010. DOI 10.4000/confins.6348.

MARTINS, I. V. F. et al. Confirmação molecular de infecção por *Fasciola hepatica* em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) do Estado do Espírito Santo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, p. e000221, 28 maio 2021. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612021027>

MARTÍNEZ-PÉREZ, J. M.; ROBLES-PÉREZ, D.; ROJO-VÁZQUEZ, F. A.; MARTÍNEZ-VALLADARES, M. Comparison of three different techniques to diagnose *Fasciola hepatica* infection in experimentally and naturally infected sheep. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 190, n. 1-2, p. 80-86, 2012. DOI 10.1016/j.vetpar.2012.06.002.

MAS-COMA, S.; BARGUES, M. D.; VALERO, M. A. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 35, n. 11-12, p. 1255-1278, 2005. DOI 10.1016/j.ijpara.2005.07.010.

MAS-COMA, S.; VALERO, M. A.; BARGUES, M. D. Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis.

Veterinary Parasitology, Amsterdam, v. 163, n. 4, p. 264-280, 2009. DOI 10.1016/j.vetpar.2009.03.024.

MAS-COMA, S.; VALERO, M. A.; BARGUES, M. D. Fascioliasis. *In*: TOLEDO, R.; FRIED, B. (ed.). **Digenetic trematodes**. New York: Springer, 2019. (Advances in Experimental Medicine and Biology, 1154). p. 71-103. DOI 10.1007/978-3-030-18616-6_4.

MAZERI, S.; RYDEVIK, G.; HANDEL, I.; BRONSVOORT, B. M. D.; SARGISON, N. Estimation of the impact of *Fasciola hepatica* infection on time taken for UK beef cattle to reach slaughter weight. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 1, p. 7319, 2017. DOI 10.1038/s41598-017-07396-1.

MENDES, E. A. **Comportamento e desenvolvimento de *Fasciola hepática* (Linnaeus, 1758), de bovinos naturalmente infectados em sagüi (*Callithrix penicillata*) e gerbil (*Meriones unguiculatus*)**. 2006. 127 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1843/SAGF-6YDH5C>. Acesso em: 6 abr. 2023.

MEZO, M.; GONZALEZ-WARLETA, M.; CARRO, C.; UBEIRA, F. M. An ultrasensitive capture ELISA for detection of *Fasciola hepática* coproantigens in sheep and cattle using a new monoclonal antibody (MM3). **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 90, n. 4, p. 845-852, 2004. DOI [10.1645/GE-192R](https://doi.org/10.1645/GE-192R).

MOLENTO, M. B.; BENNEMA, S.; BERTOT, J.; PRITSCH, I. C.; ARENAL, A. Bovine fascioliasis in Brazil: economic impact and forecasting. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, Amsterdam, v. 12, p. 1-3, 2018. DOI 10.1016/j.vprsr.2017.12.004.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

OLIVEIRA, D. M.; RESENDE, P. O. *Fasciola hepatica*: ecologia e trajetória histórico-geográfica pelo Brasil. **Estação Científica (UNIFAP)**, Macapá, v. 7, n. 2, p. 9-19, 2017.

PENG, M.; ICHINOMIYA, M.; OHTORI, M.; ISHIKAWA, M.; SHIBAHARA, T.; ITAGAKI, T. Molecular characterization of *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, and aspermic *Fasciola* sp. in China based on nuclear and mitochondrial DNA. **Parasitology Research**, Berlin, v. 105, n. 3, p. 809-815, 2009. DOI 10.1007/s00436-009-1459-0.

ROSA, M. C. **Prevalência de fasciolose em bovinos abatidos sob regime de inspeção federal no Estado do Rio Grande do Sul**. 2016. 29 f. Monografia (Especialização em produção, tecnologia e higiene de alimentos de origem animal) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/127066>. Acesso em: 6 abr. 2023.

SABATINI, G. A.; BORGES, F. A.; CLAEREBOUT, E.; GIANECHINI, L. S.; HÖGLUND, J.; KAPLAN, R. M.; LOPES, W. D. Z.; MITCHELL, S.; RINALDI, L.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; STEFFAN, P.; WOODGATE, R. Practical guide to the diagnostics of ruminant gastrointestinal nematodes, liver fluke and lungworm infection: interpretation and usability of results. **Parasitology Vectors**, London, v. 16, n. 1, p. 58, 2023. DOI 10.1186/s13071-023-05680-w.

SANTOS, L.; VIEIRA, T. Considerações sobre os sete primeiros casos de fasciolose humana encontrados no Vale do Paraíba, Estado de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 25, p. 95-110, 1965/67. DOI 10.53393/rial.1965.v25.33432.

SARKARI, B.; MANSOURI, M.; GHADIMI, S. N.; KHABISI, S. A.; DOSHMANSIARI, A. Molecular evaluation of a case of *Fasciola hepatica* in Wild Boar in Southwestern Iran: a case report. **Iran Journal Parasitology**, Tehran, v. 13, n. 1, p. 149-155, 2018.

SHUBKIN, C. D.; WHITE, M. W.; ABRAHAMSEN, M. S.; RONGLIE, M. C.; KNAPP, S. E. A nucleid acid-based test for detection of *Fasciola hepatica*. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 78, n. 5, p. 817-821, 1992.

SILVA, A. E. P.; FREITAS, C. C.; DUTRA, L. V.; MOLENTO, M. B. Correlation between climate data and land altitude for *Fasciola hepatica* infection in cattle in Santa Catarina, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, São Paulo, v. 29, n. 3, p. e008520, 2020. DOI 10.1590/s1984-29612020065.

THANG, T. N.; HAKIM, H.; RAHIMI, R. R.; ICHIKAWA-SEKI, M. Molecular analysis reveals expansion of *Fasciola hepatica* distribution from Afghanistan to China. **Parasitology International**, Amsterdam, v. 72, p. 101930, 2019. DOI 10.1016/j.parint.2019.101930.

TOLAN JUNIOR, R. W. Fascioliasis due to *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* infection: an update on this “neglected” neglected tropical disease. **Laboratory Medicine**, Chicago, v. 42, n. 2, p. 107-116, 2011. DOI 10.1309/Imlfbb8pw4sa0yji.

WEBB, C. M.; CABADA, M. M. Recent developments in the epidemiology, diagnosis, and treatment of *Fasciola* infection. **Current Opinion in Infectious Diseases**, London, v. 31, n. 5, p. 409-414, 2018. DOI 10.1097/QCO.0000000000000482.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Food and Agriculture Organization of the United States (FAO), World Organization For Animal Health (OIE). **Foodborn parasitic infections: Fascioliasis (Liver fluke)**. Geneva: WHO, 2021. Disponível em: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/search/food-safety/fascioliasis.pdf?sfvrsn=4a8a2f97_2. Acesso em: 26 set. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Neglected tropical diseases: fascioliasis**. Geneva: WHO, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/q-a-on-fascioliasis>. Acesso em: 12 set. 2022.

ZACHARY, J. F. **Bases da patologia em veterinária**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018

*Referências de acordo com a ABNT NBR 6023:2018.

ANEXOS

ANEXO 1. Documento de aprovação - CEUA - Comitê de Ética Animal.



ATESTADO

Atesto que o Projeto "AVALIAÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR PARA Fasciola hepatica EM BOVINOS ABATIDOS EM FRIGORÍFICO DO CENTRO-OESTE PAULISTA" **Protocolo CEUA 0047/2021**, a ser conduzido por Andresa Xavier Frade Gomes, responsável/orientador Simone Baldini Lucheis, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	01/06/2021 a 07/12/2022
Nome Comum / Espécie / Linhagem	BOVINA / BOS INDICUS /
Raça	
Nº de animais machos	0
Nº de animais fêmeas	0
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	0
Peso médio de animais fêmeas	0
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	0 ano(s) e 14 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	Frigorífico localizado na região Centro-Oeste

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 19/05/2021

JOSÉ NICOLAU PRÓSPERO PUOLI FILHO
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

ANEXO 2.

Quadro 3. Resultado geral da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e PCR em tempo real (qPCR) para *Fasciola hepatica* a partir de fígado de 140 bovinos abatidos em frigorífico do Centro-Oeste Paulista e municípios de procedência.

