

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

IDENTIFICAÇÃO DO GÊNERO E ESPÉCIES DE
***Cryptosporidium* EM CÃES E GATOS**

Camila Guariz Homem

Zootecnista

ARAÇATUBA – SP

2016

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

IDENTIFICAÇÃO DO GÊNERO E ESPÉCIES DE
***Cryptosporidium* EM CÃES E GATOS**

Camila Guariz Homem

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária - UNESP, Câmpus de Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

ARAÇATUBA – SP

2016

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

H752i Homem, Camila Guariz
Identificação do gênero e espécies de cryptosporidium em cães e
gatos / Camila Guariz Homem. – Araçatuba : [s.n.], 2016
97 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de,
Mesquita Filho" Faculdade de Medicina Veterinária, 2016

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles

1.Criptosporidiose. 2.Cryptosporidium canis. 3.
Cryptosporidium felis. 4. Reação em Cadeia da Polimerase. I. T.

CDD 616.96



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Identificação do gênero e espécies de *Cryptosporidium* em cães e gatos

AUTORA: CAMILA GUARIZ HOMEM

ORIENTADOR: MARCELO VASCONCELOS MEIRELES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - Unesp

Profa. Dra. JULIANA PELOI VIDES

Curso de Medicina Veterinária / Centro Católico Auxilium - UNISALESIANO/Araçatuba

Prof. Dr. HEITOR FLÁVIO FERRARI

Curso de Medicina Veterinária / Centro Católico Auxilium - UNISALESIANO/Araçatuba

Profa. Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - Unesp

Profa. Dra. CÁRIS MARONI NUNES

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - Unesp

Araçatuba, 13 de outubro de 2016.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

CAMILA GUARIZ HOMEM - Jaboticabal – SP, 16 de Novembro de 1985. Graduação em Zootecnia, 2009, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP/FEIS, Campus de Ilha Solteira, São Paulo. Mestrado em Ciência Animal, 2011, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP/FMVA, Campus de Araçatuba, São Paulo. Aluna do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal – Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP/FMVA – Campus de Araçatuba, São Paulo.

***“A simplicidade é o
último degrau da
sabedoria”***

Khalil Gibran

Dedico

***Aos meus pais e irmãos,
que me apoiaram em todos os
momentos na conclusão de
mais este sonho.***

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos...

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles pela orientação durante o doutorado, pelo conhecimento transmitido e principalmente pelo incentivo à pesquisa científica.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA) - Campus de Araçatuba, pela viabilidade da realização do Doutorado.

Aos Laboratórios de Ornitopatologia, Imunologia e Patologia Aplicada pela disponibilização da estrutura e pelo auxílio prestado por suas equipes. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de Doutorado (processo nº 2011/09614-6) e pelo auxílio financeiro para realização deste projeto de pesquisa (processo nº 2009/51595-9).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de doutorado na modalidade Sanduíche pelo programa “Ciência sem Fronteiras” (processo nº 206152/2014-0).

À “Unidad de Parasitología y Enfermedades Parasitarias” da “Facultad de Veterinaria” – Universidad de Santiago de Compostela (USC), Lugo, Espanha, em especial ao Prof. Dr. Pablo Díez Baños, pela disponibilidade e por ter me acolhido junto à sua equipe durante meu estágio sanduíche.

Aos amigos de faculdade Guilherme Dias de Melo, José Eduardo Santos Silva, Milena Sato Souza, Fernanda Grecco Grano, Túlio Seraguci e Deuvânia Carvalho Silva por todo o auxílio, pelos dias alegres e por tornarem todo o trabalho mais divertido.

Aos amigos de intercâmbio Heloísa Varella Ribeiro, Ângelo Sena Silva, Esther Navarro González e Scheila Geiele Kamchen por se tornarem minha família na Espanha, e também aos amigos de longa data Uriles Chioda, Diego Coró, Bruno Cardoso, Maísa Jus, Franciele Silvério, Vitor Pim, Fernanda Duarte e Will Fontoura por todo o companheirismo durante estes anos.

Em especial aos meus pais João Renato Homem e Eva Maria Guariz Homem, e aos irmãos Matheus Guariz Homem e Vitória Guariz Homem, por todos os esforços não medidos, apoio e amor, sem os quais jamais teria conseguido finalizar esta etapa.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta tese, e que por falhas na minha memória não foram citados. Muito obrigado!

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	17
1. O gênero <i>Cryptosporidium</i>	17
1.2 Taxonomia.....	18
1.3 Ciclo biológico.....	20
1.4 Importância em saúde pública.....	22
1.5 Infecção em gatos.....	24
1.6 Infecção em cães.....	26
1.7 Participação de cães e gatos na epidemiologia da criptosporidiose humana.....	27
1.8 Métodos diagnósticos.....	28
1.8.1 Visualização de oocistos e outros estágios evolutivos por métodos de concentração e/ou coloração.....	29
1.8.2 Métodos imunológicos.....	30
1.8.3 Métodos moleculares.....	31
2. Objetivos.....	32
3. Referências bibliográficas.....	33
 CAPÍTULO 2 - Ocorrência e caracterização molecular de <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostras fecais de gatos provenientes do estado de São Paulo.....	 60
Resumo.....	60
Summary.....	61
Introdução.....	62
Material e métodos.....	63
Resultados e discussão.....	65
Referências.....	67

SUMÁRIO

CAPÍTULO 3 – Desenvolvimento de reação em cadeia pela polimerase em tempo real para detecção de <i>Cryptosporidium canis</i> em amostras fecais de cães.....	76
Resumo.....	76
Summary.....	78
Introdução.....	79
Material e métodos.....	80
Resultados e discussão.....	83
Referências.....	88

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 1

FIGURA 1. Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. (Fonte: BARTA; THOMPSON, 2006). 20

CAPÍTULO 3

Figura 1. Curva de regressão padrão. Padronização da reação em cadeia pela polimerase em tempo real, com amplificação em tempo real das diluições contendo 10^7 a 10^3 cópias de DNA de *C. canis*. 84

Figura 2. Curva de dissociação obtida a partir de amostras de DNA positivas para *C. canis* por meio da reação de PCR em tempo real para o gene da proteína HSP70. 84

LISTA DE QUADROS

Página

CAPÍTULO 1

Quadro 1 – Espécies de *Cryptosporidium* atualmente descritas (Adaptado de FAYER, 2010; FAYER; SANTIN, 2009; FAYER et al., 2010; HOLUBOVÁ et al., 2016; KVÁČ et al., 2013; KVÁČ et al., 2014; KVÁČ et al., 2016; LI et al., 2015; ROBINSON et al., 2010; RYAN et al., 2015)

19

CAPÍTULO 3

Quadro 1 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para obtenção de um fragmento específico para *Cryptosporidium canis* pelo gene HSP70, para uso na padronização da reação de PCR em tempo real.

81

Quadro 2 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação em cadeia pela polimerase em tempo real para amplificação de fragmento parcial do gene da proteína HSP70 de *Cryptosporidium canis*..

82

Quadro 3 – Descrição das amostras, número amostral (n), número de positivos dentro de cada grupo amostral e suas respectivas porcentagens para as técnicas de *nested* PCR (nPCR) e PCR em tempo real (qPCR).

84

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Descrição das amostras, total de amostras (n), número e porcentagem de positivos para a presença de DNA de *Cryptosporidium* spp.

66

IDENTIFICAÇÃO DO GÊNERO E ESPÉCIES DE *Cryptosporidium* EM CÃES E GATOS

Resumo: O presente trabalho objetivou a identificação e caracterização molecular de isolados de *Cryptosporidium* em amostras fecais de cães e gatos, bem como o desenvolvimento de uma reação em cadeia pela polimerase (PCR) em tempo real para detecção específica de *Cryptosporidium canis* em amostras fecais de cães. Trezentas amostras fecais de gatos e 367 amostras fecais de cães foram colhidas nas cidades de Araçatuba e Jaboticabal (SP) e submetidas aos processos de purificação e extração de DNA. “Nested” PCR (nPCR) para o gene 18S do rRNA foi realizada para identificação de *Cryptosporidium* spp., seguido de sequenciamento dos fragmentos amplificados. Uma reação de PCR em tempo real para um fragmento parcial do gene HSP70 foi padronizada para a detecção de *Cryptosporidium canis* em amostras fecais de cães. A positividade para *Cryptosporidium* spp. pela nPCR em amostras de gatos foi de 11,33% (34/300), e em amostras cães foi de 10,4% (38/367). A PCR em tempo real resultou em 15,3% (58/367) de amostras positivas para *C. canis*. Foi possível a identificação por meio de sequenciamento de três amostras positivas para *C. felis* e seis amostras positivas para *C. canis*. Foi observada uma maior positividade em filhotes quando comparados a cães adultos. A sensibilidade analítica da PCR em tempo real foi de uma cópia de DNA de *C. canis* por reação e não foi observada amplificação inespecífica de DNA de outras espécies de *Cryptosporidium*. Conclui-se que cães e gatos das regiões estudadas podem se apresentar infectados por espécies zoonóticas de *Cryptosporidium* e a PCR em tempo real desenvolvida neste trabalho é um método sensível e específico para a detecção de *C. canis* em amostras fecais de cães.

Palavras-chave: criptosporidiose, *Cryptosporidium canis*, *Cryptosporidium felis*, Reação em cadeia pela polimerase

IDENTIFICATION OF GENDER AND SPECIES OF *Cryptosporidium* IN DOGS AND CATS

Summary: This study aimed the identification and molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates in stool samples from dogs and cats, as well as the development of a polymerase chain reaction (PCR) in real time to specific detection of *Cryptosporidium canis* in fecal samples from dogs. Three hundred fecal samples from cats and 367 fecal samples from dogs were collected in the cities of Araçatuba and Jaboticabal (SP) and subjected to the processes of purification and DNA extraction. Nested PCR (nPCR) for the 18S rRNA gene was performed for identification of *Cryptosporidium* spp., followed by sequencing of the amplified fragments. A real time PCR to a partial fragment of the HSP70 gene was standardized for detection of *Cryptosporidium canis* in dogs fecal samples. The positivity for *Cryptosporidium* spp. by nPCR in cats samples was 11.33% (34/300), and in dog samples was 10.4% (38/367). The real-time PCR resulted in 15.3% (58/367) of samples positive for *C. canis*. The sequencing of the amplified fragments allowed the identification of three samples positive for *Cryptosporidium felis* and six samples positive for *C. canis*. A higher positivity was observed in puppies and kittens when compared to adult animals. The analytical sensitivity of real-time PCR was 1 copy of DNA of *C. canis* and was not observed DNA amplification for other species of *Cryptosporidium*. We concluded that dogs and cats of the investigated regions can present infected for zoonotic species of *Cryptosporidium* and the real-time PCR developed in this work is a sensitive and specific method for detection of *C. canis* in fecal samples from dogs.

Keywords: cryptosporidiosis, *Cryptosporidium canis*, *Cryptosporidium felis*, Polimerase Chain Reaction.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. O gênero *Cryptosporidium*

Cryptosporidium spp. são coccídios pertencentes ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoasida, Subclasse Coccidiasina, Ordem Eucoccidiorida, Subordem Eimeriorina e Família Cryptosporidiidae. Estes protozoários completam seu ciclo biológico na superfície de células epiteliais dos tratos gastrintestinal, respiratório e urinário de mamíferos, aves, répteis e peixes (CAREY et al., 2004; CHERMETTE; BOUFASSA-OUZROUT, 1988).

São monoxênicos e se diferem de outros coccídios por apresentarem características próprias, tais como oocistos sem esporocistos e pela presença de quatro esporozoítos. São capazes de realizar auto-infecção por meio de excitação de oocistos de parede fina, enquanto que os oocistos que apresentam parede espessa são eliminados no ambiente (BARTA; THOMPSON, 2006).

Ernest Edward Tyzzer relatou pela primeira vez a infecção por este parasito em glândulas gástricas de camundongos em 1907 (TYZZER, 1907), e posteriormente o denominou como *Cryptosporidium muris* (TYZZER, 1910). Em 1912, o protozoário foi encontrado no intestino dessa mesma espécie, sendo denominado como *Cryptosporidium parvum* (TYZZER, 1912). Após um surto acometendo aves domésticas em 1950 (SLAVIN, 1955) e, principalmente, pelos primeiros relatos de infecção em humanos (MEISEL et al., 1976; NIME et al., 1976), foi então que passou a ser pesquisado de maneira mais frequente.

Por muitos anos, a infecção por *Cryptosporidium* spp. foi considerada como rara em animais e descrita como uma infecção oportunista em indivíduos imunologicamente comprometidos. A partir da década de 80, este coccídio passou a ser considerado como um importante agente etiológico de diarreia em seres humanos imunossuprimidos e também em alguns animais domésticos e selvagens (ASHBOLT, 2004; SRÉTER; VARGA, 2000; XIAO et al., 2004), sendo então a criptosporidiose reconhecida como uma grave enfermidade

disseminada por veiculação hídrica, que tem como agravante a dificuldade de prevenção da contaminação ambiental e a ausência de terapias eficazes (DILLINGHAMA et al., 2002).

1.2. Taxonomia

A maioria das espécies de *Cryptosporidium* apresenta morfologia muito semelhante e, portanto, a taxonomia deste gênero tem sido padronizada com o uso de métodos moleculares em conjunto com estudos morfológicos, biológicos ou de especificidade por hospedeiros, que auxiliam na validação das espécies descritas (XIAO; CAMA, 2006).

Até o momento, são descritos vários genótipos e 30 espécies de *Cryptosporidium* (Quadro 1), que acometem aves, répteis, anfíbios, peixes e mamíferos, incluindo o homem (FAYER, 2000; FAYER et al., 2010; FAYER; SANTIN, 2009; HOLUBOVÁ et al., 2016; KVÁČ et al., 2013; KVÁČ et al., 2014; KVÁČ et al., 2016, LI et al., 2015; ROBINSON et al., 2010; RYAN et al., 2015). De acordo com Xiao et al. (2002), alguns genótipos podem apresentar características morfológicas muito semelhantes às de espécies já descritas, porém, diferem em sua composição genética e, pelo fato de não haver informações sobre suas características biológicas, ainda não foram classificados como espécies.

