



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA**

MARIA GEICIANE MANÇO SOUZA

**OCORRÊNCIA DE *Giardia* spp. E *Cryptosporidium* spp. EM PEQUENOS
RUMINANTES EM PROPRIEDADES DAS MESORREGIÕES
METROPOLITANA DE BELÉM E DO NORDESTE PARAENSE**

BELÉM-2016



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA**

MARIA GEICIANE MANÇO SOUZA

**OCORRÊNCIA DE *Giardia* spp. E *Cryptosporidium* spp. EM PEQUENOS
RUMINANTES EM PROPRIEDADES DAS MESORREGIÕES
METROPOLITANA DE BELÉM E DO NORDESTE PARAENSE**

**Dissertação de mestrado apresentada à
Universidade Federal Rural da Amazônia,
como parte das exigências do curso de
Mestrado em Saúde e Produção Animal na
Amazônia: área de concentração Saúde e
Meio Ambiente, para obtenção de Título de
Mestre.**

**Orientador: Prof. Dr. Washington Luiz
Assunção Pereira.**

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

BELÉM-2016



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA**

MARIA GEICIANE MANÇO SOUZA

**OCORRÊNCIA DE *Giardia* spp. E *Cryptosporidium* spp. EM PEQUENOS
RUMINANTES NAS MESORREGIÕES METROPOLITANA DE BELÉM E DO
NORDESTE PARAENSE**

Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do curso de Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia: área de concentração Saúde e Meio Ambiente, para obtenção de Título de Mestre.

Aprovada em

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira – Orientador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Profa. Dra. Fernanda Martins Hatano - 1º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Prof. Dr. - Raimundo Nonato Moraes Benigno - 2º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Profº Dr. Alexandre do Rosário Casseb - 3º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Profª Dra. Adriana Castro Maciel - Suplente
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelo dom da vida, por ter permitido que eu concluísse esse projeto.

À minha família, pelo apoio e amor a mim dedicados.

À Universidade Federal Rural da Amazônia, não só pela oportunidade a mim concedida, de ingressar no curso de Mestrado, através do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia mas também pelas grandes oportunidades que me foram dadas desde a graduação.

Ao meu orientador Dr. Washington Luiz Assunção Pereira, pela orientação, dedicação e apoio a mim prestados não só durante o curso de mestrado e sim desde a minha vida acadêmica.

À minha co-orientadora Dra. Mônica Cristina de Moraes Silva Bonfim, pela orientação e participação no desenvolvimento desse projeto, visando o aprimoramento do mesmo. Ao Instituto Evandro Chagas, Sessão de Parasitologia, Laboratório de Protozooses, na pessoa do Dr. Pedro Fernando Vasconcelos, por ter permitido o meu acesso à instituição, pela estrutura oferecida, essenciais para o desenvolvimento do meu projeto de mestrado.

Aos membros da banca examinadora, por terem aceito o convite para participar da minha defesa de dissertação, Dra. Fernanda Martins Hatano, Dr. Raimundo Nonato Moraes Benigno, Dr. Alexandre do Rosário Casseb e em especial à suplente Dra. Adriana Maciel de Castro Cardoso, pelos ensinamentos e orientações valiosos durante o estágio de docência.

À Médica Veterinária Darlene Cássia Saraiva Queiroz, pelo apoio, amizade, pelos ensinamentos repassados e pela dedicação, essenciais para a realização do projeto. Minha eterna gratidão e respeito à essa pessoa e profissional exemplar.

Às biomédicas Heyde Araújo Tavares e Alana Luanni Messias da Silva pela amizade e pelo apoio durante o desenvolvimento das técnicas de diagnóstico, preconizadas pelo projeto.

Ao Laboratório de Patologia Veterinária, especialmente aos Médicos Veterinários Breno Macedo Costa, Laura Jamille Argolo Paredes e Karina Ferreira Silveira pelo apoio durante a seleção das propriedades e as coletas das amostras.

Ao secretário do PPGSPAA, Jaime Santos, pelas numerosas ajudas burocráticas, sempre se mostrando bastante solícito e atencioso.

Aos animais, onde sem eles não seria possível a realização desse projeto. Meu eterno respeito e admiração à estes seres divinos.

À todos que fizeram parte direta ou indiretamente desse projeto de Mestrado, na qual vou levar sempre comigo as experiências vividas e os ensinamentos adquiridos, primordiais à minha formação pessoal e profissional.

À Deus, meu refúgio e minha força e à minha
família, meu bem maior.

DEDICO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

		Pág.
Quadro 1	Principais espécies de <i>Giardia</i> e seus hospedeiros.....	14
Figura 1	Ciclo de vida da <i>Giardia intestinalis</i>	16
Quadro 2	Espécies de <i>Cryptosporidium</i> e seus hospedeiros.....	21
Figura 2	Ciclo de vida do <i>Cryptosporidium parvum</i>	23
Figura 3	Mapa ilustrando as Mesorregiões Metropolitana de Belém e do Nordeste Paraense.....	31
Tabela 3	Ocorrência de <i>Giardia</i> spp. em amostras fecais de ovinos e caprinos provenientes de propriedades das Mesorregiões Metropolitana de Belém do Nordeste Paraense.....	35
Figura 4	Exame direto: cistos de <i>Giardia</i> spp. (setas) em amostra fecal de ovino proveniente de propriedade da Mesorregiões Metropolitana de Belém e do Nordeste Paraense.....	36
Tabela 4	Ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostras fecais de ovinos e caprinos provenientes de propriedades das Mesorregiões Metropolitana de Belém do Nordeste Paraense.....	38
Figura 6	Técnica de Ziehl-Neelsen modificado. Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. (setas) em amostra fecal de caprino oriundo de propriedade da das Mesorregiões Metropolitana de Belém e do Nordeste Paraense.....	39

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 <i>Giardia</i>	13
2.1.1 O agente.....	13
2.1.2 Ciclo biológico.....	15
2.1.3 A infecção.....	16
2.1.3.1 Giardíase em pequenos ruminantes.....	17
2.1.4 Epidemiologia.....	18
2.1.5 Diagnóstico.....	19
2.2 Gênero <i>Cryptosporidium</i>	20
2.2.1 Ciclo biológico.....	21
2.2.2 Criptosporidiose.....	23
2.2.2.1 Criptosporidiose em pequenos ruminantes.....	25
2.2.3 Epidemiologia.....	26
2.2.4 Diagnóstico.....	27
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 Geral.....	31
3.2 Específicos.....	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 População estudada.....	32
4.1.1 Preparo das amostras para análise e técnicas laboratoriais utilizadas.....	33
4.1.1.1 Pesquisa de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	33
4.1.1.2 Pesquisa de <i>Giardia</i> spp.....	34
4.2 Análise estatística.....	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
6 CONCLUSÕES.....	42
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

RESUMO

Os protozoários do gênero *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* ssp. são atualmente reconhecidos como os principais patógenos entéricos com potencial zoonótico que podem causar diarreia, dor abdominal, náusea e vômito. São considerados como importantes parasitos dos animais domésticos. No Estado do Pará as infecções ocasionadas por estes protozoários em caprinos e ovinos são pouco estudadas. O presente trabalho teve como objetivo estudar as infecções naturais por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* ssp. em caprinos e ovinos, criados extensivamente em propriedades localizadas nas Mesorregiões metropolitana de Belém e do Nordeste Paraense, Estado do Pará. Amostras fecais de ovinos e caprinos jovens (< 12 meses) foram obtidas e submetidas à análise coproparasitológica e microscópica. Para a pesquisa dos cistos de *Giardia* spp. as amostras foram submetidas ao teste de rotina através da pesquisa direta e observação microscópica do enteroparasita. Para a pesquisa de *Cryptosporidium* spp. foi utilizada a técnica de Ziehl-Neelsen modificada ou coloração ácido-resistente. A excreção de cistos de *Giardia* spp. foi detectada em 12,66% (19/150) das amostras analisadas, sendo 17% (17/100) e 6% (3/50) na espécie ovina e caprina, respectivamente. Oocistos de *Cryptosporidium* spp., foram observados em 8,66 % (13/150), das amostras analisadas, sendo 7% (7/100) em ovinos e 12% (6/50) em caprinos. Já a infecção simultânea pelos dois parasitos na mesma amostra analisada foi observada em 3% (3/100) na espécie ovina e 4% (2/50) na espécie caprina. A ocorrência de *Giardia* spp. em ovinos de propriedades localizadas nas Mesorregiões Metropolitana de Belém e do Nordeste paraense, mostrou-se elevada em relação à ocorrência em caprinos. Já a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. na espécie ovina não apresentou diferença significativa em relação ao parasitismo na espécie caprina, o mesmo foi observado quanto ao parasitismo pelos dois protozoários na mesma amostra analisada.

Palavras-chave: *Cryptosporidium* spp.; *Giardia* ssp.; ovinos; caprinos; Estado do Pará.

ABSTRACT

The protozoa of the genus *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. they are currently recognized as the main enteric pathogens with zoonotic potential that can cause diarrhea, abdominal pain, nausea and vomiting. They are considered important parasites of domestic animals. In the State Pará infections caused by these protozoa in sheep and goats are little studied. This work aimed to study the natural infection by *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in goats and lambs, bred extensively in properties located in the metropolitan Mesoregions Belém and Pará Northeast, Pará State. Fecal Samples from ovine and caprine animals (<12 months) were obtained and submitted to coproparasitological and microscopic analysis. For the detection of cysts *Giardia* spp. samples were submitted to the routine test through direct research and microscopic observation of enteroparasite. For the detection of *Cryptosporidium* spp. was used the Ziehl-Neelsen modified or acid-fast staining. Excretion of *Giardia* spp. detected was 12.66% (19/150) of the analyzed samples, 17% (17/100) and 6% (3/50) in ovine and caprine species, respectively. Oocysts *Cryptosporidium* spp. were observed in 8.66% (13/150) of the samples 7 % (7/100) in sheep and 12% (6/50) in goats. The incidence of both parasites on the same sample analyzed was observed in 3% (3/100) in sheep and 4% (2/50) in goats. The occurrence of *Giardia* spp. in sheep properties located in metropolitan Mesoregions Belém and Pará Northeast, was high on the occurrence in goats. The incidence of *Cryptosporidium* spp. in sheep showed no significant difference in relation to parasitism in goats, the same was observed for the parasitism by the two protozoa in the same sample analyzed.

Key-words: *Cryptosporidium* spp.; *Giardia* spp.; sheep; goats; State of Para.

1 INTRODUÇÃO

Ovinos e caprinos naturalmente albergam parasitos em maior ou menor grau, ainda que existam variações relacionadas ao animal, o tipo de produção (intensiva/extensiva), o local de pastoreio, as condições climáticas, o manejo da exploração, entre outras. As consequências das doenças parasitárias dependem da ação dos parasitas presentes no animal. Mesmo nas formas subclínicas as perdas econômicas e produtivas são de igual modo consideráveis. Assim, sendo o parasitismo um problema

difícil de erradicar, o seu controle nas explorações de pequenos ruminantes é indispensável para a sobrevivência desse no setor agropecuário (QUINTAS; CARDOSO, 2012).

Embora o parasitismo gastrointestinal seja uma das mais sérias limitações à produção de ovinos e caprinos, verifica-se uma grande escassez de informações relativas à ecologia e comportamento de endoparasitos de pequenos ruminantes nos trópicos, assim como do papel desses animais na transmissão de zoonoses (NOGUEIRA; MELLO, 2005).

Ovinos e caprinos na idade adulta também podem sofrer com os efeitos de protozooses como a giardíase (SANTÍN et al., 2007), diferentemente dos bovinos, pois não adquirem imunidade conforme se tornam mais velhos (RAMOS et al., 2004) e a criptosporidiose, cuja imunidade protetora muitas vezes insuficiente (POHJOLASTENROOS, 1986). Além disso, animais nessa faixa etária constituem a maior fonte de contaminação do pasto (FRITSCHÉ et al., 1993) e de transmissão para animais jovens no confinamento (POHJOLASTENROOS, 1986). De acordo com esse último autor a alta ocorrência de criptosporidiose e/ou giardíase está relacionada com qualquer condição que favoreça o contato ou disseminação de material fecal.

Santin et al. (2007) apontam que o tipo de criação (confinamento ou pasto), a higiene das instalações e o contato de suscetíveis (incluindo humanos) com as fezes de animais contaminados são fatores predisponentes para a ocorrência dessas doenças.

Desde 1979 a Organização Mundial da Saúde considera a giardíase uma zoonose e até hoje esta questão não está resolvida, em função dos esparsos relatos de transmissão zoonótica e pouca confirmação. O conhecimento de que há *Giardia* de genótipos específicos para determinado hospedeiro e *Giardia* de genótipo comum a humanos e vários animais, os chamados genótipos zoonóticos, têm mantido a discussão sobre a giardíase ser ou não uma zoonose (PAULINO, 2005).

