

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA ANIMAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DISSERTAÇÃO**

**“ESTUDO DE *Cryptosporidium* EM CÃES E GATOS DOMICILIADOS POR MEIO  
DO DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO E MOLECULAR”**

**AMANDA GLEYCE LIMA DE OLIVEIRA**

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA ANIMAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**“ESTUDO DE *Cryptosporidium* EM CÃES E GATOS DOMICILIADOS POR MEIO DO DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO E MOLECULAR”**

**AMANDA GLEYCE LIMA DE OLIVEIRA**

Sob a Orientação da Professora  
**Teresa Cristina Bergamo do Bomfim**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ

Maio de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

048e Oliveira, Amanda Gleyce Lima de, 1987-  
Estudo de *Cryptosporidium* em cães e gatos  
domiciliados por meio do diagnóstico microscópico e  
molecular. / Amanda Gleyce Lima de Oliveira. - 2017.  
91 f.

Orientador: Teresa Cristina Bergamo do Bomfim.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro, PPGCV, 2017.

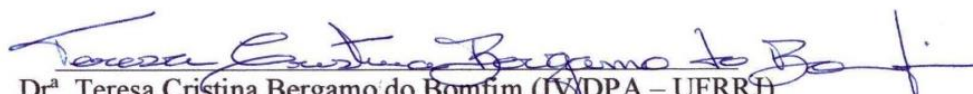
1. Animais de companhia. 2. *Cryptosporidium*. 3.  
Diagnóstico parasitológico. 4. Diagnóstico molecular. 5.  
Espécies zoonóticas. I. Bomfim, Teresa Cristina  
Bergamo do, 1964-, orient. II Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro. PPGCV III. Título.

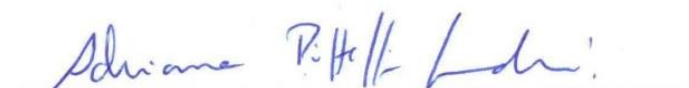
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA ANIMAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**


**AMANDA GLEYCE LIMA DE OLIVEIRA**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**,  
no Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias.

Dissertação aprovada em 31/05/2017.

  
Dr.<sup>a</sup>. Teresa Cristina Bergamo do Bomfim (IV/DPA – UFRRJ)  
(Orientadora)

  
Dr.<sup>a</sup>. Adriana Pittella Sudré (MIP/CMB – UFF)

  
Dr.<sup>a</sup>. Helena Lúcia Carneiro Santos (LEIP – FIOCRUZ/RJ)

## DEDICATÓRIA

Àquele que é presença constante na minha vida.  
Deus, obrigada por permitir que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais, Rose e Valdemar,  
minhas irmãs, Ana Paula e Viviane, e  
meu namorado, Gabriel Gonçalves,  
que sempre me incentivam a seguir em frente  
e torceram por mais essa conquista.

Amo vocês!

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos os professores, funcionários e colegas do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), pela receptividade e assistência que tiveram comigo ao longo desses dois anos. Em especial a minha orientadora Teresa Cristina Bergamo do Bomfim, que contribuiu significativamente para o desenvolvimento deste trabalho. Minha gratidão pelos ensinamentos e pelas discussões científicas compartilhadas.

Aos responsáveis do Laboratório de Hemoparasitos e Vetores da Estação Experimental W. O. Neitz, principalmente ao professor Carlos Luiz Massard, que cederam o espaço para que etapas fundamentais da metodologia fossem realizadas.

A equipe do Setor de Sequenciamento de DNA do Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP), que realizou o sequenciamento das minhas amostras.

A Professora Adriana Pittella Sudré, pela ajuda nas análises das sequências das espécies diagnosticadas.

Agradeço também ao meu namorado Gabriel Gonçalves, pelo auxílio na revisão geral da minha pesquisa.

Enfim, a todos que torceram pelo meu sucesso e cooperaram de alguma maneira para a realização desta dissertação. Simplesmente, muito obrigada.

Não se preocupe com suas falhas, no que tentou fazer, mas no que ainda é possível realizar.

*São João Paulo II*

## RESUMO

OLIVEIRA, Amanda Gleyce Lima de. **Estudo de *Cryptosporidium* em cães e gatos domiciliados por meio do diagnóstico microscópico e molecular**. 2017. 91p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal. Rio de Janeiro, Brasil, 2017.

A criptosporidiose é uma infecção intestinal e respiratória causada por Protistas parasitos do gênero *Cryptosporidium* que infectam uma ampla variedade de hospedeiros em todas as classes de vertebrados. A importância das vias de transmissão na epidemiologia da criptosporidiose não é totalmente clara, entretanto, na última década várias técnicas de biologia molecular foram desenvolvidas para diagnosticar espécies de *Cryptosporidium*, genótipos e subtipos. Estas técnicas estão sendo utilizadas para estudos epidemiológicos em áreas endêmicas e epidêmicas, o que melhorou significativamente a compreensão da transmissão de criptosporidiose em seres humanos e animais. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivos: diagnosticar por meio do exame parasitológico de fezes de cães e gatos domiciliados a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp.; caracterizar genotipicamente as espécies do gênero através do sequenciamento nucleotídico e realizar análises filogenéticas, comparando as sequências obtidas com aquelas sequências depositadas no GenBank. No total, 119 amostras fecais foram coletadas de residências pertencentes ao bairro de Campo Grande, Zona Oeste do município de Rio de Janeiro, Brasil. Oocistos de *Cryptosporidium* foram detectados nas amostras de 5/64 (7,8%) cães e 3/55 (5,4%) gatos. Após a realização do sequenciamento, *C. canis* (n = 3) e *C. parvum* (n = 2) foram às espécies identificadas em cães e *C. felis* (n = 3) foi detectada em gatos. As três espécies diagnosticadas neste estudo são consideradas de importância em saúde humana e animal. Além da criptosporidiose ser debilitante para o hospedeiro, esses dados refletem preocupação, pois as espécies diagnosticadas, apresentam potencial zoonótico. Além da importância do diagnóstico de espécies de *Cryptosporidium* neste estudo, outros parasitos gastrointestinais foram detectados e não devem ser negligenciados, visto que também apresentam importância tanto em saúde humana quanto animal. Os resultados obtidos neste estudo constituíram primeiro registro de parasitismo por *C. parvum* em cães confirmado no Brasil e conseqüentemente, no estado do Rio de Janeiro através do uso de ferramentas moleculares, contribuindo para traçar a epidemiologia molecular deste agente etiológico mundialmente.

**Palavras-chaves:** cão, gato, *Cryptosporidium*, diagnóstico parasitológico, diagnóstico molecular, espécies zoonóticas.



## ABSTRACT

OLIVEIRA, Amanda Gleyce Lima de. **Study of *Cryptosporidium* in domiciled dogs and cats through microscopic and molecular diagnosis**. 2017. 91p. Dissertation (Master's Degree in Veterinary Sciences, Veterinary Parasitology). Rural Federal University of Rio de Janeiro, Institute of Veterinary Medicine, Department of Parasitology Animal. Rio de Janeiro, Brazil, 2017.

The cryptosporidiosis is a intestinal and respiratory infection caused by parasites protists of the genus *Cryptosporidium* that infect a wide host range in all classes of vertebrates. The importance of transmission routes in the epidemiology of cryptosporidiosis is not totally clear, however, in the last decade several techniques of molecular biology have been developed to diagnose species of *Cryptosporidium*, genotypes and subtypes. These techniques are being used for epidemiological studies in endemic and epidemic areas, which has significantly improved the understanding of the transmission of cryptosporidiosis in humans and animals. In this context, the present study had the following objectives: to diagnose the presence of *Cryptosporidium* spp. oocysts by parasitological examination of faeces of dogs and cats domiciled; genotyping the species of the genus through nucleotide sequencing and performing phylogenetic analyzes, comparing the sequences obtained with those sequences deposited in GenBank. In total, 119 fecal samples were collected from residences belonging to the Campo Grande neighborhood, West Zone of the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Cryptosporidium* oocysts were detected in the samples of 5/64 (7.8%) dogs and 3/55 (5.4%) cats. After the sequencing, *C. canis* (n = 3) and *C. parvum* (n = 2) were identified in dogs and *C. felis* (n = 3) was detected in cats. The three species diagnosed in this study are considered of importance in human and animal health. Besides cryptosporidiosis is debilitating for the host, these data reflect concern, because the species diagnosed have a zoonotic potential. In addition to the importance of the diagnosis of *Cryptosporidium* species in this study, another gastrointestinal parasites were detected and should not be neglected, since they are also important in both human and animal health. The results obtained in this study constituted the first registry of parasitism by *C. parvum* in dogs confirmed in Brazil and consequently in the state of Rio de Janeiro through the use of molecular tools, contributing to trace the molecular epidemiology of this etiological agent worldwide.

**Key words:** dog, cat, *Cryptosporidium*, parasitological diagnosis, molecular diagnosis, zoonotic species

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática do ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp., demonstrando todas as fases endógenas no epitélio intestinal. Adaptado de Bouzid et al. (2013). 6
- Figura 2.** Imagens da localização de coleta das amostras fecais provenientes de cães (*Canis lupus familiaris*) e gatos (*Felis catus*). A - Mapa do Brasil com a localização do estado do Rio de Janeiro. B - Mapa do estado do Rio de Janeiro, destacando em vermelho a região metropolitana do Rio de Janeiro e em verde o município do Rio de Janeiro ([https://pt.wikipedia.org/wiki/Mesorregi%C3%A3o\\_Metropolitana\\_do\\_Rio\\_de\\_Janeiro](https://pt.wikipedia.org/wiki/Mesorregi%C3%A3o_Metropolitana_do_Rio_de_Janeiro)). C - Mapa do município do Rio de Janeiro, destacando a área de coleta das amostras fecais (Adaptado de [https://pt.wikipedia.org/wiki/Santa\\_Cruz\\_\(bairro\\_do\\_Rio\\_de\\_Janeiro\)](https://pt.wikipedia.org/wiki/Santa_Cruz_(bairro_do_Rio_de_Janeiro))). 21
- Figura 3.** Oocistos de *Cryptosporidium* spp. observados na microscopia óptica após a utilização da técnica de centrifugação e flutuação em solução saturada de açúcar (SHEATHER, 1923) modificada, provenientes de amostras fecais de cães e gatos do bairro de Campo Grande, município do Rio de Janeiro. Oocistos em A, B e C observados sem o contraste de fase; e D, observados com o contraste de fase (— = 10 µm). 29
- Figura 4.** Amplificação pela Nested-PCR do gene alvo 18S. Eletroforese em gel de agarose a 2% contendo as amostras de *Cryptosporidium* spp. M = 1Kb Plus DNA Ladder; C+ = controle positivo; C- = controle negativo; 1 a 5 = amostras de cães; 6 a 8 = amostras de gatos. 32
- Figura 5.** Alinhamento das sequências obtidas neste estudo provenientes de cães (*Canis lupus familiaris*), evidenciando os nucleotídeos idênticos por ( . ). Tamanho da sequência utilizada para comparação: 740 pb. 35
- Figura 6.** Alinhamento das sequências obtidas neste estudo provenientes de cães (*Canis lupus familiaris*), evidenciando os nucleotídeos idênticos por ( . ). Tamanho da sequência utilizada para comparação: 740 pb. 36
- Figura 7.** Alinhamento das sequências obtidas neste estudo provenientes de gatos (*Felis catus*), evidenciando os nucleotídeos idênticos por ( . ). Tamanho da sequência utilizada para comparação: 692 pb. 37
- Figura 8.** Relação genética entre os isolados de *Cryptosporidium* sp. baseada no sequenciamento parcial do gene 18S (tamanho do fragmento usado: 692 pb), inferida pelo algoritmo *Maximum Likelihood* utilizando o modelo Tamura 3 com análise de *bootstrap* com 1000 réplicas. As sequências obtidas do GenBank estão indicadas por seus números de acessos. ◆ = isolados obtidos neste estudo. 40

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Ocorrência de infecções gastrointestinais em amostras fecais de 119 animais domiciliados (cães e gatos) do bairro de Campo Grande, Rio de Janeiro.	28
<b>Tabela 2.</b> Frequência de infecções gastrointestinais segundo sexo, idade e presença ou ausência de diarreia, em amostras fecais positivas de cães domiciliados do bairro de Campo Grande, Rio de Janeiro.	30
<b>Tabela 3.</b> Frequência de infecções gastrointestinais segundo sexo, idade e presença ou ausência de diarreia, em amostras fecais positivas de gatos domiciliados do bairro de Campo Grande, Rio de Janeiro.	31
<b>Tabela 4.</b> Relação dos animais (cães e gatos) que habitavam o mesmo domicílio no bairro de Campo Grande, Rio de Janeiro.	32
<b>Tabela 5.</b> Tamanho das sequências obtidas de <i>Cryptosporidium</i> após análise da qualidade dos cromatogramas das amostras, referente aos cães (T1 a T5) e aos gatos (T6 a T8).	33

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Espécies de <i>Cryptosporidium</i> associadas à infecção em humanos e suas rotas de transmissão.	15
<b>Quadro 2.</b> Ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> spp. em cães no Brasil de acordo com as técnicas de diagnósticos utilizadas, seus respectivos percentuais e locais das pesquisas.	17
<b>Quadro 3.</b> Ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> spp. em gatos no Brasil de acordo com as técnicas de diagnósticos utilizadas, seus respectivos percentuais e locais das pesquisas.	18
<b>Quadro 4.</b> Estudos brasileiros sobre <i>Cryptosporidium</i> em cães e gatos utilizando ferramentas moleculares, destacando as espécies e as metodologias aplicadas.	19
<b>Quadro 5.</b> Percentuais das informações sobre sexo, idade e presença ou ausência de diarreia na população total (n = 119) de cães e gatos de Campo Grande, Rio de Janeiro.	20
<b>Quadro 6.</b> Sequências usadas para o gene alvo 18S, registradas no GenBank e que foram comparadas com as encontradas na pesquisa para a elaboração da árvore filogenética.	26
<b>Quadro 7.</b> Sequências obtidas do GenBank de <i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>C. canis</i> e <i>C. felis</i> utilizadas como comparação com as sequências achadas neste estudo, de acordo as suas respectivas identidades com trabalhos publicados.	39

## LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

ABINPET	Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
AAT	Terapia Assistida por Animais
ICZN	<i>International Code of Zoological Nomenclature</i> - Código Internacional de Nomenclatura Zoológica
SSU RNAr	Subunidade menor do Ácido Ribonucléico Ribossomal
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> - Administração de Alimentos e Drogas
FeLV	<i>Feline leukemia vírus</i> - Vírus da Leucemia Felina
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-RFLP	Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de Restrição
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida Humana
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> - Vírus da Imunodeficiência Humana
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
spp.	Espécies
sp.	Espécie
%	Por cento
M.	Microscopia
E. I.	Ensaio imunoenzimático
F. M.	Ferramenta molecular
(?)	Dados não informados
M	Machos
F	Fêmeas
≤	Menor ou igual
<	Menor
>	Maior
≥	Maior ou igual
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
SRD	Sem raça definida
µm	Micrômetro
Nm	Nanômetro
mg/Kg	Miligramas por quilo
mL	Mililitro
g/mL	Gramas por mililitro
°C	Grau Celsius
xg	Veze a força da gravidade
µg/mL	Microgramas por mililitro
µL	Microlitro
mM	Milimol
µM	Micromol
PB	Pares de base
M	Marcador de peso molecular
C+	Controle positivo
C-	Controle negativo
ng/µL	Nanogramas por microlitro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	3
2.1 Importância dos Animais de Companhia	3
2.1.1 Cães como animais de companhia	3
2.1.2 Gatos como animais de companhia	3
2.2 Taxonomia de <i>Cryptosporidium</i>	4
2.3 Ciclo Biológico de <i>Cryptosporidium</i> spp.	5
2.4 Infecção por <i>Cryptosporidium</i> em Cães e Gatos	6
2.4.1 Patologia e sinais clínicos	6
2.4.2 Transmissão	8
2.4.3 Tratamento	8
2.4.4 Profilaxia	9
2.5 Diagnóstico da Criptosporidiose	10
2.5.1 Diagnóstico através da microscopia	10
2.5.2 Diagnóstico por ensaios imunoenzimáticos	11
2.5.3 Diagnóstico através das ferramentas moleculares	11
2.6 Espécies de <i>Cryptosporidium</i> Parasitando Cães e Gatos	12
2.6.1 <i>Cryptosporidium canis</i>	12
2.6.2 <i>Cryptosporidium felis</i>	12
2.6.3 <i>Cryptosporidium muris</i>	12
2.6.4 <i>Cryptosporidium parvum</i>	13
2.6.5 Relatos de outras espécies de menor ocorrência em cães e gatos	13
2.7 <i>Cryptosporidium</i> como Zoonose	14
2.8 Distribuição da Criptosporidiose Canina e Felina no Brasil	16
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	20
3.1 Local de Coleta das Amostras Fecais	20
3.2 Descrição da População Analisada	20
3.3 Procedimentos de Coleta das Amostras Fecais	22
3.4 Processamento das Amostras Fecais e Diagnóstico Microscópico	22
3.5 Diagnóstico Molecular	23
3.5.1 Extração do DNA	23
3.5.2 Reação da PCR e Nested-PCR para o gene alvo 18S	23
3.5.3 Purificação, quantificação de DNA e sequenciamento	24
3.5.4 Alinhamento das sequências e análises filogenéticas	25
<b>4. RESULTADOS</b>	28
4.1 Diagnóstico Microscópico e Ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> spp. em Amostras Fecais de Cães e Gatos	28
4.2 Diagnóstico Molecular	32
4.3 Análise das Sequências e Filogenia de <i>Cryptosporidium</i>	33
<b>5. DISCUSSÃO</b>	41
5.1 Diagnóstico Microscópico e Ocorrência	41
5.2 Fatores de Risco da Criptosporidiose em Cães e Gatos	43
5.3 <i>Cryptosporidium</i> spp. e outros Parasitos Gastrointestinais	44

5.4 Diagnóstico Molecular de <i>Cryptosporidium</i> spp.	46
5.5 Importância de <i>C. parvum</i> , <i>C. felis</i> e <i>C. canis</i> como Zoonoses	48
<b>6. CONCLUSÕES</b>	50
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	51
<b>8. ANEXOS</b>	72
A - Resultados da pesquisa de amostras fecais de cães domiciliados em Campo Grande, Rio de Janeiro.	72
B - Resultados da pesquisa de amostras fecais de gatos domiciliados em Campo Grande, Rio de Janeiro.	74
C - Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) - Protocolo N° 070/2014.	76

# 1 INTRODUÇÃO

A humanidade tem estreitado cada vez mais a relação com animais de companhia. O contato físico e o compartilhamento do mesmo espaço de vida são ações muito comuns nos lares, onde esses animais frequentemente recebem uma atenção semelhante aos membros da família. Muitas pesquisas demonstram os benefícios à saúde dos humanos quando estão de posse dos seus animais de estimação, principalmente de cães e gatos. Dentre os vários motivos para obtenção desses animais, destaca-se a espontaneidade com que interagem com o ser humano. Além de serem dotados de muita energia e possuírem um amor incondicional por seus tutores, eles influenciam o desenvolvimento social e emocional, e promovem um estilo de vida ativo, proporcionando conforto, companheirismo, lazer, segurança, relaxamento e diminuição do estresse. Esses benefícios podem ser a curto e longo prazo, tendo impactos positivos em quase todos os estágios da vida humana.

A maioria das residências brasileiras tem animais de companhia. De acordo com dados de duas pesquisas realizadas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2013 a quantidade de moradias com cães no Brasil era maior do que com crianças e adolescentes entre 0 e 14 anos de idade (IBGE, 2015a; IBGE, 2015b). Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET), o Brasil é o quarto país com a maior população de animais de estimação do mundo, ficando atrás da China, Estados Unidos e Reino Unido (ABINPET, 2015). Além disso, o Brasil é o segundo maior país no mercado de *pets*, perdendo somente para Estados Unidos (WALSH, 2009).

Entretanto, apesar de todos os benefícios que esses animais, especialmente cães e gatos, proporcionam ao ser humano, é preciso também considerar os aspectos negativos desta relação. A convivência com animais de companhia, além de aumentar a possibilidade de transmissão de zoonoses, pode desenvolver em seus tutores alergias ao pelo do animal, mordeduras e arranhões. Ainda assim, a perda de um animal, seja por doença, desaparecimento ou roubo, pode acarretar muito sofrimento e angústia, inclusive levando à depressão.

Os tutores de cães e gatos muitas vezes não têm conhecimento de que seus animais podem abrigar microrganismos capazes de infectá-los. Dentre as possíveis zoonoses que humanos podem adquirir através do contato com esses animais, destaca-se a criptosporidiose, uma doença causada pelo Protista parasito do gênero *Cryptosporidium*.

*Cryptosporidium* é visto como um microrganismo oportunista, responsável por causar infecções intestinais e respiratórias em uma ampla variedade de hospedeiros da classe dos vertebrados em todo o mundo. Este patógeno é considerado de importante preocupação para a saúde pública e veterinária, pois a sua forma infectante, o oocisto, é facilmente dispersada no ambiente, tendo como via de infecção a forma fecal-oral; quer através do contato direto com humanos ou animais infectados, ou indiretamente, através dos alimentos e da água.

A infecção por *Cryptosporidium* pode causar diarreia abundante, aquosa com cólicas, dor abdominal e náuseas tanto em animais quanto em humanos. Geralmente é autolimitante em humanos imunocompetentes, com duração de apenas 2-4 dias, podendo tornar-se grave em situações onde há imunocomprometimento. Neste caso, há maior probabilidade de infecção por espécies de *Cryptosporidium* que, muitas das vezes, são diagnosticadas em cães e gatos, devido à relação humano-animal.

Estudos moleculares têm demonstrado que a maioria das infecções de cães e gatos é causada por *Cryptosporidium canis* e *Cryptosporidium felis*, respectivamente, denotando especificidade por esses hospedeiros. Por outro lado, *Cryptosporidium parvum* é reconhecida



como uma espécie generalista, apresentando uma gama de hospedeiros, incluindo humanos, e ocasionalmente, cães e gatos. Atualmente, *C. felis* é classificada como a quarta espécie do gênero *Cryptosporidium* mais comumente diagnosticada em seres humanos, seguida da espécie *C. canis*.

Embora o ser humano e animais de companhia possam se infectar com *Cryptosporidium* spp., o papel de cães e gatos na transmissão da criptosporidiose humana ainda não está claro. Por isso, nos últimos anos, o interesse na investigação de criptosporidiose canina e felina vem se destacando em diversas partes do mundo. Este fato é de suma importância para um melhor entendimento dos possíveis fatores de risco que levam à transmissão e propagação da infecção de *Cryptosporidium* entre os animais de estimação e seus proprietários.

Considerando a relevância que os animais de companhia, em especial os cães e os gatos, possuem na vida humana e que esses animais, ao eliminarem fezes no ambiente domiciliar colaborariam para dispersão ambiental da forma infectante de *Cryptosporidium*, o presente estudo teve por objetivos: diagnosticar por meio do exame parasitológico de fezes de cães e gatos domiciliados a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp.; caracterizar genotipicamente as espécies do gênero através do sequenciamento nucleotídico e realizar análises filogenéticas, comparando as sequências obtidas com aquelas depositadas no GenBank.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Importância dos Animais de Companhia

Nas últimas décadas, os animais de companhia tornaram-se cada vez mais importante na vida dos seres humanos. Numerosos estudos científicos demonstram os benefícios desses animais para a saúde humana, que contribuem significativamente tanto para o desenvolvimento físico, social e emocional dos seus proprietários como também facilitam na recuperação de determinadas doenças (BECK, MEYERS, 1996; WELLS, 2007; WELLS, 2009). Com base nisso, muitos profissionais e voluntários passaram a inserirem animais em trabalhos terapêuticos (O'HAIRE, 2010). O termo padronizado para esses trabalhos é Terapia Assistida por Animais (AAT), onde o animal é utilizado como suplemento ou associado com outras intervenções (ENDENBURG, van LITH, 2011).

Usufruir da companhia de um animal pode promover o desenvolvimento socioemocional e cognitivo de crianças (ENDENBURG, van LITH, 2011). Além disso, pode tornar-se uma fonte de interação social entre as pessoas (BECK, MEYERS, 1996, WELLS, 2009). Wells (2009) afirma que ter a posse de um animal de companhia pode ajudar a diminuir o estresse e melhorar o desempenho em atividades. Tais benefícios podem ser observados em indivíduos de diversas faixas etárias.

Muitos idosos são psicologicamente dependentes de animais de companhia. Esse vínculo pode permitir que idosos possam viver sozinhos sem ser solitários (BECK, MEYERS, 1996; PEREIRA et al., 2011). Os indivíduos com problemas neurológicos, como por exemplo, autismo, são muitas vezes intensamente sintonizados com animais (WALSH, 2009).

A relação entre humanos e animais é bastante antiga. Há evidências fósseis do convívio de humanos e cães que datam entre 12 a 15 mil anos (MOREY, 1994; LOPES, SILVA, 2012). O processo de domesticação e socialização dos animais foi uma interação de cooperação mútua de coevolução vinculada com a necessidade compartilhada por alimento, proteção e refúgio (WALSH, 2009). Nos dias atuais, os cães são os animais mais comuns nos lares brasileiros, seguidos por aves, gatos e peixes ornamentais (ABINPET, 2015).

#### 2.1.1 Cães como animais de companhia

Os cães (*Canis lupus familiaris*) foram inicialmente domesticados para caçar e proteger o ser humano. Eles foram valorizados pelos seus sentidos aguçados e comportamento de lealdade (WALSH, 2009). Uma das características comportamentais mais curiosas do cão doméstico moderno é a sua aptidão em reagir aos sinais gestuais humanos (UDELL, WYNNE, 2008). Acredita-se que esses animais foram possivelmente os primeiros a serem domesticados (MOREY, 1994).

De acordo com Charnetski et al. (2004), o simples ato de acariciar um cão reduz significativamente a pressão arterial da pessoa. Os cães têm sido largamente utilizados de forma positiva como assistentes para indivíduos portadores de alguma deficiência, incluindo, cegos, surdos, com problemas de mobilidade e epilepsia (WELLS, 2007).

#### 2.1.2 Gatos como animais de companhia

A domesticação dos gatos (*Felis catus domestica*) surgiu muito mais tarde em comparação aos cães, cerca de 5 mil anos (HU et al., 2014). Na época do desenvolvimento

das comunidades agrícolas, os gatos desempenharam um papel importante. Eles eram responsáveis por eliminar os roedores que traziam doenças e que ameaçavam as colheitas de grão (WALSH, 2009; HU et al., 2014).

Diferentemente dos cães que são mais subordinados, os gatos são animais independentes e individualistas; eles não precisam que os seres humanos os levem para passear e dormem ou ficam entretidos a maior parte do dia. Essas características podem ter sido realmente benéficas, aumentando assim, as possibilidades da sobrevivência dos gatos no domicílio (HUBER et al., 2002; UDELL, WYNNE, 2008). Udell e Wynne (2008) supõem que muitas vezes a escolha de gatos como animais de estimação seja devido ao fato que para mantê-los requer baixa manutenção em comparação aos cães.

## 2.2 Taxonomia de *Cryptosporidium*

As espécies do gênero *Cryptosporidium* são seres eucariontes intracelulares classificadas taxonomicamente em Império Eukaryota, Reino Protozoa, Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Subclasse Coccidiasina, Ordem Eucoccidiorida, Subordem Eimeriorina e Família Cryptosporidiidae (O'DONOGHUE, 1995; FAYER, 2007).

Os representantes do Filo Apicomplexa apresentam, em determinadas fases do ciclo de vida, uma estrutura denominada complexo apical, que apresenta várias organelas, que os permitem penetrar nas células dos hospedeiros. Além disso, todos são exclusivamente parasitos da Classe Sporozoa, apresentando reprodução assexuada e sexuada com formação de oocistos, e tendo a locomoção das formas infectantes realizada por flexão, deslizamento ou ondulação do corpo do parasito (FAYER, UNGAR, 1986; CURRENT, GARCIA, 1991; O'DONOGHUE, 1995).

Por desenvolverem a reprodução sexuada (gametogonia) e assexuada (merogonia) e esporogonia durante seu ciclo biológico, *Cryptosporidium* spp. pertence à Subclasse Coccidiasina. A Ordem Eucoccidiorida agrupa representantes que são capazes de infectar hospedeiros vertebrados. Em relação à Subordem Eimeriorina, são aqueles que apresentam desenvolvimento independente de gametas (masculino e feminino) (FAYER, UNGAR, 1986; CURRENT, GARCIA, 1991; O'DONOGHUE, 1995).

A Família Cryptosporidiidae apresenta um único Gênero, denominado *Cryptosporidium* que significa esporocisto ausente (do latim, *Crypto*: ausente, oculto; *Sporidium*: esporo) por não apresentar esporocistos, o oocisto apresenta somente esporozoítos. Nesta Família estão presentes as seguintes características: ciclo biológico se completa em um único hospedeiro (ciclo monoxênico), o parasito penetra na parte externa do citoplasma da célula (intracelular extracitoplasmático), microgametas não flagelados, oocistos contendo quatro esporozoítos e esporocistos ausentes (FAYER, UNGAR, 1986; CURRENT, GARCIA, 1991; O'DONOGHUE, 1995).

Alguns autores sugerem que *Cryptosporidium* spp. seria mais intimamente vinculado com os parasitos primitivos como as gregarinas (pertencentes à subclasse Gregarinasina que parasitam anelídeos, artrópodes e moluscos) em vez de coccídeos (RYAN, HIJJAWI, 2015). Pesquisas *in vitro* com as espécies *Cryptosporidium andersoni* e *C. parvum* infectando ratos revelaram formas de desenvolvimento extracelular, sugerindo que *Cryptosporidium* spp. possa não ser um agente etiológico intracelular obrigatório. Tal característica é semelhante aos gregarinas (HIJJAWI et al., 2002; THOMPSON et al., 2009). Outras similaridades que sustentam a hipótese de afinidade entre eles são: presença de dupla membrana no vacúolo parasitóforo, tamanho dos oocistos, ciclo monoxeno e localização em enterócitos (HIJJAWI et al., 2009). Apesar disso, ainda existem controvérsias na classificação taxonômica. Mais investigações são necessárias para compreender a posição taxonômica correta do gênero *Cryptosporidium*.

Dentro do gênero *Cryptosporidium* há uma extensa variação genética. No entanto, nem todas as espécies documentadas na literatura foram consideradas válidas. Isso devido à falta de informações morfológicas, biológicas e/ou caracterização genética que possa distinguir claramente as espécies entre si, ou então porque as espécies foram nomeadas fora das regras do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (*International Code of Zoological Nomenclature* - ICZN) (FAYER, 2007; FAYER, 2010).

Apesar de existirem controvérsias entre os autores sobre a quantidade exata de espécies aceitas, até o momento, 31 espécies são reconhecidas como válidas (HOLUBOVÁ et al., 2016; KVÁČ et al., 2016; ZAHEDI et al., 2016). Com poucas exceções, uma espécie de *Cryptosporidium* normalmente infecta apenas uma espécie específica ou um grupo de animais relacionados entre si (XIAO, FAYER, 2008).

