



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

DARLENE KÁSSIA SARAIVA QUEIROZ

**OCORRÊNCIA DE *Cryptosporidium* spp. EM CÃES DA ÁREA METROPOLITANA
DE BELÉM, PARÁ**

BELÉM

2012



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

DARLENE KÁSSIA SARAIVA QUEIROZ

OCORRÊNCIA DE *Cryptosporidium* spp. EM CÃES DA ÁREA METROPOLITANA DE BELÉM, PARÁ

Dissertação 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

2012

Queiroz, Darlene Kássia Saraiva

Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em cães da área Metropolitana de Belém, Pará./ Darlene Kássia Saraiva Queiroz. - Belém, 2012.

67f.; il.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia/ Saúde e Meio Ambientes) - Universidade Federal Rural da Amazônia, 2012.

1. Zoonose. 2. Cão. 3. *Cryptosporidium* spp. 4. Enteroparasito. 5. Belém – Pará – Brasil. I. Título.

CDD – 636.08969598115



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

DARLENE KÁSSIA SARAIVA QUEIROZ

**OCORRÊNCIA DE *Cryptosporidium* spp. EM CÃES DA ÁREA METROPOLITANA
DE BELÉM, PARÁ**

Dissertação 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 15/03/2012.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Gustavo Góes Cavalcante – 1º Examinador
INSTITUTO EVANDRO CHAGAS

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

Prof. Dr. Andre Marcelo Conceição Meneses – 3º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

AGRADECIMENTOS

Primariamente à Deus, por ser o meu socorro presente nas tribulações, por sua infinita misericórdia, por me abençoar diariamente mesmo muitas das vezes sem eu ter merecimento.

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

Ao meu noivo Pedro Murilo Moreira Pantoja, por seu amor, dedicação, carinho, atenção a mim dedicados durante estes quase sete anos de convívio, ao qual divido as minhas conquistas e também a toda sua família que é um presente de Deus para mim.

Aos meus amigos verdadeiros que torcem por mim que mesmo distantes, ligam, passam e-mail sempre me apoiando e demonstrando carinho.

Aos professores da UFRA aos quais tenho uma inegável gratidão e admiração e que cooperaram para a minha concepção profissional e ética, em especial a Prof^a. Adriana Maciel por todo auxílio prestado durante o estágio de docência.

Ao Meu orientador Dr. Washington Luiz Assunção Pereira por sua dedicação, paciência e atenção a mim prestadas não só durante os anos do mestrado, mas também durante a minha vida acadêmica.

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

Aos professores da Pós-Graduação que nos passaram ensinamentos fundamentais para a nossa vida profissional e por toda paciência dedicada.

Aos professores membro da banca ao qual fico honrada por participarem da minha defesa, Dr. Gustavo Góes Cavalcante, Dr. Andre Marcelo Conceição Meneses e Dr. Raimundo Nonato Moraes Benigno e a suplente Dra. Fernanda Martins Hatano.

Ao Dr. Sebastião Aldo Valente e Dra. Elisabeth Conceição de Oliveira Santos por terem aberto as portas do Instituto Evandro Chagas, confiando na minha pesquisa e a tornando possível.

As funcionárias do Laboratório de Enteroparasitoses do Instituto Evandro Chagas Ednamar Galvão, Maria Suely Paulino, Lorena Moitta, por terem sido bastante receptivas e que me apoiaram grandemente na realização diagnóstica do trabalho aqui apresentado, em especial à Ediane Reis por todos os ensinamentos passados e dedicação a mim prestada e também pelo auxílio do funcionário Carlos Farias.

À todos que de alguma forma me auxiliaram na coleta de material para este trabalho, principalmente aos proprietários dos animais, aos funcionários do Centro de Controle de Zoonoses de Belém, PA e ao bolsista de Iniciação Científica Victor Hugo Flores.

Aos animais que Deus criou e que passei a amar e respeitar ainda quando criança, aos quais eu tenho grande admiração e veneração, principalmente aos “meus filhos” de quatro patas que alegam o meu dia e me fazem mais feliz.

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 SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucléico
RNA	Ácido ribonucléico
A	Adenina
AT	Adenina-Timina
AAT	Adenina-Adenina-Timina
ATP	Adenosina trifosfato
ABES	Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental
CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
ELISA	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramma
°C	Graus Celsius
IgG	Imunoglobulina G
IMS	Immunomagnetic separation
FA	Immunofluorescence assay
IEC	Instituto Evandro Chagas
®	Marca Registrada
≥	Maior ou igual
>	Maior
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
MG	Minas Gerais
-	Negativo
Nº	Número
Oopg	Oocistos por grama de fezes
PA	Pará
PR	Paraná
PBS	Phosphate buffered saline

RFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição
%	Porcentagem
+	Positivo
Kg	Quilograma
Km	Quilômetros
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
RO	Rondônia
rpm	Rotações por minuto
RJ	Rio de Janeiro
SC	Santa Catarina
SP	São Paulo
s/n	Sem número
SRD	Sem Raça Definida
SIDA	Síndrome da imunodeficiência Adquirida
SAS	Statistical Analysis System
™	Trade Mark/ Marca comercial
USA	United States of America
X	Vezes
SIV	Vírus da Imunodeficiência Símia
ZNm	Ziehl-Neelsen modificado

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Ciclo do <i>Cryptosporidium</i> spp.....	22
Figura 2 Observação do oocisto de <i>Cryptosporidium</i> spp. pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada em fezes de um cão errante do CCZ, Belém, PA.....	46
Figura 3 Reação positiva ao antígeno de <i>Cryptosporidium</i> spp. (seta preta) detectado pelo teste de ELISA em fezes de um cão errante do CCZ, Belém, PA, ao lado do controle positivo (seta vermelha).....	47

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Distribuição da infecção por <i>Cryptosporidium</i> spp. em cães residentes na região Metropolitana de Belém, PA, 2012, segundo a procedência dos animais.....	44
Tabela 2 Resultados do diagnóstico de <i>Cryptosporidium</i> spp. pelos métodos de Ziehl-Neelsen modificado e teste de ELISA em cães residentes na região Metropolitana de Belém, PA, 2012.....	46
Tabela 3 Positividade para <i>Cryptosporidium</i> spp. em cães residentes na região Metropolitana de Belém, PA, 2012, de acordo com o sexo dos animais.....	48
Tabela 4 Positividade para <i>Cryptosporidium</i> spp. de acordo com faixa etária dos animais residentes na região Metropolitana de Belém, PA, 2012.....	49

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 CÃES E AS INFECÇÕES ZOONÓTICAS PARASITÁRIAS.....	18
2.2 <i>Cryptosporidium</i> spp.....	18
2.2.1 Histórico.....	19
2.2.2 Morfologia.....	20
2.2.3 Ciclo biológico.....	21
2.2.4 Transmissão do <i>Cryptosporidium</i>.....	24
2.2.4.1 Transmissão zoonótica.....	24
2.2.4.2 Transmissão por água e alimentos.....	25
2.2.5 Patogenia e Lesões.....	27
2.3 CRIPTOSPORIDIOSE.....	29
2.3.1 Sinais clínicos.....	29
2.3.1.1 Em cães.....	30
2.3.1.2 Em humanos imunocompetentes.....	30
2.3.1.3 Em humanos imunocomprometidos.....	31
2.3.2 Diagnóstico.....	31
2.3.3 Epidemiologia.....	34
2.3.3.1 Em cães.....	34
2.3.3.2 Em humanos.....	37
2.3.4 Profilaxia, controle e tratamento.....	38
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	41
3.1.1 Cães domiciliados	41
3.1.2 Cães errantes.....	41
3.2 COLHEITA DAS AMOSTRAS	42
3.2.1 Dos cães domiciliados.....	42
3.2.2 Dos cães errantes.....	42

3.3 TÉCNICAS LABORATORIAIS UTILIZADAS	43
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
4 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	44
5 CONCLUSÕES.....	51
6 REFERÊNCIAS.....	52
ANEXO 1.....	63
ANEXO 2.....	64
ANEXO 3.....	65
ANEXO 4.....	67

RESUMO

QUEIROZ, D.K.S. **Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em cães da área Metropolitana de Belém, Pará.** 67 f. Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia, Universidade Federal Rural da Amazônia, 2012.

As doenças parasitárias são de ocorrência freqüente tanto em animais quanto no homem e muitas possuem potencial zoonótico. Um aspecto relevante que deve ser ressaltado é que a relação entre o homem e animal vem se tornando cada vez mais próxima, principalmente em relação aos animais de companhia, podendo favorecer as zoonoses. Dentre as doenças zoonóticas, a criptosporidiose é considerada como uma enteroparasitose emergente de importância epidemiológica. O agente *Cryptosporidium* spp., é um protozoário de fácil transmissão, com diversas espécies patogênicas para vários tipos de hospedeiros entre animais domésticos, silvestres e o homem. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em cães domiciliados e errantes da região Metropolitana da cidade de Belém, PA, e sua associação com a faixa etária e o sexo dos animais, assim como também buscou-se comparar as duas técnicas de diagnóstico empregadas. Foram coletadas amostras fecais de 150 animais sem quando diarréico, sendo 100 amostras dos cães domiciliados coletadas pelos proprietários em suas residências e 11 amostras de cães domiciliados atendidos em uma clínica veterinária particular localizada no Centro da cidade de Belém. As demais 39 amostras procederam de cães errantes capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) dessa capital. O processamento laboratorial foi realizado no Setor de Parasitologia do Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, PA, onde foram utilizadas duas técnicas de diagnóstico: Ziehl-Neelsen modificada (ZNm) e Teste de ELISA utilizando anticorpos monoclonais e policlonais frente ao antígeno dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. A ocorrência foi de 3,33% (5/150), sendo 3,6% (4/111) nos animais domiciliados e 2,56% (1/39) nos animais errantes. Não houve diferença estatística significativa com relação à procedência, à idade, o sexo e métodos de diagnósticos empregados. Os resultados permitiram caracterizar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em cães domiciliados e errantes de Belém, PA e que animais assintomáticos podem eliminar oocistos do agente servindo de fonte de infecção para outros animais, para o meio ambiente e também para o homem.

Palavras chave: Zoonose, cão, *Cryptosporidium* spp., enteroparasito, Belém – Pará – Brasil.

ABSTRACT

QUEIROZ, D.K.S. 67 f. **Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in dogs in the Metropolitan area of Belém, Pará.** Masters in Animal Production and Health in the Amazon, Universidade Federal Rural da Amazônia, 2012.

Parasitic diseases are frequent in animals as well as in man and lots of those diseases possess a zoonotic potential. A relevant aspect that must be emphasized is the relation between man and animal which has become closer, mainly in pets, this can foment the zoonoses. Among the zoonoses, the cryptosporidiosis is considered as an emergent important epidemiological enteral disease. The agent *Cryptosporidium* spp., is a protozoa easily transmitted, this agent has different pathogenic species for different kinds of hosts, like pets, wild animals and the man. The main goal of this research was to evaluate the occurrence of *Cryptosporidium* spp. in home and homeless dogs in the metropolitan area of Belém city, PA, and its association with the animals' age group and sex as well as it was also compared both techniques used to diagnosis. There were collected 150 faecal samples without diarrhea, from the 150 samples, 100 were collected by the owners of these dogs in their homes, and 11 were collected in a Veterinary Clinic, placed in Belém downtown. The other 39 samples were collected at Belém Zoonoses Center Control (CCZ) and belong to homeless animals. The laboratory processing was done at Parasitology Division from the Evandro Chagas Institute, in Ananindeua, PA, using two diagnosis different techniques: Modified Ziehl-Neelsen (ZNm) and test ELISA using monoclonal and polyclonal antibodies to the *Cryptosporidium* spp. Oocyst antigen. The occurrence was 3,33% (5/150). In home dogs 3,6% (4/111) and in homeless dogs 2,56% (1/39). There was no statistics difference about the origin, age, sex and diagnosis method used. The result allowed to characterize the *Cryptosporidium* spp. occurrence in home and homeless dogs of Belém, PA and also demonstrated that asymptomatic animals can eliminate *Cryptosporidium* spp. oocysts being source of infection to other animals, environment and also to the man.