Estudos de prevalência e ocorrência de *Cryptosporidium* em ovinos tem sido relatados no mundo todo, mas há pouca informação a respeito das espécies ou genótipos (SANTÍN et al., 2007).

A Giardíase e a Criptosporidiose recentemente têm sido reconhecidas como duas das mais prevalentes enfermidades veiculadas pela água. O parasitismo por esses agentes vem chamando a atenção de pesquisadores pelo seu potencial zoonótico, com graves implicações em termos de saúde pública (SILVA, 2007). De acordo com esse autor, os dois enteroparasitos estão presentes em taxas variáveis no rebanho ovino e caprino em

nosso país. Entretanto estudos complementares da incidência das infecções e caracterização molecular das espécies/genótipos ainda são pouco realizados, não sendo possível avaliar a real importância de tais infecções para a saúde dos animais e o potencial zoonótico de ambas as enfermidades tendo em vista o crescimento de casos de enteroparasitoses em vários hospedeiros envolvendo o *Cryptosporidium* spp. e a *Giardia* spp. evidenciando, portanto, a necessidade do desenvolvimento de estudos acerca da ocorrência de casos novos dessas infecções.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Giardia e *Cryptosporidium* são protozoários que parasitam o trato gastrintestinal de mamíferos domésticos, silvestres e do homem (XIAO et al., 2001; MONIS et al., 2003) sendo dois dos mais prevalentes e importantes patógenos em ruminantes domésticos (O'HANDLEY et al., 2000; HUETINK et al., 2001; APPELBEE et al., 2003; BARWICK et al., 2003; RALSTON et al., 2003).

2.1 *Giardia*

2.1.1 O agente

Giardia duodenalis, também conhecida por *Giardia intestinalis* ou *Giardia lamblia* é um protozoário flagelado unicelular que comumente parasita o intestino delgado de uma grande variedade de mamíferos domésticos e silvestres, sendo capaz de causar sinais clínicos relacionados à diarreia e distúrbios intestinais (THOMPSON et al., 2000).

Esse microrganismo foi observado pela primeira vez por Antony Van Leeuwenhoek em (1681), mas somente em 1859 foi descrito detalhadamente por Vilem Lambl e posteriormente relatado a ocorrência em coelhos por Davaine (1875) e em anfíbios por Kunstler (1882) *apud* Monis et al. (2009).

O parasito apresenta duas formas evolutivas: trofozoíto e cisto. O trofozoíto é a forma vegetativa que habita o intestino delgado do hospedeiro e causa a doença giardiase. O cisto é a forma resistente ao ambiente externo e é transmissível aos hospedeiros susceptíveis. Foram determinados novos grupos chamados de assemblages, sendo que para *G. duodenalis* existem seis (A, B, C, E, F e G), morfologicamente indistinguíveis (THOMPSON et al., 2000), mas que são geneticamente distintos e exclusivos de diversas espécies de mamíferos, o que sugere uma diminuição no potencial zoonótico da doença, havendo necessidade de mais estudos para averiguação.

Considera-se *Giardia duodenalis* um complexo de espécies de *Giardia* com genótipos diferentes e com grau variado de especificidade de hospedeiro (MONIS; THOMPSON, 2003; APPELBEE et al., 2005).

No que diz respeito à às infecções de importância para humanos, análise de milhares de isolados provenientes de surtos diversos revelou a presença somente dos assemblages A e B. O genótipo A também geralmente é encontrado em animais. Devido às limitações dos estudos de transmissão cruzada, maior confiança é depositada na identificação dos genótipos A e B nos animais como meio de compreender a transmissão zoonótica de *Giardia* (CACCIO; RYAN, 2008).

Thompson et al. (1990) compilaram mais de 40 espécies, entre 1859 e 1987, que foram descritas no gênero *Giardia*. A maioria destas foi criada e denominada de acordo com o animal hospedeiro no qual o protozoário foi encontrado, mas, em alguns casos, características morfológicas distinguíveis foram observadas.

Atualmente, mais de 50 espécies já foram descritas mas são reconhecidas apenas 5 espécies (Quadro 1) (THOMPSON, 2004).

Quadro 1: Principais espécies de *Giardia* e seus hospedeiros (THOMPSON, 2004).

Espécie	Hospedeiro
<i>Giardia duodenalis</i>	Humanos, Animais domésticos e Animais silvestres
<i>Giardia agilis</i>	Anfíbios
<i>Giardia muris</i>	Roedores
<i>Giardia ardeae</i>	Aves
<i>Giardia psittaci</i>	Aves

Embora somente a espécie *G. duodenalis* tenha sido reconhecida como agente causador de doença em humanos e na maioria dos outros mamíferos, a caracterização molecular de exemplares de *Giardia* morfologicamente idênticos isolados de humanos e de várias outras espécies de mamíferos, tem confirmado a heterogeneidade deste parasito e fornecido uma base para um entendimento mais claro da sua taxonomia e do seu potencial zoonótico (THOMPSON et al., 2000).

A possibilidade de ruminantes domésticos e outros animais representarem fontes de infecção para o homem despertou na comunidade científica o interesse para o desenvolvimento de estudos da ocorrência de *Giardia* em animais (OLSON et al., 1995) porém ainda não existem evidências da transmissão zoonótica do protozoário, sendo que diversas hipóteses tem sido levantadas no que se refere à diversidade genética de *G. duodenalis* (MONIS; THOMPSON, 2003).

2.1.2 Ciclo biológico

O hospedeiro se infecta ingerindo cistos de *Giardia* presentes em água ou em alimentos contaminados ou por contato interpessoal. Após a ingestão, os cistos passam pelo ambiente ácido do estômago e desencistam na porção inicial do intestino delgado.

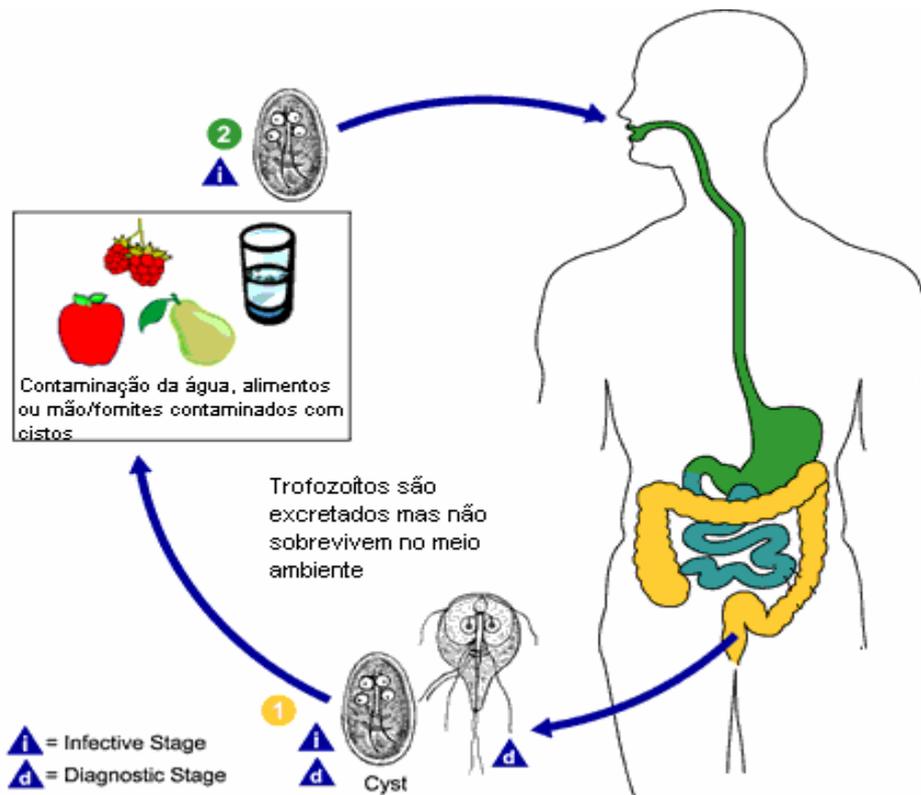
De cada cisto saem dois trofozoítos unidos pelo citoplasma que imediatamente se divide, separando-os. Cada trofozoíto fixa-se na mucosa intestinal (duodeno e jejuno) e divide-se por divisão binária. Cada novo parasito produzido repete o processo, de modo que em pouco tempo são produzidos vários deles (MEYER, 1990; THOMPSON; LYMBERY; MELONI, 1990; ADAM, 2001).

Depois, alguns destes trofozoítos desprendem-se da mucosa e iniciam o processo de encistamento na porção final do intestino delgado. Inicialmente os flagelos encurtam-se, depois o citoplasma condensa-se e há produção de uma membrana cística. Os cistos recentemente formados têm dois núcleos, mas depois há divisão nuclear no interior no interior do cisto e são formados quatro núcleos. Logo após o disco adesivo, corpos basais, corpos medianos e aparelho locomotor (flagelos) são duplicados, resultando dois trofozoítos que permanecem ligados pelo citoplasma no interior do cisto (MEYER, 1990; THOMPSON, LYMBERY; MELONI, 1990; ADAM, 2001).

Estes cistos são eliminados do corpo do hospedeiro junto com as suas fezes podendo contaminar as mãos da pessoa parasitada, os alimentos e a água (Figura 1). No ambiente, os cistos resistem até dois meses se as condições de temperatura e umidade forem favoráveis. Não se sabe se todos os cistos eliminados nas fezes são prontamente infectantes, há evidência de que cistos de *Giardia* podem levar até sete dias para se tornarem maduros e infectantes (THOMPSON; LYMBERY; MELONI, 1990; MEYER, 1990; ADAM, 2001).

Convém ressaltar que em fezes liquefeitas (diarreicas) somente o trofozoíto é encontrado, mas em fezes sólidas predominam os cistos. Em uma única evacuação pode ser observado milhões ou bilhões de cistos. Sabe-se também que alguns dos trofozoítos eliminados no material diarreico podem originar infecção, caso sobrevivam à ação da secreção gástrica (MEYER, 1990; THOMPSON; LYMBERY; MELONI, 1990; ADAM, 2001).

Figura 1 - Ciclo de vida do protozoário *G. duodenalis*



Fonte: Adaptado: Maltez, 2002.

2.1.3 A infecção

Em 2006, a giardíase foi incluída na relação de “doenças negligenciadas pela OMS (SAVIOLI et al., 2006). Atualmente, em muitos países ao redor do mundo esta doença não é sequer relatada, o que impede a compreensão de sua real importância (PLUTZER et al., 2010; BERRILLI et al., 2012).

É uma doença que apresenta uma grande variedade de manifestações clínicas que depende de fatores como a quantidade e inoculo, duração da infecção e fatores tanto do hospedeiro como do próprio parasito (WOLF, 1992) sendo a idade dos animais um dos mais importantes fatores de risco relacionados à giardíase (WADE et al., 2000).

A forma mais comum de apresentação da doença é a infecção assintomática (TESSIER; DAVIES, 1999; FARTHING et al., 2009). Para estes últimos autores, os indivíduos assintomáticos não sofrem qualquer efeito prejudicial por parte do parasito, mesmo não existindo estudos sistemáticos sobre o impacto em indivíduos. Também não está claro se a infecção assintomática poderá ser resultado de contaminação com estirpes não patogênicas ou se é resultado da capacidade do hospedeiro em manter o número de

parasitas abaixo do número necessário para desenvolver sintomatologia. Estima-se que a giardíase tenha uma incidência de 2% a 5% nos países desenvolvidos e de 20% a 30% nos países em desenvolvimento

Considerando as vias de infecção orofecal da doença, as condições precárias de higiene bem como as sanitárias favorecem a propagação do protozoário com consequente instalação da doença. Sendo assim, as regiões que estão em desenvolvimento apresentam índices de prevalência e incidência da doença mais elevados (HILL; NASH, 2009).

Não se sabe ao certo o papel de animais na transmissão do bioagente para o homem, porém alguns estudos apontam que o maior risco de potencial zoonótico é decorrente das fezes de animais domésticos (OLSON et al., 2004; THOMPSON, 2004). Fezes de ruminantes domésticos e outros animais infectados representam possíveis fontes de infecção para o homem, o que tem despertado interesse na comunidade científica para o estudo da doença. Em ruminantes domésticos há uma atenção especial, pois os mesmos poderiam ser os responsáveis pela contaminação de fontes de água e da utilização de fezes como adubo, mesmo não havendo evidência da transmissão zoonótica do protozoário (OLSON et al., 2005).

