



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA
DOUTORADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA

DARLENE KÁSSIA SARAIVA QUEIROZ PANTOJA

***Cryptosporidium* spp. (Tyzzer, 1907) E *Giardia* spp. (Leeuwenhoek, 1681) EM
MAMÍFEROS SILVESTRES DO ESTADO DO PARÁ, BRASIL**

BELÉM

2018

DARLENE KÁSSIA SARAIVA QUEIROZ PANTOJA

***Cryptosporidium* spp. (Tyzzer, 1907) E *Giardia* spp. (Leeuwenhoek, 1681) EM
MAMÍFEROS SILVESTRES DO ESTADO DO PARÁ, BRASIL**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do curso de Doutorado em Saúde e Produção Animal na Amazônia: área de concentração Sanidade e Produção Animal, para obtenção de título de doutor.

Orientador: Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira.

Co-orientadora: Dra. Mônica Cristina de Moraes Silva.

BELÉM

2018

Pantoja, Darlene Kássia Saraiva Queiroz

Cryptosporidium spp. (Tyzzer, 1907) e *Giardia* spp. (Leeuwenhoek, 1681) em mamíferos silvestres do estado do Pará, Brasil / Darlene Kássia Saraiva Queiroz Pantoja. – Belém, 2018.

94 f.

Tese (Doutorado em Saúde e Produção Animal na Amazônia: área de concentração Sanidade e Produção Animal) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2018.

Orientador: Dr. Washington Luiz Assunção Pereira.

1. Protozoa – Pará 2. Cryptosporidium spp. 3. *Giardia* spp. 4. Enteroprotzoário - Mamíferos silvestres I. Pereira, Washington Luiz Assunção (orient.) II. Título.

CDD – 579.4098115

DARLENE KÁSSIA SARAIVA QUEIROZ PANTOJA

***Cryptosporidium* spp. (Tyzzer, 1907) E *Giardia* spp. (Leeuwenhoek, 1681) EM
MAMÍFEROS SILVESTRES DO ESTADO DO PARÁ, BRASIL**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do curso de Doutorado em Saúde e Produção Animal na Amazônia: área de concentração Sanidade e Produção Animal, para obtenção de Título de Doutor.
Orientador: Prof^o. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira
Co-orientadora: Dra. Mônica Cristina de Moraes Silva.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira - Orientador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA

Prof^a. Dra. Maria Vivina Barros Monteiro - 1º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ - UFPA

Prof^o. Dr. Ednaldo da Silva Filho - 2º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA

Prof^a. Dra. Elane Guerreiro Giese - 3º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA

Prof^o. Dr. Raimundo Nonato Moraes Benigno - 4º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA

Prof^a. Dra. Ana Silvia Sardinha Ribeiro - 1º Suplente
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA

Prof^a. Dra. Fernanda Figueiredo Mendes - 2º Suplente
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA

AGRADECIMENTOS

Primariamente à Deus, por ser o meu socorro presente nas tribulações, por sua infinita misericórdia, por me abençoar e por me amar de uma maneira inexplicável.

À minha família, em especial a minha amada mãe, Maria de Nazaré Saraiva Queiroz por seu amor, dedicação, ensinamentos passados, por ser meu porto seguro em todos os momentos da minha vida e por todos os seus dias de oração por mim.

Ao meu marido Pedro Murilo Moreira Pantoja, por todo seu amor, dedicação, carinho, atenção por mim dedicados durante estes quase treze anos de convívio, ao qual divido as minhas conquistas e também a toda sua família, em especial à minha querida sogrinha Helena Vitória da Mota Moreira, que é um presente de Deus para mim.

Às minhas irmãs de sangue Dayse Queiroz e Denise Queiroz, às minhas irmãs de coração Victória, Aline Gomes e Aline Palestina que estão sempre à disposição para me ajudar em qualquer momento da minha vida e que oram sempre por mim.

Aos amigos que torceram e que me ajudaram de alguma forma a chegar nesta conquista.

Ao meu querido orientador Dr. Washington Luiz Assunção Pereira por sua dedicação, paciência e atenção a mim prestadas não só durante os anos do doutorado, mas também durante o mestrado e vida acadêmica, sempre atencioso e disponível nos momentos que precisei.

À Dra. Mônica Cristina de Moraes Silva por sua co-orientação, ensinamentos e pelo apoio em toda a minha pesquisa sem medir esforços para a melhoria do meu trabalho.

Às estagiárias mais queridas do Instituto Evandro Chagas, Alana Luanni, Daiane Brito e Thais Chaves por toda dedicação e esforço no auxílio do desenvolvimento prático laboratorial da pesquisa.

À querida técnica do Laboratório de Enteroparasitoses do Instituto Evandro Chagas e Biomédica Heyde Tavares, por ter sido bastante receptiva e que me apoiou grandemente na realização diagnóstica do trabalho aqui apresentado, por todos os ensinamentos passados e dedicação no meu trabalho.

Ao meu amigo Paulo Paiva por toda a ajuda em relação à língua inglesa.

A toda a turma do Labopat por sua disponibilidade, apoio e dedicação nos dias de coleta.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia da UFRA aos quais tenho uma imensa gratidão e admiração e que cooperaram para a minha concepção profissional e ética.

Aos professores membro da banca ao qual fico honrada por participarem da minha defesa, Prof^ª. Dra. Maria Vivina Barros Monteiro, Prof. Dr. Ednaldo da Silva Filho, Prof^ª. Dra. Elane

Guerreiro Giese, Prof. Dr. Raimundo Nonato Moraes Benigno e aos queridos suplentes Prof^ª. Dra. Ana Silvia Sardinha Ribeiro e Prof^ª. Dra. Fernanda Figueiredo Mendes.

A todos que de alguma forma me auxiliaram na coleta de material para este trabalho, Patrícia Andréia, Ellen, Juliana, Thaís, Dr. Messias, Geiciane, Dr. Jayro, Marcella, Laura, Fernanda, Dra. Mônica, Gilberto, Henrique, Prof^ª. Ana Sílvia e Prof. Frederico.

Aos animais que Deus criou e que passei a amar e respeitar ainda quando criança, aos quais eu tenho grande admiração e amor, especialmente à minha filha de quatro patas Amora ao qual eu tenho um amor infinito.

Ao Mestre dos mestres, pois acredito que Deus jamais plantaria no meu coração sonhos pelos quais eu não conseguiria realizar.

DEDICO

“Disse também Deus: Produza a terra seres viventes, conforme a sua espécie: animais domésticos, répteis e animais selváticos, segundo a sua espécie. E assim se fez. E fez Deus os animais selváticos, segundo a sua espécie, e os animais domésticos, conforme a sua espécie, e todos os répteis da terra, conforme a sua espécie. E VIU DEUS QUE ISSO ERA BOM”.

(GÊNESIS 1: 24-25).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossomal
RNA	Ácido ribonucleico
A	Adenina
AT	Adenina-Timina
AAT	Adenina-Adenina-Timina
ATP	Adenosina trifosfato
BPA	Batalhão da Polícia Ambiental
ICZN	Código Internacional de Nomenclatura Zoológica
CEUA	Comitê de Ética de Uso Animal
ELISA	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
EUA	Estados Unidos da América
GDH	Glutamase desidrogenase
G	Gramma
HE	Hematoxilina-eosina
IgM	Imunoglobulina M
IMS	Immunomagnetic separation
FA	Immunofluorescence assay
IEC	Instituto Evandro Chagas
LABOPAT	Laboratório de Patologia Animal
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
N	Número
PA	Pará
pb	Pares de bases
RFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição
pH	Potencial Hidrogênico
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
RS	Rio Grande do Sul

Rpm	rotações por minuto
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SSU	Subunidade Ribossomal
TPI	Triose phosphate isomerase
UFRA	Universidade Federal Rural da Amazônia
SIV	Vírus da Imunodeficiência Símia
ZNm	Ziehl-Neelsen modificado
ZOOUNAMA	Zoológico da Universidade da Amazônia

RESUMO

PANTOJA, D. K. S. Q. *Cryptosporidium* spp. (Tyzzer, 1907) e *Giardia* spp. (Leeuwenhoek, 1681) em mamíferos silvestres do Estado do Pará, Brasil. 2018. 97 f. Tese (Doutorado em Saúde e Produção Animal na Amazônia, Universidade Federal Rural da Amazônia, 2018).

As enteroparasitoses zoonóticas representam importante problema de saúde pública, ao qual espécies de protozoários como *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. podem atingir elevadas frequências em regiões em que as condições de saneamento básico são precárias, promovendo surtos de diarreia em animais domésticos, homens e animais silvestres. Esses agentes são protozoários de fácil transmissão que apresentam diversas espécies patogênicas para vários tipos de hospedeiros. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em diversas espécies de mamíferos silvestres no Estado do Pará, Amazônia, Brasil. Amostras fecais de 140 animais distintos (seis de vida livre e 134 de cativeiros) foram coletadas em seis municípios do Estado do Pará. Para pesquisa de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., foram utilizados os métodos direto e Kinyoun, respectivamente, e um teste imunológico comercial (RIDA[®]QUICK *Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba* Combi N1722) para detecção de antígenos de ambos os parasitas. *Cryptosporidium* spp. foi detectado em 9,28% (13/140) das amostras, sendo dois de animais de vida livre e 11 de cativeiros. *Giardia* spp. foi encontrada em 10% (14/140) das amostras, sendo um de animal de vida livre e 13 de cativeiros. Apenas um animal apresentou infecção concomitante para os agentes. Os resultados encontrados evidenciam que há ocorrência do *Cryptosporidium* spp. e da *Giardia* spp. em mamíferos silvestres na região amazônica correspondente ao Estado do Pará, possivelmente participando como mantenedores e disseminadores dos agentes infecciosos para o meio ambiente e outros hospedeiros, destacando-se que pouco se sabe sobre o verdadeiro papel desses mamíferos na disseminação como também na manutenção de tais agentes zoonóticos.

Palavras chave: Zoonoses. *Cryptosporidium* spp. *Giardia* spp. Enteroprotzoários. Silvestres. Amazônia.

ABSTRACT

PANTOJA, D. K. S. Q. *Cryptosporidium* spp. (Tyzzer, 1907) and *Giardia* spp. (Leeuwenhoek, 1681) in wild mammals in the Estado do Pará, Brasil. 2018. 97 f. Thesis (Doctorate degree in Health and Animal Breeding in Amazônia, Federal Rural University of Amazon, 2018).

Zoonotic enteric parasites have been a huge problem in public health, due to the presence of high and frequent levels of protozoa as *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. noticed in regions where basic sanitation are precarious, causing outbreaks of diarrhea in human beings, wild and domestic animals. These infective agents are protozoa that present several pathogenic species easily transmitted to many types of hosts. The present survey objective was to evaluate the occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in several species of wild mammals in the State of Pará, Amazonia, Brasil. Samples of feces from 140 individual wild animals (six in their natural habitat and 134 raised in captivity) were collected in six different rural municipalities in the State of Pará. The research for *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., were respectively done through direct and Kinyoun methods besides the routine immunological exams (RIDA®QUICK *Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba* Combi N1722) under the proposal to detect antigens for both parasites. *Cryptosporidium* spp. was detected in 9,28% (13/140) of the samples, being present in two samples from animals in their natural habitat and 11 in captivity. *Giardia* spp. was present in 10% (14/140) of the samples, being present in one animal in their natural habitat and 13 raised in captivity. Only one animal was infected by both protozoa at the same time. The results indicate the presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in wild mammals in the Amazon region in the State of Pará, possibly taking place as keepers and as disseminators of these infective agents to the environment and to some other hosts, what shows that the real contribution of these mammals on the dissemination and also maintenance of these cited zoonotic infective agents, have not been clearly known.

Keywords: Zoonosis. *Cryptosporidium* spp. *Giardia* spp. Enteroprotazoals. Wild. Amazon.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 CONTEXTUALIZAÇÃO.....	15
2.1 Generalidades: animais silvestres e as infecções por protozoários.....	15
2.2 <i>Cryptosporidium</i>.....	16
2.2.1 Histórico.....	18
2.2.2 Morfologia.....	18
2.2.3 Ciclo biológico.....	19
2.2.4 Transmissão de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	22
2.2.4.1 Transmissão zoonótica.....	22
2.2.4.2 Transmissão por água e alimentos.....	23
2.2.5 Patogênese.....	24
2.3 Criptosporidiose.....	26
2.3.1 Sinais clínicos.....	26
2.3.2 Diagnóstico.....	27
2.3.3 Epidemiologia.....	30
2.4 <i>Giardia</i>.....	32
2.4.1 Histórico.....	34
2.4.2 Morfologia.....	34
2.4.3 Ciclo biológico.....	35
2.4.4 Transmissão da <i>Giardia</i> spp.....	37
2.4.5 Patogênese.....	37
2.5 Giardíase.....	39
2.5.1 Sinais clínicos.....	39
2.5.2 Diagnóstico.....	40
2.5.3 Epidemiologia.....	42
3 REFERÊNCIAS.....	45
4 CAPÍTULO I.....	57
5 CAPÍTULO II.....	63
6 CAPÍTULO III.....	77
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	93

1 INTRODUÇÃO

As mudanças ambientais decorrentes de fenômenos naturais ou produzidas pela intervenção antrópica, imprimem grande influência na proliferação e no aparecimento de doenças parasitárias zoonóticas tais como a criptosporidiose e a giardíase (LALLO et al., 2009).

A criptosporidiose é causada por *Cryptosporidium* spp., e é uma doença de ampla distribuição geográfica, encontrada em várias espécies de animais (FERREIRA; BORGES, 2002), incluindo o homem (PEREIRA et al., 2009), promove gastroenterite moderada a severa e sua transmissão ocorre pela ingestão de oocistos do protozoário (GARRIDO, 2003).

Cryptosporidium, que significa “esporo escondido”, pertence à classe Sporozoa e à subordem Eimeriorina, ou coccídios verdadeiros (WYNGAARDEN et al., 1993). É um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, sendo o único Coccidium representante da família Cryptosporidiidae (FAYER; SANTÍN, 2009).

A giardíase é causada por *Giardia* spp., protozoário flagelado que apresenta um ciclo de vida direto. A transmissão ocorre especialmente pela ingestão de água contaminada com cistos do parasita, causando enterites no homem e nos animais (THOMPSON, 2000), como cães e gatos e em espécies de mamíferos silvestres (THOMPSON, 2004).

De acordo com a classificação taxonômica, a *Giardia* spp. pertence ao filo Metamonada, subfilo Trichozoa, superclasse Eopharyngia, classe Trepomonadea, subclasse Diplozoa, ordem Giardiida e família Giardiidae (PLUTZER; ONGERTH; KARANIS, 2010).

As ocorrências do *Cryptosporidium* spp. e da *Giardia* spp. em mamíferos silvestres encontradas na literatura são bastante variáveis, não estando esclarecido se tais variações estão relacionadas às espécies envolvidas, localização geográfica, preferências alimentares dos hospedeiros, sazonalidade ou se seriam resultados das técnicas de amostragens e diagnósticos utilizadas (APPELBEE et al., 2005). Sabe-se, no entanto, que mudanças em condições ambientais, podem influenciar a dinâmica das relações entre parasito e hospedeiros, facilitando o trânsito e a capacidade de adaptação dos micro-organismos (MANGINI; SILVA, 2007).

Com relação a transmissão desses agentes por animais silvestres, estudos destacam que zoológicos são considerados grandes fontes de conhecimento para o homem, gerando também interação com a natureza, porém a grande concentração de diferentes espécies de animais em um pequeno espaço e o contato com o homem, predispõe o surgimento e disseminação das doenças zoonóticas (CABRAL et al., 2001).

Com relação à conservação das espécies, a saúde animal é um dos pontos primordiais, sendo relevante o estudo das enteroparasitoses e suas implicações na compreensão do estado

atual da mesma, incluindo a saúde humana e ambiental, além de auxiliar no entendimento do papel exercido pelos animais na propagação dos agentes parasitários (ARAÚJO, 2014).

Estudos recentes descrevem o crescimento do número de casos de enteroparasitoses em vários hospedeiros envolvendo o *Cryptosporidium* spp. e a *Giardia* spp. que são responsáveis por duas das mais graves doenças/agentes veiculadas pela água, o que evidencia, portanto, a necessidade do desenvolvimento de estudos epidemiológicos sobre estes agentes nos animais silvestres, pois pouco se sabe sobre o envolvimento desses na transmissão dos agentes aqui estudados. Nesse sentido, o presente trabalho teve por objetivo investigar a ocorrência e a caracterização molecular desses enteroprotazoários, em fezes de mamíferos silvestres no estado do Pará, Amazônia, Brasil, gerando informações epidemiológicas que possam contribuir para futuros estudos sobre a saúde única, que abrange meio ambiente, homens e animais, já que estudos evidenciam que esses animais podem estar contribuindo ativamente na cadeia epidemiológica de muitas doenças, servindo como mantenedores e disseminadores de agentes infecciosos para o meio ambiente e para outros hospedeiros.

2 CONTEXTUALIZAÇÃO

2.1 Generalidades: animais silvestres e as infecções por protozoários

As alterações ambientais geradas pelo homem, podem criar condições favoráveis à disseminação de doenças, incluindo as zoonoses parasitárias (PATZ et al., 2000). Lallo et al. (2009), também enfatizaram que a ocorrência de mudanças ambientais, exerce grande influência na proliferação e no surgimento de doenças parasitárias zoonóticas, entre elas a malária, leishmaniose, criptosporidiose, giardíase, tripanossomíase e esquistossomose, sendo que essas mudanças ambientais podem levar a alterações no equilíbrio ecológico e conseqüentemente, à ocorrência de agentes patogênicos em seus hospedeiros silvestres e vetores.

A ocupação de áreas de florestais, com habitações humanas em áreas anteriormente habitadas por animais selvagens, tem gerado a destruição de abrigos de diferentes espécies silvestres, promovendo também a redução de suas fontes alimentares (PAULO, 2011). Como consequência dos danos gerados ao ecossistema, algumas espécies silvestres que sobrevivem acabam se aproximando das residências, cujas moradias passam a servir de locais de busca de alimentos para espécies que apresentam potencial de abrigar agentes zoonótico, pondo assim em risco a saúde do homem (CIPOLLO; DIAS, 2012).

Os animais silvestres pertencentes à fauna brasileira podem estar localizados na natureza, ou seja, são classificados como animais de vida livre, ou de cativeiro, vivendo em parques zoológicos, criatórios conservacionistas, científicos ou comerciais, institutos de pesquisa, centros de triagem e reabilitação. No entanto, independente do ambiente, esses animais podem ser considerados reservatórios de agentes zoonóticos (SILVA, 2004).

Infecções por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. têm sido descritas em uma grande variedade de animais silvestres, tanto nos de vida livre como nos de cativeiros em todo o mundo, especialmente em mamíferos (APPELBEE et al., 2005; FENG, 2010). Pesquisadores observaram que algumas espécies silvestres ou grupos são mais sensíveis às infecções pelos protozoários, manifestando sinais clínicos mesmo quando são adultos e imunocompetentes (SAMUEL et al., 2001).

Outros estudos mostraram que animais silvestres mantidos em cativeiros, apresentam elevados níveis de estresse, sendo esse um dos fatores principais para a condição de transmissão de doenças entre os animais que estão no mesmo ambiente, pois a ocorrência do estresse gera imunossupressão nos mesmos (MARVULO, 2007). Feng (2010), também descreve que o

ambiente de cativeiro propicia a transmissão cruzada de *Cryptosporidium* spp. entre diferentes espécies hospedeiras.

A pesquisa de agentes parasitários em animais silvestres de vida livre tem sido descrita em todo o mundo, porém, em decorrência da diversidade de espécies animais, tais estudos são ainda incipientes (LALLO et al., 2009).

A criptosporidiose também já foi descrita em roedores silvestres, sugerindo que esses pequenos mamíferos podem ser reservatórios do agente devido à ausência de especificidade para o hospedeiro (SINSKI et al., 1998).

Dall'Olio e Franco (2004), encontraram oocistos de *Cryptosporidium muris* e *Cryptosporidium parvum* nas fezes de pequenos mamíferos silvestres, sugerindo que eles podem atuar como reservatórios e contribuir para a contaminação dos cursos das águas e a infecção de outros animais, entre eles os mamíferos invasores, inclusive o homem. De acordo com Didier et al. (2004) a espécie *C. parvum* tem sido responsabilizada pela maioria das infecções descritas em seres humanos e em mamíferos.

Estima-se que aproximadamente 5% dos coelhos selvagens do mundo estejam infectados com o gênero *Cryptosporidium*, especialmente *Cryptosporidium cuniculus*, porém tanto os coelhos selvagens como os domésticos são considerados fontes potenciais da infecção para o homem, sendo esses animais os únicos hospedeiros conhecidos desta espécie. Além do *C. cuniculus*, os coelhos também podem se infectar com as espécies *C. parvum* e *C. meleagridis*, ao qual todas são consideradas patógenos humanos (DUSZYNSKI; COUCH, 2013).

A importância dos animais silvestres na epidemiologia da giardíase ainda é desconhecida, apesar de estudos moleculares indicarem que esses animais podem representar fontes de infecção para o homem (SULAIMAN et al., 2003). Soares et al. (2008), destacaram que o potencial zoonótico de protozoários a partir de hospedeiros silvestres é pouco estudado no Brasil.

2.2 *Cryptosporidium*

Parasitas do gênero *Cryptosporidium* possuem grande capacidade de reprodução e disseminação, apresentando várias espécies conhecidas por infectar diferentes espécies de animais (GRAAF et al., 1999). Apresenta um ciclo biológico direto com uma forma encistada fora do hospedeiro (oocisto), não possuindo um meio óbvio de locomoção como cílios ou flagelos, sendo esta, uma das características do seu filo (JONES et al., 1997).

O gênero *Cryptosporidium* possui 21 espécies e aproximadamente 40 genótipos, tendo

numerosos vertebrados como hospedeiros (FAYER; SANTÍN, 2009).

Em humanos, as espécies identificadas como responsáveis pela criptosporidiose são *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis* e *C. canis*. As mais frequentes são *C. hominis* e *C. parvum* (CAMA, 2008).

A utilização de técnicas moleculares permitiu distinguir diferenças na estrutura de alguns componentes dos esporozoítos dentro dos oocistos, como enzimas e ácidos nucleicos, que possibilitaram a separação de vários genótipos de *C. parvum*, espécie mais patogênica e com maior frequência nas infecções humanas (NEVES, 2005).

O estudo do genoma completo de *C. parvum* trouxe novos aspectos da biologia e da evolução dos parasitos Apicomplexa (KEELING, 2004). A análise filogenética da pequena subunidade ribossomal do ácido ribonucleico (RNA) (SSU RNA) permite verificar diferenças entre as espécies de *Cryptosporidium*. Análises da sequência de ácido desoxirribonucleico (DNA) revelam repetições sucessivas de mono, di e trinucleotídeos de A, AT e AAT, refletindo a grande quantidade de nucleotídeos AT no genoma de parasitos dessa espécie (FENG et al., 2000).

No Brasil, pouco se sabe sobre criptosporidiose em animais silvestres, ao qual o difícil acesso ao habitat natural, a restrição promovida pelos órgãos ambientais e a dificuldade de manuseio dos animais, são alguns dos fatores limitantes para o crescimento de pesquisas relacionadas ao *Cryptosporidium* spp. (SILVA et al., 2008).

Estudos em área serrana do Sudeste brasileiro, relatam a ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp. em pequenos mamíferos silvestres e roedores das espécies *Akodon serrensis* e *Oryzomys ratticeps* (DALL'OLIO; FRANCO, 2004), evidenciando que este gênero de parasito apresenta grande número de hospedeiros tanto domésticos como silvestres (SOARES et al., 2008).

De acordo com os estudos moleculares, dois genótipos são mais comumente encontrados em humanos: o genótipo humano (ou tipo I) reconhecido como *C. hominis* e o genótipo bovino (ou tipo II) *C. parvum* (MONIS; THOMPSON, 2003). Estudos sugeriram a classificação do *C. parvum* como uma nova espécie chamada de *C. pestis*, assim como a de um genótipo semelhante ao *C. hominis*, como sendo *C. cuniculus*, tendo como hospedeiros o coelho selvagem *Oryctolagus cuniculus* e o homem (ROBINSON et al., 2010; SLAPETA, 2011).

2.2.1 Histórico

Cryptosporidium foi observado pela primeira vez nos Estados Unidos (EUA) em 1907 por Tyzzer, no tubo digestivo de camundongos de laboratório; em 1955 foi encontrado em perus *Meleagris gallopavo* e em 1971 em bezerros *Bos taurus*, relatado como causador de doença diarreica e óbito dos animais, isso após anos sem avanços nos estudos de tal agente, pois o *Cryptosporidium* spp. era considerado um protozoário de pouca importância clínica e econômica (ALMEIDA, 2004; LINDSAY; BLAGBURN, 2008).

Tyzzer descreveu o gênero *Cryptosporidium* para designar um pequeno coccídeo encontrado nas glândulas gástricas de camundongos, que recebeu o nome de *C. muris* e, em 1911, o mesmo pesquisador encontrou outra espécie, menor do que a primeira, localizada no intestino delgado também de camundongos, e a descreveu como *C. parvum* (NEVES, 2005).