ANIMAL	PROCEDÊNCIA	PCR primer COX1	PCR primer FhCO1	qPCR
1	Riversul	Negativo	Negativo	Negativo
2	Riversul	Negativo	Negativo	Negativo
3	Riversul	Negativo	Negativo	Negativo
4	Riversul	Negativo	Negativo	Negativo
5	Riversul	Negativo	Negativo	Negativo
6	Itaí	Negativo	Negativo	Negativo
7	Itaí	Negativo	Negativo	Negativo
8	Sabino	Negativo	Negativo	Negativo
11	Avaí	Negativo	Negativo	Negativo
12	Avaí	Negativo	Negativo	Negativo
13	Presidente Alves	Negativo	Negativo	Negativo
14	Presidente Alves	Negativo	Negativo	Negativo
15	Presidente Alves	Negativo	Negativo	Negativo
16	Avaí	Negativo	Negativo	Negativo
17	Avaí	Negativo	Negativo	Negativo
18	Avaí	Negativo	Negativo	Negativo
19	Avaí	Negativo	Negativo	Negativo
20	Avaí	Negativo	Negativo	Negativo
21	Colombia	Negativo	Negativo	Negativo
22	Colombia	Negativo	Negativo	Negativo
23	Colombia	Negativo	Negativo	Negativo
25	Colombia	Negativo	Negativo	Negativo
26	Colombia	Negativo	Negativo	Negativo
30	Sta Cruz Rio do Rio Pardo	Negativo	Negativo	Negativo
31	Sta Cruz Rio do Rio Pardo	Negativo	Negativo	Negativo
33	Sta Cruz Rio do Rio Pardo	Negativo	Negativo	Negativo
34	Sta Cruz Rio do Rio Pardo	Negativo	Negativo	Negativo

36	Sta Cruz Rio do Rio Pardo	Negativo	Negativo	Negativo
37	Sta Cruz Rio do Rio Pardo	Negativo	Negativo	Negativo
38	Sta Cruz Rio Pardo	Negativo	Negativo	Negativo
39	São José do Barreiro	Negativo	Negativo	Negativo
40	Sta Cruz Rio Pardo	Negativo	Negativo	Negativo
41	Riversul	Negativo	Negativo	Negativo
42	Riversul	Negativo	Negativo	Negativo
43	Riversul	Negativo	Negativo	Negativo
44	Bauru	Negativo	Negativo	Negativo
45	Bauru	Negativo	Negativo	Negativo
46	Bauru	Negativo	Negativo	Negativo
47	Bauru	Negativo	Negativo	Negativo
48	Bauru	Negativo	Negativo	Negativo
49	Bauru	Negativo	Negativo	Positivo
50	Bauru	Negativo	Negativo	Negativo
51	Sta Cruz Rio Pardo	Negativo	Negativo	Positivo
52	Sta Cruz Rio Pardo	Negativo	Negativo	Positivo
53	Sta Cruz Rio Pardo	Negativo	Negativo	Negativo
54	Sta Cruz Rio Pardo	Negativo	Negativo	Positivo
55	Sta Cruz Rio Pardo	Negativo	Negativo	Negativo
56	Sta Cruz Rio Pardo	Negativo	Negativo	Negativo
57	Sta Cruz Rio Pardo	Negativo	Negativo	Positivo
58	Sta Cruz Rio Pardo	Negativo	Negativo	Positivo
59	Sta Cruz Rio Pardo	Negativo	Negativo	Negativo
60	Sta Cruz Rio Pardo	Negativo	Negativo	Positivo
61	Itaí	Negativo	Negativo	Positivo
62	Itaí	Negativo	Negativo	Negativo
63	Itaí	Negativo	Negativo	Negativo

64	Itaí	Negativo	Negativo	Negativo
65	Itaí	Negativo	Negativo	Negativo
66	Itaí	Negativo	Negativo	Positivo
67	Itaí	Negativo	Negativo	Positivo
68	Itaí	Negativo	Negativo	Positivo
69	Itaí	Negativo	Negativo	Negativo
71	Itaí	Negativo	Negativo	Positivo
72	Itaí	Negativo	Negativo	Negativo
73	Itaí	Negativo	Negativo	Positivo
74	Itaí	Negativo	Negativo	Positivo
75	Itaí	Negativo	Negativo	Positivo
76	Lençóis Paulista	Negativo	Negativo	Positivo
77	Lençóis Paulista	Negativo	Negativo	Positivo
78	Lençóis Paulista	Negativo	Negativo	Positivo
79	Lençóis Paulista	Negativo	Negativo	Positivo
80	Lençóis Paulista	Negativo	Negativo	Positivo
81	Riversul	Negativo	Negativo	Positivo
82	Riversul	Negativo	Negativo	Positivo
83	Riversul	Negativo	Negativo	Positivo
84	Riversul	Negativo	Negativo	Positivo
85	Riversul	Negativo	Negativo	Positivo
86	Vargem	Positivo	Negativo	Positivo
87	Vargem	Positivo	Negativo	Positivo
88	Vargem	Negativo	Negativo	Negativo
89	Vargem	Negativo	Negativo	Positivo
90	Vargem	Negativo	Negativo	Positivo
91	Vargem	Negativo	Negativo	Positivo
92	Vargem	Negativo	Negativo	Negativo
93	Vargem	Negativo	Negativo	Positivo
94	Vargem	Negativo	Negativo	Positivo
95	Vargem	Negativo	Negativo	Positivo
96	Lençóis Paulista	Negativo	Negativo	Negativo
97	Lençóis Paulista	Negativo	Negativo	Positivo
98	Lençóis Paulista	Negativo	Negativo	Negativo

99	Lençóis Paulista	Negativo	Negativo	Positivo
100	Lençóis Paulista	Negativo	Negativo	Positivo
102	Presidente Alves	Negativo	Negativo	Negativo
103	Presidente Alves	Negativo	Negativo	Negativo
104	Presidente Alves	Negativo	Negativo	Positivo
105	Presidente Alves	Negativo	Negativo	Positivo
106	Presidente Alves	Negativo	Negativo	Positivo
107	Presidente Alves	Negativo	Negativo	Positivo
108	Presidente Alves	Negativo	Negativo	Negativo
109	Presidente Alves	Negativo	Negativo	Positivo
110	Presidente Alves	Negativo	Negativo	Negativo
111	Presidente Alves	Negativo	Negativo	Negativo
112	Presidente Alves	Negativo	Negativo	Positivo
113	Presidente Alves	Negativo	Negativo	Positivo
114	Presidente Alves	Negativo	Negativo	Positivo
115	Presidente Alves	Negativo	Negativo	Positivo
116	Presidente Alves	Negativo	Negativo	Positivo
117	Presidente Alves	Negativo	Negativo	Negativo
118	Presidente Alves	Negativo	Negativo	Positivo
119	Presidente Alves	Negativo	Negativo	Positivo
120	Presidente Alves	Negativo	Negativo	Positivo
121	Riversul	Negativo	Negativo	Positivo
122	Riversul	Negativo	Negativo	Negativo

123	Riversul	Negativo	Negativo	Positivo
124	Riversul	Negativo	Negativo	Positivo
125	Riversul	Negativo	Positivo	Positivo
126	Riversul	Negativo	Negativo	Positivo
127	Riversul	Negativo	Negativo	Positivo
128	Riversul	Negativo	Positivo	Positivo
129	Riversul	Negativo	Negativo	Positivo
130	Riversul	Negativo	Negativo	Negativo
131	Itaporanga	Negativo	Negativo	Positivo
132	Itaporanga	Negativo	Negativo	Negativo
133	Itaporanga	Negativo	Negativo	Negativo
134	Itaporanga	Negativo	Negativo	Negativo
135	Itaporanga	Negativo	Negativo	Positivo
136	Itaporanga	Negativo	Negativo	Negativo
137	Itaporanga	Negativo	Negativo	Positivo
138	Avaré	Negativo	Negativo	Negativo
139	Avaré	Negativo	Negativo	Negativo
140	Avaré	Positivo	Negativo	Negativo
141	Bariri	Negativo	Negativo	Negativo
143	Bariri	Positivo	Negativo	Positivo
144	Bariri	Positivo	Negativo	Positivo
145	Bariri	Positivo	Negativo	Positivo
146	Bariri	Positivo	Negativo	Positivo
147	Bariri	Negativo	Negativo	Negativo
148	Bariri	Negativo	Negativo	Negativo
149	Bariri	Negativo	Negativo	Negativo
150	Bariri	Negativo	Negativo	Negativo

*Amostras: 9, 10, 24, 27, 28, 29, 32, 35, 70 e 142 não realizadas.

CAPÍTULO 3.