2.1.3.1 Giardíase em pequenos ruminantes

A giardíase é mais comum em animais jovens (TAMINELLI; ECKERT, 1989; BURET et al., 1990), porém poucos estudos epidemiológicos detalhados foram realizados sobre os possíveis fatores de risco relacionados à ocorrência da infecção (BONFIM et al., 2004). Ela tem sido associada à presença de sinais clínicos nessa faixa etária, tais como diarreia, diminuição do ganho de peso, anorexia, apatia e ressecamento da lã (KIROPES et al., 1987) porém, Buret et al. (1990), observaram que nem sempre a infecção por *Giardia* está relacionada à essa sintomatologia.

Estudando o efeito da infecção em cordeiros desafiados experimentalmente Olson et al. (1995) mostraram uma diminuição do ganho de peso desses animais e diminuição na eficiência da eliminação comparados a animais do grupo controle. O peso da carcaça dos animais infectados foi mais baixo que dos animais não infectados. Aloísio et al. (2006) verificaram que a giardíase causa relevantes perdas econômicas em fazendas que desenvolvem a atividade da ovinocultura.

Fora do Brasil, a doença foi relatada por Taminelli e Eckert (1989) na Suíça e por Diaz et al. (1996) na Espanha. Koudela e Vítovec (1980) avaliando o curso da doença e

achados histológicos, em uma infecção experimental, utilizando caprinos jovens, observaram que a maioria dos animais não apresentou sintomas clínicos. Aquele que apresentou alguma sintomatologia, foi caracterizada uma diminuição do apetite, apatia e consistência das fezes alteradas.

2.1.4 Epidemiologia

G. duodenalis é um complexo de espécies frequentemente encontrado em animais domésticos como o gado, cães e gatos assim como em várias espécies de mamíferos selvagens e aves (THOMPSON, 2004). Apresenta distribuição mundial e possui grande importância epidemiológica e clínica por sua alta prevalência (ADAM, 2001). Estima-se que cerca de $2,8 \times 10^8$ novos casos da doença sejam detectados por ano, no mundo (LLOYD et al., 2002).

O papel dos animais na contaminação da água por esse protozoário vem sendo discutida por diferentes autores. Algumas epidemias na América do Norte foram relacionadas à contaminação da água com cistos de *Giardia* excretados por animais como castores e ratos almiscarados (ERLANDSEN et al., 1990; KARANIS et al., 1996). Segundo Thompson (2004) é pouco provável que animais domésticos e silvestres sejam considerados a fonte de contaminação da água no caso de surtos e que provavelmente é o homem que contamina a água.

Hunter e Thompson (2005) observaram que temas recorrentes relacionados à giardíase eram, viajar, nadar em águas superficiais, beber água e ter contato com crianças que usam fraldas. Em apenas um estudo pode-se observar a associação significativa com o contato de animais de estimação.

Embora existam evidências de que a transmissão zoonótica de *Giardia* ocorra, diversos autores concordam que dados sobre a frequência dessa transmissão são escassos e recomendam a obtenção dos mesmos por meio de estudos epidemiológicos que genotipem os isolados de *Giardia* de hospedeiros em foco endêmicos e de casos positivos em pesquisas de vigilância longitudinal (THOMPSON, 2004; HUNTER; THOMPSON, 2005; MONIS et al., 2009).

2.1.5 Diagnóstico

A diarreia é um sinal clínico não patognomônico, vago e comum a várias patologias, entre as quais se destaca a giardíase. A confirmação do diagnóstico é feita através da visualização do parasita (cisto e/ou trofozoíto) ou através da detecção de antígenos, utilizando amostras fecais ou intestinais do hospedeiro (SAMUEL et al., 2001).

No diagnóstico parasitológico de fezes diarreicas encontramos mais facilmente as formas trofozoítas e aconselha-se o exame direto das fezes logo após a emissão das mesmas pelo hospedeiro infectado. Já em fezes formadas encontramos mais frequentemente cistos visualizados pelas técnicas de flutuação (CHAIA, 1975).

Tradicionalmente o método de flutuação é considerado o padrão ouro, no entanto alguns estudos sugerem que a sua sensibilidade é mais reduzida em comparação com os novos métodos de diagnóstico (GEURDEN et al., 2008). É possível aumentar a sua sensibilidade através de métodos que permitam a concentração de cistos, como a flutuação com sacarose ou sulfato de zinco (SAMUEL et al., 2001), mas é necessário ter em atenção algumas particularidades como: a excreção intermitente dos cistos pode conduzir a falsos negativos, sendo essencial várias amostras fecais, se possível de três dias consecutivos; e o fato da esteatorreia, estar por vezes presente no quadro clínico, interferir na flutuação com sacarose (GEURDEN et al., 2010).

Os sintomas podem ocorrer entre um dia a uma semana antes da excreção de cistos, tornando-se necessário a repetição da análise em doentes com sintomas persistentes (ADAM, 1991). A vantagem deste método baseia-se no baixo custo dos consumíveis utilizados e por ser um método não invasivo na colheita da amostra. Contudo o sucesso do diagnóstico depende da experiência e capacidades do técnico de microscopia, sendo esta a sua desvantagem (GEURDEN et al., 2010).

Um resultado negativo não exclui a possibilidade de infecção por *Giardia*. Deve-se considerar o período de pré patência (que geralmente é de uma a duas semanas) e a intermitência da eliminação deste parasito (ZAJAC, 1992; HAMNES et al., 2007). Em relação ao aspecto macroscópico das fezes pode-se verificar a presença de muco, sangue e de parasitas metazoários (SLOSS et al., 1999).

Um teste alternativo é o imunoensaio enzimático (ELISA), método que apresenta sensibilidade superior ao da microscopia, segundo Motta et al. (2004).

O diagnóstico através da detecção de antígenos nas fezes pode ser realizado através de três técnicas diferentes: imunofluorescência, *enzyme-linked immunosorbent*

assay (ELISA) e imunocromatografia, utilizando-se em todas elas anticorpos monoclonais contra proteínas da parede do cisto e do trofozoíto (GEURDEN et al., 2010).

Geurden et al. (2008), compararam três métodos de diagnóstico, imunofluorescência, imunocromatografia e microscopia e constataram que dos três o que demonstrou mais sensibilidade foi a imunofluorescência, seguido da imunocromatografia e por último o exame microscópico. A possível razão para a diferença entre os dois primeiros é o fato de se realizar um passo inicial de concentração de cistos na imunofluorescência, não acontecendo o mesmo na imunocromatografia.

A principal vantagem da imunocromatografia em relação às outras técnicas é a possibilidade de ser realizada no local, não havendo necessidade de recorrer ao laboratório, assim como a rapidez dos resultados (GEURDEN et al., 2010).

2.2 Gênero *Cryptosporidium*

O gênero *Cryptosporidium* tem sido classificado como pertencente ao filo Apicomplexa e todas as espécies são protozoários parasitas intracelulares obrigatórios com um desenvolvimento endógeno. O ciclo culmina na produção de formas encistadas denominadas oocistos, que são descarregadas nas fezes do hospedeiro. Parasitam o ápice das vilosidades das células intestinais de seus hospedeiros vertebrados, onde completam seu ciclo de vida monoxeno (FORTES, 2004; XIAO et al., 2004). Para a maioria das espécies deste filo, o estágio de oocisto é de grande importância para a dispersão, sobrevivência e infectividade do parasita. É também, o estágio importante para a detecção do parasita e identificação das espécies.

O *Cryptosporidium* foi descoberto como microrganismo patogênico de espécies animais no começo do século XX, mais precisamente no ano de 1907. Somente em 1976 foi verificada sua patogenia ao organismo humano, com relatos difundidos pelo mundo todo, em pacientes com neoplasias hematológicas (CANTALICE NETO et al., 1998).

Atualmente, 26 espécies de *Cryptosporidium* são reconhecidas, sendo nove capazes de infectar humanos (Tabela 2) (ASSIS et al., 2013; CHALMERS; KATZER, 2013; SHARMA et al., 2013;), sendo que diversos grupos de subtipos e subgenótipos de *Cryptosporidium* têm sido identificados, dos quais os subtipos *C. parvum* IIa e IIb foram identificados como zoonóticos (PLUTZER; KARANIS, 2009; HELMY et al., 2013).

Quadro 2: Espécies de *Cryptosporidium* e seus hospedeiros (segundo Xiao et al., 1999; Lindsay et al., 2000; Xiao et al., 2001; Xiao et al., 2004; Fayer et al., 2006; Feng et al., 2007).

Espécies	Hospedeiro principal
<i>Cryptosporidium canis</i>	Cães
<i>Cryptosporidium felis</i>	Gatos
<i>Cryptosporidium suis</i>	Suínos
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Bovinos, Ovinos, caprinos e humanos
<i>Cryptosporidium hominis</i>	Humanos e macacos
<i>Cryptosporidium andersoni</i>	Bovinos e camelos
<i>Cryptosporidium muris</i>	Roedores e camelos
<i>Cryptosporidium hominis</i>	Humanos
<i>Cryptosporidium meleagridis</i>	Perus e humanos

Estudos têm demonstrado uma heterogeneidade de *Cryptosporidium* spp. nas infecções humanas e animais e tem sugerido uma conexão íntima entre a presença destas infecções, a eliminação de grandes quantidades de oocistos no ambiente por animais domésticos e a contaminação de águas superficiais (SILVA, 2004).

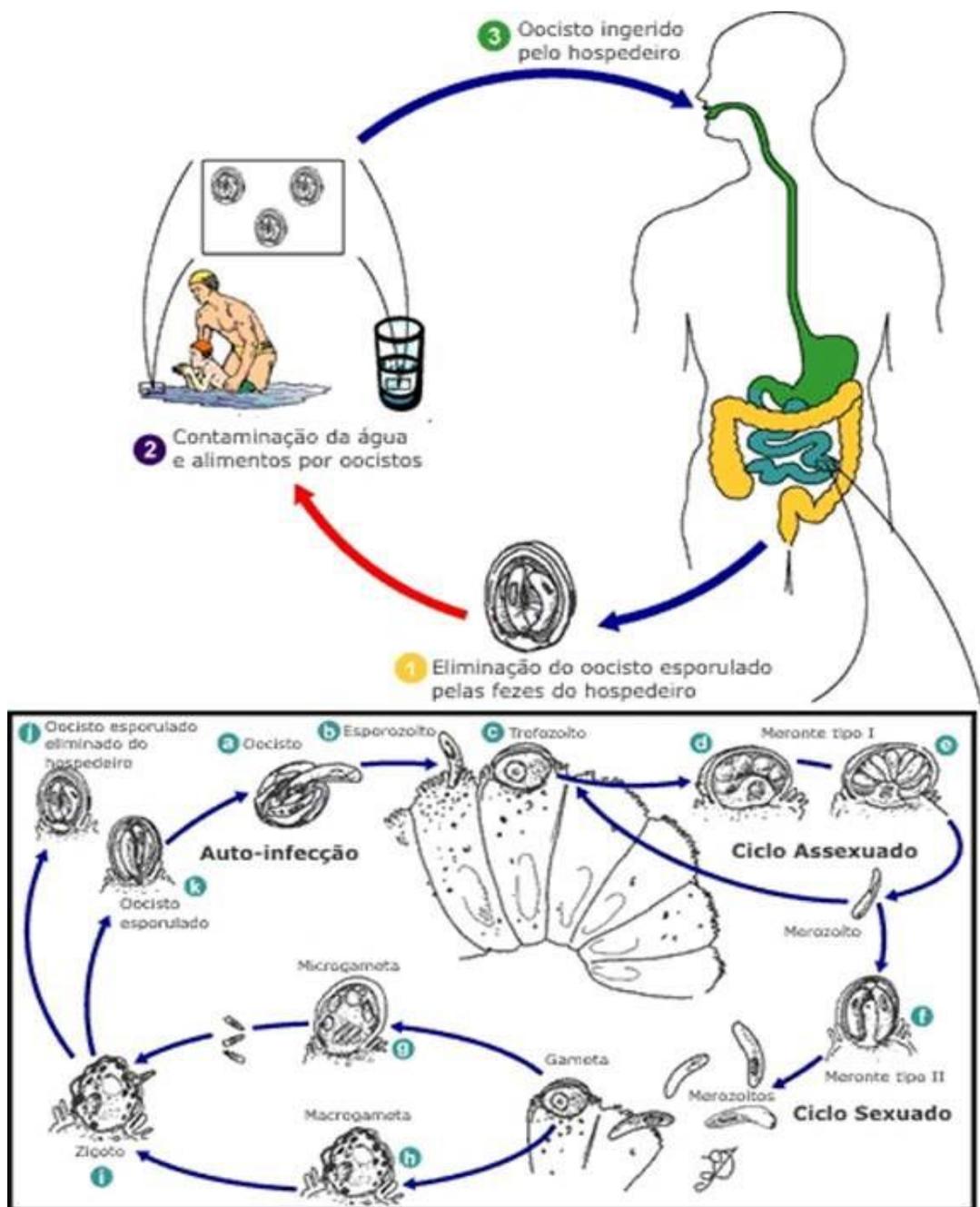
2.2.1 Ciclo biológico

O ciclo das espécies de *Cryptosporidium* é muito semelhante aos ciclos dos outros coccídios pertencentes a subordem Eimeriorina em todos os seus estágios evolutivos (SMITH; ROSE, 1998). Monoxênico, com duas fases de desenvolvimento, uma assexuada e outra sexuada, ocorrendo no mesmo hospedeiro (SMITH et al., 2007; XIAO e FAYER, 2008). O parasito possui seis estágios de desenvolvimento dentro do organismo do hospedeiro infectado, que são: a excitação dos oocistos, merogônia, gametogônia, fertilização, formação da parede dos oocistos e a esporogônia (SMITH; ROSE, 1998) (Figura 2).