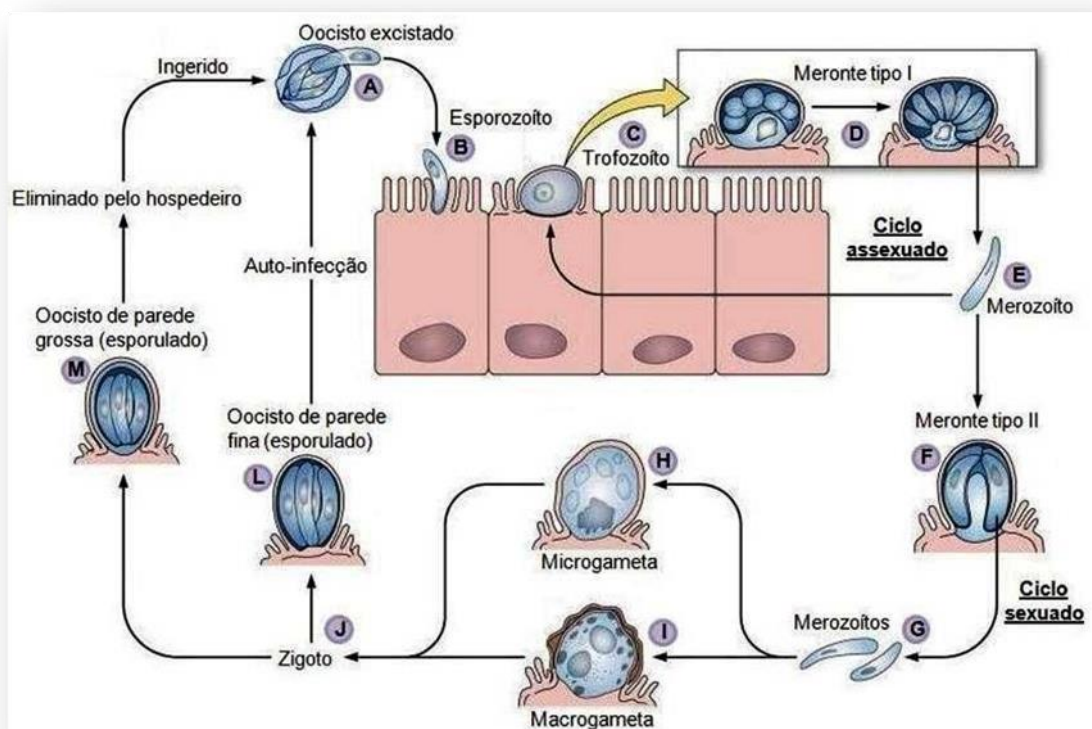
Além dessas espécies, há cerca de 40 genótipos que são denominados quando tem diferenças significativas em sequências parciais do gene codificador da subunidade menor do ácido ribonucléico ribossomal (SSU rRNA) (PLUTZER, KARANIS, 2009; RYAN, HIJJAWI, 2015). Um genótipo não é reconhecido com o táxon. Na verdade, se trata de uma descrição parcial e temporária (FAYER, 2007). Isso porque, com o aumento de dados biológicos e moleculares, acredita-se que muitos desses genótipos possam futuramente obter o status de espécies (XIAO, FAYER, 2008; RYAN et al., 2014). Também foram identificados sub-genótipos, que são variações dentro de um genótipo. Tais variações auxiliam a distinguir as fontes do parasito e sua abundância de hospedeiros (FAYER, 2007).

### **2.3 Ciclo Biológico de *Cryptosporidium* spp.**

O complexo ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp., que está representado na Figura 1, é completamente desenvolvido em um único hospedeiro com duração de aproximadamente dois dias (O'DONOGHUE, 1995; CACCIÒ, PUTIGNANI, 2014). As infecções ocorrem geralmente no trato gastrointestinal, entretanto, em alguns casos pode acometer também o trato respiratório. Os sítios de localização do parasitismo estão na dependência das espécies que estão envolvidas em uma determinada infecção (CURRENT, GARCIA, 1991; SPONSELLER et al., 2014).

O ciclo inicia-se quando o hospedeiro se infecta ao ingerir oocistos esporulados. No hospedeiro, ocorre o processo de excitação (Figura 1A), que permite a liberação dos esporozoítos (Figura 1B) em cada oocisto, mediante aos estímulos físico-químicos no lúmen intestinal (O'DONOGHUE, 1995; SPANO, CRISANTI, 2000). Os esporozoítos aderem e penetram na parte externa do citoplasma das células do epitélio intestinal. As infecções são predominantemente localizadas no jejuno e íleo. Após a invasão, os esporozoítos tornam-se ovais ou esféricos, se diferenciando em trofozoítos (Figura 1C) (O'DONOGHUE, 1995).

Em seguida, os trofozoítos multiplicam-se assexuadamente por merogonia, resultando na formação de dois tipos de merontes, tipo I e tipo II. Os merontes tipo I (Figura 1D) liberam de seis a oito merozoítos (Figura 1E) que ao penetrarem em uma nova célula hospedeira se transformam em outro meronte tipo I (processo de autoinfecção) ou então, meronte tipo II (Figura 1F). Este outro tipo desenvolve no seu interior quatro merozoítos (Figura 1G) que são liberados para invadirem novas células, iniciando a fase de reprodução sexuada por gametogonia. Nesta fase, ocorre a formação de microgametas (gametas masculinos - Figura 1H) e macrogametas (gametas femininos - Figura 1I). Após a fertilização do macrogameta pelo microgameta ocorre a formação do zigoto (Figura 1J). Posteriormente, este se transformará através do processo de esporogonia, em oocisto contendo quatro esporozoítos haplóides no seu interior (FAYER, 2007; CACCIÒ, PUTIGNANI, 2014).



**Figura 1.** Representação esquemática do ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp., demonstrando todas as fases endógenas no epitélio intestinal. Adaptado de Bouzid et al. (2013).

Dois tipos de oocistos são produzidos, a maioria com parede grossa (80%) e alguns com parede fina (20%). Os oocistos de parede fina (Figura 1L) permanecem no hospedeiro e liberam esporozoítos que resultam em autoinfecção interna. Os oocistos de parede grossa (Figura 1M) são altamente resistentes às adversidades ambientais e estão prontos para infectar novos hospedeiros, sendo eliminados junto às fezes do hospedeiro infectado (CURRENT, GARCIA, 1991; SCORZA, TANGTRONGSUP, 2010). Estes oocistos são eliminados pelo hospedeiro totalmente esporulado e são, portanto, imediatamente infectantes (FAYER, UNGAR, 1986).

Os oocistos apresentam-se com parede lisa, incolor, de forma esférica a subsférica, com quatro esporozoítos alongados no seu citoplasma e um corpo residual (SMITH, 2007). O tamanho dos oocistos varia de 3,0 a 8,5  $\mu\text{m}$ , dependendo da espécie (FAYER, 2007; ZEIBIG, 2014). Ao contrário dos outros membros da Subclasse Coccidiasina, o oocisto de *Cryptosporidium* spp. não tem esporocisto. Outras formas evolutivas, tais como merozoítos e gametócitos, não são observadas em amostras fecais; elas são detectadas apenas em materiais de biópsia intestinal (ZEIBIG, 2014).

## 2.4 Infecção por *Cryptosporidium* spp. em Cães e Gatos

### 2.4.1 Patologia e sinais clínicos

Criptosporidiose ou criptosporidíase é uma infecção intestinal ou respiratória causada por Protistas parasitos do gênero *Cryptosporidium* que infectam uma ampla variedade de

hospedeiros da classe dos vertebrados (FAYER, UNGAR, 1986; SMITH, NICHOLS, 2010). Esta doença é responsável por episódios de diarreia prolongada ou persistente associados à dor abdominal (O'DONOGHUE, 1995; LUCIO-FORSTER et al., 2010).

A gravidade e a duração da enfermidade dependem da suscetibilidade do hospedeiro e das espécies de *Cryptosporidium* envolvidas, podendo ser assintomática, aguda ou crônica (O'DONOGHUE, 1995; FAYER, 2007; GAŁĘCKI, SOKÓŁ, 2015). Em algumas situações, pode conduzir a uma doença grave, potencialmente fatal (FAYER, UNGAR, 1986; ROBERTSON et al., 2000).

O primeiro caso clínico de criptosporidiose em cães foi evidenciado na Escócia por Tzipori e Campbell (1981), que detectaram anticorpos contra *Cryptosporidium* nos soros de 16 de 20 cães. Porém, apenas dois anos mais tarde foi descrita a associação do agente etiológico com o processo da doença, através de um cão, com uma semana de vida, sofrendo de diarreia aguda (WILSON et al., 1983). Depois disso, criptosporidiose canina foi relatada em todo o mundo, envolvendo tanto os cães assintomáticos como os diarreicos (GIANGASPERO et al., 2006; EDERLI et al., 2008; SANTÍN, TROUT, 2007; SAMIE et al., 2013; SILVA et al., 2016).

Embora os oocistos de *Cryptosporidium* spp. sejam frequentemente detectados nas fezes dos cães, a maioria dos animais infectados apresenta fezes normais (ABE et al., 2002; LUPO et al., 2008; MCKENZIE et al., 2010; YOSHIUCHI et al., 2010; XU et al., 2016). Entretanto, os cães podem eliminar oocistos por 22 a 88 dias e serem assintomáticos (YOSHIUCHI et al., 2010), sendo que é mais provável encontrar oocistos nas fezes de animais com diarreia (HUNTER, THOMPSON, 2005; GIANGASPERO et al., 2006). Além disso, oocistos nas fezes são mais comumente detectados em cães mais velhos (BATCHELOR et al., 2008).

Os sinais clínicos são típicos em filhotes e geralmente estão associados à doenças concomitantes, como a cinomose canina (FUKUSHIMA, HELMAN, 1984; TURNWALD et al., 1988), Parvovírus (DENHOLM et al., 2001) ou uma imunodeficiência (GREENE et al., 1990; WILLARD, BOULEY, 1999). Contudo, a presença de infecções concomitantes dificulta a determinação se *Cryptosporidium* spp. é a principal causa da doença.

A infecção por *Cryptosporidium* spp. em gatos foi relatada pela primeira vez no Japão (ISEKI, 1979). Desde então, *Cryptosporidium* spp. parece ser comum em gatos assintomáticos e sintomáticos em todo o mundo (RAMBOZZI et al., 2007; SANTÍN, TROUT, 2007; FERREIRA et al., 2012; SAMIE et al., 2013; SILVA et al., 2015). As infecções são mais comumente observadas em filhotes (RAMBOZZI et al., 2007; YOSHIUCHI et al., 2010). A maioria dos estudos que incluem gatos experimentalmente e naturalmente infectados menciona a eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. sem a presença de sinais clínicos (MTAMBO et al., 1991; NASH et al., 1993; FAYER et al., 2006). Isso também foi observado por Yoshiuchi et al. (2010), onde gatos com criptosporidiose eliminavam oocistos por 48 a 116 dias e não apresentavam sinais clínicos de diarreia.

Contudo, os oocistos têm sido também observados nas fezes de gatos com diarreia (GOODWIN, BARSANTI, 1990; LENT et al., 1993; MORGAN et al., 1998; FITZGERALD et al., 2011). Animais com imunossupressão, como a infecção pelo vírus da leucemia felina (*Feline leukemia virus* - FeLV), são também susceptíveis a desenvolverem sinais clínicos de doença (MONTICELLO et al., 1987; LEMOS et al., 2011). Rambozzi et al. (2007) relataram que os gatos são mais propensos à infecção por *Cryptosporidium* spp. se infectados com outros parasitos entéricos. A incidência e a importância clínica de criptosporidiose em gatos são desconhecidas, mas a criptosporidiose pode ser incluída no diagnóstico diferencial de felinos com diarreias crônicas (SANTÍN, TROUT, 2007).

## 2.4.2 Transmissão

A infecção por *Cryptosporidium* spp. ocorre através da transmissão de oocistos por via fecal-oral de forma direta ou indireta. A forma direta é pelo estreito contato com o hospedeiro infectado e a indireta é pela ingestão de água ou alimentos contaminados com resíduos fecais contendo oocistos (XIAO, FAYER, 2008; RYAN et al., 2014). Normalmente, cães e gatos eliminam apenas  $10^3$  oocistos por grama de fezes. No entanto, a ingestão de uma pequena quantidade de oocistos é o suficiente para que o hospedeiro possa se infectar (SCORZA, TANGTRONGSUP, 2010; SCORZA, LAPPIN, 2012; RYAN et al., 2014).

A água é um importante veículo de transmissão de criptosporidiose. Há relatos da presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em fontes de água potável, águas de rios e mares, e águas residuais de diferentes localizações geográficas (NICHOLS et al., 2010; KOOMPAPONG, SUKTHANA, 2012; GALVÁN et al., 2014; MAHMOUDI et al., 2015; BUENO FRANCO et al., 2016). Esses oocistos são bastante resistentes ao cloro nas concentrações aplicadas no tratamento de água convencional para consumo humano. Além disso, por serem muito pequenos, os oocistos podem passar pelos filtros utilizados durante esse tratamento, colaborando assim, para sua disseminação (ZEIBIG, 2014; GAŁĘCKI, SOKÓŁ, 2015).

Alimentos contaminados com oocistos de *Cryptosporidium* spp. e consumidos crus ou levemente cozidos constituem fontes de infecção (SMITH, NICHOLS, 2010). Pesquisa feita em Turim, na Itália, revelou que a quantidade de gatos alimentados com comida caseira e mista (ração e comida caseira) e que contraíram criptosporidiose era cinco vezes maior em comparação com os gatos que ingeriam somente ração (RAMBOZZI et al., 2007). Maior positividade para *Cryptosporidium* spp. foi observada também em cães domiciliados da cidade de Lages, Santa Catarina, que recebiam apenas dieta caseira, reafirmando a relevância dos alimentos para a epidemiologia da infecção (MOURA et al., 2009). Além disso, no mesmo estudo realizado em Santa Catarina, foi revelado que animais mantidos em ambiente com terra/grama apresentaram maior positividade do que aqueles mantidos em ambiente sem esta característica.

Ambientes superlotados, como abrigos, clínicas veterinárias e pet shops, e condições insalubres podem promover a propagação de *Cryptosporidium* spp. entre os animais (LALLO, BONDAN, 2006; ITOH et al., 2014; XU et al., 2016). Além disso, a presença de animais assintomáticos pode influenciar na contaminação do ambiente e ocasionar a infecção ativa naqueles que são imunocomprometidos (SILVEIRA-NETO et al., 2015). Levando em consideração a alta resistência dos oocistos, a contaminação do ambiente pode durar vários meses, servindo como um reservatório de infecção (THOMPSON et al., 2008; YOSHIUCHI et al., 2010; GAŁĘCKI, SOKÓŁ, 2015).

## 2.4.3 Tratamento

Criptosporidiose em animais saudáveis geralmente há a cura espontaneamente. No entanto, a diarreia em animais imunocomprometidos pode ser difícil de ser controlada. A principal finalidade para um tratamento é interromper a diarreia (SCORZA, TANGTRONGSUP, 2010). Caso apresentem desidratação grave é indicado à reposição oral ou intravenosa de líquidos. Outro aspecto que deve ser lembrado é a ingestão de alimentos de fácil digestão (RAMIREZ et al., 2004; SCORZA, TANGTRONGSUP, 2010).

Diversos fármacos foram testados para tratar criptosporidiose. Infelizmente, a maioria deles não mostrou eficácia (ZEIBIG, 2014). A falta de opções terapêuticas contribui para alta prevalência e distribuição generalizada de *Cryptosporidium* spp. (RYAN et al., 2014). O único tratamento aprovado pela Administração de Alimentos e Drogas (*Food and Drug*

*Administration* - FDA) nos Estados Unidos foi com nitazoxanida (Alinia™, no Brasil conhecido como Annita®). Todavia, foi apenas prescrito para ser administrado em humano, ou seja, não existem medicamentos aprovados para cães e gatos (FOX, SARAVOLATZ, 2005; BOWMAN, LUCIO-FORSTER, 2010).

O número de relatos publicados sobre o tratamento da criptosporidiose canina e felina ainda é reduzido. A nitazoxanida foi testada em uma gata infectada por *Cryptosporidium* spp. que resultou no desaparecimento de oocistos nas fezes logo após o tratamento (BARR et al., 1994). Pimentel et al. (2011) ao investigarem a eficiência da nitazoxanida verificaram que na dosagem preconizada para crianças (7,5 mg/kg) não exerceu efeito no tratamento da criptosporidiose em cães. Scorza e Tangtrongsup (2010) recomendam a dosagem de 25 mg/kg por via oral a cada 12 horas durante pelo menos 7 dias. No entanto, este fármaco pode gerar irritação gastrointestinal e vômitos com frequência.

O uso da azitromicina parece ser seguro em cães e gatos, sendo a irritação gastrointestinal leve e o seu efeito colateral mais significativo. Porém, podem ser necessárias várias semanas de tratamento para que a diarreia possa cessar plenamente. Além do mais, esse antibiótico pode ser oneroso em animais de grandes portes (SCORZA, TANGTRONGSUP, 2010). FitzGerald et al. (2011) trataram um gato com criptosporidiose com 5,3 mg/kg de azitromicina a cada 12 horas por 2 semanas. O vômito cessou, mas a diarreia persistiu, apesar de ter melhorado.

Outros fármacos que também têm sido administrados em cães e gatos são tilosina e paromomicina. A tilosina não é tolerada pela maioria dos gatos, pois tem um paladar desagradável. Nesse caso, o uso em cápsulas se torna necessário (SCORZA, TANGTRONGSUP, 2010). Shahiduzzamana e Dauschiesb (2012) acreditam que atualmente a utilização da paramomicina seja a melhor escolha para o tratamento da criptosporidiose canina e felina. Porém, é digno de nota que animais com diarreia não podem ser tratados com paromomicina, porque sua absorção pode desenvolver nefrotoxicidade (SCORZA, TANGTRONGSUP, 2010).

#### **2.4.4 Profilaxia**

A realização regular de exames parasitológicos de fezes em cães e gatos, com ou sem diarreia, é uma importante medida de controle e profilaxia. Porém, como a quantidade de eliminação de oocistos nas fezes pode variar ciclicamente de dia para dia, um resultado negativo não exclui a possibilidade da parasitose. Então, sempre que possível, os exames de fezes devem ser repetidos ao longo de alguns dias (HUBER et al., 2005; MEKARU et al., 2007; GAŁECKI, SOKÓŁ, 2015), com a intenção de proporcionar melhores condições de saúde para os animais e impedir o risco de transmissão para seus tutores (PEREIRA et al., 2011).

Seguir boas práticas de higiene e ferver a água para limpeza de recipientes para acondicionamento de água e alimentos podem minimizar as chances de exposição ao oocisto de *Cryptosporidium* spp. (SCORZA, TANGTRONGSUP, 2010). Outra medida que pode ser eficaz é a exposição desses recipientes à luz solar, uma vez que os oocistos são sensíveis à radiação ultravioleta de emissões entre 248 e 295 nm e tornam-se irreversivelmente inativados (ROCHELLE et al., 2005; SILVEIRA-NETO et al., 2015). O ato de separar os animais diarreicos de outros animais normais também pode ser benéfico (SCORZA, TANGTRONGSUP, 2010).

Apesar dos esforços para o desenvolvimento de uma vacina contra a criptosporidiose, até o momento, não existe nenhuma disponível. Um dos principais motivos da dificuldade em formular uma terapia eficaz parece ser a localização incomum do parasito dentro da célula hospedeira (RAMIREZ et al., 2004; RYAN et al., 2014). Com isso, as expectativas para a



criação de uma vacina ainda parecem muito distantes, embora sua utilização em animais teria um valor considerável no combate da doença (THOMPSON et al., 2008).

## 2.5 Diagnóstico da Criptosporidiose

Diversas técnicas podem ser empregadas na detecção de *Cryptosporidium* spp., cada uma com sensibilidade e especificidade diferentes. As técnicas comumente utilizadas são as microscópicas, imunoenzimáticas e moleculares, as quais apresentam tanto vantagens como desvantagens. Coelho et al. (2009) e Meireles (2010) sugerem que a combinação de duas ou mais técnicas seja necessária para aumentar a precisão do resultado.

### 2.5.1 Diagnóstico através da microscopia

Tradicionalmente, a microscopia é utilizada para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em água, alimento e/ou amostras de fezes (O'DONOGHUE, 1995; NICHOLS et al., 2010). Os métodos baseados na observação de oocistos na microscopia têm vantagens devido ao baixo custo dos reagentes, serem relativamente simples e capazes de determinar a intensidade da infecção (MEIRELES, 2010; SILVEIRA-NETO et al., 2015). Além do mais, esses métodos não são específicos apenas para o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp., sendo assim, outros parasitos gastrointestinais também podem ser detectados durante a análise. Isso pode ser relevante quando há sintomatologia clínica de diarreia, que não é específico unicamente para criptosporidiose (THOMPSON et al., 2008).

Os oocistos de *Cryptosporidium* spp. podem ser difíceis de serem detectados microscopicamente devido ao seu pequeno tamanho, e eventualmente são muito parecidos com leveduras, esporos de fungos, algas, resíduos vegetais e outros detritos fecais (FAYER et al., 2000; MEIRELES, 2010). Por isso, os examinadores precisam ser bem treinados para que possam observar e identificar corretamente o parasito e desse modo, impedir que ocorram resultados falso-positivos e vice-versa (HUBER et al., 2002; MEIRELES, 2010).

Morfologicamente os oocistos de *Cryptosporidium* spp. são semelhantes, não sendo garantida a correta identificação da espécie (SMITH, NICHOLS, 2010; YOSHIUCHI et al., 2010). Dessa forma, técnicas de diagnóstico utilizando a microscopia não são capazes de identificar as espécies envolvidas numa infecção (JEX et al., 2008), mas podem servir como um procedimento de triagem (SCORZA, TANGTRONGSUP, 2010; LEMOS et al., 2011).

Uma variedade de métodos para concentrar oocistos em amostras fecais, corar e imunomarcá-los foram elaboradas com o propósito de auxiliar na identificação confiável do parasito, mesmo quando há uma baixa carga parasitária (FAYER, UNGAR, 1986; O'DONOGHUE, 1995). Lemos et al. (2011) enfatizam que os esporozoítos dentro dos oocistos devem ser observados para evitar um resultado incorreto. Na literatura brasileira, os métodos mais usados para diagnosticar criptosporidiose são os baseados na microscopia, isto por causa dos custos das técnicas moleculares (MEIRELES, 2010; BRESCIANI et al., 2013).

Os oocistos podem ser detectados utilizando-se esfregaços fixados em formalina e corados pelo Giemsa. Além disso, o uso de lugol ou coloração álcool-acidorrésistente modificada também auxilia na identificação dos oocistos (ZEIBIG, 2014). Há ainda outras técnicas de coloração que são bastante empregadas na detecção de oocistos em amostras fecais como Ziehl-Neelsen modificada (MOURA et al., 2009; ANJOS et al., 2013), Kinyoun (BRESCIANI et al., 2008; LEMOS et al., 2011) e Safranina-azul de metileno (BALASSIANO et al., 2009; MUNDIM et al., 2009). Entretanto, com a utilização dessas metodologias podem ocorrer problemas de sensibilidade e especificidade, podendo apresentar resultados variáveis entre laboratórios (ELLIOT et al., 1999).

Os procedimentos de concentração de oocistos, como flutuação em solução de sulfato

de zinco modificada e flutuação em solução de Sheather, são métodos necessários principalmente quando uma determinada amostra é analisada em microscopia de contraste de fase (ZEIBIG, 2014). Os ensaios de imunofluorescências têm sido estudados em amostras fecais de cães e gatos (LUPO et al., 2008; KOSTOPOULOU et al., 2017). Um dos principais benefícios desse ensaio é a capacidade de combinar o reconhecimento imunológico do microrganismo com a análise morfológica microscópica, com isso, os resultados falso-positivos são raros. Porém, apresenta a limitação de ter a necessidade do uso de um microscópio de fluorescência (SCORZA, TANGTRONGSUP, 2010).

### 2.5.2 Diagnóstico por ensaios imunoenzimáticos

Os ensaios imunoenzimáticos visam detectar antígenos específicos nas fezes através de anticorpos. A princípio, eles foram criados para uso com fezes humanas, porém, eles também têm sido utilizados para testar amostras fecais de cães e gatos (MEKARU et al., 2007; RIMHANEN-FINNE et al., 2007). Como esses ensaios utilizam anticorpos que foram desenvolvidos contra *C. parvum*, existe a chance de obter resultados falso-negativos quando comparados com diferentes antígenos (SCORZA, TANGTRONGSUP, 2010).

Dentre os ensaios imunoenzimáticos mais utilizados na detecção da infecção por *Cryptosporidium* spp. se destacam-se o ensaio de imunoabsorção enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - ELISA) e o ensaio imunocromatográfico (FAYER et al., 2000; JEX et al., 2008). Entretanto, ainda podem ser utilizadas como técnicas de diagnósticos a reação de aglutinação em látex, o anticorpo policlonal fluorescente, a imunofluorescência com anticorpos monoclonais, dentre outras (FAYER et al., 2000).

De modo geral, os ensaios imunoenzimáticos apresentam mais sensibilidade e especificidade em comparação com as técnicas microscópicas, além de fornecerem resultados mais rápidos (GARCIA, SHIMIZU, 1997; RAMIREZ et al., 2004). A principal desvantagem do uso desses ensaios está relacionada com a probabilidade de ocorrência de reações cruzadas com outros microrganismos, podendo gerar resultados falso-positivos (FAYER et al., 2000). Assim como as técnicas de microscopia, os ensaios imunoenzimáticos não conseguem determinar a espécie/genótipo de *Cryptosporidium* envolvida na infecção (JEX et al., 2008).

### 2.5.3 Diagnóstico através das ferramentas moleculares

As ferramentas moleculares são sensíveis e específicas para a detecção de DNA de determinado agente etiológico, incluindo *Cryptosporidium*, sendo capazes de identificar espécies e/ou genótipos e/ou subtipos envolvidos em determinadas infecções (EL-MADAWY et al., 2010; SMITH, NICHOLS, 2010).

Esta característica é de fundamental importância, pois permite avaliar a epidemiologia e as medidas de prevenção e controle de surtos de criptosporidiose (RAMIREZ et al., 2004; EL-MADAWY et al., 2010). Porém, devido ao seu custo, essas técnicas são normalmente restritas a estudos epidemiológicos, ou seja, não são rotineiramente utilizadas em laboratórios de diagnóstico (THOMPSON et al., 2008).

Dentre os métodos moleculares destaca-se a Nested-PCR, onde são usados dois pares de *primers*, cada par em uma etapa. Na primeira etapa é feita uma reação em cadeia pela polimerase (PCR), ocorrendo uma amplificação do material genético analisado e na segunda etapa, uma reamplificação é realizada (XIAO et al., 1999a; HUBER et al., 2007).

Outras metodologias moleculares têm sido empregadas para o diagnóstico de *Cryptosporidium*, como polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP), atualmente sendo pouco utilizada; PCR em tempo real (qPCR) dentre outras (FAYER et al., 2000; JEX et al., 2008).

Para a caracterização molecular de *Cryptosporidium* é realizado o sequenciamento dos fragmentos que foram amplificados na PCR ou em uma das suas variantes (HUBER et al., 2007). Em geral, o marcador molecular mais utilizado é o gene da subunidade 18S do RNA ribossomal (18S RNAr), mas outros marcadores também têm sido empregados, como gene codificante da glicoproteína 60kDa (gp60), proteína do choque térmico resistente ao calor de 70kDa (hsp-70) e proteína da parede do oocisto (COWP) (MORGAN et al., 2000; FAYER et al., 2001; PAVLASEK, RYAN, 2007; JEX et al., 2008; BESER et al., 2015).

## **2.6 Espécies de *Cryptosporidium* Parasitando Cães e Gatos**

### **2.6.1 *Cryptosporidium canis***

Morgan et al. (2000) identificaram e descreveram geneticamente o genótipo canino de *Cryptosporidium*, confirmando que se tratava mesmo de uma nova espécie. No ano seguinte, a espécie foi nomeada como *C. canis* por Fayer et al. (2001). O surgimento desta evidência genética foi bastante significativo, principalmente porque *C. canis* e *C. parvum* são morfologicamente e antigenicamente semelhantes (MORGAN et al., 2000; FAYER, 2010). Tais semelhanças permitiram que muitas infecções em cães fossem relatadas equivocadamente como *C. parvum* (FAYER, 2010).

O local de parasitismo de *C. canis* é o intestino delgado do hospedeiro e seus oocistos apresentam diâmetro maior de 4,95 µm e diâmetro menor de 4,71 µm (FAYER et al., 2001; SMITH et al., 2007). Infecções por *C. canis* são mais frequentemente relatadas no cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) (HUBER et al., 2007; THOMAZ et al., 2007; PALMER et al., 2008; JIAN et al., 2014; OSMAN et al., 2015; XU et al., 2016), entretanto tem sido detectado em outros hospedeiros, como cães-guaxinins (*Nyctereutes procyonoides*), mangustos (*Herpestes ichneumon*) raposas (*Vulpes vulpes* e *Vulpes lagopus*) e visons (*Mustela vison*) (ZHANG et al., 2016a; ZHANG et al., 2016b; MATEO et al., 2017).

### **2.6.2 *Cryptosporidium felis***

O primeiro relato de gatos naturalmente infectados por *Cryptosporidium* foi descrito no Japão por Iseki (1979), baseado na morfometria do parasito e nas tentativas sem sucesso de transmissão em outros hospedeiros. O mesmo autor nomeou a espécie de *C. felis*. O tamanho médio dos seus oocistos é de 4,6 x 4,0 µm (SARGENT et al., 1998), tendo como local de parasitismo também o intestino delgado do hospedeiro (SMITH et al., 2007).

Por apresentar elevada especificidade ao hospedeiro, até os dias atuais, *C. felis* é a espécie mais prevalente em gatos (HUBER et al., 2007; THOMAZ et al., 2007; PALMER et al., 2008; YOSHIUCHI et al., 2010; SILVEIRA-NETO et al., 2015; XU et al., 2016). Além de gatos, há apenas dois relatos descrevendo a presença dessa espécie em bovinos (BORNAY-LLINARES et al., 1999; CARDONA et al., 2015). Mais recentemente, Mateo et al. (2017) realizaram a primeira descrição molecular de *C. felis* em raposa (*Vulpes vulpes*).

### **2.6.3 *Cryptosporidium muris***

A primeira espécie de *Cryptosporidium* nomeada foi *C. muris*, a qual foi diagnosticada nas células das glândulas gástricas de camundongos. Tyzzer foi o responsável por descrever detalhadamente o ciclo biológico e as fases de desenvolvimento, além de nomear essa espécie (TYZZER, 1907; TYZZER, 1910). Os oocistos de *C. muris* foram mensurados e tiveram o diâmetro maior de 7,0 µm e diâmetro menor de 5,0 µm (TYZZER, 1910).

*Cryptosporidium muris*, uma espécie predominantemente de roedores, também foi

isolado em populações canina e felina. Santín et al. (2006) relataram pela primeira vez *C. muris* em um gato. No entanto, não foi possível determinar se o gato simplesmente abrigava os oocistos de um roedor infectado que havia ingerido ou se tinha uma infecção ativa. Posteriormente, outros autores também identificaram *C. muris* em gatos (PAVLASEK, RYAN, 2007; FITZGERALD et al., 2011; YANG et al., 2015). No estudo de FitzGerald et al. (2011), foi diagnosticado infecção mista com *C. felis* e *C. muris* em um gato com histórico de diarreia.

Há dois relatos de *C. muris* em cães (LUPO et al., 2008; ELLIS et al., 2010), sendo que Lupo et al. (2008) acreditam que a infecção no cão pode estar associada ao acesso a roedores infectados. Porém, cães infectados com *C. muris*, podem apresentar sintomatologia clínica (ELLIS et al., 2010), assim como também serem assintomáticos (LUPO et al., 2008).

#### **2.6.4 *Cryptosporidium parvum***

Em 1912, Tyzzer identificou microorganismos semelhantes a *Cryptosporidium* no intestino delgado de camundongos de laboratório. Contudo, até aquele momento, apenas uma única espécie tinha sido detectada, *C. muris* (TYZZER, 1910; FAYER, UNGAR, 1986). Porém, devido à diferença na localização intestinal e oocistos de tamanhos menores em comparação com *C. muris*, foi considerado que houve a descoberta de uma nova espécie, *C. parvum* (TYZZER, 1912).