Artigo Científico

Artigo a ser enviado para a revista *Zoonosis and Public Health*
(Normas de publicação – ANEXO 3)

1 **Spatial analysis and molecular evaluation for *Fasciola hepatica* in cattle**
2 **slaughtered in a slaughterhouse in the Midwest of São Paulo, Brazil**

3 ¹São Paulo State University (UNESP), School of Veterinary Medicine and Animal
4 Science, Brazil

5 **Correspondence:**

6 Adress: Department of Animal Production and Preventive Veterinary Medicine, School
7 of Veterinary Medicine and Animal Science, Sao Paulo State University (UNESP),
8 Botucatu, SP. Code 18618-681. Road: Professor Doctor Walter Maurício Correa s/n,
9 UNESP Campus de Botucatu - Caixa Postal 560., Zip code: 18.618-681 - Distrito de
10 Rubião Júnior, Botucatu, São Paulo, Brazil. Phone: (+55) (14) 3880-2090.

11 E-mail: simone.b.lucheis@unesp.br

12 Keywords: Diagnosis; *Fasciola hepatica*; zoonosis; ruminants; slaughterhouse;
13 georeferencing.

14 **Abstract**

15 *Fasciola hepatica* (*F. hepatica*) is a fluke parasite that affects the tissues of animals and
16 humans. This parasite lives mainly in the liver of its hosts, and its transmission cycle
17 involves an intermediate host, the snail of the genus *Lymnaea*. There is elimination of
18 parasite eggs in the feces of infected animals, contaminating wet places. For the
19 diagnosis in this work, the molecular test of Polymerase Chain Reaction (PCR) was
20 performed, using two pairs of *primers* for *F.hepatica*; and real-time PCR (qPCR) with a
21 pair of *primers*. 140 samples of liver from cattle slaughtered in a slaughterhouse in the
22 Midwest region of São Paulo were used. It was verified that, at PCR, for the two *primers*,
23 nine of the 140 samples (6.4%) were positive, two (1.4%) with the FhC01 *primer* pair,
24 and seven (5%) with the FhC01 pair of *primers*. of COX1 *primers*. By the qPCR
25 technique, with SSCPFaF and SSCPFaR *primers*, sixty-four (45.7%) demonstrations
26 were positive for *F. hepatica*. It was possible to observe positive positive procedures in
27 the cities of Vargem and Lençóis Paulista, with positivity of 80%, respectively. Four
28 municipalities had all samples negative for the detection of *F. hepatica*. The use of
29 molecular tests, especially qPCR, allowed the knowledge of epidemiological data on
30 fascioliasis in the studied sample universe and suggested an alert for the implementation
31 of sanitary programs in search of the improvement of the health of the herd of beef cattle
32 of the evaluated properties.

33 **Keywords:** Diagnosis; *Fasciola hepatica*; Zoonosis, Ruminants; Public Health;
34 Georeferencing.

35 **Impacts**

36 - The results obtained reveal the importance of the diagnostic evaluation for *Fasciola*
37 *hepatica* in beef cattle from the municipalities evaluated in this study, as well as from
38 other regions of the federation.

39 - The use of molecular tests, especially qPCR, was an effective diagnostic tool for the
40 identification of parasitized animals.

41 - The distribution based on the cases showed that fascioliasis is widely disseminated in
42 the evaluated municipalities and suggests an alert for the implementation of sanitary
43 programs in search of improving the health of the beef cattle herd.

44

45 1. Introduction

46 *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758), is a parasite of the Phylum Plathelminth, Class
47 Trematoda (leaf-shaped), Order Digenea and Family Fasciolidae. It has an indirect cycle,
48 that is, the sexual or asexual generations parasitize alternate hosts (Bowman, 2010). Its
49 main intermediate host are snails, especially those of the genus *Lymnaea*, *Galba*,
50 *Fossaria* and *Pseudosuccinea* (CDC, 2019).

51 This parasite affects different organs, but mainly the liver and bile ducts of several
52 species of mammals, such as sheep, buffaloes, horses, swine and camelids (WHO.,
53 OIE., FAO., 2021).

54 The parasite is distributed in more than 70 countries, especially in places where sheep
55 or cattle are raised. Human cases have been reported in Latin America, the Middle East,
56 the Caribbean, Asia, Africa, parts of Europe and rare cases in Australia. There are two
57 species capable of infecting people, *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*
58 (*F.gigantica*), the latter being more commonly identified in Africa and Asia. The disease
59 is considered more common in animals, however, the number of records of human cases
60 living in developing nations is considered of great importance and must be taken into
61 account (CDC, 2019).

62 The first report on the circulation of this parasite in Brazil was made by Adolfo Lutz in
63 1921, who detected it when observing the altered liver of slaughtered sheep and cattle,
64 in addition to the presence of a species of *Lymnaea*. These animals came from Barra do
65 Piraí, on the Vale do Paraíba between São Paulo and Rio de Janeiro.

66 Regarding the life cycle, adult *F. hepatica* establishes itself in the bile ducts and liver of
67 mammals, which are the definitive hosts. The eggs are carried by the bile to the lumen
68 of the intestine and are then eliminated in the feces. These eggs, in turn, only become
69 infective in the form of ciliated larvae (miracidia), when in contact with water (Bowman,
70 2010).The miracidium, when finding an intermediate host, penetrates the snail of the
71 genus *Lymnaea*, where it loses its ciliated surface, and migrates to the digestive glands
72 of the same, establishing itself in the form of a sporocyst.

73 The sporocysts transform into rediae on the tissues of the snail. The young forms, called
74 cercariae, are the next evolutionary phase of *F. hepatica*. The cercariae leave the reins
75 and abandon the snail to live free in the water, swimming in search of plants where they
76 can settle in the water. At this stage, they lose their tail and become the infective form for
77 people and animals, the metacercariae, which is ingested in contaminated water or
78 during grazing. Under suitable conditions, the life cycle of *F. hepatica* can be considered
79 complete in three to four months (Bowman, 2010).

80 Given the large number of definitive hosts, it is possible to observe how adaptable and
81 ecologically versatile this helminth is, which explains its incredible geographic
82 dispersion (Oliveira; Resende, 2017).

83 Article types

84 2. Materials and Methods

85 This study was approved by the Ethics Committee (CEUA) of the Botucatu School of
86 Veterinary Medicine and Animal Science of the São Paulo State University
87 (FMVZ/UNESP), under registration number 0047/2021.

88 One hundred and forty samples of liver from cattle previously slaughtered were evaluated
89 in a slaughterhouse located in the Midwest region of São Paulo. The choice of animals

90 was random, without discrimination of sex, race or age, considering only animals from
91 properties in the State of São Paulo, Brazil, located in fourteen different municipalities.

92 2.1 Collection and storage of biological samples

93 The liver samples were collected with scissors and metal tweezers sterilized in 70%
94 alcohol at the time of each collection, and the tissue fragments were identified with the
95 animal's record and wrapped in aluminum foil, being packed in a refrigerated thermal box
96 and sent to the laboratory for the analyses.

97 2.2 Processing of biological samples

98 From the tissue sample, aliquots of 1 gram of liver were weighed on an analytical balance
99 and, in a laminar flow hood, the samples were aliquoted into microtubes containing 200
100 microliters of PBS pH 7.6 and stored in a freezer at -20°C until its processing.

101 In a laminar flow hood, the next step in sample processing was the preparation of
102 inoculum for subsequent DNA extraction. Thus, the liver fragments were removed from
103 the microtubes and macerated. After maceration, 2 mL of Buffered Saline Solution (SST)
104 pH 7.6 were added, pipetting 1,000 microliters of the supernatant into two microtubes
105 free of DNase and RNase (1 mL for each one), identified and kept in a freezer at - 20 °C
106 until DNA extraction was performed.

107 2.3 PCR Assays

108 Two pairs of *primers* were tested in conventional PCR. *Primers* of the first pair were
109 described by Cucher et al., (2006), which amplify the 405 bp region of the cytochrome c
110 oxidase subunit 1 gene (gene position corresponds to nucleotides 1888-3420 of
111 X15613.1), as follows: FhCO1F (5`TATGTTTTGATTTTACCCGG-3`) and FhCO1R
112 (5`ATGAGCAACCAAACCATGT-3`) R.

113 The second pair of *primers* was described by Sarkari et al., (2018) and was composed
114 of 438 bp fragments of the mitochondrial gene COX1 and a 535 bp fragment of the
115 mitochondrial gene nad1, described below: 5'-ACGTTGGATCATAAGCGTG-3' F & 5'-
116 CCTCATCCAACATAACCTCT-3' R. PCR reactions were performed in 0.2 mL
117 microtubes with total volumes of 25 µl, with 2.5 µl of MgCl₂ (1.5 mM), 0.5 µl of dNTP
118 solution (0.2 mM), 0.5 µl of Taq Platinum DNA (1U) (Invitrogen®), 0.5 µl of each *primer*
119 or *primer* (10 pM), 17.75 µl of ultrapure water and 2 µl of DNA from the sample obtained
120 at the end of the extraction at 10ng . As a positive control of the tests, the DNA of adult
121 *F. hepatica* was used and as a negative control, ultra-pure water.