Durante os anos seguintes várias novas espécies foram descritas por diferentes autores baseando-se na ideia de que o parasito fosse espécie-específico (XIAO; CAMA, 2006).

Os primeiros casos de criptosporidiose em humanos foram relatados no ano de 1976. O primeiro em uma criança de três anos de idade residente em uma zona rural nos EUA (NIME et al., 1976). O segundo caso foi em um adulto imunodeprimido também nos EUA que foi diagnosticado por biópsia intestinal e retal (MEISEL et al., 1976). A doença só passou a ter importância a partir de 1980 com o surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (SMITH; ROSE, 1998).

2.2.2 Morfologia

Cryptosporidium spp. são coccídios minúsculos com seus oocistos contendo um diâmetro de 4 a 8 µm, dependendo da espécie e da fase de desenvolvimento (BOWMAN et al., 2004). Apresenta diferentes formas estruturais que podem ser encontradas nos tecidos (formas endógenas), nas fezes e no meio ambiente (oocistos). Os oocistos são pequenos, esféricos ou ovóides com cerca de 5,0 x 4,5 µm (*C. parvum*), e 7,4 x 5,6 µm (*C. muris*) e contêm quatro esporozoítos livres no seu interior quando eliminados nas fezes (NEVES, 2005). Os esporozoítos são elípticos, achatados, sem flagelos, porém móveis que sofrem excitação no tubo intestinal do hospedeiro após a dissolução da parede externa do oocisto (WYNGAARDEN et al., 1993).

Os oocistos possuem um corpo residual composto por grânulos e os estágios endógenos possuem organela de adesão. A parede dos oocistos é lisa, composta por duas camadas

eletrodensas constituídas por glicoproteínas e separadas por uma camada glicolípida intermediária (FAYER; UNGAR, 1986).

Estudos caracterizaram uma organela semelhante à mitocôndria por meio de descrição ultra-estrutural e morfológica, da localização de anticorpos mitocondriais, da análise filogenética de genes que codificam transporte de proteínas mitocondriais e da identificação e análise de sequências de genes associados à mitocôndria (PUTIGNANI et al., 2004).

Com relação ao metabolismo sugere-se que o parasito recorre a glicólise para a produção de energia, sendo capaz de utilizar e catabolizar monoaçúcares (glicose e frutose), assim como armazenar e catabolizar polissacarídeos como a amilopectina. Como muitos organismos anaeróbicos, os parasitos do gênero *Cryptosporidium* economizam ATP (adenosina trifosfato) por meio da utilização de pirofosfato fosfofrutoquinase-dependente. Enzimas para o metabolismo de lipídios complexos como o glicerolípido e o inositol fosfato foram identificadas (ABRAHAMSEN et al., 2004).

2.2.3 Ciclo biológico

O oocisto esporulado, único estágio exógeno, contém quatro esporozoítos envolvidos por uma parede de dupla camada que confere resistência ao organismo. Estes são excretados nas fezes de um hospedeiro infectado e a fase endógena começa após estes serem ingeridos por um hospedeiro susceptível. Os esporozoítos são liberados através da ruptura da parede do oocisto quando expostos às temperaturas corporais, aos ácidos, às tripsinas e aos sais biliares, e aderem às células epiteliais do trato gastrointestinal, usualmente íleo ou jejuno, ou trato respiratório (mais comum em aves) (FAYER, 1997).

Estudos *in vitro* demonstraram que os esporozoítos de *Cryptosporidium* spp. podem desencostar em soluções aquosas mornas, o que possibilita e justifica as infecções e autoinfecções em sítios extraintestinais (FAYER, 1997). Portanto, é importante destacar que o *Cryptosporidium* spp. não necessita da presença de enzimas digestivas ou sais biliares para que aconteça o excistamento. Esse processo pode ocorrer pela presença de receptores específicos no organismo do hospedeiro, podendo o agente completar seu ciclo em sítios extraintestinais, como no epitélio pulmonar, quando a infecção ocorre por inalação de oocistos em suspensão (via menos comum) (FAYER; XIAO, 2008).

Durante o estágio invasivo, organelas secretórias do parasito com complexo apical (rhoptrias, micronema e granulações densas), liberam proteínas que facilitam a invasão das

células. As proteínas identificadas da superfície e complexo apical incluem GP900, p 23, CSL, TRAP-C1, CP15, cp 47, e GP 15/40 (CAREY et al., 2004).

Os esporozoítos penetram nas células intestinais, multiplicam-se assexuadamente no interior de vacúolos, formando os merontes de tipo I (contém de seis a oito merozoítas), os quais liberam merozoítas que também invadem os enterócitos, dando origem aos merontes de tipo II (contém apenas quatro merozoítas). Alguns merontes de tipo II se diferenciam em macrogametócitos e em microgametócitos. Esses últimos tornam-se multinucleados onde cada núcleo forma um microgameta iniciando a multiplicação sexuada e fertilizam os macrogametócitos dando origem ao zigoto, que em seguida sofre meiose e se reveste de parede formando dois tipos de oocistos: um de parede fina (aproximadamente 20% dos oocistos) e outro de parede grossa (aproximadamente 80% dos oocistos), ambos infectantes (Figura 1) (FAYER; 1997; FAYER; UNGAR, 1986; CAREY et al., 2004).

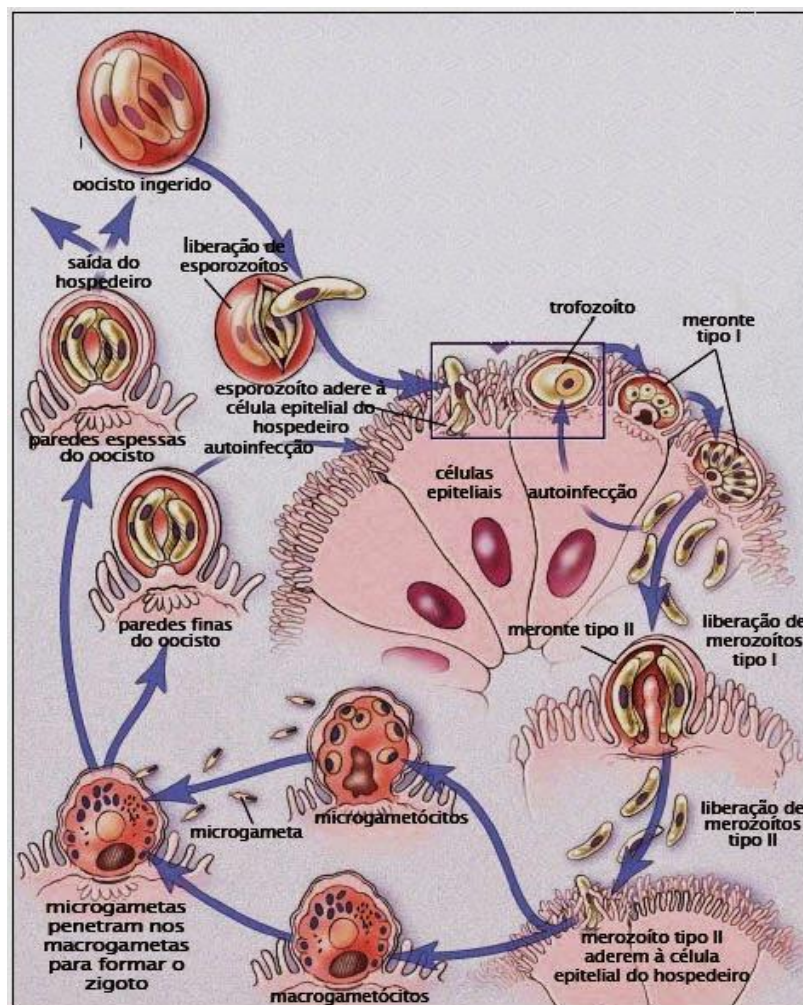


Figura 1: Ilustração adaptada do ciclo de vida do *Cryptosporidium* spp.
Fonte: Chen et al. (2002).

Os oocistos com parede espessa são as formas infectantes excretadas para o meio ambiente com as fezes, e os oocistos de parede fina se rompem no intestino delgado promovendo os casos de autoinfecção (CACCIO, 2004).

Milhões de oocistos maduros são liberados nas fezes, contaminando o meio ambiente, e permanecem viáveis durante vários meses. Os oocistos esporulam no interior do hospedeiro e já são infectantes quando eliminados para o meio ambiente (FAYER; UNGAR, 1986).

A capacidade de se desenvolver completamente dentro de um único hospedeiro (ciclo vital monoxênico) implica em um grande potencial de reinfecção e contribui para a natureza refratária dessa doença como se verifica em pacientes com SIDA (WYNGAARDEN et al., 1993).

A relação parasito-célula hospedeira é única porque o parasito é intracelular, isto é, englobado por uma membrana celular do hospedeiro, mas é extracitoplasmático (WYNGAARDEN et al., 1993). Porém, descobertas sobre os estágios extracelulares do parasito têm reportado a habilidade do mesmo em completar seu ciclo de vida sem a necessidade de célula hospedeira, o que sugere que *Cryptosporidium* spp. possa não ser um parasito intracelular obrigatório. Estágios reprodutivos extracelulares têm sido descritos em *C. andersoni* e *C. parvum* (BOXELL et al., 2008; THOMPSON, 2009).

Considerado um coccídio resistente (CAREY et al., 2004), os oocistos de *Cryptosporidium* spp. apresentam características que favorecem a sua rápida dispersão no ambiente, tais como a capacidade de suportar a ação dos desinfetantes comumente utilizados (formoldeído, fenol, etanol, lisol), a possibilidade de atravessar determinados sistemas de filtração de água em decorrência do seu tamanho reduzido, a capacidade de flutuar, a permanência no ambiente durante algumas semanas ou meses e a tolerância em determinadas temperaturas e salinidade (FAYER et al., 2004).

No ambiente, os oocistos de *Cryptosporidium* spp. podem sobreviver por até um ano a 4°C; na água, permanecem viáveis por até 176 dias; em água do mar, por 35 dias; em fezes, sobrevivem 130 dias. Com congelamento a -22°C uma pequena proporção de oocistos ainda permanece viva e capaz de resistir por 775 horas (PEREIRA et al., 2009).

Cada geração do parasito pode se desenvolver e maturar de 12 a 14 horas e o período entre a ingestão de oocistos e a excreção destes nas fezes varia de hospedeiro para hospedeiro e de acordo com a espécie de *Cryptosporidium* (FAYER, 1997). A duração do ciclo biológico é curta e, segundo estudos realizados em várias espécies de animais, varia, em média, de dois a sete dias (NEVES, 2005).

2.2.4 Transmissão de *Cryptosporidium* spp.

A transmissão pode ocorrer de forma direta entre animais, entre humanos, de animais para humanos, ou indiretamente através da ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos viáveis (FAYER et al., 2000).

A transmissão pessoa a pessoa é a principal via de contaminação em ambientes com alta densidade populacional como asilos, creches, podendo haver a propagação do agente para os familiares das crianças contaminadas; hospitais com transmissão entre pacientes e pessoas que participam do cuidado restrito aos pacientes, como os enfermeiros (FAYER; UNGAR, 1986). Tem sido afirmado que *C. hominis* é encontrado somente entre humanos, enquanto *C. parvum*, também responsável por grande número de casos humanos, apresenta os animais de fazenda com os maiores reservatórios, considerado então, um patógeno zoonótico (HUNTER; THOMPSON, 2005).

2.2.4.1 Transmissão zoonótica

A transmissão do *Cryptosporidium* spp. entre seres humanos e animais domésticos tem sido bem documentada e é provável que tanto uns como outros sirvam de reservatório do agente (WYNGAARDEN et al., 1993). Pode ocorrer para o homem e para os animais pela contaminação fecal-oral (BALLWEBER, 2001).

Estudos moleculares indicam que os cães podem transmitir o genótipo bovino de *Cryptosporidium*, a única espécie de animal que seria capaz de infectar o homem (ABE et al., 2002). Porém, com base na taxonomia, já se aceita que todas as espécies de *Cryptosporidium* possam ser potencialmente perigosas para o homem. Acredita-se que o indivíduo com imunodeficiência possa ser susceptível a espécies ou genótipos não-infectantes para o imunocompetente (TAVARES; MARINHO, 2005).

A ocorrência de *C. parvum* em fezes de cães tem sido frequentemente demonstrada em todo o mundo, indicando a importância desses animais como fontes de infecção para o homem (LALLO; BONDAN, 2006). Cães infectados com *Cryptosporidium* spp. podem contaminar o meio, tornando o solo e a água (tanto potável como aquela utilizada na irrigação e também de recreação) fontes de infecção para o ser humano (MOURA et al., 2009).

Greca (2010) utilizando a reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR) e Nested-PCR, para conhecer os genótipos de *Cryptosporidium*, demonstrou que espécies com grande

potencial zoonótico como *C. parvum* e *C. hominis* podem infectar o cão, indicando que o ser humano pode transmitir a outras espécies animais o espécie-específico *C. hominis*.

A transmissão zoonótica mais frequente entre pacientes imunodeprimidos foi questionada, uma vez que estudo realizado no Peru, sugere que não há diferença significativa na distribuição de *Cryptosporidium* entre pacientes com SIDA e crianças imunocompetentes que vivem na mesma área geográfica (XIAO; CAMA, 2006). De acordo com esses autores, a infecção por *C. meleagridis*, *C. felis* e *C. canis* também pode ocorrer numa frequência menor, enquanto *C. muris*, *C. suis* e *C. cervine*, são raramente relatadas em casos humanos.

2.2.4.2 Transmissão por água e alimentos

Ocorrências de criptosporidiose foram atribuídas ao consumo de água, devido, principalmente à resistência dos oocistos aos mais variados métodos utilizados em tratamento da água como cloração, ozonização ou filtração. Enquanto o contato direto de pessoa /pessoa ou de animal/pessoa normalmente gera um pequeno número de infectados, a contaminação de um manancial pode afetar milhares de pessoas (SPÓSITO FILHA; OLIVEIRA, 2009).

Segundo Tavares e Marinho (2005), o oocisto de *Cryptosporidium* spp. é resistente a ácidos e às concentrações de cloro encontradas em água de beber e de piscinas. Essa resistência ao cloro e a baixa dose infectante o tornam o patógeno entérico de maior potencial de contágio.

A sobrevivência dos oocistos diminui à medida que a temperatura aumenta, o que pode acelerar a sua degradação. Em temperaturas extremas a viabilidade e a infectividade são afetadas, uma vez que as proteínas que compõe a parede dos oocistos podem desnaturar, expondo os esporozoítos. Também, o rápido congelamento inativa os oocistos em maior proporção quando comparados ao congelamento lento como ocorre na natureza. Muitas condições de estresse que os oocistos encontram no meio ambiente poderiam limitar a sua infectividade (TAMBURRINI; POZIO, 1999).

A contaminação do meio ambiente com fezes humanas ou de animais infectados com oocistos, pode atingir alimentos e fontes de água usadas para consumo, para recreação ou para irrigação e processamento de alimentos (frutas e verduras) resultando em surtos de criptosporidiose (PEREIRA et al., 2009).

A água contaminada é uma importante fonte de infecção humana, tanto pelo consumo direto, como no preparo de alimentos. *Cryptosporidium* spp. também já foi encontrado em alimentos como salmão, salada de frutas, vegetais crus, alface, alho, tomate, leite cru e cidra de maçã (SLIFKO et al., 2000).

Numerosos surtos ocorridos nos EUA, Canadá, Reino Unido, França, Austrália, Japão e outros países industrializados foram associados à contaminação de águas de abastecimento para consumo, evidenciando a resistência do parasito aos sistemas convencionais de tratamento de água (FRANCO, 2007). Pessoas ou animais infectados podem eliminar até 10 bilhões de oocistos de *C. parvum* por grama de fezes, com isso poucos hospedeiros infectados são necessários para contaminar grande quantidade de água (OLSO et al., 2003 *apud* SILVA, 2010).

O emprego de fezes de animais como adubo orgânico em culturas vegetais pode causar infecção direta pela formação de aerossóis ou contaminar águas superficiais e subterrâneas (FAYER et al., 2000).

Depois do primeiro grande surto ocorrido nos EUA em 1993, com 403.000 pessoas afetadas e outros importantes surtos ocorridos em várias regiões do mundo, mudanças na legislação sobre a qualidade da água para consumo e dos projetos de tratamentos para água de abastecimento, resultaram em declínio no número de surtos de criptosporidiose transmitidos por esta via nos EUA e Reino Unido (XIAO; CAMA, 2006; FRANCO, 2007).

O número de surtos causados por alimentos contaminados é menor que os produzidos por águas contaminadas, o que pode ser atribuído a pouca investigação ou ao fato de que as ocorrências dos casos descritos são dispersas e esporádicas. As fontes de contaminação destes surtos podem estar associadas aos manipuladores ou aos alimentos crus contaminados com oocistos na produção, por meio de água de irrigação e também pela contaminação direta do alimento por materiais fecais na etapa de processamento. Muitos animais marinhos que são consumidos como alimentos, têm a capacidade de filtrar águas para realizar a sua alimentação, porém quando estas estiverem contaminadas com oocistos, os animais acabam retendo o parasito no seu interior, evidenciados em vários estudos realizados que identificaram *C. parvum*, *C. hominis* e *C. meleagridis* como contaminantes de frutos do mar (XIAO; CAMA, 2006; SMITH; NICHOLS, 2010).

2.2.5 Patogênese

Desde o seu reconhecimento em 1907, a infectividade e a patogenia da infecção por *Cryptosporidium* spp. ainda não é totalmente compreendida. No início acreditava-se ser um problema exclusivamente dos animais (CHAPPELL et al., 2003).

Após o rompimento do oocisto e liberação dos esporozoítos no intestino, estes se aderem aos enterócitos do hospedeiro. Em seguida, há uma invaginação da membrana celular, que

envolve o esporozoítio, formando um vacúolo extracitoplasmático (STERLING; ARROWOOD, 1992).

Os organismos estão localizados no interior das células, mas situam-se imediatamente por baixo da membrana celular, dando a impressão que são extracelulares e fixados à borda microvilosa das células parasitadas (JONES et al., 1997). Isto permite que o protozoário se proteja do sistema imunológico e, ao mesmo tempo, se beneficie do transporte de solutos através da membrana da célula parasitada (ABRAHAMSEN et al., 2004).

O processo de invasão de células hospedeiras e desenvolvimento do parasito culminam em branda a moderada fusão das vilosidades e em mudanças na superfície do epitélio (GRAAF et al., 1999). Os criptosporídios de mamíferos parasitam as células epiteliais intestinais, quase sempre o intestino delgado, mas também do ceco e do colo e, ocasionalmente, dos ductos biliares, da traqueia e dos brônquios (JONES et al., 1997).

A disseminação para as vias biliares deve ocorrer por via luminal e não sistêmica. O protozoário tem sido encontrado ligado ao epitélio da vesícula biliar em pacientes sintomáticos com SIDA, que foram colecistectomizados e na bile dos que foram submetidos à colangiografia retrógrada, porém, o mecanismo patogênico pelo qual *Cryptosporidium* spp. parasita a árvore biliar é desconhecido (TAVARES; MARINHO, 2005).

O envolvimento pulmonar é uma complicação rara da criptosporidiose intestinal descrita em pacientes também portadores da SIDA, a maioria deles com doença avançada, ao qual devido à uma infecção maciça, pode haver invasão por contiguidade, ocasionando pneumonias intersticiais (MACKENZIE et al., 1994).

Segundo Brea et al. (1993) e López-Vélez et al. (1995), as sintomatologias mais frequentes incluem tosse crônica, febre e dispnéia, sem alterações radiológicas específicas, algumas vezes com infiltrado intersticial pulmonar. Como a doença biliar, a disseminação para a árvore brônquica deve ocorrer por via luminal.

Yanai et al. (2000), em um estudo com dois macacos experimentalmente infectados com o *Vírus da Imunodeficiência Símia* (SIV), observaram que além da diarreia, os animais apresentaram sintomas respiratórios, e após o sacrifício dos mesmos, identificaram lesões envolvendo a traquéia, os pulmões, as vias biliares, o pâncreas e o intestino, com a presença do *Cryptosporidium* no citoplasma de macrófagos alveolares, nas células gigantes multinucleadas e nas células do epitélio intestinal. As secções pulmonares mostraram uma broncopneumonia associada à criptosporidiose.

As lesões entéricas causadas por *Cryptosporidium* spp. diminuem as atividades enzimáticas intracelulares da mucosa intestinal e alteram o metabolismo corpóreo (MODOLO

et al., 1988). Alterações na permeabilidade da membrana celular dos enterócitos e trocas no fluxo de íons podem ocorrer no curso da infecção e envolvem respostas a uma série de citocinas e quimocinas. Também ocorre a apoptose das células como consequência da infecção dos enterócitos por *Cryptosporidium* spp. (CHAPPELL et al., 2003).

Após aderência do esporozoíto, as células da mucosa epitelial liberam citocinas que ativam fagócitos, secretando fatores solúveis como histamina, serotonina, adenosina, prostaglandina e fatores ativadores de plaquetas que atuam sobre os nervos entéricos aumentando a secreção intestinal de água e cloretos, inibindo a absorção. Posteriormente, as células morrem por resultado direto da invasão, multiplicação e expulsão do parasito, ou as células se danificam devido à inflamação, causando distorção das vilosidades, má absorção de nutrientes, desidratação e desequilíbrio eletrolítico (FAYER; UNGAR, 1986; SMITH et al., 2006).

As células infectadas podem estar ligeiramente mais eosinofílicas que o normal, mas nesta infecção não ocorrem extensas necroses. Podem ocorrer atrofia e fusão das vilosidades, dilatação das criptas e infiltração celular na lâmina própria com linfócitos e plasmócitos, e menor quantidade de neutrófilos e eosinófilos (JONES et al., 1997).

2.3 Criptosporidiose

2.3.1 Sinais clínicos

A criptosporidiose pode ser causada por diferentes espécies e subtipos de *Cryptosporidium* spp., afetando diferentes hospedeiros. Os sinais clínicos variam de acordo com a idade e o estado sanitário do hospedeiro e também da espécie e/ou subtipo e dose infectante do parasito (XIAO; FAYER, 2008).

Embora não se tenha total conhecimento dos meios pelos quais *Cryptosporidium* spp. determina o quadro clínico, além da destruição das microvilosidades levando à diminuição da absorção intestinal da digestão, a presença e a atividade de enteroxinas produzidas pelo parasito ou pelo hospedeiro também vêm sendo sugerida (SILVA, 2010). Em casos mais graves da doença, o hospedeiro pode desenvolver quadros de enterite, colite, cistite, hepatite, pancreatite e manifestações clínicas respiratórias como sinusite e pneumonia (CHALMERS; DAVIES, 2010).

O período entre a ingestão de oocistos e o aparecimento dos sintomas é de sete a 10 dias, podendo variar de cinco a 28 dias (PEREIRA et al., 2009).

O sintoma mais comum de criptosporidiose em mamíferos é a diarreia aquosa profusa que algumas vezes demonstra coloração amarelo-palha e odor fétido. Outros sinais clínicos também podem ser observados, como desidratação, má-absorção, febre, anorexia, perda de peso, fraqueza, depressão, sonolência e em alguns casos, distensão abdominal. A maioria dos animais exibe recuperação espontânea no intervalo de uma a duas semanas de infecção, mas mortalidades significativas podem ocorrer em animais jovens e imunodeficientes (O'DONOGHUE, 1995; MORGAN et al., 2000; HAMNES et al., 2007).

A diarreia é o sinal clínico mais comum, apesar de muitos animais infectados serem assintomáticos (NELSON; COUTO, 2010). Apresenta-se líquida e profusa, possuindo coloração amarelada e odor fétido. Juntamente com a diarreia, surgem desidratação, febre e anorexia. Entretanto, em geral, a infecção pode se manter em estado subclínico e em condições de estresse ou de imunodepressão, ocorre reativação da eliminação de oocistos (FAYER, 1997).

Em animais domésticos, a contaminação por *Cryptosporidium* spp. geralmente ocorre entre a primeira e quarta semanas de vida, sendo que a duração dos sintomas é de aproximadamente duas semanas. Os sinais clínicos mais observados tanto nos animais de estimação, quanto nos animais de produção é uma diarreia profusa, que pode levar à morte por desidratação (OLSON et al., 2011).

Já em aves, a criptosporidiose se apresenta de três principais formas, incluindo a respiratória, intestinal e renal, apresentando manifestações clínicas ou subclínicas (SANTIN, 2013).

A doença em seres humanos manifesta-se de quatro maneiras: assintomática, aguda, crônica e fulminante (intensa e rápida), ao qual a forma aguda é observada geralmente em crianças com menos de cinco anos de idade e a crônica em indivíduos malnutridos ou imunodeprimidos (PEREIRA et al., 2009). Portadores assintomáticos do parasito têm sido encontrados entre indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos (WYNGAARDEN et al., 1993).

2.3.2 Diagnóstico

O diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. requer a observação dos oocistos ou um resultado positivo no ensaio imunoenzimático (ELISA - Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay). *C. parvum* é o menor dos coccídeos, sendo muito difícil observá-lo no exame fecal. O uso de técnicas de coloração ácida sobre o esfregaço fecal e anticorpos fluorescentes aumentam a sensibilidade (NELSON; COUTO, 2010).