Quadro 1 - Espécies de *Cryptosporidium* atualmente descritas (Adaptado de FAYER,2010; FAYER;SANTIN, 2009; FAYER et al., 2010; HOLUBOVÁ et al., 2016; KVÁČ et al., 2013; KVÁČ et al., 2014; KVÁČ et al., 2016; LI et al., 2015; ROBINSON et al., 2010; RYAN et al., 2015).

Espécie	Principais hospedeiros	Autor
<i>Cryptosporidium andersoni</i>	Bovinos, homem (A)	Lindsay et al. (2000)
<i>Cryptosporidium avium</i>	Aves (C, I)	Holubová et al. (2016)
<i>Cryptosporidium baileyi</i>	Aves (B, C, TR)	Current et al. (1986)
<i>Cryptosporidium bovis</i>	Bovinos (D)	Fayer et al. (2005)
<i>Cryptosporidium canis</i>	Caninos, homem (ID)	Fayer et al. (2001)
<i>Cryptosporidium cuniculus</i>	Coelho, homem (D)	Robinson et al. (2010)
<i>Cryptosporidium erinacei</i>	Ouriço (D)	Kváč et al. (2014)
<i>Cryptosporidium fayeri</i>	Canguru vermelho (<i>Macropus rufus</i>) (D)	Ryan et al. (2008)
<i>Cryptosporidium felis</i>	Felinos, homem (ID)	Iseki (1979)
<i>Cryptosporidium fragile</i>	Anfíbios (<i>Duttaphrynus melanostictus</i>) (E)	Jirků et al. (2008)
<i>Cryptosporidium galli</i>	Aves (P)	Pavlašek (1999), Ryan (2003)
<i>Cryptosporidium hominis</i>	Humanos (ID)	Morgan-Ryan et al. (2002)
<i>Cryptosporidium huwi</i>	Lebiste (<i>Poecilia reticulata</i>) (E)	Ryan et al. (2015)
<i>Cryptosporidium macropodum</i>	Canguru gigante (<i>Macropus giganteus</i>) (D)	Power e Ryan (2008)
<i>Cryptosporidium meleagridis</i>	Aves, homem (ID)	Slavin (1955)
<i>Cryptosporidium molnari</i>	Peixes (E)	Alvarez-Pellitero e Sitja-Bobadilla (2002)
<i>Cryptosporidium muris</i>	Roedores, homem (E)	Tyzzler (1910)
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Ruminantes, homem (ID)	Tyzzler (1912)
<i>Cryptosporidium proliferans</i>	Roedor (<i>Tachyoryctes splendens</i>)(E)	Kváč et al., 2016
<i>Cryptosporidium ryanae</i>	Bovinos (D)	Fayer et al. (2008)
<i>Cryptosporidium rubeyi</i>	Esquilos (<i>Spermophilus beecheyi</i> , <i>Spermophilus beldingi</i> , <i>Spermophilus lateralis</i>) (D)	Li et al. (2015)
<i>Cryptosporidium scrofarum</i>	Suínos (D)	Kváč et al. (2013)
<i>Cryptosporidium serpentis</i>	Lagartos, serpentes (E)	Levine (1980) (Brownstein et al., 1977)
<i>Cryptosporidium scophthalmi</i>	Peixes (ID)	Alvarez-Pellitero et al. (2004)
<i>Cryptosporidium suis</i>	Suínos, homem (ID, IG)	Ryan et al. (2004)
<i>Cryptosporidium tyzzeri</i>	Camundongo (ID)	Ren et al. (2012)
<i>Cryptosporidium ubiquitum</i>	Ruminantes, homem (ID)	Fayer et al. (2010)
<i>Cryptosporidium varanii</i>	Lagartos (E)	Pavlašek et al. (1995)
<i>Cryptosporidium wrairi</i>	Cobaio (<i>Cavia porcellus</i>) (ID)	Vetterling et al. (1991)
<i>Cryptosporidium xiaoi</i>	Ovinos (D)	Fayer e Santin (2009)

* A-abomaso; B-bursa de Fabricius; C-cloaca; Ce-Ceco; E-estômago; I-Íleo; ID-intestino delgado; IG-intestino grosso; P-proventrículo; TR-trato respiratório; D-Desconhecido.

1.3. Ciclo biológico

O ciclo de vida de *Cryptosporidium* possui seis estágios de desenvolvimento no hospedeiro, sendo muito semelhante ao de outros coccídios pertencentes à subordem Eimeriorina. O ciclo de vida deste protozoário é realizado em um único hospedeiro e, portanto, são considerados monoxenos. O processo de infecção é composto por: excitação dos oocistos, merogonia, gametogonia, fertilização, formação da parede dos oocistos e esporogonia (DUBEY et al., 1990; XIAO; CAMA, 2006) (Figura 1).

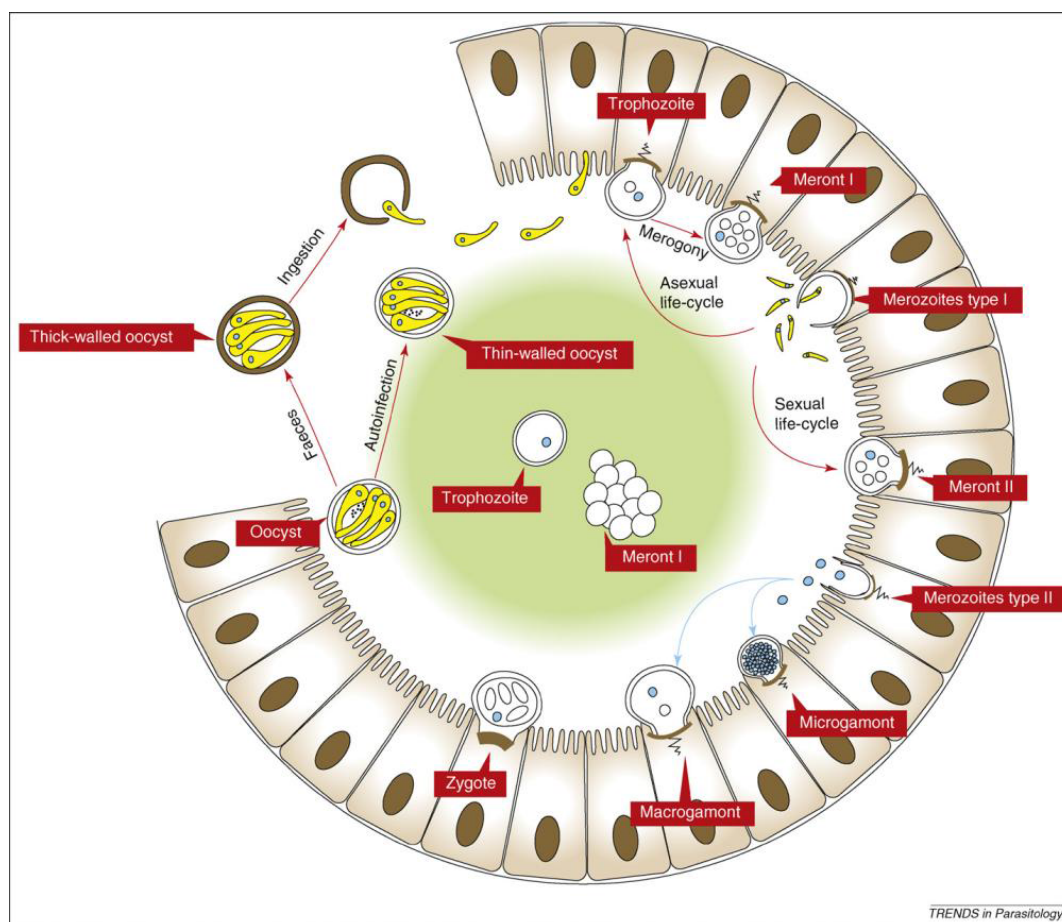


FIGURA 1. Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. (Fonte: BARTA; THOMPSON, 2006).

O ciclo se inicia com a eliminação de oocistos já esporulados nas fezes de um hospedeiro infectado. O hospedeiro susceptível se infecta pela ingestão de oocistos que geralmente são encontrados na água e alimentos ou, em menor escala, podem se infectar pela inalação de oocistos em suspensão (CURRENT et al., 1986; SMITH et al., 2007; SRÉTER; VARGA, 2000; XIAO et al., 2004; XIAO; FAYER, 2008).

O oocisto é composto por quatro esporozoítos haplóides, e possui uma parede extremamente resistente, composta por três camadas: uma externa, de 5nm, formada por glicoproteínas ácidas, e duas internas, uma de 10nm, composta por lipídeos complexos (glicolipídeos e lipoproteínas) e outra de 20nm, provavelmente composta por glicoproteínas ácidas (PETRY, 2004). 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 são liberados e se aderem à superfície das células epiteliais do trato gastrointestinal, onde são envolvidos pelas microvilosidades para formação de um vacúolo parasitóforo (localização intracelular, porém extracitoplasmática). Esta estrutura é formada por uma membrana derivada das microvilosidades da célula epitelial, e atua como uma “organela de alimentação”, resultante da fusão da parede do parasito com a membrana celular do hospedeiro, proporcionando a captação de nutrientes do citoplasma da célula do hospedeiro (BOROWSKI et al., 2008). Os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos, iniciando a multiplicação assexuada ou merogonia (SMITH et al., 2007; SRÉTER; VARGA, 2000; XIAO et al., 2004).

Os trofozoítos podem dar origem a dois tipos de merontes: o meronte tipo I e o meronte tipo II. O meronte do tipo I possui de seis a oito merozoítos, que podem dar origem a novos merozoítos do tipo I ou do tipo II. O meronte do tipo II possui quatro merozoítos, que são os responsáveis pela fase sexual do ciclo ou gametogonia, onde ocorre a diferenciação em estágios femininos (macrogametas) e masculinos (microgametas) (SMITH et al., 2007). Após fertilização, o macrogameta se desenvolve em oocisto, podendo formar oocistos de parede delgada que são responsáveis por auto-infecção (iniciam

um novo ciclo dentro do mesmo hospedeiro), ou então os oocistos de parede espessa, os quais são eliminados nas fezes e resistentes às condições ambientais. A esporulação dos oocistos ocorre logo após sua formação, sendo então eliminados na sua forma infectante, potencializando a possibilidade de infecção de novos hospedeiros (DUBEY et al., 1990).

Quando eliminados nas fezes dos hospedeiros infectados, os oocistos podem contaminar águas superficiais ou de reservatórios (MACHADO et al., 2006; MULLER, 1999; SMITH, 1993), que atuam como importantes veículos deste parasito por possibilitar atingir um grande contingente de hospedeiros (LABERGE et al., 1996). O potencial de infecção por *Cryptosporidium* está relacionado às seguintes características: grande quantidade oocistos excretados por hospedeiros infectados no ambiente, baixa especificidade por hospedeiros mamíferos, tamanho reduzido e baixa velocidade de sedimentação dos oocistos na água, baixa dose infectante (menos de 10 oocistos) e por já serem eliminados em sua forma infectante (DILLINGHAMA et al., 2002; XIAO et al., 2004).

Os oocistos eliminados no ambiente são sensíveis à dessecação, ao congelamento bem como às temperaturas de 55°C/30 segundos ou 70°C/5 segundos (FUJINO et al., 2002), mas são extremamente resistentes à ação do cloro utilizado no tratamento de água (XIAO et al., 2004), podendo permanecer viáveis no ambiente por até três meses, em temperatura de 25-30°C, seis meses em temperatura de 20° C ou sete meses quando armazenados em água a 15°C (ANDERSON, 1985; FAYER et al., 1998).

1.4. Importância em Saúde Pública

Cryptosporidium é considerado um patógeno emergente, porém o risco que este parasito representa à saúde pública muitas vezes é ignorado. A Organização Mundial da Saúde (OMS) incluiu a criptosporidiose na lista das doenças negligenciadas (SAVIOLI et al., 2006). O número de pessoas infectadas ainda é subestimado, pois não é feita uma estimativa verdadeira da

prevalência anual da enfermidade (YORDER et al., 2012). As razões pelas quais os valores reais dos casos de criptosporidiose humana são subestimados estão relacionadas com o fato de não se tratar de 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).

Surtos de criptosporidiose envolvendo humanos já foram descritos em quase 100 países em seis continentes, principalmente pelo fato de este protozoário apresentar alta infectividade aliada à sua grande resistência às condições ambientais (XIAO et al., 2004). Em 1984, um primeiro surto com transmissão pela água no Texas acometeu mais de 2000 pessoas, causando gastroenterite e tornando este parasita reconhecido como patógeno humano (D'ANTONIO et al., 1985). No entanto a importância do parasito em saúde pública somente foi reconhecida em 1993, a partir de um surto ocorrido na cidade de Milwaukee (EUA), onde 403.000 pessoas apresentaram diarreia atribuída à contaminação de água de consumo com oocistos de *Cryptosporidium* (MACKENZIE et al., 1994).

A origem dos surtos da criptosporidiose em humanos pode ocorrer por veiculação hídrica ou ingestão de alimentos contaminados. Já foram identificados oocistos de *Cryptosporidium* no leite (GELLETLIE et al., 1997), em legumes e vegetais (MONGE; CHINCHILA, 1996; ORTEGA-MORA et al., 1992), em mariscos (JOHNSON et al., 1995), em mexilhões e ostras (GRACZYK et al., 1996) e em bebida industrializada (MILLARD et al., 1994).

A infecção em humanos geralmente ocorre pelas espécies *C. hominis* e *C. parvum* (SMITH et al., 2006), podendo ocorrer dois tipos de transmissão: a zoonótica e a antroponótica. A transmissão zoonótica ocorre mais frequentemente envolvendo a espécie *C. parvum*, e está associada principalmente a ruminantes em áreas rurais (MORGAN et al., 1999),

possivelmente pelo maior contato do homem com animais infectados (LEARMONTH et al., 2004). A transmissão antroponótica geralmente envolve a espécie *C. hominis*, ocorrendo mais frequentemente em áreas urbanas devido à grande densidade populacional, com transmissão pelo contato pessoa-a-pessoa (LAKE et al., 2007).