Key words: Zoonoses, dog, *Cryptosporidium* spp., enteroparasites, Belém – Pará – Brazil.

1 INTRODUÇÃO

O envolvimento dos cães nas transmissões de diversas doenças incluindo as consideradas zoonóticas vem sendo amplamente investigado onde segundo Capuano e Rocha (2006), o papel do cão como um hospedeiro definitivo de várias parasitoses tem sido reconhecido como um importante problema de saúde pública.

Dentre tantos parasitos intestinais que infectam o homem, Silva *et al.* (2005) ressaltam *Cryptosporidium* spp. que se apresenta como um patógeno oportunista, principalmente em pacientes imunodeprimidos. Moura *et al.* (2009), relataram que o cão, devido ao seu estreito convívio com o ser humano, pode representar uma importante fonte de infecção de *Cryptosporidium* spp., considerado um agente zoonótico recorrente pela Organização Mundial da Saúde.

A doença em humanos tem sido descrita desde 1976 em mais de 90 países na forma de casos individuais ou surtos populacionais, decorrentes da ingestão de alimentos ou água contaminada por oocistos (EL-AHRAF *et al.*, 1991 *apud* LALLO; BONDAN, 2006).

Cryptosporidium é um protozoário de distribuição cosmopolita encontrado em uma ampla variedade de espécies animais com maior prevalência em países menos desenvolvidos (FERREIRA; BORGES, 2002). Sua transmissão ocorre pela ingestão de oocistos, forma de resistência capaz de sobreviver em ambientes externos (água, solo). Franco (2007), afirma que as doenças de veiculação hídrica, sobretudo aquelas causadas por protozoários intestinais, emergiram como um dos principais problemas de saúde pública nos últimos 25 anos.

Cães infectados com *Cryptosporidium* spp. podem contaminar o meio ambiente, tornando o solo, a água, tanto potável como aquela utilizada na irrigação e também de recreação, fontes de infecção para o ser humano (MOURA *et al.*, 2009). Esse patógeno emergente de relevância em saúde pública causa gastroenterite moderada a severa no homem e nos animais (GARRIDO, 2003), sendo um dos responsáveis por diarreias neonatais, onde a multiplicação do parasita no interior dos enterócitos causa má absorção e má digestão e como consequência ocorre diarreia por alterações das células epiteliais, atrofia de vilosidades e perda de enzimas digestivas (SPÓSITO FILHA; OLIVEIRA, 2009).

Em estudos recentes realizados em Porto Alegre, RS, Silva (2010), observou que dos 410 cães que participaram de sua pesquisa, 6,34% apresentaram resultado positivo para *Cryptosporidium* spp., porém no Estado do Rio de Janeiro, Ederli *et al.* (2005), verificaram uma ocorrência de 40% de positividade em cães domiciliados, o que nos leva a acreditar na

necessidade do desenvolvimento de estudos epidemiológicos sobre *Cryptosporidium* spp. em todas as regiões não só do Brasil como também do mundo, já que trata-se de uma questão de saúde coletiva.

As condições ambientais favoráveis, presença de animais infectados e a aglomeração de espaços físicos favorecem a disseminação dos parasitas numa dada população. Nesse sentido, o presente trabalho, objetivou investigar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em fezes de cães domiciliados e errantes da região Metropolitana da cidade de Belém, PA, comparando os dados de acordo com o sexo, idade e procedência do animal. Comparou-se também os resultados de dois métodos de diagnóstico: técnica de coloração Ziehl-Neelsen modificada (ZNm) e o ensaio imunoenzimático (teste de ELISA).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÃES E AS INFECÇÕES ZOONÓTICAS PARASITÁRIAS

A população mundial canina está estimada em mais de 500 milhões de animais que estão envolvidos involuntariamente na transmissão de aproximadamente 60 infecções zoonóticas, entre elas as parasitoses intestinais (MACPERSON, 2005).

As infecções parasitárias acometem cães de todas as idades, porém são mais prevalentes em filhotes, pois os animais jovens não respondem imunologicamente de forma eficaz às infecções sofridas (RAMIREZ-BARRIOS *et al.*, 2004).

A criptosporidiose é uma parasitose causada por um protozoário denominado *Cryptosporidium* spp. que pode parasitar diferentes hospedeiros, incluindo o homem (PEREIRA *et al.*, 2009). É considerada uma zoonose emergente podendo afetar principalmente a população que convive com animais domésticos especialmente bovinos, suínos e animais de companhia (ANDERSON *et al.*, 1982). O cão é uma importante fonte de infecção para outros animais e humanos, principalmente crianças e imunocomprometidos (NAVARRO *et al.*, 1997).

2.2 *Cryptosporidium* spp.

Parasitas do gênero *Cryptosporidium* possuem grande capacidade de reprodução e disseminação, sendo várias espécies conhecidas por infectar diferentes espécies de animais (GRAAF *et al.*, 1999).

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* pertencente à família Cryptosporidiidae. Atualmente o gênero *Cryptosporidium* possui 21 espécies e aproximadamente 40 genótipos, tendo numerosos vertebrados como hospedeiros (FAYER; SANTÍN, 2009).

Os protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, antigo Sporozoa, não possuem meios óbvios de locomoção como cílios ou flagelos. *Cryptosporidium* apresenta um ciclo biológico direto com uma forma encistada fora do hospedeiro (JONES *et al.*, 1997).

De acordo com os estudos moleculares mais recentes, dois genótipos são mais comumente encontrados em humanos: o genótipo humano (ou tipo I: reconhecido como

Cryptosporidium hominis) e o genótipo bovino (ou tipo II: *Cryptosporidium parvum*) (MONIS; THOMPSON, 2003).

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* apresenta novos aspectos da biologia e da evolução dos parasitas Apicomplexos (KEELING, 2004). A análise filogenética da pequena subunidade ribossomal do RNA (SSU RNA) permite verificar diferenças entre as espécies de *Cryptosporidium*. Análises da sequência de 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 desta espécie (FENG *et al.*, 2000).

Cryptosporidium canis tem sido observado em fezes de cães em todo mundo. Embora morfologicamente idêntico ao *C. parvum* e possuindo antígenos de superfície comuns a essa espécie, distinguiu-se pela inabilidade em infectar ratos, embora possa infectar humanos e bovinos além de apresentar diferenças genéticas de outras espécies (XIAO *et al.*, 2004). Miller *et al.* (2003), acreditam que a espécie *C. canis* seja a única clinicamente significativa para cães, apesar de haver a identificação de infecção nesses animais por *C. parvum*.

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).

2.2.1 Histórico

Cryptosporidium foi observado pela primeira vez em 1907 por Tyzzer, no tubo digestivo de camundongos de laboratório; em 1955 foi encontrado em perus e em 1971 em bezerros (ALMEIDA, 2004). Tyzzer criou o gênero *Cryptosporidium* para designar o pequeno coccídeo encontrado nas glândulas gástricas de camundongos, que recebeu o nome de *Cryptosporidium 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 *Cryptosporidium parvum* (NEVES, 2005).

Durante os anos seguintes várias novas espécies foram descritas por diferentes autores baseando-se na idéia de que o parasita 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 Estados Unidos (NIME *et al.*, 1976), o segundo em um adulto imunodeprimido também nos Estados Unidos 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).

Durante muito tempo *Cryptosporidium* foi considerado não patogênico, no entanto, em 1955 a presença desse agente foi associada com um quadro de diarreia e mortalidade de pássaros, havendo a descrição de uma nova espécie, *C. meleagridis* (STAVIN, 1955 *apud* SILVA, 2010).

Em cães foi descrita pela primeira vez em 1981 quando os estudiosos encontraram anticorpos anti-*Cryptosporidium* em 16 das 20 amostras de soro canino analisadas (TZIPORI; CAMPBELL, 1981). Em 1983 foi diagnosticado o primeiro caso clínico de criptosporidiose canina, quando foi observado o parasito em um cão com cinomose, demonstrando que em animais imunodeprimidos o aparecimento da doença parasitária é favorecido (WILSON *et al.*, 1983).

Inicialmente a infecção em cães por *Cryptosporidium* spp. foi atribuída à *C. parvum*. Entretanto, estudos posteriores de transmissão cruzada evidenciaram que a infecção em cães é causada por *C. parvum* genótipo cão. Com a introdução das modernas ferramentas da biologia molecular (PCR e PCR-RFLP = Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição), Fayer *et al.* (2001), descreveram e propuseram uma nova espécie infectando cães, *C. canis*, que pode inclusive apresentar variabilidade genética (SATOH *et al.*, 2006).

2.2.2 Morfologia

Cryptosporidium spp. é um coccídio minúsculo com seus oocistos contendo um diâmetro de 4 a 8µm dependendo da espécie e da fase de desenvolvimento (BOWMAN *et al.*, 2004). O protozoário 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 (cerca de 5,0 x 4,5µm para *C. parvum*, e 7,4 x 5,6µm para *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). Essas diferenças na forma ou na estrutura interna podem ser observadas com o auxílio de um microscópio de alta resolução (ABE *et al.*, 2002).

Os oocistos possuem um corpo residual composto por grânulos, em 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 glicolípídica intermediária (FAYER; UNGAR, 1986).

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

Dentre as habilidades metabólicas sugere-se que o parasita recorre a glicólise para a produção de energia, sendo capaz de utilizar e catabolizar mono-açúcares (glicose e frutose), assim como armazenar e catabolizar polissacarídeos como a amilopectina. Como muitos organismos anaeróbicos, os parasitas do gênero *Cryptosporidium* economizam ATP (adenosina trifosfato) através da utilização de pirofosfato fosfofrutoquinase-dependente. Enzimas para o metabolismo de lipídios complexos como o glicerolípídio e o inositol fosfato foram identificadas. Já os ácidos graxos aparentemente não são fontes de energia, visto que são ausentes as enzimas necessárias para a degradação dos mesmos (ABRAHAMSEN *et al.*, 2004).

2.2.3 Ciclo biológico

O oocisto esporulado é o único estágio exógeno, que consiste em quatro esporozoítos móveis envolvidos por uma dupla camada de parede que confere resistência ao organismo. Os oocistos 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 a temperaturas corporais, ácidos, tripsinas e 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* podem desencostar em soluções aquosas mornas, o que possibilita e justifica as infecções e autoinfecções em sítios extraintestinais (FAYER, 1997).

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 infectantes penetram nas células intestinais, onde amadurecem assexuadamente no interior de vacúolos, formando os merontes de tipo I (contém de 6-8 merozoítas), os quais liberam merozoítas que também invadem os enterócitos, dando origem aos merontes de tipo II (contém apenas 4 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 (Figura 1), 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 e com esporozoítos livres (FAYER; 1997; FAYER; UNGAR, 1986; CAREY *et al.*, 2004).