Embora a análise morfométrica seja uma boa forma de diagnóstico, a dificuldade em identificar oocistos surge quando o tamanho, forma ou estruturas internas de umas espécies não podem ser distinguidos de outros, como é o caso das espécies do gênero *Cryptosporidium* (FAYER et al., 2000).

As amostras de fezes a serem processadas pelos diferentes métodos coproparasitológicos podem ser utilizadas ainda frescas ou preservadas em substâncias fixadoras (GARCIA, 1995).

Devido à dificuldade de identificação e/ou à escassez de oocistos é importante que a amostra seja concentrada para facilitar a análise. Técnicas como sedimentação com formalina-éter e formalina acetato de etil ou centrífugo-flutuação com solução de Sheather, sulfato de zinco e flutuação em solução concentrada de cloreto de sódio, podem ser utilizadas (HINRICHSEN, 2005).

A coloração de Ziehl-Neelsen e suas variações são os procedimentos que oferecem os melhores resultados na identificação do *Cryptosporidium* spp. (CARLI, 1994). Na realização do exame, pode ser utilizada a fucsina carbólica, que misturada às fezes não cora o parasito, mas o deixa como um cisto claro no fundo vermelho (TAVARES; MARINHO, 2005). Outras técnicas de coloração também têm sido relatadas como a hematoxilina férrica, safranina tricômica e prata metanamina (HINRICHSEN, 2005).

O diagnóstico da criptosporidiose pulmonar pode ser feito pelo Ziehl-Neelsen modificado (ZNM) aplicado a todas as amostras das secreções respiratórias como escarro e lavado broncoalveolar, pode-se utilizar a coloração de Kinyoun (CORTI et al., 2008).

Os testes baseados em Imunoensaios, que detectam o antígeno na amostra de fezes, têm capacidade para análise de um grande número de amostras, sem a necessidade de utilização de um técnico experiente na identificação. Apresentam alta especificidade (90-100%), porém a sensibilidade pode ficar em torno de 70%, o que pode resultar em falsos positivos (JOHNSTON et al., 2003).

Entre os testes imunológicos, estão as técnicas de imunofluorescência (direta e indireta) e imunoenzimática com anticorpos monoclonais; testes com anticorpo policlonal fluorescente; reações de aglutinação com látex; imunoserologia usando detecção de imunoglobulinas por teste de ELISA; hemaglutinação passiva reversa; ensaios imunocromatográficos e citometria de fluxo (FAYER et al., 2000).

Segundo Nelson e Couto (2010), o teste de ELISA é mais sensível que o exame fecal. É disponível no mercado para ser realizado em seres humanos e também em outros mamíferos, baseando-se na detecção do antígeno do parasito nas fezes (BALLWEBER, 2001). Porém Tuli

et al. (2010), em estudo realizado em pacientes portadores de SIDA na Índia, utilizaram o ELISA para detecção do antígeno de *C. parvum* em 200 amostras positivas pelos métodos de coloração de safranina e Kinyoun, tendo o resultado apresentado 15 amostras como falsos negativos, ao qual a sensibilidade do ELISA foi de 93,25% para a presença de *C. parvum*, sendo que, nesse estudo, a técnica de Kinyoun foi considerada melhor.

Os oocistos de *Cryptosporidium* spp., como de outros protozoários parasitos em ambientes aquáticos, apresentam-se em pequeno número (devido à diluição), necessitando de técnicas de concentração efetivas para sua identificação. Dos vários métodos existentes o que tem sido mais aplicado é o “método 1622”: *Cryptosporidium* in water by filtration/IMS/FA, usando filtragem com poros de 1 µm, centrifugação, purificação do concentrado por meio da separação imunomagnética (IMS) dos oocistos e reação de imunofluorescência com anticorpos anti-*Cryptosporidium* conjugados com fluoresceína permitindo a identificação por microscopia de fluorescência (SMITH et al., 2007).

Outro método de diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. referido na literatura é a utilização de biopsia intestinal ou biliar, porém se constitui em processo bastante invasivo e cuja sensibilidade depende da localização do tecido examinado (XIAO; CAMA, 2006). Em tecidos de material de autópsia ou biopsia, as técnicas de coloração também podem ser utilizadas para detecção dos oocistos, sendo a mais utilizada a coloração de cortes histológicos por hematoxilina-eosina (HE), ao qual nos cortes histológicos, os estágios evolutivos são identificados dentro de vacúolos parasitóforos, visualizados como corpos esféricos, medindo de 2 a 7,5 µm estando localizados nas superfícies das células epiteliais (CHALMERS; DAVIES, 2010).

A identificação da espécie não é possível somente pela realização da análise morfológica, uma vez que os oocistos são muito semelhantes entre as diferentes espécies, com uma pequena variação morfológica ou são até mesmo idênticos (FAYER et al., 2000). Assim como também os métodos imunológicos, que apesar de oferecerem algumas vantagens para o diagnóstico da criptosporidiose em relação à microscopia como testes rápidos, simples, sensíveis e específicos, não possibilitam a identificação de espécies ou genótipos de *Cryptosporidium* spp. responsáveis pela infecção (JEX et al., 2008).

Destacam-se, portanto, as técnicas moleculares como os únicos meios de diferenciação confiáveis entre as espécies de *Cryptosporidium* spp., incluindo a PCR, Nested-PCR, PCR em tempo real, técnica de polimorfismo do comprimento dos fragmentos por enzimas de restrição (RFLP) e sequenciamento automático de ácidos nucleicos, porém, o custo elevado em comparação aos outros métodos de identificação morfológica, faz com que essas técnicas não

sejam rotineiramente utilizadas em laboratórios de diagnóstico, apesar de serem caracterizadas por alta sensibilidade e especificidade (JEX et al., 2008).

2.3.3 Epidemiologia

Muitos fatores podem contribuir para a falta de conhecimento sobre a epidemiologia do parasita. Entre eles, destaca-se a ausência da prática de notificação da doença, que não é obrigatória, por parte dos médicos e dos laboratórios, além também das técnicas diagnósticas utilizadas pela maioria dos laboratórios que não permitem a identificação do parasita em um exame de fezes rotineiro (VALENTIM; CARDOSO, 2011).

Vários são os fatores que influenciam a epidemiologia desta protozoose: tamanho reduzido e variado dos oocistos, permitindo sua passagem por filtros usualmente empregados nos processos de tratamento de água; baixas doses infectantes (a dose infectante de *C. parvum* varia de nove a 1.042 oocistos); oocistos produzidos no interior dos hospedeiros, quando eliminados com as fezes, já encontram-se esporulados, ou seja, já são infectantes; tanto seres humanos como animais participam como reservatórios do agente no seu ciclo biológico (SMITH et al., 2006).

No Brasil, durante muito tempo, os estudos sobre *Cryptosporidium* spp. e da ocorrência da criptosporidiose relacionavam-se a levantamentos epidemiológicos em algumas regiões do país. Já existem investigações realizadas em praticamente todas as regiões, e muitas delas incluem caracterização genotípica (PEREIRA et al., 2009).

A caracterização de espécies e variantes dentro da espécie, através de técnica de PCR empregando marcadores específicos, vem sendo a metodologia mais eficiente para estudos epidemiológicos atuais. Por meio dessa tecnologia, identificou-se que existe uma substancial variação de subtipos dentro das espécies de *Cryptosporidium*. Na espécie *C. homini*, seis subtipos foram identificados (Ia, Ib, Id, Ie, If, Ig), com vários relatos apresentados em 21 países. Na espécie de *C. parvum* foi identificada uma diversidade ainda maior de subtipos, dez até agora descritos e assim denominados (IIa, IIb, IIc, IId, IIe, IIe, IIh, Iii, IIj, IIk) (JEX; GASSER, 2010).

Ryan et al. (2003), realizaram uma pesquisa no Zoológico de Praga com amostras fecais de mamíferos silvestres e onze espécies desses animais foram positivas para *Cryptosporidium*, e com a aplicação de técnicas moleculares, ao qual eles verificaram que estes mamíferos albergavam quatro diferentes espécies do agente, estando a maioria infectada por *C. parvum*.

Na fauna natural de pequenos mamíferos silvestres da Mata Atlântica de três áreas serranas do Sudeste brasileiro, foi investigada a ocorrência de espécies de *Cryptosporidium*, em 240 animais capturados e incluídos no estudo, amostras fecais de 39 apresentaram estruturas álcool-ácido resistentes, observadas a partir da coloração pelo método de ZNm, seguida pela reação de imunofluorescência direta. Foi confirmada a presença de oocistos de *C. muris* (5,1%) e de *C. parvum* (5,1%), apresentando infecção concomitante em dois animais (DALL'OLIO; FRANCO, 2004).

Em um estudo realizado no Brasil, por Meireles et al. (2007), com 145 amostras fecais de capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) de vida livre, coletadas no Estado de São Paulo, diagnosticou-se 5,52% de positividade para *Cryptosporidium* spp., sendo a espécie *C. parvum* isolada em todos os casos.

De acordo com Fayer e Xiao (2008), nos mamíferos silvestres, a carga parasitária por *Cryptosporidium* spp. tende a ser menor quando comparada aos valores encontrados em mamíferos domésticos.

Alguns primatas brasileiros já foram descritos como hospedeiros desse agente, como o sagui-do-tufo-branco (*Callithrix jacchus*), macaco-aranha (*Ateles belzebuth*) e mico-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) (KINDLOVITS; KINDLOVITS, 2009).

Com o objetivo de avaliar a ocorrência e determinar os genótipos responsáveis pela infecção de mamíferos neotropicais por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., Santos (2011) analisou 452 amostras fecais procedentes de 52 diferentes espécies, *in situ* e *ex situ*, de sete localidades distintas do Estado de São Paulo, Brasil. As amostras foram avaliadas por métodos de diagnóstico microscópico, seguidos por técnicas moleculares de amplificação (Nested-PCR), sequenciamento e caracterização genotípica. Os resultados revelaram prevalência de 6,2% para *Giardia* spp. e de 4,8% para *Cryptosporidium* spp., sendo que dezessete diferentes espécies de mamíferos silvestres foram positivas, 11 para *Giardia* spp., nove para *Cryptosporidium* spp. e três para ambos os bioagentes.

Outro estudo realizado com o objetivo de determinar a ocorrência e a classificação molecular de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de animais exóticos criados como animais de estimação no Brasil, foi realizado por Souza (2013), analisando um total de 386 amostras de seis espécies de animais exóticos. A pesquisadora encontrou positividade para *Cryptosporidium* spp. em 11,40% (44/386) das amostras, ao qual o sequenciamento de fragmentos amplificados permitiu a identificação de *C. tyzzeri* (*Cryptosporidium* genótipo I de camundongos) em camundongos (*Mus musculus*), *C. muris* em camundongos e hamsters

(*Mesocricetus auratus* e *Cricetulus griseus*) e chinchila (*Chinchilla lanigera*), *C. parvum* em chinchila e *Cryptosporidium* sp. em porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*).

Um trabalho também foi realizado para verificar a presença de *Cryptosporidium* spp. em fezes de aves, mamíferos e nas águas dos recintos e lagos do Zoológico Municipal de Curitiba, Brasil, coletando-se 128 amostras fecais de mamíferos. O material foi analisado por meio da técnica de ZNm e nenhuma amostra de fezes dos mamíferos encontrava-se positiva para o agente (BOSA, 2014).

2.4 *Giardia*

O gênero *Giardia* spp. é um protozoário monoxênico que coloniza o intestino delgado de vários hospedeiros incluindo mamíferos, aves, répteis e anfíbios. Apresenta distribuição mundial principalmente em países em desenvolvimento e é mais frequente entre hospedeiros imunocomprometidos (ACHA; SZYFRES, 2003).

A nomenclatura utilizada para *Giardia* spp. ainda é confusa, pois cada pesquisador emprega uma denominação. O número de espécies de *Giardia* spp. também é uma grande controvérsia e os nomes usados estão constantemente sofrendo mudanças (THOMPSON et al., 2000; BOWMAN et al., 2010).

Existem giárdias de genótipos específicos para determinado hospedeiro e giárdias de genótipo comum a humanos e vários outros animais que são denominados genótipos zoonóticos, sendo um assunto muito controverso (MONIS et al., 2003; MONIS; THOMPSON, 2003).

Mais de 50 espécies de *Giardia* já foram descritas e são reconhecidas apenas cinco espécies: *Giardia duodenalis*, *Giardia agilis*, *Giardia muris*, *Giardia ardeae* e *Giardia psittaci* (THOMPSON, 2004). A *G. lamblia* também é conhecida como *G. duodenalis* ou *G. intestinalis* (THOMPSON et al., 2000).

Segundo Smith et al. (2007), em estudos com base na morfologia dos trofozoítos, descreveram que existem seis espécies de *Giardia*, a saber: *G. muris* em roedores, *G. agilis* em anfíbios, *G. psittaci* e *G. ardea* em aves, *G. microti* em coioote e *G. duodenalis* (com sete assemblages ou grupos genéticos) em mamíferos.

Através da utilização da biologia molecular, pesquisadores canadenses identificaram 11 genótipos diferentes de *Giardia*, incluindo oito genótipos que foram encontrados no homem (HEALTH CANADA, 2011).

Um levantamento realizado nas palestras e nos trabalhos apresentados no evento denominado II Conferência Internacional sobre *Giardia* e *Cryptosporidium*, foi possível observar que 21 trabalhos adotaram a espécie *G. lamblia*, 21 a espécie *G. duodenalis*, 16 a espécie *G. intestinalis*, dois apenas a *Giardia* Assemblages sem empregar o nome específico e apenas um grupo já denomina de *G. enterica* a Assemblage A de origem humana. Na mesma conferência foi evidenciada a necessidade de uniformizar a nomenclatura e de denominar corretamente a espécie com base no Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN) (CARVALHO, 2009).

A maioria das espécies de *Giardia* encontra-se adaptadas a determinado tipo de hospedeiro, com exceção da *Giardia duodenalis* que infecta diversas espécies de mamíferos, onde a aplicação de técnicas moleculares em estudos envolvendo esta espécie tem demonstrado diversidade genética intraespecífica (THOMPSON et al., 2000; THOMPSON, 2004; APPELBEE et al., 2005). Existem relatos de espécie encontrada unicamente em lagartos, descrita como *Giardia varani*, assim como também acredita-se que peixes possuem espécies exclusivas para os mesmos (FENG; XIAO, 2011).

Com o advento da biologia molecular dos parasitos do gênero *Giardia* spp. tem mostrado ampla diversidade genética, sendo possível identificar que *G. intestinalis* apresenta um elevado nível de diversidade genética com sete genótipos distintos: A, B, C, D, E, F e G, ao qual somente os genótipos A e B foram detectados no homem e em uma ampla variedade de outros hospedeiros mamíferos, enquanto os genótipos C-G são hospedeiros específicos. Os genótipos C e D incluem isolados de cães, enquanto que o genótipo E está relacionado a animais de produção como, suínos, ovinos e bovinos. Os genótipos F e G são exclusivos de gatos e ratos domésticos, respectivamente (EY et al., 1997; HOPKINS et al., 1997; PAULINA, 2005; SOUZA et al., 2007).

Estudos também identificaram a ocorrência de diversidade genética dentro de cada grupo maior. O grupo A consiste de dois agrupamentos distintos: AI e AII. O primeiro congrega uma mistura de parasitos isolados de humanos e de animais e tem sido alvo de estudo na análise do potencial de transmissão zoonótica da *Giardia* spp. Já o grupo B apresenta diversidade genética de parasitos isolados, predominantemente de humanos (ABE et al., 2005; PAULINA, 2005).

Existem exceções para as especificidades, pois os genótipos C e D foram encontrados em felinos (READ et al., 2004; PALMER et al., 2008) e humanos (TRAUB et al., 2009), D foi descrito em suínos (LANGKJAER et al., 2007; SPRONG et al., 2009) e humanos (FORONDA et al., 2008), o genótipo E foi encontrado em gatos e humanos (READ et al., 2004; SPRONG

et al., 2009; LEBBAD et al., 2010) e F foi relatado em suíno (ARMSON et al., 2009) e humanos (GELANEW et al., 2007). Alguns estudiosos também sugerem a existência do genótipo H, provenientes de mamíferos marinhos (FENG; XIAO, 2011).

2.4.1 Histórico

O gênero *Giardia* criado por Kunstler em 1882, engloba um grupo de flagelados que parasita o intestino delgado de mamíferos, aves, répteis e anfíbios, porém a primeira descrição existente de trofozoítos é atribuída a Anton van Leeuwenhoek, no ano de 1681, ao notar “animalúnculos móveis” em suas fezes, no entanto, só no ano de 1859, Lambl descreveu mais detalhes do agente (NEVES, 2005).

As primeiras evidências da patogenicidade da *Giardia* spp. só foram sugeridas em 1916, por Fantham e Porter, ao correlacionarem a presença do parasita com os sintomas e as fezes diarreicas de soldados que retornavam da guerra (SOGAYAR, 2001).

No início, a *Giardia* spp. era considerada um micro-organismo comensal do intestino delgado e apenas após a segunda metade do século passado, é que sua importância clínica foi destacada, sendo então o gênero *Giardia*, reconhecido como um importante patógeno cosmopolita (OLSON et al., 2002).

2.4.2 Morfologia

A *Giardia* spp. apresenta duas formas morfológicamente distintas: trofozoíto e cisto. O cisto mede de 11 a 14µm de comprimento e 7 a 10µm de largura, sendo a forma infectante e resistente no meio ambiente (GARCIA; BRUCKNER, 1993; IVANOV, 2010). São imóveis, arredondados e possuem dois ou quatro núcleos, quatro corpos parabasais, quatro axonemas e com parede celular grossa (SOARES et al., 2008).

O trofozoíto de formato piriforme é a forma móvel do parasito e mede de 12 a 15µm de comprimento e 6 a 8µm de largura com uma superfície dorsal convexa (ADAM, 2001). A forma de trofozoíto apresenta simetria bilateral, onde em seu corpo pode ser observado um achatamento dorsoventral, e na sua superfície ventral há uma área ovóide que constitui um disco adesivo que ocupa dois terços desta face (LEVINE, 1985; REY, 1991). A face dorsal é lisa e convexa, já a face ventral é côncava (SOGAYAR; GUIMARÃES, 2000).

O disco ventral ou adesivo é uma estrutura presente apenas nos organismos do gênero *Giardia* spp., ele é côncavo e ocupa a maior parte da região anterior da superfície ventral do

parasito, servindo para a sua fixação na mucosa intestinal do hospedeiro infectado. No disco é possível verificar a presença de proteínas contráteis como actinina, α -actinina, miosina e tropomiosina relacionadas com a sua contração e adesão ao intestino do hospedeiro (ADAM, 2001).

No interior da célula do trofozoíto há a presença de dois núcleos com grandes endossomas que conferem ao microrganismo um aspecto de “raquete de tênis com olhos” (BOWMAN et al., 2010). Apresenta forma de pêra e é móvel, possuindo quatro pares de flagelos: pares anterior, posterior, ventral e caudal; dois corpos parabasais e ainda dois axonemas cada um (SOARES et al., 2008). Cada flagelo é composto por nove pares de microtúbulos circundando dois microtúbulos, ao qual esses flagelos parecem ser importantes para a motilidade, mas não para a adesão do parasito ao intestino do hospedeiro (PAULINA, 2005).

O citoplasma do trofozoíto apresenta estruturas quase sempre duplas e simétricas, e compreendem um par de núcleos e dois feixes de fibras longitudinais que são denominados axonemas. Pode-se observar também a presença de organelas, como retículo endoplasmático, ribossomas, aparelho de Golgi e grânulos de glicogênio. Abaixo da membrana citoplasmática do trofozoíto existem numerosos vacúolos, que podem ter participação no papel da pinocitose de partículas alimentares (REY, 1991; SOGAYAR; GUIMARÃES, 2000).

2.4.3 Ciclo biológico

A via de infecção é a ingestão de cistos e o seu desencistamento começa no meio ácido do estômago, completado no duodeno e jejuno, com a liberação dos trofozoítos que colonizam o intestino delgado. Este se reproduz por divisão binária longitudinal e após a divisão nuclear e duplicação das organelas ocorre a plasmotomia, resultando assim em dois trofozoítos. O ciclo se completa pelo encistamento do trofozoíto e sua eliminação pelas fezes para o meio exterior (Figura 2) (SOGAYAR; GUIMARÃES, 2000).

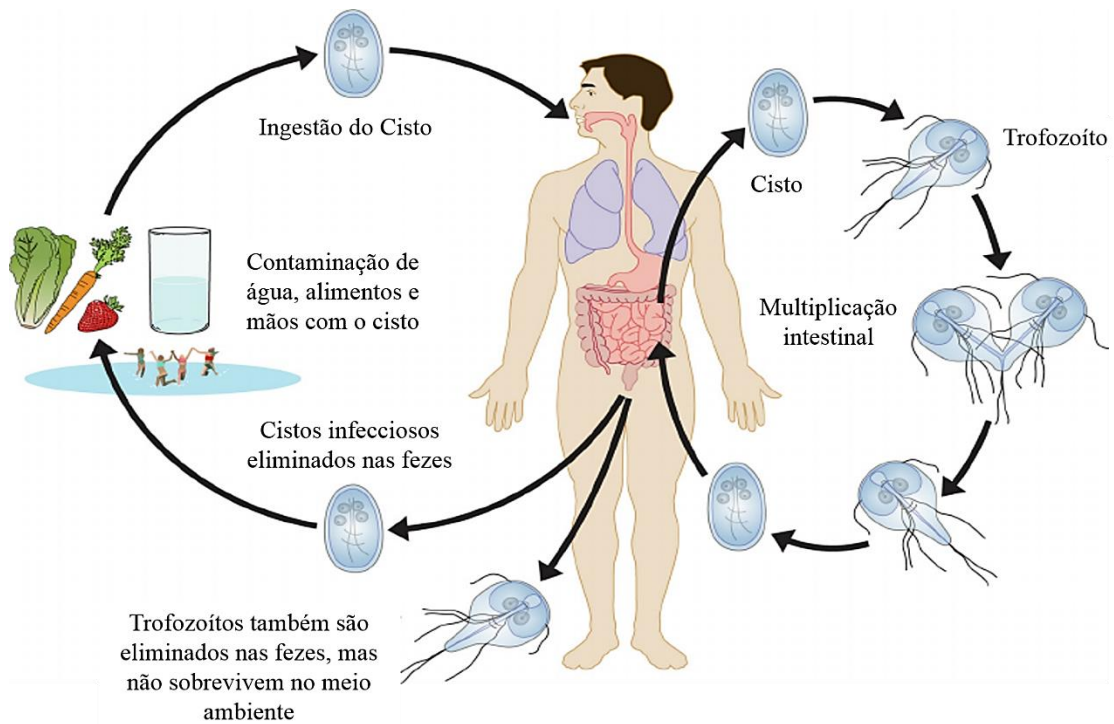


Figura 2: Ilustração adaptada do ciclo de vida da *Giardia* spp.
Fonte: Ankarklev et al. (2010).

A *Giardia* spp. não necessita de hospedeiros intermediários ou vetores para completar seu ciclo, que tem duração média de sete a 14 dias (FARTHING, 1994). Os animais eliminam os cistos da *Giardia* spp. nas fezes após um período de pré-patência de uma até duas semanas, sendo que neste intervalo de tempo, os hospedeiros podem apresentar ou não sinais clínicos da enfermidade como a diarreia (VIGNARD-ROSEZ et al., 2006).

Já para Brincker et al. (2009), o período de incubação da giardíase é de uma a três semanas, geralmente nove a 15 dias após o hospedeiro ingerir os cistos do parasito, e destacaram que a duração do período de incubação está relacionada com o tamanho do inóculo. Para os mesmos pesquisadores, a fase aguda da giardíase tem duração de três ou quatro dias. Uma vez ingeridos, os cistos de *Giardia* spp. podem ser eliminados nas fezes cinco a 16 dias após a infecção e a eliminação pode durar em média 35 dias e ainda podem permanecer subsistentes na água de rios ou lagos por até 84 dias.

Segundo Ballweber et al. (2010), o cisto pode permanecer viável no meio ambiente por até 60 dias, sendo destruído por temperaturas superiores a 64°C.

Nas amostras fecais diarreicas, devido ao rápido fluxo intestinal, é comum encontrar a presença de trofozoítos, mas estes raramente conseguem sobreviver às condições ambientais (GENNARI; SOUZA, 2002). Segundo Bowman et al. (2010), os cistos maduros com potencial para formar dois trofozoítos são as formas encontradas normalmente nas fezes do hospedeiro

infectado, já os trofozoítos são observados em fezes diarreicas, porém esta forma não é capaz de causar infecção em algum hospedeiro.

2.4.4 Transmissão da *Giardia* spp.

A transmissão ocorre a partir da ingestão de água não tratada e alimentos contaminados por cistos maduros, de pessoa a pessoa por meio de mãos contaminadas, por exemplo, de animais para pessoas ou vice-versa por contato (NEVES, 2005).

Segundo Thompson (2004), existem quatro ciclos de transmissão responsáveis pela manutenção do parasita nos mamíferos hospedeiros, envolvendo como hospedeiros principais os cães e gatos, os humanos, o gado e os animais silvestres, havendo a possibilidade de transmissão entre hospedeiros de um mesmo ciclo e de um ciclo para outro diretamente ou por via hídrica, não se sabendo a frequência das transmissões.