O início do ciclo ocorre com a eliminação de oocistos esporulados nas fezes do hospedeiro infectado. Outro animal susceptível irá se infectar ao ingerir oocistos presentes na água, alimentos ou em fômites. Com a excitação, haverá a liberação de quatro esporozoítos e a adesão dos mesmos na superfície das células epiteliais do trato gastrointestinal, onde serão englobados pelas microvilosidades, formando um vacúolo parasitóforo (localização intracelular extracitoplasmática). A seguir, haverá a diferenciação dos esporozoítos em trofozoíto, iniciando a multiplicação assexuada ou merogônia (CURRENT, 1999; SRETER; VARGA, 2000; XIAO et al., 2004; SMITH et al., 2007).

Trofozoítos originarão merontes tipo I e tipo II, com oito e quatro merozoítos em seu interior, respectivamente e a seguir formarão microgametócitos e macrogametócitos, que são os estágios sexuais do parasito (SMITH et al., 2007). Após a fertilização, ocorrerá a formação de dois tipos de oocistos: os de parede fina e os de parede espessa. Ambos possuem a capacidade de esporulação dentro do hospedeiro, contendo em seu interior quatro esporozoítos livres. Oocistos de parede fina sofrem excitação na luz do trato gastrointestinal, onde são capazes de iniciar uma autoinfecção, enquanto que os oocistos de parede espessa são eliminados, na forma infectante, em fezes e são altamente resistentes em condições ambientais (CURRENT, 1999; VARGA, 2000; XIAO et al., 2004; SMITH et al., 2007).

Figura 2 - Ciclo de vida do *C. parvum*



Fonte: Adaptado do Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

2.2.2 Criptosporidiose

Para Araújo et. al. (2007), a criptosporidiose se configura como uma doença diarreica, que acomete com gravidade indivíduos imunocomprometidos, sendo benigna em pacientes imunocompetentes. A patologia é caracterizada pela ocorrência de diarreia prolongada ou persistente, associada a dor abdominal, náuseas, vômitos e, mais raramente, febre, mal-estar e anorexia (WIEBBELLING et. al., 2002).

A importância da criptosporidiose em animais de produção é traduzida não só pelo potencial zoonótico de algumas espécies como também pela perda econômica que esta infecção promove (OLSON et al., 2004) e segundo Silva (2004) o *C. parvum* é o enteropatógeno mais comumente encontrado durante as primeiras semanas de vida em ruminantes, sendo considerado importante na etiologia das síndromes diarreicas neonatais.

Tal síndrome é consequência da interação entre produtos parasitários, que lesam a barreira epitelial e interferem nas respostas imunológicas e inflamatórias do hospedeiro (THOMPSON; PALMER; O'HANDLEY, 2008), com comprometimento da conversão alimentar; redução no ganho de peso vivo, diminuição da produção, com morbidade alta em surtos e ocasionalmente o óbito do animal (FOREYT, 1990; VIEIRA et al., 1997), gerando grande prejuízo econômico ao criador (VIEIRA, 1999, NOORDEEN et al., 2012). O parasito frequentemente age sozinho, mas a doença é mais pronunciada quando outros agentes estão presentes (RADOSTITS et al., 2000; SILVERLÅS et al., 2013).

Em animais de produção há uma variabilidade sazonal na frequência da infecção, pois o aumento da ocorrência está associado com a época das chuvas, de dezembro a fevereiro (GREEN et al., 2004). Também dependendo da época há uma espécie responsável pelo surto, o que torna difícil determinar um hospedeiro específico. Atualmente, observa-se maior ocorrência do *C. andersoni*, embora o *C. parvum* também seja diagnosticado com bastante frequência, inclusive simultaneamente com *Giardia* (OZMEN et al., 2006). É muito comum a ocorrência de recidiva e esse protozoário comumente participa de infecções mistas (PUGH, 2005).

A patogenia e o quadro clínico da doença são influenciados por vários fatores que incluem entre eles idade, competência imunológica do indivíduo infectado e a associação com outros patógenos (RADOSTITS et al., 2000) e quando o parasita está presente, causa inflamação e atrofia das vilosidades intestinais resultando em perda da superfície de absorção, desequilíbrio no transporte de nutrientes (THOMPSON; PALMER; O'HANDLEY, 2008) com consequente comprometimento na produtividade animal (DECUBELLIS; GRAHAM, 2013).

Apesar de poucos relatos em pequenos ruminantes, a criptosporidiose tem sido responsável pela diminuição da produtividade e retardo no crescimento, podendo até levar à morte (TZIPORI et al., 1981; ANGUS et al., 1982; FOREYT, 1990; DE GRAFF et al., 1999).

2.2.2.1 Criptosporidiose em pequenos ruminantes

O protozoário *Cryptosporidium* é considerado como um dos principais patógenos entéricos em cabras (DELAFOSSÉ et al., 2006). O mesmo tem sido observado em vários países do mundo apresentando prevalências variáveis: 2,5% na França (CASTRO-HERMIDA et al., 2005); 4,8% no Brasil (BOMFIM et al., 2005); 67,7% na Argentina (VENTURINI et al., 2006); 4,8% na Zâmbia (GOMA et al., 2007), 35,8% na Bélgica (GEURDEN et al., 2008) e 16,66% no Brasil (COELHO, 2011).

A primeira evidência de infecção por *Cryptosporidium* spp. foi na Austrália com acometimento de um cabrito com duas semanas de idade, que veio a óbito após curto episódio diarreico (MASON; HARTLEY; TILT, 1981) e no Brasil o parasito foi observado primeiramente nessa espécie por Vieira e seus colaboradores em 1997.

Além do mais, caprinos assumem significado importante na transmissão do *Cryptosporidium* spp. para o ser humano, visto que pode atuar como reservatório de grupos zoonóticos de *C. parvum* (MONIS; THOMPSON, 2003; QUÍLEZ et al., 2008; XIAO; FENG, 2008, RIEUX et al., 2013).

Já em ovinos, a infecção por *Cryptosporidium* foi primeiramente descrita na Austrália em animais de uma a três semanas de idade que apresentavam diarreia (BARKER; CARBONELL, 1974). Seu papel como um agente etiológico primário foi confirmado em experimentos realizados no início da década de 80 (ANGUS et al., 1982; SNODGRASS et al., 1984). Desde então, o parasita tem representado importante papel na Síndrome da Diarreia Neonatal em espécies domésticas e é atualmente associada a altos níveis de morbidade. Dependendo das condições ambientais e da presença de outros agentes enteropatogênicos pode haver alta mortalidade (ANGUS, 1990; MATOS-FERNANDEZ et al., 1994; MATOS-FERNANDEZ et al., 1996). O período pré-patente em ovelhas é em torno de 2-7 dias (TZIPORI et al., 1981) e cerca de quatro dias em filhotes (KOUDELA; JIRI, 1997).

Normalmente, os animais entre uma e cinco semanas de idade demonstram os sinais clínicos entre cinco dias e duas semanas (CASTRO-HERMIDA et al., 2007). Este período é inversamente proporcional à dose do agente infectante e diretamente proporcional à idade do animal (ORTEGA-MORA; WRIGHT, 1994).

Estudos de prevalência e ocorrência de *Cryptosporidium* em ovinos tem sido relatados no mundo todo, mas há pouca informação a respeito das espécies ou genótipos (SANTÍN et al., 2007).

Fiuza et al. (2011) detectaram 1,6% (2/90) de infecção por este parasito em cordeiros entre dois a seis meses de idade, com identificação molecular de *C. ubiquitum* em dez rebanhos de ovinos no Rio de Janeiro. Em Araçatuba/SP, *C. parvum* foi diagnosticado em ovinos por Féres et al. (2009) e na Polônia por Majewska et al. (2000). Shen et al. (2011) na China e Silva (2007) observou na cidade de Tupi-Paulista/SP, *C. parvum*, *C. bovis*, *C. felis* e *C. genótipo cervine*.

As espécies de *Cryptosporidium* encontradas em ovinos até o presente momento foram o genótipo suíno tipo II, genótipo marsupial, *C. suis*, *C. andersoni*, *C. parvum*, *C. bovis-simile*, *C. muris*, *C. bovis*; *C. cervine* 1 e 2 (RYAN, 2005; SANTIN et al., 2007).

2.2.3 Epidemiologia

A criptosporidiose é conhecida por ocorrer tanto em humanos como em animais. A prevalência da doença em humanos é registrada principalmente nos indivíduos imunocomprometidos. Quando estabelecido o quadro de infecção nestes pacientes, a reversibilidade da enfermidade dificilmente ocorre, levando o paciente ao óbito (LIMA; STAMFORD, 2003).

O protozoário do gênero *Cryptosporidium*, possui alta resistência aos processos convencionais de tratamento de água. Além disso, sua baixa seletividade por hospedeiro e a possibilidade de transmissibilidade direta (do homem para o homem) e cruzada (de animais para o homem) são fatores que contribuem para a rápida disseminação da doença (LOPES, 2002). Outro fator que auxilia na ampla ocorrência da doença é ela ser silenciosa em alguns casos, em indivíduos imunocompetentes, que não deixam de espalhar o protozoário em algum momento (LIMA; STAMFORD, 2003).

Oocistos eliminados nas fezes permanecem infectantes no meio ambiente por até seis meses em temperatura de 20°C, três meses entre 25-30°C e sete meses quando armazenados em água a 15°C, o que demonstra que as fezes podem representar uma importante forma de veiculação de oocistos entre os animais domésticos ou silvestres, a água destinada a bebida ou recreação e em alimento para humanos (ANDERSON, 1985; FAYER et al., 1998).

Na transmissão da criptosporidiose, alguns grupos de insetos, como as baratas, moscas domésticas e alguns tipos de besouros, já foram incriminados como vetores mecânicos do agente (FAYER et al., 2000).

O tamanho do oocisto é reduzido, quando comparado a outros protozoários da classe (O'DONOUGHUE, 1995). Essa característica possibilita que o parasita se dissemine de várias formas. Segundo o autor, a dimensão pequena do oocisto possibilita a sua locomoção pela água, que representa a sua principal forma de disseminação, pelo vento, por objetos sólidos, ou mesmo por frutas, verduras e legumes. Esta movimentação pode ocorrer por infecção de outros animais, ou até mesmo nas superfícies externas destes animais ou do próprio homem (LOPES, 2002).

Possuem uma resistência muito alta e sobrevive à maioria dos desinfetantes como álcool, hipoclorito de sódio, fenóis e quaternário de amônia, entre outros. Também é resistente à concentração de cloro empregada na cloração da água (SPÓSITO FILHA; OLIVEIRA, 2009).

Quanto à temperatura, os oocistos do protozoário causador da criptosporidiose podem resistir, em suspensões aquosas até 67 °C por um minuto e 60 °C por cinco minutos (FAYER, 1997). Importante salientar que o processo de pasteurização em temperatura aproximada de 72 °C, por 15, 10 ou 5 segundos é capaz de tornar inativos os oocistos em questão (LOPES, 2002).

Em solos sua disseminação é pouco estudada, porém em águas superficiais tratadas ou não há dados que demonstram essa prevalência (LOPES, 2002). Porém em águas superficiais, de consumo humano ou de efluentes de esgotos vários estudos demonstraram ampla ocorrência do *Cryptosporidium* spp.

2.2.4 Diagnóstico

Quando a intenção é apenas observar se há contaminação pelo agente etiológico, os métodos de exame parasitológico rotineiro de fezes e colorações especiais de esfregaços de fezes são suficientes. Agora se o estudo objetiva determinar a espécie de *Cryptosporidium* envolvida, o uso da técnica do PCR se faz necessária (LOPES, 2002).

Para Nelson e Couto (2010), o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. requer a observação dos oocistos ou um resultado positivo no ensaio imunoenzimático (ELISA). Onde o *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. (BALLWEBER, 2001).

A principal técnica de diagnóstico utilizada nos laboratórios é a que permite a identificação da presença de oocistos do protozoário nas fezes, sem a determinação da

espécie envolvida (HUBER, 2007). Podem ser analisadas amostras de fezes frescas como também preservadas através de solução de ácido acético, acetato de sódio ou formalina. Devido à dificuldade de identificação e 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 (HINICHSEN, 2005).