122 2.3.1 Electrophoresis

123 Visualization of amplified products was performed using the electrophoresis technique.
124 For this purpose, a 2% agarose gel was prepared with 10 µl/mL of SYBR® Safe DNA gel
125 stain (Life Technologies). 8 µl of PCR product were used and 5 µl of 100 bp ladder
126 (Invitrogen®) as molecular weight markers. For all samples, 2 µl of a Blue Juice Gel
127 Loading solution (Life Technologies) was added. The gel was submitted to an
128 electrophoretic run in a horizontal HE33 tank (Amershan Biosciences) containing 1X TBE
129 (0.1M Tris, 0.09mL of boric acid and 0.001M of EDTA) and a voltage of 80V for 60
130 minutes, using the source Electrophoresis Power Supply Model EPS 301 (GE-
131 Healthcare). The gel was visualized on a UV light transilluminator and the image
132 captured by the Major Science® system and documented using the Vision Works LS
133 software.

134

135 2.4 qPCR Assays

136 The qPCR used the *primers* according to Calvani et al., (2017) generating amplicons of
137 140 bp from *Fasciola hepatica*, described below: SSCPFaF [S0754] (50-TTG GTA CTC
138 AGT TGT CAG TGT G-30) & SSCPFaR [S0755] (50-AGC ATC AGA CAC ATG ACC
139 AAG-30). The reactions were performed in the Applied Biosystems™ StepOne™ Real-
140 Time PCR System equipment from Thermo Fisher Scientific™. PCR reactions used initial
141 volumes of up to 10 µl, which included 2.5 µl of *Fasciola hepatica* template DNA and 7.5
142 µl of mix. PCR reactions were started at 95°C for 3 min, followed by 40 cycles of 5s at
143 95°C and 10s at 60°C. SYBR® Green qPCR and Taq DNA Polymeras®, both from
144 ProMega - Merck®, were used. Water was used as a negative control, and DNA
145 extracted from *F. hepatica* as a positive control.

146 2.5 Statistical Analysis

147 The percentage of positive samples by region of origin was calculated, as well as the
148 95% confidence interval for the total number of positive samples. A prevalence of 6.32%
149 was estimated (Bennema et al., 2014) with a margin of error of plus or minus 5%. The
150 sample size calculation was performed using the OpenEpi program, with a considered
151 population of 150 animals (Dean et al., 2015).

152 2.6 Spatial analysis

153 Through a digital database, geoprocessing was carried out from the mapping of the
154 samples, aiming to spatially understand the distribution of cases in the study area. For
155 this, the Geographic Information System (GIS) instrument was used, in addition to the
156 QGIS 3.16 software for making the maps.

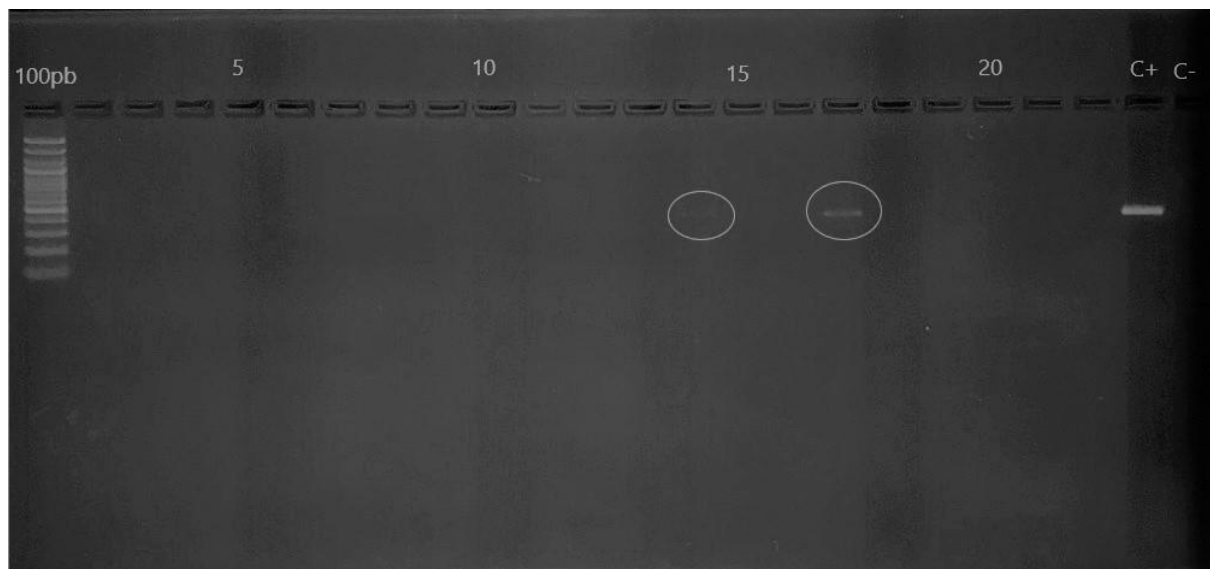
157 3. Results

158 3.1 PCR and qPCR

159 Two (1.4%) positive liver samples were detected with the pair of FhCO1 *primers* of the
160 total of 140 samples. They coming from the municipality of Riversul.

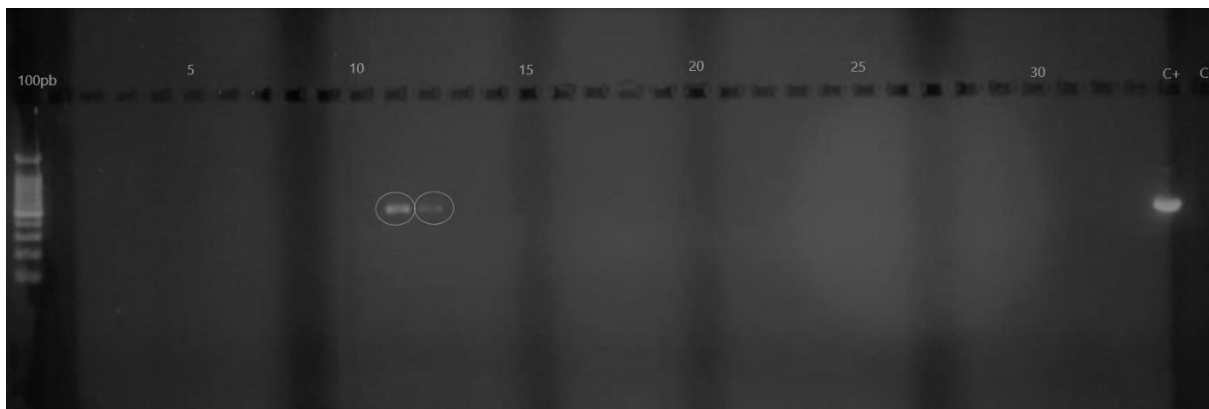
161 Samples evaluated with the set of COX1 *primers*, came from the city of Vargem, while
162 the other five samples came from the city of Bariri. The total number of positive samples
163 for this set of *primers* was seven (4.9%).

164 Figure 1 shows the PCR result with the pair of FhCO1 *primers*, while figures 2 and 3
 165 demonstrate the amplification with the COX1 *primers*.