As espécies *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. felis*, *C. ubiquitum*, *C. fayeri*, *C. muris*, *C. andersoni*, *C. suis*, *C. tyzzeri*, *C. cuniculus* e *C. viatorum* já foram relatadas também em humanos, o que demonstra que animais domésticos e selvagens podem atuar como reservatórios e representar fontes de infecção deste parasito para o homem, tanto por contaminação de fontes de água e alimentos com oocistos, como por contato direto (CHALMERS et al., 2009; ELWIN et al., 2012; FAYER, 2010; ROBINSON et al., 2010).

Os sinais clínicos da infecção por *Cryptosporidium* em humanos variam de acordo com o estado imune do hospedeiro, com quadro de diarreia autolimitante em indivíduos imunocompetentes, até quadros de diarreia crônica em pacientes imunocomprometidos, podendo resultar em óbito (ABRAHAMSEN et al., 2004). Em crianças, a infecção está associada a episódios de diarreia prolongada, levando à má absorção e diminuição do crescimento (AGNEW et al., 1998; CHECKLEY et al., 2015).

1.5. Infecção em gatos

A infecção por *Cryptosporidium* spp. é relativamente comum em gatos. Estudos epidemiológicos realizados em todo o mundo têm relatado que a prevalência da infecção em gatos varia de 0 a 29% (LUCIO-FOSTER et al., 2010).

O primeiro relato deste parasita em gatos foi feito por Iseki (1979), que o denominou como *C. felis*. Posteriormente, foram identificadas neste mesmo hospedeiro as espécies *C. muris* (PAVLASEK; RYAN, 2007) e *C. parvum* (SARGENT et al., 1998). Atualmente a infecção por *C. felis* é a mais relatada (BESER et al., 2015; FITZGERALD et al., 2011; ITO et al., 2016; PALMER et

al., 2008), enquanto que a infecção por *C. muris* (BOWMAN; LUCIO-FOSTER, 2010; FITZGERALD et al., 2011, PAVLASEK; RYAN, 2007) e *C. parvum* (SARGENT et al., 1998) apresentam menor incidência.

Uma maior ocorrência de eliminação de oocistos têm sido notada em felinos abaixo de um ano de idade em estudos conduzidos nos Estados Unidos (BALLWEBER et al., 2009), na Itália (RAMBOZZI et al., 2007), no Reino Unido (PARIS et al., 2014) e na Suécia (BESER et al., 2015). Um sistema imunológico relativamente imaturo e a falta de imunidade por exposição anterior são possíveis explicações para a maior prevalência em filhotes (RAMBOZZI et al., 2007).

A presença e a gravidade dos sinais clínicos da criptosporidiose em gatos domésticos podem variar muito, com quadros de infecção assintomática até a presença de diarreia grave (FAYER et al., 2006; MTAMBO et al., 1991; NASH et al., 1993; PALMER et al., 2008). Vale destacara que animais imunossuprimidos parecem ser mais susceptíveis ao desenvolvimento da enfermidade (MONTICELLO et al., 1987).

Estudos têm sido desenvolvidos para a detecção de *Cryptosporidium* em gatos em diversos países, dentre eles Austrália (FITZGERALD et al., 2011; McGLADE et al., 2003; PALMER et al., 2008; SARGENT et al., 1998; YANG et al., 2015), Brasil (COELHO et al., 2009; FUNADA et al., 2007; GENNARI et al., 1999; LEMOS et al., 2011; RAGOZO et al., 2002; THOMAZ et al., 2007), Canadá (HOOPES et al., 2015), China (LI et al., 2015b), Colômbia (SANTÍN et al., 2006), Estados Unidos (FAYER et al., 2006; LUCIO-FOSTER; BOWMAN, 2011), Itália (PAOLETTI et al., 2011; RAMBOZZI et al., 2007) Japão (ITO et al., 2016), Reino Unido (PARIS et al., 2014; SCORZA et al., 2014) e Tailândia (KOOMPAPONG et al., 2014).

No Brasil, estudos foram conduzidos nos estados de São Paulo (COELHO et al., 2009; FUNADA et al., 2007; GENNARI et al., 1999; RAGOZO et al., 2002; THOMAZ et al., 2007) e Rio de Janeiro (LEMOS et al., 2011). A prevalência da criptosporidiose em gatos no Brasil varia 3,9% a 14,44% (MEIRELES, 2010).

1.6. Infecção em cães

O primeiro relato de *Cryptosporidium* em cães foi feito por Tzipori e Campbell (1981) por meio da detecção de anticorpos anti *Cryptosporidium* no soro de cães. Posteriormente foi feita a caracterização molecular desta espécie (FAYER et al., 2001).

Geralmente os cães são infectados pela espécie *C. canis* (ITOH et al., 2014; JIAN et al., 2014; LI et al., 2015b; OSMAN et al., 2015; PAOLETTI et al., 2015; SEVÁ et al., 2010; THOMAZ et al., 2007; UEHLINGER et al., 2013; XU et al., 2016; YOSHIUCHI et al., 2010), mas também existem relatos de infecção pelas espécies *C. parvum* (SIMONATO et al., 2015; SOTIRIADOU et al., 2013) e *C. ubiquitum* (LI et al., 2015b).

No mundo todo, trabalhos reportam a prevalência da criptosporidiose em cães entre 0,2% a 44,1% (BAJER et al., 2011; HANNES et al., 2007;; ITOH et al., 2014; JIAN et al., 2014; LA SAALA et al., 2015; LI et al., 2015b; OSMAN et al., 2015; PAOLETTI et al., 2015; UEHLINGER et al., 2013; XU et al., 2016; YOSHIUCHI et al., 2010). No Brasil, são relatadas ocorrências de 1,4% a 26,2% (BALASSIANO et al., 2009; GIZZI et al., 2014; KATAGIRI et al., 2008; MUNDIN et al., 2007; SEVÁ et al., 2010).

Na maioria dos casos, a infecção em cães por *Cryptosporidium* se apresenta na forma assintomática (GIANGASPERO et al., 2006; HANNES et al., 2007, JIAN et al., 2014). No entanto, podem ser observados sinais clínicos como diarreia severa, com síndrome de má absorção e perda de peso, variando conforme o estado imunológico do hospedeiro (GIZZI et al., 2004, IRWIN, 2002).

A ocorrência de criptosporidiose em cães está relacionada com a idade dos hospedeiros: cães filhotes apresentam uma maior prevalência quando comparados a cães adultos (BALASSIANO et al., 2009; HANNES et al., 2007; JIAN et al., 2014; OSMAN et al., 2015). Fatores relacionados à qualidade de vida do animal (acesso ao solo, higiene do ambiente onde o animal vive, fonte de água potável, presença de doença concomitante, nível de educação do

proprietário e visitas a clínicas veterinárias) podem desempenhar um importante papel na ocorrência da criptosporidiose (LA SAALA et al., 2015). Cães criados em abrigos e canis, onde ficam em contato direto com outros animais também apresentam uma maior prevalência (GIANGASPERO et al., 2006, JIAN et al., 2014; MUNDIN et al., 2007).

1.7. Participação de cães e gatos na epidemiologia da criptosporidiose humana

O crescente número de animais de companhia, principalmente em áreas urbanas, tem estreitado o contato entre estes e o homem, aumentando a exposição humana a agentes zoonóticos (GENNARI et al., 1999).

O fato de humanos se infectarem geralmente pelas espécies *C. hominis* e *C. parvum* faz com que cães e gatos sejam considerados como animais que oferecem risco mínimo como potencial reservatório de criptosporidiose, já que estes na maioria das vezes, apresentarem infecção por *C. canis* e *C. felis*, respectivamente. Apesar da participação de cães e gatos na criptosporidiose humana ainda não ser sido muito esclarecida, muitos trabalhos têm relatado a infecção em humanos por *C. canis* (ADAMU et al., 2014; GATEI et al., 2008; LALONDE et al., 2013; LUCCA et al., 2009; MOLLOY et al., 2010) e por *C. felis* (ADAMU et al., 2014; CACCIÓ et al., 2002; LEONI et al., 2006; LLORENTE et al., 2006; LUCCA et al., 2009; MATOS et al., 2004; MBAE et al., 2015; PEDRAZA-DÍAZ et al., 2001; XIAO et al., 2001). Além disso, tanto os cães como os gatos podem ser infectados por *C. parvum* (SARGENT et al., 1998; SIMONATO et al., 2015; SOTIRIADOU et al., 2013), que é uma espécie zoonótica de grande importância na epidemiologia da criptosporidiose.

Já foi relatada associação entre a criptosporidiose em idosos e seus respectivos gatos domiciliados (PEREIRA; FERREIRA, 2012), embora não tenha sido realizada a caracterização molecular para determinação da espécie isolada.

Beser et al. (2015) relataram uma possível transmissão zoonótica de *C. felis* de um gato para o seu dono na Suécia. O animal apresentou diarreia crônica e perda de peso meses antes de sua dona também apresentar quadro de diarreia. Foram verificadas em ambos os hospedeiros sequências idênticas de *C. felis* para os genes SSU rRNA, HSP70 e COWP (“*Cryptosporidium* Oocyst Wall Protein”).

Cryptosporidium pode causar diarreia grave em crianças, particularmente em crianças desnutridas, levando a um impacto significativo no crescimento e função cognitiva das mesmas (CHECKLEY et al., 2015).

A possível transmissão de *Cryptosporidium* entre crianças e um cão que viviam na mesma casa foi relatado por Xiao et al. (2014). Uma menina de três anos e seu irmão de seis anos e meio de idade apresentaram diarreia transitória ao mesmo tempo. Por meio de microscopia, ambos foram confirmados como positivos para *Cryptosporidium* spp.. Foram colhidas amostras fecais dos animais da casa, quando um cão assintomático também apresentou positividade para *Cryptosporidium* spp.. A caracterização molecular das amostras permitiu a identificação de *C. canis* nos três hospedeiros.

1.8. Métodos de diagnóstico da infecção por *Cryptosporidium*

A experiência é um fator fundamental para diagnóstico de criptosporidiose, uma vez que os oocistos e outros estágios de desenvolvimento do gênero *Cryptosporidium* estão entre os menores dentre os coccídios, além de serem muito similares às leveduras, tanto em tamanho quanto forma, o que pode resultar em diagnóstico falso-positivo (SRÉTER; VARGA, 2000; XIAO et al., 2004).

O ideal na identificação de *Cryptosporidium* é uma abordagem polifásica, utilizando-se análise morfológica dos oocistos, técnicas moleculares e características biológicas, como a especificidade por hospedeiros, patogenicidade, períodos pré-patente e patente e intensidade de excreção de oocistos (EGYED et al., 2002). Cada método possui uma finalidade específica,

e apresenta vantagens e desvantagens. Quando se deseja avaliar a presença do parasito, exames parasitológicos de fezes e colorações especiais são suficientes. Caso o objetivo seja a determinação da espécie de *Cryptosporidium* envolvida, torna-se necessário então o uso de métodos moleculares. No entanto, quando o objetivo é determinar se o hospedeiro foi exposto ao protozoário, os métodos sorológicos podem ser utilizados.

1.8.1. Visualização de oocistos e outros estágios evolutivos por métodos de concentração e/ou coloração

A análise morfológica de oocistos não é definitiva para a identificação da espécie, pois devido ao fato de os oocistos serem muito pequenos, estes podem apresentar variações morfológicas imperceptíveis, ou mesmo serem idênticos entre as diferentes espécies (MORGAN et al., 1999; FAYER et al., 2000; FALL et al., 2003).

Um dos métodos mais utilizados na detecção de oocistos a partir de amostras fecais é o método de centrífugo-flutuação em solução de Sheather (CURRENT, 1990). Nesta técnica as amostras devem ser examinadas rapidamente, pois quando os oocistos de *Cryptosporidium* ficam expostos por muito tempo em soluções de alta densidade, estes podem sofrer distorções ou rompimento da parede, levando a resultados errôneos. Para visualização dos oocistos, utiliza-se microscopia óptica de campo claro ou de contraste de fase (XIAO; FENG, 2008). Os oocistos são visualizados como corpos brilhantes contendo grânulos negros, quando visualizados em contraste de fase; em microscópio de campo claro, os oocistos aparecem translúcidos, muitas vezes como estruturas levemente rosadas, contendo grânulos em seu interior (SRÉTER; VARGA, 2000).

Existem ainda outras técnicas que podem ser empregadas na detecção de oocistos de *Cryptosporidium*, como a coloração negativa com verde malaquita e a técnica de Kinyoun (álcool ácido resistente). Na coloração com verde malaquita, os oocistos são vistos como estruturas brilhantes em um

fundo verde (ELLIOT et al., 1999), enquanto na técnica de Kinyon os oocistos aparecem como coloração rosa a vermelha contra um fundo verde (MA; SOAVE, 1983).

A visualização de *Cryptosporidium* em tecidos pode também ser realizada com uso da técnica de coloração de Kinyoun, por meio de esfregaços de mucosas, que permite excelente visualização de estágios evolutivos de *Cryptosporidium* (LATIMER et al., 1988). Para visualização de *Cryptosporidium* em tecidos, a técnica comumente utilizada é a hematoxilina-eosina (HE), onde os estágios evolutivos são visualizados como corpos esféricos basófilos, de 2,0 a 7,5 μm , localizados na superfície das células epiteliais (dependendo do estágio do ciclo biológico) dos cortes histológicos. Outras técnicas que podem ser utilizadas são colorações à base de prata e ácido periódico de Schiff. A microscopia eletrônica de transmissão permite a visualização de morfologia ultra-estrutural do parasito (PETRY, 2004; VALIGUROVÁ et al., 2008).

