

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**OCORRÊNCIA DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. EM
ANIMAIS EXÓTICOS DE COMPANHIA NO BRASIL**

Milena Sato de Souza
Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP
2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**OCORRÊNCIA DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. EM
ANIMAIS EXÓTICOS DE COMPANHIA NO BRASIL**

**Milena Sato de Souza
Orientador: Prof. Adjunto Marcelo Vasconcelos Meireles**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

ARAÇATUBA – SP
2013

Catálogo na Publicação (CIP)
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Souza, Milena Sato de

S729o Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em animais exóticos de companhia no Brasil / Milena Sato de Souza. -- Araçatuba: [s.n], 2013.

63 f. il.; + CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2013

Orientador: Prof. Adj. Marcelo Vasconcelos Meireles

1. PCR. 2. Saúde pública. 3. Zoonoses. I. T.

CDD 636.0896



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Ocorrência de Cryptosporidium spp. em animais exóticos de companhia no Brasil.

AUTORA: MILENA SATO DE SOUZA

ORIENTADOR: Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRA em CIÊNCIA ANIMAL (MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.

Dra. LUZIA HELENA QUEIROZ

Dra. VALÉRIA DE SÁ JAYME

Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES

DATA DA REALIZAÇÃO: 26 de novembro de 2013.

Presidente da Comissão Examinadora
Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES
- Orientador -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MILENA SATO DE SOUZA – Santos – SP, 26 de setembro de 1988. Graduada em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Araçatuba, São Paulo em dezembro de 2010. Bolsista de Iniciação Científica FAPESP de maio de 2009 a agosto de 2010. Aluna do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Campus de Araçatuba, São Paulo e bolsista FAPESP de agosto de 2011 a novembro de 2013. Estágio de pesquisa no Laboratório *UK Cryptosporidium Reference Unit, Public Health Wales Microbiology* - Singleton Hospital, na cidade de Swansea, Reino Unido, entre outubro e dezembro de 2012.

« Ce qui est créé par l'esprit est plus vivant que la matière. »

Charles Baudelaire

Dedico

*à minha querida mãe, pelo incentivo e apoio em
todas as horas, mas principalmente,
pelo amor incondicional*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Adjunto Marcelo Vasconcelos Meireles pela orientação e por todos os conhecimentos passados, indispensáveis para o desenvolvimento do projeto e crescimento profissional, além da confiança e apoio demonstrados.

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, pela disponibilização dos meios necessários que viabilizaram o desenvolvimento do projeto de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro do projeto de pesquisa (#2011/08814-1) que originou a presente dissertação, bem como pela concessão da bolsa de mestrado (#2011/02730-0) e bolsa de estágio no exterior (#2012/09079-6), que foram essenciais para a conclusão dessa pesquisa.

Ao Laboratório *UK Cryptosporidium Reference Unit, Public Health Wales Microbiology* - Singleton Hospital, em especial à Rachel Chalmers por aceitar o pedido de estágio e ao Stephen Hadfield por me orientar, além de todos da equipe do laboratório: Kristin Elwin, Guy Robinson, Jonathan e Nigel pela ótima recepção e carinho durante a realização do estágio de pesquisa no laboratório em Swansea, Reino Unido.

À minha mãe, por sempre me apoiar e incentivar em tudo, minha eterna gratidão.

Aos meus amigos de laboratório, Camila, Fernanda, José Eduardo e Guilherme, que tornaram esse período muito mais feliz e, sem dúvida, contribuíram com esse trabalho.

Aos meus amigos de graduação que se tornaram irmãos e me ajudaram nos cinco anos de faculdade.

Aos alunos de iniciação científica, Bruno e Henrique, pela colaboração no projeto.

A todos os pós-graduandos, estagiários e técnicos dos laboratórios pelo agradável convívio e auxílio na pesquisa.

E finalmente, mas não menos importante, a Deus pela força e fé.

SUMÁRIO

	Página
I INTRODUÇÃO	16
II REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Histórico.....	17
2.2 Taxonomia	18
2.3 Ciclo biológico	20
2.4 Importância em Saúde Pública	22
2.5 Infecção em roedores	25
2.6 Infecção em coelhos.....	27
2.7 Diagnóstico	27
2.7.1 Diagnóstico microscópico	28
2.7.2 Diagnóstico imunológico	29
2.7.3 Diagnóstico molecular	30
2.8 Tratamento	32
2.3. Controle e Prevenção	34
OBJETIVOS	37
III MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 Amostras fecais	38
3.2 Extração de DNA genômico	38
3.3 <i>Nested</i> PCR para amplificação de fragmento da subunidade 18S do gene do RNA ribossômico de <i>Cryptosporidium</i> spp	39
3.4 Sequenciamento dos fragmentos amplificados	40
3.5 Alinhamento e tradução das sequências de nucleotídeos e edição final	40
IV RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
V CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1 - Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp.....22

LISTA DE QUADROS

Página

Quadro 1 - Espécies de *Cryptosporidium* atualmente descritas 19

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso utilizados nas reações de PCR (XIAO et al., 2000).....	39
Tabela 2 - Resultado da <i>nested</i> PCR e identificação molecular de <i>Cryptosporidium</i> spp. em animais exóticos de companhia no Brasil.....	42

OCORRÊNCIA DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. EM ANIMAIS EXÓTICOS DE COMPANHIA NO BRASIL

RESUMO - A infecção por algumas espécies ou genótipos de *Cryptosporidium* representa um risco em potencial para a saúde pública, principalmente por causa de morbidade e mortalidade em crianças de zero a cinco anos de idade e em pacientes imunodeprimidos. Embora existam alguns relatos de infecção por *Cryptosporidium* em animais exóticos, sua participação na epidemiologia da criptosporidiose humana é incerta, e a literatura sobre esse tema ainda é bastante escassa. O objetivo deste estudo foi determinar a ocorrência e realizar a classificação molecular de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de animais exóticos criados como animais de estimação no Brasil. Um total de 386 amostras de seis espécies de animais exóticos foi colhido e armazenado em solução de dicromato de potássio 5% a 4°C. Os oocistos foram purificados por centrífugo-sedimentação em água-éter, seguindo-se a extração de DNA genômico e a realização da *nested*-PCR para amplificação de fragmento parcial do gene da subunidade 18S do rRNA. Positividade para *Cryptosporidium* spp. foi observada em 11,40% (44/386) das amostras. O sequenciamento de fragmentos amplificados permitiu a identificação de *Cryptosporidium tyzzeri* (*Cryptosporidium* genótipo I de camundongos) em camundongos (*Mus musculus*), *Cryptosporidium muris* em camundongos, hamster (*Mesocricetus auratus* e *Cricetulus griseus*) e chinchila (*Chinchilla lanigera*), *Cryptosporidium parvum* em chinchila e *Cryptosporidium* sp. em porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*). Os resultados deste estudo mostram que há uma variedade de espécies de *Cryptosporidium* spp. presentes em animais exóticos de companhia no Brasil. Os dados sugerem que esses animais podem participar da epidemiologia da criptosporidiose humana, particularmente por seu estreito convívio.

Palavras-chave: PCR, saúde pública, zoonoses.

OCCURRENCE OF *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. IN EXOTIC ANIMALS RAISED AS PETS IN BRAZIL

SUMMARY - Infection by some species or genotypes of *Cryptosporidium* represents a potential risk to public health, mainly because of the morbidity and mortality in children from zero to five years of age and in immunocompromised patients. Although there are some reports of *Cryptosporidium* infection in exotic animals, the participation of these animals in the epidemiology of human cryptosporidiosis is uncertain and studies on this topic is still rather scarce. The aim of this study was to determine the occurrence as well as to perform the molecular classification of *Cryptosporidium* spp. in faecal samples of exotic animals raised as pets in Brazil. A total of 386 faecal samples from six species of exotic animals was collected and stored in a solution 5% potassium dichromate at 4°C. The oocysts were purified by centrifugal sedimentation water-ether, followed by genomic DNA extraction and the performance of the nested-PCR to amplify partial gene fragment of 18S rRNA. Positivity for *Cryptosporidium* spp. was obtained in 11.40% (44/386) of samples. The sequencing of the amplified fragments allowed the identification of *Cryptosporidium tyzzeri* (*Cryptosporidium* mouse genotype I) on mice (*Mus musculus*), *Cryptosporidium muris* in mice, hamster (*Mesocricetus auratus* and *Cricetulus griseus*) and chinchilla (*Chinchilla lanigera*), *Cryptosporidium parvum* in chinchilla and *Cryptosporidium* sp. in guinea pig (*Cavia porcellus*). The results of this study show that there are a variety of species of *Cryptosporidium* spp. present in exotic animals company in Brazil. The data suggest that these animals may have zoonotic potential and participate in the epidemiology of human cryptosporidiosis.

Keywords: PCR, public health, zoonosis.

I INTRODUÇÃO

O gênero *Cryptosporidium*, pertencente ao filo Apicomplexa, é constituído por protozoários coccídios que infectam mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes. Animais domésticos e selvagens são susceptíveis à infecção causada por diversas espécies e genótipos desse coccídio, muitos dos quais são encontrados em humanos (XIAO; FAYER, 2008).

Infecções por *Cryptosporidium* em humanos podem ser assintomáticas ou resultar em doença clínica, principalmente, na forma de diarreia que pode durar até três semanas, embora seja autolimitante em pessoas saudáveis. Entretanto, enfermidade prolongada pode ser fatal em pacientes imunocomprometidos (BARALDI et al., 1999; HUNTER; NICHOLS, 2002; SAUDA et al., 1993; TALI et al., 2011); em crianças está associada a episódios de diarreia prolongada, levando à má absorção e diminuição do crescimento (AGNEW et al., 1998).

Em animais, a infecção ocorre geralmente em indivíduos jovens, particularmente em ruminantes. O sinal mais observado é a diarreia líquida e profusa, que possui coloração amarelada e odor fétido; pode ocorrer desidratação, febre e anorexia. Porém, é comum a infecção se manter em estado subclínico e, em condições de estresse ou de imunodepressão, ocorrer reativação da eliminação de oocistos (FAYER; XIAO, 2008).

Várias espécies de animais domésticos e selvagens são parasitadas por espécies zoonóticas de *Cryptosporidium* e têm sido consideradas como reservatórios do protozoário e fonte de contaminação ambiental, constituindo um problema de saúde pública importante em todos os continentes (XIAO et al., 2000).

II REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

Cryptosporidium é um coccídio que foi descrito pela primeira vez por Ernest Edward Tyzzer em 1907, após observação de formas evolutivas nas glândulas gástricas de camundongos, sendo denominada *Cryptosporidium muris*. Em 1910, este mesmo pesquisador descreveu o ciclo de vida do parasita e das formas de desenvolvimento. Em 1912, Tyzzer também identificou oocistos menores que os de *C. muris* no intestino de camundongos e os nomeou como *Cryptosporidium parvum* (FAYER; XIAO, 2008).