166

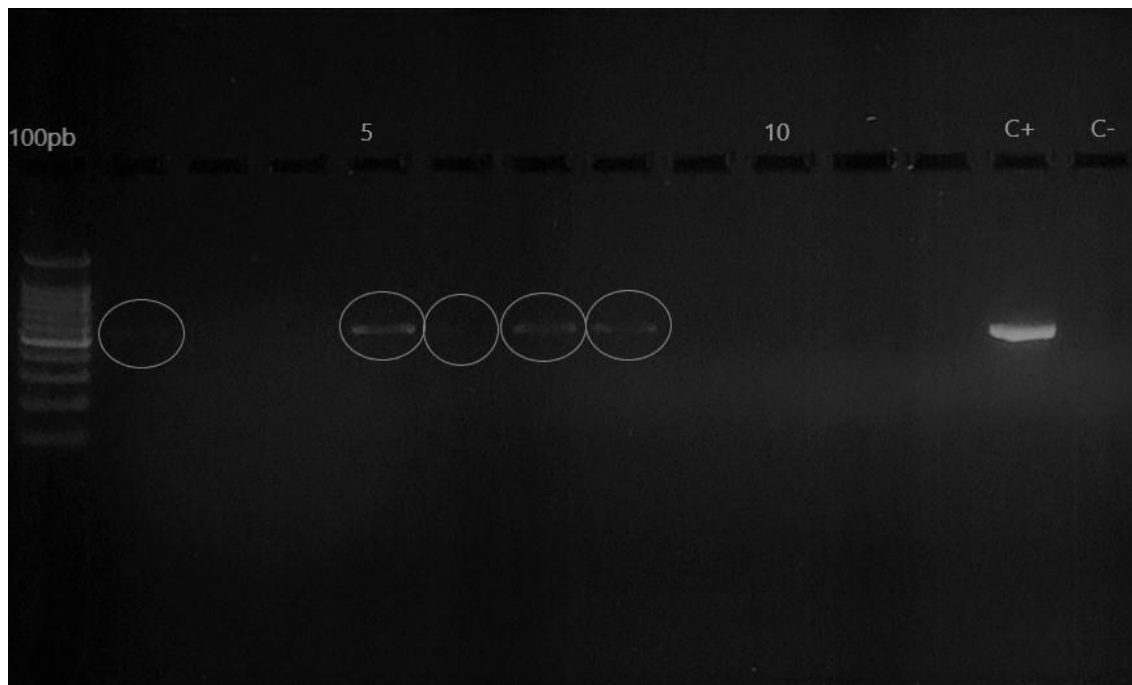
167 Figure 1. 2% agarose gel electrophoresis for FhCO1F and FhCO1R *primers* (405 bp) for
 168 *Fasciola hepatica*. 100 bp molecular weight marker. Columns 14 and 17 - amplified
 169 samples; 23 - positive control *Fasciola hepatica*; 24 - negative control (ultrapure water).



170

171 Figure 2. 2% agarose gel electrophoresis for COX1F and COX1R *primers* (535pb) for
 172 *Fasciola hepatica*. Molecular weight marker 100pb. Columns 11 and 12 - amplified
 173 samples; 34 - positive control (*F. hepatica*); 35 - negative control (ultra pure water).

174



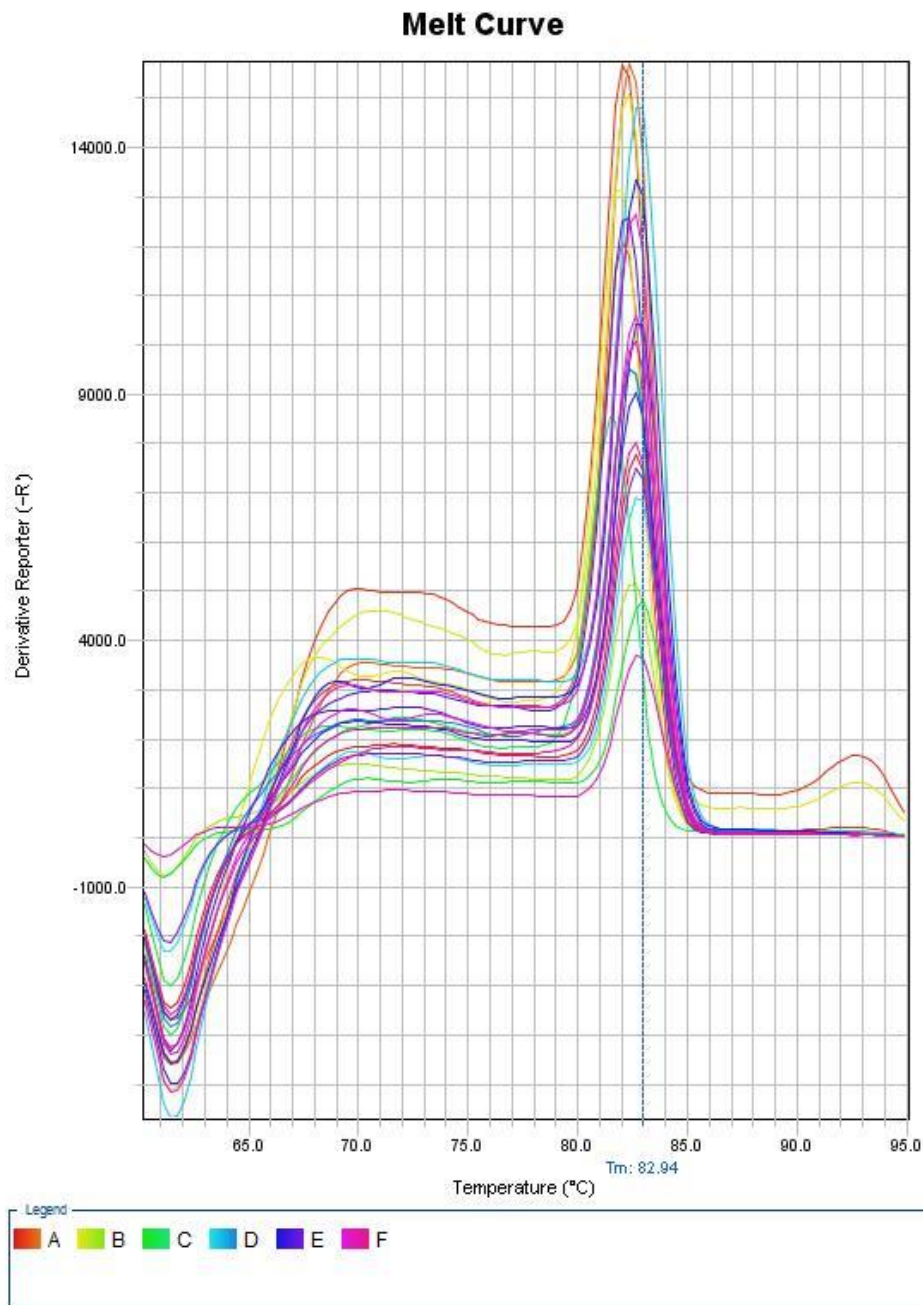
175

176 Figure 3. 2% agarose gel electrophoresis for COX1F and COX1R *primers* (535 bp) for
 177 *Fasciola hepatica*. 100 bp molecular weight marker. Columns 2, 5, 6, 7, and 8 - amplified
 178 samples; 13 - positive control (*F. hepatica*); 14 - negative control (ultrapure water).

179

180 In qPCR, sixty-four positive samples were observed, representing 45.7% of the total in
 181 this diagnostic test. The distribution of this result by municipality was: four from the city
 182 of Bariri, one from Bauru, eight from Itaí, three from Itaporanga, eight from Lençóis
 183 Paulista, twelve from Presidente Alves, thirteen from Riversul, six from Santa Cruz do
 184 Rio Pardo and eight from town of Vargem. The result is showed in the Figure 4.

185



209 Figure 4. Melting curve for *Fasciola hepatica* using Quantitative Real-Time Polymerase
 210 Chain Reaction (qPCR) technique, amplified at a temperature of 82.94°C. The
 211 denaturation curve shows the variation of fluorescence as a function of temperature. The
 212 colors of the legend A, B, C, D, E and F correspond to the different amplified products
 213 that are being analyzed, allowing the identification and differentiation of the samples.

214

215 3.2 Statistical Analysis

216 The qPCR test showed a prevalence of 45.7%, while the PCR tests using *primer* COX1
 217 and FhCO1 showed prevalences of only 5% and 1.4%, respectively.

218 The p-value was estimated at $p < 0.001$, which means that the probability of the observed
 219 result being due to chance is less than 0.1%. This indicates that there is a significant
 220 difference between both PCR and qPCR tests, and between *primers* COX1 and FhCO1.

221 The highest prevalence was found in the cities of Lençóis Paulista and Vargem (80%),
 222 followed by Presidente Alves (59%) and Itaí (47.1%). The cities with no positives were
 223 Avaí, Colombia, Sabino, and São José do Barreiro. Results are in Picture 1.