*Cryptosporidium parvum* apresenta baixa especificidade ao hospedeiro, podendo parasitar uma grande variedade de mamíferos, sobretudo bezerros. Em estudos experimentais, *C. parvum* foi capaz de infectar cães e gatos (AUGUSTIN-BICHL et al., 1984; LLOYD, SMITH, 1997); casos de infecções naturais ocorrem ocasionalmente nestes hospedeiros (ŠLAPETA, 2013). Parece que infecções por *C. parvum* em gatos são mais raras do que em cães (XIAO et al., 1999b; HAJDUŠEK et al., 2004; GIANGASPERO et al., 2006; EL-MADAWY et al., 2010; SOTIRIADOU et al., 2013; LI et al., 2015).

O oocisto de *C. parvum* apresenta diâmetro maior de 5,0 µm e diâmetro menor de 4,5 µm (SARGENT et al., 1998). Até hoje, esta é a espécie mais estudada, apresenta uma enorme diversidade genética com subtipos caracterizados (XIAO, FAYER, 2008).

Dentre as espécies de *Cryptosporidium*, *C. parvum* tem sido a mais regularmente diagnosticada contaminando águas (NICHOLS et al., 2010; KOOMPAPONG, SUKTHANA, 2012; GALVÁN et al., 2014; MAHMOUDI et al., 2015; BUENO FRANCO et al., 2016), sendo uma forma de facilitar sua dispersão no ambiente.

#### **2.6.5 Relatos de outras espécies de menor ocorrência em cães e gatos**

Algumas outras espécies de *Cryptosporidium* também foram detectadas em cães e gatos, porém os registros são quantitativamente menores. No estudo de Gil et al. (2017), foi diagnosticado *Cryptosporidium hominis*, espécie conhecida por infectar exclusivamente ser humano, em um cão. Os autores acreditam que o cão pode também atuar como novo hospedeiro adequado para *C. hominis*. Outros exemplos de espécies de *Cryptosporidium* encontradas em cães são *C. meleagridis* (HAJDUŠEK et al., 2004), *C. scrofarum* (KOSTOPOULOU et al., 2017) e *C. ubiquitum* (LI et al., 2015), espécies que foram originalmente descritas a partir de peru, suínos e porco-espinho, respectivamente (SLAVIN, 1955; FAYER et al., 2010; KVÁČ, et al., 2013).

Há pouco tempo, *C. ryanae*, o genótipo *Cryptosporidium* do rato III e um novo genótipo mais intimamente relacionado a este genótipo foram identificados infectando naturalmente gatos (YANG et al., 2015). *Cryptosporidium ryanae* foi descrito a partir de bovinos e desde então, parece que esta espécie está restrita à este hospedeiro (FAYER et al.,

2008; ŠLAPETA, 2013). A detecção de *Cryptosporidium* associado a roedores (genótipo do rato III e o novo genótipo) no gato pode não ser propriamente uma infecção ativa, mas sim o resultado da transmissão mecânica devido ao consumo de roedores (falso parasitismo). Mais pesquisas precisam ser realizadas para que haja confirmação (YANG et al., 2015).

## 2.7 *Cryptosporidium* como Zoonose

A criptosporidiose tem sido considerada uma significativa zoonose que representa uma grande preocupação para saúde pública e veterinária (LUCIO-FORSTER et al., 2010; SOTIRIADOU et al., 2013). O gênero *Cryptosporidium* é um importante agente etiológico de diarreias, e muitas das vezes a doença é negligenciada. Resultados do *Global Enteric Multicenter* (GEMS) mostraram que *Cryptosporidium* spp. estão entre as principais causas de diarreia grave em crianças menores de 2 anos de idade (KOTLOFF et al., 2013). A transmissão zoonótica de *Cryptosporidium* através de animais domésticos foi deduzida após casos de humanos adoecerem depois de ficarem expostos a animais infectados (O'DONOGHUE, 1995).

Das 31 espécies consideradas como válidas algumas foram relatadas como capazes de causar infecções em humanos, dentre elas estão *C. canis*, *C. felis* e *C. parvum*, que também foram diagnosticadas em cães e gatos (ŠLAPETA, 2013; HOLUBOVÁ et al., 2016; KVÁČ et al., 2016; ZAHEDI et al., 2016). Contudo, os responsáveis pela maioria das infecções no ser humano são *C. hominis* e *C. parvum*, sendo *C. hominis* mais predominante. Outras espécies, como *C. canis* e *C. felis*, são casos menos comuns (XIAO et al., 2001; CAMA et al., 2007; ELWIN et al., 2012a; ADAMU et al., 2014). Desse modo, acredita-se que o risco de transmissão do agente etiológico para seres humanos através de cães e gatos seja provavelmente baixo (LUCIO-FORSTER et al., 2010; RYAN et al., 2014). No Quadro 1 encontram-se as espécies de *Cryptosporidium* associadas à infecção em humanos e suas rotas de transmissão.

Šlapeta (2013) relata que *C. canis* e *C. parvum* são espécies consideradas de menor importância em saúde pública, enquanto que *C. felis* seria de importância moderada. O destaque para *C. felis* também foi constatado por Lucca et al. (2009) ao detectarem uma frequência muito semelhante a *C. parvum* em humanos na cidade de São Paulo, Brasil, infectados com o vírus da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida Humana (SIDA), expressando 18,5% e 14,8% respectivamente. Com base nisso, sugere-se que gatos infectados por *C. felis* podem desempenhar um papel potencial na transmissão zoonótica da criptosporidiose.

O primeiro relato de *C. canis* e *C. felis* em humanos foi publicado por Pieniasek et al. em 1999, onde os pacientes estavam infectados pelo HIV. Posteriormente, outros estudos confirmaram a presença dessas duas espécies no mesmo hospedeiro. A maior parte desses relatos está relacionada com crianças, principalmente nos primeiros anos de vida, e indivíduos em condições de imunocomprometimento (XIAO et al., 2001; CAMA et al., 2007; LUCCA et al., 2009; FENG et al., 2012; ADAMU et al., 2014). Estes estão em maiores riscos em parte por causa de razões imunológicas, e conseqüentemente se tornam mais vulneráveis a adquirirem infecções (ROBERTSON et al., 2000; KANTERE et al., 2014). Outros grupos que também podem estar suscetíveis a infecções devido ao comprometimento do sistema imunológico são as mulheres grávidas e os idosos (KANTERE et al., 2014).

**Quadro 1.** Espécies de *Cryptosporidium* associadas à infecção em humanos e suas rotas de transmissão.

REFERÊNCIAS	ROTAS DE TRANSMISSÃO	ASSOCIAÇÃO COM INFECÇÃO E/OU DOENÇA EM HUMANOS	PRINCIPAL HOSPEDEIRO	ESPÉCIE DE <i>Cryptosporidium</i>
Ortega-Pierres et al. (2009); Ryan et al. (2016)	Antropozoonótica	Associado a diarreia em humanos em todo o mundo; causando surtos em comunidades, a maioria em crianças de países desenvolvimento	Humanos	<i>C. hominis</i>
Ortega-Pierres et al. (2009); Ryan et al. (2016)	Zoonótica (contato com animais de produção, especialmente animais jovens) e antropozoonótica	A causa mais comum de diarreia em humanos e animais, em todo o mundo; ocorrência de casos esporádicos	Mamíferos incluindo humanos	<i>C. parvum</i>
Šlapeta (2013)	Zoonótica	Dados de infecção experimental em hospedeiros adultos indicam ligeira doença. Casos esporádicos configurando com diarreia	Aves e mamíferos, incluindo humanos	<i>C. meleagridis</i>
Lucio-Forster et al. (2010)	Zoonótica; com baixo risco de transmissão pelos gatos	Diarreia em crianças no Peru; casos esporádicos em vários países, associado a indivíduos imunossuprimidos; alguns relatando contato com gatos	Gato	<i>C. felis</i>
Lucio-Forster et al. (2010)	Zoonótica; com baixo risco de transmissão pelos cães	Diarreia em crianças no Peru; casos esporádicos países em desenvolvimento; alguns relatam o contato com cães	Cão	<i>C. canis</i>
Chalmers et al. (2009)	Zoonótica	Causa dos surtos no Reino Unido e casos esporádicos na França e Nigéria	Coelhos e humanos	<i>C. cuniculus</i>
Palmer et al. (2003)	Zoonótica	Criptosporidiose gástrica; raros relatos em países em desenvolvimento associados a indivíduos com HIV / AIDS	Roedores e humanos	<i>C. muris</i>
Li et al. (2014)	Zoonótica e Antropozoonótica	Casos esporádicos em vários países, possivelmente envolvendo água contaminada por fezes de animais	Mamíferos, incluindo humanos	<i>C. ubiquitum</i>
Elwin et al. (2012b); Adamu et al. (2014)	Antropozoonótica	Casos esporádicos em diferentes países, envolvendo especialmente viajantes	Humanos	<i>C. viatorum</i>

Adaptado de Certad et al. (2017).

Algumas pesquisas diagnosticaram oocistos de *C. canis* e *C. felis* em animais e no ser humano que residiam no mesmo ambiente domiciliar. Um casal de irmãos, uma menina de 2 anos e 7 meses de idade e um menino de 6 anos e 5 meses de idade, e um cão foram diagnosticados com criptosporidiose durante o mesmo período, mas as rotas da transmissão não foram determinadas (XIAO et al., 2007). Beser et al. (2015) suspeitaram que provavelmente o gato foi a fonte inicial da infecção, devido os sintomas da doença

aparecerem antes da sua proprietária, uma mulher imunocompetente de 37 anos, apresentando um histórico de doenças anteriores, incluindo Síndrome do intestino irritável, e a utilização de corticosteróides. Entretanto, esses fatores não foram considerados facilitadores para a infecção por *Cryptosporidium*. Para assegurar a direção da infecção entre humanos e animais requer estudos epidemiológicos longitudinais elaborados com cautela para identificar a história natural da infecção (LUCIO-FORSTER et al., 2010).

Por questão de segurança, humanos devem adotar diariamente medidas de higiene para minimizar a transmissão da doença entre eles e os animais de companhia. O emprego de melhores condições de saneamento básico também é fundamental (BOWMAN, LUCIO-FORSTER, 2010). Recomenda-se que indivíduos imunocomprometidos evitem contatos tanto com as fezes dos animais como com animais menores de 6 meses de idade ou animais errantes (SCORZA, TANGTRONGSUP, 2010). Robertson et al. (2000) orienta que antes de adquirir um animal de abrigo, por exemplo, é essencial que este seja avaliado por um veterinário e que receba tratamento para eliminar possíveis infecções.

## 2.8 Distribuição da Criptosporidiose Canina e Felina no Brasil

A criptosporidiose em cães e gatos tem sido atualmente investigada em países como África do Sul (SAMIE et al., 2013), Alemanha (SOTIRIADOU et al., 2013), Austrália (PALMER et al., 2008) China (JIAN et al., 2014; LI et al., 2015; XU et al., 2016), Espanha (GIL et al., 2017), Japão (YOSHIUCHI et al., 2010) dentre outros. No Brasil, a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em cães e gatos foi registrada em diferentes estados, onde Rio de Janeiro e São Paulo são os locais com mais relatos (Quadros 2 e 3). Contudo, é importante ressaltar que a maioria desses estudos brasileiros não empregou técnicas moleculares e, portanto, não foi possível o diagnóstico de espécies.

De acordo com esses estudos epidemiológicos, a prevalência de infecções por *Cryptosporidium* varia de 1,0% a 94,44% em cães e 1,45% a 54,3% em gatos. Um fato que chama a atenção é prevalência da criptosporidiose canina (94,44%) encontrada por Fernandes et al. (2008). Em nenhum outro trabalho foi verificado uma taxa de infecção tão elevada. Todavia, existem vários fatores que podem influenciar a diferença desses valores. Dentre eles estão localização geográfica, tamanho e idade da população alvo, metodologia empregada e procedência dos animais (HAMNES et al., 2007; DALL'AGNOL et al., 2010). Esses fatores precisam ser levados em consideração quando se compara resultados de diferentes estudos (HAMNES et al., 2007).

Pereira et al. (2011) avaliaram a positividade de *Cryptosporidium* spp. na população de cães e gatos em Teresópolis, Rio de Janeiro, onde 87 de 300 animais (29,0%) tinham oocistos em suas fezes. Porém, não informaram separadamente a quantidade de cães e gatos infectada. Por essa razão, não foi possível afirmar a prevalência da infecção em cada população. O mesmo aconteceu com Thomaz et al. (2007), onde não foi indicado o total de cães e gatos envolvido na pesquisa, apenas informaram o número de cães e gatos infectados.

Pesquisa realizada em São Paulo com 450 cães verificou que por meio da técnica de PCR foi possível a detecção de *Cryptosporidium* spp. em três amostras a mais do que aquelas que foram obtidas na microscopia de luz, aplicando como metodologia esfregaço de fezes coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen. Isso reforça a necessidade da implementação de ambas as técnicas nos laboratórios (LALLO, BONDAN, 2006).

Grecca et al. (2013) utilizaram as mesmas técnicas aplicadas por Lallo e Bondan (2006) em amostras fecais de cães e gatos e observaram apenas resultados negativos através do diagnóstico microscópico, enquanto que a utilização de técnicas moleculares, apresentaram resultados positivos em algumas poucas amostras. Os autores acreditam que a explicação para o resultado negativo fosse devido à pequena quantidade de oocistos presentes nas fezes dos

animais. Resultados distintos entre diferentes metodologias também foram encontrados nas pesquisas de Bresciani et al. (2008) e Ferreira et al. (2012).

No estudo realizado por Alves et al. (2005), os cães domiciliados tiveram menor prevalência com relação aos errantes, apresentando 2,08% e 6,0% de positividade, respectivamente. Isso talvez possa ocorrer devido ao fato de que o ambiente interno e o menor contato com outros animais representam baixa exposição à infecção por *Cryptosporidium* (PEREIRA et al., 2011).

**Quadro 2.** Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em cães no Brasil de acordo com as técnicas de diagnóstico utilizadas, seus respectivos percentuais e locais das pesquisas.

REFERÊNCIAS	TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO	PERCENTUAL DE POSITIVIDADE	ESTADOS BRASILEIROS
Alves et al. (2005)	M.	11/434 (2,53%)	Goiás
Figueiredo et al. (2004)	E. I.	5/269 (1,85%)	Minas Gerais
Mundim et al. (2007)	M.	6/433 (1,4%)	
Navarro et al. (1997)	M.	3/133 (2,25%)	Paraná
Grecca et al. (2013)	M. e F. M.	0/116 (0%) 13/116 (11,2%)	
Gizzi et al. (2014)	M. e F. M.	10/147 (14,7%)	
Silva et al. (2016)	M.	31/97 (31,9%)	Pernambuco
Almeida et al. (2015)	M.	54/95 (56,84%)	Piauí
Huber et al. (2005)	M.	4/166 (2,41%)	Rio de Janeiro
Huber et al. (2007)	F. M.	1/4 (25,0%)	
Ederli et al. (2008)	M.	90/200 (45%)	
Fernandes et al. (2008)	M.	17/18 (94,44%)	
Balassiano et al. (2009)	M.	131/1500 (26,2%)	
Pereira et al. (2011)	M.	?/264 (?)	
Silva et al. (2007)	M.	21/240 (8,75%)	
Silva et al. (2008)	M.	61/109 (55,9%)	Rio Grande do Sul
Labruna et al. (2006)	M.	2/95 (2,1%)	Rondônia
Moura et al. (2009)	M.	8/200 (4,0%)	Santa Catarina
Frizzo et al. (2016)	M.	2/28 (7,1%)	
Gennari et al. (1999)	M.	10/353 (2,83%)	São Paulo
Lallo e Bondan (2006)	M. e F. M.	40/450 (8,8%) 43/450 (9,5%)	
Funada et al. (2007)	M.	43/1755 (2,4%)	
Thomaz et al. (2007)	M. e F. M.	9/? (?)	
Bresciani et al. (2008)	M. e E. I.	4/420 (1,0%) 10/420 (2,4%)	
Katagiri e Oliveira-Sequeira (2008)	M.	8/254 (3,1%)	
Sevá et al. (2010)	M. e F. M.	3/28 (10,7%)	
Ferreira et al. (2016)	M.	28 / 3099 (0,9%)	
Lallo et al. (2016)	M. e E. I.	50/1000 (5,0%)	

\* M.: Microscopia; E. I.: Ensaio imunoenzimático; F. M.: Ferramenta molecular; (?): Dados não informados.



**Quadro 3.** Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em gatos no Brasil de acordo com as técnicas de diagnóstico utilizadas, seus respectivos percentuais e locais das pesquisas.

AUTORES	TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO	PERCENTUAL DE POSITIVIDADE	ESTADOS BRASILEIROS	
Anjos et al. (2013)	M.	7/51 (13,72%)	Mato Grosso do Sul	
Grecca et al. (2013)	M. e F. M.	0/25 (0%) 1/25 (4,0%)	Paraná	
Silva et al. (2015)	M.	6/32 (18,8%)	Pernambuco	
Almeida et al. (2015)	M.	5/12 (41,67%)	Piauí	
Huber et al. (2002)	M.	6/48 (12,5%)	Rio de Janeiro	
Huber et al. (2007)	F. M.	9/30 (30,0%)		
Fernandes et al. (2008)	M.	1/3 (33,33%)		
Lemos et al. (2011)	M.	5/60 (8,33%)		
Pereira et al. (2011)	M.	?/85 (?)		
Ferreira et al. (2012)	M., E. I. e F. M.	13/102 (12,7%) 4/102 (3,9%)		
Carrasco et al. (2016)	M. e F. M.	10/100 (10%)		
Dall'Agnol et al. (2010)	M.	63/116 (54,3%)		Rio Grande do Sul
Pivoto et al. (2013)	M.	6/191 (3,1%)		São Paulo
Gennari et al. (1999)	M.	27/187 (14,44%)		
Ragozo et al. (2002)	M.	2/138 (1,45%)		
Funada et al. (2007)	M.	37/327 (11,3%)		
Thomaz et al. (2007)	M. e F. M.	7/? (?)		
Coelho et al. (2009)	M. e E. I.	2/51 (3,9%)		
Gennari et al. (2016)	M.	30/502 (5,9%)		

\* M.: Microscopia; E. I.: Ensaio imunoenzimático; F. M.: Ferramenta molecular; (?): Dados não informados.

Ao comparar os Quadros 2 e 3 é possível observar que a quantidade de pesquisas publicadas sobre criptosporidiose canina é mais frequente do que a felina. Almeida et al. (2015) e Silveira-Neto et al. (2015) sugeriram que a justificativa provavelmente seja porque a população de cães é maior do que a de gatos. Além do mais, a coleta de fezes de cães é mais fácil, pois os gatos normalmente enterram suas excretas.

Os primeiros sequenciamentos de *C. canis* em cães e *C. felis* em gatos no Brasil foram realizados por Huber et al. (2007) e Thomaz et al. (2007), tornando evidente a circulação dessas duas espécies nas cidades do Rio de Janeiro e de São Paulo, respectivamente. Em ambos os estudos foram utilizados PCR e Nested-PCR. Sevá et al. (2010) utilizaram as mesmas metodologias que os autores anteriores e diagnosticaram *C. canis* em cães de zona rural em São Paulo. Entretanto, alguns outros autores, como Ferreira et al. (2012), Grecca et al. (2013), Gizzi et al. (2014) e Carrasco et al. (2016), mencionam que utilizaram ferramentas moleculares no diagnóstico para *Cryptosporidium*, mas não informam as metodologias que usaram e as espécies que foram diagnosticadas, pois não realizaram o sequenciamento (Quadro 4).

Em relação a *C. parvum*, apesar de alguns trabalhos brasileiros documentaram a presença dessa espécie em cães e gatos (GENNARI et al., 1999; RAGOZO et al., 2002; ALVES et al., 2005; LABRUNA et al., 2006; SILVA et al., 2008), em nenhum houve a confirmação através das ferramentas moleculares, metodologias imprescindíveis para que haja a identificação de espécies. O único trabalho brasileiro que relata o diagnóstico de *C. parvum*

em cães utilizando ferramentas moleculares foi de Lallo e Bondan (2006), porém os autores mencionam que foi feita PCR, sem a Nested-PCR e sem a utilização do sequenciamento (Quadro 4). Na metodologia há muitas falhas, faltando itens para se fechar um diagnóstico preciso de espécie. Logo, a real prevalência de *C. parvum* tanto em cães quanto em gatos no Brasil é desconhecida.

**Quadro 4.** Estudos brasileiros sobre *Cryptosporidium* em cães e gatos utilizando ferramentas moleculares, destacando as espécies e as metodologias aplicadas.

REFERÊNCIAS	HOSPEDEIROS	ESPÉCIES	MÉTODOS
Huter et al. (2007)	Cães Gatos	<i>C. canis</i> <i>C. felis</i>	PCR, Nested-PCR e sequenciamento
Thomaz et al. (2007)	Cães Gatos	<i>C. canis</i> <i>C. felis</i>	PCR, Nested-PCR e sequenciamento
Sevá et al. (2010)	Cães	<i>C. canis</i>	PCR, Nested-PCR e sequenciamento
Lallo e Bondan (2006)	Cães	<i>C. parvum</i>	PCR
Ferreira et al. (2012)	Gatos	<i>Cryptosporidium</i> sp.	PCR
Grecca et al. (2013)	Cães Gatos	<i>Cryptosporidium</i> sp.	PCR e Nested-PCR
Gizzi et al. (2014)	Cães	<i>Cryptosporidium</i> sp.	qPCR
Carrasco et al. (2016)	Gatos	<i>Cryptosporidium</i> sp.	qPCR

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local de Coleta das Amostras Fecais

Foram feitas coletas de fezes de cães (*Canis lupus familiaris*) e gatos (*Felis catus*) no bairro de Campo Grande, Zona Oeste do município do Rio de Janeiro (22° 52' S, 43° 33' O) (Figura 2). Este bairro é considerado o de maior extensão física e, apesar das especulações imobiliárias na região, a ocupação é resultante de loteamentos isolados de grandes áreas com predomínio residencial de casas. Campo Grande apresenta uma economia diversificada com áreas rurais, uma zona industrial e um comércio que tem experimentado crescimento significativo nos últimos anos.

Partindo das características ocupacionais da região, tendo o predomínio de casas como residências, as amostras fecais de cães e gatos foram coletadas no interior de domicílios onde os animais eram criados como animais de companhia. Estes domicílios possuíam áreas externas (ou quintais), onde em alguns os animais tinham acesso fora dos mesmos, apesar desses retornarem aos seus domicílios para se alimentarem e manterem o convívio com seus tutores. Em muitos desses ambientes de criação de animais de companhia (cães e gatos), havia outros animais, tais como aves domésticas (galinhas) e aves de vida livre (pombos e rolinhas). Alguns proprietários relataram a presença também de roedores sinantrópicos.

A alimentação dos cães e gatos era à base de ração que muitas das vezes não estava de acordo com a faixa etária dos animais, além de sobra de alimentos de humanos. Muitos dos animais não tinham acesso à assistência veterinária e a água administrada era encanada.

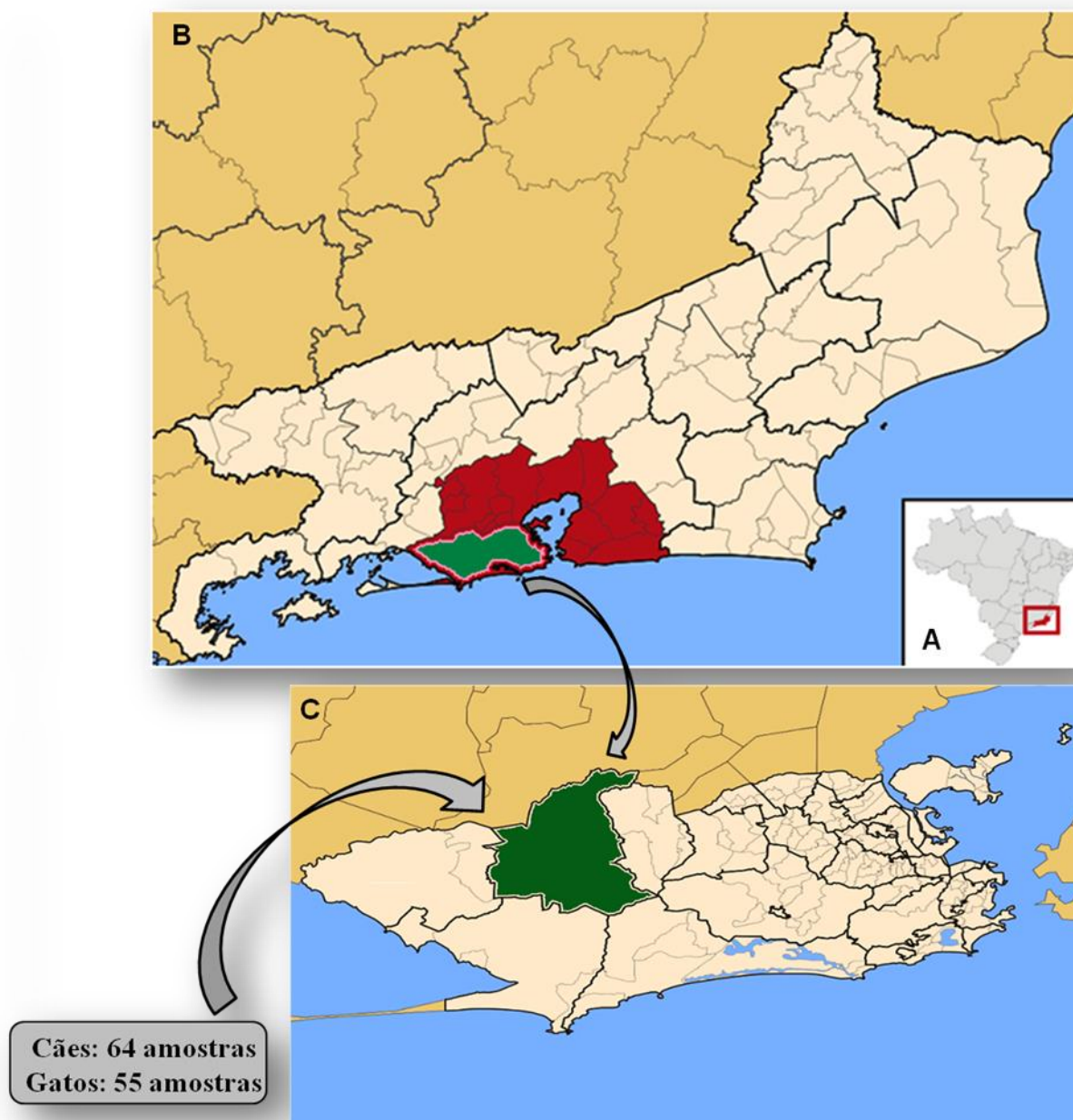
#### 3.2 Descrição da População Analisada

Foram coletadas 64 amostras de cães e 55 de gatos, totalizando 119 amostras. A população do estudo incluía cães e gatos de ambos os sexos, com faixa etária entre 3 meses a 13 anos de idade, com e sem diarreia (Anexos A e B). Os cães e gatos foram classificados em três categorias de faixa etária: jovens (até um ano), adultos (mais de um ano e menos de sete anos) e idosos (a partir de sete anos). No Quadro 5 está calculado separadamente a quantidade de cães e gatos de acordo com as variáveis abaixo.

**Quadro 5.** Percentuais das informações sobre sexo, idade e presença ou ausência de diarreia na população total (n = 119) de cães e gatos de Campo Grande, Rio de Janeiro.

ANIMAL	SEXO		IDADE			DIARREIA	
	F	M	≤ 1 ano	> 1 e < 7 anos	≥ 7 anos	Sim	Não
<b>CÃES, n = 64</b> (%)	25 (39)	39 (61)	6 (11)	35 (54)	23 (36)	24 (37,5)	40 (62,5)
<b>GATOS, n = 55</b> (%)	20 (36,4)	35 (63,6)	9 (16,3)	32 (58,2)	14 (25,5)	17 (31)	38 (69)

\* F: Fêmea; M: Macho.



**Figura 2.** Imagens da localização de coleta das amostras fecais provenientes de cães (*Canis lupus familiaris*) e gatos (*Felis catus*). A - Mapa do Brasil com a localização do estado do Rio de Janeiro. B - Mapa do estado do Rio de Janeiro, destacando em vermelho a região metropolitana do Rio de Janeiro e em verde o município do Rio de Janeiro ([https://pt.wikipedia.org/wiki/Mesorregi%C3%A3o\\_Metropolitana\\_do\\_Rio\\_de\\_Janeiro](https://pt.wikipedia.org/wiki/Mesorregi%C3%A3o_Metropolitana_do_Rio_de_Janeiro)). C - Mapa do município do Rio de Janeiro, destacando a área de coleta das amostras fecais (Adaptado de [https://pt.wikipedia.org/wiki/Santa\\_Cruz\\_\(bairro\\_do\\_Rio\\_de\\_Janeiro\)](https://pt.wikipedia.org/wiki/Santa_Cruz_(bairro_do_Rio_de_Janeiro))).

### **3.3 Procedimentos de Coleta das Amostras Fecais**

Para a realização da coleta das amostras fecais, os proprietários dos domicílios onde havia cães e gatos tiveram um esclarecimento prévio sobre a pesquisa e aqueles que aceitaram participar, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido autorizando a utilização das amostras fecais de seus animais. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, número 070/2014 (Anexo C).

Nos domicílios onde os proprietários dos animais aceitaram participar, foi acordado um dia de visita para a coleta das amostras fecais. Para tal, foi solicitado aos proprietários que não recolhessem as fezes dos animais no ambiente domiciliar. O propósito dessas visitas foi para que houvesse uma coleta adequada das amostras fecais, assim como também, a preservação correta das mesmas. As coletas foram realizadas em uma única vez.

As amostras fecais dos cães foram retiradas do ambiente domiciliar, considerando apenas aquelas de aparência recentemente eliminadas. Foram retiradas porções superficiais do bolo fecal sem que houvesse contato com o solo e foram acondicionadas em recipientes de plástico com tampa rosqueada, contendo solução fisiológica. Após as amostras serem identificadas, foram acondicionadas sob-refrigeração e encaminhadas ao laboratório para processamento.

Para a coleta das amostras fecais dos gatos, nos domicílios onde havia as caixas de areia, as amostras foram coletadas diretamente nestes locais. Naqueles onde não havia, foram fornecidas (doadas) as mesmas aos proprietários, que foram orientados de como eram colocadas no domicílio e como deveriam ser feitas a limpeza e higienização. Após um período de adaptação dos animais, aproximadamente uma semana, foram acordados junto aos tutores dos animais os dias para coleta. Uma única exceção foi que em um domicílio onde havia três gatos jovens com diarreia, cada um foi colocado no interior de caixas de papelão forradas com plástico, que após defecarem, foi recolhido os plásticos de forração do fundo e as fezes foram coletadas. Da mesma forma que as amostras fecais dos cães, as dos gatos foram acondicionadas em recipientes de plástico com solução fisiológica possuindo tampa rosqueada. Em seguida, o material foi identificado, acondicionado sob-refrigeração e encaminhado para o processamento.

### **3.4 Processamento das Amostras Fecais e Diagnóstico Microscópico**

O processamento das amostras fecais e o diagnóstico parasitológico das fezes dos animais foram realizados no laboratório de Protozoologia, situado no Departamento de Parasitologia Animal, do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. No laboratório, as amostras fecais foram catalogadas, processadas e diagnosticadas através da microscopia óptica utilizando a técnica de flutuação em solução saturada de açúcar (SHEATHER, 1923), com algumas alterações que seguem abaixo.

As amostras foram identificadas, homogeneizadas com água destilada e filtradas com o auxílio de um tamis plástico descartável revestido com gaze para reter os resíduos grosseiros. Depois da filtragem, a solução foi distribuída em dois tubos cônicos de 15 mL e centrifugada por 10 minutos a 402,4 xg. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, restando somente o sedimento.