1.8.2. Métodos imunológicos

Os testes imunológicos têm sido utilizados em substituição à análise microscópica em fezes, para pesquisa de oocistos ou de antígenos solúveis (KHEL et al., 1995), pois apresentam melhor sensibilidade e especificidade quando comparadas às técnicas tradicionais de coloração, e por reduzirem o tempo gasto na detecção dos oocistos (ARROWOOD; STERLING, 1989; JOHNSTON et al., 2003).

Dentre os métodos, destacam-se o ensaio imunoenzimático (FAYER et al., 2000; JEX et al., 2008; SILVA et al., 2003) e a reação de imunofluorescência direta (BIALEK et al., 2002; FAYER et al., 2000; JEX et al., 2008).

Apesar de oferecerem algumas vantagens no diagnóstico da criptosporidiose em relação à microscopia por se tratarem de testes rápidos, simples, sensíveis e específicos, os métodos imunológicos também não

permitem a identificação de espécies ou genótipos de *Cryptosporidium* envolvidos na infecção (JEX et al., 2008).

1.8.3. Métodos moleculares

A caracterização molecular de *Cryptosporidium* é geralmente realizada por meio da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e suas variantes, seguida de análise do tamanho dos fragmentos amplificados por PCR e digeridos por enzimas de restrição (RFLP), ou de sequenciamento dos fragmentos amplificados, permitindo a diferenciação entre as diferentes espécies de *Cryptosporidium* (SARGENT et al., 1998; MORGAN et al., 1999; SRÉTER; VARGA, 2000; JEX et al., 2008).

O *locus* mais utilizado é o gene da subunidade 18S do gene do RNA ribossômico (18S rRNA), que apresenta cinco cópias por genoma e menor polimorfismo por apresentar evolução mais lenta, sendo escolhido para o uso em amostras de animais que possam estar infectados por espécies ou genótipos ainda não classificados (SPANNO et al., 1998; XIAO et al., 1999a; MORGAN et al., 2000; XIAO et al., 2000a).

Outros *loci* também podem ser utilizados, como o gene da actina (SULAIMAN et al., 2002), da proteína do choque térmico (HSP70) (SULAIMAN et al., 2000) e da proteína da parede de oocistos-COWP (XIAO et al., 2000). Estes genes apresentam alto polimorfismo interespecíes, o que os tornam importantes ferramentas na análise genética de espécies ou genótipos geneticamente similares (XIAO et al., 2004).

Outra técnica que também vem sendo utilizada no diagnóstico da criptosporidiose é a PCR em tempo real. Esta técnica tornou-se um método alternativo à PCR convencional, proporcionando um resultado mais rápido, diminuindo possíveis contaminações com *amplicons*, além de dispensar a análise dos fragmentos amplificados por eletroforese em gel de agarose, sendo possível a visualização dos resultados preliminares antes do término da reação. Na literatura já existem vários relatos do uso da PCR em tempo real na

detecção e/ou identificação de espécies de *Cryptosporidium* em humanos (BOUZID et al., 2016; HADFIELD et al., 2011; JOTHIKUMAR et al., 2008; STROUP et al., 2006; ZEBARDAST et al., 2016) e em animais (HOMEM et al., 2012; NAKAMURA et al., 2014; SILVA et al., 2014; YANG et al., 2009).

2. Objetivos

O presente estudo teve como objetivo identificar a presença de *Cryptosporidium* em amostras fecais de cães e gatos seguido de caracterização molecular dos isolados, bem como o desenvolver uma PCR em tempo real para amplificação de fragmento parcial do gene da proteína HSP70 para detecção de DNA de *C. canis* em amostras fecais de cães.

3. Referências bibliográficas

ABRAHAMSEN, M.S.; TEMPLETON, T.J.; ENOMOTO, S.; ABRAHANTE, J.E.; ZHU, G. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. **Science**, v.304, p.441- 445, 2004.

ADAMU, H.; PETROS B.; ZHANG, G.; KASSA, H.; AMER, S.; YE, J.; FENG, Y.; XIAO, L. Distribution and clinical manifestations of *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV/AIDS patients in Ethiopia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, doi: 10.1371, 2014.

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

ALVAREZ-PELLITERO, P.; QUIROGA, M.; SITJÀ-BOBADILLA, A.; REDONDO, M.J.; PALENZUELA, O.; PADRÓS, F.; VÁZQUEZ, 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.23, p.133-445, 2004.

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

ANDERSON, B.C. Moist heat inactivation of *Cryptosporidium* sp. **American Journal of Public Health**, v.75, p.1433-1444, 1985

ARROWOOD, M.J.; STERLING, C.R. Comparison of conventional staining methods and monoclonal antibody-based methods for *Cryptosporidium* oocyst detection. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, p.1490-1495, 1989.

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

BAJER, A.; BEDNARKSA, M.; RODO, A. Risk factors and control of intestinal parasite infections in sled dogs in Poland. **Veterinary Parasitology**, v.175, p.343-350, 2011.

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

BALLWEBER, L.R.; PANUSKA, C.; HUSTON, C.L.; VASILOPULOS, R.; PHARR, G.T.; MACKIN, A. Prevalence of and risk factors associated with shedding of *Cryptosporidium felis* in domestic cats of Mississippi and Alabama. **Veterinary Parasitology**, v.160, p. 306-310, 2009.

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.

BESER, J.; TORESSON, L.; EITREM, R.; TROELL, KRUSNELL, J.W.; LEBBAD, M. Possible zoonotic transmission of *Cryptosporidium felis* in a household. **Infection Ecology and Epidemiology**, v.5, e: 28463, 2015.

BIALEK, R.; BINDER, N.; DIETZ, K. Comparison of fluorescence, antigen and PCR assays to detect *Cryptosporidium parvum* in fecal specimens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 43, p. 283-288, 2002.

BOROWSKI, H.; CLODE, P.L.; THOMPSON, A.R.C. Active invasion and/or encapsulation? A reappraisal of host-cell parasitism by *Cryptosporidium*. **Trends in Parasitology**, v. 24 p.509-516, 2008.

BOUZID, M.; ELWIN, K.; NADER, J.L.; CHALMERS, R.M.; HUNTER, P.R.; TYLER, K.M. Novel real-time PCR assays for the specific detection of human infective *Cryptosporidium* species. **Virulence**, v.7, p.395–399, 2016.

BOWMAN, D.D.; LUCIO-FOSTER, A. Cryptosporidiosis and giardiasis in dogs and cats: Veterinary and public health importance. **Experimental Parasitology**, v.124, p.121-127, 2010.

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.

CACCIÓ, S.; PINTER, E.; FANTINI, R.; MEZZAROMA, I.; POZIO, E. Human Infection with *Cryptosporidium felis*: Case Report and Literature Review. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, p.85-86, 2002.

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

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.

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

CHERMETTE, R., BOUFASSA-OUZROUT, S. Cryptosporidiosis: a Cosmopolitan Disease in Animals and in Man. 2. ed. p.122. Paris: OIE, 1988.

COELHO, W.M.D.; AMARANTE, A.F.T.; SOUTELLO, R.V.G.; MEIRELES, M.V.; BRESCIANI, K.D.S. Occurrence of gastrointestinal parasites in fecal samples of cats in Andradina City, São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.18, p.46-49, 2009.

CURRENT, W.L. Techniques and laboratory maintenance of *Cryptosporidium*. In: DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; FAYER, R. (Eds). **Cryptosporidiosis of man and animals**. Boca Raton: CRS, 1990. p.31-49.

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.

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.

DILLINGHAMAA, 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.

EGYED, Z.; SRÉTER, T.; SZELL, Z.; BESZTERI, B.; DOBOS-KOVACS, M.; MARIALIGETI, K.; CORNELISSEN, W.C.A.; VARGA, I. Polyphasic typing of *Cryptosporidium baileyi*: a suggested model for characterization of cryptosporidia. **Journal of Parasitology**, v.88, p.237-243, 2002.

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

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

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

FALL, A.; THOMPSON, R. C. A.; HOBBS, R. P.; MORGAN-RYAN, U. Morphology is not a reliable tool for delineating species within *Cryptosporidium*. **Journal of Parasitology**, v. 59, p. 399-402, 2003.

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

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

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

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

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

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

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

FAYER, R.; TROUT, J.M.; JENKINS, M.C. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. **Journal of Parasitology**, v.84, p.1165-1169, 1998.

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

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

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.

FUNADA, M.R.; PENA, H.F.J.; SOARES, R.M.; AMAKU, M.; GENNARI, S.M. Frequency of gastrointestinal parasites in dogs and cats referred to a veterinary school hospital in the city of São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.59, p.1338-1340, 2007.

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

GELLETLIE, R.; STUART, J.; SOLTANPOOR, N.; ARMSTRONG, R.; NICHOLS, G. Cryptosporidiosis associated with school milk. **Lancet**, v.350, p.1005-1006, 1997.

GENNARI, S. M.; KASAI, N.; PENA, H. F. DE J.; CORTEZ, A. Occurrence of protozoa and helminths in faecal samples of dogs and cats from São Paulo city. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.36, n.2, p.193-197, 1999.

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

GIZZI, A.B.R.; OLIVEIRA, S.T.; LEUTENEGGER, C.M.; ESTRADA, M.; KOZEMJAKIN, D.A.; STEDILE, R.; MARCONDES, M.; BIONDO, A.W. Presence of infectious agents and co-infections in diarrheic dogs determined with a real-time polymerase chain reaction-based panel. **BMC Veterinary Research**, v.10, p.23-30, 2014.

GRACZYK, T.K.; CRANFIELD, M.R.; FAYER, R. Evaluation of commercial enzyme immunoassay (EIA) and immunofluorescent antibody (IFA) test kits for detection of *Cryptosporidium* oocysts of species other than *Cryptosporidium parvum*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.54, p.274-279, 1996.

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

HANNES, 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, p.22-31, 2007.

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

HOMEM, C.G.; NAKAMURA, A.A.; SILVA, D.C.; TEIXEIRA, W.F.P.; COELHO, W.M.D.; MEIRELES, M.V. Real-time PCR assay targeting the actin gene for the detection of *Cryptosporidium parvum* in calf fecal samples. **Parasitology Research**, v.110, p.1741-1745, 2012.

HOOPES, J.; HILL, J.E.; POLLEY, L.; FERNANDO, F.; WAGNER, B.; SCHURER, J.; JENKINS, E. Enteric parasites of free-roaming, owned, and rural cats in prairie regions of Canada. **The Canadian Veterinary Journal**, v.56, p.495–501, 2015.

IRWIN, P.J. Companion animal parasitology: a clinical perspective. **Internacional Journal of Parasitology**, v.32, p.581-593, 2002.

ISEKI, M. *Cryptosporidium felis* (Protozoa; Eimeriorina) from the domestic cat. **Japan Journal of Parasitology**, v.35, p.285–307, 1979.

ITO, Y.; ITOH, N.; KIMURA, Y.; KANAI, K. Molecular detection and characterization of *Cryptosporidium* spp. among breeding cattery cats in Japan. **Parasitology Research**, v.115, p.2121–2123, 2016.

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

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

JIAN, F.; QI, M.; HE, X.; WANG, R.; ZHANG, S.; DONG, H.; ZHANG, L. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* in dogs in Henan Province, China. **BMC Veterinary Research**, v.10, p.26-29, 2014.

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

JOHNSON, D.C.; REYNOLDS, K.A.; BERBA, C.P.; PEPPER, I.L.; ROSE, J.B. Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in marine waters. **Water Science Technology**, v.31, p.439-442, 1995.

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.

JOTHIKUMAR, N.; DA SILVA, A.J.; MOURA, I.; QVARNSTROM, Y.; HILL, V.R. Detection and differentiation of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* by dual TaqMan assays. **Journal of Medical Microbiology**, v.57, p.1099-1105, 2008.

KATAGIRI, S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G. Prevalence of Dog Intestinal Parasites and Risk Perception of Zoonotic Infection by Dog Owners in São Paulo State, Brazil. **Zoonoses and Public Health**, v.55, p.406–413, 2008.

KHEL, K. S. C.; CICIRELLO, H.; HAVENS, P. L. Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 416-418, 1995.

KOOMPAPONG, K.; MORI, H.; THAMMASONTHIJAREN, N.; PRASERTBUN, R.; PINTONG, A.; POPRUK, S.; ROJEKITTIKHUM, W.; CHAISIRI, K.; SUKTHANA, Y.; MAHITTIKORN, A. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in seagulls, pigeons, dogs, and cats in Thailand. **Parasite**, v.21, p.52-58, 2014.

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

KVÁČ, M.; HOFMANNOVÁ, L.; HLASKOVÁ, L.; KVĚTONOVÁ, D.; VÍTOVEC, J.; McEVOY, J.; SAK, B. *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. **Veterinary Parasitology**, v.201, p.9-17, 2014.

KVÁČ, M.; HAVRDOVÁ, N.; HLÁSKOVÁ, L.; DAŇKOVÁ, T.; KANDĚRA, J.; JEŽKOVÁ, J.; VÍTOVEC, J.; SAK, B.; ORTEGA, Y.; XIAO, L.; MODRÝ, D.; CHELLADURAI, J.R.J.J.; PRANTLOVÁ, V.; McEVOY, J. *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Molecular and biological evidence of cryptic species within gastric *Cryptosporidium* of mammals. **PLoS One**, v.11, doi: 10.1371, 2016.

LAKE IR1, HARRISON FC, CHALMERS RM, BENTHAM G, NICHOLS G, HUNTER PR, KOVATS RS, GRUNDY C. Case-control study of environmental and social factors influencing cryptosporidiosis. **European Journal of Epidemiology**, v.22, p.805-811, 2007.

LALONDE, L.F.; REYES, J.; GAJADHAR, A.A. Application of a qPCR assay with melting curve analysis for detection and differentiation of protozoan oocysts in human fecal samples from Dominican Republic. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.89, p.892–898, 2013.

LA SALA, L.F.; LEIBOFF, A.; BURGOS, J.M.; COSTAMAGNA, S.R. Spatial distribution of canine zoonotic enteroparasites in Bahía Blanca, Argentina. **Revista Argentina Microbiología**, v.47, p.17-24, 2015.