A coprofagia, que é o hábito de ingestão das fezes, praticada por alguns animais, é uma via significativa de autoinfecção e amplifica a disseminação da enfermidade (FARTHING, 1994). Mesmo os animais infectados eliminando em suas fezes cistos dos protozoários, o homem geralmente se infecta por transmissão direta, de pessoa para pessoa (BOWMAN et al., 2010).

Os cistos de *Giardia* spp. podem sobreviver na água por vários meses, fazendo com que muitas vezes seja difícil de determinar a fonte de contaminação. Contudo, as fezes dos animais como dos cães, bovinos, ovinos, cavalos e suínos, representam um grande potencial para contaminação das águas e dos alimentos (NISHI et al., 2004). Existem artigos na literatura que chamam a atenção para os mamíferos domésticos e silvestres como fonte de infecção para os humanos e de contaminação da água (FENG et al., 2007).

É possível observar uma maior sensibilidade de animais jovens, pois os mesmos apresentam sistema imune não totalmente desenvolvido, e o comportamento dos filhotes também facilita a contaminação pelo agente, já que eles têm contato mais frequente com materiais que podem estar contaminados com os cistos (MUNDIM et al., 2003).

2.4.5 Patogênese

Embora um estudo clínico realizado por Rendtorff tenha sugerido o papel patogênico da *Giardia* spp. no homem, devido a maioria das infecções ter se mostrado assintomática, fez com

que a ideia de que a *Giardia* spp. não fosse patogênica prevalecesse por muito tempo (SOGAYAR, 2001).

O número de cistos ingeridos pelo hospedeiro, desempenha um papel de destaque na patogênese da doença. Em animais a ingestão de somente 10 cistos é capaz de causar a infecção (LINDSAY; ZAJAC, 2009).

Os mecanismos patogênicos na giardíase são multifatoriais, podendo ser determinados por fatores relacionados ao parasito, como mecânicos, proteolíticos e imunológicos e ao hospedeiro, como dieta, microbiota intestinal e estados nutricional e imunológico (UNICEF, 2004). A combinação entre resposta do hospedeiro e fatores do parasito pode estar envolvida no desenvolvimento patogênico, porém, o dano causado pela aderência do trofozoíto à célula intestinal é estudado como fator desencadeante da patologia (SOUZA et al., 2000).

O conhecimento do potencial patogênico da *Giardia* spp. nos animais domésticos e silvestres ainda é pequeno, ao qual várias pesquisas biomoleculares evidenciam a transmissão zoonótica (CARVALHO, 2009).

As diversas cepas de *Giardia* spp. possuem grau variado de patogenicidade (MUNDIM et al., 2003). Os mecanismos pelos quais a *Giardia* spp. causa diarreia e má absorção intestinal não são bem conhecidos, podendo ocorrer mudanças na arquitetura da mucosa devido o processo inflamatório gerado (NEVES, 2005). Pode-se notar exsudato inflamatório catarral presente no intestino delgado, causando uma enterite catarral, presença de petéquias e de focos necróticos na mucosa e eventualmente na serosa do intestino (OLSON et al., 2002).

As lesões resultantes do processo inflamatório, induzidas pelo parasita, geram hiperplasia das criptas, apoptose celular, intensa infiltração de células plasmáticas, linfócitos e leucócitos polimorfonucleares (OLSON; BURET, 2001; IVANOV, 2010).

As espécies de *Giardia* se localizam principalmente na porção anterior do intestino delgado, no lume, sem causar invasão da mucosa intestinal, sendo que a aderência à superfície da mucosa acontece devido a uma interação entre o trofozoíto presente e proteases produzidas pelas próprias células intestinais. Os trofozoítos produzem, a partir da ação da tripsina, uma lecitina que gera a aderência às superfícies dos enterócitos, por meio do qual a tripsina é ativa na porção anterior do intestino delgado, fazendo com que o parasitismo seja mais intenso nesse local (GENNARI; SOUZA, 2002).

A liberação de toxinas, a não conjugação de sais biliares, a atrofia das vilosidades, a lesão das microvilosidades intestinais, o crescimento abundante de bactérias, a secreção e a liberação das prostaglandinas também têm sido observados (SOGAYAR, 2001).

A síndrome da má absorção gerada pela presença do parasito é explicada quando os trofozoítos colonizam o duodeno levando a uma redução difusa da altura das microvilosidades intestinais, resultando em uma perda generalizada da superfície de absorção em até 50%, observando-se também um aumento na motilidade intestinal (GENNARI; SOUZA, 2002).

Giardia spp. contém várias proteases e algumas delas são capazes de agir sobre as glicoproteínas da superfície das células epiteliais e promover o rompimento da integridade da membrana, sendo que a normalidade da mucosa se restabelece com a eliminação do agente (SOGAYAR, 2001).

2.5 Giardíase

2.5.1 Sinais clínicos

A *Giardia* spp. acomete os animais e o homem e causa diarreia que é o sintoma mais comum com comprometimento da digestão e absorção dos alimentos, culminado com desidratação, perda de peso e morte principalmente em animais jovens, animais com doenças concomitantes ou debilitados (MUNDIM et al., 2003).

Sogayar e Guimarães (2000) destacaram que o número de cistos do parasito ingeridos e o pH do suco gástrico também influenciam nos sinais clínicos observados.

Para Parra e Grecco (2008), os sinais clínicos podem variar em um amplo espectro associados ou isolados, destacando que não existem sinais característicos da giardíase, pois diversas enfermidades intestinais se assemelham a ela, como as gastroenterites virais, bacterianas ou causadas por outros parasitos, assemelhando-se também às alergias alimentares, à enfermidade da má absorção, as gastroenterites promovidas por fármacos e as enfermidades alérgicas.

Na grande maioria dos casos, os animais adultos são portadores assintomáticos, contribuindo desta forma para a eliminação de cistos do parasita no meio ambiente, o que pode contaminar outros animais e o homem (BARR; BOWMAN, 2010).

A diarreia é a manifestação clínica mais comum nos animais e vem acompanhada de dor abdominal, pode ser de forma aguda, crônica ou em surtos intercalados com defecação normal. As fezes são geralmente pastosas ou liquefeitas com mau odor, de coloração clara e acinzentada, muitas vezes contendo muco (SOUZA et al., 2000).

A maioria dos cães e gatos são capazes de ingerir cistos infecciosos de *Giardia* spp. sem ter a doença, já outros animais desenvolvem graus variados da doença e de sinais clínicos. A

intensidade dos sinais clínicos varia de acordo com a idade, o estado geral, o nível de estresse imunológico e o nutricional. Os sinais podem ocorrer em cães com menos de um ano de idade. Nos jovens pode vir a causar graves quadros clínicos e até levar a óbito principalmente em filhotes (LINDSAY; ZAJAC, 2009).

Os sinais clínicos podem ocorrer também em cães mais velhos que sofrem de outras doenças ou naqueles submetidos a medicação imunodebilitante, como quimioterapia ou corticosteroides, e geralmente no hemograma é possível observar um aumento no número de eosinófilos e anemia branda (ROBERTSON et al., 2010). Em gatos o principal sinal clínico também é a diarreia, gerando fezes com aspectos mucoide, pálida, pastosa e quase sempre fétida (KIRKPATRICK, 2007).

Infecções fatais por *Giardia* spp. foram descritas em chinchilas e mais recentemente em pássaros. Doença alérgica e urticária têm sido associadas com giardíase em humanos e animais domésticos, levando a possibilidade de que esta doença pode ser responsável por casos clínicos de atopia em outros animais como cães, gatos e periquitos (OLSON, 2000).

No homem, segundo a Organização Mundial da Saúde (1997), o maior impacto clínico da infecção por *Giardia* spp. tem sido observado em indivíduos malnutridos, imunocomprometidos e em crianças, sendo que nessas últimas, as complicações resultantes da giardíase, como a diarreia persistente e a má absorção intestinal, podem comprometer o desenvolvimento físico e mental. Portanto, entre as parasitoses intestinais que afetam o homem, a *Giardia intestinalis*, apresenta grande importância na infância, que causa quadro diarreico que muitas vezes passa despercebido pelos pais (SOUZA et al., 2007).

2.5.2 Diagnóstico

Os cistos de *Giardia* spp. podem ser detectados nas fezes por inúmeros métodos, os mais tradicionais de identificação envolvem o exame direto de esfregaço fecal, ou concentração fecal por acetato-formalina e sulfato de zinco, seguido de exame microscópico (TAYLOR et al., 2007).

Em fezes formadas ou pastosas pesquisa-se a presença de cistos utilizando o método a fresco ou de concentração de Ritchie ou Faust e colaboradores (CIMERMAN; CIMERMAN, 1999).

Com relação ao diagnóstico imunológico para *Giardia* spp., os métodos mais utilizados são a imunofluorescência direta e o teste de ELISA, que para pesquisa de anticorpos da classe IgM apresenta alta sensibilidade e especificidade (96%), conseguindo detectar os antígenos de

Giardia spp. nas fezes mesmo que o animal não esteja mais eliminando cistos no momento do exame, permitindo diferenciar casos de infecção recente e de grupos controle (SOGAYAR; GUIMARÃES, 2000).

A detecção de antígenos nas fezes empregando a técnica de ELISA tem demonstrado resultados satisfatórios e as técnicas baseadas no reconhecimento do DNA de *Giardia*, como o PCR, estão sendo padronizadas para a identificação deste parasita nas fezes (NEVES, 2005). A realização de análises moleculares tem demonstrado o mesmo genótipo de *Giardia* spp. em humanos e em outras espécies de mamíferos (THOMPSON et al., 2000).

Durante muito tempo o diagnóstico de *Giardia* spp. em fezes ou em água foi feito apenas com uso de técnicas convencionais, basicamente a microscopia, porém esta técnica é de eficiência limitada, permitindo a identificação da espécie apenas pelo aspecto morfológico e não detecta infecção subclínica e pode ser negativa devido à intermitência da eliminação de cistos pelo hospedeiro. Outras metodologias foram então introduzidas para o diagnóstico, como a imunofluorescência, mas o problema continuou a existir. O diagnóstico só melhorou com o surgimento das técnicas moleculares que permitem a identificação específica dos parasitos. Essas técnicas têm se mostrado mais sensíveis, específicas e fidedignas do que as tradicionais, como é o caso da PCR e da RFLP (PAULINA, 2005).

Com relação a biologia molecular para o estudo de *Giardia* spp., o gene TPI (triose phosphate isomerase) é considerado o mais variável, ideal para identificação de cepas. O gene GDH (glutamase dehidrogenase), que apresenta moderada variabilidade, é o mais versátil. Já o gene β -giardin, com locus único e conservado, tem grande potencial para definir os grupos dentro dos Assemblages, enquanto que o gene SSU rDNA é útil para tipagem de Assemblage e subassemblage (TRAUB et al., 2005).

A utilização das técnicas moleculares para caracterizar os parasitos isolados de mamíferos silvestres, fornece evidências de que estes animais podem significar risco à saúde pública em certas áreas. Estudos demonstram que com a determinação dos genótipos de *Giardia* spp. verificadas em animais silvestres, será possível avaliar a importância de uma determinada espécie silvestre na saúde pública e a possibilidade de identificar a fonte de contaminação por *Giardia* spp. e infecção em humanos, animais domésticos e outras espécies silvestres (APPELBEE et al., 2005).

2.5.3 Epidemiologia

A giardíase tem importância epidemiológica por apresentar um alto potencial zoonótico (THOMPSON et al., 2000). As maiores prevalências da *Giardia* spp. são encontradas em animais jovens, principalmente na faixa etária de até um ano, encontrando-se de 26 a 50% de animais parasitados. Em canis, o parasita pode ser encontrado em até 100% dos cães. Já em gatos a prevalência é menor, podendo variar de 1,4 a 11% (ROSEZ et al., 2002).

Tanto o homem como os animais, têm contribuído para o aumento da infecção em áreas mais populosas, nas quais a constante presença de cães nas áreas urbanas expõe a população às contaminações ambientais e às doenças a partir do contato direto ou indireto com animais infectados, incluindo a giardíase e outras parasitoses (KATAGIRI; OLIVEIRA-SIQUEIRA, 2007).

Resultados de pesquisas mostraram que a prevalência da giardíase é alta em diferentes regiões do Brasil e que sua ocorrência sempre foi subestimada devido à falta de diagnóstico e pelo fato de indivíduos infectados apresentarem eliminação de cistos de forma intermitente (PARRA; GRECCO, 2008).

A incidência e a prevalência de giardíase em humanos e animais têm sido relatada em todo o mundo, variando consideravelmente entre as populações e localizações geográficas estudadas (LINDSAY; ZAJAC, 2009).

Um trabalho desenvolvido no Canadá, demonstrou pela primeira vez a predominância de *G. duodenalis* Assemblage B (zoonótica) no gado, sendo também este o primeiro relato de *Giardia* e *Cryptosporidium* em carne crua comprada no varejo (COKLIN et al., 2007).

Uma pesquisa de Carvalho et al. (2009), na cidade de Curitiba, Paraná, verificou a presença de *Giardia* spp. em 17,1% das amostras de fezes de cães que frequentam rotineiramente parques e logradouros públicos da capital, em meses ao qual a temperatura encontrava-se mais elevada.

Em espécies silvestres, a *Giardia* spp. apresenta valores relatados que variam entre menos de 1% até 100%, sendo mais comum em animais de cativeiro, pois tal ambiente favorece a disseminação do agente (SAMUEL et al., 2001).

Do ponto de vista epidemiológico, a infecção por *Giardia*, é mais preocupante em animais, pois estes apresentam poucos sintomas e sinais clínicos de infecção e respondem mal aos tratamentos, servindo como fontes de infecção e podendo eliminar cistos pelas fezes por meses ou anos (LALLO et al., 2003).

A grande maioria dos dados obtidos sobre *Giardia* spp. em mamíferos silvestres, originaram-se de estudos feitos para avaliar o potencial destes animais como reservatórios do agente para humanos e para o gado. Os primeiros animais a serem avaliados foram os que se estabeleciam dentro dos reservatórios de água como o castor, sendo este o mamífero mais frequentemente responsabilizado pela contaminação da água com cistos de *Giardia* spp. (APPELBEE et al., 2005).

Os grupos A e B de *G. duodenalis* foram detectados em várias espécies silvestres que abrangem quase todas as ordens de mamíferos incluindo Artiodactyla, Rodentia, Primates, Carnivora e Hyracoidea, e novos genótipos de *Giardia* spp. estão sendo encontrados em animais selvagens como é o caso dos marsupiais. Já foram descobertos mais dois novos genótipos de *Giardia* em marsupial australiano (bandicoot) e no diabo da Tasmânia. O genótipo de *Giardia* de bandicoot foi depois encontrado também em ovelhas e em camundongo na Austrália, sendo que nesse camundongo também foi encontrado o genótipo zoonótico A e os genótipos C e D encontrados originalmente em cães (PAULINA, 2005).

Na Bélgica foi realizado um estudo para diagnosticar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. na infecção de primatas não humanos e revelou uma alta prevalência de *G. enterica* e nenhuma ocorrência de *Cryptosporidium* (LEVECKE et al., 2007).

Em um estudo realizado em um zoológico na Croácia, 131 amostras fecais foram coletadas de animais assintomáticos, sendo esses, mamíferos silvestres de 57 espécies, onde encontraram 29% de positividade para *Giardia* spp. em diagnóstico realizado a partir de microscopia de fluorescência, seguida de PCR e sequenciamento molecular (BECK et al., 2011).

No Norte da Argentina, foram coletadas 90 amostras de fezes de bugio-preto (*Alouatta caraya*), onde observaram 67% de ocorrência em animais de área rural, 57% em animais de áreas remotas da floresta nativa e 40% em animais áreas próximas a vilarejos, sugerindo que tal espécie de mamífero pode ser um importante reservatório da *Giardia* spp. (KOWALEWSKI et al., 2011).

No sul do Brasil, um estudo realizado ao longo de 16 anos, amostras fecais de animais silvestres de cativeiros eram examinadas por teste coproparasitológico de centrífugo-sedimentação. Foram coletadas 4838 amostras, sendo que dessas, 91,46% correspondiam a amostras provenientes de mamíferos silvestres de 18 espécies diferentes, ao qual observaram uma ocorrência de 1,7% para *Giardia* spp. (SANTOS et al., 2008).

Em um estudo realizado por Lallo et al. (2009), pesquisaram a ocorrência de *Giardia*, *Cryptosporidium* e microsporídios por meio da análise de 98 amostras fecais de animais

silvestres capturados em uma área de desmatamento para a construção das barragens de Paraitinga e Biritiba no Estado de São Paulo. As amostras foram obtidas de 46 roedores, 21 marsupiais, 16 sapos, nove morcegos, três primatas e três lagartos. A técnica de centrífugo-flutuação com sulfato de zinco foi utilizada para a pesquisa de *Giardia* spp. diagnosticando cistos de *Giardia* em amostras fecais de dois pequenos roedores da espécie *Coendou villosus* (ouriço-cacheiro).

3 REFERÊNCIAS

ABE, N.; SAWANO, Y.; YAMADA, K.; KIMATA, I.; ISEKI, M. *Cryptosporidium* infection in dogs in Osaka, Japan. **Veterinary Parasitology**, Osaka, v. 108, n. 3, p. 185-193, 2002.

ABE, N.; KIMATA, I.; TOKORO, M. Genotyping of *Giardia* Isolates From Humans on Japan Using the Small Subunit Ribosomal RNA and Glutamate Dehydrogenase Sequences. **Jpn J Infect Dis**, Osaka, v. 58, p. 57-58, jan. 2005.

ABRAHAMSEN, M. S.; TEMPLETON, T. J.; ENOMOTO, S.; ABRAHANTE, J. E.; ZHU, G.; LANCTO, C. A.; DENG, M.; LIU, C.; WIDMER, G.; TZIPORI, S.; BUCK, G. A.; XU, P.; BANKIER, A. T.; DEAR, P. H.; KONFORTOV, B. A.; SPRIGGS, H. F.; IYER, L.; ANANTHARAMAN, V.; ARAVIND, L.; KAPUR, V. Complete Genome Sequence of the Apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. **Science**, v. 304, n. 5669, p. 441-445, 2004.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Giardiasis. Zoonosis y Enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales. **Organización Panamericana de la Salud**, USA, 3ª ed, p. 47-52, 2003.

ADAM, R. D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, p.447-475, 2001.

ALMEIDA, T. T. C. **Padronização e avaliação de métodos moleculares para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) em amostras fecais: extração de DNA genômico e PCR (reação em cadeia pela polimerase)**. 2004, 130 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, São Paulo, 2004.

ANKARKLEV, J.; JERLSTROM-HULTQVIST, J.; RINGQVIST, E.; TROELL, K.; SVARD, S. G. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 413-422, 2010.

APPELBEE, A. J.; THOMPSON, R. C. A.; OLSON, M. E. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife – Current status and future needs. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 8, p. 370-376, 2005.

ARAÚJO, R. S. 2014. **Enteroparasitos de carnívoros silvestres e *Canis familiaris* (Linnaeus 1758) (Mammalia; Carnivora) na reserva particular do patrimônio natural Santuário do Caraça, Minas Gerais**. 2014, 43 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

ARMSON, A.; YANG, R.; THOMPSON, J.; JOHNSON, J.; REID, S.; RYAN, U. M. *Giardia* genotypes in pigs in Western Australia: prevalence and association with diarrhea. **Experimental Parasitology**, v. 121, n. 4, p. 381-383, abr. 2009.

BALLWEBER, L. R. **Veterinary Parasitology-The Practical Veterinarian**. 1. ed. Elsevier health sciences, 2001, p. 208-212. 328 p.

- BALLWEBER, L. R.; XIAO, L.; BOWMAN, D. D.; KAHN, G.; CAMA, V. A. Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 4, p. 180-189, abr. 2010.
- BARR, S. C.; BOWMAN, D. D. **Doenças infecciosas e parasitárias em cães e gatos - consulta em 5 minutos**. 1. ed. São Paulo: Revinter, 2010. 640p.
- BECK, R.; SPRONG, H.; BATA, I.; LUCINGER, S.; POZIO, E.; CACCIÒ, S. M. Prevalence and molecular typing of *Giardia* spp. in captive mammals at the zoo of Zagreb, Croatia. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 1-2, p. 40-46, 2011.
- BOSA, C. R. **Deteção e identificação de *Cryptosporidium* spp. tyzzer, 1907 em fezes de animais e em água do Zoológico Municipal de Curitiba, Paraná, Brasil**. 2014. 109 f. Tese (Doutorado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.
- BOWMAN, D. D.; LYNN, R. C.; EBERHARD, M. L. **Georgis' Parasitology for veterinarians**. 8. ed. Madrid: Elsevier, p. 102-103, 2004.
- BOWMAN, D. D.; LYNN, R. C.; EBERHARD, M. L.; ALCARAZ, A. **Georgi's Parasitologia veterinária**. Tradução da 9. Ed. com adaptação à realidade brasileira. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 742 p.
- BOXELL, A.; HIJAWI, N.; MONIS, P.; RYAN, U. Comparison of various staining methods for the detection of *Cryptosporidium* in cell-free culture. **Experimental Parasitology**, v. 120, p. 67-72, 2008.
- BREA, H. A. J.; BANDRÉS, F. E.; MOSQUERA, L. J. D.; LANTERO, B. M.; EZQUERRA, L. M. Cryptosporidiosis pulmonary SIDA. Presentación de um caso y revisión de la literatura. **Annals of Internal Medicine**, n. 10, p. 232-236, 1993.
- BRINCKER, J. C.; TEIXEIRA, M. C.; ARAÚJO, F. A. P. Ocorrência de *Giardia* sp. em cães e gatos no município de Caxias do Sul/RS. **Revista da FZVA**, v. 16, n. 1, p. 333-334, 2009.
- CABRAL, D. D.; BARBOSA, F. C.; STRASSER, C.; BARSOTTI, S. R. H. Exame de fezes de mamíferos silvestres para verificação de parasitismo por *Cryptosporidium* sp. **Bioscience Journal**, v. 17, n. 1. p. 77-83, jun, 2001.
- CAMA, V. A. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 14, p. 1567-1574. 2008.
- CAREY, C. M.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. **Water Research**, v. 38, n. 4, p. 818-862, 2004.
- CARVALHO, T. T. R. Estado atual do conhecimento de *Cryptosporidium* e *Giardia*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 38, n. 1, p. 1-16, jan-mar, 2009.
- CACCIO, S. M., Epidemiology of *Cryptosporidium*. Food Pathogen Epidemiology. Microbes, Maladies and Methods. **National Food Centre, Research e Training for the food Industry**, v. 46, n. 1-2, p. 151-155, 2004.

CHALMERS, R. M.; DAVIES, A. P. Minireview: clinical cryptosporidiosis. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 138-146, 2010.

CHAPPELL, C.; OKHUYSEN, P.; WHITER, J. R. C. *Cryptosporidium parvum*: infectivity, pathogenesis and the host-parasite relationship. In. THOMPSON, A., ARMSSON, A.; RYAN, U. M. **Cryptosporidium: from molecules to disease**. Amsterdam: Elsevier. p. 9-19, 2003.

CHEN, X. M.; KEITHLY, J. S.; PAYA, C. V.; LARUSSO, N. F. Cryptosporidiosis. **The New England Journal of Medicine**. v. 346, p. 1723-1731, 2002.

CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia Humana e seus fundamentos gerais**. 1. ed. São Paulo: Atheneu: 1999. 374p.

CIPILLO, R. I.; DIAS, R. A. Associação de variáveis ambientais à ocorrência de leptospirose canina e humana na cidade de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 2, p. 363-370. 2012.

COKLIN, T.; FARBER, J.; PARRINGTON, L.; DIXON, B. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Ontario, Canada. **Veterinary Parasitology**, v. 150, p. 297-305, 2007.

CORTI, M.; VILLAFANE, M. F.; MUZZIO, E.; BRAVA, J.; ABUÍN, J. C.; PALMIERI, O. J. Criptosporidiosis broncopulmonar en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 40 n. 2, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, abr./jun., 2008. Disponível em <<http://www.scielo.org.ar/scielo.php>> Acesso em 15 de janeiro de 2016.

DALL'OLIO, A. J.; FRANCO, R. M. B. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em pequenos mamíferos silvestres de três áreas serranas do Sudeste brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 1, p. 25-31, 2004.

DIDIER, E. S.; STOVALL, M. E.; GREEN, L. C.; BRINDLEY, P. J.; SESTAK, K.; DIDIER, P. J. Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n. 1-2, p.145-166, dez. 2004.

DUSZYNSKI, D. W.; COUCH, L. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis in Rabbits. **The Biology and Identification of the Coccidia (Apicomplexa) of Rabbits of the World**. San Diego: Elsevir, p. 241-252, 2013.

EY, P.; MANSOURI, M.; KULDA, J.; NOHYNKOVA, E.; MONIS, P.; ANDREWS, R.; et al. Genetic analysis of *Giardia* from hoofed farm animal reveals artiocadactyl - specific and potentially zoonotic genotypes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 44, p. 626-635, 1997.

FARTHING, M. J. G. Giardiasis as a disease. **CAB International**, Wallingford, p. 15-20, 1994.