Colorações especiais que facilitem a identificação dos oocistos, como as técnicas álcool-ácido-resistentes: Ziel-Neelsen modificado e carbofucsina de Kinyou modificado são bastante empregadas. Outras técnicas de coloração também tem sido relatadas como a hematoxilina férrica e safranina tricrômica e prata metanamina (CIMERMAN, CIMERMAN, 1999; HINICHSEN, 2005).

Com a descoberta do *Cryptosporidium* após 1980 a técnica de Ziel-Neelsen, desenvolvida por Ehrlich, começou a ser aplicada e posteriormente modificada por Henriksen e Pohlenz em 1981, foi descrita mais tarde por Casemore em 1991 e desde então tem sido usada largamente para o diagnóstico laboratorial da criptosporidiose (CLARKE; McINTYRE, 2001).

De acordo com Garcia et al. (2000), a coloração ácido-resistente ou método de Ziehl-Neelsen foi inicialmente utilizada para corar bactérias, como os bacilos da tuberculose e da lepra (micobactérias), baseado em suas características tintoriais. A ácido-resistência está relacionada à presença de lipídios, ligados fortemente a parede celular, que resistem a extração sucessiva com álcool-éter e clorofórmio. A integridade física da parede celular é essencial a ácido-resistência. O método de coloração pelo Ziehl-Neelsen modificado ou ácido-resistência usando carbofucsina apresentou resultados fidedignos para detecção de *Cryptosporidium* spp. em esfregaços de fezes, bem como em tecido de biópsia intestinal, não permitindo que fossem confundidos com leveduras.

Os oocistos nas colorações ácido-resistentes são observados como estruturas esféricas, medindo de 3 a 6 µm de diâmetro, em diferentes graus de intensidade de vermelho-brilhante, contendo granulações escuras em seu interior, correspondentes às formas esporuladas. Algumas vezes, a dupla parede do oocisto aparece altamente refringente, em contraste ao fundo azul ou verde (DIAS JÚNIOR, 1999).

Os testes de imunoensaio, que detectam o antígeno em amostras de fezes, tem capacidade para análise de um grande número de amostras, sem a necessidade de utilização de um técnico experiente a identificação. Apresentam alta especificidade (90-

100%), porém a sensibilidade pode ficar em torno de 70%, podendo ocorrer falsos positivos. Geralmente não apresentam bons resultados quando o número de oocistos é pequeno (JONSTON et al., 2003 apud XIAO; CAMA, 2006).

Os testes comerciais para diagnóstico em amostras de fezes: Rida Quick *Cryptosporidium*, Ridascreen *Cryptosporidium*, Rida Quick Coomb e *Cryptosporidium* Strip foram avaliados por Weitzel et al. (2006), onde os mesmos apresentaram sensibilidade de 88%, 82%, 82% e 75% respectivamente, apresentando rapidez de diagnóstico e facilidade de leitura. Ferreira et al. (2001) defendem que a identificação de oocistos em amostras de fezes permaneça como um importante recurso diagnóstico, uma vez que uso de “kits” são dispendiosos enquanto que a microscopia exige apenas instrumental básico e laboratório, além de oferecer poucas probabilidades de resultados falsos-positivos, uma vez que as preparações permanentes podem ser examinadas novamente em caso de dúvidas.

Técnicas moleculares, especialmente a PCR, são os mais sensíveis métodos para detectar a presença do parasito. Várias ferramentas vêm sendo desenvolvidas possibilitando também a diferenciação de espécies dentro do gênero ou distinguir genótipos dentro da mesma espécie, possibilitando a identificação de fontes de infecção e/ou rotas de transmissão (WARD; WANG, 2001; CACCIÓ, 2004). Além do mais, a possibilidade de detecção do *Cryptosporidium* em amostras que apresentem um baixo número de oocistos capacita esta metodologia para identificação do parasita em pacientes em fases finais ou iniciais da doença, bem como em amostras de solo ou água contaminadas. Amostras orgânicas como fezes ou solos, muitas vezes contêm inibidores que podem reduzir a sensibilidade do PCR, necessitando que algumas técnicas sejam utilizadas para evitar esta inibição, como a remoção ou purificação dos oocistos antes da extração do DNA e remoção desses inibidores durante a extração do DNA (WARD; WANG, 2001).

Um ponto importante do diagnóstico consiste na eliminação dos oocistos pelo hospedeiro, que ocorre de modo intermitente em indivíduos sintomáticos e assintomáticos. Desta maneira, várias amostras de fezes devem ser analisadas antes de ser dado um diagnóstico preciso (FAYER, 1997).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Estimar a ocorrência de infecções naturais por *Giardia* ssp. e *Cryptosporidium* spp. em caprinos e ovinos, criados extensivamente em propriedades da Mesorregiões Metropolitana de Belém e do Nordeste Paraense.

3.2 Específicos

Verificar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em ovinos e caprinos por meio de análise coprológica e microscopia ótica em municípios do Pará;

Comparar a prevalência da infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. nas espécies ovina e caprina.

Verificar a coinfeção dos enterozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em ovinos e caprinos.

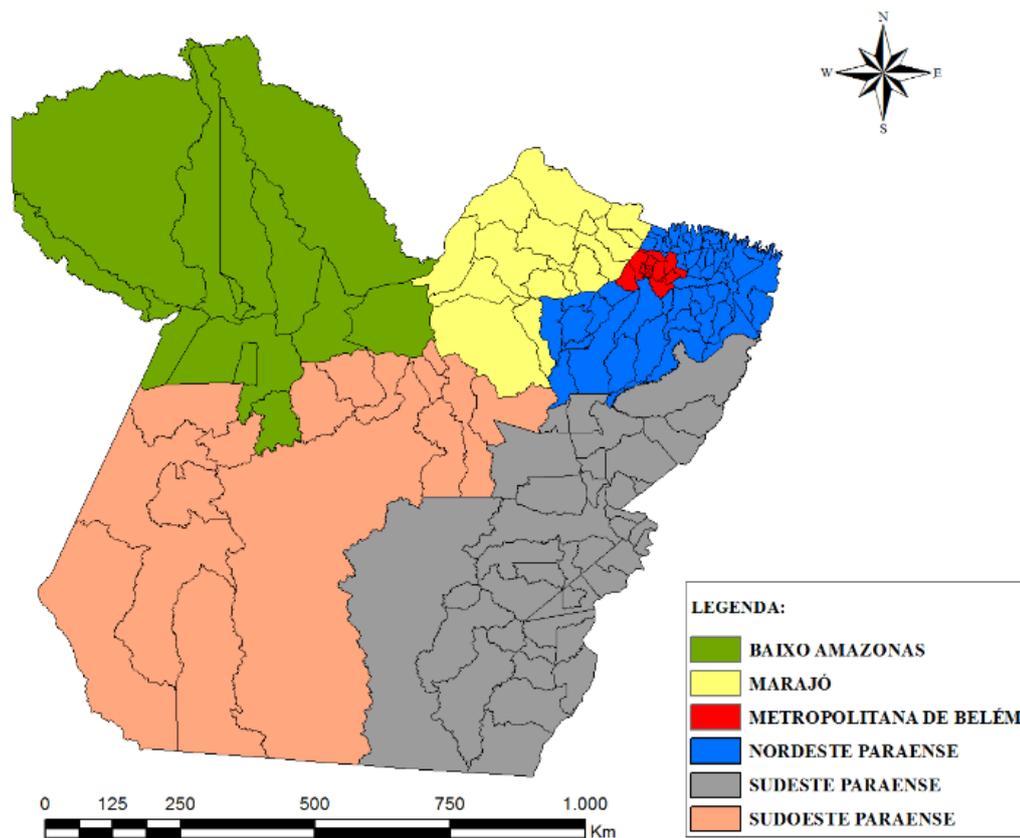
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 População estudada

Os animais objetos do presente estudo foram provenientes de sete propriedades localizadas nos municípios de São Miguel do Guamá, Santa Maria do Pará, São Francisco do Pará, Igarapé-Açu, pertencentes à mesorregião do Nordeste paraense e Castanhal, Santa Bárbara e Belém, pertencentes à Mesorregião metropolitana de Belém (Figura 3).

Para o estudo foram selecionados ao acaso animais jovens (< 12 meses de idade), entre caprinos e ovinos, sem raça definida, de ambos os sexos, apresentando ou não quadro diarreico, criados sobre regime semi-intensivo e extensivo. A coleta de amostras de fezes animal foi realizada no período de Agosto a Dezembro de 2015.

Figura 3: Mapa do Estado do Pará ilustrando as Mesorregiões paraenses.



Fonte: <https://www.google.com.br/>

4.2 COLETA DE AMOSTRAS

As amostras de fezes foram obtidas diretamente da ampola retal de 150 animais, sendo 100 ovinos e 50 caprinos, com o auxílio de luvas de procedimento e em seguida armazenadas em tubos de Falcon de 50 mL, devidamente identificados e transportados em caixa de polímero expandido contendo gelo reciclável para conservação das mesmas. Para a pesquisa de *Giardia* spp., as amostras foram processadas até 48 horas após a coleta. Já para a pesquisa de *Cryptosporidium* spp., as amostras foram congeladas a -18° C e

processadas posteriormente. As análises foram realizadas no Laboratório de Protozooses da Sessão de Parasitologia do Instituto Evandro Chagas.

4.1.1 Preparo das amostras para análise e técnicas laboratoriais utilizadas

4.1.1.1 Pesquisa de *Cryptosporidium* spp.

Foi utilizado o método de diagnóstico de Ziehl-Neelsen modificada ou coloração ácido-resistente, coloração de Kinyoun, realizando-se a preparação de duas lâminas para cada amostra de fezes.

Para a pesquisa de oocistos utilizou-se no processamento laboratorial aproximadamente 1g das fezes coletadas, tanto para ovinos quanto para caprinos, dissolvidas em 10 mL de formol a 5% dispostos em tubo de Falcon. As amostras em formol ficaram em descanso por no mínimo 24 horas e após esse período, a diluição foi filtrada em copo plástico descartável para reter ao máximo os resíduos grosseiros com o auxílio de filtros descartáveis, onde uma parte equivalente a 4mL deste filtrado foi colocado em tubo tipo Falcon de 14mL, acrescido de 4mL de éter. O tubo em seguida foi tampado e o conteúdo foi emulsionado por 10 vezes e deixado em repouso por 5 minutos e em seguida o material foi centrifugado a 2.000 rpm por 5 minutos segundo a técnica de centrifugo-concentração pelo método éter-formol (LEÓN *et al.*, 1999). O sobrenadante então é desprezado e o sedimento retido no fundo do tubo foi utilizado na confecção do esfregaço em duas lâminas com extremidades foscas, identificadas para cada amostra e deixadas secar em temperatura ambiente.

Em seguida as lâminas foram submetidas à técnica de coloração de Ziehl-Neelsen modificado, com a utilização da fucsina carbólica, segundo as recomendações de Ortolani (1988). Após a secagem, as lâminas foram fixadas com Metanol (Álcool Metílico) e deixadas para secar novamente e em seguida a porção com o esfregaço foi coberta com a fucsina carbólica durante 30 minutos, que serve para marcar o local onde o oocisto está presente.

As lâminas foram lavadas com água corrente para a remoção do excesso da fucsina e em seguida foram cobertas com solução de álcool-ácido sulfúrico a 0,5% durante 5 minutos para remover ainda mais o excesso do corante, lavadas e posteriormente cobertas pelo Verde Malaquita durante 5 minutos, em seguida lavadas pela última vez e deixadas para secar naturalmente. Por último foram examinadas em objetiva de imersão com

aumento de 100X com duas gotas de óleo de imersão no microscópio óptico.

4.1.1.2 Pesquisa de *Giardia* spp.

Para a detecção de cistos do parasito foi realizado o teste de rotina coproparasitológica através da exame direto e observação microscópica do enteroparasita.

Uma pequena quantidade de fezes é colocada em lâmina de microscopia identificada onde posteriormente são adicionadas algumas gotas de Lugol. Com a ajuda de um palito de madeira o material é diluído na solução até a sua homogeneização. A mistura é então coberta com uma lamínula e a leitura das lâmina para a pesquisa dos cistos é realizada no microscópio óptico.

4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Uma vez obtidos os resultados das amostras fecais, os dados serão tabulados em planilhas do Microsoft Excel 2007 e avaliados quanto à estatística descritiva pelo programa SAS, comparando-se os dados mediante análise de variância (ANOVA) através do teste Qui-quadrado (X^2) com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 150 amostras analisadas a presença de cistos de *Giardia* spp. foi observada em 14,66% (22/150) das amostras, sendo 19% (19/100) e 6% (3/50) na espécie ovina e caprina, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 1: Ocorrência de *Giardia* spp. em amostras fecais de ovinos e caprinos provenientes de propriedades das Mesorregiões Metropolitana de Belém e do Nordeste Paraense, 2016.