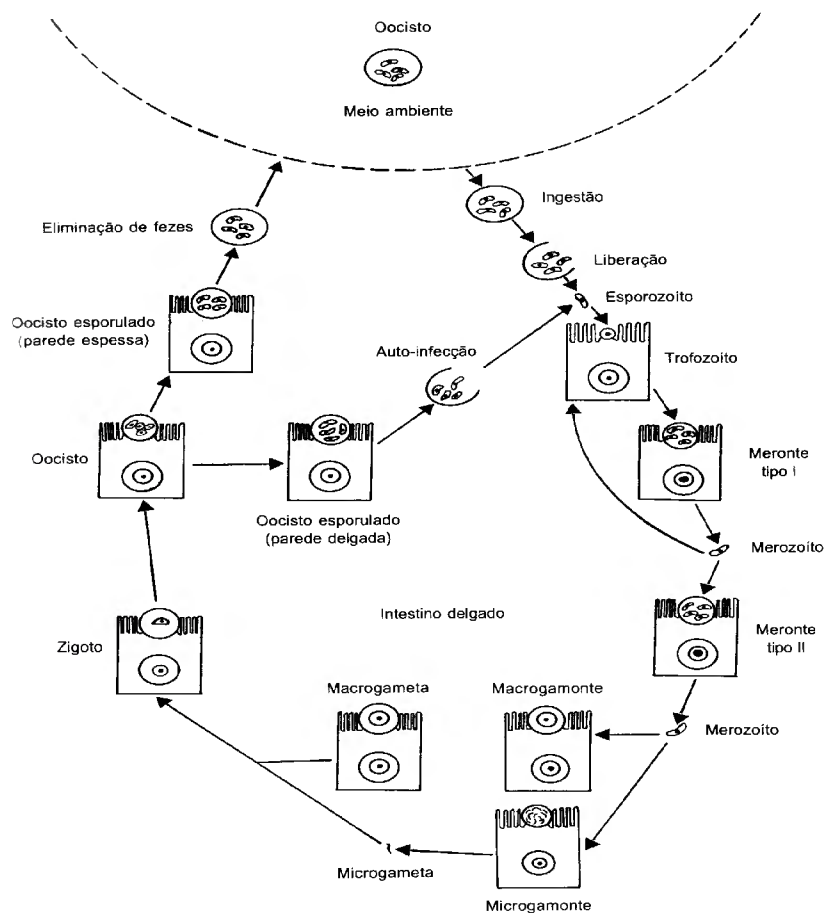


Figura 1: Ciclo do *Cryptosporidium* spp.
Fonte: Neves (2005).

Segundo Neves (2005), o oocisto de parede espessa é excretado para o meio externo com as fezes, e o de parede delgada, se rompe no intestino delgado e acredita-se que é o responsável pelos casos de auto-infecção. Os oocistos esporulam no interior do hospedeiro e já são infectantes quando eliminados para o meio ambiente. Milhões de oocistos maduros são liberados nas fezes, contaminando o meio ambiente, e permanecem viáveis durante vários meses (FAYER; UNGAR, 1986).

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

O ciclo do *Cryptosporidium* spp. não apresenta hospedeiro intermediário (BOWMAN *et al.*, 2002). A capacidade de se desenvolver completamente dentro de um único hospedeiro (ciclo vital monoxêmico) implica em um grande potencial de reinfestação e contribuiria para a natureza refratária dessa doença como se verifica em pacientes com SIDA (WYNGAARDEN *et al.*, 1993).

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).

Os oocistos que são pequenos, leves e imóveis podem ser destruídos pelo processo de dessecação, pela água oxigenada, amônia a 5% e pelo aquecimento a 65°C durante 30 minutos (NEVES, 2005).

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 parasita 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 do *Cryptosporidium*

A transmissão pode ocorrer diretamente 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/pessoa é a principal via de contaminação em ambientes com alta densidade populacional como 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 ao pacientes, como os enfermeiros; e também em asilos (FAYER; UNGAR, 1986). Tem sido afirmado que *C. hominis* é encontrado somente entre humanos não sendo atribuído potencial zoonótico a essa espécie, enquanto para *C. parvum*, também responsável por grande número de casos humanos, os maiores reservatórios são os animais de fazenda sendo considerado 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 da doença (WYNGAARDEN *et al.*, 1993). Pode ocorrer para o homem como também para os animais pela contaminação fecal-oral (BALLWEBER, 2001).

Estudos moleculares indicam que os cães podem transmitir o genótipo bovino de *Cryptosporidium*, o qual é patogênico para a espécie humana (ABE *et al.*, 2002). De modo geral, considera-se *C. parvum* como o único capaz de infectar o homem. Entretanto, surgiram controvérsias com base na taxonomia e aceita-se hoje 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 transmissão zoonótica mais freqüente 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).

A infecção por *C. meleagridis*, *C. felis* e *C. canis* também pode ocorrer numa freqüência menor, enquanto *C. muris*, *C. suis* e *C. cervine genótipo*, são raramente relatadas em casos humanos (XIAO; CAMA, 2006).

A ocorrência de *C. parvum* em fezes de cães tem sido freqüentemente demonstrada em todo o mundo, indicando a importância desses animais como fontes de infecção deste protozoário para o homem (LALLO; BONDAN, 2006). Este agente pode infectar cães que, por ventura, ingiram oocistos esporulados (NELSON; COUTO, 2010).

Cães infectados com *Cryptosporidium* spp. podem contaminar o meio, tornando o solo, a água (tanto potável como aquela utilizada na irrigação e também de recreação) fonte de infecção para o ser humano (MOURA *et al.*, 2009).

A maioria das infecções por *Cryptosporidium* relatadas em cães são identificadas somente pelo gênero, uma vez que nem sempre a PCR ou outra ferramenta molecular estão disponíveis para uma identificação específica (MOURA *et al.*, 2009). Nesse sentido, estudo de Greca (2010) utilizando 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, isso indica que o ser humano pode transmitir a outras espécies animais o espécie-específico *C. hominis*.

A transmissão entre humano e canino foi relatada em um trabalho realizado em 2007, em crianças, onde os pesquisadores identificaram o caso de uma menina e seu irmão que apresentavam diarreia estando ambos contaminados com *C. canis*, espécie também encontrada na análise das fezes do cão da casa, que se encontrava assintomático no mesmo período. Este estudo demonstrou que *C. canis* teria importância em saúde pública, uma vez que sob condições favoráveis, a transmissão de cães para humanos pode ocorrer (XIAO *et al.*, 2007).

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 a pessoa

ou de animal a pessoa normalmente gera um pequeno número de infectados, a contaminação de um manancial pode afetar milhares de pessoas (SPÓSITO FILHA; OLIVEIRA, 2009).

Franco (2007), afirma que as doenças de veiculação hídrica, sobretudo aquelas causadas por protozoários intestinais, emergiram como um dos principais problemas de Saúde Pública nos últimos 25 anos.

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). Segundo Fayer *et al.* (2000), a ingestão de água contaminada mostra-se como a principal via de transmissão para o homem.

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).

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).

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).

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 piscinas. Essa resistência ao cloro e a baixa dose infectante o tornam o patógeno entérico de maior potencial de contagiosidade atualmente conhecido.

De acordo com a condição ambiental, a sobrevivência dos oocistos diminui à medida que a temperatura aumenta, podendo temperaturas mornas 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).

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 dispersos e esporádicos. As fontes de contaminação destes surtos podem estar associadas aos manipuladores ou aos alimentos crus contaminados com oocistos na produção, através de água de irrigação e também pela contaminação direta do alimento por materiais fecais na etapa de processamento. Alimentos de origem marinha, provenientes de águas contaminadas com oocistos, filtram a água e retém o parasito, vários estudos têm sido realizados identificando *C. parvum*, *C. hominis* e *C. meleagridis* como contaminantes de frutos do mar (XIAO; CAMA, 2006; SMITH; NICHOLS, 2010).

2.2.5 Patogenia e Lesões

A patogenia e o quadro clínico da criptosporidiose no homem são influenciados por vários fatores que incluem, entre eles, a idade, a competência imunológica do indivíduo infectado e a associação com outros patógenos (NEVES, 2005). 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 a adesão, há uma invaginação da membrana celular, que envolve o esporozoíto 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 parasita culminam em branda à moderada fusão das vilosidades, mudanças na superfície do epitélio (GRAAF *et al.*, 1999). Em sua maioria, os criptosporídios de mamíferos parasitam as células epiteliais intestinais, quase sempre o intestino delgado, mas também do ceco e colo e, ocasionalmente, dos ductos biliares, traquéia, e brônquios (JONES *et al.*, 1997). A colonização extraintestinal por *Cryptosporidium* é mais comum em pacientes imunocomprometidos (FAYER, 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, sendo que 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, onde devido a uma infecção maciça, pode haver invasão por contiguidade ocorrendo pneumonias intersticiais (MACKENZIE *et al.*, 1994).

Mercado *et al.* (2007), observaram a presença de oocistos do agente patogênico em uma alíquota de escarro possuindo 10 mL de secreção, em um portador de SIDA com 58 anos de idade que foi hospitalizado com sintomas respiratórios, a partir da técnica de Ziehl-Neelsen, utilizando também o PCR, onde conseguiram identificar que se tratava do *Cryptosporidium hominis*.

Segundo Brea *et al.* (1993) e López-Vélez *et al.* (1995), as sintomatologia mais frequente inclui 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. A causa mais frequente de morte é a insuficiência respiratória, podendo haver a coexistência de outros agentes infecciosos respiratórios.

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, pulmões, vias biliares, pâncreas e intestino, com a presença do *Cryptosporidium* spp. no citoplasma de macrófagos alveolares, células gigantes multinucleadas e células do epitélio intestinal. As secções pulmonares mostraram uma broncopneumonia associada a criptosporidiose.

A patogenia da infecção pulmonar por *Cryptosporidium* spp. não está totalmente elucidada. Os oocistos podem ser detectados no interior dos macrófagos, que podem transportá-los para locais extra-intestinais (GENTILE *et al.*, 1987 *apud* CORTI *et al.*, 2008).

As lesões entéricas causadas por *Cryptosporidium* spp. diminuem as atividades enzimáticas intracelulares da mucosa intestinal e alteram o metabolismo corpóreo (MODOLO *et al.*, 1988). Através da microscopia eletrônica pode-se observar todo o espectro dos estágios endógenos do protozoário aderido à superfície do enterócito e envolto por uma membrana (WYNGAARDEN *et al.*, 1993).

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. O aumento da permeabilidade da membrana estaria relacionado à lactose-desidrogenase. 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 nessa 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 a 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).

O período entre a ingestão de oocistos e o aparecimento dos sintomas é de 7 a 10 dias, podendo variar de 5 a 28 dias (PEREIRA *et al.*, 2009).

2.3.1.1 Em cães

A diarreia é o sinal clínico mais comum em cães, 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).

Muitas infecções de cães com *C. parvum* são assintomáticas, porém infecções simultâneas com o vírus da cinomose podem levar à doença clínica. Apesar de poucos cães eliminarem oocistos, as elevadas taxas de soropositividade encontradas sugerem um histórico de exposição prévia e as infecções são consideradas mais severas nos cães jovens (ROBERTSON *et al.*, 2000).

2.3.1.2 Em humanos imunocompetentes

A doença em seres humanos manifesta-se de quatro maneiras: assintomática, aguda, crônica ou fulminante (intensa e rápida), sendo que a forma aguda é observada geralmente em crianças com menos de cinco anos de idade e a crônica em indivíduos mal nutridos ou imunodeprimidos (PEREIRA *et al.*, 2009).

Em indivíduos imunocompetentes, a doença se caracteriza por diarreia aquosa (três a dez evacuações diárias, representando um a três litros por dia) com duração de um a trinta dias (média de 12 a 14 dias). Outros sinais incluem anorexia e perda de peso, dor abdominal, náuseas e vômitos, flatulências, febre baixa e dor de cabeça. O quadro clínico é geralmente, benigno e autolimitante, com duração média de dez dias. Adicionalmente, colite, apendicite aguda, dilatação de ductos hepáticos e pneumonias têm sido atribuídas ou associadas à criptosporidiose (FAYER, 1997; NEVES, 2005).