LABERGE, I.; GRIFFITHS, M.W.; GRIFFITHS, M.W. Prevalence, detection and control of *Cryptosporidium parvum* in food. **International Journal of Food Microbiology**, v.31, p.1-26, 1996.

LATIMER, K.S.; GOODWIN, M.A.; DAVIS, M.K. Rapid cytologic diagnosis of respiratory cryptosporidiosis in chickens. **Avian Diseases**, v.32, p.826-830, 1988.

LEARMONTH, J.J.; IONAS, G.; EBBETT, K.A.; KWAN, E.S. Genetic characterization and transmission cycles of *Cryptosporidium* species isolated from humans in New Zealand. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.3973-3978, 2004.

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

LEONI, F.; AMAR, C.; NICHOLS, G.; PEDRAZA-DÍAZ, S.; MCLAUCHLIN, J. Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p.703–707, 2006.

LEVINE, N.D. Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. **Journal of Parasitology**, v.66, p.830–834, 1980.

LI, X.; PEREIRA, M.G.C.; LARSEN, R.; XIAO, C.; PHILLIPS, R.; STRIBY, K.; McCOWAN, B.; ATWILL, E.R. *Cryptosporidium rubeyi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in multiple *Spermophilus ground squirrel* species. **Intercional Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v.4, p.343-350, 2015a.

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

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

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

LLORENTE, M.T.; CLAVEL, A.; VAREA, M.; GOÑI, M.P.; SAHAGÚN, J.; OLIVERA, S. *Cryptosporidium felis* Infection, Spain. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, p.1471-1472, 2006.

LUCCA, P.; DE GASPARI, E.N.; BOZOLLI, L.M.; FUNADA, M.R.; SILVA, S.O.S.; IULIANO, W.; SOARES, R.M. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from HIV infected patients from na urban area of Brazil. **Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine**, v.51, p.341-343, 2009.

LUCIO-FORSTER, A.; BOWMAN, D.D. Prevalence of fecal-borne parasites detected by centrifugal flotation in feline samples from two shelters in upstate New York. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.13, p.300-303, 2011.

LUCIO-FORSTER, A.; GRIFFITHS, J.K.; CAMA, V.A.; XIAO, L.; BOWMAN, D.D. Minimal zoonotic risk of cryptosporidiosis from pet dogs and cats. **Trends in Parasitology**, v.26, p.174-179, 2010.

MA, P.; SOAVE, R. Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. **Journal of Infectious Diseases**, v. 147, p. 824-828, 1983.

MACHADO, E.C.L.; STAMFORD, T.L.M.; ALVES, L.C.; MELO, R.G.; SHINOHARA, N.K.S. Effectiveness of *Cryptosporidium* spp. oocysts detection and enumeration methods in water and milk samples. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine and Animal Science**, v.58, p.432-439, 2006.

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.

MATOS, O.; ALVES, M.; XIAO, L.; CAMA, V.; ANTUNES, F. *Cryptosporidium felis* and *C. meleagridis* in persons with HIV, Portugal. **Emerging and Infectious Diseases**, v.10, p.2256-2257, 2004.

MBAE, C.; MULINGE, E.; WARURU, A.; NGUGI, B.; WAINAINA, J.; KARIUKI, S. Genetic Diversity of *Cryptosporidium* in Children in an Urban Informal Settlement of Nairobi, Kenya. **PLoS One**. doi: 10.1371, 2015.

McGLADE, T.R.; ROBERTSON, I.D.; ELLIOT, A.D.; READ, C.; THOMPSON, R.C.A. Gastrointestinal parasites of domestic cats in Perth, Western Australia **Veterinary Parasitology**, v.117, p.251–262, 2003.

MEIRELES, M.V. *Cryptosporidium* infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. **Brazilian Journal of Parasitology**, v.19, p.197-204, 2010.

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.

MILLARD, P.S.; GENSHEIMER, K.F.; ADDISS, D.G.; SOSON, D.M.; BECKETT, G.A.; HOUCK-JANKOSKI, A.; HUDSON, A. An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider. **Journal of the American Medical Association**, v.272, p.1592-1196, 1994.

MOLLOY, S.F.; SMITH, H.V.; KIRWAN, P.; NICHOLS, R.A.B.; 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. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.82, p.608–613, 2010.

MONGE, R.; CHINCHILLA, M. Presence of *Cryptosporidium* oocysts in fresh vegetables. **Journal of Food Protection**, v.59, p.202-203, 1996.

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

MORGAN, U. M.; XIAO, L.; FAYER, R.; LAL, A. A.; THOMPSON, R. C. A. Variation in *Cryptosporidium*: towards a taxonomic revision of the genus. **International Journal for Parasitology**, v. 29, 1733-1751, 1999.

MORGAN, U. M.; XIAO, L.; LIMOR, J.; GELIS, S.; RAIDAL, S. R.; FAYER, R.; LAL, A.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R. C. *Cryptosporidium meleagridis* in na Indian ring-neck parrot (*Psittacula krameri*). **Australian Veterinary Journal**, v.78, p.182-183, 2000.

MONTICELLO, T.M.; LEVY, M.G.; BUNCH, S.E.; FAIRLY, R.A. Cryptosporidiosis in a feline leukaemia virus-positive cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.19, p. 705-706, 1987.

MULLER, A.N.B. **Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana de São Paulo**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

MTAMBO, M.M.; NASH, A.S.; BLEWETT, D.A.; SMITH, H.V.; WRIGHT, S. *Cryptosporidium* infection in cats: prevalence of infection in domestic and feral cats in the Glasgow area. **The Veterinary Record**, v.129, p.502-504, 1991.

MUNDIM, M.J.S.; ROSA, L.A.G.; HORTÊNCIO, S.M.; FARIA, E.S.M.; RODRIGUES, R.M.; CURY, M.C. Prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. In dogs from different living conditions in Uberlândia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.144, p.356–359, 2007.

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

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

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.

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

ORTEGA-MORA, L.M.; TRONCOSO, J.M.; ROJO-VÁSQUES, F.A.; GÓMEZBAUTISTA, M. Cross-reactivity of polyclonal serum antibodies generated against *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Infection and Immunity**, v.60, p.3442-3445, 1992.

PALMER, C.S.; TRAUB, R.J.; ROBERTSON, I.D.; DELVIN, G.; RESS, R.; THOMPSON, R.C.A. Determining the zoonotic significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Australian dogs and cats. **Veterinary Parasitology**, v.154, p.142-147, 2008.

PAOLETTI, B.; OTRANTO, D.; WEIGL, S.; GIANGASPERO, A.; DI CESARE, A.; TRAVERSA, D. Prevalence and genetic characterization of *Giardia* and *Cryptosporidium* in cats from Italy. **Research in Veterinary Science**, v.91, p.397-399, 2011.

PAOLETTI, B.; OTRANTO, D.; WEIGL, S.; GIANGASPERO, A.; DI CESARE, A.; TRAVERSA, D. Prevalence and genetic characterization of *Giardia* and *Cryptosporidium* in cats from Italy. **Research in Veterinary Science**, v.91, p.397-399, 2015.

PARIS, J.K.; WILLS, S.; BALZER, H.; SHAW, D.J.; GUNN-MOORE, D.A. Enteropathogen co-infection in UK cats with diarrhoea. **Veterinary Research**, v.10, p.2-11, 2014.

PAVLASEK, 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.

PAVLASEK, I.; RYAN, U. The first finding of a natural infection of *Cryptosporidium muris* in a cat. **Veterinary Parasitology**, v.144, n.3-4, p. 349-352, 2007.

PEDRAZA-DÍAS, S.; AMAR, C.; IVERSEN, A.M.; STANLEY, P.J.; MCLAUNCHLIN, J. Unusual *Cryptosporidium* species recovered from human faeces: first description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium* 'dog type' from patients in England. **Journal of Medical Microbiology**, v.50, p.293-296, 2001.

PEREIRA, C.R.A.; FERREIRA, A.P. Ocorrência e fatores de risco da criptosporidiose em felinos de companhia de idosos. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v.15, p.681-691, 2012.

PETRY, F. Structural Analysis of *Cryptosporidium parvum*. **Microscopy and Microanalysis**, v. 10, p. 586-601, 2004.

POWER, M.L.; RYAN, U.M. A new species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*). **Journal of Parasitology**, v.94, p. 1114-1117, 2008.

RAGOZO, A.M.A.; MURADIAN, V.; SILVA, J.C.R.; CARAVIERI, R.; AMAJONER, V.R.; MAGNABOSCO, C.; GENNARI, S.M. Occurrence of gastrointestinal parasites in feces of cats from the cities of São Paulo and Guarulhos. Braz. **Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39, p.244-246, 2002.

RAMBOZZI, L.; MENZANO, A.; MANNELLI, A.; ROMANO, S.; ISAIA, M.C. Prevalence of cryptosporidian infection in cats in Turin and analysis of risk factors. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.9, n.5, p.392-396, 2007.

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

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. Redescription of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): morphology, biology and phylogeny. **Internacional Journal for Parasitology**, v.40, p.1539–1548, 2010.

RYAN, U.M.; MONIS, P.; ENEMARK, H.L.; SULAIMAN, I.; SAMARASINGHE, B.; READ, C.; BUDDLE, R.; ROBERTSON, I.; ZHOU, L.; THOMPSON, R.C.; XIAO, L. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). **Journal of Parasitology**, v.90, p.769-773, 2004.

RYAN, U.; PAPARINI, A.; TONG, K.; YANG, R.; GIBSON-KUEH, S.; O'HARA, A.; LYMBERG, A.; XIAO, L. *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poeciliareticulata*). **Experimental Parasitology**, v.150, p.31-35, 2015.

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.; XIAO, L.; READ, C.; SULAIMAN, I.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.

SANTIN, M.; TROUT, J.M.; VECINO, J.A.C.; DUBEY, J.P.; FAYER, R. *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bienersi* in cats from Bogota (Colombia) and genotyping of isolates. **Veterinary Parasitology**, v.141, p.334-339, 2006.

SARGENT, K.D.; MORGAN, U.M.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R.C.A. Morphological and genetic characterization of *Cryptosporidium* oocysts from domestic cats. **Veterinary Parasitology**, v. 77, p. 221-227, 1998.

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

SCORZA, V.; WILLMOTT, A.; GUNN-MOORE, D.; LAPPIN, M.R. *Cryptosporidium felis* in faeces from cats in the UK. **Veterinary Record**, v.14, p.609-610, 2014.

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

SILVA, C.V.; FERREIRA, M.S.; GONÇALVES-PIRES, M.R.F.; COSTA-CRUZ, J.M. Detection of *Cryptosporidium*-specific coproantigen in human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome patients by using a commercially available immunoenzymatic assay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, p.1097-1099, 2003.

SILVA, D.C.; PAIVA, P.R.; NAKAMURA, A.A.; HOMEM, C.G.; DE SOUZA, M.S.; GREGO, K.F.; MEIRELES, M.V. The detection of *Cryptosporidium serpentis* in snake fecal samples by real-time PCR. **Veterinary Parasitology**, v.204, p.134-138, 2014.

SIMONATO, G.; DI REGALBONO, A.F.; CASSINI, R.; TRAVERSA, D.; BERALDO, P.; TESSARIN, C.; PIETROBELLI, M. Copromicroscopic and molecular investigations on intestinal parasites in kennelled dogs. **Parasitology Research**, v.114, p.1963-1970, 2015.

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

SMITH, J.L. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* as agents of food borne disease. **Journal of Food Protection**, v.56, p.451-461, 1993.

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, p.161-167, 2006.

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

SOTIRIADOU, I.; PANTCHEV, N.; GASSMANN, D.; KARANIS, P. Molecular identification of *Giardia* and *Cryptosporidium* from dogs and cats. **Parasite**, v.20, p.8-14, 2013.

SPANO, F.; PUTIGNANI, L.; CRISANTI, A.; SALLICANDRO, P.; MORGAN, U.M.; LE BLANCO S. M.; TCHACK, L.; TZIPORI, S.; WIDMER, G. Multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from different hosts and geographical origins. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.3255-3259, 1998.

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

STROUP, S.E.; ROY, S.; MCHELE, J.; MARO, V.; NTABAGUZI, S.; SIDDIQUE, A.; KANG, G.; GUERRANT, R.L.; KIRKPATRICK, B.D.; FAYER, R.; HERBEIN, J.; WARD, H.; HAQUE, R.; HOUP, E.R. Real-time PCR detection and speciation of *Cryptosporidium* infection using scorpion probes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 1217-1222, 2006.

SULAIMAN, I. M.; LAL, A. A.; XIAO, L. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. **Journal of Parasitology**, v.88, p. 388-394, 2002.

SULAIMAN, I.M.; MORGAN, U.M.; THOMPSON, R.C.A.; LAL, A.A.; XIAO, L. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.2385–2391, 2000.

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

TZIPORI, S.; CAMPBELL, I. Prevalence of *Cryptosporidium* Antibodies in 10 Animal Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.14, p.455-456, 1981.

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

TYZZER, E.E. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. **Journal of 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. **Archive fur Protistenkunde**, v.26, p.394- 412, 1912.

UEHLINGER, F.D.; GREENWOOD, S.J.; MCCLURE, J.T.; CONBOY, G.; O'HANDLEY, R.; BARKEMA, H.W. Zoonotic potential of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. and prevalence of intestinal parasites in young dogs from different populations on Prince Edward Island, Canada. **Veterinary Parasitology**, v.196, p.509–514, 2013.

VALIGUROVÁ, A.; JIRKŮ, M.; KOUDELA, B.; GELNAR, M.; MODRÝ, D.; ŠLAPETA, J. Cryptosporidia: Epicellular parasites embraced by the host cell membrane. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 913-922, 2008.

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

WARD, L. A.; WANG, Y. Rapid methods to isolate *Cryptosporidium* DNA from frozen feces for PCR. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 41, p. 37-42, 2001.

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.; 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, p.492-497, 2001.