Origin	PCR primer COX1	PCR primer FhCO1	qPCR	Total samples
Avaí	-	-	-	7
Prevalence %	0	0	0	100%
Avaré	1	-	-	3
Prevalence %	33,3%	0	0	100%
Bariri	4	-	4	10
Prevalence %	40%	0	40%	100%
Bauru	-	-	1	7
Prevalence %	0	0	14,3%	100%
Colombia	-	-	-	5
Prevalence %	0	0	0	100%
Itaí	-	-	8	17
Prevalence %	0	0	47,1%	100%
Itaporanga	-	-	3	7
Prevalence %	0	0	42,9%	100%
Lençóis Paulista	-	-	8	10
Prevalence %	0	0	80%	100%
Presidente Alves	-	-	13	23
Prevalence %	0	0	56,5%	100%
Riversul	-	2	13	23
Prevalence %	0	8,7%	56,5%	100%
Sabino	-	-	-	1
Prevalence %	0	0	0	100%
São José do Barreiro	-	-	-	1
Prevalence %	0	0	0	100%
Sta Cruz Rio do Rio Pardo	-	-	6	18
Prevalence %	0	0	33,3%	100%
Vargem	2	-	8	10
Prevalence %	20%	0	80%	100%
Total				
Total	7	2	64	140
Prevalence por exame %	4,9%	1,4%	45,7%	100%
IC de 95%	[1,4 ; 8,5]	[0,0 ; 3,3]	[37,5 ; 54]	

224 Picture1. Prevalence of positive animals for *Fasciola hepatica* by municipality, according
 225 to method and 95% confidence interval for the total of positive samples

226 3.3 Spatial analysis

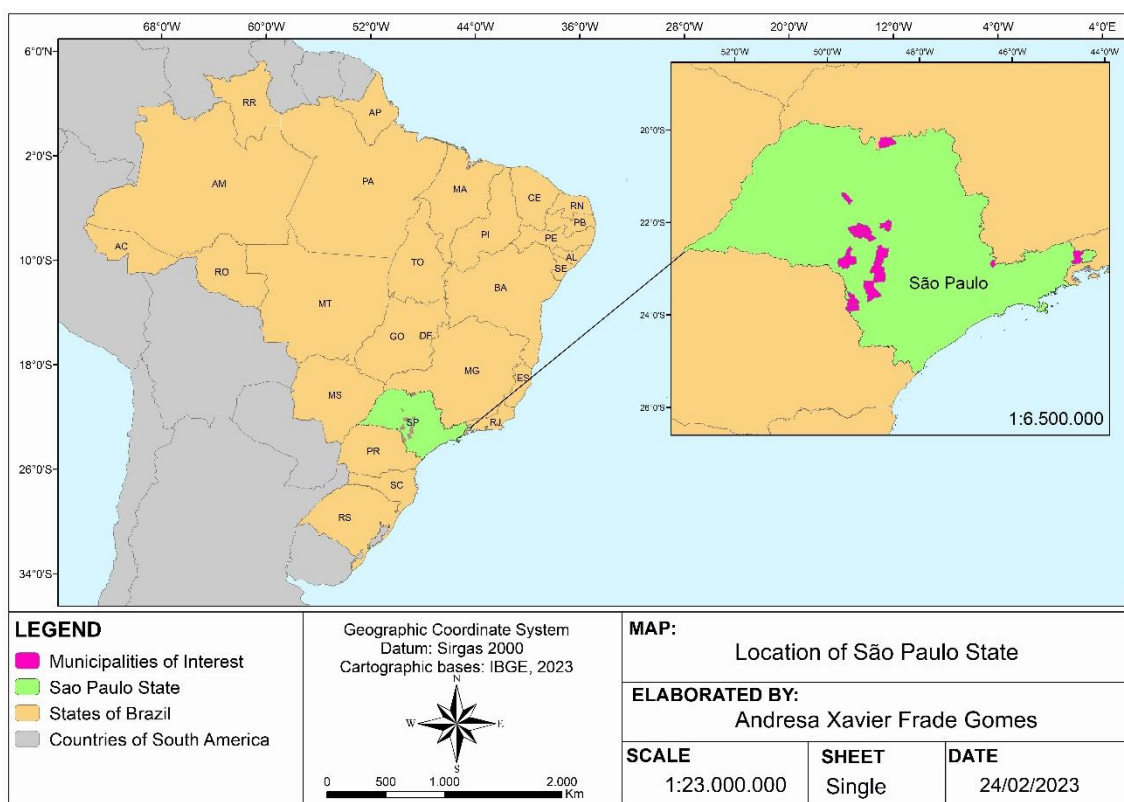
227 Four municipalities (28.6%) among the fourteen surveyed had all samples negative for
 228 cPCR or qPCR techniques. They were: Avai, Colombia, Sabino and São José do
 229 Barreiro. The other ten cities (71.42%) had one or more positive samples for one of the
 230 exams.

231 The municipalities that revealed the highest number of positives in qPCR were Lençóis
 232 Paulista and Vargem, with 80% of their samples positive (8 out of 10 samples evaluated).

233 The results of the exams and their distribution, by municipality, on each map were
 234 observed.

235 Maps with geographic locations are represented in the Figures 5 and 6.

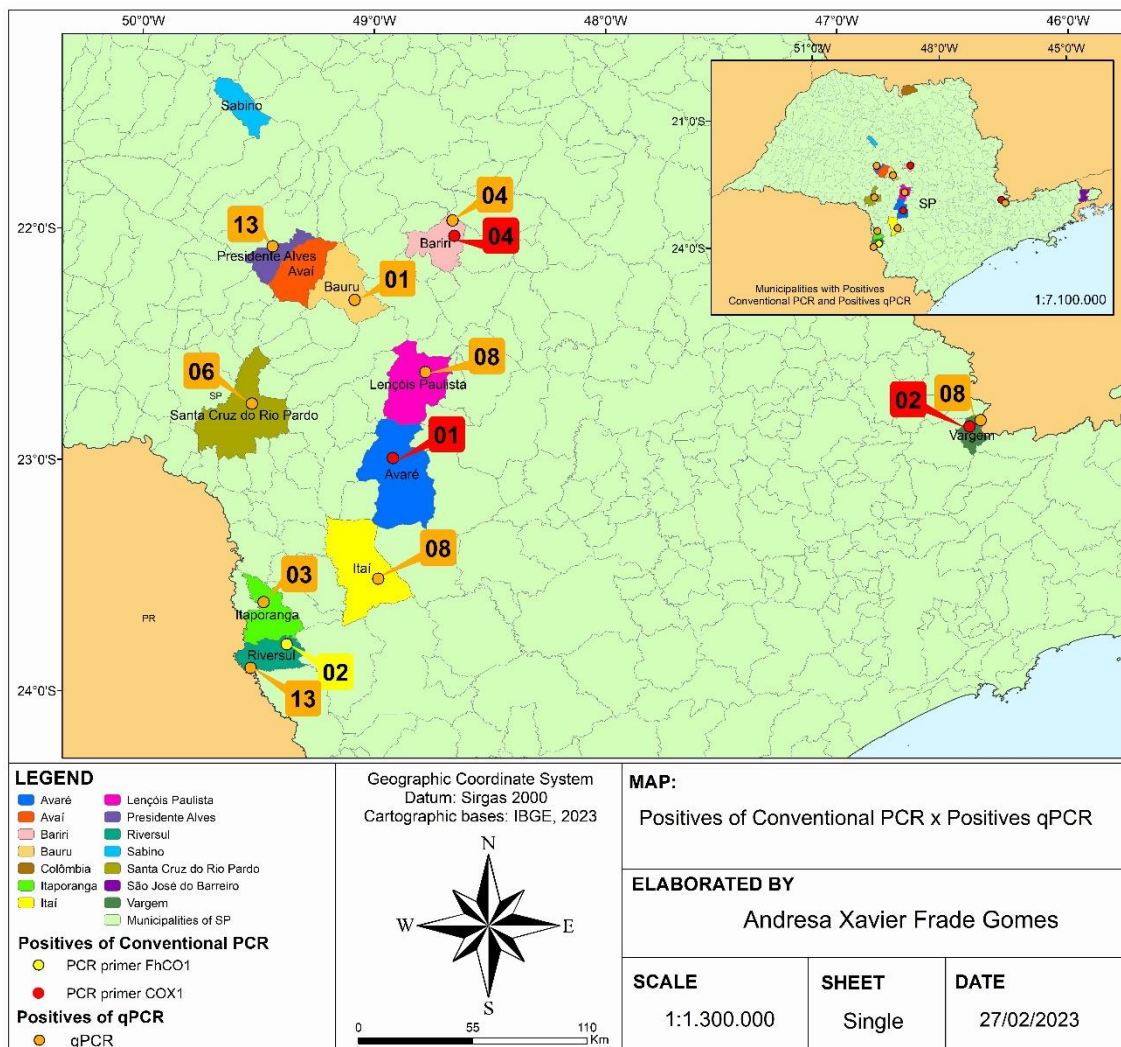
236



237

238 Figure 5. Location of Brazil in South America, highlighting the state of São Paulo and
 239 the municipalities of origin of the animals for the *Fasciola hepatica* research.

240



241

242 Figure 6. Map of municipalities in the state of São Paulo, Brazil, and comparison of
 243 positive samples for *Fasciola hepatica* by Conventional Polymerase Chain Reaction for
 244 the two *primer* pairs (in yellow, *primer* FhCO1, and in red, *primer* COX1) and by Real-
 245 Time Polymerase Chain Reaction (qPCR), highlighted in orange.

246 Discussion

247 *Fasciola hepatica* was detected for the first time in Brazil in 1918 in cattle and sheep from
 248 Rio Grande do Sul (Neves, 2005).