Um tubo de cada amostra foi selecionado aleatoriamente e homogeneizado outra vez com solução saturada de açúcar (densidade específica de 1,30 g/mL), enquanto que o outro tubo foi armazenado sob-refrigeração a uma temperatura aproximada de 4 °C. Depois da homogeneização do tubo contendo sedimento com a solução saturada de açúcar, o material passou por uma nova centrifugação por 10 minutos a 402,4 xg.

Posteriormente, na segunda centrifugação, os tubos referentes a cada amostra, foram completados com solução saturada de açúcar até formar um menisco na superfície. Estes foram cobertos com uma lamínula de vidro e após um período de cinco minutos, a lamínula foi retirada da superfície do tubo e colocada sobre uma lâmina de vidro para a realização do diagnóstico microscópico parasitológico. As amostras foram consideradas positivas para *Cryptosporidium* spp. pela observação de oocistos na microscopia óptica de campo claro e contraste de fase.

Das amostras diagnosticadas positivas para a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp., os tubos de 15 mL correspondentes as mesmas amostras que se encontravam preservados sob-refrigeração foram posteriormente utilizados para a extração de DNA e as análises subsequentes.

### 3.5 Diagnóstico Molecular

As três próximas etapas, que compreendeu desde a extração de DNA, realização das reações da PCR e Nested-PCR, e purificação do DNA, foram realizadas no laboratório de Hemoparasitos e Vetores da Estação Experimental W. O. Neitz, pertencente ao Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

#### 3.5.1 Extração de DNA

Para a extração de DNA de *Cryptosporidium* sp. foi empregado o kit comercial da Qiagen (QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit) (COKLIN et al., 2009; DAS et al., 2011), de acordo com as recomendações especificadas pelo fabricante com duas modificações. A primeira modificação foi à utilização de um agitador com controle de temperatura, a uma rotação de 800 rpm, para auxiliar na homogeneização das amostras; a segunda, foi no final da extração, onde as amostras foram eluídas em 100 µL de tampão AE (fornecido pelo fabricante) ao invés de 200 µL como sugeria o manual de instruções, para concentrar o DNA (FAYER et al., 2010).

#### 3.5.2 Reações da PCR e Nested-PCR para o gene alvo 18S

A reação em cadeia da polimerase foi feita em duas fases, e para ambas foi usado o 18S como gene alvo. Na primeira reação (PCR) foram utilizados os *primers* 18SF: 5`- TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG-3` (*forward*) e 18SR: 5`- CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA-3` (*reverse*), obtendo-se amplicons em torno de 1.325 pb (XIAO et al., 1999b; FAYER et al., 2010). Para a segunda fase (Nested-PCR) foram usados os *primers* 18SNF: 5`- GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG-3` (*forward*) e 18SNR: 5`- AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A-3` (*reverse*), obtendo-se amplicons entre 826 a 864 pb, dependendo da espécie de *Cryptosporidium* e/ou genótipos detectados (XIAO et al., 1999b; FAYER et al., 2010). Como controle positivo para *Cryptosporidium* foi utilizado uma amostra de pombos na amplificação da PCR e para Nested-PCR, tendo como número de acesso KY561382, espécie *Cryptosporidium meleagridis* (trabalho ainda não publicado). Para o controle negativo foi utilizado água ultrapura.

Na realização das reações da PCR, foram utilizados 4 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0,2 µM de cada *primer* (18SF e 18SR - Invitrogen), Tampão Taq 1X (Invitrogen), 200 µM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTPs - Invitrogen), 1,0 U *Platinum Taq Polymerase* (Invitrogen), 2 µL de DNA da amostra e água ultrapura (*Nuclease-free water* - Promega) até completar o volume final de 25 µL. Para a reação da Nested-PCR foram utilizadas as mesmas

condições da PCR, com a exceção da concentração de  $MgCl_2$ , que passou a ser 2 mM e também, da utilização de 0,2  $\mu M$  do *primer* 18SNF e 0,2  $\mu M$  do *primer* 18SNR, acrescentando 1  $\mu L$  de DNA da amostra obtida da PCR e água ultrapura (*Nuclease-free water* - Promega) até completar o volume final de 25  $\mu L$ .

As condições da termociclagem utilizadas para a realização das reações da PCR e Nested-PCR tiveram como ponto de partida a temperatura de 94 °C por três minutos (*hot start*), seguida de um total de 35 ciclos onde ocorreu a desnaturação do DNA a 94 °C por 45 segundos, hibridização dos oligonucleotídeos através de um gradiente de temperatura que variou de 58 °C (PCR primária) e 59 °C (PCR secundária) por 45 segundos e a extensão da cadeia de DNA dos produtos formados a 72 °C por um minuto. Ao final dos 35 ciclos, foi realizada uma etapa de extensão a 72 °C por sete minutos.

Após a execução de todos os ciclos, 10  $\mu L$  do material foi visualizado através da eletroforese em gel de agarose a 2% (100V por 60 minutos), corado com brometo de etídio (5  $\mu g/mL$ ). O tampão da amostra utilizado foi *Loading Buffer* 6X – tipo III (SAMBROOK, RUSSEL, 2001) e o marcador usado como peso molecular foi *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen). O gel de agarose foi posteriormente observado sob luz ultravioleta, analisado e fotografado.

### 3.5.3 Purificação, quantificação de DNA e sequenciamento

Todas as amostras que amplificaram DNA, obtidas por meio da reação da Nested-PCR, foram mais tarde purificadas utilizando ExoSAP-IT® (USB Corporação; Cleveland, OH), de acordo com as recomendações do fabricante e depois, foram sequenciadas aplicando os iniciadores da Nested-PCR. O ExoSAP-IT® pode ser usado para purificar os produtos da PCR, variando de 100 bp até mais de 20 kb. Este produto é composto por duas enzimas, *Exonuclease I* (*Exo I*) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (*SAP*), as quais foram adicionadas a um microtubo 2,5  $\mu L$  de cada e mais 12,5  $\mu L$  do produto obtido da Nested-PCR.

Após centrifugação, os microtubos foram para o termociclador, inicialmente para uma incubação em 37 °C por 15 minutos seguido de inativação das enzimas ExoSAP-IT® a 80 °C durante 15 minutos. Desse modo, o DNA foi purificado. Dos microtubos contendo um volume total de 17,5  $\mu L$  de amostra, foi retirado 5  $\mu L$  do material acrescentado de 1,5  $\mu L$  de tampão que foi visualizado através de um gel de agarose a 2% (100V por 60 minutos), que foi corado com brometo de etídio (5  $\mu g/mL$ ). O tampão de amostra usado foi *Loading Buffer* 6X – tipo III (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e o marcador usado de peso molecular foi *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen) com 4  $\mu L$  acrescido de 1,5  $\mu L$  de tampão. O gel de agarose foi posteriormente observado sob luz ultravioleta, analisado e fotografado, para depois ser quantificado.

A quantificação de DNA de cada amostra foi feita através da visualização das bandas no gel, comparando com intensidade das bandas do marcador. Desta forma, foi dividida a quantidade em nanogramas das bandas observadas no gel por 4, porque foi aplicado 4  $\mu L$  do marcador. O ideal, para o envio de amostras para a Plataforma da USP, é que fiquem com aproximadamente 20 ng/ $\mu L$ , para a obtenção de sequências de boa qualidade. Caso seja acima de 20 ng/ $\mu L$  é recomendado diluições e o inverso concentração.

Após a purificação e obtenção ideal de ng/ $\mu L$  de DNA, um tubo de 0,2 mL contendo 5  $\mu L$  da amostra foi acrescido de 2,5  $\mu L$  do respectivo *primer* (Nested-PCR) a 5  $\mu M$ , totalizando 7,5  $\mu L$ . Este procedimento foi realizado para os *primers* F e R, desta forma obtendo dois tubos para cada amostra a ser enviada para o sequenciamento.

Para a realização do sequenciamento, os DNA purificados foram encaminhados para o Setor de Sequenciamento de DNA do Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP).

### 3.5.4 Alinhamento das sequências e análises filogenéticas

A análise dos cromatogramas e a edição das sequências foram realizadas utilizando o programa Bioedit versão 7.1 (HALL, 1999). O alinhamento das sequências foi feito através do algoritmo ClustalW (LARKIN et al., 2007). Na plataforma BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), foi feita uma busca de sequências obtidas através do sequenciamento dos espécimes utilizando o gene 18S para determinar suas identidades e possíveis homologias e similaridades com espécies previamente depositadas no GenBank.

As sequências registradas no GenBank utilizadas como parâmetro de comparação com as sequências consenso obtidas na presente pesquisa estão descritas no Quadro 6. As sequências obtidas neste estudo foram depositadas no GenBank, usando a plataforma BankIt, viabilizado pelo banco de dados.

Análises filogenéticas utilizando os métodos estatísticos *Neighbor-Joining* e *Maximum Likelihood* foram conduzidas utilizando-se o software MEGA 6 (TAMURA et al., 2011). A seleção do modelo de substituição nucleotídica que melhor se adequava aos dados foi realizada por meio do software MEGA 6. As análises filogenéticas para construção da árvore foram conduzidas utilizando o modelo de distribuição *General Time Reversible* com correção para distribuição gama e sítios invariáveis (Modelo GTR+G+I). O grau de confiabilidade foi testado utilizando-se a análise de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) com 1000 réplicas.



**Quadro 6.** Sequências usadas para o gene alvo 18S, registradas no GenBank e que foram comparadas com as encontradas na pesquisa para a elaboração da árvore filogenética.

ESPÉCIES E GENÓTIPOS	NÚMERO DE ACESSO DA SEQUÊNCIA NO GenBank	AUTOR	LOCAL	HOSPEDEIRO ORIGINÁRIO
<i>C. andersoni</i>	JN400881	Venu et al. (2012)	Índia	Bovino ( <i>Bos taurus</i> )
<i>C. baileyi</i>	EU814429	Wang et al. (2010)	China	Pato ( <i>Anas platyrhynchos</i> )
<i>C. bovis</i>	EU408317	Elwin e Chalmers (2008)	Escócia	Ovelha ( <i>Ovis aries</i> )
<i>C. canis</i>	AF112576	Xiao et al. (1999b)	EUA	Cão ( <i>Canis lupus familiaris</i> )
	KU608308	Zhang et al. (2016a)	China	Raposa ( <i>Vulpes vulpes</i> )
	EU754833	Jian et al. (2014)	China	Cão ( <i>Canis lupus familiaris</i> )
	KP890053	Osman et al. (2015)	França	Cão ( <i>Canis lupus familiaris</i> )
<i>C. cuniculus</i>	KC157561	Liu et al. (2014)	China	Coelho ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )
<i>C. felis</i>	AF108862	Morgan et al. (1999b)	Austrália	Gato ( <i>Felis catus domestica</i> )
	DQ836340	Santín et al. (2006)	Colômbia	Gato ( <i>Felis catus domestica</i> )
	AJ493211	Gatei et al. (2002)	Tailândia	Ser humano ( <i>Homo sapiens</i> )
	AF112575	Xiao et al. (1999b)	EUA	Gato ( <i>Felis catus domestica</i> )
<i>C. fragile</i>	EU162753	Jirku et al. (2008)	Malásia	Sapo ( <i>Duttaphrynus melanostictus</i> )
<i>C. galli</i>	HM116387	Qi et al. (2011)	China	Pássaro ( <i>Leiothrix argentauris</i> )
<i>C. hominis</i>	KP314259	Liu et al. (2015)	China	Macaco esquilo ( <i>Saimiri sciureus</i> )
<i>C. meleagridis</i>	KP730310	Vermeulen et al. (2015)	Austrália	Canguru ( <i>Petrogale penicillata</i> )
<i>C. molnari</i>	HM243547	Palenzuela et al. (2010)	Alemanha	Peixe ( <i>Sparus aurata</i> )
<i>C. muris</i>	EU553588	Pedraza-Díaz et al. (2009)	Espanha	Cobra ( <i>Python regius</i> )
	DQ836341	Santín et al. (2006)	Colômbia	Gato ( <i>Felis catus domestica</i> )
	AB697055	Murakoshi et al. (2013)	Japão	Rato de campo japonês ( <i>Apodemus speciosus</i> )
<i>C. parvum</i>	AF093014	Morgan et al. (1999a)	Austrália	Javali ( <i>Sus scrofa</i> )
	LC012016	Aita et al. (2015)	Japão	Bovino ( <i>Bos taurus</i> )
	KM012046	Hadfield et al. (2015)	Reino Unido	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )
	EF175938	Meireles et al. (2007)	Brasil	Capivara ( <i>Hydrochoerus hydrochoeris</i> )
<i>C. serpentis</i>	AF151376	Kimbell et al. (1999)	EUA	Cobra do milho ( <i>Elaphe guttata guttata</i> )

**Quadro 6.** Sequências usadas para o gene alvo 18S, registradas no GenBank e que foram comparadas com as encontradas na pesquisa para a elaboração da árvore filogenética (Continuação).

<b>ESPÉCIES E GENÓTIPOS</b>	<b>NÚMERO DE ACESSO DA SEQUÊNCIA NO GenBank</b>	<b>AUTOR</b>	<b>LOCAL</b>	<b>HOSPEDEIRO ORIGINÁRIO</b>
<i>C. suis</i>	JQ936482	Yin et al. (2013)	China	Suíno ( <i>Sus scrofa</i> )
<i>C. ubiquitum</i>	JN642225	Cieloszyk et al. (2012)	Espanha	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )
Duck genotype	AY504514	Zhou et al. (2004)	EUA	Ganso do Canadá ( <i>Branta canadensis</i> )
Goose genotype I	AY120912	Xiao et al. (2002)	EUA	Ganso do Canadá ( <i>Branta canadensis</i> )
Avian genotype I	GQ227479	Nakamura et al. (2009)	Brasil	Canário ( <i>Serinus canaria</i> )
Goose genotype II	AY504515	Zhou, et al. (2004)	EUA	Ganso do Canadá ( <i>Branta canadensis</i> )
Avian genotype II	DQ002931	Meireles et al. (2006)	Brasil	Avestruzes ( <i>Struthio camelus</i> )
Avian genotype II	JX548292	Wang et al. (2014)	China	Galinha ( <i>Gallus gallus</i> )
Avian genotype V	HM116381	Qi et al. (2011)	China	Calopsita ( <i>Nymphicus hollandicus</i> )
Avian genotype V	KJ487974	Nakamura et al. (2014)	Brasil	Papagaio verdadeiro ( <i>Amazona aestiva</i> )

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Diagnóstico Microscópico e Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em Amostras Fecais de Cães e Gatos

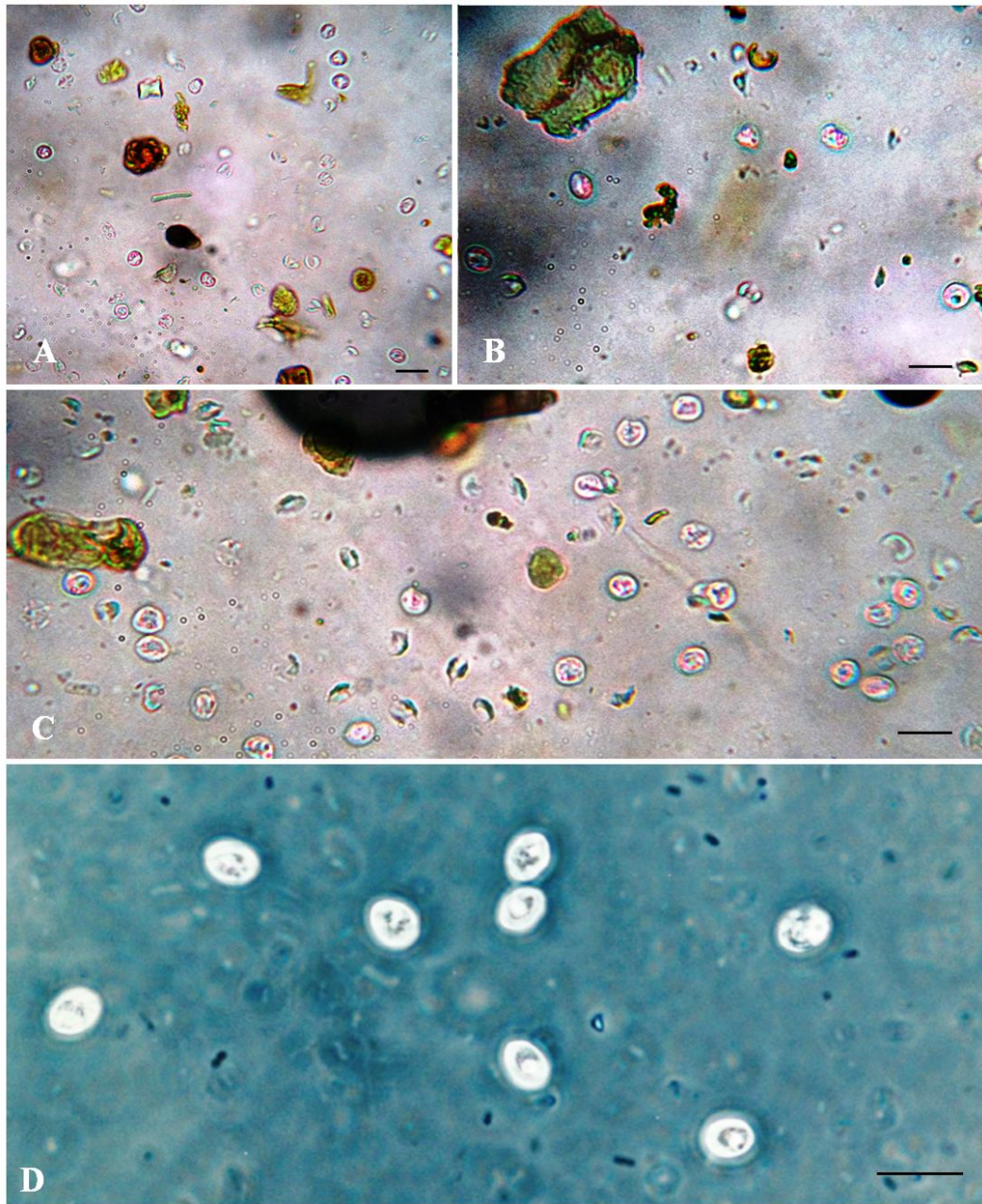
Através do diagnóstico parasitológico de fezes, utilizando a técnica de centrifugação e flutuação com solução saturada de açúcar (SHEATHER, 1923) modificado, foi possível a observação na microscopia óptica de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em oito dos 119 animais domiciliados (6,7%). Na Figura 3 encontram-se as imagens dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. das amostras fecais de cães e gatos.

Além de *Cryptosporidium* spp., outros parasitos gastrointestinais também foram detectados nas amostras fecais após a utilização da mesma técnica que foi citada anteriormente. Na Tabela 1 encontram-se os percentuais de positividade de *Cryptosporidium* spp. e dos demais parasitos gastrointestinais diagnosticados nos cães e gatos domiciliados.

**Tabela 1.** Ocorrência de infecções gastrointestinais em amostras fecais de 119 animais domiciliados (cães e gatos) do bairro de Campo Grande, Rio de Janeiro.

PARASITOS	CÃES (n = 64)		GATOS (n = 55)		TOTAL (%)
	Positivos	%	Positivos	%	
<b>Protistas</b>					
<i>Cryptosporidium</i> spp.	5	7,8	3	5,4	8 (6,7)
<i>Cystoisospora</i> spp.	16	25	7	12	23 (19,3)
<i>Giardia intestinalis</i>	9	14	5	9	14 (11,7)
<b>Helmintos</b>					
Ancylostomatidae	8	12,5	5	9	13 (10,9)
<i>Toxocara canis</i>	6	9,3	0	0	6 (9,3)
<i>Toxocara cati</i>	0	0	3	5,4	3 (5,4)
<i>Dipylidium caninum</i>	3	4,6	0	0	3 (4,6)
<i>Trichuris vulpis</i>	1	1,5	0	0	1 (1,5)

Dentre todos os parasitos gastrointestinais identificados, uma maior predominância em cães foi de *Cystoisospora* spp., seguida de *Giardia intestinalis*, Ancylostomatidae, *Toxocara canis*, *Cryptosporidium* spp., *Dipylidium caninum* e *Trichuris vulpis*. Infecções por *Cystoisospora* spp. em gatos também foram as mais recorrentes, seguidas por *Giardia intestinalis* e Ancylostomatidae, onde ambas tiveram o mesmo percentual, e por último *Cryptosporidium* spp. e *Toxocara cati*, que também apresentavam a mesma frequência.



**Figura 3.** Oocistos de *Cryptosporidium* spp. observados na microscopia óptica após a utilização da técnica de centrifugação e flutuação em solução saturada de açúcar (SHEATHER, 1923) modificada, provenientes de amostras fecais de cães e gatos do bairro de Campo Grande, município do Rio de Janeiro. Oocistos em A, B e C observados sem o contraste de fase; e D, observados com o contraste de fase (— = 10 µm).

As Tabelas 2 e 3 estão representadas as associações entre cada parasito e as variáveis analisadas nos 58 animais positivos (48,7%). Das amostras positivas para todos os parasitos gastrointestinais, a população de cães obteve a maior quantidade de infecções em comparação a dos gatos, 41 (70,7%) e 17 (29,3%) respectivamente. As infecções foram mais frequentes em animais machos e adultos, e cães assintomáticos e gatos com fezes diarreicas. Entretanto, 27 das 58 amostras positivas para parasitos gastrointestinais (46,5%) não apresentavam

quadro clínico de diarreia.

Com relação às amostras positivas de *Cryptosporidium* spp., os cães apresentavam fezes dentro dos padrões de normalidade, com exceção de apenas uma amostra. Além disso, cinco cães, destes quatro eram animais do sexo masculino e adultos e uma fêmea com idade avançada. Em se tratando dos gatos, todos os três apresentavam um quadro clínico de diarreia e eram machos com 3 meses de idade (jovens).

**Tabela 2.** Frequência de infecções gastrointestinais segundo sexo, idade e presença ou ausência de diarreia, em amostras fecais positivas de cães domiciliados do bairro de Campo Grande, Rio de Janeiro.

PARASITOS	SEXO		IDADE			DIARREIA	
	F	M	≤ 1 ano	> 1 e < 7 anos	≥ 7 anos	Sim	Não
<i>Cryptosporidium</i> spp.	0	4	0	4	0	0	4
<i>Cystoisospora</i> spp.	5	8	4	7	2	7	6
<i>Giardia intestinalis</i>	1	6	0	3	4	4	3
Ancylostomatidae	3	0	1	1	1	2	1
<i>Toxocara canis</i>	4	1	1	2	2	0	5
<i>Dipylidium caninum</i>	0	2	0	2	0	1	1
<i>Cryptosporidium</i> spp. + <i>Dipylidium caninum</i>	1	0	0	0	1	1	0
<i>Cystoisospora</i> spp. + <i>Giardia intestinalis</i>	0	1	0	1	0	1	0
<i>Cystoisospora</i> spp. + Ancylostomatidae	1	1	1	1	0	2	0
<i>Giardia intestinalis</i> + Ancylostomatidae	0	1	1	0	0	0	1
Ancylostomatidae + <i>Toxocara canis</i>	0	1	0	0	1	1	0
Ancylostomatidae + <i>Trichuris vulpis</i>	0	1	0	0	1	0	1
<b>TOTAL (%)</b>	15 (36,6)	26 (63,4)	8 (19,5)	21 (51,2)	12 (29,3)	19 (46,34)	22 (53,66)

\* F: Fêmea; M: Macho.

**Tabela 3.** Frequência de infecções gastrointestinais segundo sexo, idade e presença ou ausência de diarreia, em amostras fecais positivas de gatos domiciliados do bairro de Campo Grande, Rio de Janeiro.

PARASITOS	SEXO		IDADE			DIARREIA	
	F	M	≤ 1 ano	> 1 e < 7 anos	≥ 7 anos	Sim	Não
<i>Cryptosporidium</i> spp.	0	3	3	0	0	3	0
<i>Cystoisospora</i> spp.	0	2	2	0	0	2	0
<i>Giardia intestinalis</i>	2	0	1	0	1	1	1
Ancylostomatidae	1	1	0	2	0	0	2
<i>Toxocara cati</i>	1	1	0	2	0	0	2
<i>Cystoisospora</i> spp. + <i>Giardia intestinalis</i>	2	1	0	2	1	3	0
<i>Cystoisospora</i> spp. + Ancylostomatidae	0	2	0	2	0	2	0
Ancylostomatidae + <i>Toxocara canis</i>	0	1	0	0	1	1	0
<b>TOTAL</b>	6	11	6	8	3	12	5
(%)	(35,3)	(64,7)	(35,3)	(47,1)	(17,6)	(70,6)	(29,4)

\* F: Fêmea; M: Macho.

Algumas infecções com mais de um parasito foram identificadas, representando apenas 22,4% (13 animais) de todas as amostras positivas. No entanto, em praticamente todos esses casos os animais apresentavam fezes com diarreia (84,6%). Infecções concomitantes envolvendo *Cryptosporidium* spp. só foi encontrada em um cão. Além de *Cryptosporidium* spp., foi diagnosticado nas fezes desse animal ovos e cápsula ovígera do helminto *Dipylidium caninum*. O cão em questão foi o único infectado por *Cryptosporidium* spp. que apresentou fezes com diarreia. A respeito dos gatos com criptosporidiose, não apresentaram infecções concomitantes.

Na maioria das residências onde as amostras fecais foram coletadas habitava apenas um animal. Nas poucas residências que tinham a presença de dois ou três animais foi observado que eles compartilhavam de pelo menos um parasito gastrointestinal (Tabela 4). Os três gatos infectados por *Cryptosporidium* spp. pertenciam ao mesmo domicílio. No que diz respeito aos cães infectados por este mesmo parasito, todos habitavam em domicílios diferentes.

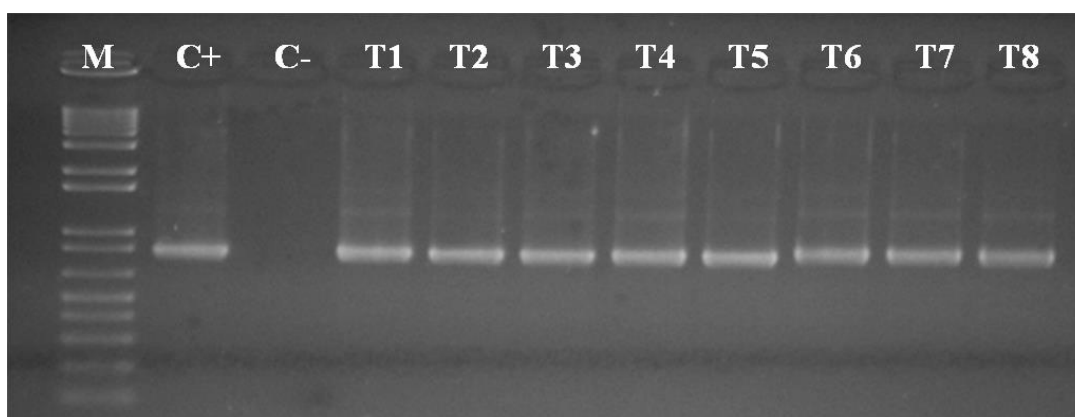
**Tabela 4.** Relação dos animais (cães e gatos) que habitavam o mesmo domicílio no bairro de Campo Grande, Rio de Janeiro.

RESIDÊNCIA	ANIMAIS	AMOSTRA	DIARREIA	RESULTADO DE EXAME PARASITOLÓGICO DE FEZES
I	Cães	9	Sim	<i>Cystoisospora</i> spp. e <i>Ancylostomatidae</i>
		10	Sim	<i>Cystoisospora</i> spp.
II	Cães	24	Não	<i>Toxocara canis</i>
		25	Não	<i>Toxocara canis</i>
III	Cães	59	Não	<i>Cystoisospora</i> spp.
		60	Não	<i>Cystoisospora</i> spp.
IV	Gatos	12	Sim	<i>Cryptosporidium</i> spp.
		13	Sim	<i>Cryptosporidium</i> spp.
		14	Sim	<i>Cryptosporidium</i> spp.

#### 4.2 Diagnóstico Molecular

As oito amostras que foram diagnosticadas positivas para *Cryptosporidium* spp. pela visualização de oocistos na microscopia óptica, cinco provenientes de cães e três de gatos, foram submetidas ao diagnóstico molecular. Nas reações da Nested-PCR foram observados amplicons com aproximadamente 830 pb (Figura 4), confirmando que a região do gene alvo foi amplificada para *Cryptosporidium* sp. (XIAO et al., 2000).

Os resultados das amostras positivas diagnosticadas pela microscopia foram em concordância com resultados da Nested-PCR e amplicons de todas as amostras positivas na Nested-PCR, foram sequenciados.



**Figura 4.** Amplificação pela Nested-PCR do gene alvo 18S. Eletroforese em gel de agarose a 2% contendo as amostras de *Cryptosporidium* spp. M = 1Kb Plus DNA Ladder; C+ = controle positivo; C- = controle negativo; T1 a T5 = amostras de cães; T6 a T8 = amostras de gatos.

### 4.3 Análise das Sequências e Filogenia de *Cryptosporidium*

Das amostras que amplificaram na Nested-PCR para o gene 18S, todas foram purificadas e sequenciadas. Na Tabela 5 encontram-se os tamanhos das sequências obtidas das amostras de cães e gatos após análise da qualidade dos cromatogramas.

As sequências obtidas neste estudo foram alinhadas (Figuras 5, 6 e 7) e comparadas com sequências depositadas no GenBank. A comparação dos fragmentos das amostras dos cães T1 e T4 com sequência completa do 18S de *Cryptosporidium parvum* depositada no GenBank (número de acesso: AF164102) (BLEARS et al., 2000), permitiu localizar aproximadamente a posição nucleotídica dos fragmentos analisados: T1: 237-975 e T4: 237-976. As sequências dos cães (T1 e T4), obtidas neste estudo, foram alinhadas e se encontram-se na Figura 5. As sequências foram depositadas no GenBank com os seguintes números: T1 = MF589922 e T4 = MF589923.

**Tabela 5.** Tamanho das sequências obtidas de *Cryptosporidium* após análise da qualidade dos cromatogramas das amostras, referente aos cães (T1 a T5) e aos gatos (T6 a T8).