Em crianças o agente produz diarreia aquosa, dor abdominal e outros sintomas intestinais, porém a doença normalmente evolui para a cura (CHAPPELL *et al.*, 2003). A infecção subclínica, sem a presença de diarreia, pode determinar atraso no crescimento, com baixo peso e altura. Crianças em ambientes contaminados podem apresentar múltiplos episódios de infecção, sendo que, a sintomatologia diminui à medida que se repete o aparecimento da doença. Esta situação de aparecimento repetido da infecção faz pensar que a imunidade adquirida é de curta duração ou incompleta (CAMA, 2008).

2.3.1.3 Em humanos imunocomprometidos

As infecções clínicas de quadro mais severo em humanos têm sido associadas a pacientes imunologicamente comprometidos, incluindo pessoas portadoras do vírus da SIDA, pessoas subnutridas, mulheres grávidas e indivíduos que utilizam medicamentos imunossupressores (FAYER *et al.*, 1990).

Os sintomas são crônicos, caracterizando-se por vários meses de diarreia aquosa e refratária a qualquer medicação antimicrobiana, levando a acentuada perda de peso. Ocorrem desequilíbrio eletrolítico, má absorção, emagrecimento acentuado e mortalidade elevada, principalmente em indivíduos com SIDA (NEVES, 2005).

Pacientes imunossuprimidos tendem a desenvolver diarreia importante, irreversível, contribuindo para a morte em consequência das graves alterações metabólicas ocorridas (TAVARES; MARINHO, 2005).

Manifestações clínicas da criptosporidiose pulmonar são inespecíficas e incluem tosse crônica, febre e dispnéia como os sintomas mais frequentes, pode ser acompanhada ou não sinais radiológicos na forma de infiltrado intersticial e também diarreia (CORTI *et al.*, 2008).

Portadores assintomáticos do parasita 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). *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).

As amostras de fezes a serem processadas pelos diferentes métodos coproparasitológicos podem ser utilizadas ainda frescas ou preservadas em substâncias fixadoras. As diferentes classes de substâncias fixadoras disponíveis têm a função de preservar as características morfológicas dos parasitas aumentando a chance de que eles sejam detectados e corretamente identificados (GARCIA, 1995).

Neto *et al.* (2003), com relação a conservação de oocistos de *Cryptosporidium* em fezes, analisaram um dispositivo contendo formol a 10% tamponado, que dispensa refrigeração e que permite execução higiênica dos exames, além de evitar mau odor e garantir a biossegurança e observaram que foi possível evidenciar satisfatoriamente o oocisto do agente nas fezes, utilizando a coloração de Kinyoun ou ZNm.

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* (CARLI, 1994). Na realização do exame, pode ser utilizada a fucsina carbólica, que misturada às fezes não cora o parasita, 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 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%, podendo ocorrer falsos positivos (JOHNSTON *et al.*, 2003).

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 parasita 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 falsas negativas, onde 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.

Dentre outras vantagens do teste de ELISA, estão a estabilidade e o pequeno volume de reagentes, resultados de natureza quantitativa, possibilita rápida execução diagnóstica, apresenta baixo nível de risco biológico, pode ser também usada para estudos epidemiológicos (TIZARD, 1998).

Existem vários kits de ELISA para diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. em fezes presentes comercialmente no mercado. Em um estudo realizado em fezes de 51 gatos conservadas em formol a 10%, em Andradina, SP, Coelho *et al.* (2009), utilizaram o *Cryptosporidium* Test da TechLab[®] e observaram três amostras positivas. Já Figueiredo *et al.* (2004), em Lavras e Viçosa, MG usaram um kit de ELISA direto da Alexon - Trend, USA, para diagnóstico de *Cryptosporidium* em fezes de cães saudáveis. Vários outros kits foram utilizados em diferentes estudos como *Cryptosporidium* Microwell ELISA - SafePath[™] Laboratories USA e ProSpecT[®]-*Cryptosporidium* Microplate Assay (TITILINCU *et al.*, 2010) e *Cryptosporidium parvum* Antigen ELISA - Morwell Diagnostics (FEITOSA *et al.*, 2004).

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 pode ser distinguido de outros, como é o caso das espécies do gênero *Cryptosporidium* spp. (FAYER *et al.*, 2000).

Nos indivíduos imunocompetente, os parasitas são identificados nas fezes três dias após a infecção e o tempo de emissão é curto (duas ou três semanas), não havendo abundância. Nos pacientes imunodeprimidos, a permanência dos oocistos pode ser indefinida, correspondendo aos períodos de diarreia (CARLI, 1994).

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 1µm, centrifugação, purificação do concentrado através 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).

2.3.3 Epidemiologia

A criptosporidiose tem sido assinalada com grande frequência em todas as partes do mundo, sendo por isso considerada uma zoonose emergente importante (NEVES, 2005).

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 9 a 1.042 oocistos); oocistos esporulados já infectantes quando eliminados com as fezes; tanto seres humanos como animais serem os reservatórios de infecção (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. Atualmente 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 (reação em cadeia da polimerase) empregando marcadores específicos, vem sendo a metodologia mais eficiente para estudos epidemiológicos atuais. Através 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. Dentro da espécie de *C. parvum* foi identificado uma diversidade ainda maior de subtipos, 10 até agora descritos e assim denominados (IIa, IIb, IIc, IId, IIe, IIe, IIh, Iii, IIj, IIk) (JEX; GASSER, 2010).

2.3.3.1 Em cães

Dados da ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em cães diferem bastante de acordo com o local pesquisado e a técnica de diagnóstico empregada. Nos vários continentes, estudos apontam diferenças significativas quanto à positividade deste parasito nas populações de cães (SILVA, 2010).

Na Europa, estudo realizado no Reino Unido, no período de 2003 a 2005, de 4.526 cães avaliados, 29 (0,6%), apresentavam oocisto de *Cryptosporidium*, detectados pela coloração de Auramina e Ziehl-Neelsen (BATCHELOR *et al.*, 2008). Na Noruega, estudo realizado em cães de um a doze meses de idade, de um total de 887 amostras coletadas de 290 cães, 149 (16,8%) foram positivas para *Cryptosporidium* (HAMNES *et al.*, 2007).

Abe *et al.* (2002), analisaram em Osaka, Japão, amostras de fezes de 140 cães de rua, sem sintomas clínicos, através da técnica de concentração e flutuação por solução de açúcar foi encontrado 6,4% (9/140) positivos, enquanto que pela análise por PCR a positividade encontrada foi de 9,3% (13/140).

Na Holanda pesquisa em 92 amostras fecais de cães domiciliados, utilizando coloração de ZNm (Kinyoun), registrou uma positividade de 8,7% (8/92) (OVERGAAUW *et al.*, 2009). Já outro estudo realizado no Canadá, em 68 amostras de fezes de cães filhotes, nenhuma apresentou positividade pela referida técnica de coloração, porém, 7,4% (5/68) foram positivas pela técnica de imunoenensaio (SHUKLA *et al.*, 2006).

No Brasil em 1997, um estudo realizado em Londrina, PR, para a detecção dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. com 133 amostras de fezes de cão com idades variadas e apresentando diarreia, atendidos em um hospital veterinário estadual, utilizando a técnica de ZNm, encontraram 2,25% (3/133) de amostras positivas (NAVARRO *et al.*, 1997).

Huber *et al.* (2004), em pesquisa para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. encontraram positividade em 2,4% das amostras fecais dos cães submetidas à técnica de centrífugo-flutuação e Figueiredo *et al.* (2004), nas cidades de Lavras e Viçosa, MG, observaram 1,85% dos cães excretando oocistos de *C. parvum* a partir do ELISA.

Ederli *et al.* (2005), analisaram fezes de 100 cães domiciliados na cidade de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro, utilizando a técnica de ZNm, encontraram oocistos as fezes de 40% dos animais, mostrando que há uma elevada ocorrência de cães domiciliados infectados e assintomáticos nessa cidade, fato que favorece a persistência da contaminação ambiental e infecção de animais susceptíveis. Ederli *et al.* (2008), nessa região, encontraram uma positividade de 45% (90/200) em amostras de fezes de 200 cães, analisadas por microscopia após concentração pela técnica de Ritchie e coloração de pela técnica de ZNm.

Lallo e Bondan (2006), realizaram um estudo para avaliar a prevalência de *Cryptosporidium* sp. em amostras fecais de 450 cães da cidade de São Paulo, SP, sendo 200 amostras de cães atendidos em um hospital veterinário e 250 de animais pertencentes a canis particulares, utilizando duas técnicas de diagnóstico, a ZNm que identificou 8,8% (40/450) de positividade, e a técnica de PCR que diagnosticou 9,5% (43/450) de animais positivos. Nesse

mesmo estudo também se evidenciou que dos 54 animais jovens apenas 5,5% (3/54) apresentaram positividade sendo, portanto, menor em relação aos adultos onde 10,1% (40/390) dos 390 animais mostraram-se positivos, não havendo diferença estatística entre machos e fêmeas. Lallo (2003) em estudos anteriores também em São Paulo encontrou uma prevalência de 3,1%, evidenciando, portanto, um aumento nos números de caso nessa região.

No município de Monte Negro, RO, um estudo com 95 amostras de fezes de cães da área urbana, foi diagnosticado a presença de *Cryptosporidium* em 2,1% (2/95) dos animais (LABRUNA *et al.*, 2006).

Katagiri e Oliveira-Sequeira (2007) analisaram fezes de 254 cães em Botucatu, SP, sendo 125 de animais domiciliados e 129 de rua. O estudo utilizou coloração de ZNm e registrou 3,1% (8/254) de animais positivos, sendo 4% (5/125) dos cães domiciliados e 2,3% (3/129) dos cães de rua respectivamente.

Em Campos dos Goytacazes, RJ, foi analisada a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em animais errantes apreendidos pelo CCZ, onde coletou-se 33 amostras fecais localizadas nos pisos dos canis individuais, sendo 22 de caninos e 11 de felinos, fixadas em formol tamponado a 10%, e posteriormente submetidas às técnicas de Ritchie e de ZNm, para concentração e coloração dos oocistos, e observou-se que dos 33 animais, 39,4% (13/33) eliminaram oocistos do agente em suas fezes, sendo quatro felinos e nove caninos. Os autores associaram a alta prevalência ao fato de terem trabalhado exclusivamente com animais errantes, que possuíam acesso a água e alimentos não tratados, condições higiênicas inadequadas e afetados por fatores imunossupressores como desnutrição, desidratação, estresse e infecção por outros parasitas (ALMEIDA *et al.*, 2008).

Bresciani *et al.* (2008), em um estudo em fezes de 420 cães de Araçatuba, SP, utilizando a técnica de coloração pelo Kinyoun, técnica de Sheather e ELISA, verificaram que apenas 2,4% (10/420) dos animais encontravam-se positivos para *Cryptosporidium*.

Em outro estudo realizado por Moura *et al.* (2009), em fezes de 200 cães domiciliados da cidade de Lages, SC, utilizando também a coloração de ZNm, observou 4% (8/200) de positividade. Realizaram conjuntamente a técnica da centrifugo-flutuação com solução de Sheather seguida de micrometria, resultando em 1,5% (3/200) de positividade para *Cryptosporidium* spp.