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

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

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

XIAO, L.; 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.; FENG, Y. Zoonotic cryptosporidiosis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.52, p.309-323, 2008.

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 coevolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. **Internacional Journal of Parasitology**, v.32, p.1773-1785, 2002.

XIAO, L.; CAMA, V.A.; CABRERA, L.; ORTEGA, Y.; PEARSON, J.; GILMAN, R.H. Possible Transmission of *Cryptosporidium canis* among Children and a Dog in a Household. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.2014–2016, 2007.

XU, H.; JIN, H.; WU, W.; LI, P.; WANG, L.; LI, N.; FENG, Y.; XIAO, L. Genotypes of *Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon bieneusi* and *Giardia duodenalis* in dogs and cats in Shanghai, China. **Parasites & Vectors**, v.9, p.121-129, 2016.

YANG, R.; JACOBSON, C.; GORDON, C.; RYAN, U. Prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* species in pre-weaned sheep in Australia. **Veterinary Parasitology**, v.161, p.19-24, 2009.

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

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.

YOSHIUCHI, R.; MATSUBAYASHI, M.; KIMATA, I.; FURUYA, M.; TANI, T.; SASAI, K. Survey and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in owned companion animal, dogs and cats, in Japan. **Veterinary Parasitology**, v.174, p.313–316, 2010.

ZEBARDAST, M.; YEGANEH, F.; GHARAVI, M.J.; ABADI, A.; TABAEIE, S.J.S.; HAGHIGHI, A. Simultaneous detection and differentiation of *Entamoeba histolytica*, *E.dispar*, *E. moshkovskii*, *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium* spp. in human fecal samples using multiplex PCR and qPCR-MCA. **Acta Tropica**, v.162, p.233–238, 2016.

CAPÍTULO 2. OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp. EM AMOSTRAS FECALIS DE GATOS PROVENIENTES DO ESTADO DE SÃO PAULO

HOMEM, C.G.; MEIRELES, M.V.

UNESP, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Programa de Pós Graduação em Ciência Animal - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Rua Clóvis Pestana, nº 793, CEP 16050-680, Bairro Dona Amélia, Araçatuba - SP. milahomem@hotmail.com

RESUMO: *Cryptosporidium* spp. é um protozoário que representa importante causa de morbidade e mortalidade em crianças de zero a cinco anos de idade e em pacientes imunodeficientes. *Cryptosporidium felis* é a espécie mais prevalente em gatos, mas já foi descrito em crianças, pacientes imunocomprometidos e indivíduos imunocompetentes. O objetivo deste trabalho foi identificar a presença de *Cryptosporidium* em amostras fecais de gatos com posterior caracterização molecular dos isolados. Um total de 300 amostras fecais de gatos de todas as idades foram colhidas nas cidades de Araçatuba e Jaboticabal (SP). A nested PCR para amplificação do fragmento da subunidade do gene 18S rRNA foi realizada em todas amostras para identificação de *Cryptosporidium* spp., seguida de sequenciamento dos fragmentos amplificados. A positividade para *Cryptosporidium* spp. pela nested PCR em amostras de gatos foi de 11,33% (34/300), sendo que das provenientes de adultos 10,04% (25/249) foram positivas. Dentre as amostras de filhotes 17,65% (9/51) foram positivas. O sequenciamento dos fragmentos amplificados permitiu a identificação de três amostras como *C. felis*, o que permite concluir que os gatos de área urbana podem atuar como reservatório de *C. felis* para o homem.

Palavras-chave: *Cryptosporidium felis*, PCR, felinos.

SUMMARY: *Cryptosporidium* spp. is a protozoan that represents an important cause of morbidity and mortality in children from zero to five years of age and in immunocompromised patients. *Cryptosporidium felis* is the most prevalent species in cats, but has been described in children, immunocompromised patients and immunocompetent individuals. The aim of this work was to identify the presence of *Cryptosporidium* in fecal samples from cats with subsequent molecular characterization of the isolates. A total of 300 fecal samples of cats of all ages were collected in the cities of Araçatuba and Jaboticabal (SP). Nested PCR for amplification of the 18S rRNA gene subunit fragment was performed on all samples for identification of *Cryptosporidium* spp., followed by sequencing the amplified fragments. The positivity for *Cryptosporidium* spp. by nested PCR in samples of cats was 11.33% (34/300), and of those from adults was 10.04% (25/249) were positive. Among the pups samples, 17.65% (9/51) were positive. The sequencing of the amplified fragments allowed the identification of three samples such as *C. felis*, which allows to conclude that the cats of urban area can act as reservoir of *C. felis* for man.

Keywords: *Cryptosporidium felis*, PCR, feline.

Introdução

Cryptosporidium spp. é considerado um patógeno emergente, tendo sido incluído pela Organização Mundial da Saúde (OMS) na “Iniciativa das Doenças Negligenciadas”, na qual estão incluídas enfermidades bacterianas, parasitárias e virais que acometem o homem (SAVIOLI et al., 2006). Em países em desenvolvimento, o protozoário representa importante causa de morbidade e mortalidade em crianças de zero a cinco anos de idade e em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (ASHBOLT, 2004; GATEI et al., 2002; LEAV et al., 2003; OSHIRO et al., 2000).

A infecção em seres humanos é comumente causada por *C. hominis*, que infecta o homem, ou por *C. parvum*, que é responsável por infecções zoonóticas amplamente descritas na literatura (FAYER et al., 2000; MILLARD et al., 1994; PREISER et al., 2003; SULAIMAN et al., 1998). Contudo *C. felis*, *C. canis*, *C. meleagridis*, *C. cuniculus*, *C. suis*, *C. andersoni*, *C. ubiquitum* (genótipo cervídeo) e *C. muris* também podem infectar os seres humanos, especialmente crianças e pacientes imunossuprimidos (XIAO et al., 2010).

C. felis já foi descrito em crianças (CAMA et al., 2008; LLORENTE et al., 2006; MBAE et al., 2015; XIAO et al., 2001). Muitos estudos relatam a presença desta espécie em pacientes imunocomprometidos (ADAMU et al., 2014; CACCIÓ et al., 2002; CIELOSZYK et al., 2012; LEONI et al., 2006; LUCCA et al., 2009; MATOS et al., 2004), mas indivíduos imunocompetentes também podem ser acometidos (BESER et al., 2015; PEDRAZA-DÍAZ et al., 2001).

Em gatos prevalece a infecção por *C. felis* (PALMER et al., 2008), mas existe ainda relatos de infecção por *C. muris* (BOWMAN; LUCIO-FOSTER, 2010; FITZGERALD et al., 2011, PAVLASEK; RYAN, 2006). A primeira descrição de *Cryptosporidium* spp. em gatos foi feita por Iseki em 1979, no Japão. A maioria dos trabalhos descreve infecção assintomática da criptosporidiose felina, no entanto o animal pode desenvolver diarreia severa e consequente perda de peso (BESER et al., 2015).

Dentre as diferentes técnicas utilizadas na detecção de *Cryptosporidium* estão: visualização de oocistos em amostras fecais por meio de microscopia, (utilizando diversas técnicas de coloração ou imunofluorescência), ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de antígenos solúveis em fezes e a reação em cadeia pela polimerase (PCR) *nested* e suas variantes para amplificação de DNA. No entanto, os métodos de microscopia e ELISA apresentam baixa sensibilidade quando comparados aos métodos moleculares, e não permitem a identificação da espécie do parasito, enquanto que o uso da PCR *nested* possibilita o seqüenciamento dos fragmentos amplificados para identificação das espécies (JEX et al., 2008).

Várias zoonoses parasitárias estão associadas ao contato humano com animais de companhia, principalmente cães e gatos (RAGOZO et al., 2002). Infecção por *Cryptosporidium* spp. é relativamente comum em gatos e estudos epidemiológicos realizados no mundo todo relatam que a prevalência em gatos varia de 0 a 29,4% (LUCIO-FOSTER et al., 2010). O estreito contato entre a crianças e/ou pessoas imunocomprometidas pode favorecer a transmissão zoonótica de *Cryptosporidium* spp (CIELOSZYK et al., 2012).

O objetivo do trabalho foi identificar a presença de *Cryptosporidium* em amostras fecais de gatos e posteriormente realizar a caracterização molecular dos isolados.

Material e métodos

Colheita de amostras e extração do DNA genômico

As amostras foram obtidas por conveniência a partir de gatos provenientes de residências, criatórios comerciais, Organizações Não Governamentais (ONG) protetoras de animais e Centro de Controle de Zoonoses das cidades de Araçatuba e Jaboticabal, no interior do estado de São Paulo. Foram utilizadas 300 amostras fecais de gatos colhidas logo após a eliminação pelo animal, sendo 50 de gatos filhotes (até um ano de idade) e 116

de gatos adultos (acima de um ano de idade) da cidade de Araçatuba, e um gato filhote e 133 gatos adultos da cidade de Jaboticabal.

Assim que colhido, o material foi armazenado a 4°C em recipientes plásticos estéreis de 50 mL, em solução de bicromato de potássio 2,5% (concentração final). Após este passo as amostras foram submetidas ao processo de purificação pela técnica de centrífugo-sedimentação em água/éter (MELONI; THOMPSON, 1996).

O DNA genômico foi extraído a partir do sedimento resultante do processo de purificação, por meio da técnica descrita por SILVA et al. (2010).

Nested PCR e sequenciamento dos fragmentos amplificados

Para amplificação de fragmentos do gene da 18S do rRNA foi utilizada a *nested* PCR (XIAO et al., 2000), com oligonucleotídeos iniciadores 5' TTCTAGAGCTAATACATGCG 3' e 5' CCCATTTCCTTCGAAACAGGA 3' para a reação primária (1325 bp) e 5' GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG 3' e 5' AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA 3' para a reação secundária (826-840 pb), nas seguintes condições de reação: 25µL de solução contendo 2,5 µL de tampão para PCR 1 x, MgCl₂ a 2,5 mM, 1 U de Taq DNA polimerase, 200 M de cada desoxiribonucleotídeo, 100 nM de cada oligonucleotídeo iniciador e 2,5µL de DNA alvo nas duas reações. As amostras foram submetidas à desnaturação inicial do DNA a 94°C por 3 minutos, seguida de 34 ciclos, cada um consistindo em desnaturação a 94°C por 45 segundos, 45 segundos de anelamento a 50°C e 60 segundos de extensão a 72°C, com extensão final a 72°C por 7 minutos.

Amostras que apresentaram amplificação intensa do fragmento de DNA, visualizadas por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5%, foram purificadas utilizando-se o *kit* QIAquick® Gel Extraction (Qiagen), e sequenciadas com utilização do ABI Prism® *Dye Terminator* 3.1, em sequenciador automático ABI 3730XL (Applied Biosystems). As reações de sequenciamento foram realizadas nas duas direções, com os oligonucleotídeos iniciadores da *nested* PCR.

Resultados e discussão

Das 300 amostras de gatos, 34 (11,33%) foram positivas pela *nested* PCR. Na literatura são relatadas taxas de positividade em amostras fecais de gatos variando de zero a 29,4% (COELHO et al., 2009; ITO et al., 2016; KOOMPAPONG et al., 2014; LI et al., 2015; LUCIO-FOSTER et al., 2010; MANCIATI et al., 2015; PALMER et al., 2008; PAOLETTI et al., 2011; PARIS et al., 2014; XU et al., 2016; YANG et al., 2015). No entanto, pelo fato de que diferentes técnicas de diagnóstico foram utilizadas nesses relatos, não é possível realizar a comparação com os resultados deste trabalho.

Do total de amostras provenientes de adultos (249), 10,04% (25 amostras) foram positivas pela *nested* PCR. Dentre as 51 amostras de filhotes, nove (17,65%) foram positivas. Alguns autores descrevem maior prevalência de criptosporidiose em gatos com menos de um ano de idade (PALMER et al., 2008; PARIS et al., 2014; RAMBOZZI et al., 2007; SANTÍN et al., 2006), no entanto Yang et al. (2015) encontrou positividade maior em gatos com mais de 6 anos de vida. Sistema imunológico imaturo e falta de imunidade por exposição anterior são possíveis explicações para uma maior prevalência em filhotes (RAMBOZZI et al., 2007).

Para a cidade de Araçatuba, das 116 amostras de gatos de adultos, 16 (13,79%) foram positivas, e para filhotes nove amostras (18,0%) foram positivas. Das amostras de Jaboticabal, 6,77% (9 de 133) das amostras obtidas a partir de gatos adultos foram positivas e nenhuma amostra de filhote apresentou-se positiva pela *nested* PCR (Tabela 1). Coelho et al. (2009) encontraram uma positividade de 3,9% para *Cryptosporidium* na cidade de Andradina (também pertencente à microrregião de Araçatuba), mas com o uso técnica de coloração negativa com verde malaquita para detecção dos oocistos por microscopia. Utilizando-se também de microscopia, Gennari et al. (1999) encontraram uma positividade de 14,44% para *Cryptosporidium* em amostras fecais de gatos provenientes da cidade de São Paulo.

Tabela 1. Descrição das amostras, total de amostras (n), número e porcentagem de positivos para a presença de DNA de *Cryptosporidium* spp.

Amostras	n	Positivos (n)	%
Gatos Adultos Araçatuba	116	16	13,79
Gatos Filhotes Araçatuba	50	9	18
Gatos Adultos Jaboticabal	133	9	6,77
Gatos Filhotes Jaboticabal	1	0	0

Existem na literatura diversos estudos envolvendo a infecção de humanos por *C. felis* (ADAMU et al., 2014; CACCIÓ et al., 2002; LEONI et al., 2006; LUCCA et al., 2009; MATOS et al., 2004; PEDRAZA-DÍAS et al., 2001), o que desperta o interesse em estudos sobre a ocorrência do parasitismo por *C. felis* em gatos, e qual o papel destes animais na transmissão deste parasito ao homem. O seqüenciamento dos fragmentos amplificados permitiu a identificação com 99% de similaridade de três amostras como sendo *C. felis* (número de acesso AF112575 no GenBank). Um estudo no estado de São Paulo realizado por Thomaz et al. (2007) também encontrou isolados de *C. felis* em 7 amostras de gatos.