Apesar de uma nova espécie, *Cryptosporidium meleagridis*, ter sido descrita no intestino de perus e associada com diarreia grave e mortalidade baixa em 1955, o interesse no estudo deste parasita manteve-se reduzido (SLAVIN, 1955). Somente em 1971, após ter sido evidenciada a associação de *Cryptosporidium* à diarreia em vitelos, foi que esse organismo passou a despertar interesse em medicina veterinária (PANCIERA et al., 1971). A partir de então vários casos provocados por este protozoário foram descritos em animais domésticos e silvestres (CASEMORE et al., 1985; CURRENT; GARCIA, 1991).

Os primeiros relatos de casos de criptosporidiose em humanos foram feitos alguns anos mais tarde, nos Estados Unidos, em 1976. Um caso foi observado em um paciente imunocomprometido que fazia tratamento para doença autoimune e, o outro, em uma criança de três anos de idade. Nos dois casos, os pacientes eram residentes em zona rural e mantinham contato com gado (MEISEL et al., 1976; NIME et al., 1976). Desde então, esse protozoário passou a ser pesquisado de maneira mais frequente.

A infecção por *Cryptosporidium* foi considerada rara em animais e, em humanos, foi descrita como uma infecção oportunista em indivíduos imunologicamente comprometidos até a década de 80. Entretanto, nas últimas décadas, *Cryptosporidium* tem sido considerado um importante agente etiológico de diarreia em pessoas imunocomprometidas e também em alguns animais domésticos e selvagens (ASHBOLT, 2004; SRÉTER; VARGA, 2000; XIAO et al., 2004). Além disso, a criptosporidiose foi reconhecida como uma grave enfermidade com disseminação hídrica, aliado ao fato da ausência de terapias eficazes e da dificuldade de prevenção da contaminação ambiental (DILLINGHAMA et al., 2002).

2.2 Taxonomia

O gênero *Cryptosporidium* pertence ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoea, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidiorida, Subordem Eimeriina e Família Cryptosporidiidae. Este gênero é constituído por protozoários coccídios que completam seu ciclo biológico na superfície de células epiteliais dos tratos gastrointestinal, respiratório e urinário, podendo infectar mamíferos, aves, peixes, répteis e anfíbios (LEVINE, 1984; XIAO; FAYER, 2008).

Já foram descritas 26 espécies de *Cryptosporidium* (Quadro 1) e mais de 60 genótipos têm sido mencionados em diferentes hospedeiros animais (ELWIN et al., 2012; FAYER, 2010; SHI et al., 2010). Devido à falta de informações sobre suas características biológicas e por apresentarem diferenças em sua composição genética, alguns desses genótipos ainda não foram classificados como novas espécies, apesar de apresentarem características morfológicas semelhantes às de espécies já descritas (XIAO et al., 2002).

Quadro 1 - Espécies de *Cryptosporidium* atualmente descritas

Espécie	Hospedeiro	Bibliografia
<i>C. andersoni</i>	Bovinos (A)	Lindsay et al. (2000)
<i>C. baileyi</i>	Aves (B, C, TR)	Current et al. (1986)
<i>C. bovis</i>	Bovinos (ID)	Fayer et al. (2005)
<i>C. canis</i>	Caninos (ID)	Fayer et al. (2001)
<i>C. cuniculus</i>	Coelhos (D)	Robinson et al. (2010)
<i>C. fayeri</i>	Canguru vermelho (<i>Macropus rufus</i>)	Ryan et al. (2008)
<i>C. felis</i>	Felinos (ID)	Iseki (1979)
<i>C. fragile</i>	Anfíbios (<i>Duttaphrynus melanostictus</i>) (E)	Jirků et al. (2008)
<i>C. galli</i>	Várias espécies de aves (P)	Pavlásek (1999); Ryan et al. (2003)
<i>C. hominis</i>	Humanos (ID)	Morgan-Ryan et al. (2002)
<i>C. macropodum</i>	Canguru gigante (<i>Macropus giganteus</i>)	Power e Ryan (2008)
<i>C. meleagridis</i>	Várias espécies de aves, homem (ID)	Slavin (1955)
<i>C. molnari</i>	Peixes (E)	Alvarez-Pellitero e Sitja-Bobadilla (2002)
<i>C. muris</i>	Roedores (E)	Tyzzer (1910)
<i>C. parvum</i>	Camundongo, bovinos, homem (ID)	Tyzzer (1912)
<i>C. ryanae</i>	Bovinos (D)	Fayer et al. (2008)
<i>C. saurophilum</i>	Lagartos (E, ID)	Koudela e Modrý (1998)
<i>C. serpentis</i>	Lagartos, serpentes (E)	Brownstein et al. (1977); Levine (1980)
<i>C. scophthalmi</i>	Peixes (E, ID)	Alvarez-Pellitero et al. (2004)
<i>C. suis</i>	Suínos (ID, IG)	Ryan et al. (2004)
<i>C. tyzzeri</i>	Camundongos (ID)	Ren et al. (2012)
<i>C. ubiquitum</i>	Ruminantes, homem (ID)	Fayer et al. (2010)
<i>C. varanii*</i>	Monitor esmeralda (<i>Varanus prasinus</i>)	Pavlásek et al. (1995)
<i>C. viatorum</i>	Humanos (D)	Elwin et al. (2012)
<i>C. wrairi</i>	Cobaio (<i>Cavia porcellus</i>) (ID)	Vetterling et al. (1971)
<i>C. xiaoi</i>	Ovinos (D)	Fayer e Santin (2009)

Principais sítios de infecção do parasito no hospedeiro: A-abomaso; B-bursa; C-cloaca; E-estômago; ID-intestino delgado; IG-intestino grosso; P-proventrículo; TR-trato respiratório; *D-Desconhecido. * Em substituição a *C. saurophilum*. (Fonte: Adaptado de XIAO; FAYER, 2008).

2.3 Ciclo biológico

O ciclo de vida dos parasitas do gênero *Cryptosporidium* é monoxeno, ou seja, todas as fases (sexuadas e assexuadas) se desenvolvem no mesmo hospedeiro, diferindo de outros coccídios que não possuem esta capacidade. Isso quer dizer que o ciclo de vida não necessita de um hospedeiro intermediário. O ciclo possui seis estágios de desenvolvimento no hospedeiro infectado: excitação dos oocistos, merogonia, gametogonia, fertilização, formação da parede dos oocistos e esporogonia (SMITH; ROSE, 1998; XIAO; CAMA, 2006) (Figura 1).

A eliminação de oocistos esporulados nas fezes ou secreções respiratórias do hospedeiro infectado é responsável pela contaminação ambiental e transmissão da doença. O hospedeiro susceptível se infecta ao ingerir oocistos presentes na água ou alimentos e, em menor escala, pela inalação. O oocisto é composto por quatro esporozoítos, haploides e possui uma parede de duas camadas, altamente resistente. Após a ingestão de oocistos, mediante ação do pH, enzimas pancreáticas e temperatura, há ruptura da parede do oocisto e liberação dos esporozoítos durante a excitação. Os esporozoítos liberados se aderem à superfície das células epiteliais do trato gastrointestinal e iniciam o processo de invasão dos enterócitos, onde são envolvidos pelas microvilosidades e formam um vacúolo parasitóforo (localização intracelular, mas extracitoplasmática), passando a designar-se trofozoíto (DUBEY et al., 1990; SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008).

Então, os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos e iniciam a fase seguinte correspondente à multiplicação assexuada ou merogonia. Os trofozoítos passam por três divisões nucleares e originam os merontes tipo I, que contêm seis a oito merozoítos haploides, ou merontes tipo II, com quatro

merozoítos. Os merozoítos tipo I podem originar novos merontes tipo I e possibilitar a reinfecção do animal, ou originar merontes tipo II e iniciar a fase sexual do ciclo ou gametogonia. Os merozoítos de segunda geração, ao infectarem novas células, se diferenciam em macrogamontes, que originarão o gameta feminino (macrogameta) ou em microgamontes, que originarão os gametas masculinos (microgametas) e iniciam o ciclo sexuado. Os microgametas irão fertilizar os macrogametas, formando o zigoto. Após a fertilização, o zigoto sofre duas divisões nucleares, denominada esporogonia, e origina o oocisto contendo quatro esporozoítos. Durante a esporogonia, os oocistos formados podem ser de parede espessa (80% deles), excretados nas fezes na forma esporulada (infectante), resistentes às condições ambientais, ou de parede delgada (cerca de 20%), que permanecem no hospedeiro e são responsáveis pela autoinfectação (XIAO; FAYER, 2008; SMITH et al., 2007). (Figura 1)

Os oocistos eliminados nas fezes dos hospedeiros infectados podem contaminar fontes de água e, com isso, atingir um grande número de animais e pessoas. Algumas características estão relacionadas ao potencial de infecção por *Cryptosporidium*, dentre eles: presença de grande quantidade de oocistos eliminadas nas fezes pelos hospedeiros infectados no ambiente, baixa especificidade por hospedeiros mamíferos, tamanho reduzido, parede espessa e baixa velocidade de sedimentação dos oocistos e capacidade alta de flutuação na água, baixa dose infectante (menos de 10 oocistos) e por serem eliminados esporulados, ou seja, na sua forma infectante, o que significa que a infecção pode ser imediata pelo novo hospedeiro (DILLINGHAMA et al., 2002; XIAO et al., 2004).