Balassino *et al.* (2009), em uma pesquisa com amostras de fezes de 500 cães atendidos em clínicas veterinárias do Município do Rio de Janeiro, RJ, processadas por centrifugo-flutuação e sedimentação com coloração por azul de metil-safranina identificaram 26,2% de casos positivos.

Silva (2010), realizando um estudo com 410 amostras de fezes submetidas à técnica de Ziehl-Neelsen, diagnosticou 6,34% (26/410) de positividade, sendo avaliadas amostras de cães domiciliados e errantes, observando respectivamente 9,85% (20/203) e 2,89% (6/207) de amostras positivas para *Cryptosporidium*.

2.3.3.2 Em humanos

Cryptosporidium spp. tem distribuição mundial e pode ser encontrado tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. Anualmente ocorrem de 250 a 500 milhões de casos de infecção na Ásia, África e América Latina. Estudos evidenciam que o parasito está presente em 80 a 97% das águas superficiais e em 26 a 54% das águas tratadas (SMITH; ROSE, 1998).

Entre adultos imunocompetentes de nações industrializadas a prevalência de *Cryptosporidium* nas fezes é de aproximadamente 2 a 6%, sendo a prevalência a antígenos de oocistos entre 17 a 32%. Em países menos desenvolvidos, no entanto, a criptosporidiose é uma doença primariamente da infância. No Brasil, por exemplo, é relatado que mais de 95% das crianças são soropositivas aos cinco anos (GOLDMAN; AUSIELLO, 2004).

Relato de infecção em humanos por *C. meleagrides*, *C. canis*, *C. felis* e *C. muris*, ocorrem mais em países subdesenvolvidos, porém a transmissão zoonótica ainda não é clara, uma vez que, ainda não se possui confirmação por análises genéticas da rota de transmissão dessas infecções (CAMA, 2008).

Xiao *et al.* (2001), identificaram genotipicamente, *Cryptosporidium* em 132 amostras fecais de 80 crianças residentes em Lima no Perú. De 85 episódios de infecção, 67 (79%) foram devidos ao genótipo humano de *C. parvum* e 18 devidas a espécies que são consideradas zoonóticas: 8 do genótipo bovino de *C. parvum*, 7 de *C. meleagries*, 2 de *C. canis* e 1 de *C. felis*. Não foi identificada nenhuma infecção com mais de um tipo de genótipo. Para as crianças infectadas com genótipo humano de *Cryptosporidium* comparadas aquelas infectadas com genótipos zoonóticos, não havia diferença quanto ao consumo de água, saneamento ou convívio com animais.

Estudos realizados de 2005 a 2008 na Austrália em 248 amostras de fezes de humanos com diarreia através de PCR detectaram que 78,6% dos casos eram devidos à infecção por *C. hominis*, 19,8% por *C. parvum* e 1,6% por *C. meleagridis* (SILVA, 2010).

Entre os anos de 2006 e 2008 nos EUA, o número de casos de criptosporidiose aumentaram dramaticamente (79,9%), a partir de 6.479 casos em 2006 para 11.657 em 2007, e depois diminuiu (9,9%) 10.500 em 2008 (YODER *et al.*, 2010).

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 por parte dos médicos e dos laboratórios. Além das técnicas diagnósticas utilizadas pela maioria dos laboratórios que não permitem a identificação do parasita em um exame de fezes rotineiro (VALENTIM; CARDOSO, 2011).

Em relação à criptosporidiose pulmonar, estudo realizado por Corti *et al.* (2008), em cinco pacientes do sexo masculino com idade média de 33 anos, demonstrou oocistos em amostras de escarro e lavado bronco-alveolar de todos os pacientes afirmando que vários autores acreditam que a prevalência da criptosporidiose brônquica pode ser subestimada, porque sua presença não é investigado sistematicamente.

2.3.4 Profilaxia, controle e tratamento

A profilaxia e controle da criptosporidiose são feitos pela adoção de medidas que previnem ou evitam a contaminação do meio ambiente, água e alimentos com oocistos do parasito e o contato de pessoas susceptíveis com fontes de infecção. Cuidados especiais de higiene pessoal e com o vestuário, utensílios e instrumentos devem ser adotados pelos indivíduos dos grupos de riscos cujas atividades os colocam em contato com material contaminado, pessoas doentes ou animais infectados (NEVES, 2005).

Ballweber (2001) ressalta que na criptosporidiose o controle é difícil e o saneamento básico é necessário.

Medidas de prevenção e controle incluem também a prática de uma boa higiene como por exemplo, lavar as mãos, não nadar em piscinas quando estiver apresentando diarreia, realização de tratamento de água, ferver a água, instalar sistemas de desinfecção secundária, por exemplo, irradiação ultravioleta ou sistemas de desinfecção por ozônio que inativam *Cryptosporidium* spp., dentre outras medidas (XIAO; FAYER, 2008).

O controle da criptosporidiose só pode ser atingido por meio de uma compreensão mais apurada da epidemiologia da doença, o que ajudará na adoção das medidas preventivas mais eficazes. No entanto, apesar dos diversos trabalhos publicados, o caráter ubíquo do *Cryptosporidium*, seu período de incubação variável e o potencial de transmissão pessoal subsequente à infecção tornam a investigação epidemiológica difícil (ABES, 2005).

O tratamento para a criptosporidiose, tanto em humanos quanto em animais, é o sintomático. Drogas anticoccídicas utilizadas em animais, de modo geral, não têm apresentado uma resposta satisfatória, apesar dos diversos protocolos testados (SPÓSITO FILHA; OLIVEIRA, 2009).

Durante o ciclo, somente três estágios extracelulares são susceptíveis: oocistos, esporozoítos móveis e os merozoítos decorrentes da reprodução assexuada. Esta característica dificulta a ação de drogas contra esse parasito (STEIN *et al.*, 2006).

Pessoas e bovinos imunocompetentes eliminam espontaneamente o agente, mas se desconhece se o mesmo ocorre em outros animais. A maioria dos cães jovens com diarreia associada à criptosporidiose morre ou é submetida à eutanásia (NELSON; COUTO, 2010).

Vários medicamentos foram utilizados na terapia da criptosporidiose, nenhum com eficácia comprovada. O co-trimoxazol e a espiromicina são ineficazes e a paromomicina e a azitromicina mostram resultados inconstantes (TAVARES; MARINHO, 2005).

A nitazoxanida é um antiprotozoário que tem ação através da inibição de enzimas que agem no metabolismo desse parasito. Atualmente a nitazoxanida é a única droga aprovada pela FDA (Food and Drug Administration) para o tratamento da criptosporidiose em crianças, uma vez que ela diminui o tempo da doença clínica e reduz a carga parasitária (CIMERMAN, 2008 *apud* SILVA, 2010). É o único antiparasitário de amplo espectro que foi aprovado nos Estados Unidos para o tratamento da criptosporidiose. Pode ser prescrita para crianças a partir 1 ano de idade e adultos, mas não provou ser eficaz para pessoas imunocomprometidas (YODER *et al.*, 2010).

Não há nenhum tratamento eficaz para a criptosporidiose intestinal ou extra-intestinais em pacientes imunocomprometidos (CORTI *et al.*, 2008).

A nitazoxanida (Annita®) demonstrou eficácia no tratamento em pacientes humanos. Porém, na dosagem preconizada para crianças não teve efeito no tratamento da criptosporidiose em cães (PIMENTEL, 2008).

Um estudo com o objetivo de verificar a eficácia da nitazoxanida no tratamento da criptosporidiose em cães observando a possibilidade de alterações bioquímicas séricas hepáticas e renais após a terapia foi realizado utilizando-se 11 cães de diferentes sexos, idades e raças, independente do estado clínico e consistência de suas fezes. As amostras fecais foram concentradas pela técnica de Ritchie modificada para concentração dos oocistos, e coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada. Administrou-se 10 mg/kg de nitazoxanida, 2 vezes ao dia, durante 3 dias consecutivos aos animais e foi observado que o tratamento realizado

com na dose referida foi ineficaz no combate ao protozoário e a única alteração evidenciada foi o aumento de uréia em apenas um animal (ALMEIDA *et al.*, 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram estabelecidos 2 grupos de estudo: animais domiciliados e animais errantes, totalizando um número de 150 amostras fecais coletadas e examinadas. Todos os animais eram assintomáticos, ou seja, no período de colheita das amostras, não apresentavam quadro clínico diarréico.

3.1.1 Cães domiciliados

No período de agosto a dezembro de 2011, foram analisadas no Laboratório de Parasitoses Intestinais do Instituto Evandro Chagas (IEC) amostras fecais de 100 cães domiciliados, que apresentavam faixas etárias variando entre seis meses a 19 anos, sendo 22 animais jovens (< 12 meses) e 78 adultos (\geq 12 meses) de ambos os sexos (51 fêmeas e 49 machos). Com relação à raça, 39 eram SRD (sem raça definida) e 61 de raças variadas, todos domiciliados na cidade de Belém do Pará. As amostras foram obtidas de cães em 20 bairros distintos da região Metropolitana de Belém (Águas Lindas, Batista Campos, Canudos, Coqueiro, Cremação, Fátima, Guamá, Icoaraci, Marambaia, Marco, Nazaré, Pedreira, Reduto, Sacramenta, São Brás, Souza, Tapanã, Telégrafo, Terra Firme e Umarizal).

No mesmo período também foram analisadas amostras fecais de 11 cães atendidos em uma clínica veterinária particular, localizada no centro da cidade de Belém, portadores de enfermidades diversas, porém não portadores de problemas intestinais, sendo 3 cães jovens e 8 adultos, procedentes de 10 bairros distintos da região Metropolitana de Belém (Castanheira, Canudos, Guamá, Jurunas, Marco, Parque Verde, Pedreira, São Brás, Terra Firme e Umarizal). Com referência ao sexo, analisou-se amostra de uma fêmea e de 10 machos, desses animais 2 eram SRD e 9 de raças variadas.

3.1.2 Cães errantes

Foram analisadas no mês de setembro de 2011, também no IEC, 39 amostras de fezes de cães capturados e abrigados pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) localizado na Avenida Augusto Montenegro, Km 10, s/n, Marambaia, Belém, PA, procedentes de 16 bairros distintos da região Metropolitana de Belém (Benguí, Canudos, Cidade Velha, Coqueiro,

Curió, Guamá, Icoaraci, Jurunas, Outeiro, Parque Guajará, Parque Verde, Tapanã, Telégrafo, Tenoné, Umarizal e Val-de-Cans). As amostras foram obtidas de animais de ambos os sexos, sendo 31 fêmeas e 8 machos. Em relação à idade três animais eram jovens (< 12 meses) e 36 adultos (\geq 12 meses), todos SRD.

3.2 COLHEITA DAS AMOSTRAS

3.2.1 Dos cães domiciliados

Realizou-se uma colheita de fezes por animal no período de junho a dezembro de 2011, a partir da entrega de um kit de colheita em residências de diferentes bairros da cidade de Belém. Foram confeccionados e distribuídos aproximadamente 200 kits de coleta que eram compostos por: frasco coletor universal de fezes com conservantes (25 mL de formol a 5%) para *Cryptosporidium* spp., usado também por Almeida *et al.* (2008), porém na concentração de 10%, etiquetado para identificar o animal e o número da amostra; uma espátula coletora para auxiliar o proprietário durante a coleta; palito de madeira para facilitar a homogeneização das fezes com o conservante; formulário para obtenção dos dados básicos dos animais (Anexo 1) a ser preenchido pelos proprietários juntamente com um manual de orientação quanto à colheita das fezes (Anexo 2).

As 11 amostras fecais obtidas na clínica veterinária particular foram coletadas diretamente do reto dos animais, com auxílio de luva descartável, sendo posteriormente acondicionadas em frasco coletor com conservante (25 mL de formol a 5%).