NOME	TAMANHO DO FRAGMENTO
T1	737 pb
T2	739 pb
T3	743 pb
T4	737 pb
T5	745 pb
T6	738 pb
T7	692 pb
T8	706 pb

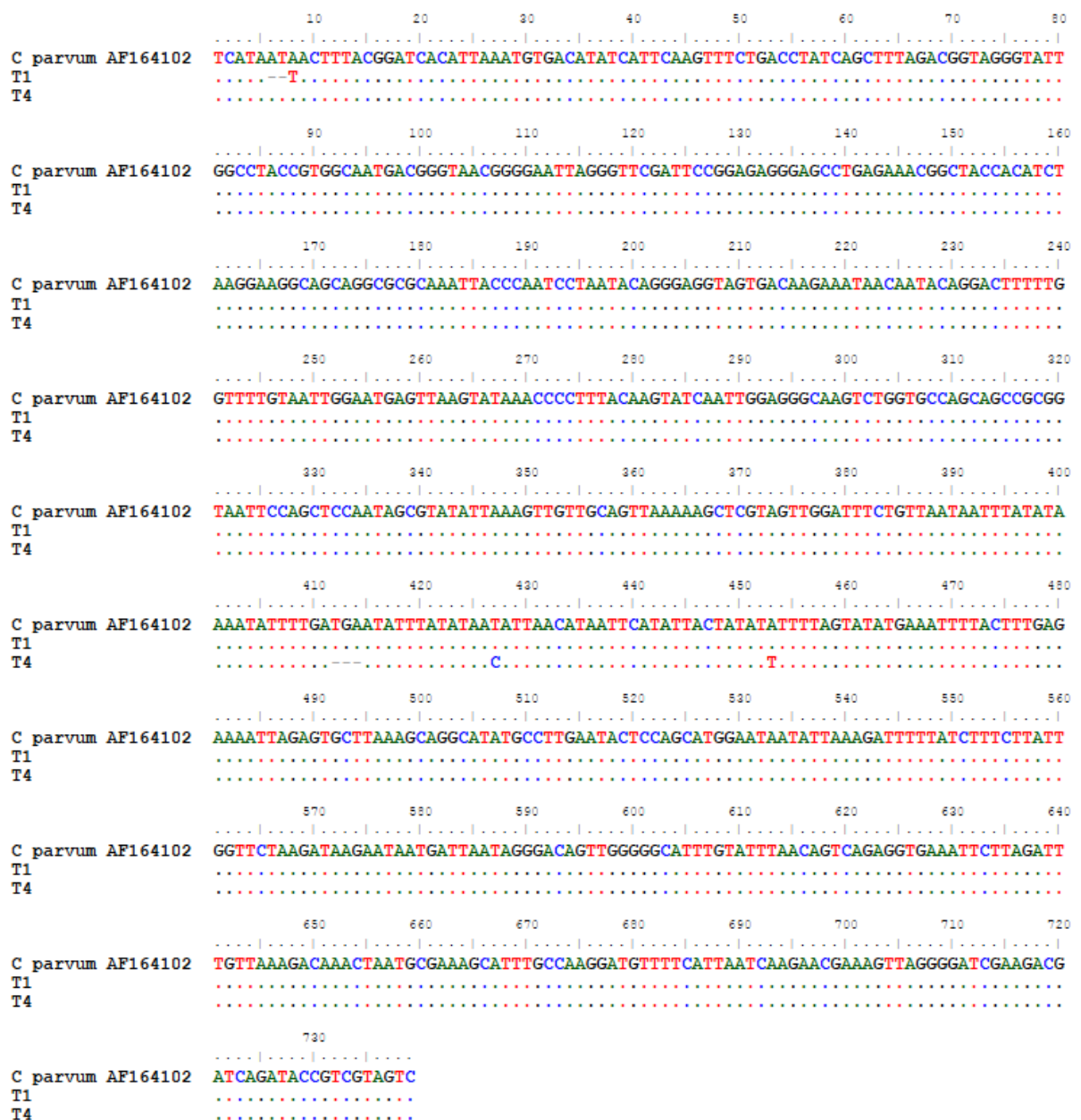
A comparação das amostras dos cães T2, T3 e T5 com sequência completa do 18S de *Cryptosporidium canis* depositada no GenBank (número de acesso: AF112576) (XIAO et al., 1999b), permitiu localizar aproximadamente a posição nucleotídica dos fragmentos analisados: T2: 233-971; T3: 229-971; T5:227-971. As sequências dos cães (T2, T3 e T5), obtidas neste estudo, foram alinhadas e se encontram na Figura 6. Como as três sequências foram idênticas entre si, foi depositada uma amostra no GenBank com o seguinte número: T2 = MF589918.

A comparação das amostras dos gatos T6, T7 e T8 com as sequências completas do 18S de *Cryptosporidium felis* depositadas no GenBank (números de acesso: AF108862 e AF112575) (MORGAN et al., 1999b; XIAO et al., 1999b), permitiu localizar aproximadamente posição nucleotídica dos fragmentos analisados: T6: 270-1007; T7: 305-996; T8: 302-1007. As sequências dos gatos (T6, T7 e T8), obtidas neste estudo, foram alinhadas e se encontram na Figura 7. As sequências foram depositadas no GenBank com os seguintes números: T6 = MF589919, T7 = MF589920 e T8 = MF589921.

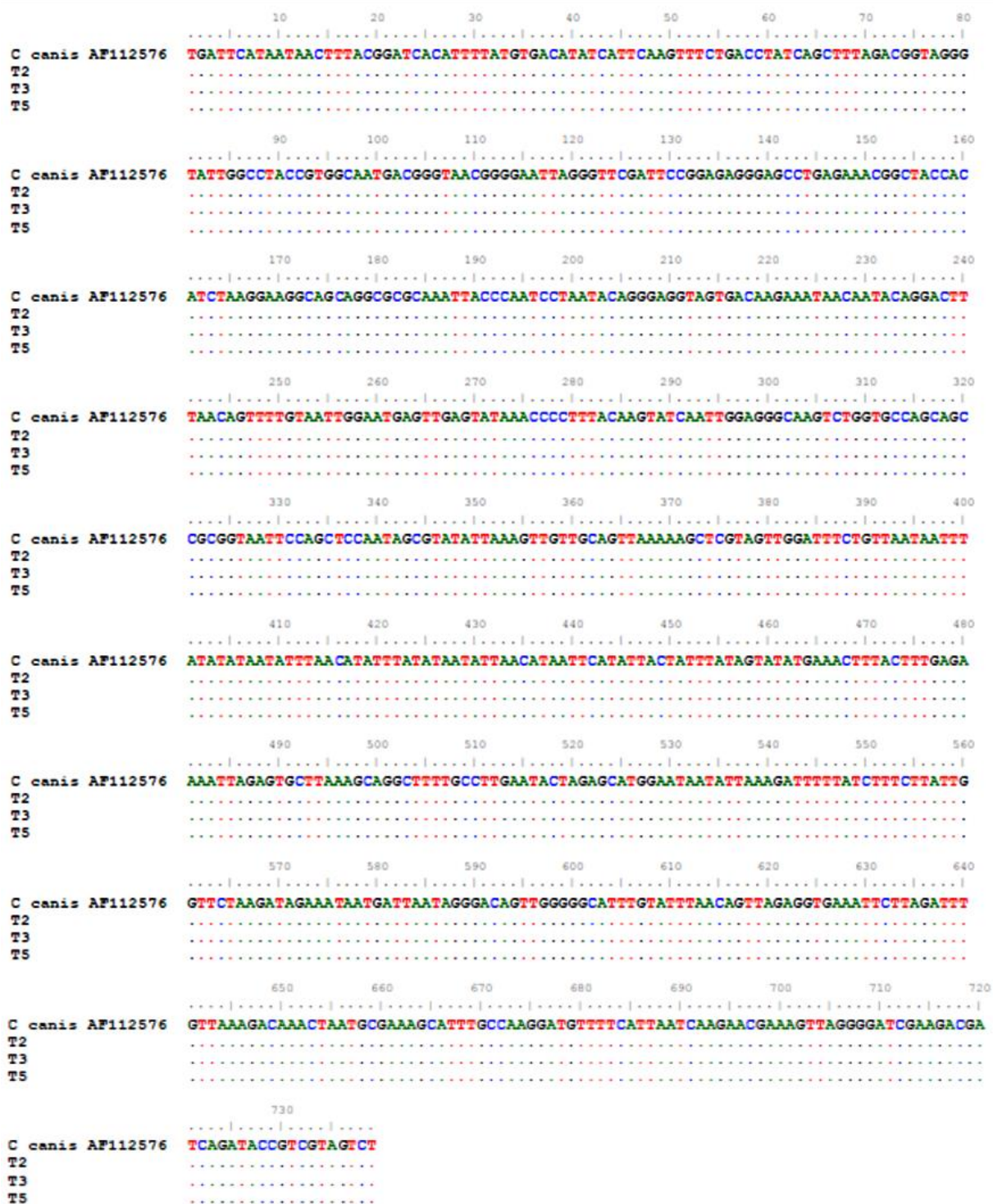


Com relação aos fragmentos das sequências obtidas dos isolados de *Cryptosporidium* das amostras dos cães, as amostras T1 e T4 apresentaram de 100% a 99% de similaridades com as sequências da espécie *Cryptosporidium parvum* depositadas no GenBank (JX2986601, KX216598, KX216598 e KX259139) e (KP730314, EU553550, EF175936 e AJ849463), respectivamente. No que se refere às amostras T2, T3 e T5, todas apresentaram 100% de similaridades com *Cryptosporidium canis* depositadas no GenBank (KT749818, KP890051, EU754826, AF112576 e AB210854) e foram idênticas entre si.

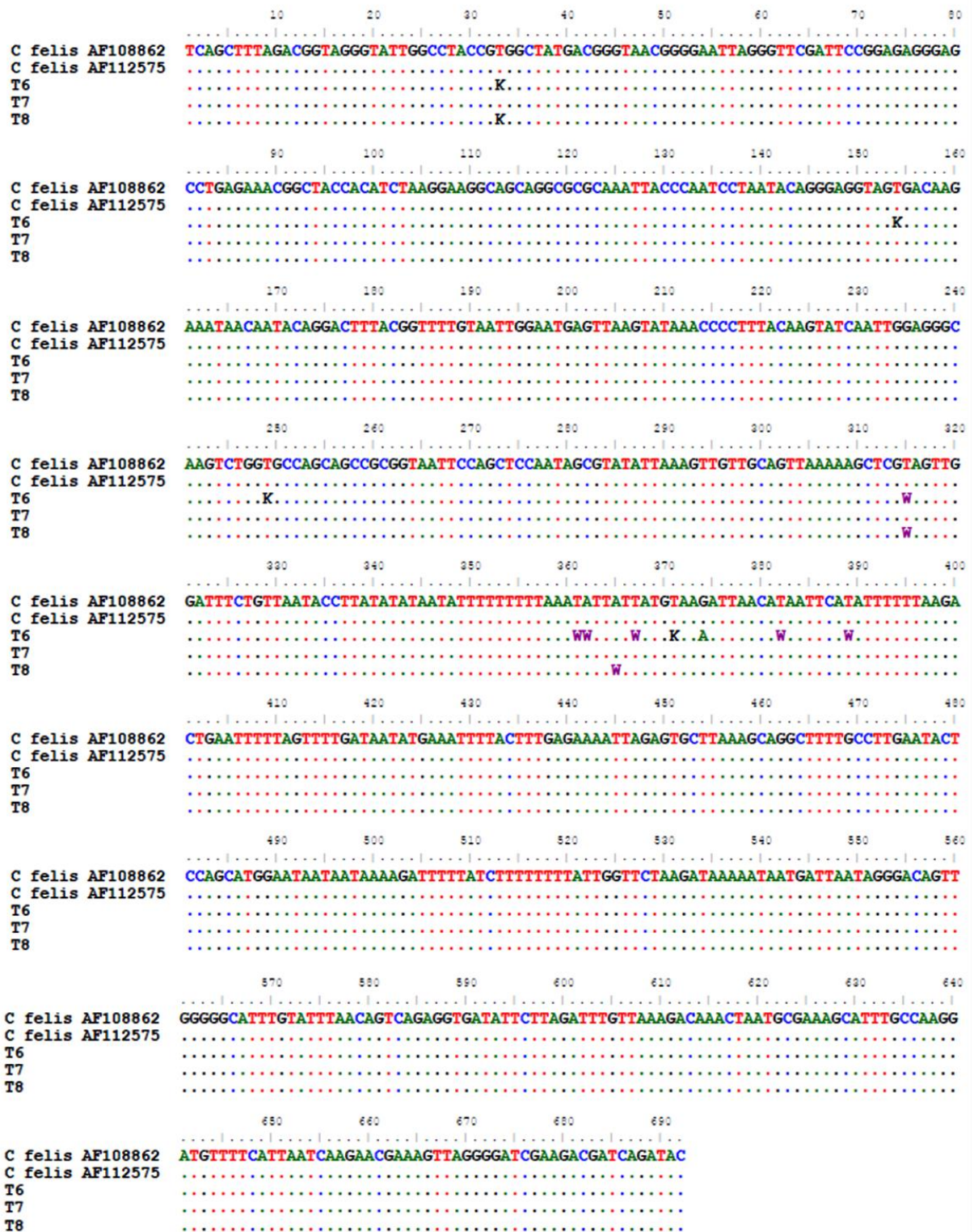
Os fragmentos das sequências obtidas dos isolados de *Cryptosporidium* das três amostras dos gatos, T6, T7 e T8, apresentaram de 100% a 98% de similaridades com a espécie *Cryptosporidium felis* depositadas no GenBank (AF112575, EF493319, AJ493211, HQ149021, AF108862 e EU825743). Sendo que as amostras T6 e T7 apresentaram nas suas sequências as letras "K" e "W" que segundo os códigos da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) são assim discriminados: K = G T (ceto) e W = A T (ligações de hidrogênio fracas) (<https://iupac.org/>).



**Figura 5.** Alinhamento das seqüências obtidas neste estudo provenientes de cães (*Canis lupus familiaris*) evidenciando os nucleotídeos idênticos por ( . ). Tamanho da seqüência utilizada para comparação: 740 pb.



**Figura 6.** Alinhamento das sequências obtidas neste estudo provenientes de cães (*Canis lupus familiaris*) evidenciando os nucleotídeos idênticos por ( . ). Tamanho da sequência utilizada para comparação: 740 pb.



**Figura 7.** Alinhamento das seqüências obtidas neste estudo provenientes de gatos (*Felis catus*) evidenciando os nucleotídeos idênticos por ( . ). Tamanho da seqüência utilizada para comparação: 692 pb.

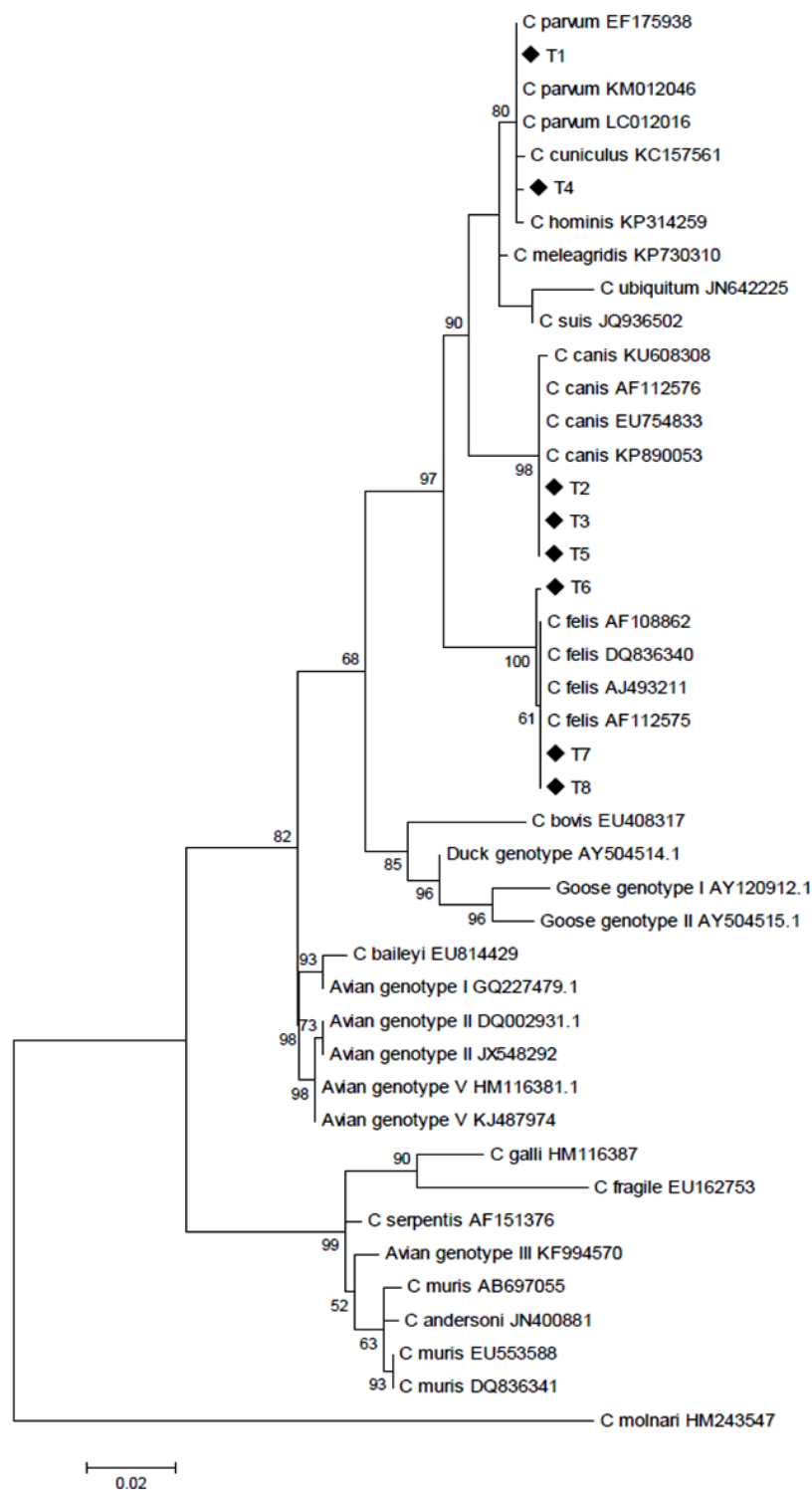
No Quadro 7 encontram-se as espécies diagnosticadas no presente estudo, com as similaridades com as sequências depositadas no GenBank que apresentavam trabalhos correspondentes publicados.

As análises filogenéticas de *Cryptosporidium* spp., suportam a estrutura genética geral do gênero, com as espécies gástricas e as intestinais, formando grupos monofiléticos distintos, o que está de acordo com as características biológicas e especificidade de cada hospedeiro.

A topologia da árvore filogenética obtida pelo *Maximum Likelihood* mostra a posição taxonômica dos isolados obtidos no presente estudo, e podemos observar que *C. parvum*, *C. canis* e *C. felis* se agrupam no clade das espécies intestinais. Na Figura 8, está representada a árvore filogenética com as respectivas amostras de acordo com cada espécie diagnosticada neste trabalho.

**Quadro 7.** Sequências obtidas do GenBank de *Cryptosporidium parvum*, *C. canis* e *C. felis* utilizadas como comparação com as sequências deste estudo, de acordo com as suas respectivas identidades com trabalhos publicados.

ESPÉCIE DIAGNOSTICADA/ AMOSTRA	SEQUÊNCIA (ACESSO / ORIGEM)	IDENTIDADE	REFERÊNCIA	LOCAL
<i>Cryptosporidium parvum</i>				
Amostra T1	<b>JX 298601</b> Búfalo ( <i>Bubalus</i> )	100%	Helmy et al. (2013)	Egito
	<b>KU679364</b> Ouriço-terrestre ( <i>Erinaceus europaeus</i> )	99%	Hofmannova et al. (2016)	República Checa
	<b>KX216598</b> Humano ( <i>Homo sapiens</i> )		Mohammadpour et al. (2016)	Irã
	<b>KX259139</b> Bovino ( <i>Bos taurus</i> )		Huang et al. (2014)	China
Amostra T4	<b>KP730314</b> Canguru ( <i>Petrogale penicillata</i> )	100%	Vermeulen, et al. (2015)	Austrália
	<b>EU 553550</b> Réptil ( <i>Eublepharis macularius</i> )		Pedraza-Diaz et. (2009)	Espanha
	<b>EF175936</b> Capivara ( <i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> )		Meireles et al. (2007)	Brasil
	<b>AJ849463</b> Humano ( <i>Homo sapiens</i> )		Soba et al. (2006)	Eslovênia
<i>Cryptosporidium canis</i>				
Amostras T2, T3 e T5	<b>KT749818</b> Humano ( <i>Homo sapiens</i> )	100%	González-Díaz et al. (2016)	México
	<b>KP890051</b> Cão ( <i>Canis lupus familiaris</i> )		Osman et al. (2015)	França
	<b>EU754826</b> Cão ( <i>Canis lupus familiaris</i> )		Jian et al. (2014)	China
	<b>AF112576</b> Cão ( <i>Canis lupus familiaris</i> )		Xiao et al. (1999b)	EUA
	<b>AB210854</b> Cão ( <i>Canis lupus familiaris</i> )		Satoh et al. (2006)	Japão
<i>Cryptosporidium felis</i>				
Amostras T6 e T8	<b>AF112575</b> Gato ( <i>Felis catus</i> )	98 - 99%	Xiao et al. (1999b)	EUA
	<b>EF493319</b> Gato ( <i>Felis catus</i> )		Thomaz et al. (2007)	Brasil
	<b>AJ493211</b> Humano (HIV+)		Gatei et al. (2002)	Tailândia
Amostra T7	<b>HQ149021</b> Humano ( <i>Homo sapiens</i> )	100%	Hadfield et al. (2011)	Reino Unido
	<b>AF108862</b> Gato ( <i>Felis catus</i> )		Morgan et al. (1999b)	Austrália
	<b>EU825743</b> Amostra ambiental (Águas de rio)		Yang et al. (2008)	EUA



**Figura 8.** Relação genética entre os isolados de *Cryptosporidium* sp. baseada no sequenciamento parcial do gene 18S (tamanho do fragmento usado: 692 pb), inferida pelo algoritmo *Maximum Likelihood* utilizando o modelo Tamura 3 com análise de *bootstrap* com 1000 réplicas. As sequências obtidas do GenBank estão indicadas por seus números de acessos. ◆ = isolados obtidos neste estudo.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Diagnóstico Microscópico e Ocorrência de *Cryptosporidium* spp.

O diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. pela microscopia de luz demanda tempo e exige uma habilidade considerável do investigador para identificar de forma precisa os oocistos. A microscopia óptica é predominantemente utilizada para a detecção de oocistos em amostras fecais de cães e gatos na grande maioria das publicações existentes no Brasil (rever os Quadros 2 e 3). Várias técnicas têm sido aplicadas para auxiliar na identificação dos oocistos, mas as dificuldades de discriminar entre oocistos e outras estruturas similares somente com um bom treinamento.

No presente estudo, foi utilizada a técnica de flutuação em solução saturada de açúcar (SHEATHER, 1923) com modificações, pois além de ser a técnica padrão no laboratório, ela tem sido considerada como uma das melhores técnicas de concentração de oocistos, cistos e alguns ovos de helmintos em amostras fecais de diferentes espécies de hospedeiros (ANDERSON, 1981; ALVES et al., 2005; CARDOZO et al., 2008). Alguns trabalhos brasileiros também usaram essa mesma técnica como metodologia para detectar oocistos em amostras fecais de cães e gatos (ALVES et al., 2005; HUBER et al., 2007; BRESCIANI et al., 2008; BALASSIANO et al., 2009; MOURA et al., 2009).

Neste trabalho, além da observação de oocisto na microscopia sem contraste de fase, utilizou-se o contraste de fase (rever a Figura 3) para melhor visualização dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., facilitando o diagnóstico quando a carga parasitária era baixa. Espécimes biológicos que não tenham sido corados, em geral, se apresentam transparentes, o que tornam sua observação difícil ao microscópio óptico comum, principalmente se o observador não for experiente, visto que o detalhamento da imagem fica prejudicado pela proximidade das densidades ópticas e índices de refração das diferentes partes do tecido. O microscópio com contraste de fase é um instrumento que converte diferenças do índice de refração que não podem ser vistas, em diferenças de intensidade que se tornem visíveis. As ondas de luz que atravessam os componentes celulares de densidades ópticas diferentes assim o farão em diferentes velocidades. Desse modo, as ondas luminosas que atravessam núcleos, mitocôndrias e inclusões celulares emergirão em tempos diferentes e em fases diversas, de um elemento em relação ao outro. Além do que, a forma do oocisto de *Cryptosporidium* spp. ao ser observada fica refringente e algumas estruturas internas do oocisto se tornam visíveis, principalmente o resíduo do oocisto.

Em um estudo realizado por Ignatius et al. (2016), amostras fecais de humanos foram analisadas por meio do ensaio imunoenzimático com o uso de um kit comercial (Ridascreen *Cryptosporidium*; RBiopharm, Darmstadt, Germany) e por meio da qPCR, e posteriormente, através da microscopia de contraste de fase de lâminas não coradas. Os autores verificaram que duas amostras previamente negativas para *Cryptosporidium* spp. no ensaio imunoenzimático foram positivas no exame microscópico, excluindo, portanto, resultados falso-negativos. Além disso, a microscopia de contraste de fase diagnosticou algumas amostras positivas tal como na qPCR, mas também foi capaz de detectar amostras positivas naquelas que foram detectadas como negativas na qPCR. Em conclusão, os autores mencionam que a microscopia com o uso do contraste de fase foi considerado um método altamente específico, pouco exigente e barato para o diagnóstico laboratorial de criptosporidiose humana, independente das espécies do gênero *Cryptosporidium*.



A técnica de flutuação em solução saturada de açúcar é considerada uma excelente metodologia de concentração para obtenção de oocistos em amostras fecais, principalmente se o hospedeiro estiver com uma baixa carga parasitária. Sendo assim, se o hospedeiro apresentar uma infecção subclínica, eliminando poucos oocistos, a técnica poderá facilitar o diagnóstico da criptosporidiose (GARCIA et al., 1983; HUBER et al., 2004). Porém, a leitura microscópica das amostras em lâminas utilizando essa técnica, deve ser realizada rapidamente, isto porque, os oocistos após um intervalo de aproximadamente 15 minutos perdem sua coloração rósea, característica da técnica quando observado em microscopia de campo claro, e começam a deformar com facilidade perdendo o formato esférico (HUBER et al., 2004).

Métodos de coloração para visualização de oocistos em amostras fecais, como Ziehl-Neelsen modificado e Kinyoun, também são bastante explorados pelos autores brasileiros, sendo usados sozinhos ou como complemento de outra técnica para microscopia (NAVARRO et al., 1997; ALVES et al., 2005; LALLO, BONDAN et al., 2006; BRESCIANI et al., 2008; EDERLI et al., 2008; LEMOS et al., 2011; FERNANDES et al., 2008; KATAGIRI, OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2008; MOURA et al., 2009; PEREIRA et al., 2011; FERREIRA et al., 2012; PEREIRA, FERREIRA, 2012; ANJOS et al., 2013; GRECCA et al., 2013; ALMEIDA et al., 2015; SILVA et al., 2015; GRECCA et al., 2013; LALLO et al., 2016; SILVA et al., 2016).

Na atual pesquisa, não foram utilizados métodos de coloração. Apesar das técnicas de coloração auxiliarem na visualização da forma infectante, o oocisto, pode haver interpretação errônea quando a carga parasitária estiver baixa, gerando resultados falso-negativos. Isto porque a técnica permite a coloração de várias outras estruturas do material fecal que apresentam as mesmas afinidades tintoriuais, não permitindo uma distinção correta dos oocistos. Em amostras fecais existem várias estruturas com as mesmas afinidades tintoriais que os oocistos de *Cryptosporidium*, o que pode dificultar o diagnóstico. Um bom observador consegue distinguir tais estruturas com segurança, porém um observador pouco treinado faria a emissão de um diagnóstico errôneo. Outro problema referente à coloração seria a obtenção de dados morfométricos não fidedignos, pelo fato de muitas técnicas usarem o calor para fixação dos corantes, acarretando o aparecimento de distorções no formato dos oocistos. Uma exceção seria a utilização da imunofluorescência onde os oocistos podem ser mensurados com uma precisão razoável (SMITH, 2007).

Deve ser destacado que a eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* pelo hospedeiro é inconstante em indivíduos sintomáticos e assintomáticos. Sendo assim, várias amostras de fezes precisam ser avaliadas antes de ser emitido um diagnóstico final (CURRENT, GARCIA, 1991). O número de coletas por indivíduo é de extrema relevância para a obtenção de um resultado satisfatório através de exames microscópicos. Quanto maior o número de amostras por indivíduo, maior as chances de se obter positividade no diagnóstico para *Cryptosporidium*, principalmente em ambientes onde há a infecção (FAYER, XIAO, 2008). No presente estudo, foram feitas coletas de amostras únicas devido a algumas limitações, tais como, a dificuldade em encontrar proprietários de cães e gatos que quisessem participar da pesquisa e o descumprimento da pesquisa por parte de alguns participantes. Desta forma, as taxas de infecções apresentadas podem ter sido subestimadas.

Vale ressaltar que através da microscopia óptica é impossível distinguir as espécies de *Cryptosporidium* envolvidas em uma infecção (O'DONOGHUE, 1995; JEX et al., 2008; MEIRELES, 2010), pois as similaridades morfológicas dos oocistos entre as espécies tornam impossíveis sua identificação específica (FAYER et al., 2000; HUBER et al., 2004; FAYER, 2007; SMITH, 2007; FAYER, 2010; XIAO, 2010). No presente estudo, oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram detectados, através da microscopia óptica, em amostras fecais de cinco cães e três gatos de uma população total de 119 (6,7%) animais domiciliados no bairro

de Campo Grande, Rio de Janeiro. Os cães apresentaram maior taxa de infecção em comparação aos gatos, 7,8% e 5,4%, respectivamente. Os estudos de prevalência de *Cryptosporidium* em populações caninas têm revelado frequências variáveis. As baixas ocorrências encontradas foram consistentes com alguns estudos anteriores de cães e gatos também domiciliados realizados no Brasil (SILVA et al., 2007; LEMOS et al., 2011; FERREIRA et al., 2012; LALLO et al., 2016) e em outros países, como Alemanha e Grécia, tendo gatos como hospedeiro (SOTIRIADOU et al., 2013; KOSTOPOULOU et al., 2017), e Japão, em relação aos cães (ITOH et al., 2014).

Por outro lado, porcentagens inferiores ao atual estudo, já foram relatadas. Na Alemanha, a taxa de infecção encontrada em cães foi de apenas 1,2% (SOTIRIADOU et al., 2013). No Brasil, prevalências entre 2% e 2,9% foram encontradas em cães nos municípios de Goiânia, Monte Negro, Uberlândia, São Paulo e Rio de Janeiro, pertencentes aos estados de Goiás, Rondônia, Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro, respectivamente (GENNARI et al., 1999; ALVES et al., 2005; HUBER et al., 2005; LABRUNA et al., 2006; MUNDIM et al., 2007). Pivoto et al. (2013), identificaram 3,1% de positividade em gatos no município de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

Percentuais mais altos comparados a este estudo também foram encontradas. Almeida et al. (2015) obtiveram positivities de 56,84% e 41,67% nas fezes de cães e gatos, respectivamente, na cidade de Bom Jesus, Piauí. Novamente em Santa Maria (Rio Grande do Sul), foi identificada uma taxa de infecção de 54,3% em gatos (DALL'AGNOL et al., 2010). Uma taxa altíssima foi achada em cães de Seropédica, no Rio de Janeiro, 94,44% (FERNANDES et al., 2008).

O tamanho da amostragem, em alguns casos, pode influenciar o resultado da taxa de infecção (HAMNES et al., 2007). Por exemplo, apesar de Almeida et al. (2015) terem apresentado porcentagens relativamente altas, o número de gatos analisados foi pequeno, apenas 12. A mesma porcentagem foi encontrada por Samie et al. (2013), que utilizaram também 12 animais, só que neste caso a população alvo foram os cães. Fato semelhante foi observado no estudo de Fernandes et al. (2008), onde 17 dos 18 cães estavam infectados. Além do tamanho amostral, outros fatores também precisam ser levados em consideração, como a metodologia empregada e as variáveis regionais, além de avaliar se a população alvo de cada pesquisa a ser comparada é homogênea.

## **5.2 Fatores de Risco da Criptosporidiose em Cães e Gatos**

No presente estudo, quatro dos cinco cães infectados por *Cryptosporidium* spp. não apresentavam sinais clínicos de diarreia. Este resultado corrobora com a visão de que a criptosporidiose em cães é geralmente assintomática (ABE et al., 2002; THOMPSON et al., 2008; YOSHIUCHI et al., 2010; JIAN et al., 2014). Nos casos de criptosporidiose felina, os sintomas também são frequentemente ausentes (THOMPSON et al., 2008; YOSHIUCHI et al., 2010; GRECCA et al., 2013), porém neste trabalho, todos os gatos infectados apresentaram fezes com diarreia. A explicação para este fato pode estar na idade dos animais analisados, pois infecções em animais jovens regularmente desenvolvem diarreia (GENNARI et al., 2016).