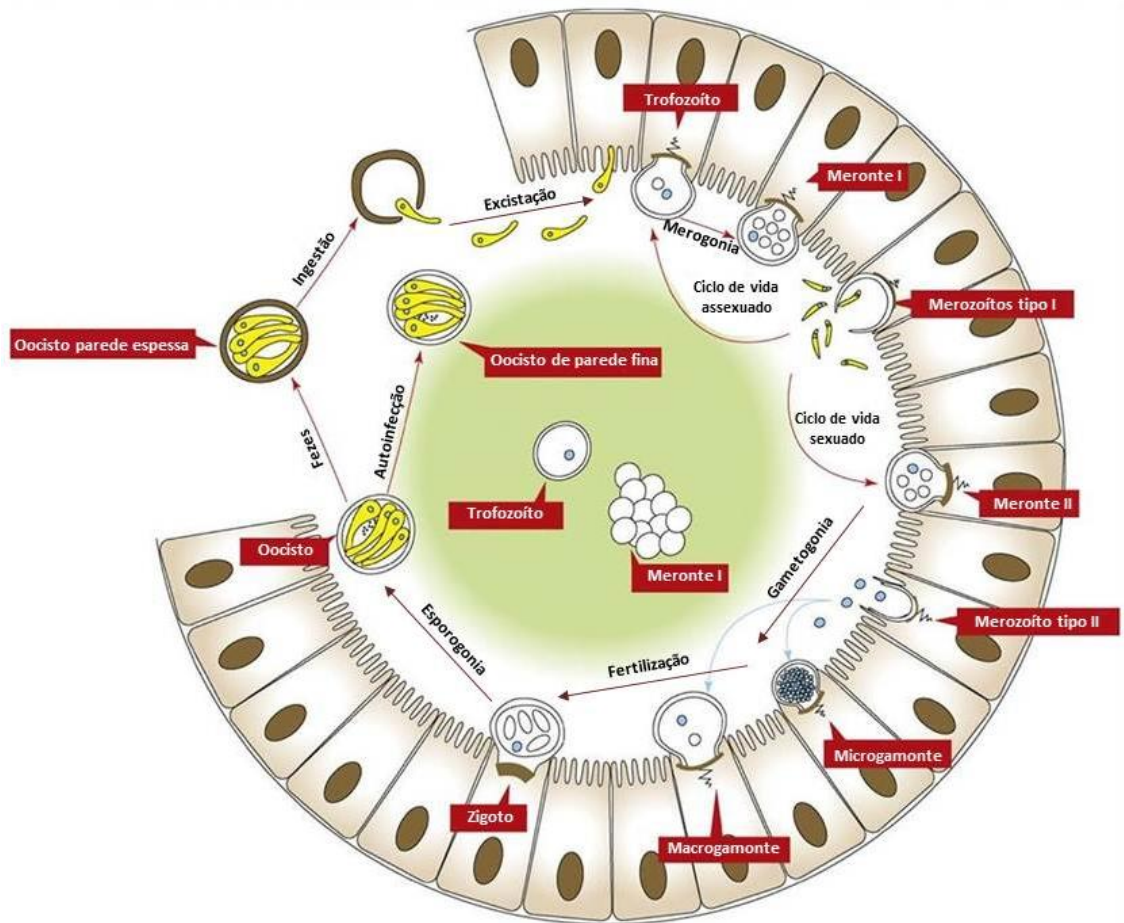


Figura 1 - Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. (Fonte: Adaptado de BARTA; THOMPSON, 2006)

2.4 Importância em Saúde Pública

A criptosporidiose está descrita em quase 100 países em seis continentes, com exceção da Antártica (XIAO; FAYER, 2008). Após o primeiro caso com transmissão pela água reconhecido, no Texas, quando mais de 2000 pessoas foram relatadas com gastroenterite causada por *Cryptosporidium*, este

protozoário foi reconhecido como patógeno humano e está sendo detectado em águas de todo o mundo (D'ANTONIO et al., 1985).

Cryptosporidium é considerado um patógeno emergente, porém o risco à saúde que ele representa, muitas vezes, é ignorado. Por isso, a Organização Mundial da Saúde (OMS) incluiu a criptosporidiose na lista das doenças negligenciadas (SAVIOLI et al., 2006). Apesar da importância que este protozoário representa para a saúde pública, o número de pessoas infectadas é subestimado e ainda não se tem uma estimativa verdadeira da prevalência anual, segundo o Centro de Controle de Doenças e Prevenção (YODER et al., 2012).

Existem inúmeras razões pelas quais se subestimem os valores reais dos casos de criptosporidiose humana como o fato de não ser uma doença de notificação obrigatória, deficiência da notificação dos casos confirmados aos órgãos responsáveis, deficiência na procura por assistência médica, falta de informação dos médicos, ausência de requisição de exames de fezes, técnicas de diagnóstico impróprias, infecções assintomáticas, dentre outras (DIETZ et al., 2000).

Os surtos de criptosporidiose em humanos são relatados por todo o mundo e, como o protozoário é um organismo ubíquo, apresenta grande número de reservatórios e é altamente infeccioso, o risco de qualquer pessoa se infectar é alto. As pessoas que têm maior risco de infecção são aquelas que mantêm contato com animais e/ou pessoas infectados, que ingerem água não tratada, viajam para países de condições sanitárias deficientes e pessoas sem boas condições higiênicas (YODER; BEACH, 2007). Além disso, as características do oocisto e de sua eliminação favorecem a contaminação do ambiente e infecção de outros hospedeiros (XIAO et al., 2004).

Um dos surtos mais significativos aconteceu nos Estados Unidos, em 1993, quando mais de 400 mil pessoas foram contaminadas por *Cypstorporidium* (mais tarde identificado como *C. hominis*) por meio de água

contaminada com esgoto. Estes surtos além de representar riscos à saúde, também interferem na economia devido aos custos médicos e perda da produtividade (MACKENZIE et al., 1994).

Nas últimas três décadas, 524 surtos de enfermidades transmitidas pela água foram reportados no mundo, destacando-se aqueles compreendidos no período entre 1984 e 2004 e outro entre 2004 e 2010, em que um dos principais agentes etiológicos foi *Cryptosporidium* spp. (BALDURSSON; KARANIS, 2011; KARANIS et al., 2007).

A infecção em seres humanos comumente é causada por *C. hominis* e *C. parvum*. No entanto, há relatos de infecção por *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. felis*, *C. ubiquitum*, *C. fayeri*, *C. muris*, *C. andersoni*, *C. suis*, *C. tyzzeri*, *C. cuniculus* e *C. viatorum* em humanos, o que demonstra que animais domésticos e selvagens podem atuar como reservatórios e representar fontes de infecção deste parasito para o homem, favorecendo a contaminação de fontes de água, alimentos ou transmitindo por contato direto (CHALMERS et al., 2009; ELWIN et al., 2012; FAYER, 2010; ROBINSON et al., 2010).

Em países em desenvolvimento, o protozoário representa causa de morbidade e mortalidade em crianças de zero a cinco anos de idade e em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (AJJAMPUR et al., 2010; ASHBOLT, 2004; CREEK et al., 2010; GATEI et al., 2003; KOTLOFF et al., 2013; LEAV et al., 2003; OSHIRO et al., 2000).

Infecções por *Cryptosporidium* em humanos podem ser assintomáticas ou resultar em doença clínica, principalmente, na forma de diarreia que pode durar até três semanas, embora seja autolimitante em pessoas saudáveis. Entretanto, enfermidade prolongada pode ser fatal em pacientes imunocomprometidos (BARALDI et al., 1999; HUNTER; NICHOLS, 2002; SAUDA et al., 1993; TALI et al., 2011) e em crianças está associada a episódios de diarreia prolongada, levando à má absorção e diminuição do crescimento (AGNEW et al., 1998).

A ocorrência de infecção por *Cryptosporidium* spp. em crianças tem sido relatada por diversos autores (MASCARINI; DONALISIO, 2006; NAIR et al., 2008; OSHIRO et al., 2000). As crianças apresentam imaturidade do sistema imunológico, estão na fase de exploração, possuem hábitos de higiene ainda em formação e constantemente entram em contato com o solo (FRANCO; CORDEIRO, 1996; OSTERHOLM et al., 1992). Por isso, *Cryptosporidium* ainda é um dos principais agentes de diarreia infecciosa que constitui importante causa de morbimortalidade em crianças abaixo de cinco anos de idade, sendo responsável por cerca de 1,5 milhão de mortes anualmente, principalmente em países subdesenvolvidos (UNICEF, 2008).

Em 2008, um surto em humanos causado por *C. cuniculus* foi relacionado ao consumo de água da torneira contaminada por fezes de coelho na Inglaterra (CHALMERS et al., 2009). Além disso, nos últimos anos houve um aumento no número de casos de criptosporidiose relatado nos Estados Unidos (YODER et al., 2012), na Holanda, Reino Unido e Alemanha (FOURNET et al., 2013), confirmando que *Cryptosporidium* spp. está cada vez mais reconhecido como protozoário importante em saúde pública (DESAI et al., 2012).

2.5 Infecção em roedores

Os roedores têm sido considerados reservatórios de *Cryptosporidium* para diversos animais, incluindo humanos, por serem ubíquos e abundantes. Segundo estudos anteriores baseados apenas na morfologia dos oocistos, roedores silvestres foram identificados com oocistos semelhantes à *Cryptosporidium parvum* e *C. muris*, mostrando que roedores podem servir de hospedeiros para estas espécies (BAJER et al., 2003).

Aproximadamente 40 espécies de roedores, pertencentes a 11 famílias, já foram relatadas como hospedeiros de *Cryptosporidium* (FENG, 2010). Alguns exemplos de roedores infectados por *Cryptosporidium* são: porquinho-da-índia, chinchila, capivara, *hamster*, ratos e esquilos (LV et al., 2009). Em relação às espécies de *Cryptosporidium* que foram identificadas em roedores, há relatos de cinco espécies e cerca de 20 genótipos. Entre elas: *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. andersoni*, *Cryptosporidium* genótipo cervídeo, *Cryptosporidium* genótipo chipmunk e *Cryptosporidium* genótipo skunk. Todas essas espécies já foram descritas causando infecção em humanos (XIAO; FAYER, 2008). Outras espécies de *Cryptosporidium* relatadas em roedores foram: *C. wairi*, *Cryptosporidium* genótipo furão, *Cryptosporidium* genótipo de gambá, *Cryptosporidium* genótipo de camundongo I e II, *Cryptosporidium* genótipo de esquilo III e subtipo de *C. parvum* (FOO et al., 2007; LV et al., 2009; MEIRELES et al., 2007)

A maioria dos registros em roedores se refere à enfermidade assintomática (FAYER; XIAO, 2008), como relatado em infecções pelo genótipo furão de *Cryptosporidium* em furões e vison (*Mustela vison*) (ABE; ISEKI, 2003; GÓMEZ-COUSO et al., 2007) e também em infecção por *Cryptosporidium* sp. em roedores selvagens (FAYER; XIAO, 2008).

Oocistos morfologicamente semelhantes aos de *Cryptosporidium muris* foram encontrados em esquilos da Sibéria e utilizados em infecção experimental em camundongos. Foi observada ausência de sinais clínicos tanto nos esquilos como nos camundongos experimentalmente infectados (HURKOVA et al., 2003). Outros relatos de *Cryptosporidium* em esquilos foram feitos na China (MATSUI et al., 2000), em Nova York (PERZ; LeBLANCK, 2001), na Califórnia (ATWILL et al., 2001) e nos Alpes italianos (BERTOLINO et al., 2003). A presença de oocistos em amostras fecais também foi detectada em castores europeus (SINSKY et al., 1998) e castores da América do Norte (FAYER et al., 2006).

2.6 Infecção em coelhos

Após a primeira descrição de *Cryptosporidium* em coelhos em 1912, o protozoário já foi relatado em coelhos de fazenda, laboratório, domésticos e selvagens (ROBINSON; CHALMERS, 2010).

Inman e Takeuchi (1979) descreveram no trato intestinal de um coelho assintomático, um isolado de *Cryptosporidium* que foi denominado, mais tarde, *Cryptosporidium cuniculus* e considerado como hospedeiro específico. Na mesma época, Rehg et al. (1979) também observaram esta mesma espécie na luz intestinal de coelhos aparentemente saudáveis. Os riscos da infecção podem estar relacionados com a idade, sendo que podem ser relatadas fezes diarreicas, alta contagem de oocistos presentes nas fezes e alta mortalidade em recém-nascidos e em coelhos de 30 a 40 dias (ROBINSON et al., 2010).