3.2.2 Dos cães errantes

No mês de setembro de 2011 foi realizada uma coleta de material no CCZ, Belém-PA, onde foram obtidas fezes diretamente do reto dos animais após a contenção dos mesmos. Buscou-se colher aproximadamente 10 g de fezes utilizando-se luvas de procedimento descartável para cada animal, onde realizou-se também uma coleta por animal. As amostras foram acondicionadas em frascos coletores universal sem conservante, numeradas, identificadas e transportadas em caixa de polímero expandido com gelo, para armazenamento a uma temperatura de 4°C por um período de 24 horas, para posterior processamento e avaliação parasitológica.

As amostras de fezes identificadas e numeradas procedentes de residências com

formulário, assim como as colhidas na clínica particular e as obtidas no CCZ, Belém-PA, foram armazenadas em caixas de polímero expandido e levadas ao Laboratório de Parasitoses Intestinais da Seção de Parasitologia do IEC, para processamento e avaliação parasitológica.

3.3 TÉCNICAS LABORATORIAIS UTILIZADAS

Foram utilizados dois métodos de diagnóstico: A técnica de Ziehl-Neelsen modificada ou coloração ácido-resistente, coloração de Kinyoun (Anexo 3), realizando-se a preparação de duas lâminas para cada amostra de fezes e o Teste de ELISA (ensaio imunoenzimático) (Anexo 4), indicados pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2010) como eficientes para a identificação da presença ou ausência de *Cryptosporidium*. O teste foi realizado a partir de um kit de diagnóstico da Teclab-USA, Wampole CRYPTOSPORIDIUM II (A Monoclonal ELISA for the Detection of *Cryptosporidium* Oocysti Antigen In Fecal Specimens). O referido teste de ELISA utiliza anticorpos monoclonais e policlonais frente ao antígeno dos oocistos de *Cryptosporidium* spp.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados da ocorrência de *Cryptosporidium* spp. foram submetidos à análise de discriminação entre tratamento (errantes x domiciliados); (machos x fêmeas); (jovens x adultos) pelo teste de Kruskal-Wallis, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico (SAS) Statistical Analysis System.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No estudo da ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em cães residentes na região Metropolitana de Belém, das 150 amostras fecais analisadas, 5 (3,33%) foram positivas para o protozoário (Tabela 1). A infecção ocorreu, respectivamente, em 3,6 % (4/111) dos cães domiciliados e em 2,56% (1/39) dos cães errantes.

Tabela 1: Distribuição da infecção por *Cryptosporidium* spp. em cães residentes na região Metropolitana de Belém, PA, 2012, segundo a procedência dos animais.

Procedência	Nº	Positivos	(%)
Domiciliados	111	4	3,6
Errantes	39	1	2,56
TOTAL	150	5	3,33

Resultado teste de Kruskal-Wallis: ($p > 0,05$).

Os resultados obtidos mostraram-se próximos aos encontrados por Navarro *et al.* (1997), em Londrina, PR, com 2,25% (3/133) de amostras positivas pela técnica de ZNm; entretanto, no referido estudo os animais apresentavam diarreia. Outros trabalhos apresentaram resultados semelhantes como o de Labruna *et al.* (2006), no município de Monte Negro, RO, que registraram 2,1% (2/95) de cães positivos e de Moura *et al.* (2009), em cães domiciliados da cidade de Lages, SC, que com a técnica de ZNm, observaram 4% (8/200) de positividade para *Cryptosporidium* spp.

A ocorrência de *Cryptosporidium* spp. foi superior nos animais domiciliados em relação aos errantes, porém, os resultados do teste de Kruskal-Wallis, mostraram não haver diferença significativa quanto à procedência dos animais de estudo.

Segundo Valentim e Cardozo (2011), é preocupante a ocorrência de portadores assintomáticos para a saúde pública, pelo fato da criptosporidiose ser uma zoonose e, conseqüentemente, animais nessa situação podem ser fontes de contaminações e dispersões do agente no ambiente. Considerando que muitas parasitoses que acometem os seres humanos são transmitidas por animais, de maneira direta ou indireta, o conhecimento sobre zoonoses parasitárias, destacando aqui a criptosporidiose, torna-se essencial sob o ponto de vista de saúde pública.

Os resultados no que se refere à infecção entre animais domiciliados e errantes, foram semelhantes aos obtidos por Katagiri e Oliveira-Sequeira (2007), que analisaram fezes de cães domiciliados e errantes na cidade de Botucatu, SP, e verificaram positividade de 3,1% (8/254) sendo 4% (5/125) de cães domiciliados e 2,3% (3/129) de cães de rua, bem como aos resultados obtidos por Silva (2010) na cidade de Porto Alegre, RS, que registrou infecção em 9,85% e 2,89% de cães domiciliados e errantes respectivamente.

No que se refere aos animais errantes, o índice de infecção foi inferior ao encontrado por Abe *et al.* (2002), no Japão, que analisaram apenas fezes de cães de rua, sem sintomas clínicos e diagnosticaram 6,4% de positividade através da técnica de concentração e flutuação por solução de açúcar e 9,3% pelo PCR, confirmando que infecções de cães por *Cryptosporidium* podem ser assintomáticas (ROBERTSON *et al.*, 2000). Também em cães domiciliados, os dados mostram-se inferiores aos encontrados por Overgaauw *et al.* (2009), que observaram 8,7% de animais positivos.

No presente estudo houve maior positividade de casos de *Cryptosporidium* spp. em animais domiciliados e, que pode estar relacionado, a falta de memória imunológica adquirida pelo não contato anterior com o referido agente, nesse sentido, Cama (2008), assevera que em crianças essa imunidade é de curta duração ou incompleta. Apesar dos cães domiciliados terem apresentado esse resultado, sua carga parasitária, ou seja, a quantidade de oocistos por grama de fezes (oopg) foi considerada baixa, possibilitando a identificação da presença do parasita apenas no teste de ELISA a partir da identificação do antígeno do *Cryptosporidium* spp. e não no ZNm pela baixa excreção de oocistos dificultando a possibilidade de sua visualização.

Em relação aos cães errantes onde houve somente um animal positivo, pode-se supor que os animais pela vivência nas ruas, em contato com água e alimentos contaminados, podem ter adquirido uma memória imunológica, não tendo conhecimento exato da sua durabilidade, mas que de alguma forma os auxiliou a eliminarem espontaneamente *Cryptosporidium* spp. Contudo, como se pode observar, o animal errante parasitado encontrava-se com uma alta carga parasitária sendo possível a observação dos oocistos pelo método do ZNm além da positividade também no teste de ELISA.

Os resultados dos métodos de estudos utilizados na análise das 150 amostras fecais estão demonstrados na Tabela 2, onde foi verificado a superioridade do teste de ELISA para o diagnóstico individual do *Cryptosporidium* spp., com 3,33% (5/150) de casos positivos. Para o método de ZNm registrou-se 0,66% (1/150), ou seja somente um animal positivo, onde o mesmo está incluso entre os animais que mostraram-se positivos no teste de ELISA. Portanto

houve discordância em quatro amostras, sendo o ELISA mais sensível que o ZN na detecção de casos positivos.

Tabela 2: Resultados do diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. pelos métodos de Ziehl-Neelsen modificado e teste de ELISA em cães residentes na região Metropolitana de Belém, PA, 2012.

MÉTODOS		ELISA		
		Positivo	Negativo	TOTAL
ZIEHL-NEELSEN	Positivo	1	0	1
	Negativo	4	145	149
TOTAL		5	145	150

Resultado teste de Kruskal-Wallis: ($p > 0,05$).

Comparando os métodos laboratoriais utilizados, na análise fecal dos 111 animais domiciliados os resultados foram positivos apenas para o teste de ELISA, ocorrendo em 3,6% (4/111) dos casos. Já, para os animais errantes, dos 39 submetidos ao estudo, 2,56% (1/39), foram positivos nos dois os métodos, pela observação do oocisto de *Cryptosporidium* spp. corados numa tonalidade de róseo-avermelhado pela técnica de ZNm (Figura 2) e pela reação antígeno do *Cryptosporidium* detectado pelo teste de ELISA (Figura 3).



Figura 2: Observação do oocisto de *Cryptosporidium* spp. pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada em fezes de um cão errante do CCZ, Belém, PA.

Fonte: QUEIROZ, D.K.S. 2011.

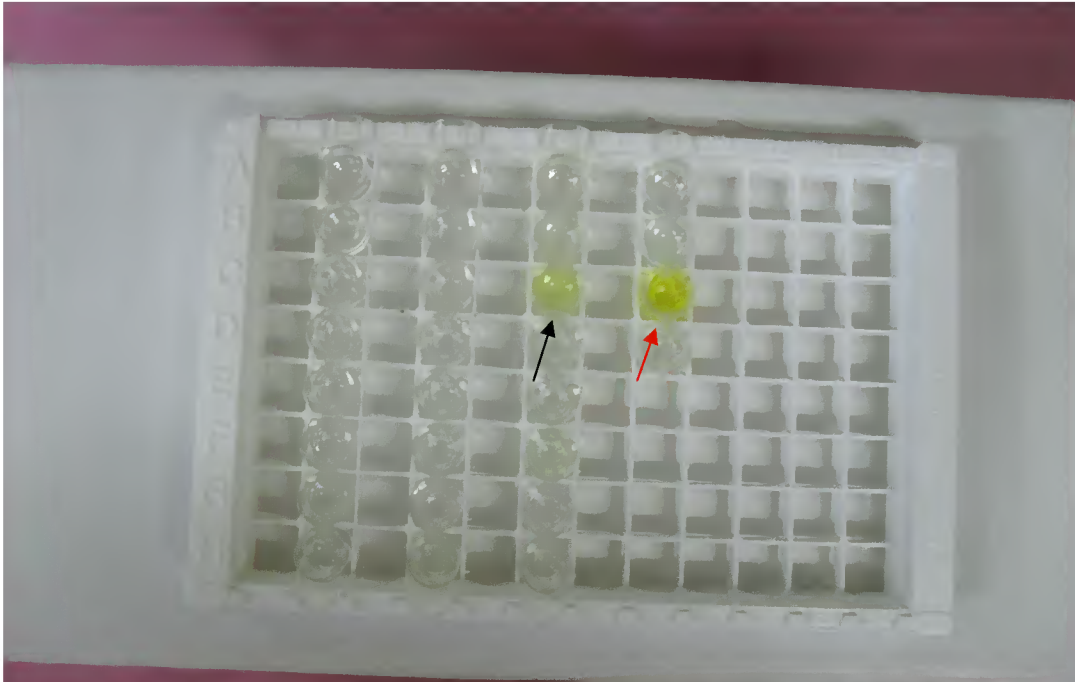


Figura 3: Reação positiva ao antígeno de *Cryptosporidium* spp. (seta preta) detectado pelo teste de ELISA em fezes de um cão errante do CCZ, Belém, PA, ao lado do controle positivo (seta vermelha).

Fonte: QUEIROZ, D.K.S. 2011.

O resultado obtido pela técnica de ZNm (Tabela 2), foi semelhante aos de Batchelor *et al.* (2008), que verificaram no Reino Unido, 0,6% de positividade em amostras de fezes de cães, entretanto foi muito inferior aos encontrados na Holanda por Overgaauw *et al.* (2009), que registraram uma positividade de 8,7%. Navarro *et al.* (1997) também encontraram uma baixa positividade, com a utilização da mesma técnica em Londrina, PR, onde dos 133 animais do estudo, encontrou positividade em apenas 3 animais (2,25%).