O presente estudo permitiu a identificação de *C. felis* em amostras fecais de gatos provenientes das regiões estudadas neste trabalho, podendo estes animais atuarem como reservatórios de *C. felis* para o homem.

Referências

ADAMU, H.; PETROS B.; ZHANG, G.; KASSA, H.; AMER, S.; YE, J.; FENG, Y.; XIAO, L. Distribution and clinical manifestations of *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV/AIDS patients in Ethiopia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, doi: 10.1371, 2014.

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

BESER, J.; TORESSON, L.; EITREM, R.; TROELL, K.; WINIECKA-KRUSNELL, J.; LEBBAD, M. Possible zoonotic transmission of *Cryptosporidium felis* in a household. **Infection Ecology & Epidemiology**, doi: 28.463, 2015.

BOWMAN, D.D.; LUCIO-FOSTER, A. Cryptosporidiosis and giardiasis in dogs and cats: Veterinary and public health importance. **Experimental Parasitology**, v.124, p.121-127, 2010.

CACCIÓ, S.; PINTER, E.; FANTINI, R.; MEZZAROMA, I.; POZIO, E. Human Infection with *Cryptosporidium felis*: Case Report and Literature Review. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, p.85-86, 2002.

CAMA, V.A.; BERN, C.; ROBERTS, J.; CABRERA, L.; STERLING, C.R.; ORTEGA, Y.; GILMAN, R.H.; XIAO, L. *Cryptosporidium* Species and Subtypes and Clinical Manifestations in Children, Peru. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, p.1567–1574, 2008.

CIELOSZYK, J.; GOÑI, P.; GARCÍA, A.; REMACHA, M.A.; SANCHÉZ, E.; CLAVEL, A. Two cases of zoonotic cryptosporidiosis in Spain by the unusual species *Cryptosporidium ubiquitum* and *Cryptosporidium felis*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.30, p.549–551, 2012.

COELHO, W.M.D.; AMARANTE, A.F.T.; SOUTELLO, R.V.G.; MEIRELES, M.V.; BRESCIANI, K.D.S. Ocorrência de parasitos gastrintestinais em amostras fecais de felinos no município de Andradina, São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.18, p.46-49, 2009.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S.J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: Transmission, detection and identification. **Internacional Journal of Parasitology**, v.30, p.12-13, 2000.

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

GATEI, W.; SUPUTTAMONGKOL, Y.; WAYMA, D.; ASHFORD, R.W.; BAILEY, J.W.; GREENSILL, J.; BEECHING, N.J.; HART, C.A. Zoonotic species of

Cryptosporidium are as prevalent as the anthroponotic in HIV-infected patients in Thailand. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.96, p.797-802, 2002.

GENNARI, S.M.; KASAI, N.; PENSA, H.F.J.; CORTEZ, A. Occurrence of protozoa and helminths in faecal samples of dogs and cats from São Paulo city. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v.36, p.87-91, 1999.

ISEKI, M. *Cryptosporidium felis* (Protozoa; Eimeriorina) from the domestic cat. **Japan Journal of Parasitology**, v.35, p.285–307, 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.304-317, 2008.

KOOMPAPONG, K.; MORI, H.; THAMMASONTHIJAREN, N.; PRASERTBUN, R.; PINTONG, A.; POPRUK, S.; ROJEKITTIKHUM, W.; CHAISIRI, K.; SUKTHANA, Y.; MAHITTIKORN, A. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in seagulls, pigeons, dogs, and cats in Thailand. **Parasite**, v.21, p.52-58, 2014.

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

LEONI, F.; AMAR, C.; NICHOLS, G.; PEDRAZA-DÍAZ, S.; MCLAUCHLIN, J. Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p.703–707, 2006.

LI, W.; LI, Y.; SONG, M.; LU, Y.; YANG, J.; TAO, W.; JIANG, Y.; WAN, Q.; ZHANG, S.; XIAO, L. Prevalence and genetic characteristics of

Cryptosporidium, *Enterocytozoon bienersi* and *Giardia duodenalis* in cats and dogs in Heilongjiang province, China. **Veterinary Parasitology**, v. 208, p.125–134, 2015.

LLORENTE, M.T.; CLAVEL, A.; VAREA, M.; GOÑI, M.P.; SAHAGÚN, J.; OLIVERA, S. *Cryptosporidium felis* Infection, Spain. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, p.1471-1472, 2006.

LUCCA, P.; DE GASPARI, E.N.; BOZOLLI, L.M.; FUNADA, M.R.; SILVA, S.O.S.; IULIANO, W.; SOARES, R.M. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from HIV infected patients from an urban area of Brazil. **Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine**, v.51, p.341-343, 2009.

ITO, Y.; ITOH, N.; KIMURA, Y.; KANAI, K. Molecular detection and characterization of *Cryptosporidium* spp. among breeding cattery cats in **Japan Parasitology Research**, v.115, p.2121–2123, 2016.

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

KOOMPAPONG, K.; MORI, H.; THAMMASONTIJAREN, N.; PRASERTBUN, R.; PINTONG, A.; POPRUK, S.; ROJEKITTIKHUM, W.; CHAISIRI, K.; SUKTHANA, Y.; MAHITTIKORN, A. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in seagulls, pigeons, dogs, and cats in Thailand. **Parasite**, v.21, p.52-58, 2014.

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

LEONI, F.; AMAR, C.; NICHOLS, G.; PEDRAZA-DÍAZ, S.; MCLAUCHLIN, J. Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p.703–707, 2006.

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

LLORENTE, M.T.; CLAVEL, A.; VAREA, M.; GOÑI, M.P.; SAHAGÚN, J.; OLIVERA, S. *Cryptosporidium felis* Infection, Spain. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, p.1471-1472, 2006.

LUCCA, P.; DE GASPARI, E.N.; BOZOLLI, L.M.; FUNADA, M.R.; SILVA, S.O.S.; IULIANO, W.; SOARES, R.M. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from HIV infected patients from an urban area of Brazil. **Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine**, v.51, p.341-343, 2009.

LUCIO-FORSTER, A.; GRIFFITHS, J.K.; CAMA, V.A.; XIAO, L.; BOWMAN, D.D. Minimal zoonotic risk of cryptosporidiosis from pet dogs and cats. **Trends in Parasitology**, v.26, p.174-179, 2010.

MANCIATI, F.; NARDONI, S.; MUGNAINI, L.; ZAMBERNARDI, L.; GUERRINI, A.; GAZZOLA, V.; PAPINI, R.A. A retrospective molecular study of select intestinal protozoa in healthy pet cats from Italy. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.17, p.163–167, 2015.

MATOS, O.; ALVES, M.; XIAO, L.; CAMA, V.; ANTUNES, F. *Cryptosporidium felis* and *C. meleagridis* in persons with HIV, Portugal. **Emerging and Infectious Diseases**, v.10, p.2256-2257, 2004.

MBAE, C.; MULINGE, E.; WARURU, A.; NGUGI, B.; WAINAINA, J.; KARIUKI S. Genetic Diversity of *Cryptosporidium* in Children in an Urban Informal Settlement of Nairobi, Kenya. **PLoS One**. doi: 10.1371, 2015.

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

MILLARD, P.S.; GENSHEIMER, K.F.; ADDIS, D.G.; SOSIN, D.M.; HOUCK-JANKOSHI, A.; HUDSON, A. An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider. **Journal of American Medicine Association**, v.272, p.1592-1596, 1994.

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. **The Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine**, v.33, p.277-280, 2000.

PALMER, C.S.; TRAUB, R.J.; ROBERTSON, I.D.; DELVIN, G.; RESS, R.; THOMPSON, R.C.A. Determining the zoonotic significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Australian dogs and cats. **Veterinary Parasitology**, v.154, p.142-147, 2008.

PAOLETTI, B.; OTRANTO, D.; WEIGL, S.; GIANGASPERO, A.; DI CESARE, A.; TRAVERSA, D. Prevalence and genetic characterization of *Giardia* and *Cryptosporidium* in cats from Italy. **Research in Veterinary Science**, v.91, p.397-399, 2011.

PARIS, K.; WILLS, S.; BALZER, H.; SHAW, D.J.; GUNN-MOORE, D.A. Enteropathogen co-infection in UK cats with diarrhoea. **Veterinary Research**, v.10, p.2-11, 2014.

PAVLASEK, I.; RYAN, U. The first finding of a natural infection of *Cryptosporidium muris* in a cat. **Veterinary Parasitology**, v.144, p.349-352, 2006.

PEDRAZA-DÍAS, S.; AMAR, C.; IVERSEN, A.M.; STANLEY, P.J.; MCLAUNCHLIN, J. Unusual *Cryptosporidium* species recovered from human faeces: first description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium* 'dog type' from patients in England. **Journal of Medical Microbiology**, v.50, p.293-296, 2001.

PREISER, G.; PREISER, L.; MADEO, L. An outbreak of cryptosporidiosis among veterinary science students who work with calves. **Journal of American College Health**, v.51, p.213-215, 2003.

RAGOZO, A.M.A.; MURADIAN, V.; SILVA, J.C.R.; CARAVIERI, R.; AMAJONER, V.R.; MAGNABOSCO, C.; GENNARI, S.M. Occurrence of gastrointestinal parasites in feces of cats from the cities of São Paulo and Guarulhos. Braz. **Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39, p.244-246, 2002.

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

SANTÍN, M.; TROUT, J.M.; VECINO, C.J.A.; DUBEY, J.P.; FAYER, R. *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bieneusi* in cats from Bogota (Colombia) and genotyping of isolates. **Veterinary Parasitology**, v.141, p.334-339, 2006.

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

SILVA, D.C.; HOMEM, C.G.; NAKAMURA, A.A.; TEIXEIRA, W.F.P.; PERRI, S.H.V.; MEIRELES, M.V. Physical, epidemiological, and molecular evaluation of infection by *Cryptosporidium galli* in Passeriformes. **Parasitology Research**, v.107, p.271–277, 2010.

SULAIMAN, I.M.; XIAO, L.; YANG, C.; ESCALANTE, L.; MOORE, A.; BEARD, C.B.; ARROWOOD, M.J.; LAL, A.A. Differentiating human from animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. **Emerging Infectious Diseases**, v.4, p.681-685, 1998.

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

XIAO L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. **Experimental Parasitology**, v.124, p.80–89, 2010.

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.; 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, p.492-497, 2001.

XU, H.; JIN, Y.; WU, W.; LI, P.; WANG, L.; LI, N.; FENG, Y.; XIAO, L. Genotypes of *Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon bieneusi* and *Giardia duodenalis* in dogs and cats in Shanghai, China. **Parasites & Vectors**, v.9, p.121-130, 2016.

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

CAPÍTULO 3 – DESENVOLVIMENTO DE REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO DE *Cryptosporidium canis* EM AMOSTRAS FECAIS DE CÃES

HOMEM, C.G.; MEIRELES, M.V.

UNESP, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Programa de Pós Graduação em Ciência Animal - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Rua Clóvis Pestana, nº 793, CEP 16050-680, Bairro Dona Amélia, Araçatuba - SP. milahomem@hotmail.com

RESUMO: O uso de métodos moleculares para diagnóstico da infecção por *Cryptosporidium* possibilita a estimativa do potencial zoonótico deste parasito e a determinação das fontes de infecção para o ser humano. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma PCR em tempo real para amplificação de fragmento parcial do gene da proteína HSP70 para detecção de DNA de *C. canis* em amostras fecais de cães. Foram colhidas 367 amostras fecais de cães de todas as idades, sendo 235 provenientes da cidade de Araçatuba e 132 de Jaboticabal-SP. As amostras foram submetidas à extração de DNA genômico, após purificação por centrífugo-sedimentação em água-éter, seguido da realização da *nested* PCR (nPCR) em todas as amostras para detecção de DNA de *Cryptosporidium* spp. e determinação da espécie do parasito por meio de sequenciamento dos fragmentos amplificados. A PCR em tempo real foi padronizada para amplificação de um fragmento parcial do gene da proteína HSP70 para detecção de *C. canis*. A nPCR revelou 10,4% (38/367) das amostras positivas para *Cryptosporidium* spp., dentre elas, seis identificadas como *C. canis* por meio de sequenciamento dos fragmentos amplificados. A PCR em tempo real resultou em 15,3% (58/367) de amostras positivas para *C. canis*. Foi observada uma maior positividade em filhotes quando comparados a cães adultos na cidade de Araçatuba. Foram realizadas também a determinação da sensibilidade e especificidade analíticas da PCR

em tempo real, que demonstrou que a reação desenvolvida foi capaz de detectar uma cópia de DNA de *C. canis* por reação, e também não se observou amplificação inespecífica de DNA para diversas espécies de *Cryptosporidium* testadas.

Palavras-chave: cão, criptosporidiose, diagnóstico molecular, gene HSP70.

SUMMARY: The use of molecular methods to diagnose *Cryptosporidium* infection makes it possible to estimate the zoonotic potential of this parasite and determine the sources of infection for humans. This work aimed to the development of a real-time PCR for partial fragment amplification of the HSP70 protein gene to detect *C. canis* DNA in faecal samples from dogs. A total of 367 fecal samples were collected from dogs of all ages, of which 235 were from the city of Araçatuba and 132 from Jaboticabal-SP. The samples were submitted to genomic DNA extraction, after purification by centrifugation-sedimentation in water-ether, followed by nested PCR (nPCR) in all samples for detection of *Cryptosporidium* spp. and determination of the parasite species by sequencing the amplified fragments. Real-time PCR was standardized for amplification of a partial fragment of the HSP70 protein gene for the detection of *C. canis*. The nPCR revealed 10.4% (38/367) of the positive samples for *Cryptosporidium* spp., among them, six identified as *C. canis* by sequencing the amplified fragments. Real-time PCR resulted in 15.3% (58/367) of *C. canis* positive samples. It was observed a greater positivity in puppies when compared to adult dogs in the city of Araçatuba. The determination of the analytical sensitivity and specificity of the PCR in real time was also carried out, which showed that the reaction was able to detect 1copy of DNA of *C. canis* by reaction, and also no nonspecific DNA amplification was observed for several species of *Cryptosporidium* tested.