Estima-se que 5% dos coelhos selvagens estejam infectados com *Cryptosporidium*, especialmente *C. cuniculus*, porém tanto os coelhos selvagens como os domésticos são uma fonte potencial de criptosporidiose humana, sabendo-se que os seres humanos e os coelhos são os únicos hospedeiros conhecidos desta espécie. Além de *C. cuniculus*, os coelhos podem se infectar com *C. parvum* e *C. meleagridis*, todas as espécies consideradas patógenos humanos (DUSZYNSKI; COUCH, 2013).

2.7 Diagnóstico

A identificação de *Cryptosporidium* pode ser feita por análise morfológica dos oocistos e características biológicas tais como especificidade por hospedeiro, período pré-patente e patente, patogenicidade e intensidade de

excreção dos oocistos, assim como podem ser utilizadas técnicas moleculares e imunológicas. Cada método possui uma finalidade específica e apresenta suas vantagens e desvantagens. Se a intenção é apenas saber se *Cryptosporidium* está presente, então exames parasitológicos de fezes e colorações especiais são suficientes. Mas se o objetivo é determinar a espécie de *Cryptosporidium* envolvida, o uso de técnicas moleculares torna-se necessário. Quando o objetivo é determinar se o hospedeiro foi exposto ao protozoário, então, os métodos sorológicos podem ser utilizados para este propósito.

2.7.1 Diagnóstico microscópico

Para o diagnóstico correto visando a detecção de oocistos de *Cryptosporidium*, a experiência é fundamental, visto que estes, assim como outros estágios de desenvolvimento deste gênero estão entre os menores dentre os coccídios. Além disso, os oocistos são muito similares às leveduras tanto em tamanho quanto em forma, o que pode levar a um diagnóstico falso-positivo (XIAO et al., 2004).

A definição da espécie não é possível somente pela análise morfológica ou morfométrica, uma vez que os oocistos são muito semelhantes entre as diferentes espécies, com uma pequena variação morfológica ou são até mesmo idênticos. Possuem tamanho reduzido (4-8 μm), sem esporocistos e são de difícil visualização (FAYER et al., 2000).

Existem inúmeras técnicas usadas para a concentração e posterior detecção de oocistos a partir de amostras fecais. Dentre elas estão: métodos de concentração de oocistos em fezes com formol-éter ou Ritchie, Sheather,

separação por gradientes de Percoll, gradientes de céσιο, sulfato de zinco ou Larsh, separação imunomagnética, entre outros (FAYER et al., 2000).

Também pode ser feita a recuperação de oocistos em amostras de água ou esgoto, primeiramente, fazendo uma concentração para recuperar os oocistos e depois purificação. A concentração pode ser feita por dissolução da membrana filtrante, filtro cartucho, precipitado de carbonato de cálcio ou centrifugação em fluxo contínuo. A purificação pode ser feita por flotação em gradiente de Percoll-sucrose ou separação imunomagnética (FAYER et al., 2000).

A visualização dos oocistos pode ser feita, após métodos de concentração prévios de água ou fezes, através da coloração Ziehl-Neelsen, Giemsa, método auramina-fenol/fucsina, verde Malaquita, Kinyoun, Koster, Kohn, coloração ácido-resistente com tricromo, dimetil sulfóxido (DMSO) com carbol-fucsina, safranina, auramina O-fenol ou azul de metileno (FAYER et al., 2000; JEX et al., 2008).

As técnicas de coloração também podem ser utilizadas para detecção dos oocistos em tecidos de material de autopsia ou biopsia. A mais utilizada é a coloração de cortes histológicos por hematoxilina-eosina (HE). Outras técnicas utilizadas são colorações à base de prata, ácido periódico de Schiff ou Giemsa. Nos cortes histológicos, os estágios evolutivos são identificados dentro de vacúolos parasitóforos, visualizados como corpos esféricos, de 2 a 7,5 µm, localizados na superfície das células epiteliais (CHALMERS; DAVIES, 2010).

2.7.2 Diagnóstico imunológico

Os métodos imunológicos possuem melhor sensibilidade e especificidade se comparados com outras técnicas mais tradicionais de

coloração, reduzindo tempo de trabalho com a detecção dos oocistos (JOHNSTON et al., 2003).

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

Apesar de oferecerem algumas vantagens para o diagnóstico da criptosporidiose em relação à microscopia como testes rápidos, simples, sensíveis e específicos, os métodos imunológicos não permitem a identificação de espécies ou genótipos de *Cryptosporidium* envolvidos na infecção (JEX et al., 2008).

2.7.3 Diagnóstico molecular

A diferenciação entre as espécies de *Cryptosporidium* por meio de coloração ou por métodos imunológicos não é possível. Sendo assim, as técnicas moleculares são os únicos meios de diferenciação confiáveis entre as espécies. As técnicas baseadas em biologia molecular incluem reação em cadeia de polimerase (PCR), *nested* PCR, PCR em tempo real, técnica de polimorfismo do comprimento dos fragmentos por enzimas de restrição (RFLP) e/ou sequenciamento automático de ácidos nucleicos. Entretanto, devido ao custo elevado em relação aos outros métodos de identificação morfológica, essas técnicas não são rotineiramente utilizadas em laboratórios de diagnóstico, apesar de serem caracterizadas por alta sensibilidade e especificidade (JEX et al., 2008).

A PCR e suas variantes, seguida de RFLP ou de sequenciamento dos fragmentos amplificados são as técnicas geralmente mais realizadas para caracterização molecular de *Cryptosporidium*. O gene da subunidade 18S do RNA ribossômico (18S rRNA ou SSU rRNA) é o *locus* mais utilizado pelo fato de possuir cinco cópias por genoma, apresentar evolução mais lenta e, conseqüentemente, possuir baixo polimorfismo, sendo, portanto, o gene de escolha para amostras de animais que podem estar infectados por genótipos ou espécies ainda sem classificação (XIAO et al., 2000).

Outros *locus* também utilizados, porém com maior polimorfismo, são os genes da actina, proteína do choque térmico resistente ao calor de 70kDa (HSP70), proteína da parede do oocisto (COWP) e gene codificante da glicoproteína 60kDa (GP60). Estes *locus* são importantes na análise genética de espécies ou genótipos similares por apresentarem alto polimorfismo interespecies (XIAO et al., 2004).

Entre os métodos moleculares, a PCR destaca-se quando há baixa quantidade de oocistos nas amostras de fezes, tecidos, água ou outros tipos de materiais como, por exemplo, a bile colhida durante endoscopia. Esta técnica permite amplificar uma única molécula de DNA milhares de vezes, melhorando a sensibilidade de detecção. Devido a esta maior sensibilidade, a PCR é usada em amostras clínicas e ambientais, além de permitir diferenciar as espécies e genótipos de *Cryptosporidium* (CHALMERS; DAVIES, 2010).

Apesar da PCR ser sensível, ainda há algumas limitações como resultados falso-positivos devido à contaminação laboratorial ou detecção de ácidos nucleicos livres de micro-organismos não viáveis que podem interferir com os ensaios qualitativos e/ou quantitativos (FAYER et al., 2000). Já a *nested* PCR é um método mais sensível e específico, pois utiliza duas reações de PCR, sendo que a segunda utiliza um par de oligonucleotídeos de seqüências internas do segmento amplificado na primeira reação (HUBER, 2007).

Outra técnica que vem se destacando é a PCR em tempo real em que permite o diagnóstico por meio da amplificação e detecção dos fragmentos de DNA em tempo real. Este método molecular reduz o tempo de análise e dos riscos de contaminação já que não requer a visualização dos produtos de PCR após eletroforese, uma etapa necessária em outras variantes da PCR. Outra vantagem é sua alta especificidade, quando se utiliza uma sonda fluorescente, que juntamente com os oligonucleotídeos vão se ligar ao alvo de forma mais específica. Essa técnica tem sido utilizada com sucesso para o diagnóstico clínico e se tornou uma ferramenta valiosa para estudos epidemiológicos tanto em humanos quanto em animais (DE WAELE et al., 2011; HADFIELD et al., 2011).

2.8 Tratamento

A criptosporidiose tende a apresentar cura espontânea nos pacientes imunocompetentes, exceto em casos mais agudos em que é necessário tratamento sintomático para desequilíbrio hidroeletrolítico. Entretanto, em pacientes imunocomprometidos, os sintomas tendem a se estender em decorrência da manutenção do parasitismo intestinal. Não existe terapêutica eficaz para o tratamento da doença, embora inúmeras drogas tenham sido testadas (BENSON et al., 2004).

O tratamento, então, é sintomático com fármacos antidiarreicos que permitem diminuir a frequência e o volume das diarreias líquidas. Além disso, pode ser necessário repor a perda de líquidos e eletrólitos através da administração de soluções contendo potássio, bicarbonato de sódio, fósforo, magnésio e glucose, por via oral ou intravenosa (BENSON et al., 2004).

Mais de 150 fármacos têm sido testados contra os protozoários do gênero *Cryptosporidium* sem sucesso nos últimos anos, apesar de

apresentarem ação contra outros coccídios. Porém, alguns destes fármacos apresentaram-se eficientes na melhoria dos sintomas e na quantidade de oocistos eliminados (ARMSON et al., 2003; BENSON et al., 2004).

O tratamento com antirretroviral em pacientes com AIDS mostrou melhora dos sintomas e redução da excreção dos oocistos. Paramomicina, azitromicina, furazolidona, diclazuril, colostro de bovino hiperimune, entre outros, podem melhorar os sintomas nos doentes imunocomprometidos (TZIPORI; WARD, 2002).

A paramomicina, um antibacteriano, foi um dos primeiros fármacos a demonstrar efeito terapêutico contra o protozoário. Estudos realizados em modelo animal mostraram que a droga foi eficaz no tratamento da doença quando administrado em doses elevadas. Porém, essa mesma droga utilizada em pacientes infectados por HIV possuiu eficácia reduzida ou nula (ARMSON et al., 2003; BENSON et al., 2004).

A espiramicina, em certos casos, pode controlar a sintomatologia e alguns autores referem resultados positivos com o uso da paramomicina em pacientes que não respondem à espiramicina (WHITE et al., 1994). Outras pesquisas mostram que a administração de paramomicina associada com outros antibióticos, como azitromicina, ou antirretrovíricos, podem potencializar o efeito e apresentar maior eficácia no tratamento (SMITH et al., 1998; HOMMER et al., 2003). A roxitromicina também mostrou resultado positivo e cura em 68% dos pacientes tratados (UIP, et al., 1998).

O ácido aurintricarboxílico apresentou diminuição na infecciosidade e viabilidade de *C. parvum* quando testado em camundongos, sem efeitos negativos aos animais (KLEIN et al., 2008). A curcumina e a miltefosina também apresentaram diminuição na infecciosidade e invasão das células do hospedeiro pelos esporozoítos, inibindo o desenvolvimento de *C. parvum in vitro* (SHAHIDUZZAMAN et al., 2009)

A nitazoxanida é um fármaco de amplo espectro de ação, eficaz contra helmintos, bactérias e outros protozoários. Em pacientes com criptosporidiose, verificou-se melhora dos sintomas gastrintestinais como diminuição da diarreia aquosa, dores abdominais e vômitos, melhora do estado geral e diminuição da excreção dos oocistos (ROSSIGNOL, 2006).