Com relação ao teste de ELISA, os resultados mostram-se superiores aos verificados por Figueiredo *et al.* (2004), nas cidades de Lavras e Viçosa, onde, 1,85% dos cães apresentavam oocistos nas fezes.

Os resultados do presente trabalho corroboram com os estudos de Shukla *et al.* (2006), no Canadá, no que se refere a comparação entre os dois métodos de diagnósticos, já que das 68 amostras de fezes de cães filhotes analisadas pela técnica de ZNm, nenhuma apresentou resultado positivo e 5 (7,4%) foram positivas no teste de ELISA.

Silva (2010), utilizando a técnica de ZNm, realizou apenas uma colheita de amostra fecal por animal, assim como procedido no presente estudo. O autor comentou que isso pode ter reduzido a positividade de casos encontrada no seu estudo, uma vez que a excreção do oocisto de *Cryptosporidium* ocorre de forma intermitente validando a orientação de mais de uma coleta para se obter um resultado de maior confiança, pois, segundo Robertson *et al.*

(2000), muitas vezes a quantidade de oocistos identificados nas lâminas positivas é pequena, porém nesse estudo realizado em cães da região Metropolitana de Belém utilizando o teste de ELISA, conseguiu-se identificar uma positividade em animais que não apresentaram oocistos nas lâminas, elevando a confiabilidade dos resultados encontrados.

Segundo Pereira (2007), para detectar *Cryptosporidium* spp. pela coloração de Ziehl-Neelsen é necessário que o animal excrete de 50.000 a 500.000 oocistos por grama de fezes (oopg) e como os animais do presente estudo não apresentavam sinais clínicos como diarreia e a quantidade de oocistos eliminados provavelmente foi pequena, sendo realizada a observação do parasita pela técnica de ZNm em apenas um animal, onde encontrou-se uma média de 6 oocistos para cada uma das 2 lâminas examinadas coradas com Kinyoun.

Nouri; Toroghi (1991) e Wolfson *et al.* (1995) afirmaram que a baixa ocorrência de *Cryptosporidium* spp. diagnosticada tanto em animais como no homem, está atribuída a particularidade do seu ciclo biológico, pela não eliminação total dos oocistos produzidos pelas fezes, devido a realização do ciclo endógeno, mantendo uma baixa eliminação, desde que o estado imunológico do portador não esteja comprometido por qualquer fator.

O estudo comparativo entre os sexos dos animais mostrou que 2,98% (2/67) dos machos e 3,61% (3/83) das fêmeas foram positivos (Tabela 3), sem diferirem estatisticamente.

Tabela 3: Positividade para *Cryptosporidium* spp. em cães residentes na região Metropolitana de Belém, PA, 2012, de acordo com o sexo dos animais.

Animais	Nº	Positivos	(%)
Machos	67	2	2,98
Fêmeas	83	3	3,61
Total	150	5	3,33

Resultado teste de Kruskal-Wallis: ($p > 0,05$).

Os resultados do presente estudo corroboram com os resultados de Lallo; Bondan (2006), em estudo com 450 cães da cidade de São Paulo, SP, e Ederli *et al.* (2008) em Campos dos Goytacazes, RJ, e Moura *et al.* (2009), em Lages, SC que evidenciaram não haver diferença estatística entre machos e fêmeas quanto a infecção pelo *Cryptosporidium* spp.

No que se refere à idade dos animais de estudo, classificou-se como jovens (< 12 meses) e adultos (\geq 12 meses). Os resultados da infecção em relação à faixa etária dos cães estão expressos na Tabela 4.

Tabela 4: Positividade para *Cryptosporidium* spp. de acordo com faixa etária dos animais residentes na região Metropolitana de Belém, PA, 2012.

Animais	Nº	Positivos	%
Jovens (< 12 meses)	28	2	7,69
Adultos (\geq 12 meses)	122	3	2,45
TOTAL	150	5	3,33

Resultado teste de Kruskal-Wallis: ($p > 0,05$).

Observou-se que a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. nos cães jovens correspondeu a 7,69% (2/26), já nos animais adultos, a infecção foi de 2,45% (3/119). Estatisticamente, não houve diferença significativa entre as idades dos animais estudados.

Os resultados aqui obtidos diferem dos encontrados por Lallo e Bondan (2006), que analisaram 450 amostras fecais de cães da cidade de São Paulo, SP e evidenciaram 5,5% e 10,1% de positividade para animais jovens e adultos, respectivamente, portanto, a ocorrência de infecção foi menor nos animais jovens em relação aos adultos. Entretanto, Hamnes *et al.* (2007), na Noruega, observaram uma notável taxa de infecção em cães jovens, de 1 a 12 meses de idade, com uma positividade de 16,8% para *Cryptosporidium* corroborando com Ramirez-Barrios *et al.* (2004), onde destacaram que as infecções parasitárias acometem cães de todas as idades, porém são mais prevalentes em filhotes por não responderem imunologicamente de forma eficaz as infecções.

Os resultados obtidos neste estudo foram semelhantes, aos encontrados em felinos por Coelho *et al.* (2009), no Município de Andradina, SP, com uma ocorrência maior de infecção em animais jovens com menos de 1 ano de idade. Já Navarro *et al.* (1997), em Londrina, PR, analisaram amostras fecais de 133 cães e verificaram três casos positivos, todos pertencentes a animais com menos de 1 ano de vida.

Observou-se que quando se compara os resultados aqui encontrados aos outros evidenciados em diversos estudos em todo o mundo, a ocorrência do *Cryptosporidium* em cães tanto domiciliados como errantes demonstra valores variáveis, dependendo, portanto dos meios de diagnósticos empregados e também da localidade estudada.

Mediante os resultados encontrados deve-se considerar que as parasitoses de modo geral, desde longas datas atingem os animais e os homens promovendo enfermidades que muitas vezes geram danos irreversíveis à saúde de ambos, dentro dessas parasitoses estão as zoonóticas como a criptosporidiose com uma importância na saúde pública de valor incomensurável, envolvendo, neste caso, a relação ambiente-homem-animal.

A ocorrência da criptosporidiose que deve ser mais explorada para se obter um conhecimento epidemiológico mais abrangente no Estado do Pará e também em outras localidades onde presença de *Cryptosporidium* spp. é negligenciada.

No Estado do Pará poucos estudos foram realizados quanto à ocorrência de enteroparasitas em cães e gatos, sabe-se, no entanto, que a relação entre os cães e os humanos é cada vez mais estreita e que a possibilidade de transmissão de doenças entre ambos é favorecida, principalmente nas populações as quais faltam informações sobre as zoonoses. Adicionalmente, Greca (2010) afirma que a criptosporidiose ainda é pouco conhecida pelos clínicos de pequenos animais e alerta para os clínicos que estes comecem a incluir a criptosporidiose na sua lista de diagnóstico diferencial ao atender animais com problemas gastrintestinais.

Convém ressaltar o desconhecimento pela população a cerca do *Cryptosporidium* spp. e de outras parasitoses intestinais de cães, de importância zoonótica. Portanto, faz-se necessária a intensificação de ações educativas que sirvam para orientar os proprietários dos animais quanto à importância da coleta de fezes do ambiente, que servem como fonte de infecção, para que se possa minimizar ainda mais a ocorrência desses parasitos e a possível transmissão ao homem. Ainda enfatizando a questão ambiental, Greca (2010) lembra que o lançamento de esgoto não tratado nos rios contamina a água com oocistos de *Cryptosporidium* sp., que pode conter espécies zoonóticas e específicas de *Cryptosporidium* sp. como *C. hominis*, assim os animais podem se tornar suscetíveis ao se infectar com outras espécies de *Cryptosporidium* sp., pois a água ingerida é a mesma consumida pelo ser humano.

5 CONCLUSÃO

A ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em cães da região Metropolitana de Belém, PA caracterizou-se baixa, onde o teste de ELISA apresentou sensibilidade maior que à técnica de Ziehl-Neelsen modificada, observando, portanto um número superior de positividade, não havendo diferenças na ocorrência do agente entre cães domiciliados e errantes, independente também do sexo e da idade dos animais.

6 REFERÊNCIAS

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

ABES - Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental. **Uma revisão sistemática sobre a relação entre criptosporidiose e abastecimento de água**. p.1-7, 2005. Disponível em <<http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/abes23/VII-030.pdf>> Acesso em 03 de agosto de 2010.

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.

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.

ALMEIDA, A.J.; MONTEIRO, M.I.; BRAGA, R.S.; MARIANO, F.A.; CALDEIRA, M.S. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em animais errantes apreendidos em Campos dos Goytacazes, RJ. **JBCA Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, v. 1, n. 2, p. 66-75. 2008.

ALMEIDA, A.J.; ALBERNAZ, A.P.; BAUMAN, B.H. **Protocolo experimental para tratamento da criptosporidiose canina**. 38º COMBRAVET – Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Florianópolis, SC, 2011. Disponível em <http://www.sovergs.com.br/site/38conbravet/lista_area_02.htm> Acesso em 31 de janeiro de 2012.

ANDERSON, B.C.; DONNDELINGER, T.; WILKINS, R.M.; SMITH, J. Cryptosporidiosis in a veterinary student. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 180, n. 4, p. 408-409, 1982.

BALASSIANO, B. C. C.; CAMPOS, M.R.; MENEZES, R.C.A.A.; PEREIRA, M.J.S Factors associated with gastrointestinal parasite infection in dogs in Rio de Janeiro, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 91, n. 2-4, p. 234-240, 2009.

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

BATCHELOR, D.J.; TZANNES, S.; GRAHAM, P.A.; WASTLING, J.M.; PINCHBECK, G.L.; GERMAN, A.J. Detection of endoparasites with zoonotic potential in dogs with gastrointestinal disease in the UK. **Transboundary and Emerging Diseases**, Berlin, v. 55, n. 2, p. 99-104, 2008.

BOWMAN, D.D.; HENDRIX, C.M.; LINDSAY, D.S.; BARR, S.C. **Feline Clinical Parasitology**, Iowa State University Press, 469 p. 2002.

BOWMAN, D.D.; LYNN, R.C.; EBERHARD, M.L. **Georgis' Parasitology for veterinarians**. 8ª ed. Madrid: Espanha: Elsevier, p. 102-103, 2004.

BOXELL, A.; HIJJAWI, 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.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Guia de Bolso. 8ª ed. Brasília. p. 127-128. 2010.

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. **Ann Inter Med**, n. 10, p. 232-236, 1993.

BRESCIANI, K.D.S.; AMARANTE, A.F.T.; LIMA, V.M.F.; MARCONDES, M.; FEITOSA, F.L.F.; TÁPARO, C.V.; SERRANO, A.C.M.; ISHIZAKI, M.N.; TOME, R.O.; PERRI, S.H.V.; MEIRELES, M.V. Infecções por *Cryptosporidium* spp. em cães de Araçatuba, SP, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 3, p. 466-468, 2008.

CAMA, V.A. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 14, p. 1567-1574. 2008.

CAPUANO, D.M.; ROCHA, G.M. Ocorrência de parasitas com potencial zoonótico em fezes de cães coletadas em áreas públicas do município de Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 9, n. 1, p. 81-86, 2006.

CAREY, C.M.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocysts. **Water Research**, v. 38, n. 4, p. 818-862, 2004.

CARLI, G.A. **Diagnóstico Laboratorial das Parasitoses humanas. Métodos e Técnicas**. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, p. 127-140, 1994.

CHAPPELL, C.; OKHUYSEN, P.; WHITER, JR. 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. 19-9, 2003.

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

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 Microbiologia**, 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 2012.