Apesar da população total de gatos nesta pesquisa ser predominantemente adulta (58,2%), os três gatos com criptosporidiose tinham apenas três meses de idade. Gatos jovens parecem ser mais suscetíveis à infecção por *Cryptosporidium* spp., provavelmente devido ao sistema imunológico desses animais ainda estarem em desenvolvimento e desta forma, não possuem imunidade completamente desenvolvida, que é adquirida através de exposições anteriores ao parasito (RAMBOZZI et al., 2007). Funada et al. (2007), Yoshiuchi et al. (2010)

e Gennari et al. (2016) também identificaram maior ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em gatos jovens.

A imunossupressão também representa fator de risco para criptosporidiose (MONTICELLO et al., 1987). Isso pode estar relacionado ao sistema imunológico comprometido do animal, o tornando mais suscetível à infecções. Esta hipótese foi reforçada por Lemos et al. (2011), onde dos cinco gatos diagnosticados com *Cryptosporidium* spp., quatro foram positivos para FeLV. Com relação aos gatos infectados por *Cryptosporidium* spp. da atual pesquisa, não foi registrada nenhuma comorbidade.

Neste trabalho foi observado, que os cães infectados por *Cryptosporidium* spp. eram predominantemente adultos. Lallo e Bondan (2006) relataram também maior frequência em cães adultos (10,1%) do que em cães jovens (5,5%), sem que houvesse diferença significativa. Porém, algumas publicações referentes ao assunto, não demonstram evidências do parasitismo com relação à idade dos animais, sugerindo então, que a infecção possa ocorrer em qualquer faixa etária dos hospedeiros (HUBER et al., 2005; ITOH et al., 2014; OSMAN et al., 2015).

Maior positividade da infecção por *Cryptosporidium* spp. neste trabalho foi observada nos cães e gatos machos. Silva et al. (2008), Samie et al. (2013) e Li et al. (2015) obtiveram o mesmo resultado em cães. Contudo, como na presente investigação a amostragem foi feita aleatoriamente, foi obtido um número menor de fêmeas na população total de animais. Este fato pode ter influenciado essa maior ocorrência da infecção em animais machos. Alguns autores não consideram a variável sexo como significativa para a infecção (LALLO, BONDAN, 2006; FUNADA et al., 2007; RAMBOZZI et al., 2007). Dessa forma, a probabilidade de infecção em animais machos seria similar à de fêmeas.

No Brasil, há relatos de *Cryptosporidium* spp. em cães e gatos, sendo a maioria deles de animais domiciliados, mas existem casos analisados de animais provenientes de abrigos, canis, gatis, hospitais e clínicas veterinárias, assim como também animais errantes. As taxas de infecções são bastantes variáveis independentes da condição de vida do animal. Katagiri e Oliveira-Siqueira (2008) analisaram 129 cães errantes e 125 cães domiciliados em Botucatu, São Paulo, e verificaram que o primeiro grupo teve menor prevalência (2,3%), enquanto que o segundo grupo apresentou 4%.

Silva et al. (2008) observaram que *Cryptosporidium* spp. foi o parasito com maior prevalência, 55,9% (61/109), em cães de canis de Santa Maria, Rio Grande do Sul. Em contrapartida, Mundim et al. (2007) constataram que de 119 cães de canis no município de Uberlândia, Minas Gerais, apenas um estava infectado (0,5%). Este último resultado foi muito inferior em comparação com o obtido em cães no presente estudo, utilizando animais domiciliados. Possivelmente, nos faz acreditar que não é garantido ter uma baixa ou nula taxa de infecção por *Cryptosporidium* spp. simplesmente por ser um animal domiciliado, o qual geralmente recebe certos cuidados dos seus proprietários. A prevalência de cada hospedeiro varia e depende de um conjunto de fatores, que inclui idade, condições de vida, estado imunológico, presença de outros parasitos, tipo de alimentação, região estudada dentre outros (HAMNES et al., 2007; YOSHIUCHI et al., 2010).

### **5.3 *Cryptosporidium* spp. e outros Parasitos Gastrointestinais**

Além da presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp., diagnosticada nos cães e gatos deste estudo, outros parasitos gastrointestinais também foram detectados. Dentre estes podemos destacar: *Cystoisospora* spp., *Giardia intestinalis*, Ancylostomatidae, *Toxocara canis* e *T. cati*, *Dipylidium caninum* e *Trichuris vulpis*. O parasito mais predominante tanto em cães quanto em gatos foi *Cystoisospora* spp., apresentando positividade de 25% e 12%, respectivamente. Estudo realizado em um abrigo de gatos localizado no município de Mangaratiba, Rio de Janeiro, foi verificado que 14,29% dos gatos estavam infectados por

*Cystoisospora* spp. (HUBER et al., 2002). Taxas inferiores de infecção por *Cystoisospora* spp., entre 4% e 6%, foram encontradas em cães de clínicas veterinárias (BALASSIANO et al., 2009) e domiciliados (FERNANDES et al., 2008) no mesmo estado citado anteriormente.

Inquéritos parasitológicos realizados em vários municípios do Brasil têm mostrado que esses protistas e helmintos gastrintestinais são relativamente frequentes em cães e gatos, inclusive naqueles domiciliados (GENNARI et al., 1999; ALVES et al., 2005; SILVA et al., 2007; FERNANDES et al., 2008; DALL'AGNOL et al., 2010; ANJOS et al., 2013; ALMEIDA et al., 2015; LALLO et al., 2016).

A ocorrência de animais infectados por um ou mais parasitos gastrointestinais nas populações de cães e gatos foi bastante significativa neste estudo (48,7%). Apesar dos animais serem domiciliados, a maioria deles tinha acesso à área externa (quintal) dos domicílios e muitas das vezes caminhavam entre os mesmos. Com isso, eles eram mais expostos a fontes de infecções, tendo contato com outros animais da mesma ou de diferente espécie. Além disso, não se deve descartar a possível ingestão de água e alimentos inapropriados ao consumo, tanto fora quanto no interior dos domicílios. É importante destacar que os proprietários ofereciam aos seus animais água encanada e sobra de alimentos de humanos. Essas condições observadas dos animais amostrados poderiam favorecer a infecção de vários parasitos, inclusive *Cryptosporidium* spp..

*Cryptosporidium* spp. é um patógeno de veiculação hídrica, podendo infectar uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados, inclusive humanos (FAYER, XIAO, 2008). Sabe-se que a cloração da água apresenta um benefício indiscutível à saúde humana, uma vez que o cloro é um desinfetante comum capaz de destruir e/ou inativar a maioria dos microrganismos patogênicos transmitidos pela água (SANTOS et al., 2011). Porém, os processos convencionais de tratamento da água não são totalmente eficientes para certas parasitoses, como os protistas *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. (ROSE et al., 2002), que possuem oocistos e cistos, respectivamente, resistentes aos processos de cloração e ao aumento de temperatura, permanecendo viáveis por muito tempo no ambiente.

A ingestão de certos alimentos crus ou mal cozidos que estejam contaminados aparenta ser fator de risco para infecção por *Cryptosporidium* spp. (RAMBOZZI et al., 2007; MOURA et al., 2009). Por isso é necessário evitar administrar aos animais alimentos nessas condições, dando preferência em ferver ou então, oferecer dieta comercial para os animais, sob a forma de rações.

Quase metade dos animais que apresentaram amostras de fezes positivas (46,5%) nesta pesquisa, independente do parasito diagnosticado, não manifestaram diarreia, principalmente nas amostras de cães. Este dado enfatiza a importância da realização rotineiramente de exames coproparasitológicos nos animais de companhia, mesmo quando eles estão aparentemente saudáveis, servindo assim, como uma medida de prevenção. Infelizmente a grande maioria dos animais amostrados não tinha acesso à assistência médico veterinária.

Todos os animais que habitavam o mesmo domicílio compartilhavam de pelo menos um parasito gastrointestinal, como foi observado neste trabalho com relação aos três gatos com criptosporidiose. Segundo Ederli et al. (2008), animais que habitam juntos num mesmo espaço podem favorecer a disseminação de parasitos, e consequentemente, aumentar o risco de infecção. Isto possivelmente ocorreria pela contaminação ambiental da forma infectante, facilitando a ingestão por possíveis hospedeiros.

No presente estudo, nos domicílios que tinham mais de um animal de companhia, conviviam apenas gatos com gatos e cães com cães, mas não se deve descartar a possibilidade da contaminação ambiental com fezes de animais errantes, que por ventura poderiam estar infectados e defecarem próximo aos domicílios. Tem que se levar em consideração também a contaminação ambiental de oocistos pelo auxílio do escoamento de águas das chuvas. Além

do que, a grande maioria desses animais tinha acesso fora dos domicílios, podendo desta forma, possivelmente favorecer a infecção extradomiciliar.

Neste trabalho, as infecções com mais de um parasito gastrointestinal por animal não foram muito frequentes, representando somente 22,4% de todas as amostras positivas. O quadro clínico de diarreia em animais infectados por apenas um parasito foi presente em alguns casos e ausente em outros. Porém, quando o mesmo animal era infectado por mais de um parasito, geralmente apresentava diarreia (84,6%). Essa correlação entre infecções concomitantes e a presença de diarreia também foi constatada por Causapé et al. (1996) e Gizzi et al. (2014), os quais utilizaram cães em seus estudos. No entanto, Yang et al. (2015) relataram coinfeções entre *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em quatro gatos que não apresentavam diarreia ou qualquer outro sintoma conhecido.

Infecções concomitantes envolvendo *Cryptosporidium* spp. em cães e gatos vêm sendo relatadas por vários autores. *Giardia intestinalis* e os representantes da família Ancylostomatidae são alguns dos parasitos que mais se destacam nessa associação (FERNANDES et al., 2008; OVERGAAUW et al., 2009; ANJOS et al., 2013; SOTIRIADOU et al., 2013; ALMEIDA et al., 2015; LI et al., 2015; YANG et al., 2015; XU et al., 2016). Infecções com três ou mais parasitos, incluindo *Cryptosporidium*, também são encontradas, mas em menor ocorrência. Em um abrigo de gatos foi verificado que um animal estava infectado por *Cryptosporidium* sp., *Cystoisospora* sp. e Ancilostomídeos ao mesmo tempo (HUBER et al., 2002).

No presente trabalho, uma cadela parasitada por *Cryptosporidium* spp. também estava infectada por *Dipylidium caninum*. O animal em questão era idoso, 12 anos de idade, e conseqüentemente possuía um sistema imunológico comprometido, possivelmente, o tornando mais suscetível a várias outras infecções. *Dipylidium caninum* é um helminto que comumente acomete cães e gatos, um dos sintomas mais frequente desta infecção é a diarreia (ALHO et al., 2015; RODRIGUES et al., 2016). Sendo assim, a idade avançada do animal citado anteriormente e a coinfeção poderiam justificar a presença de diarreia neste caso.

#### **5.4 Diagnóstico Molecular de *Cryptosporidium* spp.**

Estudos moleculares da criptosporidiose com cães e gatos vêm sendo conduzidos tentando esclarecer possíveis envolvimento desses animais como fonte de infecção para humanos, enfatizando o papel desses animais como reservatório e disseminadores de oocistos no meio ambiente. Neste estudo, todas as amostras que foram positivas na microscopia, foram confirmadas através do uso de metodologias moleculares. Para tal, foi usado o 18S como gene alvo, pois este oferece uma excelente sensibilidade (CHECKLEY et al., 2015), além de ser amplamente utilizado (FAYER et al., 2001; PAVLASEK, RYAN, 2007; THOMAZ et al., 2007; LUPU et al., 2008; YOSHIUCHI et al., 2010; YANG et al., 2015). Desta forma, sendo diagnosticados *C. parvum*, *C. canis* em cães e *C. felis* em gatos.

Nos últimos anos, as técnicas de biologia molecular utilizadas para a detecção de *Cryptosporidium* sp. se desenvolveram, sendo eficazes não apenas no diagnóstico das espécies e genótipos, mas identificando os espécimes inclusive em subtipos, propiciando um melhor entendimento da biologia e da epidemiologia do protozoário (XIAO, RYAN, 2004; XIAO, 2010). Tais metodologias são aplicadas no estudo da sistemática, em particular na resolução do problema taxonômico, em ecologia dos parasitos, evolução biológica, genética de população, estrutura de comunidades, epidemiologia e interação com seus hospedeiros, melhorando o entendimento da relação parasito hospedeiro. No Brasil, apesar da existência de investigações sobre a infecção por *Cryptosporidium* em cães e gatos, a identificação genética do parasito ainda é pouco explorada.

Como na maioria das publicações anteriores a este estudo, no Brasil e em outras partes do mundo (HUBER et al., 2007; THOMAZ et al., 2007; PALMER et al., 2008; SEVÁ et al., 2010; YOSHIUCHI et al., 2010; OSMAN et al., 2015; XU et al., 2016; GIL et al., 2017), foram detectadas as espécies *C. canis* e *C. felis* em cães e gatos, respectivamente. Isso reforça a ideia que *C. canis* parece ter um determinado grau de especificidade com cães, assim como, *C. felis* tem com gatos.

Os cães e gatos podem abrigar não só espécies adaptadas aos hospedeiros, como também outras espécies de *Cryptosporidium*. Hajdušek et al. (2004) identificaram *C. meleagridis* em um cão na República Checa, mas não foram apresentadas características sobre o animal. Posteriormente, nenhum outro caso relacionando essa espécie em cães foi relatado. Casos em cães com *C. hominis*, *C. scrofarum* e *C. ubiquitum* foram descritos apenas uma vez. A primeira e a terceira espécie foram encontradas em cães errantes, e a segunda foi em um cão de abrigo (LI et al., 2015; GIL et al., 2017; KOSTOPOULOU et al., 2017).

*Cryptosporidium felis* é a principal espécie de *Cryptosporidium* detectada naturalmente em gatos (LUCIO-FORSTER, 2010). No entanto, Yang et al. (2015) descreverem infecções por *C. ryanae*, o genótipo *Cryptosporidium* do rato III e um novo genótipo mais intimamente relacionado a este genótipo em gatos. Como esses casos são bastante recentes, mais estudos são necessários para determinar a gama de *Cryptosporidium* que infectam gatos.

*Cryptosporidium parvum* e *C. muris* também têm sido relatados ocasionalmente infectando cães e gatos. Estudo realizado em canis e propriedades privadas na Itália foi encontrado sete cães infectados por *C. parvum*, enquanto que apenas um estava infectado por *C. canis* (GIANGASPERO et al., 2006). Em um canil no Texas, nos EUA, 49 dos 70 cães estavam infectados por *C. muris* e todos assintomáticos (LUPO et al., 2008). Em gatos, casos de infecções por *C. muris* (SANTÍN et al., 2006; PAVLASEK, RYAN, 2007; FITZGERALD et al., 2011; YANG et al., 2015) parece ser maior que *C. parvum* (SOTIRIADOU et al., 2013; LI et al., 2015). Porém, até o momento, são relatos envolvendo exclusivamente em um animal.

Na atual pesquisa, o diagnóstico de *C. parvum* nas amostras fecais de dois cães é considerado de grande relevância, devido ao fato de que esta espécie de *Cryptosporidium* apresentar baixa especificidade por hospedeiros (RAMIREZ et al., 2004). Lallo e Bondan (2006) foram os únicos brasileiros a emitiram o diagnóstico de *C. parvum* em amostras de cães, após a amplificação do DNA, mas não realizaram o sequenciamento para detectar a espécie. Com isso, não foi possível fazer conclusões sobre o potencial epidemiológico dos cães positivos. Deste modo, este é o primeiro diagnóstico de *C. parvum* em cães confirmado através do uso de ferramentas moleculares no Brasil e consequentemente, no estado do Rio de Janeiro.

Segundo Lupo et al. (2008), a criptosporidiose canina, em particular, parece ser uma infecção leve, independentemente da espécie de *Cryptosporidium* envolvida. Na presente pesquisa, a diarreia foi ausente em cães infectados tanto por *C. canis* quanto *C. parvum*. Em cães infectados por *C. parvum* na Itália, a diarreia foi presente nas fezes de alguns e ausentes nas fezes de outros (GIANGASPERO et al., 2006).

Os dados aqui encontrados refletem preocupação, pois além da criptosporidiose ser debilitante para o hospedeiro, as espécies diagnosticadas mostraram ser capazes de infectar humanos, principalmente crianças e pacientes imunocomprometidos em diversos estudos (XIAO et al., 2001; CAMA et al., 2007; LUCCA et al., 2009; ELWIN et al., 2012; FENG et al., 2012; ADAMU et al., 2014).

## 5.5 Importância de *C. parvum*, *C. felis* e *C. canis* como Zoonose

O papel dos cães e gatos na criptosporidiose humana tem sido o foco de muita atenção. Estudos moleculares de *Cryptosporidium* em amostras fecais de cães e gatos têm sido bem-sucedidos e demonstraram que a maioria das infecções nestes animais é causada por *C. canis* e *C. felis* específicos do hospedeiro, respectivamente. Sendo que a maioria das infecções que acometem humanos está associada a *C. hominis* e *C. parvum*; seguidas por *C. canis* e *C. felis*, sendo que com essas duas últimas espécies há poucos registros (XIAO et al., 2001; CAMA et al., 2007; LUCCA et al., 2009; ELWIN et al., 2012; FENG et al., 2012; ADAMU et al., 2014). Entretanto, estudos epidemiológicos moleculares sustentam que há risco de transmissão zoonótica mesmo que as estimativas sejam baixas para infecções em humanos. Deste modo, as três espécies de *Cryptosporidium* diagnosticadas neste estudo apresentam potencial zoonótico, *C. parvum* e *C. canis*, evidenciadas em cães e *C. felis* em gatos.

A prevalência das espécies de *Cryptosporidium* incomuns em humanos varia geograficamente. No Brasil, em uma área urbana do município de São Paulo, Lucca et al. (2009) examinaram 27 amostras fecais de humanos infectados com HIV. Após o sequenciamento, revelou a presença de *C. felis* em 5 amostras (18,5%), *C. parvum* em 4 (14,8%) e *C. canis* em apenas 1 (3,7%). Na Etiópia, estudo realizado com 520 humanos também com HIV, 92 pacientes estavam infectados com *C. parvum*, 5 com *C. felis* e 2 com *C. canis* (ADAMU et al., 2014). Na Inglaterra e no país de Gales, entre os anos de 2000 a 2008, após a análise de 14.469 amostras de criptosporidiose humana, constatou-se que 6.372 indivíduos eram infectados por *C. parvum*, 38 por *C. felis* e 1 por *C. canis* (ELWIN et al., 2012a).

A realização de estudos epidemiológicos serve como importante avaliação dos possíveis riscos à saúde humana, visto que oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram encontrados em amostras ambientais (JEX et al., 2008; SMITH, NICHOLS, 2010). Mahmoudi et al. (2015) realizaram uma análise nas águas de um rio no Irã que revelou a presença de cinco espécies de *Cryptosporidium*, entre elas estavam *C. parvum* e *C. canis*. A espécie *C. parvum* também foi encontrada em uma estação de tratamento de águas residuais na Espanha, em rios no Brasil e na Tailândia, e em amostras de água não tratada e potável na Escócia (NICHOLS et al., 2010; KOOMPAPONG, SUKTHANA, 2012; GALVÁN et al., 2014; BUENO FRANCO et al., 2016).

Nesta pesquisa, como dois cães infectados por *C. parvum*, e os outros dois por *C. canis* eram assintomáticos, eles poderiam estar servindo como reservatórios para a criptosporidiose humana, já que tinham acesso aos domicílios de seus tutores. Por essa razão, os tutores de animais de companhia, especificamente de cães e gatos, precisam ser informados adequadamente sobre os possíveis riscos de zoonoses.

Ferreira et al. (2012) realizaram um estudo com cães e gatos pertencentes à população humana de idosos com mais de 70 anos de idade em Teresópolis, no Rio de Janeiro e verificaram que esses animais tinham uma positividade muito elevada para *Cryptosporidium* spp. (43,9%). Como forma de diagnóstico foi usada a técnica de Ziehl-Neelsen modificada e o teste Imunoenzimático (sendo que não foi especificado detalhes sobre os mesmos), e posteriormente, as amostras positivas foram submetidas na reação em cadeia de polimerase, porém não chegaram ao diagnóstico de espécie. Os autores caracterizaram maior probabilidade de exposição desse parasito em grupos populacionais apontados como mais suscetíveis a infecções.

Além de *Cryptosporidium* spp., quase todos os outros parasitos gastrointestinais diagnosticados nas amostras fecais dos cães e gatos são agentes de doenças zoonóticas considerados relevantes para a saúde pública. *Giardia intestinalis*, *Toxocara canis*, *Toxocara cati*, assim como *Cryptosporidium* spp., possuem rota de transmissão ora-fecal. Além disso, o

maior componente para a disseminação é a presença de cistos, ovos e oocistos no ambiente (LALLO et al., 2016). Algumas espécies da família Ancylostomatidae podem ocasionar a larva migrans cutânea, conhecida popularmente como bicho geográfico, em humanos (ALVES et al., 2005). No caso de *Dipylidium caninum*, o ser humano se infecta da mesma maneira que os animais, ingerindo acidentalmente uma pulga infectada, a qual representa o hospedeiro intermediário (ALHO et al., 2015). A identificação destes parasitos serve como um alerta para a área do estudo da pesquisa. Se medidas preventivas forem aplicadas, podem reduzir o risco de transmissão para humanos e outros animais.

Os dados deste estudo fornecem evidências moleculares que o risco de transmissão zoonótica de *Cryptosporidium* pelo contato próximo entre proprietários e seus cães de companhia sejam provavelmente significativos nesta área de estudo devido a presença de *C. parvum*. Com riscos menores de transmissões zoonóticas, mas não menos importantes, *C. canis* e *C. felis* também merecem atenção, principalmente em humanos por serem mais suscetíveis a infecções. Além disso, as possíveis implicações à saúde de cães e gatos infectados por qualquer uma das espécies mencionadas acima não podem ser ignoradas.

Portanto, cuidados especiais são necessários quanto à profilaxia do parasito e aos animais infectados, buscando dessa forma, diminuir a fonte de disseminação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. para o meio ambiente. Devido ao impacto dessas espécies na saúde pública e veterinária, mais estudos precisam ser realizados, incluindo outras ferramentas moleculares. Uma dessas baseia-se na análise de sequências do gene gp60, que permitirá a identificação das famílias de genótipos e subgenótipos dentro de cada uma das espécies diagnosticadas neste estudo, principalmente de *C. parvum*, por ser uma espécie de maior prevalência em humanos. A importância desta identificação baseia-se no fato de que nem todos os subtipos ou subgenótipos apresentam potencial zoonótico.

Investigações futuras deverão continuar para uma melhor compreensão do potencial de transmissão zoonótica de *Cryptosporidium* spp. entre seres humanos e seus animais de companhia (cães e gatos) que compartilham um mesmo domicílio. Esses hospedeiros devem ser investigados no que diz respeito à distribuição de espécies de *Cryptosporidium* e genótipos envolvidos. Além disso, a sequência ou ordem das infecções, o curso da doença, a idade e o estado imunológico dos indivíduos infectados também precisam ser analisados. Tais investigações são difíceis de serem organizadas, isto porque, todos os membros da família (humanos e animais) precisam estar sincronizados no que diz respeito a coleta de amostras fecais, onde estas deverão ser recolhidas durante um período de várias semanas, a fim de que qualquer oocistos recuperados sejam verdadeiramente um resultado de infecção e não uma simples "passagem" por uma pessoa ou animal de estimação sem causar infecção (falso parasitismo). Além disso, os oocistos recuperados devem ser geneticamente identificados, sendo também difícil de determinar com certeza a direção da infecção, ou seja, o proprietário se infectou primeiro e, em seguida, infectou o cão e/ou o gato? O animal foi infectado primeiro e, em seguida, eliminou oocistos que infectou o proprietário? Ou, os animais e os seres humanos infectaram-se a partir de uma fonte comum de oocistos, como exemplo, a água?



## 6 CONCLUSÕES

- Foram identificadas três espécies de *Cryptosporidium*, sendo duas em cães (*C. parvum* e *C. canis*) e uma em gatos (*C. felis*).
- O estudo atual representa o primeiro registro no Brasil e conseqüentemente no estado do Rio de Janeiro de *C. parvum* em cães, contribuindo para traçar a epidemiologia molecular deste agente etiológico mundialmente.
- As três espécies de *Cryptosporidium* diagnosticadas neste estudo, são consideradas de importância em saúde humana e animal. Além da criptosporidiose ser debilitante para o hospedeiro, esses dados refletem preocupação, pois as espécies detectadas apresentam potencial zoonótico.
- Além da importância do diagnóstico das espécies de *Cryptosporidium*, não se deve negligenciar os outros parasitos gastrointestinais que foram encontrados, pois também apresentam importância tanto em saúde humana quanto animal.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, N.; SAWANO, Y.; YAMADA, K.; KIMATA, I.; ISEKI, M. *Cryptosporidium* infection in dogs in Osaka, Japan. **Veterinary Parasitology**, v. 108, p. 185-193, 2002.

ABINPET. 2015. **Faturamento do setor crescerá 7,4% e fechará em R\$ 17,9 bilhões em 2015**. Disponível em: <<http://pabinpet.org.br/site/faturamento-do-setor-crescera-74-e-fechara-em-r-179-bilhoes-em-2015/>>. Acesso em: 08 jun. 2016.

ADAMU, H.; PETROS, B.; ZHANG, G.; KASSA, H.; AMER, S.; YE, J.; FENG, Y.; XIAO, L. Distribution and clinical manifestations of *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV/AIDS patients in Ethiopia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, p. 1-10, 2014.

AITA, J.; ICHIKAWA-SEKI, M.; KINAMI, A.; YAITA, S.; KUMAGAI, Y.; NISHIKAWA, Y.; ITAGAKI, T. J. Molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* detected in Japanese black and Holstein calves in Iwate Prefecture and Tanegashima Island, Kagoshima Prefecture, Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 77, n. 8, p. 997-999, 2015.

ALHO, A. M.; CRUZ, R.; GOMES, L.; CARVALHO, L. M. *Dipylidium caninum*, da ingestão da pulga ao controlo do céstode mais comum do cão e do gato. **Clínica Animal**, v. 3, p. 26-29, 2015.

ALMEIDA, M. S.; SOUSA, R. A.; RIBEIRO, K. H. C.; SANTOS, K. R.; CATENACCI, L. S. Ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp. em cães e gatos de Bom Jesus, Piauí, Brasil. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 21, p. 1421-1431, 2015.

ALVES, O. F.; GOMES, A. G.; SILVA, A. C. Ocorrência de enteroparasitos em cães do município de Goiânia, Goiás: comparação de técnicas de diagnóstico. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 2, p. 127-133, 2005.

ANDERSON, B. C. Patterns of shedding of cryptosporidial oocysts in Idaho calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 178, p. 892-984, 1981.

ANJOS, D. S.; BABO-TERRA, V. J.; BORGES, F. A.; PAPASSONI, B.; ECHEVERRIA, J. T.; SOUZA, J. K.; OLIVEIRA, T. L.; BORGES, D. G. L. B. Frequência de *Cryptosporidium* sp. em gatos domiciliados no município de Campo Grande, MS. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, p. 261-262, 2013.

AUGUSTIN-BICHL, G.; BOCH, J.; HENKEL, G. *Cryptosporidium* infections in dogs and cats. **Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift**, v. 97, p. 179-181, 1984.

BALASSIANO, B. C. C.; CAMPOS, M. R.; MENEZES, R. C. A. A.; PEREIRA, M. J. S. Factors associated with gastrointestinal parasite infection in dogs in Rio de Janeiro, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 91, p. 234-240, 2009.

- BARR, S. C.; JAMROSZ, G. F.; HORNBUCKLE, W. E.; BOWMAN, D. D.; FAYER, R. Use of paromomycin for treatment of cryptosporidiosis in a cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 205, n. 12, p. 1742-1743, 1994.
- BATCHELOR, D. J.; TZANNES, S.; GRAHAM, P. A.; WASTLING, J. M.; PINCHBECK, G. L.; GERMAN, A. J. Detection of endoparasites with zoonotic potential in dogs with gastrointestinal disease in the UK. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 55, p. 99-104, 2008.
- BECK, A. M.; MEYERS, N. M. Health enhancement and companion animal ownership. **Annual Review of Public Health**, v. 17, p. 247-257, 1996.
- BESER, J.; TORESSON, L.; EITREM, R.; TROELL, K.; WINIECKA-KRUSNELL, J.; LEBBAD, M. Possible zoonotic transmission of *Cryptosporidium felis* in a household. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 5, p. 1-5, 2015.
- BLEARS, M. J.; POKORNY, N. J.; CARRENO, R. A.; CHEN, S.; DE GRANDIS, S. A.; LEE, H.; TREVORS, J. T. DNA fingerprinting of *Cryptosporidium parvum* isolates using Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). **Journal of Parasitology**, v. 86, n. 4, p. 838-841, 2000.
- BORNAY-LLINARES, F. J.; SILVA, A. J.; MOURA, I. N. S.; MYJAK, P.; PIETKIEWICZ, H.; KRUMINIS-ŁOZOWSKA, W.; GRACZYK, T. K.; PIENIAZEK, N. J. Identification of *Cryptosporidium felis* in a cow by morphologic and molecular methods. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 1455-1458, 1999.
- BOUZID, M.; HUNTER, P. R.; CHALMERS, R. M.; TYLER, K. M. *Cryptosporidium* Pathogenicity and Virulence. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 115-134, 2013.
- BOWMAN, D. D.; LUCIO-FORSTER, A. Cryptosporidiosis and giardiasis in dogs and cats: Veterinary and public health importance. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 121-127, 2010.
- BRESCIANI, K. D. S.; AMARANTE, A. F. T.; LIMA, V. M. F.; MARCONDES, M.; FEITOSA, F. L. F.; TÁPARA, C. V.; SERRANO, A. C. M.; ISHIZAKI, M. N.; TOME, R. O.; PERRI, S. H. V.; MEIRELES, M. V. Infecções por *Cryptosporidium* spp. em cães de Araçatuba, SP, Brazil. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 3, p. 466-468, 2008.
- BRESCIANI, K. D. S.; AQUINO, M. C. C.; ZUCATTO, A. S.; INÁCIO, S. V.; NETO, L. S.; COELHO, N. M. D.; COELHO, W. M. D.; BRITO, R. L. L.; VIOL, M. A. Criptosporidiose em animais domésticos: aspectos epidemiológicos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 5, p. 2387-2402, 2013.
- BUENO FRANCO, R. M.; BRANCO, N.; TRAINOTTI AMARO, B. C.; NETO, R. C.; da SILVA FIUZA, V. R. *Cryptosporidium* species and *Giardia* genotypes detected in surface water supply of Campinas, Southeast Brazil, by molecular methods. **Journal of Veterinary Medicine and Research**, v. 3, n. 3, p. 1-7, 2016.

CACCIÒ, S. M.; PUTIGNANI, L. Epidemiology of Human Cryptosporidiosis. In: CACCIÒ, S. M.; WIDMER, G. (eds). *Cryptosporidium: parasite and disease*. Viena: Springer, 2014. p. 43-79.

CAMA, V. A.; ROSS, J. M.; CRAWFORD, S.; KAWAI, V.; CHAVEZ-VALDEZ, R.; VARGAS, D.; VIVAR, A.; TICONA, E.; ÑAVINCOPA, M.; WILLIAMSON, J.; ORTEGA, Y.; GILMAN, R. H.; BERN, C.; XIAO, L. Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 196, p. 684-691, 2007.

CARDONA, G. A.; LUCIO, A.; BAILO, B.; CANO, L.; FUENTES, I.; CARMENA, D. Unexpected finding of feline-specific *Giardia duodenalis* assemblage F and *Cryptosporidium felis* in asymptomatic adult cattle in Northern Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 209, p. 258-263, 2015.

CARDOZO, S. V.; TEIXEIRA FILHO, W. L.; LOPES, C. W. G. Avaliação das técnicas de rotina no diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium baileyi* em amostras de fezes de frango de corte (*Gallus gallus domesticus*). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 351-353, 2008.