Em animais, o uso de antiprotozoários e antimicrobianos têm sido utilizados sem sucesso no tratamento contra a criptosporidiose. Drogas como o decoquinato e a paramomicina diminuem a excreção de oocistos e melhoram os sinais clínicos. O lactato de halofuginona, um anticoccídeo utilizado em aves, teve seu uso descrito em bovinos e demonstrou eficácia na diminuição da severidade dos sinais clínicos e da excreção dos oocistos (TZIPORI; WARD, 2002; MARTINS et al., 2007)

2.9 Controle e prevenção

A prevenção é a forma mais eficaz para controlar a criptosporidiose. As medidas para prevenir e limitar a propagação dos oocistos de *Cryptosporidium* devem ser direcionadas a fim de reduzir a eliminação dos oocistos bem como evitar sua dispersão no ambiente. Este é um objetivo difícil de ser cumprido por se tratar de um protozoário ubiqüitário resistente às condições ambientais e a maioria dos desinfetantes (FAYER; XIAO, 2008).

Como a água é a principal fonte de contaminação de *Cryptosporidium*, as medidas de prevenção devem incluir técnicas de tratamento adequado na rede pública de abastecimento da água assim como tratamento de água potável e também água de piscinas. Os métodos químicos e físicos de tratamento da água de consumo incluem coagulação, floculação, sedimentação, filtração e cloração. Entretanto, estes métodos têm se mostrado algumas vezes ineficientes na remoção e/ou inativação dos oocistos de

Cryptosporidium (ROSE et al., 2002). Os oocistos, de tamanho reduzido (4-8 μm), são menores que os orifícios dos filtros convencionais, dificultando a remoção física da água. Além disso, os desinfetantes mais comumente utilizados nos tratamentos das águas de abastecimentos e de recreio, mesmo em altas concentrações e por períodos longos, como o cloro e a monocloramina, não estão sendo tão eficazes. Como alternativas promissoras, outros compostos têm sido utilizados como o dióxido de cloro, a amônia e o óxido de etileno, entretanto, apresentam toxicidade relevante constituindo um entrave à sua utilização. Outras opções estudadas são a desinfecção com ozônio ou irradiação com luz ultravioleta (UV), que agem no DNA genômico, inativando-o (BETANCOURT; ROSE, 2004).

Os oocistos presentes no ambiente podem sobreviver entre temperaturas entre 4°C e 22°C, em água, mas são sensíveis ao congelamento, às altas temperaturas e à dessecação (FUJINO et al., 2002; POKORNY et al., 2002). Com o aumento da temperatura, pode ocorrer desnaturação das proteínas da parede do oocisto e, assim, os esporozoítos ficam expostos às condições ambientais prejudiciais, diminuindo sua capacidade infectante e viabilidade. O congelamento rápido também inativa os oocistos se comparados com o congelamento lento, condição encontrada naturalmente no ambiente. Os oocistos podem permanecer viáveis por seis dias a uma temperatura de 22°C negativos. Entretanto, em congelação rápida de 70°C negativos, os oocistos não sobrevivem (FAYER; NERAD, 1996; ROBERTSON et al., 1992).

Outras formas de reduzir os riscos de transmissão da criptosporidiose no ambiente incluem diminuir a densidade dos animais no mesmo espaço, isolar os animais doentes, separar os jovens dos adultos, tratar os estrumes dos animais antes de usar como fertilizantes de solo, além de boas práticas higiênico-sanitárias que são fundamentais (RAMIREZ et al., 2004).

Como as opções de tratamento são limitadas, os riscos de contaminação devem ser reduzidos tomando-se alguns cuidados básicos de higiene como

lavar as mãos com água e sabão antes de preparar alimentos ou comer, lavar frutas e verduras antes do consumo com água potável, fazer o tratamento adequado de água não potável, lavar as mãos após usar o banheiro, cuidar de pessoas com diarreia, trocar fraldas e após contato com animais, entre outras precauções visando prevenir e controlar a criptosporidiose (CHALMERS; DAVIES, 2010).

OBJETIVOS

Com a crescente utilização de *hamsters*, coelhos, furões, porquinhos-da-índia e chinchilas como animais de companhia, têm-se discutido seu potencial como reservatórios e veiculadores de parasitoses que acometem humanos, principalmente crianças. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi determinar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de animais exóticos criados como animais de companhia e realizar a classificação molecular para determinação da espécie ou genótipo do protozoário nas amostras positivas.

III MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras fecais

Foram colhidas 386 amostras no total sendo elas: 186 amostras de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), 78 de chinchila (*Chinchilla lanigera*), 52 de hamsters (*Mesocricetus auratus* e *Cricetulus griseus*), 33 de porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*), 22 de furões (*Mustela putorius*) e 15 de camundongos (*Mus musculus*), de diferentes idades e aparentemente saudáveis, sem histórico de doença anterior. As amostras, constituídas por aproximadamente 3 gramas de fezes, foram colhidas em criatórios comerciais, *pet shops*, clínicas veterinárias e em residências, em algumas cidades do estado de São Paulo, Brasil, de acordo com a disponibilidade, em uma amostragem de conveniência estipulada anteriormente de aproximadamente 350 amostras.

As amostras foram armazenadas a 4°C, em recipientes de plástico de 50 mL, em solução de bicromato de potássio 2,5% (concentração final), e submetidas à purificação pela técnica de centrífugo-sedimentação em água/éter (MELONI; THOMPSON, 1996).

3.2 Extração de DNA genômico

A extração de DNA foi realizada com utilização do “QIAamp® DNA Stool Mini Kit” (Qiagen), de acordo com protocolo sugerido pelo fabricante, após passo inicial de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em *termomixer* por 95°C, por 5x, em tampão ASL.

3.3 Nested PCR para amplificação de fragmento da subunidade 18S do gene do RNA ribossômico de *Cryptosporidium* spp.

A nested PCR foi realizada nas 386 amostras para determinar a espécie ou genótipo de *Cryptosporidium* presente nos animais. Desse modo, foi feita a amplificação de fragmentos do gene da subunidade 18S do RNA ribossômico utilizando os oligonucleotídeos 5' TTCTAGAGCTAATACATGCG 3' e 5' CCCATTCCTTCGAAACAGGA 3', para a reação primária (~1325 pb) e 5' GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG 3' e 5' AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA 3' para a reação secundária (826-840 pb) (XIAO et al., 2000), nas seguintes condições de reação: preparação de 25µL de solução contendo 2,5µL de tampão para PCR 1x 2,5mM MgCl₂, 1U de Taq DNA polimerase, 200µM de cada desoxiribonucleotídeo, 200nM de cada oligonucleotídeo e 2,5µL de DNA alvo, tanto para reação primária quanto para secundária.

Tabela 1 – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso utilizados nas reações de PCR (XIAO et al., 2000)

Oligonucleotídeos	Sequência (5' → 3')	Tamanho do produto (pb)
Senso	TTCTAGAGCTAATACATGCG	1325
Anti-senso	CCCATTCCTTCGAAACAGGA	
Senso	GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG	826-840
Anti-senso	AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA	

As amostras foram submetidas à desnaturação inicial a 94°C por três minutos, seguida de 34 ciclos, cada um constituindo em desnaturação a 94°C por 45 segundos, 45 segundos de anelamento a 55°C e 60 segundos de extensão a 72°C, com extensão final a 72°C por sete minutos.

A identificação dos produtos das reações foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, aplicando-se uma voltagem de 100 por 40 minutos. Após a eletroforese, o gel de agarose corado com brometo de etídio foi visualizado em um transluminador e as amostras positivas apresentaram tamanho entre 826 e 840 pares de bases.

3.4 Sequenciamento dos fragmentos amplificados

Os fragmentos resultantes da *nested* PCR foram purificados utilizando-se o “QIAquick® Gel Extraction kit” (Qiagen) e submetidos ao sequenciamento bidirecional no Centro de Sequenciamento e Genômica Funcional da UNESP, Campus de Jaboticabal, utilizando o “ABI Prism® Dye Terminator 3.1” (Applied Biosystems), em sequenciador automático ABI 3730XL (Applied Biosystems).

3.5 Alinhamento e tradução das sequências de nucleotídeos e edição final

A determinação da sequência consenso foi realizada por meio do *software* Codoncode Aligner v. 1.5.2. (CodonCode Corp., Dedham, Massachusetts, USA). Somente foram considerados nucleotídeos com valores de qualidade de sequenciamento maior ou igual a 20. Após determinação da sequência consenso dos fragmentos amplificados por PCR, estas foram alinhadas com auxílio dos programas Clustal W (THOMPSON et al., 1997) e

“BioEdit® Sequence Alignment Editor” (HALL, 1999), tomando-se como base sequências homólogas disponíveis no GenBank.

IV RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 386 amostras submetidas à *nested* PCR, 44 (11,40%) amostras foram consideradas positivas para *Cryptosporidium* spp. Dentre elas, 25 (56,82%) foram de coelhos, seis (13,64%) de *hamsters*, cinco (11,36%) de chinchilas, quatro (9,09%) de porquinhos-da-índia e quatro (9,09%) de camundongos. Todas as amostras de furões foram negativas pela *nested* PCR. A maior ocorrência encontrada foi em camundongos, sendo que das 15 amostras, quatro foram positivas e possibilitaram sequenciamento. A ocorrência em coelhos foi de 13,44% (25/186), seguida dos porquinhos-da-índia com 12,12% (4/33), *hamsters* 11,54% (6/52) e chinchilas 6,41% (5/78) (Tabela 2).

Das 44 amostras positivas, somente 10 resultaram em amplificação de DNA em quantidade suficiente para possibilitar o sequenciamento do fragmento amplificado, o que permitiu a identificação de *Cryptosporidium tyzzeri* em camundongos, *Cryptosporidium muris* em camundongos, *hamsters* e chinchila, *Cryptosporidium parvum* em chinchila e *Cryptosporidium* spp. em porquinho-da-índia (Tabela 2).

A *nested* PCR utilizada neste trabalho permite apenas a identificação do gênero *Cryptosporidium*; a determinação da espécie do protozoário só é possível após sequenciamento dos fragmentos amplificados. A amplificação de pequena quantidade de DNA, após a realização de *nested* PCR para *Cryptosporidium* spp., é comumente devida à presença de inibidores da reação da taq DNA polimerase em DNA extraído das amostras fecais ou à presença de pequena quantidade de oocistos nas amostras fecais. Como a técnica de

extração de DNA utilizada é específica para amostras fecais e promove a remoção da maioria dos agentes inibidores da taq DNA polimerase, o mais provável é que nessas amostras havia pequena quantidade de oocistos.