EDERLI, B.B.; RODRIGUES, M.F.G.; DE CARVALHO, C.B. Oocistos do Gênero *Cryptosporidium* em cães domiciliados na Cidade de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 14, n. 3, p. 129-131, 2005.

EDERLI, B.B.; EDERLI, N.B.; OLIVEIRA, F.C.R.; QUIRINO, C.R.; CARVALHO, C.B. Fatores de risco associados à infecção por *Cryptosporidium* spp. em cães domiciliados na cidade de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 250-266, 2008.

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

FAYER, R.; SPEER, C.A.; DUBEY, J.P. Cryptosporidiosis of man and animals. **General biology of *Cryptosporidium***. p. 1-29. 1990.

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

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

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.

FEITOSA, F.L.F.; SHIMAMURA, G.M.; ROBERTO, T.; MEIRELES, M.V.; NUNES, C.M.; CIARLINI, P.C.; BORGES, A.S. Prevalência de criptosporidiose em bezerros na região de Araçatuba, Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 189-193, 2004.

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.

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.

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

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.

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.

GOLDMAN, L; AUSIELLO, D. Cryptosporidiosis. In: **Cecil textbook of medicine**. 22^a ed. p.2092-2095, 2004.

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. 11, p. 22, 2007. Disponível em <<http://www.actavetscand.com/content/49/1/22>> Acesso em 15 de janeiro de 2012.

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

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

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

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**, New York, 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.

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

LALLO, M.A. **Ocorrência de *Cryptosporidium parvum* em cães na Grande São Paulo**. 1993. 45f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

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.

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

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.

MACPHERSON, C.N.L. Human behavior and the epidemiology of parasitic zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 11/12, p. 1319-1331, 2005.

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.

MERCADO, R.; BUCK, G.A.; MANQUE, P.A.; OZAKI, L.S. *Cryptosporidium hominis* Infection of the Human Respiratory Tract. **Emerging Infectious Diseases**. v.13, n. 3, March 2007. Disponível em <<http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/13/3/pdfs/06-0394.pdf>> Acesso em 04 de fevereiro de 2012.

MILLER, D.L.; LIGGETT, A.; RADI, Z.A.; BRANCH, L.O. Gastrointestinal cryptosporidiosis in a puppy. **Veterinary Parasitology**, v. 115, n. 3, p. 199-204, 2003.

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

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.

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

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

NETO, V.A.; BEZERRA, R.C.; ALARCÓN, R.S.R.; BRAZ, L.M.A. Conservação de oocistos de *Cryptosporidium* em fezes para exame parasitológico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 303-304, 2003.

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 enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. **Gastroenterology**, v. 70, p. 592-598, 1976.

NOURI, M.; TOROGHI, R. Assymptomatic cryptosporidiosis in cattle and human in Iran. **Veterinary Record**, v. 128, p. 358-359, 1991.

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**. 1988, 85f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1988.

OVERGAAUW, P.A.; VAN ZUTPHEN, L.; HOEK, D.; YAYA, F.O.; ROELFSEMA, J.; PINELLI, E.; VAN KNAPEN, F.; KORTBEEK, L.M. Zoonotic parasites in fecal samples and fur from dogs and cats in The Netherlands. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 1-2, p. 115-122, 2009.

PEREIRA, J. T. **Métodos de desinfecção em água contendo *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) e sua detecção por técnica de biologia molecular.** 2007. 92 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia, Patologia) - Setores de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007. Disponível em <<http://dspace.c3sl.ufpr.br:8080/dspace/handle/1884/13537>> Acesso em 25 de fevereiro de 2012.

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.

PIMENTEL, F.F. **Efeito do tratamento com nitazoxanida na criptosporidiose canina.** 2008. 28f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2008.

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.

RAMÍREZ-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.

ROBERTSON, I.D.; IRWIN, P.J.; LYMBERY, A.J.; THOMPSON, R.C. The role companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1369-1377, 2000.

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

SHUKLA, R.; GIRALDO, P.; KRALIZ, A.; FINNIGAN, M.; SANCHEZ, A.L. *Cryptosporidium* spp. and other zoonotic enteric parasites in a sample of domestic dogs and cats in the Niagara region of Ontario. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 47, n. 12, p. 1179–1184, 2006.

SILVA, C.G.M.; ANDRADE, S.A.C.; STAMFORD, T.L.M. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e outros parasitas em hortaliças consumidas *in natura*, no Recife. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.10, p. 63-69, 2005.

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.

SLIFKO, T.R.; SMITH, H.V.; ROSE, J.B. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. **International Journal for Parasitology**, Oxford, 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.

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

STEIN, B.; STOVER, L.; GILLEM, A.; WINTERS, K.; LEE, J.H.; CHAURET, C. The effect of lectins on *Cryptosporidium parvum* oocyst in vitro attachment to host cells. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 1, p. 1-9, 2006.

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

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.

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

TITILINCU, A.; MIRCEAN, V.; ACHELARITEI, D.; COZMA, V. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in asymptomatic dogs by ELISA and risk factors associated with infection. **Lucrări Stiințifice Medicină Veterinară**, v. 43, n. 1, 2010 TIMISOARA. Disponível em <http://www.usab-tm.ro/vol10MV/2_vol10.pdf> Acesso em 15 de janeiro de 2012.

TIZARD, I. **Introdução á Imunologia Veterinária**. 2ed. São Paulo: Roca, p. 545, 1998.

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 janeiro de 2012.

TZIPORI, S.; CAMPBELL, I. Prevalence of *Cryptosporidium* antibodies in 10 animal species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 455-456, 1981.

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.

WILSON, R.B.; HOLSCHER, M.A.; LYLE, S.J. Cryptosporidiosis in a pup. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 183, n. 9. p. 1005-1006, 1983.

WOLFSON, J.S.; RITCHER, J.M.; WALDRON, N.A.; WEBWER, D.J.; MC CARTHY, D.M.; HOPKINS, C.C. Cryptosporidiosis in immunocompetent patients. **The New England Journal Medicine**, v. 312, p. 1278-1282, 1995.

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.; BERN, C.; LIMOR, J.; SULAIMAN, I.; ROBERTS, J.; CHECKLEY, W.; CABRERA, L.; GILMAN, R.H.; LAL, A.A. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 3, p. 492-497, 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., 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.; CAMA, V.A.; CABRERA, L.; ORTEGA, Y.; PEARSON, J.; GILMAN, R.H. Possible transmission of *Cryptosporidium canis* among children and a dog in a household. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, n. 6, p. 2014-2016, jun., 2007.

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 2012.

YODER, J.S.; HARRAL, C.; BEACH, M.J. Cryptosporidiosis Surveillance - United States, 2006–2008. **Surveillance Summaries**, v. 59, n. 6, p. 1-25, 2010.

ANEXO 1**FORMULÁRIO DE DADOS**

NOME DO ANIMAL: _____ SEXO: MACHO () FÊMEA()

IDADE: _____ Nº AMOSTRA: _____

RAÇA: _____ BAIRRO RESIDENTE: _____

DADOS DO PROPRIETÁRIO:

NOME: _____

ENDEREÇO: _____

TELEFONE: _____ E-MAIL: _____

DATA DA COLHEITA: ____/____/____

ANEXO 2

ORIENTAÇÃO PARA COLETA DE MATERIAL:

- 1- Colher cerca de 10 gramas de fezes;
- 2- Evitar fezes em contato com o solo (colher superficialmente);
- 3- Utilizar para coleta a espátula de madeira;
- 4- Colocar as fezes no frasco contendo o conservante;
- 5- Dissolver as fezes com auxílio da espátula;
- 6- Fechar o frasco e mantê-lo à temperatura ambiente;
- 7- Manter o kit fora do alcance de crianças e animais;

ANEXO 3

Realização da técnica de Ziehl-Neelsen modificado

1. Inicialmente preparou-se todo material necessário;
2. Para a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. utilizou-se no processamento laboratorial 3mL das fezes dissolvidas no formol a 5% dos cães domiciliados e 2g de fezes das amostras dos cães errantes;
3. O conteúdo foi homogeneizado em um copo plástico descartável 2mL de solução de PBS (Phosphate buffered saline – solução tampão fosfato-salino);
4. Em seguida a diluição foi filtrada em outro copo plástico descartável para reter ao máximo os resíduos grosseiros com o auxílio de gaze dobradas em quatro camadas;
5. Uma parte equivalente a 4mL deste filtrado foi colocado em tubo tipo falcon de 14mL, acrescido de 4mL de éter;
6. O tubo em seguida foi tampado e o conteúdo foi emulsionado por 10 vezes e deixado em repouso por 5 minutos;
7. 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);
8. O sobrenadante foi desprezado em um vaso sanitário;
9. O sedimento ficou retido no fundo do tubo tipo falcon e uma gota foi utilizada na confecção do esfregaço em duas lâminas com extremidades foscas para cada amostra e as lâminas foram deixadas para secar em temperatura ambiente;
10. 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);
11. Após a secagem as lâminas foram fixadas com Metanol (Álcool Metílico) e deixadas para secar novamente;
12. Em seguida a porção com o esfregaço foi coberta com a fucsina carbólica (Corante de Kinyoun) durante 30 minutos, que serve para marcar o local onde o oocisto está presente;
13. 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 5% durante 5 minutos, que remove ainda mais o excesso do corante;
14. As lâminas foram lavadas pela segunda vez e cobertas pelo Verde Malaquita durante 5 minutos, em seguida lavadas pela última vez e deixadas para secar naturalmente;

15. Por último foram examinadas em objetiva de imersão com aumento de 100X com duas gotas de óleo de imersão no microscópio óptico.

ANEXO 4

Realização do Teste de ELISA

1. Inicialmente colocou-se 400 μ L de diluente presente no kit em um tubo de ensaio de vidro para diluir 0,1g das fezes formadas em um tubo de ensaio, ou seja, que não se encontravam diluídas em conservantes e sim refrigeradas (amostras dos cães errantes). Não houve necessidade de diluir as amostras que se encontravam no formol a 5% (amostras dos cães domiciliados);
2. Usou-se o BIOMIXER-agitador vortex modelo QL90, para fazer a homogeneização;
3. Pipetou-se 100 μ L de diluente que foi adicionado em todos os poços da microplaca de teste presente no kit que contém o anticorpo monoclonal;
4. Em seguida pipetou-se 50 μ L do homogeneizado com as fezes ou 50 μ L da amostra diluída em conservante, e colocou-se em todos os poços da microplaca ordenadamente. Em um dos poços colocou-se uma gota do controle positivo presente no kit;
5. A microplaca foi coberta com uma tampa e deixada em repouso durante 1 hora em temperatura ambiente;
6. Depois de 1 hora desprezou-se o conteúdo dos poços que em seguida foram lavados com solução de lavagem presente no kit (preparada com 50 mL da solução concentrada que vem no kit adicionando 950 mL de água destilada para formar 1 litro da solução). Fez-se a lavagem 5 vezes seguidas;
7. Após a lavagem colocou-se uma gota do conjugado (contém o anticorpo policlonal) nos poços e a microplaca foi novamente coberta com a tampa por um período de 30 minutos em temperatura ambiente;
8. Após esse período foi realizada uma segunda lavagem;
9. Após a lavagem foi adicionada 2 gotas de substrato nos poços e a microplaca foi novamente coberta e deixada em repouso durante 10 minutos;
10. Após os 10 minutos colocou-se uma gota de solução de parada presente também no kit e fez-se a visualização da coloração dos poços;
11. Com a finalização do teste o controle positivo encontra-se em uma coloração bem amarelada e as amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. encontram-se em uma escala de coloração amarelada de tons mais claros até mais amarelados. Já o controle negativo e as amostras negativas encontram-se transparentes.