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

FAYER, R. **Cryptosporidium and cryptosporidiosis**. Boca Raton: CRC Press. 1997. 251p.

- FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1305-1322, 2000.
- FAYER, R.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Zoonotic protozoa: from land to sea. **Trends Parasitology**, v. 20, n. 11, p. 531-536, 2004.
- FAYER, R.; SANTIN, M. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). **Veterinary Parasitology**, v. 164, n. 2-4, p. 192-200, 2009.
- FAYER, R.; XIAO, L. ***Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis**. Boca Raton: IWA Publishing, CRC Press, 2008. 576 p.
- FENG, X.; RICH, S. M.; AKIYOSHI, D.; TUMWINE, J. K.; KEKITIINWA, A.; NABUKEERA, N.; TZIPORI, S.; WIDMER, G. Extensive polymorphism in *Cryptosporidium parvum* identified by multilocus microsatellite analysis. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3344-3349, 2000.
- FENG, Y. *Cryptosporidium* in wild placental mammals. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 128-137, 2010.
- FENG, Y.; ORTEGA, Y.; HE, G.; DAS, P.; XU, M.; ZHANG, X.; FAYER, R.; GATEI, W.; CAMA, V.; XIAO, L. Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. **Veterinary Parasitology**, v. 144, p. 1-9, 2007.
- FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 110-140, 2011.
- FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patient; A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 4, p. 443-457. 2002.
- FORONDA, P.; BARGUES, M. D.; ABREU-ACOSTA, N.; PERIAGO, M.V.; VALERO, MA, VALLADARES B, et al. Identification of Genotypes of *Giardia intestinalis* of Human Isolates in Egypt. **Parasitology Research**, v. 103, p. 1177-1181, 2008.
- FRANCO, R. M. B. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em saúde pública. **Revista Panamericana de Infectologia**, São Paulo, v. 9, n. 4, p. 36-43. 2007.
- GARCIA, L. S. Pros and Cons of using preservatives for O & P fecal specimens. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 17, p. 164-167, 1995.
- GARCIA, L. S.; BRUCKNER, D. A. **Diagnostic Medical Parasitology**. 2.ed. Washington: American Society for Microbiology, p. 31-48, 1993.
- GARRIDO, L. E. M. ***Cryptosporidium parvum*: patógeno emergente de veiculação hídrica: desafios metodológicos de detecção ambiental**. 2003. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro, 2003.

GELANEW, T.; LALLE, M.; HAILU, A.; POZIO, E.; CACCIÒ, S. M. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Etiópia. **Acta Tropica**, v. 102, p. 92-99, 2007.

GENNARI, S. M.; SOUZA, S. **Giardiase**. Boletim Técnico. São Paulo [s.n.], [2002].

GRAAF, D. C.; VANOPDENBOSCH, E.; ORTEGA-MORA, L.M.; ABBASSI, H.; PEETERS, J. E. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. **International Journal for Parasitology**, v. 29. n. 8, p. 1269-1287, 1999.

GRECA, M. P. S. **Identificação molecular e filogenia de espécies de *Cryptosporidium* em cães e em gatos de Curitiba e região Metropolitana**. 2010. 93 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Universidade Federal do Paraná, Setores de Ciências Biológicas e da Saúde, Curitiba, 2010.

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. 1, p. 22, 2007.

HEALTH CANADA. **Guidelines for Canadian Drinking Water Quality Supporting Documentation. Protozoa: *Giardia* and *Cryptosporidium***. Disponível em <www.hc-sc.gc.ca.> Acesso em 04 de outubro de 2014.

HINRICHSEN, S. L. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 358-364, 2005.

HOPKINS, R. M.; MELONI, B. P.; GROTH, D. M.; WETHERALL, J. D.; REYNOLDSON, J. A.; THOMPSON, C. A. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. **Journal for Parasitology**, v. 83, p. 44-51, 1997.

HUNTER, P. R.; THOMPSON, A. R. C. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 11, p. 1181-1190, 2005.

IVANOV, A. I. *Giardia* and Giardiasis. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**. v. 13, n. 2, p. 65-80, 2010.

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, n. 4, p. 304–317, jul–ago, 2008.

JEX, A. R.; GASSER, R. B. Genetic richness and diversity in *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* reveals major knowledge gaps and a need for the application of “next generation” technologies-Research review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 1, p. 17-26, 2010.

JOHNSTON, S. P.; BALLARD, M. M.; BEACH, M. J.; CAUSER, L.; WILKINS, P. P. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 623-626, 2003.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia Veterinária**. 6ª ed. São Paulo: Editora Manole, p. 559, 584-585, 1997.

KATAGIRI, S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G. Zoonoses causadas por parasitas intestinais de cães e o problema do diagnóstico. **Arquivo do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 74, n. 2, p. 175-184, 2007.

KEELING, P. J. Reduction and compaction in the genome of the apicomplexan parasite *Cryptosporidium parvum*. **Developmental cell**, v. 6, n. 5, p. 614-616, 2004.

KINDLOVITS, A.; KINDLOVITS, L. M. Enfermidades parasitárias. In: KINDLOVITS, A.; KINDLOVITS, L. M. (Ed.). **Clínica e terapêutica em primatas neotropicais**. Rio de Janeiro, RJ: L.F. Livros de Veterinária Ltda, p. 211-244. 2009.

KIRKPATRICK, C. E. Giardiasis. **Veterinaria Clinical North American: Small Animal Practice**, v. 17, p. 1377-1387, 2007.

KOWALEWSKI, M. M.; SALZER, J. S.; DEUTSCH, J. C.; RAÑO, M.; KUHLENSCHMIDT, M. S.; GILLESPIE, T. R. Black and gold howler monkeys (*Alouatta caraya*) as sentinels of ecosystem health: Patterns of zoonotic protozoa infection relative to degree of human-primate contact. **American Journal of Primatology**, v. 73, n. 1, p. 75-83, 2011.

LALLO, M. A.; RODRIGUES, L. C. S.; BONDAN, E. F. Giardiase em cães e gatos– revisão. **Revista Clínica Veterinária**, v. 43, p. 40-44, mar.-abr., 2003.

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.; PEREIRA, A.; ARAÚJO, R.; FAVORITO, S. E.; BERTOLLA, P.; BONDAN, E. F. Ocorrência de *Giardia*, *Cryptosporidium* e microsporídios em animais silvestres em áreas de desmatamentos no Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1465-1470, ago. 2009.

LANGKJAER, R. B.; VIGRE, H.; ENEMARK, H. L.; MADDOX-HYTEL, C. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. **Parasitology**, v. 134, p. 339-350, 2007.

LEBBAD, M.; MATTSSON, J. G.; CHRISTENSON, B.; LJUNGSTRÖM, B.; BACKHANS, A.; ANDERSON, J. O. From mouse to mouse: Multilocus genotyping of *Giardia* isolates from various animal species. **Veterinary Parasitology**, v. 168, p. 231-239, 2010.

LEVECKE, B.; DORNY, P.; GEURDEN, T.; VERCAMMEN, F.; VERCRUYSSSE, J. Gastrointestinal protozoa in non-human primates of four zoological gardens in Belgium. **Veterinary Parasitology**, v. 148, p. 236-246, 2007.

LEVINE, N.D. **Veterinary Protozoology**. 5.ed. Ames: Iowa State University, 1985. 414 p.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L. *Cryptosporidium*. In: ATKINSON, C. T.; THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B. (Ed.). **Parasitic diseases of wild birds**. Ames, Iowa: Blackwell Publishing, p. 195-203, 2008.

LINDSAY, D. S.; ZAJAC, A. M. The Biology and Control of *Giardia* spp and *Tritrichomonas foetus*. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 39, n. 6, p. 993-1007, nov. 2009.

LÓPEZ-VÉLES, R. T. R.; GARCIA, C. A.; GOMEZ-MAMPASO, E.; GUERREIRO, A.; MOREIRA, V.; VILLANUEVA, R. Intestinal and extraintestinal cryptosporidiosis in AIDS patients. **European Journal of Clinical Microbiology e Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 677-681, 1995.

MACKENZIE, W. R.; HOXIE, N. J.; PROCTOR, M. E.; GRADUS, M. S.; BLAIE, K. A.; PETERSON, D. E.; KAZMIERCZAK, J. J.; ADDISS, D. G.; FOX, K. R.; ROSE, J. B.; DAVIS, J. P. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. **New England Journal of Medicine**, v.3. p. 161-167, 1994.

MANGINI, P. R.; SILVA, J. C. R. Medicina da conservação: aspectos gerais. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Ed.). **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, p. 1258-1268, 2007.

MARVULO, M. F. V. Zoonoses. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Ed.). **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, p. 1250-1256, 2007.

MEIRELES, M. V.; SOARES, R. M.; BONELLO, F.; GENNARI, S. M. Natural infection with zoonotic subtype of *Cryptosporidium parvum* in Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 1-2, p. 166-170, 2007.

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

MODOLO, J. R.; GONÇALVES, R. C.; KUCHEMUCK, M. R. G.; GOTTSCHALK, A. F. Ocorrência de criptosporidiose em bezerros na região de Botucatu - SP. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 10, n. 1, p. 9-10, 1988.

MONIS, P. T.; ANDREWS, R. H.; MAYRHOFER, G.; EY, P. L. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. **Infection, Genetics and Evolution**, v.3, p. 29-38, 2003.

MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. A. *Cryptosporidium* and *Giardia* - zoonoses: fact or fiction? **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3. n.4, p. 233-344, 2003.

MORGAN, U. M.; XIAO, L.; MONIS, P.; FALL, A.; IRWIN, P. J.; FAYER, R.; DENHOLM, K. M.; LIMOR, J.; LAL, A.; THOMPSON, A. R. C. *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**, Lages, v. 8, n. 2, p. 173-178, 2009.

MUNDIM, M. J. S.; SOUZA, S. Z.; HORTÊNCIO, S. M.; CURY, M. C. Frequência de *Giardia* spp. por duas técnicas de diagnóstico em fezes de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 6, p. 770-773, 2003.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G.; **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 454, 2010.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11ª ed. São Paulo: Atheneu, p. 5, 2005.

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

NISHI, L.; MELLO, G. C., FALAVINHA, D. L. M., DIAS, M. L. G., GUILHERME, A. L. F. Pesquisa de enteroparasitas em hortaliças provenientes de central de distribuição, Maringá, Paraná. **Arquivos da Apadec**, v. 8, (supl), 2004.

O'DONOGHUE, P. J. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis in Man and Animals. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 2, p. 139-195, 1995.

OLSON, M. E. **A Giardíase e o uso da vacinação para o controle da infecção**. [Sl: sn], 2000. 61p.

OLSON, M. E.; BURET, A. G. *Giardia* and Giardiasis. In: Samuel WN, Pybus MJ, Kocan AA. **Parasitic Diseases of Wild Mammals**. 2 ed. USA: Iowa State University Press, p. 399-415, 2001.

OLSON, B. E.; OLSON, M. E.; WALLIS, P. M. ***Giardia: the cosmopolitan parasite***. Wallingford, UK: CABI, 2002. 329 p.

OLSON, M. E.; O'HANDLEY, R. M.; RALSTON, B. J.; MCALLISTER, T. A.; THOMPSON, R. C. A. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. **Trends in Parasitology**, London, v. 20, n. 4, p. 185-191, 2011.

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.

PARRA, L.; GRECCO, F. **Giardíase canina: uma atualização**. São Paulo, SP. 2008.

PATZ, J. A.; GRACZYK, T. K.; GELLER, N.; VITTOR, A. Y. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1394-1405, 2000.

PAULINA, R. C. **Detecção molecular de *Giardia* sp em amostras fecais e água: extração de DNA genômico, PCR e RFLP**. 2005. 107 f. Tese (Doutorado em Saúde Humana e Animal) - Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, 2005.

PAULO, R. F. O desenvolvimento industrial e o crescimento populacional como fatores geradores do impacto ambiental. **Veredas do Direito**, v. 7, n. 13/14, p. 173-189, 2011.

PEREIRA, J. T.; SOCCOL, V. T.; COSTA, A. O.; CASTRO, E. A.; OSAKI, S. C.; PAULINO, R. C. *Cryptosporidium* spp.: para controlar é necessário conhecer. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 10, n. 2, p. 1-25, 2009.

PLUTZER, J.; ONGERTH, J.; KARANIS, P. Review: *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, 2010. p. 213.

PUTIGNANI, L.; TAIT, A.; SMITH, H. V.; HORNER, D.; TOVAR, D.; TETLEY, L.; WASTLING, J. M. Characterization of a mitochondrion-like organelle in *Cryptosporidium parvum*. **Parasitology**, v. 129, n. 1, p. 1-18, 2004.

READ, C. M.; MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. **Infection Genetics and Evolution**, v. 4, p. 125-130, 2004.

REY, L. **Parasitologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 731 p.

ROBERTSON, L. J.; HANEVIK, K.; ESCOBEDO, A. A.; MORCH, K.; LANGELAND, N. Giardiasis — Why do the symptoms sometimes never stop? **Trends Parasitology**, v. 26, n. 2, p. 75-82, fev. 2010.

ROBINSON, G.; WRIGHT, S.; ELWIN, K.; HADFIELD, S. J.; KATZER, F.; BARTLEY, P. M.; HUNTER, P. R.; NATH, M.; INNES, E. A.; CHALMERS, R. M. Re-description of *Cryptosporidium* cuniculus Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Morphology, biology and phylogeny. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 13, p. 1539-1548, 2010.

ROSEZ, K. V.; ALVES, F. A. R.; BLEICH, I. M. *Giardia*: uma infecção global. **Revista Nosso Clínico**, n. 26, p. 30-34, mar-abr. 2002.

RYAN, U.; XIAO, L.; READ, C.; ZHOU, L.; LAL, A. A.; PAVLASEK, I. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 4302-4307, 2003.

SAMUEL, W. M.; PYBUS, M. J.; KOCAN, A. A. **Parasitic diseases of wild mammals**. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 2001. 559 p.

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

SANTOS, R. C. F. **Importância de mamíferos neotropicais na epidemiologia de protozooses: diagnóstico, caracterização molecular e aspectos ecológicos da infecção por *Giardia* e *Cryptosporidium***. 2011. 165 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SANTOS, L. C.; MORAES, W.; CUBAS, Z. S.; CUROTTO, S. M. R.; SANTOS, R. C. F.; BARROFILHO, I. R.; BIONDO, A. W. **Occurrence of *Giardia* sp. (Mastigophora: Hexamitidae) in neotropical wild animals at the Bela Vista Sanctuary Itaipu Binational, Foz do Iguassu, Paraná: A retrospective study**. In: XV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 2008, Curitiba. Resumos, 2008. p. 186.

SILVA, A. S. D.; SOARES, C. D. M.; GRESSLER, L. T.; LARA, V. M.; CARREGARO, A.B.; MONTEIRO, S. G. Comunicação Científica. Criptosporidíase gastrointestinal em tamanduá-

mirim (*Tamandua tetradactyla*). **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 10, n. 2, p. 175-177, ago. 2008.

SILVA, J. C. R. **Zoonoses e doenças emergentes transmitidas por animais silvestres**. 2004. Disponível em: <<http://www.abravas.com.br/zoonoses%20e%20Doen%27as%20Emergentes.PDF>> . Acesso em: 20 de agosto de 2014. 03

SILVA, S. M. M. D. **Prevalência de *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* spp. em populações de cães de diferentes regiões do Município de Porto Alegre, RS, Brasil**. 2010, 138f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária, Porto Alegre, 2010.

SLAPETA, J. Naming of *Cryptosporidium* pestis is in accordance with the ICZN Code and the name is available for this taxon previously recognized as *C. parvum* 'bovine genotype'. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 1-2, p. 1-5, 2011.

SINSKI, E.; BEDNARSKA, M.; BAJER, M. The role of wild rodents in ecology of Cryptosporidiosis in Poland. **Folia Parasitology**, v. 45, p. 173-174, 1998.

SLIFKO, T. R.; SMITH, H. V.; ROSE, J. B. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. **International Journal for Parasitology**, Oxiford, v. 30, p. 1379-1393, 2000.

SMITH, H. V.; ROSE, J. B. Waterborne cryptosporidiosis: current status. **Parasitology Today**, v. 14, p. 14-22. 1998.

SMITH, H. V.; CACCIÒ, S. M.; TAIT, A.; MCLAUCHLIN, J.; THOMPSON, R. C. A. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. **Trends in Parasitology**, v. 22 n. 4, p. 160-167, 2006.

SMITH, H. V. CACCIÒ, S. M.; COOK, N.; NICHOLS, R. A.; TAIT, A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 149, n. 1-2, p. 29-40, 2007.

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

SOARES, J. F.; DA SILVA, A. S.; OLIVEIRA, C. B.; DA SILVA, M. K.; MARISCANO, G.; SALOMÃO, E. L.; MONTEIRO, S. G. Parasitismo por *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* sp. em *Coendou villosus*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 23-24, mar-abr. 2008.

SOGAYAR, R. Giardíase. In: FERREIRA, A.W., ÁVILA, S.L. M. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 250-254. 2001.

SOGAYAR, M. I. T. L.; GUIMARÃES, S. *Giardia lamblia*. In: NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 10. ed. São Paulo: Atheneu, cap. 14, p. 107-113. 2000.

SOUZA, M. C.; GONÇALVES, C. A.; BAIROS, V. A.; POAIRES-DA-SILVA, J. Adherence of *Giardia lamblia* Trophozoites to Int-407 Human Intestinal Cells. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Coimbra, v. 8, p. 258-265, 2000.

SOUZA, M. S. D. **Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em animais exóticos de companhia no Brasil**. 2013. 63 f. Dissertação (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária - UNESP, Campus de Araçatuba, 2013.

SOUZA, S. L. P.; GENNARI, S.M.; RICHTZENHAIN, L. J.; PENA, H. F. J.; FUNADA, M. R.; CORTEZ, A.; GREGORI, F.; SOARES, R. M. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of São Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (gdh) coding gene. **Veterinary Parasitology**, v. 3, p. 258-264. 2007.

SPÓSITO FILHA, E.; OLIVEIRA, S.M. Criptosporidiose. **Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 1, p. 17-19, jan-jun., 2009.

SPRONG, H.; CACCIÒ, S. M.; VAN DER GIESSEN, J. W. B., on behalf of the ZOOPNET network and partners. Identification of Zoonotic Genotypes of *Giardia duodenalis*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 12, p. 558, 2009.

STERLING, C. R.; ARROWOOD, M. J. Cryptosporidia. In: Julius P. Kreier, **Parasitic Protozoa**. Academic press, p. 159-225, 1992.

SULAIMAN, I. M.; FAYER, R.; LAL, A. A.; TROUT, J. M.; SCHAEFER, F. W.; XIAO, L. Molecular characterization of microsporidia indicates that wild mammals harbor host-adapted *Enterocytozoon* spp. as well as human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 4495-4501, 2003.

TAMBURRINI, A.; POZIO, E. Long-term survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and in experimentally infected mussels (*Mytilus galloprovincialis*). **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 5, p. 711-715, 1999.

TAVARES, W.; MARINHO, L. A. C. **Rotinas de Diagnóstico e Tratamento das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. São Paulo: Editora Atheneu, p. 221-224, 2005.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Veterinary Parasitology**. 3. ed. Blackwell Publishing, 2007. 600 p.

THOMPSON, R. C. A. Giardiasis as a re-emerging infectious diseases and its zoonotic potential. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1259-1267, 2000.

THOMPSON, R. C. A.; HOPKINS, R. M.; HOMAN, W. L. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammal. **Parasitology Today**, v. 16, n. 5, p. 210-217, 2000.

THOMPSON, R. C. A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, p. 15-35, 2004.

THOMPSON, R. C. A. *Echinococcus*, *Giardia* and *Cryptosporidium*: observational studies challenging accepted dogma. **Parasitology**, Cambridge, v. 136, n. 12, p. 1529-1535, 2009.

TRAUB, R.; WADE, S.; READ, C.; THOMPSON, A.; MOHAMMED, H. Molecular characterization of potentially zoonotic isolates of *Giardia duodenalis* in horses. **Veterinary Parasitology**, v. 130, p. 317-321, 2005.

TRAUB, R. J.; INPANKAEW, T.; REID, S. A.; SUTTHIKORNCHAI, C.; SUKTHANA, Y.; ROBERTSON, L. D.; THOMPSON, R. C. Transmission cycles of *Giardia duodenalis* in dogs and humans in temple communities in Bangkok - a critical evaluation of its prevalence using three diagnostic tests in the Field in the absence of a gold standard. **Acta Tropical**, v. 111, n. 2, p. 125-132, 2009.

TULI, L.; SINGH, D. K.; GULATI, A. K.; SUNDAR, S.; MOHAPATRA, T. M. A multiattribute utility evaluation of different methods for the detection of enteric protozoa causing diarrhea in AIDS patients. **BioMed Central: Microbiology**, London, v. 10, n. 11, jan., 2010. Disponível em <<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/11/abstract>> Acesso em 12 de setembro de 2015.

UNICEF-Fundo das Nações Unidas para a infância [Internet]. **Situação mundial da criança**, 2004. Disponível em: <<http://www.unicef.org/sowc98>> Acesso em 21 de janeiro de 2016.

VALENTIM, T.; CARDOZO, S. V. Avaliação qualitativa de oocistos de *Cryptosporidium* sp. em amostras fecais de pacientes atendidos no Instituto Fernandes Figueira/Fiocruz. **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v. 6, n. 1, p. 11-16, jan-jun., 2011.

VIGNARD-ROSEZ, K. S. F. V.; ALVES, F. A. R.; BLEICH, I. M. **Giardiase**. 2006. Disponível em <http://www.cepav.com.br/textos/t_giardia.htm> Acesso em 02 de abril de 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The World Health Report. **Fighting Disease Fostering Development**, Geneva, Switzerland. 1997.

WYNGAARDEN, J. B.; SMITH JR, L. H.; BENNETT, J. C. **Tratado de Medicina Interna**. 19ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 2, p. 2033-2035, 1993.

XIAO, L.; CAMA, V. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Food Microbiol and Food Safety. In: Ortega, Y.R., Doyle, M.P. **Foodborne Parasites**. Springer-Verlag New York, p. 57–108, 2006.

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

YANAI, T.; CHALIFOUX, L. V.; MANSFIELD, K. G.; LACKNER, A. A.; SIMON, M. A. Pulmonary Cryptosporidiosis in Simian Immunodeficiency Virus–infected Rhesus Macaques. **Veterinary Pathology Online**, v. 37, p. 472–475, 2000. Disponível em <<http://vet.sagepub.com/content/37/5/472>> Acesso em 04 de fevereiro de 2015.

4 CAPÍTULO I

***Cryptosporidium* spp. OOCYSTS AND *Giardia* spp. CYSTS IN COATIS (*Nasua nasua* L. 1766) FROM PARÁ, BRAZIL**



Original Article

***Cryptosporidium* spp. OOCYSTS AND *Giardia* spp. CYSTS IN COATIS (*Nasua nasua* L. 1766) FROM PARÁ, BRAZIL**

Darlene Kássia Saraiva Queiroz Pantoja¹, Washington Luiz Assunção Pereira¹, Marcella Kathyryne Marques Bernal¹, Heyde Araújo Tavares², Alana Luanni Messias da Silva², Mônica Cristina de Moraes Silva²

¹ Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA – Belém – Pará.

² Instituto Evandro Chagas – IEC – Ananindeua – Pará.

ARTICLE INFO

Article history

Received 29 May 2017

Received in revised form 25 July 2017

Accepted 31 July 2017

Keywords:

Enteroprotzoa

Procyonids

Zoonotic potential

ABSTRACT

Zoonotic enteroparasitosis represent an important public health problem, and species of protozoa such as *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. can reach high frequencies in regions where basic sanitation conditions are poor, which promotes outbreaks of diarrhea in humans and domestic and wild animals. Wild mammals such as the South American coati (*Nasua nasua*) feed on insects present in the soil, fruits, and small vertebrates, and are susceptible to contamination by enteroparasites present in the environmental niche. The aim of the present study was to investigate the occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in *N. nasua* from a region in the Brazilian Amazon. Fecal samples of 27 coatids two from free-living and 25 from captivity were collected in three different municipalities in the state of Pará, Brazil. The search for *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in the collected samples were performed using the direct and Kinyoun methods, respectively, and a commercial immunological test (RIDA@QUICK *Cryptosporidium*/*Giardia* Combi. @R-Biopharm) was used to detect antigens from both parasites. *Cryptosporidium* spp. oocysts were found in 11.1% (3/27) of the samples; one from a free-living animal and two from captive animals. *Giardia* spp. cysts were found in 11.1% (3/27) of the samples, all from captive animals. This is the first report of infection by these protozoans in this coati's species in the North region of Brazil; the South American coati may be participating as maintainers and disseminators of infectious agents to the environment and other hosts.

INTRODUCTION

Brazilian faunas are either free-living or in captive conditions living in zoological parks, conservation, scientific or commercial shelters, research institutes, or sorting and rehabilitation centers. These animals can be carriers and, therefore, reservoirs of zoonotic agents (SILVA, 2004). Lallo et al. (2009) report that anthropogenic environmental changes strongly affect the proliferation and occurrence of zoonotic parasitic diseases, such as cryptosporidiosis and giardiasis. However, studies on the zoonotic potential of protozoa from wild hosts is still incipient in Brazil (SOARES et al., 2008).