Tabela 2 - Resultado da *nested* PCR e identificação molecular de *Cryptosporidium* spp. em animais exóticos de companhia no Brasil

Hospedeiro	Nº de amostras	Nº de amostras positivas (%)	Espécie de <i>Cryptosporidium</i>
Camundongo	15	4 (26,67%)	<i>C. tyzzeri</i> (3)* <i>C. muris</i> (1)*
Coelho	186	25 (13,44%)	-
Porquinho-da-índia	33	4 (12,12%)	<i>Cryptosporidium</i> sp. (1)*
Hamster	52	6 (11,54%)	<i>C. muris</i> (3)*
Chinchila	78	5 (6,41%)	<i>C. parvum</i> (1)* <i>C. muris</i> (1)*
Furão	22	0	-
TOTAL	386	44 (11,40%)	10

*Número de amostras identificadas pelo sequenciamento

Embora *Cryptosporidium muris* já tenha sido identificado em muitos roedores como ratos, ratazanas, camundongos, *hamsters* e esquilos, além de aves e mamíferos, incluindo humanos (FENG, 2010; FENG et al 2011; GATEI et al., 2006; KVAC et al., 2008; LUPO et al., 2008; MUTHUSAMY et al., 2006; NG et al., 2006; PALMER et al., 2003; STURDEE et al, 1999), este é o primeiro relato de *C. muris* em chinchilas, alertando para a possibilidade desta espécie também ser potencial reservatório e fonte de infecção para o homem.

Não há muitas pesquisas relacionadas à criptosporidiose em chinchilas e estudos anteriores não detectaram este protozoário tanto no Brasil quanto em outros países (GURGEL et al., 2005; LV et al., 2009). Entretanto, este protozoário foi identificado em 6,41% dos animais desta espécie analisados, sendo que duas amostras permitiram a identificação de *C. parvum* e *C. muris* no presente estudo. *C. parvum* é uma das principais espécies que acometem os humanos (FAYER, 2004) e a veiculação hídrica pode atingir facilmente um grande contingente da população, podendo provocar inúmeros surtos (YODER et al., 2012). Assim, seria importante o desenvolvimento de novos estudos para esclarecer se chinchilas são uma fonte de infecção importante de *C. parvum*.

Neste trabalho *C. tyzzeri* foi identificado em camundongos. Esta espécie foi anteriormente denominada *Cryptosporidium* genótipo I de camundongos e foi classificada recentemente por Ren et al. (2012). Em humanos, *C. tyzzeri* foi encontrado em uma criança no Kuwaiti (SULAIMAN et al., 2005) e em uma mulher com caso grave de criptosporidiose causada por *C. tyzzeri* e *C. parvum*, provavelmente transmitida por roedores selvagens, demonstrando que *C. tyzzeri* possui vários hospedeiros e também representa potencial zoonótico (RASKOVÁ et al., 2013).

Cryptosporidium wrairi, espécie até então descrita causando infecção apenas em porquinho-da-índia, sugerindo alta especificidade para esse hospedeiro, não foi observado neste trabalho. Em um estudo realizado no Brasil, a análise filogenética realizada de amostras de porquinhos-da-índia

mostrou um genótipo de *Cryptosporidium* ainda não descrito (HUBER et al., 2007), que apresenta sequencia de nucleotídeos similar à descrita neste experimento.

Coelhos podem se infectar por *C. parvum*, *C. meleagridis* e *C. cuniculus*. Todas estas espécies já foram descritas em humanos e apresentam importância em saúde pública. Como *C. cuniculus* foi descoberto recentemente como um importante agente etiológico de enfermidade clínica em humanos (CHALMERS et al., 2009; MOLLOY et al., 2010; ROBINSON et al., 2008), e há raros estudos relacionados a este parasito, seria importante identificar os isolados deste experimento em nível de espécie, e não somente de gênero, o que, infelizmente não foi possível devido à quantidade insuficiente de DNA para sequenciamento.

No presente estudo não se detectou *Cryptosporidium* spp em nenhuma das amostras de furão, embora *Cryptosporidium* genótipo furão seja encontrado em furões e esquilos vermelhos (*Sciurus vulgaris*) (KVAC et al., 2008; XIAO et al., 1999; REHG et al., 1988) e *Cryptosporidium parvum* tenha sido identificado no Japão em furões assintomáticos (ABE; ISEKI, 2003).

A ocorrência de infecção por *Cryptosporidium* spp. em crianças tem sido relatada por diversos autores (MASCARINI; DONALISIO, 2006; NAIR et al., 2008; OSHIRO et al., 2000). As crianças apresentam imaturidade do sistema imunológico, estão na fase de exploração, possuem hábitos de higiene ainda em formação e constantemente entram em contato com o solo (FRANCO; CORDEIRO, 1996; OSTERHOLM et al., 1992), além do contato com animais de estimação. Por isso, *Cryptosporidium* ainda é um dos principais agentes de diarreia infecciosa que constitui importante causa de morbimortalidade em crianças abaixo de cinco anos de idade, sendo responsável por cerca de 1,5 milhão de mortes anualmente, principalmente em países subdesenvolvidos (UNICEF, 2008). Com a crescente utilização dos animais exóticos como animais de estimação, é importante estudar seu potencial zoonótico.

V CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostram que há uma variedade de espécies de *Cryptosporidium* spp. presentes em animais exóticos de companhia no Brasil, o que sugere que animais exóticos de estimação podem apresentar potencial zoonótico e participar da epidemiologia da criptosporidiose humana.

REFERÊNCIAS

ABE, N.; ISEKI, M. Identification of genotypes of *Cryptosporidium parvum* isolates from ferrets in Japan. **Parasitology Research**, v.89, p.422-424, 2003.

AGNEW, D.G.; LIMA, A.A.M.; NEWMAM, R.D.; WUHIB, T.; MOORE, R.D.; GUERRANT, R.L.; SEARS, C.L. Cryptosporidiosis in northeastern Brazilian children: association with increases diarrhea morbidity. **The Journal of Infectious Diseases**, v.177, p.754-760, 1998.

AJJAMPUR, S.S.; SARKAR, R.; SANKARAN, P.; KANNAN, A.; MENON, V.K.; MULIYIL, J.; WARD, H.; KANG, G. Symptomatic and asymptomatic *Cryptosporidium* infections in children in a semi-urban slum community in southern India. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.83, p.1110-1115, 2010.

ALVAREZ-PELLITERO, P.; SITJÀ-BOBADILLA, A. *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. **International Journal for Parasitology**, v.32, p.1007-1021, 2002.

ALVAREZ-PELLITERO, P.; QUIROGA, M. I.; SITJÀ-BOBADILLA, A.; REDONDO, M. J.; PALENZUELA, O.; PADRÓS, F.; VÁSQUEZ, S.; NIETO, J. M. *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.62, p.133-145, 2004.

ARMSON, A.; THOMPSON, R.C.; REYNOLDS, J.A. A review of chemotherapeutic approaches to the treatment of cryptosporidiosis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v.1, p.297-305, 2003.

ASHBOLT, N.J. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. **Toxicology**, v.198, p.229-238, 2004.

ATWILL, E.R.; CAMARGO, S.M.; PHILLIPS, R.; ALONSO, L.H.; TATE, K.W.; JENSEN, W.A.; BENNET, J.; LITTLE, S.; SALMON, T.P. Quantitative shedding of two genotypes of *Cryptosporidium parvum* in California ground squirrels (*Spermophilus beecheyi*). **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.2840-2843, 2001.

BAJER, A.; CACCIO, S.; BEDNARSKA, M.; BEHNKE, J.M.; PIENIAZEK, N.J.; SINSKI, E. Preliminary molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates of wildlife rodents from Poland. **The Journal of Parasitology**, v.89, p.1053-1055, 2003.

BALDURSSON, S.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks – an update 2004-2010. **Water Research**, v.45, p.6603-6614, 2011.

BARALDI, S.R.; MARQUES, E.G.L.; DIAS, R.M.D.S. Ocorrência de *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli* na região de Campinas, SP. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.58, p.97-103, 1999.

BARTA, J. R.; THOMPSON, A.R.C. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. **Trends in Parasitology**, v.22, p.463-468, 2006.

BENSON, C.A.; KAPLAN, J.E.; MASUR, H.; PAU, A.; HOLMES, K.K. Treating opportunistic infections among HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association/Infectious Diseases Society of America. **Morbidity and Mortality Weekly Report Recommendations and Reports**, v.53, p.1-112, 2004.

BERTOLINO, S.; WAUTERS, L.A.; DE BRUYN, L.; CANESTRI-TROTTI, G. Prevalence of coccidia parasites (Protozoa) in red squirrels (*Sciurus vulgaris*): effects of host phenotype and environmental factors. **Oecologia**, v.137, p.286-295, 2003.

BETANCOURT, W.Q.; ROSE, J.B. Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Veterinary Parasitology**, v.126, p.219-34, 2004.

BROWNSTEIN, D. G.; STRANDBERG, J.D.; MONTALI, R.J.; BUSH, M.; FORTNER, J. *Cryptosporidium* in snakes with hypertrophic gastritis. **Veterinary Pathology**, v.14, p.606-617, 1977.

CASEMORE, D.P.; SANDS, R.L.; CURRY, A. *Cryptosporidium* species a “new” human pathogen. **Journal of Clinical Pathology**, v.38, p.1321-1336, 1985.

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

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

CREEK, T.L.; KIM, A.; LU, L.; BOWEN, A.; MASUNGE, J.; ARVELO, W.; SMIT, M.; MACH, O.; LEGWAILA, K.; MOTSWERE, C.; ZAKS, L.; FINKBEINER, T.; POVINELLI, L.; MARUPING, M.; NGWARU, G.; TEBELE, G.; BOPP, C.; PUHR, N.; JOHNSTON, S.P.; DASILVA, A.J.; BERN, C.; BEARD, R.S.; DAVIS, M.K. Hospitalization and mortality among primarily nonbreastfed children during a large outbreak of diarrhea and malnutrition in Botswana, 2006. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v.53, p.14-19, 2010.

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

CURRENT, W. L.; UPTON, S. J.; HAYNES, T. B. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. s. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. **Journal of Protozoology**, v.33, p.289-296, 1986.

D'ANTONIO, R.G., WINN, M.D., TAYLOR, J.; GUSTAFSON, T.L.; CURRENT, W.L.; RHODES, M.M.; GARY, G.W.; ZAJAC, R.A. A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. **Annals of Internal Medicine**, v.103, p.886-888, 1985.

DE WAELE, V.; BERZANO, M.; BERKVEN, D.; SPEYBROECK, N.; LOWERY, C.; MULCAHY, G.M.; MURPHY, T.M. Age-stratified Bayesian analysis to estimate sensitivity and specificity of four diagnostic tests for detection of *Cryptosporidium* oocysts in neonatal calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, p.76-89, 2011.