ESPÉCIE	(%)	N
Ovina	19	19/100
Caprina	6	3/50

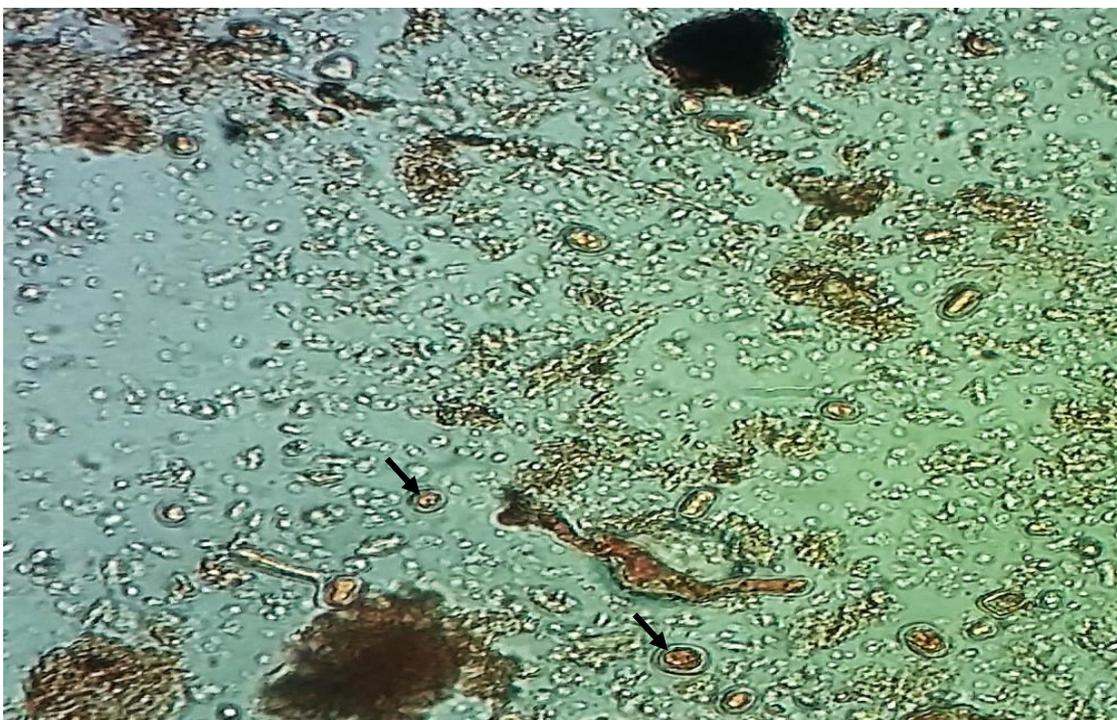
Teste Qui-quadrado= 4,5011; $p \geq 0,0339$

Bomfim et al. (2004) referem que em ovinos e caprinos, as informações sobre prevalência de infecção por *Giardia* são extremamente escassas, portanto os resultados apresentados no presente estudo, irá contribuir com informações acerca da infecção por este protozoário em pequenos ruminantes criados ao nível regional.

Em relação aos ovinos, no presente estudo, a ocorrência de *Giardia* spp. (Figura 4), apresentou resultado similar aos de Souza et al. (2012), no Rio Grande do Norte que detectaram frequência de 18,75% (12/64) de cistos de *Giardia* spp., em cordeiros da raça Santa Inês. Já Santin et al. (2007), no estado de Maryland, USA, registraram uma prevalência de 4% de (1,24/31) amostras positivas para *Giardia* spp. utilizando a técnica de PCR, mostrando que mesmo utilizando uma técnica que apresenta alta sensibilidade, ainda sim os resultados mostraram baixa ocorrência do protozoário.

No presente estudo alguns animais apresentaram quadro diarreico, porém não foi possível identificá-los e nem correlacionar com a presença dos cistos de *Giardia* spp. em amostras fecais. Silva (2009) estudou a infecção natural por *G. duodenalis*, em cordeiros machos da raça Santa Inês e não observou nenhum caso de diarreia. Nesse sentido, Buret et al. (1990) assevera que nem sempre a infecção por *Giardia* está relacionada à quadro de diarreia. De forma semelhante, Huetink et al. (2001), não correlacionaram a presença do parasito com a consistência das fezes obtidas no estudo realizado com bezerras. Entretanto, alguns trabalhos, como o realizado por Xiao et al. (1993) relatam a presença de cistos de *Giardia* spp. em bovinos jovens, com episódios de diarreia acometendo tanto isoladamente quanto associada à outros enteropatógeno, assim como Aloisio et al. (2006), que afirma que a giardíase pode estar associada à presença de diarreia aguda, causando assim impacto negativo na ovinocultura, visto que o animal passa apresentar limitação no seu desenvolvimento e no ganho de peso.

Figura 4: Exame direto: cistos de *Giardia* spp. (setas) em amostra fecal de ovino proveniente de propriedade da Mesorregiões Metropolitana de Belém e do Nordeste Paraense.



Fonte: SOUZA, M. G. M. 2016.

Para Farthing et al. (2009), em animais assintomáticos o parasito não apresenta qualquer efeito prejudicial, mesmo não estando claro se a infecção assintomática é resultado de contaminação com espécies não patogênicas ou se está relacionado à capacidade do hospedeiro em manter o número de parasitas abaixo do número necessário para desenvolver sintomatologia. Por isso McGlade et al. (2003) e Geurden et al. (2008) sugerem que a coleta das fezes para detecção de *Giardia* spp., deve ser feita de forma sequencial, de preferência por três dias consecutivos, devido à excreção intermitente de cistos do parasita. O presente estudo não seguiu tal critério, o que pode ter levado à obtenção de resultados falsos negativos na observação microscópica.

Durante as coletas das amostras de estudo, foi observado em algumas propriedades que as instalações onde os animais eram mantidos não apresentavam condições adequadas de higiene e a água fornecida para eles (Figura 5) muitas vezes tinha

origem de alguma fonte natural ou da própria propriedade, o que pode contribuir para a infecção por cistos de *Giardia* spp.

Figura 5: Fonte de água disponível para os animais de estudo de uma das propriedades que fizeram parte do estudo



Fonte: SOUZA, M. G. M. 2016.

A ocorrência de *Giardia* spp. em caprinos apresentou-se bastante inferior em relação aos ovinos, havendo diferença significativa em relação à espécie parasitada segundo o teste Qui-quadrado.

A presença de cistos de *Giardia* spp. em caprinos raramente é descrita pela literatura, sendo o primeiro relato feito por Bonfim et al. (2004) na região serrana do Rio de Janeiro. No referido estudo 105 amostras fecais foram analisadas pela técnica de centrífugo-flutuação e destas 56 foram oriundas de animais adultos e 46 de animais jovens, onde foi obtido 14,3% (15) de positividade para cistos de *Giardia* spp. todos em animais jovens. Sudré et al. (2012), registraram 22,4% de caprinos com aptidão leiteira de até um ano de idade positivos para *Giardia*. Resultado semelhantes aos obtidos por Radaveli et al. (2014), em caprinos de diferentes idades em Santa Catarina, com 22,6% de amostras positivas para *Giardia* spp.. Já na França Castro-Hermida et al. (2005), detectaram uma alta prevalência de 38% de *Giardia* spp. em caprinos com idade de cinco

a 12 meses. Os resultados obtidos pelos trabalhos supracitados foram bem superiores ao verificado em caprinos nesse estudo, com 6% de animais positivos para o enteroprotzoário.

Na pesquisa de *Cryptosporidium* spp., oocistos do protozoário estavam presentes em 8,66 % (13/150), das amostras analisadas, sendo 7% (7/100) em ovinos e 12% (6/50) em caprinos (Tabela 4). Resultados semelhantes foram obtidos por Silva (2009), em estudo experimental no Rio Grande do Norte que utilizando a técnica de Ziehl-Neelsen modificado, detectaram 7,4% de ovinos positivos para oocistos de *Cryptosporidium* spp., assim como Tembue (2007), no município de Ibimirim, Pernambuco, que identificou oocistos do coccídeo em 3,7% das amostras de fezes provenientes de animais com idade de três meses a quatro anos, utilizando a mesma técnica, sendo que as amostras positivas eram provenientes de animais jovens.

No entanto, valores superiores foram obtidos por Castro-Hermida et al. (2007) na Espanha, que registraram prevalência de 31%, Cosendey et al. (2008) no Estado do Rio de Janeiro com 41% de animais positivos e Romero-Salas et al. (2016), em estudo no México, observaram 67,5% (54/80) de ovinos com oocistos de *Cryptosporidium* spp. na faixa de até três meses de idade.

Tabela 4: Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de ovinos e caprinos provenientes de propriedades das Mesorregiões Metropolitana de Belém e do Nordeste Paraense, 2016

ESPÉCIE	(%)	N
Ovina	7	7/100
Caprina	12	6/50

Teste Qui-quadrado= 1,0528; $p \geq 0,3049$

A baixa prevalência do coccídeo pode estar relacionada à baixa contaminação do ambiente por oocistos, que pode ter relação com o sistema de criação, apesar dos oocistos permanecerem no ambiente por até seis meses em temperatura de 20°C, três meses entre 25-30°C e sete meses quando armazenados em água a 15°C, segundo Fayer (1998).

Animais infectados por *Cryptosporidium* spp. podem desenvolver sintomatologia clínica sugestiva, como apatia, desidratação, dores abdominais e diarreia assim como podem ser assintomáticos à infecção. Radostits et al. (2000) ressalta que a esse quadro

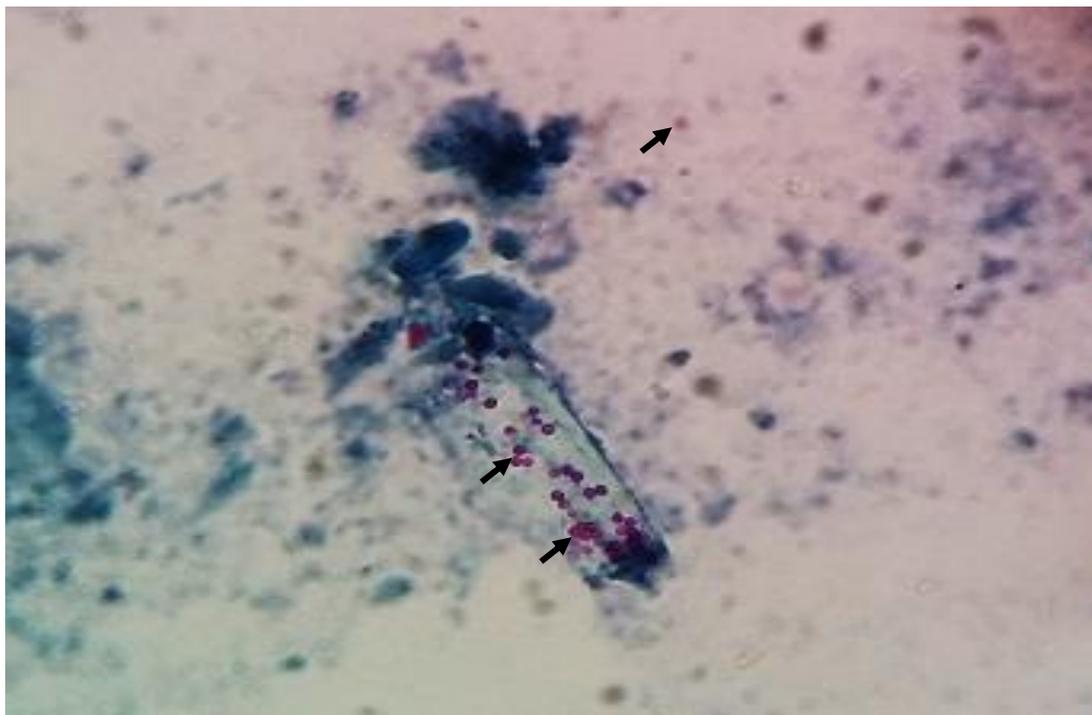
clínico desenvolvido pode ser influenciado por fatores como idade, imunocompetência individual e presença de outro patógeno e infecções por este protozoário pode comprometer a produtividade do animal, com retardo do seu crescimento devido à perda na capacidade de absorção de nutrientes, chegando até ao óbito. Além do mais estes indivíduos podem servir de fonte de contaminação para o ambiente e fontes de água, podendo até ocorrer a infecção em humanos, o que mostra a importância de se manter o controle do parasita.