249 The presence of the parasite in the state of São Paulo remained without official records
 250 until 1967, when the researcher França (1967) published a work proving the existence
 251 of cattle infected with *F. hepatica* in the Vale do Paraíba region. The predominance of
 252 cases reported in the state of São Paulo is found in this location. This fact is corroborated
 253 by the existence of a greater number of studies carried out in this region (Lutz, 1921; Dos
 254 Santos, Vieira; 1967; França, 1967).

255 The presence of wild animals infected with *F. hepatica* close to cattle is also can be a
 256 important factor in the dissemination of the helminth, a fact observed in diversas states
 257 in Brazil that border the state of São Paulo and in the state itself (Martins et al. 2021;
 258 Labruna et al., 2018; Dracz et al., 2016; Kouba et al., 2005).

259 The movement of animals between the states bordering is common, whether for breeding
260 or trade purposes. This increases the risk of spreading the infection, since infected
261 animals can harbor the parasite and contaminate new areas. Surveillance in these
262 locations is essential to monitor the presence of *F. hepatica*, identify areas of greatest
263 risk, implement adequate control measures and prevent the spread of infection.

264 Studies related to the presence and occurrence of the disease in the country are
265 unevenly distributed. There is a greater number of records published in the southern
266 states of Brazil, where the economic impact is more evident, given that the largest
267 number of cases is concentrated in the state of Rio Grande do Sul. However, this is
268 reflected in the low number of publications on the presence of the parasitosis, not only in
269 the state of São Paulo, but also in the rest of the country (Bennema et al., 2014). In a
270 literature review on the geographic expansion of *F. hepatica* and its dissemination in
271 Brazil, after gathering several studies published in the country, Oliveira; Resende (2017)
272 concluded that the climate is a limitation for the territorial dissemination of the biological
273 cycle of fascioliasis.

274 Clarifications regarding the ecological, epidemiological and climatic conditions in the
275 municipalities mentioned in this work and also in the state of São Paulo, need further
276 attention, in view of the clear influence of these factors for the occurrence of the complete
277 cycle of *Fasciola*. It is known that the presence of water and the existence of the snail
278 *Lymanaea* are mandatory factors for the occurrence of the cycle. Malacological research
279 must be taken into account when carrying out prophylaxis and parasite control measures.

280 Mapping the distribution of fascioliasis in Brazil, Bennema et al., (2014), grouped the
281 data available in the SIF (Brazilian Inspection System) on the slaughter of cattle between
282 the years 2002 and 2011, and found significant discrepancies in the prevalence of the
283 disease between the states. It was observed that the regions with the highest prevalence
284 of cases in Brazil are the Midwest and South. In that same study, it was confirmed that
285 192 municipalities in São Paulo registered the presence of *F. hepatica* in bovine livers in
286 the post-mortem inspection, which generated a prevalence of 0.09% in the state.

287 Already in 2021, the IBGE (Brazilian Institute of Geography and Statistics) agricultural
288 census accounted for the herd of the state of São Paulo at 10,718,494 million head of
289 cattle (oxen and cows). Data available on the MAPA (Ministry of Agriculture Livestock
290 and Supply) website (2023) show that from February 2021 to February 2023, 4,552 cases
291 of fascioliasis were notified by the SIF in the state of São Paulo alone. According to this
292 result, the currently estimated prevalence for *F. hepatica* in this state is 0.42%.

293 In the present study, the prevalence found in the sample universe surveyed varied
294 according to each municipality, exceeding the state average, as in the case of the city of
295 Lençóis Paulista and Vargem, where 8 of the 10 samples evaluated (80%) were positive
296 for the presence of *Fasciola* in the qPCR test.

297 The municipalities evaluated in this study, when compared, show a wide variation in
298 prevalence from one region to another, ranging from 14.3% to 80%. In addition to the
299 variation in the number of samples collected in each city, this factor can be attributed to
300 environmental differences, such as rainfall, temperature, climate, topography and herd
301 profile.

302 When searching for the final destination of the liver of cattle of both sexes between
303 February 2021 and February 2023 on the Ministry of Agriculture website (MAPA, 2023),
304 there was a total condemnation of 4,272 livers of cattle affected by fascioliasis. The final
305 destination of the livers used in the present study has not been determined.

306 Total hepatic condemnations have a high economic impact for the producer directly and
307 indirectly, as well as for slaughterhouses. Directly, the slaughterhouse loses money per
308 kilo of condemned liver. Indirectly, parasitism impairs weight gain, reduces fertility,
309 decreases immunity and thus leaves the animal susceptible to other diseases, and in
310 severe cases it can lead to death.

311 Molento et al., (2018) evaluated the economic impact of losses from disease in Brazil
312 from 2002 to 2010, by state. It was possible to visualize the concentration of damage in
313 the three southern states, with Rio Grande do Sul being the most affected, with US\$147
314 million lost. In contrast, across the country it is estimated a loss of US\$ 210 million. The
315 state of São Paulo, in turn, had a shortfall of US\$114,615 thousand per year.

316 Regarding the accessible diagnostic methods, according to Álvarez et al., (2014), it is
317 possible to note that there are still no sensitive methods available for the detection of
318 infection by *F.hepatica* and the differentiation of the pre-patent status of the patent. The
319 PCR test in feces samples, considered highly sensitive and very specific, is able to
320 discriminate current infection, but only when there are adult forms of *Fasciola*.

321 The Polymerase Chain Reaction is commonly used in different countries to differentiate
322 hybrids of *F. hepatica* and *F. gigantica* due to morphometry and measurement by the
323 geographic location of the parasite are not completely reliable (Peng et al., 2009;
324 Ichikawa et al., 2016; Thang et al., 2019; Kasahara et al., 2021).

325 Although expensive, the qPCR test offers high sensitivity and specificity. Cabada et al.,
326 (2016) performed experiments that used qPCR and PCR in stool samples with low
327 parasite loads. The results showed sensitivity of 87% and 66% respectively. Both were
328 100% specific. The tests also proved to be efficient because they did not cause a cross-
329 reaction with other cestode, trematode or nematode parasites, in addition to detecting
330 47% and 26% of infections that were not diagnosed at microscopy.

331 Similar to what was found by Cabada et al., (2016), a higher efficiency was observed in
332 the qPCR exam when compared to PCR. While the prevalence with the conventional
333 technique was able to detect between 14.4% and 5% of positive samples (for the *primer*
334 FhCO1 and COX1, respectively), in real-time PCR the mean prevalence was 45.7%. This
335 result suggests greater accuracy in the real-time test.

336 The prevalence of fascioliasis and the molecular detection of *F. hepatica* in bovine liver
337 samples from farms located in different municipalities in the Midwest region of São Paulo,
338 reinforces the need for further research on the subject in the region, in addition to disease
339 control programs. Molluscs in flooded areas close to where the animals live. It is
340 necessary to strengthen the quality and health of the herds to reduce economic losses
341 and improve their sanitary conditions. In addition, it also indicates that there may be
342 underreported cases of human infections in these regions, reinforcing the need for strict
343 epidemiological surveillance actions to control this zoonosis. The results obtained reveal
344 the importance of the diagnostic evaluation for *Fasciola hepatica* in beef cattle from the
345 municipalities evaluated in this study, as well as from other regions of the federation.

346 **Acknowledgments**

347 This study was financed in part by the Coordination for the Improvement of Higher
348 Education Personnel - Brazil (CAPES)- Finance Code 001.

349 To the São Paulo Research Foundation (FAPESP) - Regular Research Grant - Process
350 2020/09409-2.

351 **Conflict of interest**

352 The authors declare no conflicts of interest.

353 **References**

354 Alvarez Rojas, C. A.; Jex, A. R.; Gasser, R. B.; Scheerlinck, J.-P. Y. Techniques For The
355 Diagnosis Of *Fasciola* Infections In Animals. *Advances In Parasitology*, London, v. 85,
356 p. 65-107, 2014. Doi 10.1016/b978-0-12-800182-0.00002-7.

357 Bennema, S. C.; Scholte, R. G. C.; Molento, M. B.; Medeiros, C.; Carvalho, O. S.
358 *Fasciola Hepatica* In Bovines In Brazil: Data Availability And Spatial Distribution.
359 *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De São Paulo*, São Paulo, v. 56, n. 1, p. 35-
360 41, 2014. Doi 10.1590/s0036-46652014000100005.

361 Bowman, d. D. *Georgis. Parasitologia Veterinária*. 9. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
362 Cap. 4, p. 284-290.