DESAI, N.T.; SARKAR, R.; KANG, G. Cryptosporidiosis: An under-recognized public health problem. **Tropical Parasitology**, v.22, p.91-98, 2012.

DIETZ, V.; VUGIA, D.; NELSON, R.; WICKLUND, J.; NADLE, J.; MCCOMBS, K.G.; REDDY, S. Active, multisite, laboratory-based surveillance for *Cryptosporidium parvum*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.62, p.368-72, 2000.

DILLINGHAMA, R.A.; LIMAB, A.A.; GUERRANT, R.L. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. **Microbes and Infection**, v.4, p.1059-1066, 2002.

DUBEY, J.P.; SPEER, C.A.; FAYER, R. **Cryptosporidiosis of man and animals**. Boca Raton: CRC Press, 1990.

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

ELWIN, K.; HADFIELD, S.J.; ROBINSON, G.; CROUCH, N.D.; CHALMERS, R.M. *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007–2011. **International Journal for Parasitology**, v.42, p.675-682, 2012.

FAYER, R. *Cryptosporidium*: a waterborne zoonotic parasite. **Veterinary**

Parasitology, v.126, p.37-56, 2004.

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

FAYER, R.; NERAD, T. Effects of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.1431-1433, 1996.

FAYER, R.; SANTIN, M. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). **Veterinary Parasitology**, v.164, p. 192-200, 2009.

FAYER, R.; XIAO, L. **Cryptosporidium and Cryptosporidiosis**. 2nd. ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. 560p

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

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

FAYER, R.; SANTIN, M.; XIAO, L. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). **Journal of Parasitology**, v.91, p.624-629, 2005.

FAYER, R.; SANTIN, M.; TROUT, J.M.; DeSTEFANO, S.; KOENEN, K.; KAUR, T. Prevalence of Microsporidia, *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in beavers (*Castor Canadensis*) in Massachusetts. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.37, p.492-497, 2006.

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, p.1415-1422, 2001.

FENG, Y. *Cryptosporidium* in wild placental mammals. **Parasitology**, v.124, p.128-137, 2010.

FENG, Y.; LAL, A.A.; LI, N.; XIAO, L. Subtypes of *Cryptosporidium* spp. in mice and other small mammals. **Experimental Parasitology**, v.127, p.238-242, 2011.

FOO, C.; FARRELL, J.; BOXELL, A.; ROBERTSON, I.; RYAN, U.M. Novel *Cryptosporidium* genotype in wild australian mice (*Mus domesticus*). **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.7693-7696, 2007.

FOURNET, N.; DEEGE, M.P.; URBANUS, A.T.; NICHOLS, G.; ROSNER, B.M.; CHALMERS, R.M.; GORTON, R.; POLLOCK, K.G.; VAN DER GIESSEN, J.W.; WEVER, P.C.; DORIGO-ZETSMA, J.W.; MULDER, B.; MANK, T.G.; OVERDEVEST, I.; KUSTERS, J.G.; VAN PELT, W.; KORTBEEK, L.M. Simultaneous increase of *Cryptosporidium* infections in the Netherlands, the United Kingdom and Germany in late summer season, 2012. **Euro Surveillance**, v.18, p.20348, 2013.

FRANCO, R.M.B.; CORDEIRO, N.S. Giardíase e criptosporidiose em creches no município de Campinas, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.29, p.583-591, 1996.

FUJINO, T.; MATSUI, T.; KOBAYASHI, F.; HARUKI, K.; YOSHINO, Y.; KAJIMA, J.; TSUJI, M. The effect of heating against *Cryptosporidium* oocysts. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.64, p.199-200, 2002.

GATEI, W.; GREENSILL, J.; ASHFORD, R.W.; CUEVAS, L.E.; PARRY, C.M.; CUNLIFFE, N.A.; BEECHING, N.J.; HART, C.A. Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.1458-1462, 2003.

GATEI, W.; WAMAE, C.N.; MBAE, C.; WARURU, A.; MULINGE, E.;

WAITHERA, T.; GATIKA, S.M.; KAMWATI, S.K.; REVATHI, G.; HART, C.A. Cryptosporidiosis: prevalence, genotype analysis, and symptoms associated with infections in children in Kenya. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.75, p.78-82, 2006.

GÓMEZ-COUSO, H.; MÉNDEZ-HERMIDA, F.; ARES-MAZÁS, E. First report *Cryptosporidium parvum* "ferret" genotype in American mink (*Mustela vison* Shreber 1777). **Parasitology Research**, v.100, p.877-879, 2007.

GURGEL, A.C.F.; SARTORI, A.S.; ARAÚJO, F.A.P. Protozoan parasites in captive chinchillas (*Chinchilla lanigera*) raised in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Parasitologia Latinoamericana**, v.60, p.186-188, 2005.

HADFIELD, S.J.; ROBINSON, G.; ELWIN, K.; CHALMERS, R.M. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp. in 1 human clinical samples using real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, p.918-924, 2011.

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

HOMMER, V.; EICHHOLZ, J.; PETRY, F. Effect of antiretroviral protease inhibitors alone, and in combination with paromomycin, on the excystation, invasion and in vitro development of *Cryptosporidium parvum*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, p.359-364, 2003.

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

HUNTER, P.R.; NICHOLS, G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, p.145-154, 2002.

HURKOVÁ, L.; HAJDUSEK O.; MODRÝ, D. Natural infection of *Cryptosporidium muris* (Apicomplexa: Cryptosporiidae) in Siberian chipmunks. **Journal of Wildlife Diseases**, v.39, p.441-444, 2003.

INMAN, L.R.; TAKEUCHI, A. Spontaneous cryptosporidiosis in an adult female rabbit. **Veterinary Pathology**, v.16, p.89-95, 1979.

ISEKI, M. *Cryptosporidium felis* sp from the domestic cat. **Japanese Journal of Parasitology**, v.28, p.13-35, 1979.

JEX, A.R.; SMITH, H.V.; MONIS, P.T.; CAMPBELL, B.E.; GASSER, R.B. *Cryptosporidium* – biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. **Biotechnology Advances**, v.26, p.304-17, 2008.

JIRKŮ, M.; VALIGUROVÁ, A.; KOUDELA, B.; KŘÍŽEK, J.; MODRÝ, D.; ŠLAPETA, J. New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. **Folia Parasitologica**, v.55, p.81-94, 2008.

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, p.623-626, 2003.

KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **Journal of Water and Health**, v.5, p.1-38, 2007.

KLEIN, P.; CIRIONI, O.; GIACOMETTI, A.; SCALISE, G. In vitro and in vivo activity of aurintricarboxylic acid preparations against *Cryptosporidium parvum*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.62, p.1101-1104, 2008.

KOTLOFF, K.L.; NATARO, J.P.; BLACKWELDER, W.C.; NASRIN, D.; FARAG, T.H.; PANCHALINGAM, S.; WU, Y.; SOW, S.O.; SUR, D.; BREIMAN, R.F.; FARUQUE, A.S.; ZAIDI, A.K.; SAHA, D.; ALONSO, P.L.; TAMBOURA, B.;

SANOGO, D.; ONWUCHEKWA, U.; MANNA, B.; RAMAMURTHY, T.; KANUNGO, S.; OCHIENG, J.B.; OMORE, R.; OUNDO, J.O.; HOSSAIN, A.; DAS, S.K.; AHMED, S.; QURESHI, S.; QUADRI, F.; ADEGBOLA, R.A.; ANTONIO, M.; HOSSAIN, M.J.; AKINSOLA, A.; MANDOMANDO, I.; NHAMPOSSA, T.; ACÁCIO, S.; BISWAS, K.; O'REILLY, C.E.; MINTZ, E.D.; BERKELEY, L.Y.; MUHSEN, K.; SOMMERFELT, H.; ROBINS-BROWNE, R.M.; LEVINE, M.M. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **Lancet**, v.13, p.60844-60842, 2013.

KOUDELA, B.; MODRÝ, D. New species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) from lizards. **Folia Parasitologica**, v.45, p.93-100, 1998.

KVAC, M.; HOFMANNOVA, L.; BERTOLINO, S.; WAUTERS, L.; TOSI, G.; MODRY, D. Natural infection with two genotypes of *Cryptosporidium* in red squirrels (*Sciurus vulgaris*) in Italy. **Folia Parasitologica (Praha)**, v.55, p.95-99, 2008.

LEAV, B.A.; MACKAY, M.; WARD, H.D. *Cryptosporidium* species: new insights and old challenges. **Clinical Infectious Diseases**, v.36, p.906-913, 2003.

LEVINE, N.D. Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (Protozoa, Apicomplexa). **Journal of Protozoology**, v.31, p.94-98, 1984.

LINDSAY, D.S.; UPTON, S.J.; OWENS, D.S.; MORGAN, M.; MEAD, J.R.; BLAGBURN, B.L. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from Cattle, *Bos Taurus*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 47, p. 91-95, 2000.

LUPO, P.J.; LANGER-CURRY, R.C.; ROBINSON, M.; OKHUYSEN, P.C.; CHAPPELL, C.L. *Cryptosporidium muris* in a Texas canine population. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.78, p.917-921, 2008.

LV, C.; ZHANG, L.; WANG, R.; JIAN, F.; ZHANG, S.; NING, C.; WANG, H.; FENG, C.; WANG, X.; REN, X.; QI, M.; XIAO, L. *Cryptosporidium* spp. in wild,

laboratory, and pet rodents in china: prevalence and molecular characterization. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.7692-7699, 2009.

MACKENZIE, W.R.; HOXIE, N.J.; PROCTOR, M.E.; GRADUS, M.S.; BLAIR, 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.331, p.161-167, 1994.

MARTINS, S.; SOUSA S.; MADEIRA DE CARVALHO, L.M.; BACELAR, J.; CANNAS DA SILVA, J. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in Northwest Portugal dairy calves and efficacy of Halofuginone Lactate on the prevention of cryptosporidiosis. **Cattle Practice**, v.15, p.152-156, 2007.

MASCARINI, L.M.; DONALÍSIO, M.R. Giardíase e criptosporidiose em crianças institucionalizadas em creches no estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, p.655-579, 2006.

MATSUI, T.; FUJINO, T.; KAJIMA, J.; TSUJI, M. Infectivity to experimental rodents of *Cryptosporidium parvum* oocysts from Siberian chipmunks (*Tamias sibiricus*) originated in the People's Republic of China. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.62, p.487-489, 2000.

MEIRELES, M.V.; SOARES, R.M.; BONELLO, F.; GENNARI, S.M. Natural infection with zoonotic subtype of *Cryptosporidium parvum* in Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.20, p.166-170, 2007.

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

MELONI, B.P.; THOMPSON, R.C.A. Simplified methods for obtaining purified oocysts from mice and for growing *Cryptosporidium parvum* in vitro. **The Journal of Parasitology**, v.82, p.757-762, 1996.