No que se refere à ocorrência de *Cryptosporidium* spp. (Figura 6) na espécie caprina, no presente estudo foi obtido um percentual de 12% (6/50) de amostras positivas para o coccídeo. Resultados similares foram obtidos por Brito et al. (2014) em um estudo conduzido em Quixadá, no Ceará, com animais entre três e 360 dias. Os autores verificaram uma ocorrência de 7,5% de animais positivos, similar aos resultados de Geurden et al. (2008), em estudo na Bélgica com prevalência de 9,5%, em caprinos jovens e Coelho (2011) em Jaboticabal, SP com 11,45%.

No entanto, Castro-Hermida et al. (2004), obtiveram resultado inferior, com positividade de 2,4% em animais de cinco a 12 meses. Os autores ainda quantificaram os oocistos eliminados por grama de fezes dos animais estudados e os números encontrados variaram de 77 a 223 oocistos/g de fezes. No presente estudo, em uma das amostras positivas para *Cryptosporidium* spp., foi observada uma frequência elevada de oocistos por campo, indicando que o animal estava fortemente parasitado, aumentando assim a probabilidade de infecção de outros animais pertencentes ao rebanho.

Resultado superior ao no presente estudo, foi obtido por Radaveli et al. (2014), que detectaram uma frequência de 40,5% de amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. em um grupo de 217 caprinos.

Figura 6: Técnica de Ziehl-Neelsen modificado. Oocistos de *Cryptosporidium* spp. (setas) em amostra fecal de caprino oriundo de propriedade da das Mesorregiões Metropolitana de Belém e do Nordeste Paraense.



Fonte: SOUZA, M. G. M. 2016.

Quanto à presença tanto de *Giardia* spp. quanto de *Cryptosporidium* spp., na mesma amostra analisada, foi observada a ocorrência de 3% (3/100) em amostras de ovinos e 4% (2/50) nas de caprinos, não havendo diferença significativa no grau de parasitismo pelos dois protozoários nas duas espécies,

O parasitismo gastrointestinal em pequenos ruminantes é comum e prevalente, tanto por helmintos quanto por protozoários, como foi observado por Radaveli et al. (2014), que estudando a ocorrência de parasitoses em caprinos, de Santa Catarina, detectaram diferentes tipos de infecções, sejam mistas ou não, assim como os resultados obtidos por Brito et al. (2009), no Maranhão. Os autores observaram que 69,79% das amostras de ovinos e caprinos, foram positivas para os protozoários.

O parasitismo por *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. simultaneamente, foi descrito também em outras espécies de animais, como Oliveira et al. (2008), em gato-maracajá, no Rio Grande do Sul, que observaram um elevado parasitismo por cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp., assim como outros parasitas. O animal ainda não apresentava sinais clínicos que pudessem caracterizar as parasitoses, como diarreia, confirmando mais uma vez que nem sempre os animais infectados com os protozoários, podem ser sintomáticos. Também no Rio Grande do Sul, Silva et al. (2007) relataram infecção pelos dois protozoários, em nutria, mostrando que a infecção pelos coccídeos pode ocorrer individualmente mas também em associação. Ainda Santos

(2011) detectaram em três de 17 espécies diferentes de mamíferos silvestres em São Paulo a ocorrência tanto de *Giardia* spp. como de *Cryptosporidium* spp.

6 CONCLUSÃO

Mediante os resultados obtidos no estudo das infecções naturais por parasitos do gênero, *Giardia* e *Cryptosporidium* em ovinos e caprinos de propriedades localizadas nas Mesorregiões Metropolitana de Belém e do Nordeste paraense, pode-se concluir que:

- A ocorrência de *Cryptosporidium* e *Giardia* em ovinos e caprinos é baixa;
- A infecção por *Giardia* spp. em ovinos mostrou-se elevada em relação à ocorrência em caprinos;
- A infecção por *Cryptosporidium* spp. na espécie ovina não apresentou diferença significativa em relação ao parasitismo na espécie caprina.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ADAM, R. D. The biology of *Giardia* spp. **Microbiol. Rev.**, v. 55, p. 706-732, 1991.

ALMEIDA, A. J. **Diagnóstico e fatores de risco da Criptosporidiose bovina na microrregião de Campos dos Goytacazes - RJ, e identificação de *Cryptosporidium parvum* pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes. **80f, 2006.**

ALOISIO, F.; FILIPPINI, G.; ANTENUCCI, P.; LEPRI, E.; PEZZOTTE, G.; CACCIÒ, S. M.; POZIO, E. Severe weight loss in lambs infected with *Giardia duodenalis* assemblage B. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 154-158, 2006.

ANGUS, K. W. et al. London, An outbreak of diarrhea associated with cryptosporidiosis in naturally reared lambs. **The Veterinary Record**, v. 110, p. 129-130, 1982.

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

APPELBEE, A. J.; FREDERICK, L. M.; HEITMAN, T. L.; OLSON, M. E. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. **Veterinary Parasitology**, v. 112, n. 4, p. 289-94, 2003.

ASSIS, D. C.; RESENDE, D. V.; SANTOS, M. C.; CORREIA, D.; OLIVEIRA-SILVA, M. B. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Cystoisospora belli* in HIV-infected patients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 55, n. 3, p. 149-154, 2013.

BALLWEBER, L.R. **Veterinary Parasitology - The Practical Veterinarian**. Editora: Elsevier health sciences, p. 208-212, 2001.

BARWICK, R. S.; MOHAMMED, H. O.; WHITE, M. E.; BRYANT, R. B. Prevalence of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. on dairy farms in southeastern New York State. **Prev Vet Med.**, v. 59, n. 1-2, p. 1-11, 2003.

BERRILLI, F.; D'ALFONSO, R.; GIANGASPERO, A.; MARANGI, M.; BRANDONISIO, O.; KABORE, Y.; GLE, C.; CIANFANELLI, C.; LAURO, R.; DI CAVE, D. *Giardia duodenalis* genotypes and *Cryptosporidium* species in humans and domestic animals in Cote d'Ivoire: occurrence and evidence for environmental contamination. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, p. 191-195, 2012.

BONFIM, T. C. B.; HUBER, F.; GOMES, R. S.; ALVES, L. L. Infecção natural por *Giardia* em caprinos com aptidão leiteira na região serrana do estado do Rio de Janeiro. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 13, n. 3, p. 89-95, 2004.

BRITO, R. L. L.; INÁCIO, S. V.; OLIVEIRA, D. A. S.; SOUSA, M. M.; MEIRELES, M. V.; LOBO, R. N. B.; VIEIRA, L. S.; BRESCIANI, K. D. S. Ocorrência de infecção

por *Cryptosporidium* spp. em cabritos (*Capra hircus*). **Pesq. Vet. Bras.**, v. 34, n. 8, p. 728-732, 2014.

BURET, A.; DENHOLLANDER, N.; WALLIS, P. M.; BEFUS, D.; OLSON, M. E. Zoonotic potential of giardiasis in domestic ruminants. **Journal of Infectious Disease**, v. 162, n. 1, p. 231-238, 1990.

CACCIÒ, S. M.; RYAN, U. Molecular epidemiology of giardiasis. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v.160, p.75-80, 2008.

CASTRO-HERMIDA, J. A.; PORS, I.; POUPIN, B.; ARES-MAZ´AS, E.; CHARTIER, C. Prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium parvum* in goat kids in western France. **Sm Rum Res**, v. 56, p. 259–264, 2005.

CASTRO-HERMIDA, J. A.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; MEZO, M. Natural infection by *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in sheep and goats in Galacia (NW Spain). **Sm Rum Res**, v. 72, p. 96-100, 2007.

CHAIA, G. **Atlas de parasitologia**, São Paulo: Johnson & Johnson, p. 35-37, 1975.

CHALMERS, R. M.; KATZER, F. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. **Trends in Parasitology.**, v. 29, n. 5, p. 237-251, 2013.

CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. São Paulo: Ateneu, 375 p., 1999.

CLARKE, S. C.; McINTYRE, M. Acid-fast bodies in faecal smears stained by the modified Ziel-Neelsen technique. **British Journal of Biomedical Science**, v. 58, n. 1, p. 7-10, 2001.

COELHO, W. M. D. **Detecção molecular e subtipagem de *Cryptosporidium* spp. em caprinos, ovinos, bovinos, leitões e equinos jovens**. 2011, 86f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade De Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2011.

COSENDEY, R. I. J.; FIÚZA, V. R. S.; TEIXEIRA, C. S.; OLIVEIRA, F. C. R. Frequência de oocistos de coccídios do gênero *Cryptosporidium* em ovinos no estado do Rio de Janeiro. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v. 9, n. 4, p. 687-695, 2008.

CURRENT, W. L. *Cryptosporidium* Species. In: FOWLER, M. E.; MILLER, R. E. **Zoo and wild animal medicine current therapy**. 4th. ed. Philadelphia, Pennsylvania: W.B Saunders, p. 121-131, 1999.

DEGRAFF, D. C. et al. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1269-1287, 1999.

DIAS JÚNIOR, O. **Ocorrência de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais e esgoto no município de Araras-SP**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 1999.

EDERLI, B. B. **Ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* sp. em bezerros da microrregião de Campos dos Goytacazes no Estado do Rio de Janeiro.** Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes. 2002.

ERLANDSEN, S. I.; SHERLOCK, S. A.; BEMRICK, W. J.; GHOBRIAL, H.; JAKUBOWSKI, W. Prevalence of *Giardia* spp. In beaver and muskrat populations in northeastern states and Minnesota: detection of intestinal trophozoites at necropsy provides greater sensitivity than detection of cysts in fecal samples. **Appl Environ Microbiol.**, v. 56, p. 31-36, 1990.

FARTHING, M. J. G, CEVALLOS, A. M.; KELLY, P.; **Manson's Tropical Disease.** Elsevier. 22ed, 2009.

FAUBERT, G. Immune response to *Giardia duodenalis*. **Clin Microbiol Rev.** v. 13, p. 35-54, 2000.

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

FAYER, R.; SANTIN, M.; TROUT, J. M.; GREINER, E. Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1–2-year-old dairy cattle in the eastern United States. **Veterinary Parasitology**, v. 135, n. 2, p. 205-112, 2006.

FAYER, R. ***Cryptosporidium* e Cryptosporidiosis.** Primeira Edição, Ed. CRC Press, Boca Radon - Estados Unidos, 251 p., 1997.

FENG, Y.; ORTEGA, Y.; HE, G.; DAS, P.; XU, MEIQIAN.; 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, n. 1-2, p. 1-9, 2007.

FÉRES, F. C.; LOMBARDI, A. L.; CARVALHO, M. P. P.; MENDES, L. C. N.; PEIRÓ, J. R.; CADIOLI, F. A.; MEIRELES, M. V.; PERRI, S. H. V.; FEITOSA, F. L. F. Ocorrência e caracterização molecular de *Cryptosporidium* em cordeiros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 4, p. 1002-1005, 2009.

FERREIRA, C. S. et all. Identification of *Cryptosporidium* spp. oocysts in fecal smears stained with heidenhain's iron hematoxylin. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 43, n 6, 2001.

FIUZA, V. R. S.; COSENDEY, R. I. J.; FRAZÃO-TEIXEIRA, E.; SANTÍN, M.; FAYER, R.; OLIVEIRA, F. C. R. Molecular characterization of *Cryptosporidium* in Brazilian sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 3-4, p. 360-362, 2011.

FOREYT, W. J. Coccidiosis and cryptosporidiosis in sheep and goats. **Veterinary Clinics of North America: Food animal practice**, v. 6, n. 3, p. 655-670, 1990.

FORTES, E. **Parasitologia veterinária.** 2. ed. São Paulo: Ícone, p. 114-115, 2004.

GARCIA, L. S.; SHIMIZU, R. Y.; BERNARD, C. N. Detection of *Giardia Lamblia*, *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the triage parasite panel enzyme immunoassay. **J. Clin. Microbiol.**, 2000.

GEURDEN T.; THOMAS P.; CASAERT, S.; VERCRUYSSSE J.; CLAEREBOU, E. Prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* in lambs and goat kids in Belgium. **Veterinary Parasitology**, v. 155, n. 1-2, p 142-5, 2008.

GEURDEN, T., BERKVEN, D., CASAERT, S., VERCRUYSSSE, J., CLAEREBOU, E. A Bayesian evaluation of three diagnostic assays for the detection of *Giardia duodenalis* in symptomatic and asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 157, n. 1-2, p. 14-20, 2008.

GEURDEN, T.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOU, E. Is *Giardia* a significant pathogen in production animals?. **Exp Parasitol.** v. 124, p. 98-106, 2010.

HELMY, Y. A.; KRÜCKEN, J.; NÖCKLER, K.; SAMSON-HIMMELSTJERNAC, G. V.; ZESSIN, K. H. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in livestock animals and humans in the Ismailia province of Egypt. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 193, n. 1-3, p. 15-24, 2013.

HILL, D. R.; NASH, T. E. **Tropical Infectious Diseases**. 2° ed. P. 84-93, 2005.