The South American coati (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766) is a wild, carnivorous mammal widely distributed in South America and it lives in all Brazilian biomes; they are abundant in most places where they occur, especially in intact habitats, and there are apparently no significant threats to this species, but their population is probably reducing due to hunting and habitat loss caused by human action (BEISIEGEL; DE CAMPOS, 2013).

The scientific literature on the occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in wild mammals presents varied data, which are dependent on the species, geographic location, host food preferences, and seasonality, and even on results of samplings and

* Corresponding author: lenakassia7@hotmail.com

diagnostic techniques used (APPELBEE, THOMPSON; OLSON, 2005).

Cryptosporidiosis can be caused by different species and subtypes of *Cryptosporidium* spp., and it affects different hosts. Clinical signs vary according to the host's age and health status, parasite species and subtype, and infectious dose (XIAO; FAYER, 2008).

In the most severe cases of this disease, the host can develop enteritis, colitis, cystitis, hepatitis, pancreatitis, and clinical respiratory symptoms such as sinusitis and pneumonia (CHALMERS; DAVIES, 2010). The period between ingestion of the oocysts and the occurrence of symptoms is 7 to 10 days, which can range from five to 28 days (PEREIRA et al., 2009).

Several factors affect the epidemiology of cryptosporidiosis: reduced and varied size of oocysts which allows their passage through filters usually employed in water treatment processes; low infectious doses the infectious dose of *C. parvum* ranges from 9 to 1,042 oocysts; and production of oocysts inside the hosts they are already infectious when eliminated by defecation, and both humans and animals participate as reservoirs of the agent in its biological cycle (SMITH et al., 2006). Other factors may contribute to the lack of information on the epidemiology of this parasite, such as the lack of the practice of disease notification by doctors and laboratories; moreover, the fecal tests used by most laboratories do not allow the identification of this parasite (VALENTIM; CARDOSO, 2011). Fayer and Xiao (2008) report that the *Cryptosporidium* spp. parasite load tends to be lower in wild mammals when compared to that found in domestic mammals.

From the epidemiological point of view, infection by *Giardia* spp. is more worrisome in animals because they show few clinical signs of infection and do not respond well to the treatments applied; thus, they serve as sources of infection because they can eliminate the *Giardia* spp. cysts through feces for months or even years (LALLO; RODRIGUES; BONDAN, 2003). The great majority of studies on *Giardia* spp. in wild mammals were made to evaluate the potential of these animals as reservoirs of disease for humans and cattle (APPELBEE; THOMPSON; OLSON, 2005).

Giardia spp. affects animals and humans, causing diarrhea the most common symptom and jeopardizes the digestion and absorption of food, which results in dehydration, weight loss, and death, especially in young animals and those with concomitant or debilitating diseases (MUNDIM et al., 2003). The number of cysts ingested by the host is an important factor for the pathogenesis of this disease. The ingestion of only 10 cysts is capable of causing the infection (LINDSAY; ZAJAC, 2009).

Cryptosporidium spp. and *Giardia* spp. are responsible for two of the most serious water-borne diseases. The scientific literature reports epidemiological studies on these agents in several hosts, including some wild species. However, there are no studies on captive or free-living *N. nasua* animals with infection from enteroprotezoa, in the state of Pará, Brazil. Therefore, the objective of this study was to present data on the occurrence of these agents in coati (*N. nasua*) from the North region of Brazil, and contribute to the already existing information on the environmental, human, and animal health risks.

MATERIAL AND METHODS

This study was approved by the SISBIO (license No. 39285) and by the Ethics Committee for the Use of Animals of the Federal Rural University of Amazonia (UFRA) (authorization protocol No. 034/2014 CEUA - 23084.022512/2014-18).

Twenty-seven fecal samples of *N. nasua* were collected and examined: two from free-living animals and 25 from captive animals. Free-living animals were considered animals that had been removed from their natural habitat and were kept in quarantine until their final destination of release or captivity.

Eight animals were classified as young and 19 as adults 11 females and 16 males. The samples were from animals from the municipalities of Belém Emílio Goeldi Museum of Pará, Rodrigues Alves Forest, Laboratory of Animal Pathology (LABOPAT) of the UFRA, Wildlife Clinic of the UFRA Veterinary Hospital, and Environmental Police Battalion (BPA); Capitão Poço Gavião Real Conservation Shelter; and Santarém Unama Zoo (ZOOUNAMA).

The species *Nasua nasua* (Linnaeus, 1766), the South American coati, from the family Procyonidae was identified by morphological observations made by veterinarians of the collection locations, based on a comparison of the characteristics of the species described by Reis et al. (2010). This coati has a wide distribution in South America and is the only specie that can be found in the biomes Amazonia, Caatinga, Cerrado, Pantanal, Atlantic Forest, and Southern Fields.

All animals were housed in individual cages that were previously sanitized and lined with brown paper. Samples were collected between March 2015 and February 2017 in the enclosures where the animals were housed. Samples were collected immediately after defecation and without the need for containment of the animals. The samplings from free-living animals were carried out during the first 24 hours of their arrival at the management site in order to exclude probable parasitic infection of the animal at the site. In the case of animals subjected to necropsy in the LABOPAT (only two

animals), the feces were collected directly from the animal's rectum. Data on sex, age, origin, and location were obtained for each animal.

Approximately 10 g of feces per animal were collected in the first hours of the collection days, or shortly after the animals were fed because feeding causes the animals to defecate more frequently. The material was immediately collected to avoid the environmental contamination of the samples. Subsequently, the samples were stored in sterile universal collection flasks without preservatives and kept under refrigeration until the analyses. The samples were processed within 48 hours after collection at the Laboratory of Enteroparasitosis in the Parasitology Department of the Evandro Chagas Institute in Ananindeua, Pará, Brazil. The central portion of the fecal samples was prioritized in the processing, due to its lower exposure to environmental contaminants.

The direct (lugol) and Kinyoun (modified Ziehl-Neelsen - ZNm) methods were used for the diagnosis of *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts, respectively. Two slides were prepared per sample and analyzed under light microscopy on 40x (for *Giardia* cysts) and 100x objectives (for *Cryptosporidium* oocyst).

A small aliquot of fecal material mixed with four to five drops of lugol was used on a glass slide and mounted under a cover slip (24x32 mm) for microscopic observation for the direct examination.

Two grams of feces were used for the modified Ziehl-Neelsen technique. The content was diluted and homogenized in a falcon-type tube containing 10 mL of buffered formalin that was filtered through folded gauze. Subsequently, about 4 mL of ether was added to the

filtrate for centrifugation (2000 rpm for 5 minutes). The smear was made with one drop of the sediment that was stained with carbol fuchsin and observed under a microscope.

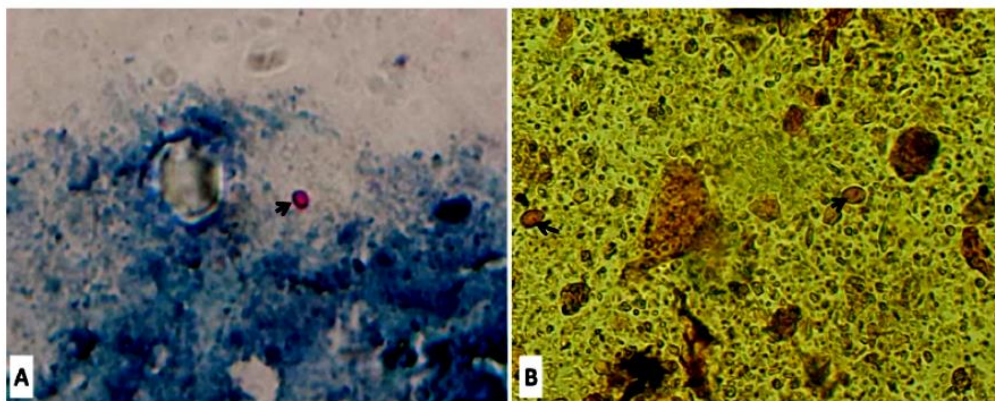
A commercial immunological method (RIDA@QUICK *Cryptosporidium/Giardia* Combi. ©R-Biopharm) was also employed to detect both parasite antigens simultaneously. The high indexes of sensitivity and specificity of this immunological method (above 90.0%) makes it a complementary tool for the microscopic diagnosis and increases the probability of detecting these parasites. Low rates of protozoa excretion in feces decreases the sensitivity of microscopic methods; therefore, the use of this method may also contribute to improved results.

The immunochromatographic test was performed according to the manufacturer's protocol. A homogenate was made using 50 mg of the sample that was diluted in 1 mL of extraction buffer. An aliquot of 0.5 ml of the obtained supernatant was placed in contact with the strips containing the antibodies, and the readings were carried out after five minutes.

RESULTS AND DISCUSSION

The positivity for *Cryptosporidium* spp. oocysts in *N. nasua* was 11.1% (3/27) (Figure 1), and was found in one young, male, free-living animal and in one male and one female captive adult animals. All three coatis had no diarrhea or any other clinical signs. The detection of *Giardia* spp. cysts was observed in 11.1% (3/27), all adult captive animals two males and one female; one of them had a clinical presentation of diarrhea (Figure 1). No co-infection was detected for both parasites.

Figure 1 - A. Positive sample for *Cryptosporidium* spp. oocysts stained by the modified Ziehl-Neelsen method (arrow). B. Positive sample for *Giardia* spp. cysts observed by the direct method (arrows).



Source: Author's collection.

Oocysts and cysts of the agents were observed in the microscopic analyses (direct and ZNm methods). However, the immunological test showed concordance of

results only for *Cryptosporidium* spp.; the diagnosis of *Giardia* spp. was positive only by the direct method. The *Giardia* cyst observed under microscopy probably does

not belong to the species *G. lamblia* for which the immunological test is indicated but to other species with *Giardia* spp. In addition, antigenic differences among the species of *G. lamblia* may have affected the results of the method. Molecular studies will aid in clarifying the observed disagreement; this shows the importance of using immunological tests for the diagnosis of these agents; they have the advantage of being fast, easy to perform, and do not require qualified technical personnel or equipment.

Occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. has been reported in *N. nasua* specimens from other regions, both in captive and free-living animals, which was also observed in this study. In 2008, Farret et al. were the first to report the occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in samples of *N. nasua* from Brazil that were kept in a conservation shelter in Rio Grande do Sul state. Among the three specimens studied, only one had positive diagnosis, presenting mixed infection from *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., and *Cystoisopora* spp. Subsequently, Bosa (2014) analyzed 128 fecal samples of mammals from the Municipal Zoo of Curitiba, Brazil, and all were negative for *Cryptosporidium* spp. The author used only specific techniques to detect *Cryptosporidium*, and did not perform search for *Giardia*.

More recently, Snak et al. (2015) examined fecal samples of seven captive *N. nasua* of the Municipal Zoo of Cascavel in Paraná, Brazil and found parasitism by *Cryptosporidium* spp. in three individuals.

Although only two specimens of free-living animals were evaluated in this study, the positive sample for *Cryptosporidium* spp. showed that this parasite occurs in *N. nasua* also in its natural habitat. However, this fact does not mean that parasitism by *Giardia* spp. is absent because both agents have the same mechanism of dissemination in the environment and have a great variety of hosts.

Studies in Brazil have demonstrated the circulation of these parasites in the wild environment. Dall'olio and Franco (2004) found high positivity (16.25%) for *Cryptosporidium* spp. when analyzing samples of 240 wild mammals that were captured in three areas of the Atlantic Forest. Holsback et al. (2013) studied 38 wild free-living animals in rehabilitation centers of the São Paulo and Mato Grosso do Sul states, Brazil, and found the presence of *Cryptosporidium* spp. in five animals. Three animals were positive for *Giardia* spp., and one of them was from the *N. nasua* species.

Paziewska et al. (2007) investigated the occurrence of *Cryptosporidium* spp. in wild mammals in Poland 14 gray wolves, which are carnivorous like *N. nasua* and obtained 36% positivity. The authors suggested that these animals are important natural sources for maintaining *Cryptosporidium* spp. in the environment.

In 2011, Beck et al. studied 131 samples of mammals belonging to 57 species from a zoo in Croatia, and found high occurrence (29.0%) of *Giardia* spp. using the immunofluorescence technique. The authors reported that none of the animals analyzed presented symptoms related to giardiasis; thus, contradicting to the data of this study: one of the positive coatis for this parasite had a clinical presentation of diarrhea. Complementary studies must be performed to clarify this correlation, since other infectious agents may cause diarrheal disease in animals.

However, the positive animals for *Cryptosporidium* spp. in this study were asymptomatic. A similar result was observed by Rasambainarivo et al. (2013) in Madagascar lemurs parasitized by *Cryptosporidium* spp. with negative results for *Giardia* spp. It is important to point out that infectious agents have different degrees of pathogenicity, and it is possible that not all parasitized hosts show clinical signs of infection or present sub-clinical infection. Therefore, these individuals are asymptomatic the main maintainers of the epidemic chain of agents, which contributes to the maintenance and dissemination of the agents in the environment.

Hodžić; Alić; Omeragić (2014) investigated 123 fecal samples of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Bosnia and Herzegovina, using immunofluorescence, and observed a prevalence of 3.2% *Cryptosporidium* spp. and 7.3% *Giardia duodenalis*.

More recently, Saki; Foroutan-rad; Asadpouri (2016) studied wild rodents in Ahvaz, Iran, using a ZNm technique and polymerase chain reaction (PCR) for *Cryptosporidium* spp. and found 3% of positive samples, which is a result slightly lower than that found in *N. nasua* in this study.

Bittner et al. (2010) stated that wild animals, both free-living and captive, might be infected with *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp., and that the interaction of these animals is increasing with humans; unfortunately, the number of complaints about coatis in houses and urban areas close to forest fragments is increasing because they are constantly seeking housing and food. The participation of *N. nasua* as well as other wild and domestic mammals as host reservoirs in the dissemination of such agents cannot be underestimated because of its direct effect on human, animal, and environmental health.

In epidemiological terms, a large variation of occurrence levels for *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in wild mammals from different regions of the country and the world is observed. Thus, new studies on wild animals within their environment will better clarify about the epidemiology of these agents in the Amazon region. Moreover, these parasites circulate more in captivity because of their maintenance and dissemination in these

environments, which shows the importance of periodic evaluations and identification of the probable sources of infection in the animals.

CONCLUSIONS

The study proves the presence of the agents *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in South American coati (*Nasua nasua*) that are kept in shelters in the state of Pará, Brazil. These animals can act as sources of infection for humans and other animals. This is the first report of infection by these protozoans in the *Nasua nasua* species in the North region of Brazil. Further molecular studies are needed to elucidate the pathogenic and zoonotic potential of these agents at the regional level.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Federal Rural University of the Amazon UFRA;
The Evandro Chagas Institute (IEC)/MS - Parasitology: Laboratory of intestinal enteroparasitosis;
The Environmental Police Battalion of the State of Pará (BPA-PA);
The Unama Zoo (ZOOUNAMA);
The Rodrigues Alves Forest;
The Emílio Goeldi Museum of Pará;
The Gavião Real Conservation Shelter.

REFERENCES

- APPELBEER, A. J.; THOMPSON, R. C. A.; OLSON, M. E. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife - Current status and future needs. *Trends Parasitol*, v. 21, n. 8, p. 370-376, 2005.
- BEISIEGEL, B. M.; DE CAMPOS, C. B. Avaliação do risco de extinção do Quati *Nasua nasua* (Linnaeus, 1766) no Brasil. A Avaliação do Estado de Conservação dos Carnívoros. *Biodiver Bras*, v. 3, n. 1, p. 269-276, 2013.
- BECK, R. et al. Prevalence and molecular typing of *Giardia* spp. in captive mammals at the zoo of Zagreb, Croatia. *Vet Parasitol*, v. 175, n. 1-2, p. 40-46, 2011.
- BITTNER, G. C. et al. Coati (*Nasua nasua*) attacks on humans: report. *Wilderness Environ Med*, n. 21, p. 349-52, 2010.
- BOSA, C. R. Detecção e identificação de *Cryptosporidium* spp. tyzzer, 1907 em fezes de animais e em água do Zoológico Municipal de Curitiba, Paraná, Brasil. 2014. 109 f. Tese (Doutorado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.
- CHALMERS, R. M.; DAVIES, A. P. Minireview: clinical cryptosporidiosis. *Exp Parasitol*, v. 124, p. 138-146, 2010.
- DALL'OLIO, A. J.; FRANCO, R. M. B. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em pequenos mamíferos silvestres de três áreas serranas do Sudeste brasileiro. *Arq Bras Med Vet Zoot*, v. 56, n. 1, p. 25-31, 2004.
- FARRET, M. H. et al. Parasitismo por protozoários gastrointestinais em carnívoros silvestres mantidos em cativeiro no sul do Brasil. *RPCV*, v. 103, p. 93-95, 2008.
- FAYER, R.; XIAO, L. *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis*. Boca Raton: IWA Publishing, CRC Press, 2008. 576 p.
- HODŽIĆ, A.; ALIĆ, A.; OMERAGIĆ, J. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in red Foxes (*Vulpes vulpes*) in Bosnia and Herzegovina. *Mac Vet Ver*, v. 37, n. 2, p. 189-192, 2014.
- HOLSBACK, L. et al. Infecção natural por endoparasitas em animais silvestres de vida-livre. *Rev Bras Parasitol Vet*, v. 22, n. 2, p. 302-306, 2013.
- LALLO, M. A.; RODRIGUES, L. C. S.; BONDAN, E. F. Giardiase em cães e gatos- revisão. *Rev Clín. Vet*, v. 43, p. 40-44, mar.-abr., 2003.
- LALLO, M. A.; et al. Ocorrência de *Giardia*, *Cryptosporidium* e microsporídios em animais silvestres em áreas de desmatamentos no Estado de São Paulo, Brasil. *Ciêñ Rural*, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1465-1470, ago. 2009.
- LINDSAY, D. S.; ZAJAC, A. M. The Biology and Control of *Giardia* spp. and *Trichomonas foetus*. *Vet Clin N Am: Small Anim Pract*, v. 39, n. 6, p. 993-1007, 2009.
- MUNDIM, M. J. S. et al. Frequência de *Giardia* spp. por duas técnicas de diagnóstico em fezes de cães. *Arq Bras Med Vet Zoot*, v. 55, n. 6, p. 770-773, 2003.
- PAZIEWSKA, A. et al. Distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. In selected species of protected and game mammals from north-eastern Poland. *Ann Agric Environ Med*, v. 14, p. 265-270, 2007.
- PEREIRA, J. T. et al. *Cryptosporidium* spp.: para controlar é necessário conhecer. *Rev Saúde Amb*, v. 10, n. 2, p. 1-25, 2009.
- RASAMBAINARIVO, F. T. et al. Survey of *Giardia* and *Cryptosporidium* in lemurs from the Ranomafana National Park, Madagascar. *J Wildl Dis*, v. 49, n. 3, p. 741-743, 2013.
- REIS, N. R. et al. *Mamíferos do Brasil: guia de identificação*. Ed1ª. Technical Books Editora, 2010, p.490.
- SAKI, J.; FOROUTAN-RAD, M.; ASADPOURI, R. Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp. in Wild Rodents of Southwestern Iran Using 18s rRNA Gene Nested-PCR-RFLP and Sequencing Techniques. *J Trop Med*. Article ID 6834206, 6 p. 2016.
- SILVA, J. C. R. Zoonoses e doenças emergentes transmitidas por animais silvestres. 2004. Disponível em: <<http://www.abravas.com.br/03zoonoses%20e%20Doen%E7as%20Emergentes.PDF>> . Acesso em: 20 de agosto de 2014.
- SMITH, H. V. et al. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. *Trends Parasitol*, v. 22 n. 4, p. 160-167, 2006.
- SNAK, A. et al. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em animais silvestres do Parque municipal de Cascavel, Paraná, Brasil. *Semin: Cien Agrar*, v. 36, n. 6, suplemento 2, p. 4323-4332, 2015.
- SOARES, J. F. et al. Parasitismo por *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* sp. em *Coendou villosus*. *Ciêñ Rural*, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 23-24, 2008.
- VALENTIM, T.; CARDOZO, S. V. Avaliação qualitativa de oocistos de *Cryptosporidium* sp. em amostras fecais de pacientes atendidos no Instituto Fernandes Figueira/Fiocruz. *Saúde Amb Rev*, Duque de Caxias, v. 6, n. 1, p. 11-16, 2011.
- XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int J Parasitol*, v. 38, n. 11, p. 1239-1255, 2008.

5 CAPÍTULO II

Cryptosporidium and *Giardia* in captive primates

Artigo submetido ao *Journal of Medical Primatology*.

Cryptosporidium and *Giardia* in captive primates

Darlene Kássia Saraiva Queiroz Pantoja¹

Washington Luiz Assunção Pereira²

Fernanda Figueiredo Mendes²

Maria Geiciane Manço Souza³

Dayane Novais da Luz Brito⁴

Thais Lopes Chaves Santos⁴

Amanda Desirée Assunção Cecim⁵

Mônica Cristina de Moraes Silva⁶

¹Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Brasil.

²Docente da Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Brasil.

³Residente da Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Brasil.

⁴Bolsista Pibic, Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Brasil.

⁵Biomedica autônoma

⁶Pesquisadora do Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Brasil.

Correspondence:

Darlene Kássia Saraiva Queiroz Pantoja. Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Brasil.

E-mail: lenakassia7@hotmail.com

Abstract

Background: This study aimed to diagnose the presence of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in captive primates in the State of Pará, in the Amazon region, Brazil.

Methods: Fecal samples were collected from 13 species of primates, totaling 76 samples in the State of Pará, Amazon region, Brazil. To search for *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp., the direct and modified Ziehl-Neelsen methods, respectively, and a RIDA[®]QUICK

Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba Combi (N1722) commercial immunological test were used for the detection of both agents.

Results: Of 76 samples, 10.5% (8/76) and 5.2% (4/76) were positive for *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp, respectively. Corresponding to 14.4% (11/76) of parasitized animals, with 1.3% (1/76) of concomitant infection.

Conclusions: *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. are present in primates kept captive in the State of Pará, Brazil, and the presence of infected animals should be considered as a zoonotic risk factors in these farms.

Keywords

cryptosporidiosis, giardiasis, wild mammals, captivity.

Introduction

Researches related to occurrence of gastrointestinal parasitism in captive nonhuman primates are important for managing their populations and maintaining the health of people who handle these animals, since many of their parasitic agents can cause zoonotic diseases¹. However, the zoonotic potential of protozoa from wild hosts is little studied in Brazil².

Regarding the transmission of parasites by wild animals, studies point out that zoos are considered sources of information because they provide natural environments for the animals. However, the concentration of different species of animals in small spaces and their contact with humans generate conditions for the emergence and dissemination of zoonotic diseases³.

Cryptosporidiosis is a parasitic disease that can be caused by different species and subtypes of the genus *Cryptosporidium*, and affect different animal species. Its clinical signs

may vary according to the host age and health status, and species or subtype, and infection level of the parasite⁴.

Cryptosporidium spp. are tiny coccidian; its oocysts had a diameter of 4 to 8 μm , depending on the species, and development stage⁵. Oocysts are resistant coccidia⁶ that have characteristics that favor their rapid dispersion in the environment, such as the ability to withstand the action of commonly used disinfectants (formaldehyde, phenol, ethanol, lisol), cross certain filtration systems due to their small size, float, remain in the environment for weeks or months, and tolerate certain ranges of temperature and salinity⁷.

Since its recognition in 1907, the infectivity and pathogenesis of *Cryptosporidium* spp. have not yet been fully understood. At first, it was believed to be a problem exclusively of animals⁸. However, studies have shown that its transmission can occur directly between animals, between humans, and from animals to humans, or indirectly through ingestion of contaminated water or food with viable oocysts⁹. The period between ingestion of oocysts and onset of symptoms is 7 to 10 days, but it can range from 5 to 28 days¹⁰.

Regarding the symptoms, the host can develop enteritis, colitis, cystitis, hepatitis, pancreatitis, and respiratory clinical manifestations such as sinusitis and pneumonia in more severe cases of the disease¹¹.

In Brazil, little is known about cryptosporidiosis in wild animals. The difficulties in accessing their natural habitats, restrictions by environmental agencies, and difficulties in handling these animals are some of the limiting factors for researches on *Cryptosporidium* spp.¹². However, these coccidia have been reported in some Brazilian primate species, such as *Callithrix jacchus* (common marmoset), *Ateles belzebuth* (white-bellied spider monkey), and *Saimiri sciureus* (common squirrel monkey)¹³.

Giardiasis is a major disease caused by *Giardia* spp. that affect animals and humans, causing diarrhea its most common symptom, impairment of digestion and absorption of food, dehydration, weight loss, and death, especially in young animals with concomitant or debilitating diseases¹⁴.

The most common clinical manifestation of giardiasis is diarrhea, and it is accompanied by abdominal pain, which may be acute, chronic, or interspersed with normal defecation. It results in foul-smelling, pasty or liquid, light gray color feces that often contain mucus¹⁵.