MOLLOY, S.F.; SMITH, H.V.; KIRWAN, P.; NICHOLS, R.A.; ASAOLU, S.O.; CONNELLY, L.; HOLLAND, C.V. Identification of a high diversity of *Cryptosporidium* species genotypes and subtypes in a pediatric population in Nigeria. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.82, p.608-613, 2010.

MORGAN-RYAN, U. M.; FALL, A.; WARD, L. A.; HIJJAWI, N.; SULAIMAN, I.; FAYER, R.; THOMPSON, R. C. A.; OLSON, M.; LAL, A.; XIAO, L. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. **Journal Eukaryotic Microbiology**, v.49, p.433-440, 2002.

MUTHUSAMY, D.; RAO, S.S.; RAMANI, S.; MONICA, B.; BANERJEE, I.; ABRAHAM, O.C.; MATHAI, D.C.; PRIMROSE, B.; MULIYIL, J.; WANKE, C.A.; WARD, H.D.; KANG, G. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* sp. isolates from human immunodeficiency virus-infected individuals in South India. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, p.632-634, 2006.

NAIR, P.; MOHAMED, J.A.; DUPONT, H.L.; FIGUEROA, J.F.; CARLIN, L.G.; JIANG, Z.D.; BELKIND-GERSON, J.; MARTINEZ-SANDOVAL, F.G.; OKHUYSEN, P.C. Epidemiology of *Cryptosporidium* in North Americans travelers to México. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.79, p.210-214, 2008.

NG, J.; PAVLASEK, I.; RYAN, U. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.7548-7553, 2006.

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

OSHIRO, E.T.; DORVAL, M.E.C.; NUNES, V.L.B.; SILVA, M.A.A.; SAID, L.A.M. Prevalência do *Cryptosporidium parvum* em crianças abaixo de 5 anos, residentes na zona urbana de Campo Grande, MS, Brasil, 1996. **Revista da**

Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.33, p.277-280, 2000.

OSTERHOLM, M.T.; REVES, R.R.; MURPH, J.R.; PICKERING, L.K. Infectious disease and child day care. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v.11, p.32-41, 1992.

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

PANCIERA, R.J.; THOMASSEN, R.W.; GARNER, F.M. Cryptosporidial infection in a calf. **Veterinary Pathology**, v.8, p.479-484, 1971.

PAVLÁSEK, I. Cryptosporidia: Biology, diagnosis, host spectrum, specificity, and the environment. **Remedia - Klinická Mikrobiologie**, v.3, p.290-301, 1999.

PAVLÁSEK, I.; LÁVICKOVÁ, M.; HORÁK, P.; KRÁL, J.; KRÁL, B. *Cryptosporidium varanii* n.sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Emerald monitor (*Varanus prasinus* Schlegel, 1893) in captivity in Prague zoo. **Gazella**, v.22, p.99-108, 1995.

PERZ, J.F.; LE BLANCQ, S.M. *Cryptosporidium parvum* infection involving novel genotypes in wildlife from lower New York State. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.1154-1162, 2001.

POKORNY, N.J.; WEIR, S.C.; CARRENO, R.A.; TREVORS, J.T.; LEE, H. Influence of temperature on *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in river water samples as detected by tissue culture assay. **The Journal of Parasitology**, v.88, p.641-643, 2002.

POWER, M.; RYAN, U. *Cryptosporidium macropodum* n.sp (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern gray kangaroos (*Macropus giganteus*). **Journal of Parasitology**, v.94, p.1114-1117, 2008.

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

RASKOVÁ, V.; KVETONOVÁ, D.; SAK, B.; MCEVOY, J.; EDWINSON, A.; STENGER, B.; KVÁČ, M. Human cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium tyzzeri* and *C. parvum* isolates presumably transmitted from wild mice. **Journal of Clinical Microbiology**, v.51, p.360-362, 2013.

REHG, J.E.; GIGLIOTTI, F.; STOKES, D.C. Cryptosporidiosis in ferrets. **Laboratory Animal Science**, v.38, p.155-158, 1988.

REHG, J. E.; LAWTON, G. W.; PAKES, S. P. *Cryptosporidium cuniculus* in the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). **Laboratory Animal Science**, v.29, p.656-660, 1979.

REN, X.; ZHAO, J.; ZHANG, L.; NING, C.; JIAN, F.; WANG, R.; LV, C.; WANG, Q.; ARROWOOD, MJ.; XIAO, L. *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). **Experimental Parasitology**, v.130, p.274-281, 2012.

ROBERTSON, L.J.; CAMPBELL, A.T.; SMITH, H.V. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.3494-500, 1992.

ROBINSON, G.; CHALMERS, R.M. The European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), a source of zoonotic cryptosporidiosis. **Zoonoses Public Health**. v.57, p.1-13, 2010.

ROBINSON, G.; ELWIN, K.; CHALMERS, R.M. Unusual *Cryptosporidium* genotypes in human cases of diarrhea. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, p.1800-1802, 2008.

ROBINSON, G.; WRIGHT, S.; ELWIN, K.; HADFIELD, S.J.; KATZER, F.; BARTLEY, P.M.; HUNTER, P.R.; NATH, M.; INNES, E.A.; CHALMERS, R.M.

Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Morphology, biology and phylogeny. **International Journal for Parasitology**, v.40, p.1539-1548, 2010.

ROSE, J.B.; HUFFMAN, D.E.; GENNACCARO, A. Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. **FEMS Microbiology Reviews**, v.26, p.113-123, 2002.

ROSSIGNOL, J.F. Nitazoxanide in the treatment of acquired immune deficiency syndrome-related cryptosporidiosis: results of the United States compassionate use program in 365 patients. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.24, p.887-894, 2006.

RYAN, U.M.; POWER, M.; XIAO, L. *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.55, p.22–26, 2008.

RYAN, U. M.; MONIS, P.; ENEMARK, H. L.; SULAIMAN, I.; SAMARASINGHE, B.; READ, C.; BUDLE, R.; RBERTSON, I.; ZHOU, L.; THOMPSON, R. C. A.; XIAO, L. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). **Journal of Parasitology**, v.4, p.769-773, 2004.

RYAN, U. M.; XIAO, L.; READ, C.; SULAIMAN, M.; MONIS, P.; LAL, A. A.; FAYER, R.; PAVLASEK, I. A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. **Journal of Parasitology**, v.89, p.809-813, 2003.

SAUDA, F.C.; ZAMARIOLI, L.A.; EBNER FILHO, W.; MELLO, L.B. Prevalence of *Cryptosporidium* sp. and *Isospora belli* among AIDS patients attending Santos Reference Center for AIDS, São Paulo, Brazil. **The Journal of Parasitology**, v.79, p.454-456, 1993.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the “neglected diseases initiative”. **Trends in Parasitology**, v.22, p.203-208, 2006.

SHAHIDUZZAMAN, M.; DYACHENKO, V.; KHALAFALLA, R.E.; DESOUKY, A.Y.; DAUGSCHIES, A. Effects of curcumin on *Cryptosporidium parvum* in vitro. **Parasitology Research**, v.105, p.1155-61, 2009.

SHI, K.; JIAN, F.; LV, C.; NING, C.; ZHANG, L.; REN, X.; DEAREN, T.K.; LI, N.; QI, M.; XIAO, L. Prevalence, genetic characteristics, and zoonotic potential of *Cryptosporidium* species causing infections in farm rabbits in China. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, p.3263-3266, 2010.

SINSKY, E.; BEDNARSKA, M.; BAJER, A. The role of wild rodents in ecology of cryptosporidiosis in Poland. **Folia Parasitologica**, v.45, p.173-174, 1998.

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

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

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

SMITH, N.H.; CRON, S.; VALDEZ, L.M.; CHAPPELL, C.L.; WHITE, A.C. JR. Combination drug therapy for cryptosporidiosis in AIDS. **The Journal of Infectious Diseases**, v.178, p.900-903, 1998.

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

STURDEE, A.P.; CHALMERS, R.M.; BULL, S.A. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in wild mammals of mainland Britain. **Veterinary Parasitology**, v.80, p.273-280, 1999.

SULAIMAN, I.M.; HIRA, P.R.; ZHOU, L.; AL-ALI, F.M.; AL-SHELAHI, F.A.; SHWEIKI, H.M.; IQBAL, J.; KHALID, N.; XIAO, L. Unique endemicity of

cryptosporidiosis in children in Kuwait. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.2805-2809, 2005.

TALI, A.; ADDEBBOUS, A.; ASMAMA, S.; CHABAA, L.; ZOUGAGHI, L. Respiratory cryptosporidiosis in two patients with HIV infection in a tertiary care hospital in Morocco. **Annales de Biologie Clinique**, v.69, p.605-608, 2011.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality tools. **Nucleic Acids Research**, v.24, p.4876-4882, 1997.

TYZZER, E.E. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. **Journal of Medical Research**, v.23, p.487-509, 1910.

TYZZER, E.E. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. **Archives fur Protistenkunde**, v.26, p.394-412, 1912.

TZIPORI, S.; WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. **Microbes and Infection**, v.4, p.1047-1058, 2002.

UIP, D.E.; LIMA A.L.; AMATO, V.S.; BOULOS, M.; NETO, V.A.; BEM DAVID, D. Roxithromycin treatment for diarrhoea caused by *Cryptosporidium* spp. in patients with AIDS. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.41, p.93-97, 1998.

UNICEF. *Countdown to 2015: maternal, newborn and child survival. Tracking progress in maternal, neonatal and child survival: the 2008 report*. New York, NY: **UNICEF**; 2008.

VETTERLING, J.M.; JERVIS, H.R.; MERRILL, T.G.; SPRINZ, H. *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the Guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. **Journal of Protozoology**, v.18, p.243-247, 1971.

WHITE JR, A.C.; CHAPPELL, C.L.; KIMBALL, K.T.; FLANIGAN, T.P.; GOODGAME R.W. Paromomycin for cryptosporidiosis in Aids: a prospective double blind trial. **The Journal of Infectious Diseases**, v.170, p.419-424, 1994.

XIAO, L.; CAMA, V. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. In: ORTEGA, Y. R. **Foodborne Parasites**. New York: Springer verlag, 2006.

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

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

XIAO, L.; ALDERISIO, K.; LIMOR, J.; ROYER, M.; LAL, A.A. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.5492-5498, 2000.

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

XIAO, L.; SULAIMAN, I.M.; RYAN, U.M.; ZHOU, L.; ATWILL, E.R.; TISCHLER, M.L.; ZHANG, X.; FAYER, R.; LAL, A.A. Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. **International Journal for Parasitology**, v.32, p.1773-1785, 2002.

YODER, J.S.; BEACH, M.J. Cryptosporidiosis surveillance – United States, 2003-2005. **Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance Summaries**, v.56, p.1-10, 2007.

YODER, J.S.; WALLACE, R.M.; COLLIER, S.A.; BEACH, M.J.; HLAVSA, M.C.
Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Cryptosporidiosis
surveillance – United States, 2009-2010. **Morbidity and Mortality Weekly
Report Surveillance Summaries**, v.61, p.1-12, 2012.