363 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Quantitativo de
364 doença por procedência. Brasília: mapa, 2023. In:
365 [https://sistemas.agricultura.gov.br/pga_sigsif/pages/view/sigsif/relatoriodoencaanimal/i](https://sistemas.agricultura.gov.br/pga_sigsif/pages/view/sigsif/relatoriodoencaanimal/index.xhtml)
366 [ndex.xhtml](https://sistemas.agricultura.gov.br/pga_sigsif/pages/view/sigsif/relatoriodoencaanimal/index.xhtml).

367 Cabada, M. M.; Malaga, J. L.; Castellanos-Gonzalez, A.; Bagwell, K. A.; Naeger, P. A.;
368 Rogers, H. K.; Maharsi, S.; Mbaka, M.; White Júnior, A. C. Recombinase Polymerase
369 Amplification Compared To Real-Time Polymerase Chain Reaction Test For The
370 Detection Of *Fasciola Hepatica* In Human Stool. *The American Journal Of Tropical*
371 *Medicine And Hygiene*, Northbrook, v. 96, n. 2, p. 341-346, 2016. Doi 10.4269/ajtmh.16-
372 0601.

373 Calvani, N. E. D.; Windsor, P. A.; Bush, R. D.; Slapeta, J; Scrambled Eggs: A Highly
374 Sensitive Molecular Diagnostic Workflow For *Fasciola* Species Specific Detection From
375 Faecal Samples. *Plos Neglected Tropical Diseases*, San Francisco, v. 11, n. 9, p.
376 E0005931, 2017. Doi 10.1371/journal.pntd.0005931.

377 Centers for Disease Control and Prevention. Fascioliasis. Atlanta: CDC, dpdx, 2019.
378 Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/fascioliasis/index.html>.

379 Cucher, M. A.; Carnevale, S.; Prepelitchi, L.; Labbé, J. H.; Wisnivesky-Colli, C. PCR
380 Diagnosis Of *Fasciola Hepatica* In Field-Collected *Lymnaea Columella* And *Lymnaea*
381 *Viatrix* Snails. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 137, n. 1-2, p. 74-82, 2006. Doi
382 10.1016/j.vetpar.2005.12.013.

383 Dracz, R. M. Aspectos Epidemiológicos De *Fasciola Hepatica* nos municípios de Pedro
384 Leopoldo e São José Da Lapa - Minas Gerais, e avaliação da infecção experimental em
385 ovinos da Raça Santa Inês. Repositorio UFMG, 18 mar. 2016.
386 [Htps://repositorio.ufmg.br/handle/1843/bubd-ap7nct](https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/bubd-ap7nct)

387 Dean, a. G.; Sullivan, k. M.; Soe, m. M. Open-epi: open source epidemiologic statistics
388 for public health, version. Atlanta: openepi, 2015. In: www.openepi.com.

- 389 França, I. *Fasciola hepatica* em bovinos no Vale do Paraíba, Estado de São Paulo - Brasil.
390 Arquivos Da Escola De Veterinária da Universidade De Minas Gerais, Belo Horizonte,
391 v. 19, p. 157-159, 1967.
- 392 Ichikawa-Seki, M.; Ortiz, P.; Cabrera, M.; Hobán, C.; Itagaki, T. Molecular
393 characterization and phylogenetic analysis of *Fasciola hepatica* from Peru. *Parasitology*
394 *International*, Amsterdam, v. 65, n. 3, p. 171-174, 2016. DOI
395 10.1016/j.parint.2015.11.010.
- 396 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades e Estados: São Paulo. Rio de
397 Janeiro: IBGE, 2021. In: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/sp.html>.
- 398 Kasahara, S.; Ohari, Y.; Jin, S.; Calvopina, M.; Takagi, H.; Sugiyama, H.; Itagaki, T.
399 Molecular characterization revealed *Fasciola* specimens in Ecuador are all *Fasciola*
400 *hepatica*, none at all of *Fasciola gigantica* or parthenogenic *Fasciola* species.
401 *Parasitology International*, Amsterdam, v. 80, p. 102215, 2021. DOI
402 10.1016/j.parint.2020.102215.
- 403 Kouba, M. M. A. N. E. Aspectos gerais da fasciolose e das endoparasitoses em capivaras
404 (*Hydrochaeris hydrochaeris* - linnaeus - 1766) e ratões do banhado (*Myocator coytus* -
405 molina, 1782) residentes em três parques do estado do Paraná. *Biblioteca Virtual em*
406 *Medicina Veterinária e Zootecnia*, p. 75–75, 2005.
- 407 Labruna, M. B. et al. Lethal fascioliasis in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in
408 Brazil. *The journal of Parasitology*, v. 104, n. 2, p. 173–176, 1 abr. 2018. Doi: 10.1645/17-
409 114
- 410 Lutz, a. Sobre a ocorrência da *Fasciola hepatica* no Estado do Rio De Janeiro. In:
411 Benchimol, j. L.; Sá, m. R. (ed.). *Adolpho Lutz: helmintologia*. Rio de Janeiro: Fiocruz,
412 2007. V. 3, livro 2, p. 665-668. Disponível em:
413 <https://books.scielo.org/id/sqn87/pdf/benchimol-9788575412312-66.pdf>.
- 414 Martins, i. V. F. et al. Confirmação molecular de infecção por *Fasciola hepatica* em
415 capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) do estado do Espírito Santo, Brasil. *Revista*
416 *Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 30, p. E000221, 28 maio
417 2021. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612021027>
- 418 Molento, m. B.; Bennema, s.; Bertot, j.; Pritsch, i. C.; Arenal, a. Bovine fascioliasis in
419 Brazil: economic impact and forecasting. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and*
420 *Reports*, Amsterdam, v. 12, p. 1-3, 2018. DOI 10.1016/j.vprsr.2017.12.004
- 421 Neves, d. P.; Melo, a. L.; Linardi, p. M.; Vitor, r. W. A. *Parasitologia humana*. 11. Ed.
422 São Paulo: atheneu, 2005. <https://doi.org/10.1590/s0036-46651992000400018>
- 423 Oliveira, d. M.; Resende, p. O. *Fasciola hepatica*: ecologia e trajetória histórico-
424 geográfica pelo Brasil. *Estação científica (unifap)*, macapá, v. 7, n. 2, p. 9-19, 2017. Doi
425 10.18468/estcien.2017v7n2.p09-19

- 426 Santos, I.; Vieira, T. Considerações sobre os sete primeiros casos de fasciolose humana
427 encontrados no Vale Do Paraíba, Estado De São Paulo. Revista Do Instituto Adolfo Lutz,
428 São Paulo, v. 25, p. 95-110, 1965/67. Doi 10.53393/rial.1965.v25.33432.
- 429 Sarkari, B.; Mansouri, M.; Ghadimi, S. N.; Khabisi, S. A.; Doshmanziari, A. Molecular
430 evaluation of a case of *Fasciola hepatica* in wild boar in Southwestern Iran: a case report.
431 Iran Journal Parasitology, Tehran, v. 13, n. 1, p. 149-155, 2018. Pmid: 29963098; pmcid:
432 pmc6019598.
- 433 Thang, T. N.; Hakim, H.; Rahimi, R. R.; Ichikawa-Seki, M. Molecular analysis reveals
434 expansion of *Fasciola hepatica* distribution from Afghanistan to China. Parasitology
435 International, Amsterdam, v. 72, p. 101930, 2019. DOI 10.1016/j.parint.2019.101930.
- 436 Peng, M.; Ichinomiya, M.; Ohtori, M.; Ishikawa, M.; Shibahara, T.; Itagaki, T. Molecular
437 characterization of *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, and aspermic *Fasciola* sp. in
438 China based on nuclear and mitochondrial DNA. Parasitology Research, Berlin, v. 105,
439 n. 3, p. 809-815, 2009. DOI 10.1007/s00436-009-1459-0.
- 440 World Health Organization. Neglected Tropical Diseases: Fascioliasis. Geneva: WHO,
441 2020. <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/q-a-on-fascioliasis>
- 442 World Health Organization. Food And Agriculture Organization Of The United States
443 (Fao), World Organization For Animal Health (OIE). Foodborn Parasitic Infections:
444 Fascioliasis (liver fluke). Geneva: who, 2021. [https://cdn.who.int/media/docs/default-](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/searo/food-safety/fascioliasis.pdf?sfvrsn=4a8a2f97_2)
445 [source/searo/food-safety/fascioliasis.pdf?sfvrsn=4a8a2f97_2](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/searo/food-safety/fascioliasis.pdf?sfvrsn=4a8a2f97_2).
- 446
- 447
- 448
- 449
- 450

451 **ANEXO 3.** Normas de publicação da revista *Zoonosis and Public Health*

452 <https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/18632378/homepage/forauthors.html>

453