CARRASCO, L. P. S.; OLIVEIRA, R. L. S.; MOREIRA, C. M. R.; SANTOS, C. R. G. R.; CORGOZINHO, K. B.; SOUZA, H. J. M. Diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. pela técnica de qPCR em gatos no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 38, supl. 2, p. 22-26, 2016.

CAUSAPÉ, A. C.; QUÍLEZ, J.; SÁNCHEZ-ACEDO, C.; CACHO, E. Prevalence of intestinal parasites, including *Cryptosporidium parvum*, in dogs in Zaragoza city, Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 67, p. 161-167, 1996.

CERTAD, G.; VISCOGLIOSI, E.; CHABÉ, M.; CACCIÒ, S. M. Pathogenic mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 7, p. 561-576, 2017.

CHALMERS, R. M.; ROBINSON, G.; ELWIN, K.; HADFIELD, S. J.; XIAO, L.; RYAN, U.; MODHA, D.; MALLAGHAN, C. *Cryptosporidium* sp. rabbit genotype, a newly identified human pathogen. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, p. 829-830, 2009.

CHARNETSKY, C. J.; RIGGERS, S.; BRENNAN, F. Effect of petting a dog on immune system functioning. **Psychological Reports**, v. 3, n. 2, p. 1087-1091, 2004.

CHECKLEY, W.; WHITE, A. C. JR.; JAGANATH, D.; ARROWOOD, M. J.; CHALMERS, R. M.; CHEN, X.; FAYER, R.; GRIFFITHS, J. K.; GUERRANT, R. L.; HEDSTROM, L.; HUSTON, C. D.; KOTLOFF, K. L.; KANG, G.; MEAD, J. R.; MILLER, M.; PETRI, W. A. JR.; PRIEST, J. W.; ROOS, D. S.; STRIEPEN, B.; THOMPSON, R. C. A.; WARD, H. D.; VOORHIS, W. A. V.; XIAO, L.; ZHU, G.; HOUPPT, E. R. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 85-94, 2015.

CIELOSZYK, J.; GOÑI, P.; GARCÍA, A.; REMACHA, M. A.; SÁNCHEZ, E.; CLAVEL, A. Two cases of zoonotic cryptosporidiosis in Spain by the unusual species *Cryptosporidium*

*ubiquitum* and *Cryptosporidium felis*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 30, n. 9, p. 549-551, 2012.

COELHO, W. M. D.; AMARANTE, A. F. T.; SOUTELLO, R. V. G.; MEIRELES, M. V.; BRESCIANI, K. D. S. Ocorrência de parasitos gastrintestinais em amostras fecais de felinos no município de Andradina, São Paulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 2, p. 46-49, 2009.

COKLIN, T.; UEHLINGER, F. D.; FARBER, J. M.; BARKEMA, H. W.; O'HANDLEY, R. M.; DIXON, B. R. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves from 11 farms in Prince Edward Island, Canada. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 3-4, p. 323-326, 2009.

CURRENT, W. L.; GARCIA, L. S. Cryptosporidiosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, n. 3, p. 325-358, 1991.

DALL'AGNOL, L. P.; OTTO, M. A.; SILVA, A. S.; MONTEIRO, S. G. Parasitos gastrintestinais em gatos naturalmente infectados no município de Santa Maria no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, n. 3, p. 181-184, 2010.

DAS, G.; CHANGKIJA, B.; SARKAR, S.; DAS, P. Genotyping of *Cryptosporidium parvum* isolates in bovine population in Kolkata and characterization of new bovine genotypes. **Research Veterinary Science**, v. 91, p. 246-250, 2011.

DENHOLM, K. M.; HAITJEMA, H.; GWYNNE, B. J.; MORGAN, U. M.; IRWIN, P. J. Concurrent *Cryptosporidium* and parvovirus infections in a puppy. **Australian Veterinary Journal**, v. 79, n. 2, p. 98-101, 2001.

EDERLI, B. B.; EDERLI, N. B.; OLIVEIRA, F. C.; QUIRINO, C. R.; CARVALHO, C. B. Fatores de risco associados à infecção por *Cryptosporidium* spp. em cães domiciliados na cidade de Campos dos Goytacazes, estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 260-266, 2008.

ELLIOT, A.; MORGAN, U. M.; THOMPSON, R. C. A. Improved staining method for detecting *Cryptosporidium* oocysts in stools using malachite green. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 45, p. 139-142, 1999.

ELLIS, A. E.; BROWN, C. A.; MILLER, D. L. Diagnostic Exercise: Chronic vomiting in a dog. **Veterinary Pathology**, v. 47, n. 5, p. 991-993, 2010.

ELWIN, K.; CHALMERS, R. M. Contemporary identification of previously reported novel *Cryptosporidium* isolates reveals *Cryptosporidium bovis* and the cervine genotype in sheep (*Ovis aries*). **Parasitology Research**, v. 102, n. 5, p. 1103-1105, 2008.

ELWIN, K.; HADFIELD, S. J.; ROBINSON, G.; CHALMERS, R. M. The epidemiology of sporadic human infections with unusual cryptosporidia detected during routine typing in England and Wales, 2000-2008. **Epidemiology and Infection**, v. 140, p. 673-683, 2012a.

ELWIN, K.; HADFIELD, S. J.; ROBINSON, G.; CROUCH, N. D.; CHALMERS, R. M. *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travelers returning

to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007-2011. **International Journal for Parasitology**, v. 42, p. 675-682, 2012b.

EL-MADAWY, R. S.; KHALIFA, N. O.; KHATER, H. F. Detection of cryptosporidial infection among Egyptian stray dogs by using *Cryptosporidium parvum* outer wall protein gene. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v.13, n. 2, p. 104-110, 2010.

ENDENBURG, N.; van LITH, H. A. The influence of animals on the development of children. **The Veterinary Journal**, v. 190, p. 208-214, 2011.

FAYER, R. General Biology. In: FAYER, R.; XIAO, L. (eds). ***Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis**. London, New York: Boca Raton, CRC Press, 2007. p. 1-42.

FAYER, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 90-97, 2010.

FAYER, R.; UNGAR, B. L. P. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis, **Microbiological Reviews**, v. 50, n. 4, p. 458-483, 1986.

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

FAYER, R.; TROUT, J. M.; XIAO, L.; MORGAN, U. M.; LAL, A. A.; DUBEY, J. P. *Cryptosporidium canis* n.sp. from domestic dogs. **Journal Parasitology**, v. 87, n. 6, p. 1415-1422, 2001.

FAYER, R.; SANTÍN, M.; TROUT, J. M.; DUBEY, J. P. Detection of *Cryptosporidium felis* and *Giardia duodenalis* Assemblage F in a cat colony. **Veterinary Parasitology**, v. 140, p. 44-53, 2006.

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

FAYER, R.; SANTÍN, M.; MACARISIN, D. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. **Veterinary Parasitology**, v. 172, p. 23-32, 2010.

FELSENSTEIN, J. Phylogenies and the comparative method. **The American Naturalist**, v. 125, n. 1, p. 1-15, 1985.

FENG, Y.; WANG, L.; DUAN, L.; GOMEZ-PUERTA, L. A.; ZHANG, L.; ZHAO, X.; HU, J.; ZHANG, N.; XIAO, L. Extended outbreak of cryptosporidiosis in a pediatric hospital, China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 2, p. 312-314, 2012.

FERNANDES, A. B.; BAÊTA, B. A.; VASCONCELOS FILHO, W. F.; MASSAD, F. V.; REBOUÇAS, F. A. C. F.; CARVALHO, J. B. DE; LOPES, C. W. G. Relação entre animais de companhia e parasitos intestinais em crianças, município de Seropédica, RJ. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 296-300, 2008.

FERREIRA, A. P.; HORTA, M. A. P.; PEREIRA, C. R. A. Análise da prevalência de *Cryptosporidium* spp. em animais de companhia de idosos. Estudo de caso: Teresópolis, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 36, n. 2, p. 328-342, 2012.

FERREIRA, J. I. G.; PENA, H. F. J.; AZEVEDO, S. S.; LABRUNA, M. B.; GENNARI, S. M. Occurrences of gastrointestinal parasites in fecal samples from domestic dogs in São Paulo, SP, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 25, n. 4, p. 435-440, 2016.

FIGUEIREDO, H. C. P.; JÚNIOR, D. J. P.; NOGUEIRA, R. B.; COSTA, P. R. S. Excreção de oocistos de *Cryptosporidium parvum* em cães saudáveis das cidades de Lavras e Viçosa, Estado de Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1625-1627, 2004.

FITZGERALD, L.; BENNETT, M.; NG, J.; NICHOLLS, P.; JAMES, F.; ELLIOT, A.; SLAVEN, M.; RYAN, U. Morphological and molecular characterisation of a mixed *Cryptosporidium muris*/*Cryptosporidium felis* infection in a cat. **Veterinary Parasitology**, v. 175, p. 160-164, 2011.

FOX, L. M.; SARAVOLATZ, L. D. Nitazoxanide: a new thiazolide antiparasitic agent. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, p. 1173-1180, 2005.

FRIZZO, C.; SCHIMIDT, A. P.; WAGNER, G.; MULLER, G. A. Intestinal parasites present in canine fecal samples collected in rural areas of municipalities in the Midwest of Santa Catarina, Brazil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 45, n. 2, p. 227-232, 2016.

FUKUSHIM, K.; HELMAN, R. G. Cryptosporidiosis in a pup with distemper. **Veterinary Pathology**, v. 21, p. 247-248, 1984.

FUNADA, M. R.; PENA, H. F. J.; SOARES, R. M.; AMAKU, M.; GENNARI, S. M. Frequência de parasitos gastrintestinais em cães e gatos atendidos em hospital-escola veterinário da cidade de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 5, p. 1338-1340, 2007.

GALVÁN, A. L.; MAGNET, A.; IZQUIERDO, F.; FERNÁNDEZ-VADILLO, C.; PERALTA, R. H.; ANGULO, S.; FENOY, S.; DEL AGUILA, C. A year-long study of *Cryptosporidium* species and subtypes in recreational, drinking and wastewater from the central area of Spain. **Science of the Total Environment**, v. 468, p. 368-375, 2014.

GAŁĘCKI, R.; SOKÓŁ, R. *Cryptosporidium canis* e *C. felis* as a potential risk to humans. **Polish Journal of Natural Sciences**, v. 30, n. 2, p. 203-212, 2015.

GARCIA, L. S.; SHIMIZU, R. Y. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 1526-1529, 1997.

GARCIA, L. S.; BRUCKNER, D. A.; BREWER, T. C.; SHIMIZU, R. Y. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 185-190, 1983.

GATEI, W.; SUPUTTAMONGKOL, Y.; WAYWA, D.; ASHFORD, R. W.; BAILEY, J. W.; GREENSILL, J.; BEECHING, N. J.; HART, C. A. Zoonotic species of *Cryptosporidium* are as prevalent as the anthroponotic in HIV-infected patients in Thailand. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 96, n. 8, p. 797-802, 2002.

GENNARI, S. M.; KASAI, N.; PENA, H. F. J.; CORTEZ, A. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 2, p. 87-91, 1999.

GENNARI, S. M.; FERREIRA, J. I. G. S.; PENA, H. F. J.; LABRUNA, M. B.; AZEVEDO, S. S. Frequency of gastrointestinal parasites in cats seen at the University of São Paulo Veterinary Hospital, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 25, n. 4, p. 423-428, 2016.

GIANGASPERO, A.; IORIO, R.; PAOLETTI, B.; TRAVERSA, D.; CAPELLI, G. Molecular evidence for *Cryptosporidium* infection in dogs in Central Italy. **Parasitology Research**, v. 99, p. 297-299, 2006.

GIL, H.; CANO, L.; LUCIO, A.; BAILO, B.; MINGO, M. H.; CARDONA, G. A.; FERNÁNDEZ-BASTERRA, J. A.; ARAMBURU-AGUIRRE, J.; LÓPEZ-MOLINA, N.; CARMENA, D. Detection and molecular diversity of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in sheltered dogs and cats in Northern Spain. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 50, p. 62-69, 2017.

GIZZI, A. B. R.; OLIVEIRA, S. T.; LEUTENEGGER, C. M.; ESTRADA, M.; KOZEMJAKIN, D. A.; STEDILE, R.; MARCONDES, M.; BIONDO, A. W. Presence of infectious agents and co-infections in diarrheic dogs determined with a real-time polymerase chain reaction-based panel. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 23, p. 1-8, 2014.

GONZÁLEZ-DIAZ, M.; URREA-QUEZADA, A.; VILLEGAS-GÓMEZ, I.; DURAZO, M.; GARIBAY-ESCOBAR, A.; XIAO, L.; HERNÁNDEZ, J.; XIAO, L.; VALENZUELA, O. *Cryptosporidium canis* in two Mexican toddlers. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 35, n. 11, p. 1265-1266, 2016.

GOODWIN, M. A.; BARSANTI, J. A. Intractable diarrhoea associated with intestinal cryptosporidiosis in a domestic cat also infected with feline leukaemia virus. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 26, p. 365-368, 1990.

GRECCA, M.; THOMAZ-SOCCOL, V.; RIBEIRO, M. C. C.; TRUPPEL, J. H.; PEREIRA, J. T.; OSAKI, S. C. Occurrence of *Cryptosporidium* sp. in dogs and cats from Curitiba and its metropolitan area. **Archives of Veterinary Science**, v. 18, n. 3, p. 1-6, 2013.

GREENE, C. E.; JACOBS, G. J.; PRICKETT, D. Intestinal malabsorption and cryptosporidiosis in an adult dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 197, p. 365-367, 1990.

HADFIELD, S. J.; ROBINSON, G.; ELWIN, K.; CHALMERS, R. M. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp. in human clinical samples by use of Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 49, n. 3, p. 918-924, 2011.



HADFIELD, S. J.; PACHEBAT, J. A.; SWAIN, M. T.; ROBINSON, G.; CAMERON, S. J.; ALEXANDER, J.; HEGARTY, M. J.; ELWIN, K. CHALMERS, R. M. Generation of whole genome sequences of new *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* isolates directly from stool samples. **BMC Genomics**, v. 16, n. 650, p. 1-12, 2015.

HAJDUŠEK, O.; DITRICH, O.; ŠLAPETA, J. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. **Veterinary Parasitology**, v. 122, p. 183-192, 2004.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HAMNES, I. S.; GJERDE, B. K.; ROBERTSON, L. J. A longitudinal study on the occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in dogs during their first year of life. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 49, n. 22, p. 1-10, 2007.

HELMY, Y. A.; KRÜCKEN, J.; NÖCKLER, K.; SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; ZESSIN, K. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in livestock animals and humans in the Ismailia province of Egypt. **Veterinary Parasitology**, v. 193, p. 15-24, 2013.

HIJJAWI, N. S.; MELONI, B. P.; MORGAN, U. M.; OLSON, M. E.; THOMPSON, R. C. A. Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni* with evidence for the existence of novel extracellular stages in the *Cryptosporidium* life cycle. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 1719-1726, 2002.

HIJJAWI, N. S.; BOXELL, A. C.; THOMPSON, R. C. A. Recent advances in the developmental biology and life cycle of *Cryptosporidium*. In: ORTEGA-PIERRES, G.; CACCIÒ, S.; FAYER, R.; MANK, T. G.; SMITH, H. V.; THOMPSON, R. C. A. (eds). **Giardia and Cryptosporidium from molecules to disease**. London: CAB International, 2009. p. 255-265.

HOFMANNOVA, L.; HAUPTMAN, K.; HUCLOVA, K.; KVETONOVA, D.; SAK, B.; KVAC, M. *Cryptosporidium erinacei* and *C. parvum* in a group of overwintering hedgehogs. **European Journal of Protistology**, v. 56, p. 15-20, 2016.

HOLUBOVÁ, N.; SAK, B.; HORČIČKOVÁ, M.; HLÁSKOVÁ, L.; KVĚTOŇOVÁ, D.; MENCHACA, S.; MCEVOY, J.; KVÁČ, M. *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. **Parasitology Research**, v. 115, p. 2243-2251, 2016.

HU, Y.; HU, S.; WANG, W.; WU, X.; MARSHALL, F. B.; CHEN, X.; HOU, L.; WANG, C. Earliest evidence for commensal processes of cat domestication. **PNAS**, v. 111, n. 1, p. 116-120, 2014.

HUANG, J.; YUE, D.; QI, M.; WANG, R.; ZHAO, J.; LI, J.; SHI, K.; WANG, M.; ZHANG, L. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Ningxia, northwestern China. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 292, p. 1-5, 2014.

HUBER, F.; BOMFIM, T. C. B.; GOMES, R. S. Comparação entre infecção por *Cryptosporidium* sp. e por *Giardia* sp. em gatos sob dois sistemas de criação. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 11, n. 1, p. 7-12, 2002.

HUBER, F.; BOMFIM, T. C.; GOMES, R. S. Comparação da eficiência da coloração pelo método da Safranina a quente e da técnica de centrífugo-flutuação na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* sp. em amostras fecais de animais domésticos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 2, p. 81-84, 2004.

HUBER, F.; BOMFIM, T. C. B.; GOMES, R. S. Comparison between natural infection by *Cryptosporidium* sp., *Giardia* sp. in dogs in two living situations in the West Zone of the municipality of Rio de Janeiro. **Veterinary Parasitology**, v. 130, p. 69-72, 2005.

HUBER, F.; SILVA, S.; BOMFIM, T. C. B.; TEIXEIRA, K. R. S.; BELLO, A. R. Genotypic characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 150, p. 65-74, 2007.

HUNTER, P. R.; THOMPSON, R. C. A. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 1181-1190, 2005.

IBGE. **Pesquisa nacional de saúde: 2013: acesso e utilização dos serviços de saúde, acidentes e violências**: Brasil, grandes regiões e unidades da federação. Coordenação de Trabalho e Rendimento. - Rio de Janeiro: IBGE, 2015a. 100 p.

IBGE. **Pesquisa nacional por amostra de domicílios: síntese de indicadores 2013**. Coordenação de Trabalho e Rendimento. - 2. ed. - Rio de Janeiro: IBGE, 2015b. 296 p.

IGNATIUS, R.; KLEMM, T.; ZANDER, S.; GAHUTU, J. B.; KIMMIG, P.; MOCKENHAUPT, F. P.; REGNATH T. Highly specific detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in human stool samples by undemanding and inexpensive phase contrast microscopy. **Parasitology Research**, v. 115, n. 3, p. 1229-1234, 2016.

ISEKI, M. *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. **Japanese Journal Parasitology**, v. 28, n. 7, p. 285-307, 1979.

ITOH, N.; OOHASHI, Y.; ICHIKAWA-SEKI, M.; ITAGAKI, T.; ITO, Y.; SAEKI, H.; KANAI, K.; CHIKAZAWA, S.; HORI, Y.; HOSHI, F.; HIGUCHI, S. Molecular detection and characterization of *Cryptosporidium* species in household dogs, pet shop puppies, and dogs kept in a school of veterinary nursing in Japan. **Veterinary Parasitology**, v. 200, p. 284-288, 2014.

JEX, A. R.; SMITH, H. V.; MONIS, P. T.; CAMPBELL, B. E.; GASSER, R. B. *Cryptosporidium* - Biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 304-317, 2008.

JIAN, F.; QI, M.; HE, X.; WANG, R.; ZHANG, S.; DONG, H.; ZHANG, L. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* in dogs in Henan Province, China. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 26, p. 1-4, 2014.

JIRKU, M.; VALIGUROVA, A.; KOUDELA, B.; KRIZEK, J.; MODRY, D.; ŠLAPETA, J. New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. **Folia Parasitologica**, v. 55, n. 2, p. 81-94, 2008.

KANTERE, M.; ATHANASIOU, L. V.; CHATZOPOULOS, D. C.; SPYROU, V.; VALIAKOS, G.; KONTOS, V.; BILLINIS, C. Enteric pathogens of dogs and cats with public health implications. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v. 9, n. 2, p. 84-94, 2014.

KATAGIRI, S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G. Prevalence of dog intestinal parasites and risk perception of zoonotic infection by dog owners in São Paulo State, Brazil. **Zoonoses Public Health**, v. 55, p. 406-413, 2008.

KIMBELL, L. M. III; MILLER, D. L.; CHAVEZ, W.; ALTMAN, N. Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium serpentis* in a wild-caught corn snake (*Elaphe guttata guttata*) and a five-species restriction fragment length polymorphism-based assay that can additionally discern *C. parvum* from *C. wrairi*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 5345-5349, 1999.

KOOMPAPONG, K.; SUKTHANA, Y. Seasonal variation and potential sources of *Cryptosporidium* contamination in surface waters of Chao Phraya River and Bang Pu Nature Reserve pier, Thailand. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 43, p. 832-840, 2012.

KOSTOPOULOU, D.; CLAEREBOUT, E.; ARVANITIS, D.; LIGDA, P.; VOUTZOURAKIS, N.; CASAERT, S.; SOTIRAKI, S. Abundance, zoonotic potential and risk factors of intestinal parasitism amongst dog and cat populations: The scenario of Crete, Greece. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 43, p. 1-12, 2017.

KOTLOFF, K. L.; NATARO, J. P.; BLACKWELDER, W. C.; NASRIN, D.; FARAG, T. H.; PANCHALINGAM, S.; WU, Y.; SOW, S. O.; SUR, D.; BREIMAN, R. F.; FARUQUE, A. S.; ZAIDI, A. K.; SAHA, D.; ALONSO, P. L.; TAMBOURA, B.; SANOGO, D.; ONWUCHEKWA, U.; MANNA, B.; RAMAMURTHY, T.; KANUNGO, S.; OCHIENG, J. B.; OMORE, R.; OUNDO, J. O.; HOSSAIN, A.; DAS, S. K.; AHMED, S.; QURESHI, S.; QUADRI, F.; ADEGBOLA, R. A.; ANTONIO, M.; HOSSAIN, M. J.; AKINSOLA, A.; MANDOMANDO, I.; NHAMPOSSA, T.; ACÁCIO, S.; BISWAS, K.; O'REILLY, C. E.; MINTZ, E. D.; BERKELEY, L. Y.; MUHSEN, K.; SOMMERFELT, H.; ROBINS-BROWNE, R. M.; LEVINE, M. M. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **The Lancet**, v. 382, p. 209-222, 2013.

KVÁČ, M.; KESTŘÁNOVÁ, M.; PINKOVÁ, M.; KVĚTOŇOVÁ, D.; KALINOVÁ, J.; WAGNEROVÁ, P.; KOTKOVÁ, M.; VÍTOVEC, J.; DITRICH, O.; MCEVOY, J.; STENGER, B.; SAK, B. *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). **Veterinary Parasitology**, v. 191, p. 218-227, 2013.

KVÁČ, M.; HAVRDOVÁ, N.; HLÁSKOVÁ, L.; DAŇKOVÁ, T.; KANDĚRA, J.; JEŽKOVÁ, J.; VÍTOVEC, J.; SAK, B.; ORTEGA, Y.; XIAO, L.; MODRÝ, D.; CHELLADURAI, J. R.; PRANTLOVÁ, V.; MCEVOY, J. *Cryptosporidium proliferans* n. sp.

(Apicomplexa: Cryptosporidiidae): molecular and biological evidence of cryptic species within gastric *Cryptosporidium* of mammals. **PLoS One**, v. 11, n. 1, p. 1-24, 2016.

LABRUNA, M. B.; PENA, H. F. J.; SOUZA, S. L. P.; PINTER, A.; SILVA, J. C. R.; RAGOZO, A. M. A.; CAMARGO, L. M. A. GENNARI, S. M. Prevalência de endoparasitas em cães da área urbana do município de Monte Negro, Rondônia. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 2, p. 183-193, 2006.

LALLO, M. A.; BONDAN, E. F. Prevalência de *Cryptosporidium* sp. em cães de instituições da cidade de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. 1, p. 120-125, 2006.

LALLO, M. A.; SPADACCI-MORENA, D. D.; COUTINHO, S. D. Comportamento humano na criação de cães e a prevalência de parasitos intestinais com potencial zoonótico. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 14, p. 119-128, 2016.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. ClustalW and ClustalX version 2. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.

LEMONS, F. O.; ALMOSNY, N. P.; SOARES, A. M. B.; ALENCAR, N. X. *Cryptosporidium* species screening using Kinyoun technique in domestic cats with diarrhea. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 14, n. 2, p. 113-117, 2011.

LENT, S. F.; BURKHARDT, J. E.; BOLKA, D. Coincident enteric cryptosporidiosis and lymphosarcoma in a cat with diarrhoea. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 29, p. 492-496, 1993.

LI, N.; XIAO, L.; ALDERISIO, K.; ELWIN, K.; CEBELINSKI, E.; CHALMERS, R.; SANTIN, M.; FAYER, R.; KVAC, M.; RYAN, U.; SAK, B.; STANKO, M.; GUO, Y.; WANG, L.; ZHANG, L.; CAI, J.; ROELLIG, D.; FENG, Y. Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum*, a zoonotic pathogen emerging in humans. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, p. 217-224, 2014.

LI, W.; LI, Y.; SONG, M.; LU, Y.; YANG, J.; TAO, W.; JIANG, Y.; WAN, Q.; ZHANG, S.; XIAO, L. Prevalence and genetic characteristics of *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon bieneusi* and *Giardia duodenalis* in cats and dogs in Heilongjiang province, China. **Veterinary Parasitology**, v. 208, p. 125-134, 2015.

LIU, X.; ZHOU, X.; ZHONG, Z.; CHEN, W.; DENG, J.; NIU, L.; WANG, Q.; PENG, G. New subtype of *Cryptosporidium cuniculus* isolated from rabbits by sequencing the Gp60 gene. **Journal of Parasitology**, v. 100, n. 4, p. 532-536, 2014.

LIU, X.; XIE, N.; LI, W.; ZHOU, Z.; ZHONG, Z.; SHEN, L.; CAO, S.; YU, X.; HU, Y.; CHEN, W.; PENG, G. Emergence of *Cryptosporidium hominis* Monkey Genotype II and Novel Subtype Family Ik in the Squirrel Monkey (*Saimiri sciureus*) in China. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1-10, 2015.

- LLOYD, S.; SMITH, J. Pattern of *Cryptosporidium parvum* oocyst excretion by experimentally infected dogs. **International Journal for Parasitology**, v. 27, n. 7, p. 799-801, 1997.
- LOPES, K. R. F.; SILVA, A. R. Considerações sobre a importância do cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) dentro da sociedade humana. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 3, p. 177-185, 2012.
- LUCCA, P.; DE GASPARI, E. N.; BOZZOLI, L. M.; FUNADA, M. R.; SILVA, S. O. S.; IULIANO, W.; SOARES, R. M. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from HIV infected patients from an urban area of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 6, p. 341-343, 2009.
- LUCIO-FORSTER, A; GRIFFITHS, J. K.; CAMA, V. A.; XIAO, L.; BOWMANN, D. D. Minimal zoonotic risk of cryptosporidiosis from pet dogs and cats. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 4, p. 174-179, 2010.
- LUPO, P. J.; LANGER-CURRY, R. C.; ROBINSON, M.; OKHUYSEN, P. C.; CHAPPELL, C. L. *Cryptosporidium muris* in a Texas canine population. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 6, p. 917-921, 2008.
- MAHMOUDI, M.R.; NAZEMALHOSSEINI-MOJARAD, E.; KAZEMI, B.; HAGHIGHI, A.; MIRZAEI, A.; MOHAMMADIHA, A.; JAHANTAB, S.; XIAO, L.; KARANIS, P. *Cryptosporidium* genotypes and subtypes distribution in river water in Iran. **Journal of Water and Health**, v. 13, n. 2, p. 600-606, 2015.
- MTAMBO, M. M. A.; NASH, A. S.; BLEWETT, D. A.; SMITH, H. V.; WRIGHT, S. *Cryptosporidium* infection in cats: prevalence of infection in domestic and feral cats in the Glasgow area. **Veterinary Record**, v. 7, p. 502-504, 1991.
- MATEO, M.; MINGO, M. H.; LUCIO, A.; MORALES, L.; BALSEIRO, A.; ESPÍ, A.; BARRAL, M.; BARBERO, J. F. L.; HABELA, M. A.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, J. L.; BERNAL, R. C.; KÖSTER, P. C.; CARDONA, G. A.; CARMENA, D. Occurrence and molecular genotyping of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in wild mesocarnivores in Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 235, p. 86-93, 2017.
- MCKENZIE, E.; RIEHL, J.; BANSE, H.; KASS, P. H.; NELSON, S. JR.; MARKS, S. L. Prevalence of diarrhea and enteropathogens in racing sled dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, p. 97-103, 2010.
- MEIRELES, M. V. *Cryptosporidium* infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 4, p. 197-204, 2010.
- MEIRELES, M. V.; SOARES, R. M.; SANTOS, M. M.; GENNARI, S. M. Biological studies and molecular characterization of a *Cryptosporidium* isolate from ostriches (*Struthio camelus*). **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 3, p. 623-626, 2006.

- MEIRELES, M. V.; SOARES, R. M.; GENNARI, S. M. Natural infection with zoonotic subtype of *Cryptosporidium parvum* in Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 166-170, 2007.
- MEKARU, S. R.; MARKS, S. L.; FELLE, A. J.; CHOUICHA, N.; KASS, P. H. Comparison of direct immunofluorescence, immunoassays, and fecal flotation for detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in naturally exposed cats in 4 Northern California animal shelters. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, p. 959-965, 2007.
- MOHAMMADPOUR, I.; MONABATI, A.; BOZORG-GHALATI, F.; MOTAZEDIAN, M. H. Molecular characterization of *Cryptosporidium* sp. in patients with multiple bowel biopsies from Fars Province, Iran. **Annals of Parasitology**, v. 62, n. 4, p. 321-330, 2016.
- MONTICELLO, T. M.; LEVY, M. G.; BUNCH, S. E.; FAIRLEY, R. A. Cryptosporidiosis in a feline leukemia virus-positive cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 191, n. 6, p. 705-706, 1987.
- MOREY, D. F. The early evolution of the domestic dog. **American Scientist**, v. 82, p. 336-347, 1994.
- MORGAN, U. M.; SARGENT, K. D.; ELLIOT, A.; THOMPSON, C. A. *Cryptosporidium* in cats – Additional evidence for *C. felis*. **The Veterinary Journal**, v. 156, p. 159-161, 1998.
- MORGAN, U. M.; DEPLAZES, P.; FORBES, D. A.; SPANO, F.; HERTZBERG, H.; SARGENT, K. D.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R. C. Sequence and PCR-RFLP analysis of the internal transcribed spacers of the rDNA repeat unit in isolates of *Cryptosporidium* from different hosts. **Parasitology**, v. 18, (Pt 1), p. 49-58, 1999a.
- MORGAN, U. M.; MONIS, P. T.; FAYER, R.; DEPLAZES, P.; THOMPSON, R. C. Phylogenetic relationships among isolates of *Cryptosporidium*: evidence for several new species. **Journal of Parasitology**, v. 85, n. 6, p. 1126-1133, 1999b.
- MORGAN, U. M.; XIAO, L.; MONIS, P.; FALL, A.; IRWIN, P. J.; FAYER, R.; DENHOLM, K. M.; LIMOR, J.; LAL, A.; THOMPSON, R. C. A. *Cryptosporidium* spp. in domestic dogs: the “dog” genotype. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 2220-2223, 2000.
- MOURA, A. B.; TEIXEIRA, E. B.; SOUZA, A. P. SARTOR, A. A.; BELLATO, V.; STALLIVIERE, F. M. *Cryptosporidium* spp. em cães domiciliados da cidade de Lages, SC. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 8, n. 2, p. 173-178, 2009.
- MUNDIM, M. J. S.; ROSA, L. A. G.; HORTÊNCIO, S. M.; FARIA, E. S. M.; RODRIGUES, R. M.; CURY, M. C. Prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dogs from different living conditions in Uberlândia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 144, p. 356-359, 2007.
- MURAKOSHI, F.; FUKUDA, Y.; MATSUBARA, R.; KATO, Y.; SATO, R.; SASAKI, T.; TADA, C., NAKAI, Y. Detection and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in large Japanese field mice, *Apodemus speciosus*. **Veterinary Parasitology**, v. 196, p. 184-188, 2013.