The animals eliminate giardia cysts in feces after a prepatent period of one to two weeks. Within this time, the hosts may present clinical signs of the disease¹⁶. In most cases, adult animals are asymptomatic carriers, thus, they contribute to the distribution of cysts from this parasite in the environment, which may contaminate other animals and humans¹⁷.

Epidemiological studies, related to wild animals, report *Giardia* spp. in less than 1% to 100% of the animals; it is more common in captive animals, since their environment favors the dissemination of this pathogen¹⁸.

Moreover, wild animals kept in captivity present high levels of stress, which is the main factor for the transmission of pathogens among animals that are in the same environment, since stress generates immunosuppression¹⁹.

Thus, Neotropical mammals and their inherent risks to human, animal, and environmental health should not be overlooked in the epidemiology of cryptosporidiosis and giardiasis²⁰. Therefore, this study sought a better epidemiological understanding of the occurrence of cryptosporidiosis and giardiasis in nonhuman primate species found in the State of Pará, Brazil, aiming to contribute to the information on animal health in captive environments and risks of these zoonotic diseases to humans.

Materials and Methods

This study was approved by the Biodiversity Authorization and Information System (SISBIO; license Nº. 39285), and the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Federal Rural University of the Amazon (UFRA) authorization protocol Nº. 034/2014, CEUA 23084.022512/2014-18.

Fecal samples from 76 captive Neotropical primates from nurseries in the State of Pará, Brazil, were collected in the enclosures in which the animals were kept between March 2015 to February 2017.

These primates were from 13 different species 27 *Sapajus apella* (Tufted capuchin), 17 *Ateles paniscus* (red-faced spider monkey), 8 *Ateles marginatus* (white-cheeked spider monkey), 7 *Saimiri sciureus* (common squirrel monkey), 5 *Leontopithecus rosalia* (golden lion tamarin), 4 *Saguinus niger* (black tamarin), 2 *Aotus azarae* (southern night monkey), 1 *Callithrix jacchus* (common marmoset), 1 *Callicebus hoffmannsi* (Hoffmann's titi), 1 *Cebus albifrons* (white-fronted capuchin), 1 *Chiropotes albinasus* (white-nosed saki), 1 *Lagothrix lagotricha* (brown woolly monkey), and 1 *Callithrix penicillata* (black-tufted marmoset) comprising 4 young and 72 adult animals, 33 females and 43 males.

These animals were from the municipalities of Belém (Emílio Goeldi Pará State Museum, Rodrigues Alves Woods, Wildlife Clinic of the Veterinary Hospital of the UFRA, and Environmental Police of the State of Pará); Capitão Poço (Gavião Real Conservationist nursery); Santarém (Unama Zoo); Marabá (Zoobotanical Foundation), and Terra Alta (Paricuiã Farm), in the state of Pará, Brasil.

All animals were kept in sanitized individual cages with brown paper underneath to avoid environmental contamination of the collected material. The samples were collected immediately after defecation, without containment of the animals, and associated with data

regarding their sex, age, origin, and location, collecting the greatest possible amount of fecal material per animal.

The samples were collected in the early hours of the day or shortly after the feeding of the animals periods in which they defecate more frequently. The feces were then placed in sterile collection bottles with no preservatives, and kept under refrigeration until analysis.

The samples were processed within 48 hours in the Enteroparasitosis Laboratory of the Parasitology Section of the Evandro Chagas Institute (Ananindeua PA, Brazil). The central portion of the feces was prioritized for processing because it had have less exposure to environmental contaminants that can affect the results of the analyses.

Cysts of *Giardia* spp. and oocysts of *Cryptosporidium* spp. were searched using the direct method (lugol) and Kinyoun staining (modified Ziehl-Neelsen method), respectively. Two slides per sample were prepared and analyzed with a light microscope, using a 40x objective for *Giardia* spp. and a 100x objective for *Cryptosporidium* spp.

The direct examination was carried out using a small aliquot of fecal material from different parts of the feces, which was mixed with four to five drops of lugol on a glass slide, numbered, covered with a 24 mm x 32 mm cover slip, and observed with a microscope.

The modified Ziehl-Neelsen technique was carried out using two grams of feces, which were diluted and homogenized in 10 mL of buffered and filtered formalin. Then, 4 mL of ether was added to the filtrate for centrifugation (2000 rpm for 5 minutes). One drop of the sediment was smeared in a slide, stained with carbol fuchsin, and observed with a microscope.

A commercial immunological method (RIDA®QUICK *Cryptosporidium* / *Giardia* / *Entamoeba* Combi Test, N1722) that detects the parasite antigens simultaneously was also used. The use of feces with low rates of protozoa decreases the sensitivity of microscopic methods, so the use of this method may improve the results making them more reliable.

The immunochromatographic test was carried out according to the manufacturer's protocol. A homogenate with 50 mg of the diluted sample in one mL of extraction buffer was made, an aliquot of 0.5 mL of the obtained supernatant was placed in contact with the strips containing the antibodies, and the samples were read after five minutes.

Results

The results were positive for *Cryptosporidium* spp. in 10.5% (8/76), and for *Giardia* spp. in 5.2% (4/76) of the 76 fecal samples, with 1.3% (1/76) presenting infection with both agents, totaling 14.4% (11/76) of parasitized samples.

The positive samples for *Cryptosporidium* spp. were from three young animals and five adults, three females and five males, from Belém, Capitão Poço, Santarém, Marabá and Terra Alta.

Three of the eight positive samples for *Cryptosporidium* spp. oocysts by the ZNm method were positive in the immunological test. The *Cryptosporidium* species observed in the ZNm test probably do not belong to the *C. parvum* species to which the immunochromatographic test is indicated.

Three of the primate species evaluated showed positivity for *Cryptosporidium* spp.—*Ateles paniscus* (red-faced spider monkey) (5/8), *Saimiri sciureus* (common squirrel monkey) (2/8), and *Aotus azarae* (southern night monkey) (1/8). One young male *S. sciureus* (common squirrel monkey) from Belém presented concomitant infection with *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp.

The four primate species that showed positivity for *Giardia* spp. consisted of one young animal and three adults, two females and two males, from Belém, Capitão Poço and Santarém.

Three positive samples for *Giardia* spp. by the direct method, with observation of cysts of the parasite, were positive in the immunological test. The *Giardia* species observed with the direct method in one of the positive animals probably do not belong to the *G. lamblia* species to which the immunochromatographic test is indicated.

Four of the 13 species were positive for *Giardia* spp.—one *Ateles paniscus* (red-faced spider monkey), one *Saimiri sciureus* (common squirrel monkey), one *Sapajus apella* (Tufted capuchin), and one *Chiropotes albinasus* (white-nosed saki). Considering all the animals studied, five species were infected with *Giardia* spp.

Discussion

The circulation of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in captive environments in the State of Pará, Brazil, was confirmed. Thus, these pathogens can cause diarrheal diseases, leading to weakness and immunosuppression in captive animals in this state. The contamination of these animals by these pathogens usually occurs by ingestion of contaminated water, as observed in a study carried out on captive nonhuman primates of the genus *Alouatta* in Santa Maria RS, Brazil, where the presence of oocysts of *Cryptosporidium* spp. and other agents in the water offered to the animals was confirmed, with two animals presenting infection by *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp., and diarrhea with fetid odor²¹.

None of the animals in the present study had any clinical signs of these diseases, thus, they were asymptomatic carriers that release cysts and oocysts from these agents to the environment, which may contaminate other animals, as well as people who have contact with them. Some wild species or groups are more sensitive to protozoan infections, manifesting clinical signs even when adults and immunocompetent¹⁸.

A study carried out in China on 34 different species of captive nonhuman primates from laboratory and natural environments, using 3349 samples from 17 different districts, showed no animal with clinical symptoms of parasitic diseases during the evaluation period. The authors examined samples microscopically, using iodine staining, and 100x and 400x objectives, and found parasitic infections in 54.1% (1811/3349), positivity for *Giardia* spp. in 1.3% (43/3349), and positivity for *Cryptosporidium* spp. in 0.5% (18/3349) of the samples, and no simultaneous infection with these agents²². The infection rates in the present study were higher for both agents, however, the sample size was much lower.

Cryptosporidiosis has been studied in nonhuman primates in different parts of the world. In an experiment using two *Macaca mulatta* (rhesus macaques) specimens infected with the Simian Immunodeficiency Virus (SIV), the animals presented diarrhea, respiratory symptoms, and after euthanasia, lesions were identified in their trachea, lungs, biliary tract, pancreas, and intestine, with presence of *Cryptosporidium* spp. in the cytoplasm of alveolar macrophages, multinucleated giant cells, and cells of the intestinal epithelium²³. The study evidenced that the infection by *Cryptosporidium* spp. can be aggravated in cases of immunosuppression. Thus, although the animals evaluated in the present study did not present any clinical signs, the presence of the parasite cannot be neglected.

A study on the presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in nonhuman primates in Belgium found a high prevalence of *G. enterica* and no occurrence of *Cryptosporidium* spp.²⁴. Contrastingly, positivity was observed for both agents in the present study. However, the results obtained for *Giardia* spp. (5.2%) presented a low percentage when compared to a study carried out in northern Argentina, in which the analysis of fecal samples of 90 *Alouatta caraya* (black howler monkey) specimens showed 67% positivity for *Giardia*

spp. in rural animals, 57% in animals from a native forest, and 40% in animals from areas near villages, indicating that this mammalian species may be a significant carrier of *Giardia* spp.²⁵.

A study carried out on eight species of nonhuman primates from different locations in the Qinling Mountains, northwest China, with 197 fecal samples, showed positivity for parasites in 17.8% (35/197), including *Cryptosporidium* spp. (3%) and *G. intestinalis* (2%). *Cryptosporidium* spp. was detected in six fecal samples of *Macaca mulatta* and were identified as *C. parvum* (n = 1) and *C. andersoni* (n = 5) this was the first report on *C. andersoni* in nonhuman primates. Positivity for *G. intestinalis* was also detected in three *M. mulatta* and one *Saimiri sciureus*²⁶.

A study on eight captive nonhuman primates of the *Alouatta* genus in Santa Maria RS, Brazil, diagnosed parasitism by *Cryptosporidium* spp. in 100% of the fecal samples, using the zinc sulfate centrifugal flotation method, and three animals with concomitant infection with *Giardia* spp.²⁷.

Different results from the present study were found in the State of Piauí. Feces samples of 22 *Cebus libidinosus* (black-striped capuchin) animals raised in captivity were not positive for *Cryptosporidium* spp. or *Giardia* spp.¹.

The presence of these parasitic agents in captive animals favors their maintenance and dissemination in these environments, and shows the importance of periodic evaluations and identification of possible sources of infection for the animals, especially water.

The results of researches show the necessity of developing forms to control parasitic infectious diseases. Some authors point out ways of reducing the risk of transmission of cryptosporidiosis in captive environments, such as reduction of animal population density, isolation of sick animals, separation of young from adult animals, and use of good hygienic-sanitary practices²⁸.

The present research proves the presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in captive nonhuman primates in nurseries in the Amazon region (state of Pará, Brazil), and reaffirms that such animals can act as sources of infection for humans and other animals.

Acknowledgements

This work was conducted in Universidade Federal Rural da Amazônia in partnership of Instituto Evandro Chagas.

References

- ¹ALCÂNTARA, D. S.; MENDONÇA, I. L.; FERNANDES NETO, V. P.; CARNIEL, P. G.; PESSOA, F. B. Estudo coproparasitológico da espécie *Cebus libidinosus* (macaco-prego). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.68, n.6, p.1609-1612, 2016.
- ²SOARES, J. F.; DA SILVA, A. S.; OLIVEIRA, C. B.; DA SILVA, M. K.; MARISCANO, G.; SALOMÃO, E. L.; MONTEIRO, S. G. Parasitismo por *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* sp. em *Coendou villosus*. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 23-24, 2008.
- ³CABRAL, D. D.; BARBOSA, F. C.; STRASSER, C.; BARSOTTI, S. R. H. Exame de fezes de mamíferos silvestres para verificação de parasitismo por *Cryptosporidium* sp. *Bioscience Journal*, v. 17, n. 1. p. 77-83, 2001.
- ⁴XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International Journal Parasitology*, Oxford, v. 38, n. 11, p. 1239-1255, 2008.
- ⁵BOWMAN, D. D.; LYNN, R. C.; EBERHARD, M. L. *Georgis' Parasitology for veterinarians*. 8. ed. Madrid: Elsevier, p. 102-103, 2004.
- ⁶CAREY, C. M.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Research*, v. 38, n. 4, p. 818-862, 2004.
- ⁷FAYER, R.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Zoonotic protozoa: from land to sea. *Trends Parasitology*, v. 20, n. 11, p. 531-536, 2004.
- ⁸CHAPPELL, C.; OKHUYSEN, P.; WHITER, J. R. C. *Cryptosporidium parvum: infectivity, pathogenesis and the host-parasite relationship*. In. THOMPSON, A., ARMSSON, A.; RYAN, U. M. *Cryptosporidium: from molecules to disease*. Amsterdam: Elsevier. p. 9-19, 2003.

- ⁹FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, v. 30, n. 12-13, p. 1305-1322, 2000.
- ¹⁰PEREIRA, J. T.; SOCCOL, V. T.; COSTA, A. O.; CASTRO, E. A.; OSAKI, S. C.; PAULINO, R. C. *Cryptosporidium* spp.: para controlar é necessário conhecer. *Revista Saúde e Ambiente*, v. 10, n. 2, p. 1-25, 2009.
- ¹¹CHALMERS, R. M.; DAVIES, A. P. Minireview: clinical cryptosporidiosis. *Experimental Parasitology*, v. 124, p. 138-146, 2010.
- ¹²DA SILVA, A. S.; SOARES, C. D. M.; GRESSLER, L. T.; LARA, V. M.; CARREGARO, A.B.; MONTEIRO, S. G. Comunicação Científica. Criptosporidíase gastrointestinal em tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*). *Revista Brasileira de Zootecias*, v. 10, n. 2, p. 175-177, ago. 2008.
- ¹³KINDLOVITS, A.; KINDLOVITS, L. M. Enfermidades parasitárias. In: KINDLOVITS, A.; KINDLOVITS, L. M. (Ed.). *Clínica e terapêutica em primatas neotropicais*. Rio de Janeiro, RJ: L.F. Livros de Veterinária Ltda, p. 211-244. 2009.
- ¹⁴MUNDIM, M. J. S.; SOUZA, S. Z.; HORTÊNCIO, S. M.; CURY, M. C. Frequência de *Giardia* spp. por duas técnicas de diagnóstico em fezes de cães. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 55, n. 6, p. 770-773, 2003.
- ¹⁵SOUZA, M. C.; GONÇALVES, C. A.; BAIROS, V. A.; POAIRES-DA-SILVA, J. Adherence of *Giardia lamblia* Trophozoites to Int-407 Human Intestinal Cells. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, Coimbra, v. 8, p. 258-265, 2000.
- ¹⁶VIGNARD-ROSEZ, K. S. F. V.; ALVES, F. A. R.; BLEICH, I. M. *Giardiase*. 2006. Disponível em <http://www.cepav.com.br/textos/t_giardia.htm> Acesso em 02 de abril de 2014.
- ¹⁷BARR, S. C. BOWMAN, D. D. *Doenças infecciosas e parasitárias em cães e gatos - consulta em 5 minutos*. 1. ed. São Paulo: Revinter, 2010. 640p.
- ¹⁸SAMUEL, W. M.; PYBUS, M. J.; KOCAN, A. A. *Parasitic diseases of wild mammals*. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 2001. 559 p.
- ¹⁹MARVULO, M. F. V. Zoonoses. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Ed.). *Tratado de animais selvagens: medicina veterinária*. São Paulo: Roca, p. 1250-1256, 2007.
- ²⁰FENG, Y. *Cryptosporidium* in wild placental mammals. *Experimental Parasitology*, v. 124, n. 1, p. 128-137, 2010.

- ²¹DA SILVA; A. S.; GRESSLE, L.T.; LARA, V.M.; MONTEIRO, S.G.; CARREGARO, A.B. Protozoários gastrintestinais em Buggios (*Alouattasp.*) mantidos em cativeiro. *Ciênc. Anim. Bras.*, v. 10, p. 669-672, 2009.
- ²²LI, J.; DONG, H.; WANG, R.; YU, F.; WU, Y.; CHANG, Y.; WANG, C.; QI, M.; ZHANG, L. An investigation of parasitic infections and review of molecular characterization of the intestinal protozoa in nonhuman primates in China from 2009 to 2015. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, v. 6, p. 8-15, 2017.
- ²³YANAI, T.; CHALIFOUX, L. V.; MANSFIELD, K. G.; LACKNER, A. A.; SIMON, M. A. Pulmonary Cryptosporidiosis in Simian Immunodeficiency Virus–infected Rhesus Macaques. *Veterinary Pathology Online*, v. 37, p. 472–475, 2000. Disponível em <<http://vet.sagepub.com/content/37/5/472>> Acesso em 04 de fevereiro de 2015.
- ²⁴LEVECKE, B.; DORNY, P.; GEURDEN, T.; VERCAMMEN, F.; VERCRUYSSSE, J. Gastrointestinal protozoa in non-human primates of four zoological gardens in Belgium. *Veterinary Parasitology*, v. 148, p. 236-246, 2007.
- ²⁵KOWALEWSKI, M. M.; SALZER, J. S.; DEUTSCH, J. C.; RAÑO, M.; KUHLENSCHMIDT, M. S.; GILLESPIE, T. R. Black and gold howler monkeys (*Alouatta caraya*) as sentinels of ecosystem health: Patterns of zoonotic protozoa infection relative to degree of human-primate contact. *American Journal of Primatology*, v. 73, n. 1, p. 75-83, 2011.
- ²⁶Du, S.; Zhao, G.; Shao, J.; Fang, Y.; Tian, G.; Zhang, L.; Wang, R.; Wang, H.; Qi, M.; Yu, S. *Cryptosporidium* spp., *Giardia intestinalis*, and *Enterocytozoon bieneusi* in Captive Non-Human Primates in Qinling Mountains. *Korean J Parasitol*, v. 53, n. 4, p. 395-402, 2015.
- ²⁷CARVALHO, T. T. R. Estado atual do conhecimento de *Cryptosporidium* e *Giardia*. *Revista de Patologia Tropical*, v. 38, n. 1, p. 1-16, jan-mar, 2009.
- ²⁸RAMÍREZ-BARRIOS, R. A.; BARBOZA-MENA, G.; MUNOZ, J.; ANGULOCUBILLAN, F.; HERNANDEZ, E.; GONZALEZ, F.; ESCALONA, F. Prevalence of intestinal parasites in dogs under veterinary care in Maracaibo, Venezuela. *Veterinary Parasitology*. v. 121, n. 1-2, p.11-20, 2004.

6 CAPÍTULO III

Cryptosporidium spp. e *Giardia* spp. em carnívoros silvestres do Estado do Pará - Brasil

Artigo a ser submetido à revista *Ciência Rural*.

***Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em carnívoros silvestres do Estado do Pará - Brasil**

Cryptosporidium spp. and *Giardia* spp. in wild carnivorous animals the State of Pará - Brazil

Darlene Kássia Saraiva Queiroz Pantoja¹

Mônica Cristina de Moraes Silva²

Dayane Novais da Luz Brito³

Thais Lopes Chaves Santos³

Marcella Katheryne Marques Bernal⁴

Heyde Araújo Tavares⁵

Washington Luiz Assunção Pereira⁶

¹Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA, Brasil.

²Pesquisadora do Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, PA, Brasil.

³Bolsista Pibic, Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, PA, Brasil.

⁴Mestranda do Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA, Brasil.

⁵Biomedica, Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, PA, Brasil.

⁶Docente da Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA, Brasil.

RESUMO:

Cryptosporidium spp. e *Giardia* spp., são protozoários zoonóticos que representam um emergente problema de saúde pública. Esses parasitos podem apresentar elevada frequência em regiões em que as condições de saneamento básico são precárias, promovendo surtos de diarreia em animais domésticos, silvestres e no homem. Mamíferos silvestres, como os carnívoros, são susceptíveis à contaminação por enteroparasitas presentes tanto no *habitat* natural como em cativeiro. O presente estudo investigou a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em diferentes espécimes silvestres da ordem Carnívora de vida livre e de cativeiro procedentes de municípios do Estado do Pará. Coletou-se amostras fecais de 37 animais distintos (quatro de vida livre e 33 de cativeiro). Para pesquisa de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. foram

utilizados métodos microscópicos (direto e Kinyoun) e imunológico (RIDA®QUICK *Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba* Combi - N1722). Do total de amostras, 24,32% (9/37) foram positivas, correspondendo a 5,4% (2/37) para *Cryptosporidium* spp. e 18,91% (7/37) para *Giardia* spp., respectivamente. Nenhum animal apresentou infecção concomitante para os agentes. Portanto, a pesquisa comprova a presença desses protozoários em carnívoros silvestres, tanto mantidos em criatórios como nos de vida livre no Estado do Pará, considerando-se que esses animais podem atuar como fontes de infecção para o homem, para outros animais e para o meio ambiente.

Palavras-Chave: Criptosporidiose. Giardiase. Mamíferos silvestres. Protozoários. Estado do Pará.

ABSTRACT:

Cryptosporidium spp. and *Giardia* spp., are zoonotic enteroparasites that have been taking place as an emerging problem to public health. These species of protozoa may reach high levels of frequency in regions where the basic sanitation conditions are precarious, promoting outbreaks of diarrhea to men, wild and domestic animals. Wild mammals, as the carnivorous, are susceptible to contamination by enteroparasites, being present at their natural *habitat* or captivity. The present survey has had the purpose to investigate the occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in free and under captivity carnivorous wild animals, from several counties in the State of Pará. Samples of feces from 37 distinct animals (four in their natural habitat and 33 raised in captivity). For the research of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. microscopic immunological, direct and Kinyoun methods were used (RIDA®QUICK *Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba* Combi - N1722). The samples gathered from wild animals have resulted in 24,32% of positive infection on the rate of (9/37), being 5,4% (2/37) positive to *Cryptosporidium* spp. and 18,91% (7/37) positive to *Giardia* spp., what

shows that no animals had both infections at the same time. So, the research strengthens the real presence of these protozoas in wild carnivorous in both conditions of life, free or under captivity, in the State of Pará, making us consider the possibility that the cited animals may be natural reservoirs for infections, not only to men but to other animals and also to environment.

Key words: *Cryptosporidium* spp. *Giardia* spp. Mammals. Protozoal. Protozoa. Pará.

INTRODUÇÃO:

Estudos sobre a ocorrência de parasitos em felinos silvestres apresentam grande importância, pois estes podem se constituir problemas zoonóticos em áreas florestais e/ou naquelas destinadas à visitação de pessoas (AIRES et al., 2008). Podem, também, contribuir para um melhor entendimento da influência e intensidade que as mudanças antrópicas promovem nos ambientes selvagens, incluindo informações adicionais sobre a fauna parasitária de animais silvestres (HOLSBACK et al., 2013).

A ocorrência de mudanças ambientais exerce grande influência na proliferação e no surgimento de doenças parasitárias zoonóticas, entre elas a criptosporidiose e a giardíase, sendo que as mudanças promovidas por fenômenos naturais ou produzidas pela intervenção antrópica, podem levar a alterações ao equilíbrio ecológico e, conseqüentemente, a ocorrência de agentes patogênicos em seus hospedeiros silvestres e vetores (LALLO et al., 2009). Nesse contexto, a saúde pública vem evidenciando uma crescente preocupação da atuação de animais silvestres como portadores e veiculadores de agentes zoonóticos (FANFA et al., 2011).

Espécies de carnívoros silvestres podem ser acometidas por vários gêneros de parasitos dos quais podem servir apenas como reservatórios ou desenvolverem a doença clínica (FIORELLO et al., 2005). WHITEMAN et al. (2008), alertam que a presença de carnívoros domésticos em unidades de conservação tem se tornado uma preocupação na região amazônica brasileira, ao

qual evidencia-se que a introdução desses animais pode oferecer riscos à conservação de carnívoros e outros mamíferos silvestres em áreas protegidas.

Parasitas do gênero *Cryptosporidium* são gastroentéricos considerados oportunistas, capazes de infectar praticamente todas as espécies de vertebrados (BRIGGS et al., 2014). A criptosporidiose pode ser causada por diferentes espécies e subtipos de *Cryptosporidium* spp., afetando diversos hospedeiros cujos sinais clínicos variam de acordo com a idade e o estado sanitário e também da espécie e dose infectante do parasito (XIAO & FAYER, 2008). Em mamíferos silvestres a carga parasitária por *Cryptosporidium* spp. tende a ser menor quando comparada aos valores encontrados em mamíferos domésticos (FAYER & XIAO, 2008).

THOMPSON et al. (2010), destacam que a diversidade de *Cryptosporidium* spp. encontrado na vida selvagem merece estudo adicional em termos de ecologia, evolução, biologia e impacto potencial sobre o saúde desses animais. O conhecimento da cadeia de transmissão da doença pode proporcionar uma oportunidade para verificar como esses agentes alcançam novos hospedeiros suscetíveis, assim, em relação aos fatores epidemiológicos, os animais silvestres podem ter um papel extremamente importante na transmissão de zoonoses, tanto em cativeiro quanto em vida livre (MARVULO, 2007). A transmissão do *Cryptosporidium* spp. é predominantemente fecal-oral, sendo a veiculação hídrica a principal via de disseminação do agente (ONICHANDRAN et al., 2014).