HINICHSEN, S. L. **Doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 358-364, 2005.

HUBER, F. **Caracterização genotípica e estudo filogenético de *Cryptosporidium* spp. obtidos de diferentes hospedeiros**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2007.

HUETINK, R. E.; VAN DER GIESSEN, J. W.; NOORDHUIZEN, J. P.; PLOEGER, H. W. Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. **Veterinary Parasitology**, v. 102, n. 1-2, p. 53-67, 2001.

HUNTER, P. R.; THOMPSON, R. C. A. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. **Int. J Parasitol.** v. 35, p. 1181-1190, 2005.

KARANIS, P.; OPIELA, K.; RENOTH, S.; SEITZ, H. M. The possible implication of muskrats to contaminate surface Waters supplies with *Giardia* spp. cysts. **Int J Med Microbiol Virol Parasitol. Infect Dis.**, v. 284, p. 302-306, 1996.

KOUDELA, B.; JIRI, V. Experimental cryptosporidiosis in kids. **Veterinary Parasitology**, v. 71, p. 273-81, 1997.

LEÓN, P. P.; FLAHERTY, P.; ZDERO, M. Una nueva coloración safranina tricómica para la detección de *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora caytanensis*, especies de Microsporidia e *Isospora belli* em material fecal. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, n. 41, p. 211-214, 1999.

LIMA, E. C.; STAMFORD, T. L. M.. *Cryptosporidium* spp. no ambiente aquático: aspectos relevantes da disseminação e diagnóstico. **Revista Ciência e Saúde Coletiva**. v. 8, nº 3, p. 791-800, 2003.

LINDSAY, D. S.; UPTON, S. J.; OWENS, D. S.; MORGAN, U. M.; MEAD, J. R.; BLAGBURN, B. L. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 47, n. 1, p. 91-95, 2000.

LOPES, J. R. **Detecção, Identificação e Quantificação de Oocistos de *Cryptosporidium parvum* na Água: Métodos Convencionais e Imunofluorescência Pós-Separação Imunomagnética**. Tese (Mestrado) - Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2002.

MAJEWSKA, A. C.; WERNER, A.; SULIMA, P.; LUTY, T. Prevalence of *Cryptosporidium* in sheep and goats bred on five farms in west-central region of Poland. **Veterinary Parasitology**, v. 89, n. 4, p. 269- 275, 2000.

MCGLADE, T. R.; ROBERTSON, I. D.; ELLIOT, A. D.; THOMPSON, R. C. High prevalence of *Giardia* detected in cats by PCR. **Veterinary Parasitology**, v. 110, n. 3-4, p. 197-205, 2003.

MEYER, E. A. **Giardiasis: human parasitic diseases**.vol.3. Amsterdam, Elsevier Science, 368p, 1990.

MONIS, P. T.; CACCIO, S. M.; THOMPSON, R. C. A. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. **Trends Parasitol.**, v. 25, p. 93-100, 2009.

MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. A. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction?. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, n. 4 , p. 233-244, 2003.

MOTTA, J. A. C.; PENNA, F. J.; MELO, M. C. B. Parasitoses intestinais. In: LEO E.; CORREA E.J.; VIANNA M.B.; MOTTA J.A.C. (Eds.) **Pediatria ambulatorial**. 5. ed. Belo Horizonte: Coopmed, 2004.

NOGUEIRA, E. A.; MELLO, N. T. C. Diagnóstico sócio-econômico da caprinocultura no sudoeste paulista. *Informações Econômicas*, São Paulo, v.35, n.8, 2005. Disponível em: <<http://www.capritec.com.br/artigos.htm> >.

O'DONOUGHUE, P. J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. **International Journal for Parasitology**, v. 25, nº 2, p. 139-195, 1995.

O'HANDLEY, R. M.; OLSON, M. E.; FRASER, D.; ADAMS, P.; THOMPSON, R. C. *Giardia* in dairy calves from Western Australia and Western Canada. **Veterinary Parasitology**, v. 90, n. 3, p. 193-200, 2000.

OLSON, M. E.; O'HANDLEY, R. M.; RALSTON, B. J. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. **Trends Parasitol.** p. 185-191, 2004.

OLSON, M. E.; MCALLISTER, T. A.; DESELLIERS, L.; MORCK, D. W.; CHENG, K. J.; BURET, A. G.; CERI, C. Effects of giardiasis on production in a domestic ruminant (lamb) model. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 11, p. 1470-1474, 1995.

ORTEGA-MORA, L. M.; WRIGHT, S. E. Age-related resistance in ovine cryptosporidiosis: patterns of infection and humoral immune response. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 5003-5009, 1994.

ORTOLANI, E. L. **Padronização da técnica de Ziehl-Neelsen para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium*. Estudo de alguns aspectos epidemiológicos de criptosporidiose em bezerros de rebanhos leiteiros no estado de São Paulo.** 85f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1988.

PAULINO, R; C. **Detecção molecular de *giardia* sp em amostras fecais e água: extração de DNA genômico, PCR e RFLP.** Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, 122 p, 2005.

PLUTZER, J.; KARANIS, P. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: An update. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 3-4, p. 187-199, 2009.

PLUTZER, J; ONGERTH, J; KARANIS, P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: facts and open questions. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 213, p. 321-333, 2010.

POHJOLA-STENROOS, S. **Diagnostic and epidemiological aspects of *Cryptosporidium* infection, a protozoan infection of increasing veterinary public health importance.** Academic dissertation, College of Veterinary Medicine, Helsinki, Finland, 138p, 1986.

QUINTAS, H.; CARDOSO, L. Vermes parasitas digestivos de ovinos e caprinos. **Guia sanitário para criadores de pequenos ruminantes.** p. 155, 2012.

RADAVELI, W. M. et al. Occurrence of gastrointestinal parasites in goats from the Western Santa Catarina, Brazil. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, v. 23, n. 1, p. 101-104, 2014.

RALSTON, B. J.; MCALLISTER, T. A.; OLSON, M. E. Prevalence and infection pattern of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in range beef calves and their dams, **Veterinary Parasitology**, v. 114, p. 113-122, 2003.

RAMOS, C. I.; BELLATO, V.; SOUZA, A. P.; ÁVILA, V. S.; COUTINHO, G. C.; DALAGNOL, C. A. Epidemiologia das helmintoses gastrintestinais de ovinos no Planalto Catarinense. **Ciência Rural**, v. 34, p. 1889-1895, 2004.

ROMERO-SALAS, D.; ALVARADO-ESQUIVEL, C.; CRUZ-ROMERO A.; AGUILAR-DOMÍNGUEZ, M.; IBARRA-PRIEGO, N.; MERINO-CHARREZ, J. O.; LEÓN, A. A. P.; HERNÁNDEZ-TINOCO, J. Prevalence of *Cryptosporidium* in small ruminants from Veracruz, Mexico. **BMC Veterinary Research**, 6p, 2016.

SAMUEL, W. M.; PYBUS, M. J.; KOCAN, A. A. **Parasitic Diseases of Wild Mammals USA**: Iowa State University Press/ Ames. 2ª edição, pp. 399-412, 2001.

SANTÍN, M.; TROUT, J. M.; FAYER, R. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species and genotypes in sheep in Maryland. **Veterinary Parasitology**, v. 146, p.17-24, 2007.

SANTOS, R. C. F. **Importância de mamíferos neotropicais na epidemiologia de protozooses. Diagnóstico, caracterização molecular e aspectos ecológicos da infecção por *Giardia* e *Cryptosporidium***. 166f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2011.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative', **Trends in Parasitology**, v. 22, p. 203-208, 2006.

SHARMA, P.; SHARMA, A.; SEHGAL, R.; MALLA, N.; KHURANA, S. Genetic diversity of *Cryptosporidium* isolates from patients in North India. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. 601-605, 2013.

SHEN, Y.; YIN, J.; YUAN, Z.; LU, W.; XU, Y.; XIAO, L.; CAO, J. The identification of the *Cryptosporidium ubiquitum* in preweaned ovines from aba tibetan and qiang autonomous Prefecture in China. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 24, n. 3, p. 315- 320, 2011.

SILVA, M. B. O. Caracterização Genética de *Cryptosporidium parvum*. Rev. Bras. Parasitol. Vet., v.13. XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Ricketisioses, Ouro Preto, MG, 2004.

SILVA, F. M. P. **Diagnóstico e caracterização molecular de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bovinos e ovinos**. 167f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2007.

SILVA, R. M. **Infecção natural por *Eimeria* spp., *Cryptosporidium* spp. e *Giardia duodenalis* em cordeiros da raça mestiça Santa Inês, na região semi-árida do Estado do Rio Grande do Norte**. 2009, 94f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

SMITH, H. V.; CACCIO, S. M.; COOK, N.; NICHOLS, R. A. B.; TAIT, A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. **Vet. Parasitol.**, v. 149, n. 1-2, p. 29-40, 2007.

SOUZA, M. F; PIMENTEL-NETO, M; SILVA, R. M; FARIAS, A. C. B; GUIMARÃES, M. P. Gastrointestinal parasites of sheep, municipality of Lajes, Rio Grande do Norte, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 21, n. 1, p. 71-73, 2012.

SPÓSITO FILHA, E.; OLIVEIRA, S. M. **Divulgação Técnica: Criptosporidiose**. v. 71, n. 1, p. 17-19, 2009.

SRETER, T.; VARGA, I. *Cryptosporidiosis* in birds a review. **Veterinary Parasitology**, v. 87, n. 4, p. 261-279, 2000.

SUDRÉ, A. P.; COUTO M. C. M.; BOMFIM, T. C. B. Occurrence of *Giardia intestinalis* in dairy goats and evaluation of risk factors for infection: research note. **R. Bras. Ci. Vet.**, v. 19, n. 3, p. 149-153, 2012.

TEMBUE, A. A. S. M. **Epidemiologia das coccidioses em pequenos ruminantes no município de Ibimirim, Estado de Pernambuco, Brasil.** 2007, 133f .Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco. Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2007.

TESSIER, J. L., DAVIES, G. A. L. **Giardiasis. Infec. Diseases Update.** P. 175-179. 1999.

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.; LYMBERG, A. J.; MELONI, B. P. Genetic variation in *Giardia* Kunstler, 1882 taxonomic and epidemiological significance. **Protozool Abst**, 1-28, 1990.

THOMPSON, R. C. A. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, p. 1259-1267, 2000.

THOMPSON, R. C. A.; HOPKINS, R. M.; HOMAN, W. I. Nomenclature and genetics groupings of *Giardia* infecting mammals. **Parasitol Today**, v. 16, p. 210-213, 2000.

TZIPORI, S.; ANGUS, K. W.; CAMPBELL, I.; CLERHEW, L. W. Diarrhea due to *Cryptosporidium* infection in artificially reared lambs. **J. Clin. Microb**, v. 14: p. 100-105, 1981.

VASQUEZ, I. H. G.; RESTREPO, M. I.; BOTERO, D. Cryptosporidiosis. **Biomédica**, v. 6, n. 12, p. 48-70, 1986.

VIEIRA, L. S.; SILVA, M. B. O.; TOLENTINO, A. C. V.; LIMA, J. D.; SILVA, A. C. Outbreak of cryptosporidiosis in dairy goats in Brazil. **The Veterinary Record**, v. 140, n. 6, p. 427-428, 1997.

VIGNAU, M. L., VENTURINI, L. M., ROMERO, J. R., EIRAS, D. F., BASSO, W. U. **Parasitología Práctica y Modelos de Enfermedades Parasitarias en los Animales Domésticos**, 1ªed. Argentina: UNLP, 2005.

WARD, L. A.; WANG, Y. Rapids methods to isolate *Cryptosporidium* DNA from frozen faces for PCR. **Diagnostic Microbiology and infectious Disease.**, v. 41, n. 1, p. 37-42, 2001.

WOLF, M. S. Giardiasis. **Clin. Microbiol. Rev.** p. 93-100, 1992.

XIAO, L.; HERD, R. P.; RINGS, D. M. Concurrent infections of *Giardia* and *Cryptosporidium* on two Ohio farms with calf diarrhea. **Veterinary Parasitology**, v. 51, n. 1-2, p. 41-483, 1993.

XIAO, L.; MORGAN, U.M.; LIMOR, J.; ESCALANTE, A.; ARROWOOD, M.; SHULAW, W.; THOMPSON, R.C.; FAYER, R.; LAL, A.A. Genetic Diversity within *Cryptosporidium parvum* and Related *Cryptosporidium* Species. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n. 8, p. 3386-3391, 1999.

XIAO, L.; SINGH, A.; LIMOR, J.; GRACZYK, T. K.; GRADUS, S.; LAL, A. Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 3, p. 1097-1101, 2001.

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S. J. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 17, n. 1, p. 72-97, 2004.

XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. **Int. J. Parasitol.**, v. 38, n. 11, p.1239-1255, 2008.