NAKAMURA, A. A.; SIMÕES, D. C.; ANTUNES, R. G.; DA SILVA, D. C.; MEIRELES, M. V. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of birds kept in captivity in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 166, p. 476-551, 2009.

NAKAMURA, A. A.; HOMEM, C. G.; SILVA, A. M.; MEIRELES, M. V. Diagnosis of gastric cryptosporidiosis in birds using a duplex real-time PCR assay. **Veterinary Parasitology**, v. 205, p. 7-13, 2014.

NASH, A. S.; MTAMBO, M. M. A.; GIBBS, H. A. *Cryptosporidium* infection in farm cats in the Glasgow area. **Veterinary Record**, v. 133, p. 576-577, 1993.

NAVARRO, I. T.; KANO, F. S.; OGAWA, L.; FREIRE, R. L.; VIDOTTO, O. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp em cães com diarreia atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina, PR. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 18, n. 1, p. 23-25, 1997.

NICHOLS, R. A.; CONNELLY, L.; SULLIVAN, C. B.; SMITH, H. V. Identification of *Cryptosporidium* species and genotypes in Scottish raw and drinking waters during a one year monitoring period. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 5977-5986, 2010.

ORTEGA-PIERRES, G.; SMITH, H. V.; CACCIÒ, S. M.; THOMPSON, R. C. New tools provide further insights into *Giardia* and *Cryptosporidium* biology. **Trends in Parasitology**, v. 25, p. 410-416, 2009.

OSMAN, M.; BORIES, J.; SAFADI, D. E.; POIREL, M.; GANTOIS, N.; BENAMROUZ-VANNESTE, S.; DELHAES, L.; HUGONNARD, M.; CERTAD, G.; ZENNER, L.; VISVOGLIOSI, E. Prevalence and genetic diversity of the intestinal parasites *Blastocystis* sp. and *Cryptosporidium* spp. in household dogs in France and evaluation of zoonotic transmission risk. **Veterinary Parasitology**, v. 214, p. 167-170, 2015.

OVERGAAUW, P. A. M.; ZUTPHEN, L.; HOEK, D.; YAYA, F. O.; ROELFSEMA, J.; PINELLI, E.; KNAPEN, F.; KORTBEEK, L. M. Zoonotic parasites in fecal samples and fur from dogs and cats in The Netherlands. **Veterinary Parasitology**, v. 163, p. 115-122, 2009.

O'DONOGHUE, P. J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 2, p. 13-195, 1995.

O'HAIRE, M. Companion animals and human health: Benefits, challenges, and the road ahead. **Journal of Veterinary Behavior**, v. 5, p. 226-234, 2010.

PALENZUELA, O.; ALVAREZ-PELLITERO, P.; SITJA-BOBADILLA, A. Molecular characterization of *Cryptosporidium molnari* reveals a distinct piscine clade. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 22, p. 7646-7649, 2010.

PALMER, C. J.; XIAO, L.; TERASHIMA, A.; GUERRA, H.; GOTUZZO, E.; SALDÍAS, G.; BONILLA, J. A.; ZHOU, L.; LINDQUIST, A.; UPTON, S. J. *Cryptosporidium muris*, a rodent pathogen, recovered from a human in Perú. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 9, p. 1174-1176, 2003.

PALMER, C. S.; TRAUB, R. J.; ROBERTSON, I. D.; DEVLIN, G.; REES, R.; THOMPSON, R. C. A. Determining the zoonotic significance of *Giardia* and

*Cryptosporidium* in Australian dogs and cats. **Veterinary Parasitology**, v. 154, p. 142-147, 2008.

PAVLASEK, I.; RYAN, U. The first finding of a natural infection of *Cryptosporidium muris* in a cat. **Veterinary Parasitology**, v. 144, p. 349-352, 2007.

PEDRAZA-DÍAZ, S.; ORTEGA-MORA, L. M.; CARRIÓN, B. A.; NAVARRO, V.; GÓMEZ-BAUTISTA, M. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from pet reptiles. **Veterinary Parasitology**, v. 160, p. 204-210, 2009.

PEREIRA, C. R. A.; FERREIRA, A. P.; KOIFMAN, R. J.; KOIFMAN, S. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in domestic companion animals of elderly population in Teresópolis, Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 14, n. 1, p. 17-25, 2011.

PIENIAZEK, N. J.; BORNAY-LLINARES, F. J.; SLEMENDA, S. B.; SILVA, A. J.; MOURA, I. N. S.; ARWOOD, M. J.; DITRICH, O.; ADDISS, D. G. New *Cryptosporidium* genotypes in HIV-infected persons. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, n. 3, p. 444-449, 1999.

PIMENTEL, F. F.; ALMEIDA, A. J.; OLIVEIRA, F. C. R.; EDERLI, B. B. Efeito do tratamento com Nitazoxanida na criptosporidiose canina. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, v. 14, p. 107-112, 2011.

PIVOTO, F. L.; LOPES, L. F. D.; VOGEL, F. S. F.; BOTTON, S. A.; SANGIONI, L. A. Ocorrência de parasitos gastrointestinais e fatores de risco de parasitismo em gatos domésticos urbanos de Santa Maria, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 43, n. 8, p.1453-1458, 2013.

PLUTZER, J.; KARANIS, P. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: An update. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 187-199, 2009.

QI, M.; WANG, R.; NING, C.; LI, X.; ZHANG, L.; JIAN, F.; SUN, Y.; XIAO, L. *Cryptosporidium* spp. in pet birds: Genetic diversity and potential public health significance. **Experimental Parasitology**, v. 128, p. 336-340, 2011.

RAGOZO, A. M. A.; MURADIAN, V.; SILVA, J. C. R.; CARAVIERI, R.; AMAJONER, V. R.; MAGNABOSCO, C.; GENNARI, S. M. Ocorrência de parasitos gastrintestinais em fezes de gatos das cidades de São Paulo e Guarulhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 5, p. 244-246, 2002.

RAMBOZZI, L.; MENZANO, A.; MANNELLI, A.; ROMANO, S.; ISAIA, M. C. Prevalence of cryptosporidian infection in cats in Turin and analysis of risk factors. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 9, p. 392-396, 2007.

RAMIREZ, N. E.; WARD, L. A.; SREEVATSAN, S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. **Microbes and Infection**, v. 6, p. 773-785, 2004.



- RIMHANEN-FINNE, R.; ENEMARK, H. L.; KOLEHMAINEN, J.; TOROPAINEN, P.; HÄNNINEN, M. L. Evaluation of immunofluorescence microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay in detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p. 345-348, 2007.
- ROBERTSON, I. D.; IRWIN, P. J.; LYMBERY, A. J.; THOMPSON. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1369-1377, 2000.
- ROCHELLE, P. A.; UPTON, S. J.; MONTELONE, B. A.; WOODS, K. The response of *Cryptosporidium parvum* to UV light. **TRENDS in Parasitology**, v. 21, n. 2, p. 81-87, 2005.
- RODRIGUES, D. S. A.; ALENCAR, D. F.; MEDEIROS, B. L. N. Dipilidiose em cães - Relato de caso. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 10, n. 3, p. 197-199, 2016.
- ROSE, J. B.; HUFFMAN, D. E.; GENNACCARO, A. Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 113-123, 2002.
- RYAN, U.; HIJAWI, N. New developments in *Cryptosporidium* research. **International Journal for Parasitology**, v. 45, p. 367-373, 2015.
- RYAN, U.; FAYER, R.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. **Parasitology**, v. 141, p. 1667-1685, 2014.
- RYAN, U.; ZAHEDI, A.; PAPANINI, A. *Cryptosporidium* in humans and animals – a one health approach to prophylaxis. **Parasite Immunology**, v. 38, p. 535-547, 2016.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SAMIE, A.; TSIPA, M. A.; BESSONG, P. The epidemiology of *Cryptosporidium* in cats and dogs in the Thohoyandou region, South Africa. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 21, p. 2510-2518, 2013.
- SANTÍN, M.; TROUT, J. M. Companion animals. In: FAYER, R.; XIAO, L. (eds). ***Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis**. London, New York: Boca Raton, CRC Press, 2007. p. 437-450.
- SANTÍN, M.; TROUT, J. M.; VECINO, J. A. C. *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bieneusi* in cats from Bogota (Colombia) and genotyping of isolates. **Veterinary Parasitology**, v. 141, p. 334-339, 2006.
- SANTOS, L. U.; NETO, R. C.; FRANCO, R. M. B.; GUIMARÃES, R. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em amostras de esgoto bruto ou tratado: avaliação crítica dos métodos. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 16, n. 2, p. 115-120, 2011.
- SARGENT, K. D.; MORGAN, U. M.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R. C. A. Morphological and genetic characterisation of *Cryptosporidium* oocysts from domestic cats. **Veterinary Parasitology**, v. 77, p. 221-227, 1998.

SATOH, M.; MATSUBARA-NIHEI, Y.; SASAKI, T.; NAKAI, Y. Characterization of *Cryptosporidium canis* isolated in Japan. **Parasitology Research**, v. 99, n. 6, p. 746-748, 2006.

SCORZA, V.; LAPPIN, M. R. Cryptosporidiosis and Cyclosporiasis. In: GREENE, C. E. (eds). **Infectious diseases of the dog and cat**. Missouri: Elsevier, 2012. p. 840-852.

SCORZA, V.; TANGTRONGSUP, S. Update on the diagnosis and management of *Cryptosporidium* spp infections in dogs and cats. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 25, n. 3, p. 164-169, 2010.

SEVÁ, A. P.; FUNADA, M. R.; SOUZA, S. O.; NAVA, A.; RICHTZENHAIN, L. J.; SOARES, R. M. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from domestic animals in a rural area surrounding Atlantic dry forest fragments in Teodoro Sampaio municipality, State of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 4, p. 249-253, 2010.

SHAHIDUZZAMAN, M.; DAUGSCHIES, A. Therapy and prevention of cryptosporidiosis in animals. **Veterinary Parasitology**, v. 188, p. 203-214, 2012.

SHEATHER, A. L. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a floatation technique. **Journal of Comparative Therapy**, v. 36, p. 266-275, 1923.

SILVA, A. S.; CEOLIN, L. V.; CARGNELUTTI, J. F.; PESSOA, G. A.; OLIVEIRA, C. B.; QUINTAL, A. P. N.; MONTEIRO, S. G. Prevalência de parasitismo em cães domiciliados num bairro de Santa Maria - RS. **Saúde**, v. 33, n. 1, p. 27-31, 2007.

SILVA, A. S.; MAURER, C. G.; GASPERI, D. D.; PESSOA, G. A.; ZANETTE, R. A.; ANTONOW, R. R.; VOGEL, F. S. F. Protozoários em cães de canis de Santa Maria - RS. **Revista da FZVA**, v. 15, n. 1, p. 191-199, 2008.

SILVA, G. R.; SANTANA, I. M.; FERREIRA, A. C. M. S.; BORGES, J. C. G.; ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A. G. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em felinos de Recife, PE, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v. 22, n. 3, p. 408-417, 2015.

SILVA, G. R.; SANTANA, I. M.; FERREIRA, A. C. M. S.; BORGES, J. C. G.; ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A. G. Avaliação de fatores epidemiológicos e sanitários associados à infecção por *Cryptosporidium* spp. em cães domiciliados. **Ciência Animal Brasileira**, v. 17, n. 3, p. 435-441, 2016.

SILVEIRA-NETO, L.; INÁCIO, S.; OLIVEIRA, L. N.; BRESCIANI, K. D. S. Is cryptosporidiosis an underestimated disease in cats? **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 47, p. 1-6, 2015.

SLAVIN, D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). **Journal of Comparative Pathology**, v. 65, n. 3, p. 262-266, 1955.

SMITH, H. V.; NICHOLS, R. A. B. *Cryptosporidium*: Detection in water and food. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 61-79, 2010.

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

SOBA, B.; PETROVEC, M.; MIOC, V.; LOGAR, J. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from humans in Slovenia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 9, p. 918-921, 2006.

SOTIRIADOU, I.; PANTCHEV, N.; GASSMANN, D.; KARANIS, P. Molecular identification of *Giardia* and *Cryptosporidium* from dogs and cats. **Parasite**, v. 20, n. 8, p. 1-7, 2013.

SPANO, F.; CRISANTI, A. *Cryptosporidium parvum*: the many secrets of a small genome. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 553-565, 2000.

SPONSELLER, J. K.; JEFFREY K. GRIFFITHS, J. K.; TZIPORI, S. The evolution of respiratory cryptosporidiosis: evidence for transmission by inhalation. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3; p. 575-586, 2014.

ŠLAPETA, J. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: a thirty colour rainbow? **International Journal for Parasitology**, v. 43, p. 957-970, 2013.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. Mega 5: Molecular evolutionary genetics analyses using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

THOMAZ, A.; MEIRELES, M. V.; SOARES, R. M.; PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of felines, canines and bovines in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 150, p. 291-296, 2007.

THOMPSON, R. C. A. *Echinococcus*, *Giardia* and *Cryptosporidium*: observational studies challenging accepted dogma. **Parasitology**, v. 136, p. 1529-1535, 2009.

THOMPSON, R. C. A.; PALMER, C. S; O'HANDLEY, R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. **The Veterinary Journal**, v. 177, p. 18-25, 2008.

TURNWALD, G. H.; BARTA, O.; TAYLOR, W.; KREEGER, J.; COLEMAN, S. U.; POURCIAU, S. S. Cryptosporidiosis associated with immunosuppression attributable to distemper in a pup. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, p. 79-81, 1988.

TYZZER, E. E. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 5, p. 12-13, 1907.

TYZZER, E. E. An extracellular coccidium: *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. **Journal of International Medical Research**, v. 18, p. 487-509, 1910.

- TYZZER, E. E. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. **Archiv für Protistenkunde**, v. 26, p. 394-412, 1912.
- TZIPORI, S.; CAMPBELL, I. Prevalence of *Cryptosporidium* antibodies in 10 animal species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 455-456, 1981.
- UDELL, M. A. R.; WYNNE, C. D. L. A review of domestic dogs' (*Canis familiaris*) human-like behaviors: Or why behavior analysts should stop worrying and love their dogs. **Journal of the Experimental Analysis of Behavior**, v. 89, p. 247-261, 2008.
- VENU, R.; LATHA, B. R.; BASITH, S. A.; RAJ, G. D.; SREEKUMAR, C.; RAMAN, M. Molecular prevalence of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves in Southern states of India. **Veterinary Parasitology**, v. 188, p. 19-24, 2012.
- VERMEULEN, E. T.; ASHWORTH, D. L.; ELDRIDGE, M. D.; POWER, M. L. Diversity of *Cryptosporidium* in brush-tailed rock-wallabies (*Petrogale penicillata*) managed within a species recovery programme. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, p. 190-196, 2015.
- WALSH, F. Human-Animal Bonds I: The relational significance of companion animals. **Family Process**, v. 48, n. 4, p. 462-480, 2009.
- WANG, L.; XUE, X.; LI, J.; ZHOU, Q.; YU, Y.; DU, A. Cryptosporidiosis in broiler chickens in Zhejiang Province, China: molecular characterization of oocysts detected in fecal samples. **Parasite**, v. 21, p. 36-44, 2014.
- WANG, R.; JIAN, F.; SUN, Y.; HU, Q.; ZHU, J.; WANG, F.; NING, C.; ZHANG, L.; XIAO, L. Large-scale survey of *Cryptosporidium* spp. in chickens and Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*) in Henan, China: prevalence and molecular characterization. **Avian Pathology**, v. 39, n. 6, p. 447-451, 2010.
- WELLS, D. L. Domestic dogs and human health: An overview. **British Journal of Health Psychology**, v. 12, p. 145-156, 2007.
- WELLS, D. L. The effects of animals on human health and well-being. **Journal of Social Issues**, v. 65, n. 3, p. 523-543, 2009.
- WILLARD, M. D.; BOULEY, D. Cryptosporidiosis, coccidiosis, and total colonic mucosal collapse in an immunosuppressed puppy. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 35, n. 5, p. 405-409, 1999.
- WILSON, R. B.; HOLSCHER, M. A.; LYLE, S. J. Cryptosporidiosis in a pup. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 183, n. 9, p. 1005-1006, 1983.
- XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 80-89, 2010.
- XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1239-1255, 2008.

XIAO, L.; RYAN, U. M. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 17, p. 483-490, 2004.

XIAO, L.; ESCALANTE, L.; YANG, C.; SULAIMAN, I.; ESCALANTE, A. A.; MONTALI, R. J.; FAYER, R.; LAL, A. A. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 1578-1583, 1999a.

XIAO, L.; MORGAN, U. M.; LIMOR, J.; ESCALANTE, A.; ARROWOOD, M.; SHULAW, W.; THOMPSON, R. C. A.; FAYER, R.; LAL, A. A. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3386-3391, 1999b.

XIAO, L.; LIMOR, J.; MORGAN, U. M.; SULAIMAN, I. M.; THOMPSON, R. A.; LAL, A. A. Sequence differences in the diagnostic target region of the oocyst wall protein gene of *Cryptosporidium* parasites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5499-5502, 2000.

XIAO, L.; BERN, C.; LIMOR, J.; SULAIMAN, I.; CABRERA, L.; GILMAN, R. H.; LAL, A. A. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 183, p. 492-497, 2001.

XIAO, L.; BERN, C.; ARROWOOD, M.; SULAIMAN, I.; ZHOU, L.; KAWAI, V.; VIVAR, A.; LAL, A. A.; GILMAN, R. H. Identification of the *Cryptosporidium* pig genotype in a human patient. **Journal of Infectious Disease**, v. 185, p. 1846-1848, 2002.

XIAO, L.; CAMA, V. A.; CABRERA, L.; ORTEGA, Y.; PEARSON, J.; GILMAN, R. H. Possible transmission of *Cryptosporidium canis* among children and a dog in a household. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 2014-2016, 2007.

XU, H.; JIN, Y.; WU, W.; LI, P.; WANG, L.; LI, N.; FENG, Y.; XIAO, L. Genotypes of *Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon bienersi* and *Giardia duodenalis* in dogs and cats in Shanghai, China. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 121, p. 1-9, 2016.

YANG, R.; YING, J. L. J.; MONIS, P.; RYAN, U. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* in cats (*Felis catus*) in Western Australia. **Experimental Parasitology**, v. 155, p. 13-18, 2015.

YANG, W.; CHEN, P.; VILLEGAS, E. N.; LANDY, R. B.; KANETSKY, C.; CAMA, V.; DEAREN, T.; SCHULTZ, C. L.; ORNDORFF, K. G.; PRELEWICZ, G. J.; BROWN, M. H.; YOUNG, K. R.; XIAO, L. *Cryptosporidium* source tracking in the Potomac River watershed. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 21, p. 6495-6504, 2008.

YIN, J. H.; YUAN, Z. Y.; CAI, H. X.; SHEN, Y. J.; JIANG Y. Y. ZHANG, J.; WANG, Y. J.; CAO, J. P. Age-related infection with *Cryptosporidium* species and genotype in pigs in China. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 26, n. 6, p. 492-495, 2013.

YOSHIUCHI, R.; MATSUBAYASHI, M.; KIMATA, I.; FURUYA, M.; TANI, H.; SASAI, K. Survey and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in owned

companion animal, dogs and cats, in Japan. **Veterinary Parasitology**, v. 174, p. 313-316, 2010.

ZAHEDI, A.; PAPANINI, A.; JIAN, F.; ROBERTSON, I.; RYAN, U. Public health significance of zoonotic *Cryptosporidium* species in wildlife: Critical insights into better drinking water management. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 5, p. 88-109, 2016.

ZEIBIG, E. A. **Parasitologia clínica: uma abordagem clínico-laboratorial**. - 1 ed. - Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 375 p.

ZHANG, S.; TAO, W.; LIU, C.; JIANG, Y.; WAN, Q.; LI, Q.; YANG, H.; LIN, Y.; LI, W. First report of *Cryptosporidium canis* in foxes (*Vulpes vulpes*) and raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) and identification of several novel subtype families for *Cryptosporidium* mink genotype in minks (*Mustela vison*) in China. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 41, p. 21-25, 2016a.

ZHANG, X.; CONG, W.; MA, J.; LOU, Z.; ZHENG, W.; ZHAO, Q.; ZHU, X. First report of *Cryptosporidium canis* in farmed Arctic foxes (*Vulpes lagopus*) in China. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 126, p. 1-4, 2016b.

ZHOU, L.; KASSA, H.; TISCHLER, M. L.; XIAO, L. Host-Adapted *Cryptosporidium* spp. in Canada geese (*Branta canadensis*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 7, p. 4211-4215, 2004.

## 8 ANEXOS

**Anexo A.** Resultados da pesquisa de amostras fecais de cães domiciliados em Campo Grande, Rio de Janeiro.

AMOSTRA	SEXO	RAÇA	IDADE	DIARREIA	RESULTADO DE EXAME PARASITOLÓGICO DE FEZES
01	F	SRD	3 anos	Presente	Ancylostomatidae
02	M	SRD	5 anos e 3 meses	Ausente	Negativo
03	M	SRD	7 anos	Ausente	Negativo
04	M	SRD	10 anos	Ausente	<i>Toxocara canis</i>
05	M	SRD	8 anos	Ausente	Negativo
06	M	SRD	6 meses	Ausente	<i>Giardia intestinalis</i> e Ancylostomatidae
07	M	Pastor Alemão	4 anos	Presente	<i>Cystoisospora</i> spp.
08	M	SRD	3 anos	Ausente	Negativo
09	M	Rottweiler	6 anos	Presente	<i>Cystoisospora</i> spp. e Ancylostomatidae
10	F	Rottweiler	10 anos	Presente	<i>Cystoisospora</i> spp.
11	M	SRD	4 anos	Presente	Negativo
12	F	SRD	12 anos	Ausente	Ancylostomatidae
13	F	Pinscher	7 anos	Ausente	<i>Toxocara canis</i>
14	M	SRD	2 anos e 6 meses	Presente	<i>Giardia intestinalis</i> e <i>Cystoisospora</i> spp.
15	M	SRD	10 meses	Presente	<i>Cystoisospora</i> spp.
16	M	SRD	13 anos	Ausente	<i>Trichuris vulpis</i> e Ancylostomatidae
17	M	SRD	3 anos	Ausente	<i>Cryptosporidium</i> spp.
18	F	SRD	6 anos e 7 meses	Ausente	<i>Toxocara canis</i>
19	F	SRD	8 anos	Ausente	<i>Giardia intestinalis</i>
20	F	SRD	10 meses	Presente	<i>Cystoisospora</i> spp.
21	M	Labrador	7 anos e meio	Presente	Ancylostomatidae e <i>Toxocara canis</i>
22	F	SRD	6 meses	Presente	Ancylostomatidae e <i>Cystoisospora</i> spp.
23	M	SRD	5 anos	Presente	<i>Giardia intestinalis</i>
24	M	SRD	3 anos e 3 meses	Ausente	<i>Toxocara canis</i>
25	F	Rottweiler	4 anos	Ausente	<i>Toxocara canis</i>
26	M	Pastor Alemão	7 anos	Ausente	<i>Giardia intestinalis</i>
27	M	SRD	9 meses	Presente	<i>Cystoisospora</i> spp.
28	M	SRD	5 anos	Ausente	<i>Cryptosporidium</i> spp.
29	F	Dachshund	5 anos	Ausente	Negativo
30	F	SRD	3 anos	Ausente	Negativo
31	M	Dachshund	4 anos	Presente	<i>Dipylidium caninum</i>
32	M	SRD	1 ano	Presente	<i>Cystoisospora</i> spp.

\* F: Feminino; M: Masculino; SRD: Sem Raça Definida.

**Anexo A.** Resultados da pesquisa de amostras fecais de cães domiciliados em Campo Grande, Rio de Janeiro (Continuação).

AMOSTRA	SEXO	RAÇA	IDADE	DIARREIA	RESULTADO DE EXAME PARASITOLÓGICO DE FEZES
33	M	Pinscher	8 anos	Ausente	Negativo
34	M	SRD	3 anos	Presente	<i>Cystoisospora</i> spp.
35	F	Pastor Alemão	11 anos	Ausente	Negativo
36	M	SRD	2 anos e 7 meses	Ausente	Negativo
37	F	SRD	5 anos	Presente	<i>Cystoisospora</i> spp.
38	F	SRD	9 anos	Ausente	Negativo
39	F	SRD	3 anos e meio	Ausente	<i>Cystoisospora</i> spp.
40	M	SRD	9 anos	Ausente	Negativo
41	F	SRD	12 anos	Presente	<i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Dipylidium caninum</i>
42	M	SRD	2 anos	Ausente	<i>Cystoisospora</i> spp.
43	F	Pastor Alemão	1 ano e meio	Presente	Ancylostomatidae
44	M	SRD	5 anos	Ausente	<i>Giardia intestinalis</i>
45	M	SRD	2 anos	Ausente	Negativo
46	F	SRD	7 anos e 3 meses	Ausente	Negativo
47	M	Pastor Alemão	4 anos	Presente	<i>Giardia intestinalis</i>
48	M	Labrador	3 anos	Ausente	<i>Cryptosporidium</i> spp.
49	F	SRD	11 anos	Ausente	Negativo
50	F	SRD	2 anos	Ausente	Negativo
51	M	SRD	5 anos	Presente	<i>Cystoisospora</i> spp.
52	M	Dachshund	8 anos	Ausente	Negativo
53	F	SRD	7 anos	Presente	Negativo
54	F	Beagle	5 anos e 8 meses	Ausente	Negativo
55	M	SRD	3 anos	Ausente	<i>Dipylidium caninum</i>
56	M	SRD	10 anos	Presente	<i>Giardia intestinalis</i>
57	M	SRD	5 anos	Ausente	<i>Cryptosporidium</i> spp.
58	M	Pastor Alemão	11 anos	Ausente	Negativo
59	M	SRD	8 anos	Ausente	<i>Cystoisospora</i> spp.
60	F	SRD	6 anos e meio	Ausente	<i>Cystoisospora</i> spp.
61	M	SRD	8 anos	Ausente	Negativo
62	M	Pinscher	6 anos	Presente	<i>Giardia intestinalis</i>
63	F	SRD	2 anos	Ausente	Negativo
64	F	Rottweiler	6 anos	Ausente	Negativo

\* F: Feminino; M: Masculino; SRD: Sem Raça Definida.



**Anexo B.** Resultados da pesquisa de amostras fecais de gatos domiciliados em Campo Grande, Rio de Janeiro.

AMOSTRA	SEXO	RAÇA	IDADE	DIARREIA	RESULTADO DE EXAME PARASITOLÓGICO DE FEZES
01	M	SRD	3 anos	Presente	<i>Cystoisospora</i> spp. e Ancylostomatidae
02	M	SRD	1 ano	Ausente	Negativo
03	M	SRD	4 anos	Ausente	Negativo
04	F	SRD	7 anos e meio	Presente	Negativo
05	M	SRD	10 anos	Presente	Ancylostomatidae e <i>Toxocara cati</i>
06	M	SRD	3 anos	Ausente	Negativo
07	F	Angorá	8 anos	Ausente	Negativo
08	M	SRD	6 anos	Ausente	Negativo
09	M	SRD	2 anos e meio	Ausente	<i>Toxocara cati</i>
10	M	SRD	5 anos	Ausente	Negativo
11	F	SRD	1 ano e 4 meses	Ausente	Negativo
12	M	SRD	3 meses	Presente	<i>Cryptosporidium</i> spp.
13	M	SRD	3 meses	Presente	<i>Cryptosporidium</i> spp.
14	M	SRD	3 meses	Presente	<i>Cryptosporidium</i> spp.
15	M	Siamês	10 anos	Ausente	Negativo
16	F	SRD	3 anos e meio	Ausente	Negativo
17	F	Angorá	5 anos	Ausente	Negativo
18	F	SRD	10 anos	Ausente	Negativo
19	F	SRD	8 anos	Presente	<i>Giardia intestinalis</i>
20	M	SRD	3 anos	Ausente	Negativo
21	M	SRD	4 anos	Ausente	Negativo
22	M	SRD	7 anos	Ausente	Negativo
23	M	SRD	1 ano e meio	Ausente	Negativo
24	M	SRD	8 meses	Presente	<i>Cystoisospora</i> spp.
25	M	SRD	4 anos	Ausente	Negativo
26	M	SRD	9 anos	Ausente	Negativo
27	F	Siamês	5 anos	Ausente	Ancylostomatidae
28	M	SRD	4 anos e 3 meses	Ausente	Negativo
29	F	SRD	6 anos	Presente	<i>Giardia intestinalis</i> e <i>Cystoisospora</i> spp.
30	M	SRD	3 anos	Ausente	Negativo
31	M	SRD	5 meses	Presente	<i>Cystoisospora</i> spp.
32	F	SRD	3 anos	Ausente	Negativo
33	F	SRD	10 anos	Presente	Negativo
34	F	SRD	4 anos	Ausente	<i>Toxocara cati</i>
35	F	SRD	2 anos e 3 meses	Ausente	Negativo

\* F: Feminino; M: Masculino; SRD: Sem Raça Definida.

**Anexo B.** Resultados da pesquisa de amostras fecais de gatos domiciliados em Campo Grande, Rio de Janeiro (Continuação).

AMOSTRA	SEXO	RAÇA	IDADE	DIARREIA	RESULTADO DE EXAME PARASITOLÓGICO DE FEZES
36	M	Angorá	3 anos	Ausente	Negativo
37	M	SRD	7 anos	Ausente	Negativo
38	M	SRD	5 anos	Presente	Negativo
39	M	SRD	3 anos	Ausente	Negativo
40	M	SRD	8 meses	Ausente	Negativo
41	M	SRD	2 anos	Presente	<i>Cystoisospora</i> spp. e Ancylostomatidae
42	M	SRD	4 anos	Ausente	Negativo
43	M	SRD	2 anos	Ausente	Ancylostomatidae
44	F	Persa	10 anos	Ausente	Negativo
45	F	SRD	1 ano e 5 meses	Ausente	Negativo
46	F	SRD	8 anos	Ausente	Negativo
47	F	SRD	3 anos	Ausente	Negativo
48	M	Persa	6 anos e 4 meses	Ausente	Negativo
49	M	SRD	5 anos	Presente	<i>Giardia intestinalis</i> e <i>Cystoisospora</i> spp.
50	M	SRD	9 anos	Presente	Negativo
51	M	SRD	1 ano	Ausente	Negativo
52	M	SRD	2 anos e 3 meses	Ausente	Negativo
53	F	SRD	11 meses	Ausente	<i>Giardia intestinalis</i>
54	F	SRD	4 anos e 3 meses	Presente	<i>Giardia intestinalis</i> e <i>Cystoisospora</i> spp.
55	F	SRD	8 anos	Ausente	Negativo

\* F: Feminino; M: Masculino; SRD: Sem Raça Definida.



Seropédica 14 de junho de 2017

## ALTERAÇÃO DE TÍTULO

Declaramos para os devidos fins que aprovada a solicitação de alteração de título do projeto CEUA N° 070/2014 de **“Giardia intestinalis em amostras fecais de cães e gatos domiciliados: Avaliação microscópica, imunológica e molecular”** para **“ Parasitas gastrointestinais em amostras fecais de cães e gatos domiciliados: Avaliação microscópica, imunológica e molecular”**, encaminhado pelo Professor (a) do Departamento de Parasitologia Animal, Teresa Cristina Bergamo do Bomfim. Informamos que foi aprovado em reunião ordinária da CEUA-IV realizada no dia 14 de junho de 2017, após avaliação do plenário da referida Comissão.

Fabio Barbour Scott  
Coordenador CEUA-IV

Jonimar Pereira Paiva  
Vice-Coordenador CEUA-IV