Já com relação a giardíase, a incidência e a prevalência em humanos e animais têm sido relatada em todo o mundo, variando consideravelmente entre as populações e localizações geográficas estudadas (LINDSAY & ZAJAC, 2009). Os animais servem como fontes de infecção e podem eliminar cistos pelas fezes por meses ou anos (LALLO et al., 2003). O número de cistos ingeridos pelo hospedeiro desempenha um papel de destaque na patogênese da giardíase (LINDSAY & ZAJAC, 2009). Os animais adultos são portadores assintomáticos na grande maioria dos casos, o que contribui para a eliminação de cistos do parasita no meio ambiente, podendo contaminar outros animais e o homem (BARR & BOWMAN, 2010).

A grande maioria dos dados obtidos sobre *Giardia* spp. em mamíferos silvestres, origina-se de estudos feitos para avaliar o potencial destes animais como reservatórios de doença para humanos e para o gado (APPELBEE et al., 2005).

De acordo com SOARES et al. (2008) o potencial zoonótico de protozoários a partir de hospedeiros silvestres é ainda pouco estudado no Brasil. Portanto, estudos que avaliem a prevalência destes agentes em animais silvestres cativos e de vida livre são necessários para o entendimento da dinâmica de transmissão destes agentes.

Nesse sentido, buscou-se com o presente trabalho, investigar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp e *Giardia* spp. em carnívoros silvestres procedentes de diferentes municípios do Estado do Pará, abrangendo animais de cativeiro e de vida livre, o que possibilita a geração de informações epidemiológicas que podem contribuir para futuros estudos sobre a saúde única, que abrange meio ambiente, homens e animais, em especial, na região Amazônica.

MATERIAL E MÉTODOS:

Aprovado pelo SISBIO, licença N° 39285, e pelo Comitê de Ética do Uso de Animais, protocolo de autorização N° 034/2014 CEUA - 23084.022512/2014-18 (UFRA).

Foram coletadas e examinadas 37 amostras fecais de 13 espécies de carnívoros silvestres de diferentes regiões do Estado do Pará, Amazônia, Brasil, sendo quatro de vida livre e 33 de cativeiros. Nove animais foram classificados como jovens (idade inferior a 12 meses) e 28 como adultos (mais de 12 meses de idade), totalizando 15 fêmeas e 22 machos.

As espécies dos carnívoros silvestres do presente estudo foram identificadas por observações morfológicas realizadas pelos médicos veterinários dos locais das coletas a partir da comparação das características da espécie descritas por REIS et al. (2010).

Foram analisadas amostras fecais das seguintes espécies: 13 jaquaticas (*Leopardus pardalis*), quatro cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), três sussuaranas (*Felis concolor*), três furões (*Galictis cf. vittata*), três onças pintada (*Panthera onça*), três juparás (*Potos flavus*), duas lontras

(*Lutra longicaudis*), uma irara (*Eira barbara*), um furão grande (*Galictis vittata*), um gato do mato (*Leopardus tigrinus*), uma ariranha (*Pteronura brasiliensis*), um gato-morisco (*Puma vagouarouandi*) e um cachorro vinagre (*Speothos vanticus*).

As coletas foram realizadas entre março de 2015 e fevereiro de 2017. As amostras de animais cativos procederam de sete mantenedoras de animais silvestres localizadas nos municípios de Belém, Santarém, Capitão Poço e Terra Alta e foram feitas nos recintos nos quais os animais estavam alojados. Todos os animais foram deixados em gaiolas individuais que foram previamente higienizadas com o objetivo de evitar contaminação ambiental do material coletado. Preconizou-se recolher as amostras imediatamente após defecação, sem a necessidade de contenção dos animais, obtendo-se dados referentes ao sexo, faixa etária, procedência e local dos mesmos. As amostras foram acondicionadas em frasco coletor universal estéril sem presença de qualquer tipo de conservantes, e mantidas sob refrigeração até as análises necessárias. Já as amostras de animais de vida livre, procederam de animais mortos e que foram obtidas durante necropsias, com a retirada do material fecal diretamente do trato digestivo inferior dos animais, realizadas no Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal Rural da Amazônia (LABOPAT/UFRA).

As amostras foram processadas e analisadas em um período de até 48 horas no Laboratório de Protozoários Intestinais da Seção de Parasitologia do Instituto Evandro Chagas/Ministério da Saúde, Ananindeua, Pará. Durante o processamento foi priorizada a utilização da porção central do bolo fecal, por apresentar menor exposição a contaminantes ambientais que poderiam influenciar nos resultados das análises.

Para pesquisa de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram utilizados os métodos direto com lugol e coloração de Kinyoun (Ziehl-Neelsen modificado-ZNm), respectivamente. Foram confeccionadas duas lâminas por amostra e analisadas sob microscopia de luz em objetivas de 40x para a observação dos cistos de *Giardia* spp. e 100x para oocisto de *Cryptosporidium* spp.

Para a realização do exame direto, utilizou-se uma pequena alíquota do material fecal, retirada de diferentes partes do bolo fecal, misturada a quatro a cinco gotas de lugol em uma lâmina de vidro, numerada e coberta com lamínula 24 mm x 32 mm, seguida de observação ao microscópio.

Na técnica de Ziehl-Neelsen modificado, utilizou-se dois gramas de fezes. O conteúdo foi diluído e homogeneizado em um tubo tipo falcon contendo 10 mL de formalina tamponada e filtrada em gaze dobrada para a retirada de resíduos grosseiros. Após esta etapa, cerca de 4 mL de éter era acrescido ao filtrado para centrifugação (2.000 rpm x 5 minutos). Uma gota do sedimento foi utilizada na confecção do esfregaço, corada com fucsina carbólica e observada ao microscópio.

Foi também empregado um método imunológico comercial RIDA[®]QUICK *Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba* Combi (N1722), que detecta os antígenos dos parasitas simultaneamente. Os elevados índices de sensibilidade e especificidade do método imunológico utilizado (acima de 90,0%) fazem do método uma ferramenta complementar ao diagnóstico microscópico, aumentando a probabilidade de detecção destes parasitas. Sabe-se que baixas taxas de excreção de protozoários nas fezes diminuem a sensibilidade dos métodos microscópicos, portanto a utilização deste teste pode contribuir para a melhoria dos resultados. A realização do teste imunocromatográfico obedeceu ao protocolo do fabricante. De forma resumida, foi feito um homogeneizado utilizando 50mg da amostra diluída em um mL de tampão de extração. Uma alíquota de 0,5mL do sobrenadante obtido foi colocada em contato com as tiras contendo os anticorpos, procedendo-se a leitura após cinco minutos.

Estatisticamente os dados foram analisados utilizando-se frequências absolutas e relativas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Das 37 amostras de fezes analisadas, 24,32% (9/37) foram positivas, correspondendo a 5,4% (2/37) para *Cryptosporidium* spp. e 18,91% (7/37) para *Giardia* spp., respectivamente, ao qual nenhum animal apresentou infecção concomitante para os agentes.

As amostras positivas para *Cryptosporidium* spp., foram obtidas de dois animais adultos, sendo uma fêmea e um macho, correspondendo a uma jaguatirica (*L. pardalis*) de cativeiro (município de Capitão Poço) e um cachorro do mato (*C. thous*) de vida livre necropsiado (município de Belém). As amostras foram positivas para *Cryptosporidium* spp. no método de ZNm. Todavia, apenas a amostra de *C. thous* foi positiva no teste imunológico, sugerindo-se que o oocisto de *Cryptosporidium* observado na amostra da jaguatirica não pertença a *C. parvum* ao qual o teste imunocromatográfico é indicado, e sim a outra espécie deste gênero. Portanto, métodos moleculares poderão auxiliar na identificação da espécie do parasito.

Diversos autores como KAR et al. (2011) ressaltam que diversas metodologias estão disponíveis para o diagnóstico confirmatório da criptosporidiose, podendo ser estabelecido por meio de exames parasitológicos (sedimentação, flutuação ou a centrífugo-sedimentação), e técnica de coloração de Ziehl-Neelsen ou Kinyoun, aos quais foram utilizados na presente pesquisa (XIAO & CAMA, 2006). Tais afirmações evidenciam que diversos métodos de diagnósticos aplicados ao agente auxiliam cada vez mais o diagnóstico, o que inevitavelmente contribui para um melhor conhecimento da epidemiologia do *Cryptosporidium* spp. no Brasil e no mundo.

No Brasil há poucas informações sobre a ocorrência de *Cryptosporidium* em espécies de carnívoros silvestres, dentre essas, FANFA et al. (2011), utilizando diferentes métodos parasitológicos, relataram a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em um *P. concolor* (puma), adulto, assintomático, mantido em um criatório conservacionista em Santa Maria, Rio Grande do Sul. Em outro estudo, HOLSBACK et al. (2013), analisaram amostras fecais de 14 carnívoros silvestres, de seis espécies diferentes e, observaram, positividade para oocistos de *Cryptosporidium* spp. em duas espécimes de *L. tigrinus* (gato do mato) de centros de

reabilitação dos Estados do Mato Grosso do Sul e São Paulo. Resultado semelhante aos obtidos nessa pesquisa no Estado do Pará, que em 37 animais de 13 diferentes espécies, diagnosticou-se *Cryptosporidium* spp. em dois espécimes, sendo uma jaguatirica e um cachorro do mato.

Em outros países, PEZZANI et al. (2001) relataram o primeiro registro de *Cryptosporidium* spp. em *P. concolor* mantido em cativeiro na Argentina. Na Irlanda STUART et al. (2013) utilizaram técnica molecular e detectaram a presença de *Cryptosporidium* em 5% (4/81) de indivíduos da espécie *Mustela vison*, uma espécie carnívora de hábitos aquáticos. Uma frequência semelhante a registrada no presente estudo. Dentre as amostras identificadas, três foram caracterizadas como *C. andersoni*, reforçando a necessidade de estudos moleculares para a elucidação da espécie de *Cryptosporidium* identificada através de microscopia neste estudo. Nas demais espécies estudadas na Irlanda, a maioria das quais de ambiente predominantemente terrestre, nenhuma amostra foi positiva para o agente.

Vale ainda destacar que nem todos os animais que são diagnosticados com a infecção por *Cryptosporidium* spp. possuem manifestações clínicas de doença, atuando assintomaticamente como fontes de infecção desse agente, albergando-o em seu trato intestinal e eliminando grandes quantidades de oocistos viáveis para o ambiente (BOYER & KUCZYNSKA, 2010).

Com relação aos resultados da pesquisa de *Giardia* spp., a positividade detectada em sete indivíduos (18,91%), ocorreu em três animais jovens e quatro adultos, sendo quatro fêmeas e três machos, procedentes de criatórios dos municípios de Belém e Capitão Poço. Como todas as amostras foram positivas para *Giardia* spp. tanto no método direto como no imunológico, provavelmente, pertencem à espécie *G. lamblia*, ao qual o teste imunocromatográfico utilizado é indicado. A presença desta espécie nestes animais destaca o seu potencial zoonótico desse agente, não descartando a possibilidade da presença de outras espécies de *Giardia* spp. nas amostras analisadas, promovendo infecções concomitantes.

No presente estudo, cinco das 13 espécies de carnívoros silvestres, estavam parasitadas, com sete animais positivos para *Giardia* spp., ocorrendo em três *L. pardalis* (jagatiricas), e em um

P. brasiliensis (ariranha), *F. concolor* (sussuarana), *L. longicaudis* (lontra) e *C. thous* (cachorro do mato), respectivamente. Dos animais, o cachorro do mato era de vida livre e a *F. concolor* foi a única a apresentar diarreia.

No Brasil, FARRET et al. (2008), analisaram amostras de fezes de 14 carnívoros silvestres mantidos em cativeiro em criadouro conservacionista no Estado do Rio Grande do Sul. Entre as espécies pesquisadas, incluíram-se cinco gatos do mato pequeno (*Leopardus tigrinus*), três quatis (*Nasua nasua*), três graxains do campo (*Lycalopex gymnocercus*) e três guaxinins (*Procyon lotor*). Os autores verificaram que *L. tigrinus* foi à única espécie que apresentou infecção elevada para *Giardia* spp. Infecção mista por cistos de *Giardia* spp., oocistos de *Cryptosporidium* spp. e *Cystoisospora* sp. estava presente em *N. nasua*, a espécie *L. gymnocercus* estava parasitada por oocistos de *Cystoisospora* sp. e *P. lotor* por cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. Os animais não apresentavam sinais clínicos das parasitoses, e os autores concluíram que estes eram portadores assintomáticos e atuavam como propagadores destes parasitos para o ambiente. O mesmo pode ser considerado na presente pesquisa, já que apenas um animal apresentou sinais clínicos de diarreia.

Recentemente, BORGES et al. (2017), utilizando métodos parasitológicos (Kinyoun e centrífugo flutuação em solução de sulfato de zinco), analisaram 337 amostras fecais de carnívoros silvestres coletadas nos Estados do Amapá, Amazonas, Pará e Rondônia, correspondendo, a 313 *Lontra longicaudis* (lontra tropical) e 24 *Pteronura brasiliensis* (ariranha). A frequência de positividade de infecção para pelo menos um patógeno foi de 27% (94/337), ao qual a infecção por *Cryptosporidium* spp. foi maior que *Giardia* spp. Já coinfecção por ambos os protozoários foi de 4,47% (14/313) nas amostras de *L. longicaudis* e 20,83% (5/24) nas de *P. brasiliensis*.

Os resultados encontrados por BORGES et al. (2017), assemelham-se aos encontrados no presente estudo em relação à positividade para a *Giardia* spp., ao qual, evidenciou-se resultado positivo para a *P. brasiliensis* e para a *L. longicaudis* tanto no método direto quando no

imunocromatográfico, acreditando-se portanto, que tais espécies podem ser mantenedoras e disseminadoras de tal agente para o meio ambiente e para outros animais. Todavia, para *Cryptosporidium* spp., na presente pesquisa, o resultado foi negativo em ambas as espécies, mesmo com a alta sensibilidade do método imunológico utilizado.

Na Espanha, MÉNDEZ-HERMIDA et al. (2007), pesquisaram por imunofluorescência direta, 437 amostras fecais de *Lutra lutra* (lontra selvagem) coletadas de 161 localidades. Foram detectados oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 3,9% (17/437) e cistos de *Giardia* spp. em 6,8% (30/437) das amostras. Os resultados demonstram que as lontras podem contribuir para a contaminação dos cursos de água, embora sejam necessários mais estudos para determinar quais espécies ou genótipos de *Cryptosporidium* e *Giardia* infectam esses animais.

Na Croácia, foi realizado um estudo microscópico e imunofluorescência para a pesquisa de *Giardia* spp. ao qual foram analisadas 131 amostras fecais de 57 espécies de mamíferos cativos no zoológico de Zagreb. A prevalência geral foi de 29% (38/131), considerada alta pelos autores, sendo que todos os animais apresentavam-se assintomáticos no momento da coleta. Com relação aos carnívoros presentes no zoológico de Zagreb, foram coletadas 21 amostras e destas, 12 (57,1%) mostraram-se positivas para *Giardia* spp. (BECK et al., 2011).

Leopardus pardalis foi a espécie que apresentou maior positividade para os agentes estudados na presente pesquisa, correspondendo a 44,44% (4/9) dos animais parasitados. Das 13 amostras coletadas de jaguatirica, quatro mostraram-se parasitadas, todas procedentes de animais de cativeiros, porém pouco se sabe sobre esses agentes nas espécies aqui estudadas, apesar da abundante literatura a respeito da ocorrência em hospedeiros humanos e animais domésticos, poucos são os estudos sobre o papel dos animais silvestres na manutenção e disseminação desses agentes (THOMPSON et al., 2010).

Na presente pesquisa foi possível observar que os agentes pesquisados ocorrem em carnívoros silvestres mantidos em cativeiros no Estado do Pará, sendo estes dados importantes para um melhor entendimento do problema em relação à epidemiologia parasitária ambiental

envolvendo diferentes espécies de animais silvestres que se tornam potenciais vetores desses importantes parasitas. Considera-se oportuno referenciar o estudo de FARRET et al. (2008), em carnívoros silvestres mantidos em cativeiro no sul do Brasil, o qual relata o parasitismo por protozoários gastrintestinais com potencial zoonótico, destacando que a situação de cativeiro torna os animais mais susceptíveis às doenças pelo estresse e a concentração destes em um mesmo local, o que pode gerar problemas de saúde nestes animais, inclusive em animais domésticos e/ou no homem, visto que que esses podem albergar parasitos zoonóticos.

Adicionalmente, é notória a ocorrência de *Cryptosporidium* e *Giardia* em carnívoros silvestres de vida livre e cativos em diferentes regiões do mundo (APPELBEE et al., 2005), com frequências que chegam a atingir valores acima de 50%. De acordo com os resultados obtidos neste estudo é possível concluir que a circulação destes agentes nos animais de ambientes florestais amazônicos sejam tão comum quanto nas demais regiões do Brasil e do mundo. Assim, novos estudos em animais silvestres de diferentes espécies irão contribuir para a uma melhor compreensão acerca da epidemiologia destes agentes na região Amazônica e no Brasil. Ademais, a circulação destes agentes em animais de cativeiro, favorecendo a manutenção e a disseminação dos mesmos nestes ambientes, mostra a importância da necessidade de avaliações periódicas bem como a identificação das prováveis fontes de infecção para os animais silvestres.

CONCLUSÃO:

A pesquisa comprova a presença dos agentes *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em carnívoros silvestres tanto mantidos em criatórios como nos de vida livre no Estado do Pará, o que possibilita considerar que esses animais podem atuar como fontes de infecção para outros animais e para o homem.

REFERÊNCIAS:

AIRES, W. O. et al. Principais parasitas de felinos selvagens. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Ano VI, n. 11, p. 1 - 5, 2008.

APPELBEE, A. J. et al. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife - Current status and future needs. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 8, p. 370-376, 2005.

BARR, S. C.; BOWMAN, D. D. **Doenças infecciosas e parasitárias em cães e gatos - consulta em 5 minutos**. 1. ed. São Paulo: Revinter, 2010. 640p.

BECK, R. et al. Prevalence and molecular typing of *Giardia* spp. in captive mammals at the zoo of Zagreb, Croatia. **Veterinary Parasitology** 175 p. 40–46, 2011.

BORGES, J. C. G. et al. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* sp. in Neotropical river otters (*Lontra longicaudis*) and giant otters (*Pteronura brasiliensis*) in northern Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, p.1-5, 2017.

BOYER, D.G.; KUCZYNSKA, E. Prevalence and concentration of *Cryptosporidium* oocysts in beef cattle paddock soils and forage. **Foodborn Pathogens and Disease**, v. 7, n. 8, p. 893–900, 2010.

BRIGGS, A. D. et al. Approaches to the detection of very small, common, and easily missed outbreaks that together contribute substantially to human *Cryptosporidium* infection. **Epidemiology Infectology**, v. 142, n. 9, p. 76–1869, 2014.

FANFA, V. R. et al. Endoparasitoses em puma (*Puma concolor*) na Região Sul do Brasil [Endoparasitoses in cougar (*Puma concolor*) from the Southern region of Brazil] Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.5, n.1, p.100-102, 2011.

FARRET, M. H. et al. Parasitismo por protozoários gastrointestinais em carnívoros silvestres mantidos em cativeiro no sul do Brasil. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, 103 (565-566) p. 93-95, 2008.

FIORIELLO, C. V. et al. Parasites of free-ranging small canids and felids in the Bolivian Chaco. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, 37(2): p.130-134. 2005.

HOLSBACK, L. et al. Natural infection by endoparasites among free-living wild animals. Infecção natural por endoparasitas em animais silvestres de vida-livre **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 22, n. 2, p. 302-306, abr.-jun. 2013.

KAR, S. et al. Quantitative comparison of different purification and detection methods for *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Journal of Veterinary Parasitology**, v. 177, p. 366–370, 2011.

LALLO, M. A. et al. Giardíase em cães e gatos– revisão. **Revista Clínica Veterinária**, v. 43, p. 40-44, mar.-abr., 2003.

LALLO, M. A. et al. Ocorrência de *Giardia*, *Cryptosporidium* e microsporídios em animais silvestres em áreas de desmatamentos no Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1465-1470, ago. 2009.

- LINDSAY, D. S.; ZAJAC, A. M. The Biology and Control of *Giardia* spp and *Tritrichomonas foetus*. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 39, n. 6, p. 993-1007, nov. 2009.
- MARVULO, M. F. V. Zoonoses. In: CUBAS, Z.S.; DIAS, J.L.C.; SILVA, J.C.R. **Tratado de Animais Selvagens**. São Paulo: Roca; p. 1250-1256. 2007.
- MÉNDEZ-HERMIDA, F. et al. *Cryptosporidium* and *Giardia* in wild otters (*Lutra lutra*). **Veterinary Parasitology**, Volume 144, Issues 1–2, 15, p. 153-156. March, 2007.
- ONICHANDRAN, S. et al. Waterborne parasites: a current status from the Philippines. **Parasites & Vectors**, v. 28, n. 7, p. 244–251, 2014.
- PEZZANI, B. C. et al. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in mammals of La Plata and its rural areas. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, 35(4): p. 521-526. 2001.
- REIS, N. R. et al. **Mamíferos do Brasil: guia de identificação**. Ed. 1º. Technical Books Editora. 2010, p.490.
- SOARES, J. F. et al. Parasitismo por *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* sp. em *Coendou villosus*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 23-24, mar-abr. 2008.
- STUART, P. et al. A coprological survey of parasites of wild carnivores in Ireland. **Parasitology Research Founded as Zeitschrift für Parasitenkunde**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 12 July, 2013.
- THOMPSON, R. C. A. et al. Parasites emerging disease and wildlife conservation. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n.10, p. 1163–1170, 2010.
- WHITEMAN, C. W. et al. Interface entre carnívoros domésticos e silvestres em área de proteção ambiental na amazônia brasileira: indicadores e implicações para conservação. **Natureza & Conservação**, Curitiba, v. 6, n. 1, p. 174-182, abr. 2008.
- XIAO, L.; CAMA, V. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis In: ORTEGA, Y. R. Foodborne Parasites. Springer: US, 2006, p. 108.
- XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. **International Journal Parasitology**, Oxiford, v. 38, n. 11, p. 1239-1255, 2008.

AGRADECIMENTOS:

À Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA).



80 ANOS
DE CONTRIBUIÇÃO À CIÊNCIA E À SAÚDE

Ao Instituto Evandro Chagas (IEC).



Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As informações sobre a ocorrência de espécies de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. entre mamíferos silvestres no Brasil são reduzidas, especialmente nesse sentido, não existiam dados de infecção por esses protozoários na mastofauna no âmbito Amazônico, dessa maneira, surgiu a proposta de avaliar a presença desses patógenos em populações de mamíferos silvestres cativos e de vida livre no Estado do Pará.

Os resultados obtidos nesta pesquisa comprovaram a ocorrência dos agentes *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em diferentes espécies de mamíferos silvestres procedentes da região Amazônica do Estado do Pará, Brasil. No estudo realizado em 140 amostras fecais, foi possível observar a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 9,28% (13/140) e de cistos de *Giardia* spp. em 10% (14/140) animais, ao qual foi observado que infecção concomitante para ambos os agentes também pode ocorrer.

As evidências de infecção apresentadas no presente estudo possibilitam acreditar que tais animais podem atuar como fontes de infecção para o homem, para outros animais e também para o meio ambiente, destacando-se que pouco se sabe sobre o verdadeiro papel desses mamíferos na disseminação como também na manutenção de tais agentes zoonóticos. Destaca-se que estudos moleculares adicionais são necessários para elucidar o potencial patogênico e zoonótico desses agentes no âmbito regional.

Finalizando, faz-se referência que a presente tese é composta de três artigos.

O 1º Artigo (*Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts in Coatis (*Nasua nasua* L. 1766) from Pará, Brazil), foi publicado na **Revista Acta Veterinária Brasilica**, e trata do primeiro relato de infecção por esses protozoários nessa espécie silvestres na região Norte do Brasil.

O 2º Artigo (*Cryptosporidium* and *Giardia* in captive primates), foi submetido ao periódico **Journal of Medical Primatology**. Este é um trabalho inédito e importante de estudo envolvendo 76 espécimes de 13 espécies diferentes de primatas neotropicais mantidos cativos em criatórios no Estado do Pará. Além disso, traz resultados importantes em técnicas de laboratório com boa especificidade e sensibilidade que podem ser usadas para diagnosticar esses agentes em sua forma clínica e subclínica.

O 3º Artigo (*Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em carnívoros silvestres do Estado do Pará – Brasil), será submetido ao periódico **Ciência Rural**. Neste buscou-se investigar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp e *Giardia* spp. em carnívoros silvestres procedentes de diferentes municípios do Estado do Pará, abrangendo animais de cativeiro e de vida livre, o que

possibilitou a geração de informações epidemiológicas que podem contribuir para futuros estudos sobre a saúde única, que abrange meio ambiente, homens e animais, em especial, na região Amazônica.

Ademais, outros artigos científicos que abordam a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. estão em fase de elaboração, sendo que um desses aborda a infecção em peixe-boi e o outro discorrerá sobre resultados moleculares cujo resultados ainda estão sendo processados.