Keywords: dog, cryptosporidiosis, molecular diagnosis, HSP70 gene.

Introdução

Cryptosporidium spp. é um protozoário que infecta os seres humanos, bem como animais domésticos e selvagens. Até o momento, são descritas 30 espécies válidas de *Cryptosporidium* (FAYER, 2010; FAYER; SANTIN, 2009; FAYER et al., 2010; HOLUBOVÁ et al., 2016; KVÁČ et al., 2013; KVÁČ et al., 2014; KVÁČ et al., 2016; LI et al., 2015a; RYAN et al., 2015; ROBINSON et al., 2010).

Os cães são animais que possuem estreito contato com os humanos, podendo atuar como reservatórios de espécies zoonóticas de *Cryptosporidium*. A espécie *Cryptosporidium canis* é a mais frequente em cães (ITOH et al., 2014; JIAN et al., 2014; LI et al., 2015b; OSMAN et al., 2015; PAOLETTI et al., 2015; SEVÁ et al., 2010; THOMAZ et al., 2007; UEHLINGER et al., 2013; XU et al., 2016; YOSHIUCHI et al., 2010).

Infecção em humanos por *C. canis* também tem sido descrita em vários países no mundo todo, dentre eles Brasil (LUCCA et al., 2009), Etiópia (ADAMU et al., 2014), Inglaterra e País de Gales (ELWIN et al., 2012), Jamaica (GATEI et al., 2008), Jordânia (HIJJAWI et al., 2010), Kênia (GATEI et al., 2006), Nigéria (MOLOY et al., 2010), Peru (XIAO et al., 2007) e República Dominicana (LALONDE et al., 2013).

O uso de métodos moleculares para diagnóstico da infecção por *Cryptosporidium* spp. possibilita estimar o potencial zoonótico e determinar as fontes de infecção para o ser humano (SKOTARCZAKANN, 2010). Dentre estes métodos, o mais utilizado é a reação em cadeia pela polimerase (PCR) do tipo *nested*, para amplificação de fragmento parcial do gene da subunidade 18S do rRNA (XIAO et al., 2000). No entanto, a PCR em tempo real tem se destacado por apresentar alta sensibilidade e por permitir o diagnóstico de criptosporidiose clínica, bem como a detecção de indivíduos portadores, sendo uma valiosa ferramenta para estudos epidemiológicos em humanos e animais (FONTAINE; GILLOT, 2003; HADFIELD et al., 2011; KUMAR et al., 2016;

NAKAMURA et al., 2014; SILVA et al., 2014; TANRIVERDI et al., 2002; ZEBARDAST et al., 2016).

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma PCR em tempo real para amplificação de fragmento parcial do gene da proteína HSP70 para detecção de DNA de *C. canis* em amostras fecais de cães.

Material e métodos

Colheita de amostras fecais e extração do DNA

Foram utilizadas 367 amostras fecais de cães, sendo provenientes de residências, criatórios comerciais, Organizações não Governamentais (ONG) Protetoras de Animais e Centros de Controle de Zoonoses das cidades de Araçatuba e Jaboticabal, no interior do estado de São Paulo, Brasil. Das 367 amostras, 132 foram colhidas de cães adultos da cidade de Jaboticabal, e 235 colhidas de cães da cidade de Araçatuba, sendo estes divididos em 214 cães adultos e 24 filhotes.

As amostras foram colhidas imediatamente após defecação natural e 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 por centrífugo-sedimentação em água/éter (MELONI; THOMPSON, 1996).

O DNA genômico foi extraído a partir do sedimento resultante do processo de purificação, por meio da técnica descrita por Silva et al. (2010).

Nested PCR (nPCR) e sequenciamento dos fragmentos amplificados. A nPCR foi realizada em todas as amostras para amplificação de um fragmento parcial do gene da subunidade 18S do rRNA de *Cryptosporidium* spp. (Xiao et al., 2000). O DNA amplificado foi visualizado por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com GelRed® (Biotium).

Os fragmentos amplificados pela nPCR foram purificados utilizando-se o kit QIAquick® Gel Extraction (Qiagen GmbH) e sequenciados com utilização do ABI Prism® Dye Terminator 3.1, em sequenciador automático ABI 3730XL

(Applied Biosystems). As reações de sequenciamento foram realizadas nas duas direções, com os mesmos oligonucleotídeos iniciadores da reação de nPCR.

Clonagem molecular

Foi realizada clonagem molecular para obtenção de quantidade suficiente de DNA para padronização da PCR em tempo real, por meio de uma curva de regressão padrão. Para isso, foi desenvolvida uma PCR do tipo *hem-nested* para o gene HSP70 utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para *C. canis* (Quadro 1). O fragmento parcial de DNA de *C. canis* obtido por meio dessa reação foi clonado com o kit TransformAid Bacterial Transformation (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) e o CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). O DNA plasmidial foi purificado com o GenElute®HP Five-Minute Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich).

Quadro 1 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para obtenção de um fragmento específico para *Cryptosporidium canis* pelo gene HSP70, para uso na padronização da reação de PCR em tempo real.

Oligonucleotídeos iniciadores	Posição *	Sequencia 5' - 3'	Produto amplificado (pb)
PrimerCanis - F	1244-1263	TCTACGAGGGTGAGAGAGCC	496
Canis - R	1720-1739	ATGAGTGGGTTCATGTGGGC	
SecCanis - F	1437-1456	CAAGGGCAGACTCTCCAAGG	303
Canis - R	1720-1739	ATGAGTGGGTTCATGTGGGC	

*Posição de anelamento no gene HSP70 de *C. canis* (*GenBank* número EU754842).

Reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qPCR) e análise de curva de dissociação

Sequências parciais do gene da proteína HSP70 de *C. canis* foram alinhadas com sequências de todas as espécies e genótipos de *Cryptosporidium* spp. disponíveis no GenBank utilizando-se o programa *Bioedit Sequence Alignment Edit* para determinação de uma região para elaboração de oligonucleotídeos iniciadores específicos para *C. canis*. Após determinação da região espécie-específica, usou-se o programa *Primer-BLAST (National Center for Biotechnology Information)* para elaboração dos oligonucleotídeos iniciadores (Quadro 2) e posteriormente verificou-se a especificidade *in silico* para *C.canis* utilizando o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

Para determinação da curva de regressão padrão da qPCR, os fragmentos resultantes da clonagem foram quantificados utilizando-se espectrofotômetro Nanodrop® ND-1000, e em seguida diluídos em concentrações entre 10^7 a 10^3 moléculas de DNA (Applied Biosystems, s.d.) para obtenção da curva de regressão. Cada diluição foi testada em duplicata.

Quadro 2 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação em cadeia pela polimerase em tempo real para amplificação de fragmento parcial do gene da proteína HSP70 de *Cryptosporidium canis*.

Oligonucleotídeos iniciadores	Posição*	Sequencia	Produto amplificado (pb)
CanisHSP70-F	1567-1586	AGAAACACCATCCAGGAGCC	150
CanisHSP70-R	1697-1716	AACCTCCTTTTGCTGGTGCT	

*Posição de anelamento no gene HSP70 de *C. canis* (GenBankEU754842).

A qPCR foi constituída por SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad) 1x, 250nM de cada oligonucleotídeo iniciador e 2,0 µL de DNA da amostra, com volume final de 20 µL. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial por 2 min a 98°C, seguida por 50 ciclos de desnaturação a 98°C por 5s, anelamento a 60°C por 5s e extensão a 72°C por 25s, seguidos por análise de curva de dissociação, com temperatura variando de 65°C a 95°C e incremento

de 0,5°C a cada 5s. As reações foram feitas no sistema de PCR em tempo real CFX96® (Bio-Rad).

Os oligonucleotídeos iniciadores foram testados quanto à sua especificidade analítica utilizando DNA genômico de diferentes espécies e genótipos de *Cryptosporidium*, dentre eles *C. bovis*, *C. andersoni*, *C. galli*, *C. ryanae*, *C. serpentis*, *C. felis*, *C. parvum*, *Cryptosporidium* genótipo suis like e *Cryptosporidium* genótipo II de aves. Cada amostra foi testada em duplicata. Os fragmentos amplificados pela qPCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, para verificação do tamanho do fragmento amplificado e presença de amplificação inespecífica.

A sensibilidade analítica da qPCR foi determinada com utilização de diluições plasmidiais seriadas na base 10, desde a concentração de 10^7 a 10^0 cópias de DNA de *C. canis*. Cada amostra foi testada em duplicata.

Resultados e discussão

O gene codificador da proteína HSP70 (SULAIMAN et al., 2000) foi escolhido por apresentar alto polimorfismo entre as diferentes espécies de *Cryptosporidium*, o que permitiu o desenho de oligonucleotídeos iniciadores específicos para *C. canis*.

A eficiência da qPCR foi de 111,8% (Figura 1). De acordo com Pfaffl (2001), a eficiência desta técnica deve ser de $100\% \pm 20\%$. A análise da curva de dissociação permitiu identificação da temperatura média de dissociação de 84,75°C ($\pm 0,75^\circ\text{C}$) para os fragmentos de DNA de *C. canis* amplificados pela qPCR (Figura 2).

Em vários países a prevalência da criptosporidiose em cães varia de 0,2% a 44,1% (BAJER et al., 2011; HANNES et al., 2007; ITOH et al., 2014; JIAN et al., 2014; LA SAALA et al., 2015; LI et al., 2015b; OSMAN et al., 2015; PAOLETTI et al., 2015; YOSHIUCHI et al., 2010; UEHLINGER et al., 2013; XU et al., 2016). No Brasil, são relatadas ocorrências de 1,4% a 26,2%

(BALASSIANO et al., 2009; GIZZI et al., 2014; KATAGIRI et al., 2008; MUNDIN et al., 2007; SEVÁ et al., 2010).

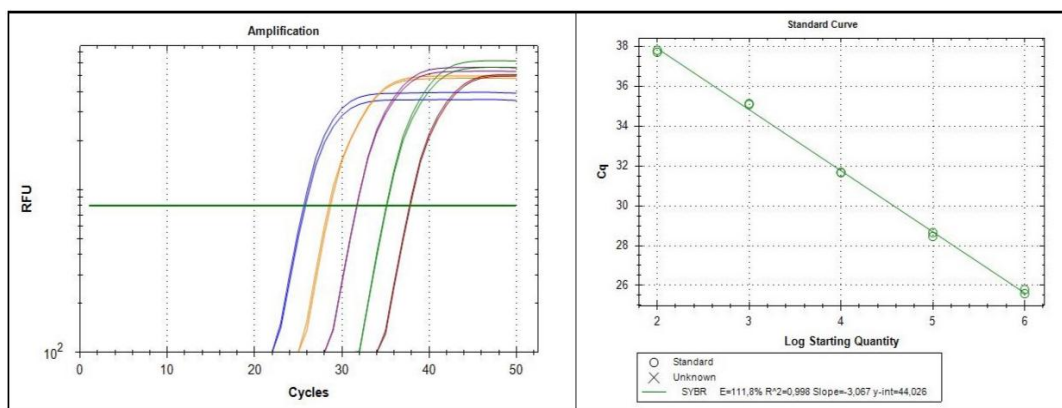


Figura 1 - Curva de regressão padrão. Padronização da reação em cadeia pela polimerase em tempo real, com amplificação em tempo real das diluições contendo 10^7 a 10^3 cópias de DNA de *C. canis*.

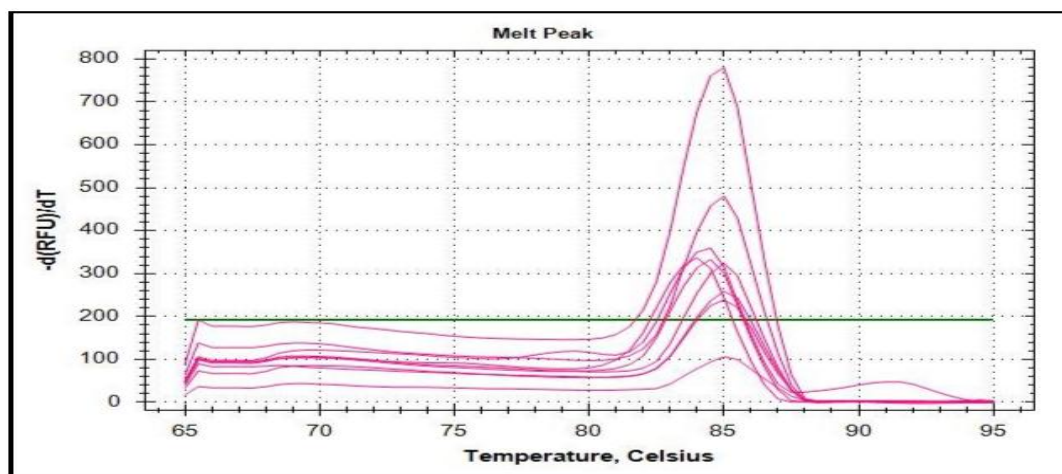


Figura 2 - Curva de dissociação obtida a partir de amostras de DNA positivas para *C. canis* por meio da reação de PCR em tempo real para o gene da proteína HSP70.

A nPCR revelou uma positividade de 10,4% (38/367) para *Cryptosporidium* spp.. Não é possível comparar a positividade desses estudos

com a encontrada neste trabalho, devido às diferenças nos métodos de detecção empregados e nas populações investigadas. O único estudo realizado na região de Araçatuba para detecção de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de cães, revelou positividade de 2,4%, pela técnica de ELISA de captura e de 1,0% pela coloração de Kinyoun (BRESCIANI et al. (2008).

A qPCR apresentou positividade de 15,3% (56/367) para *C. canis*. A média dos ciclos de amplificação (Ct) foi de 37,85, sendo o menor Ct de 29,46 e o maior de 44,77. Amostras que foram negativas pela nPCR e positivas pelas qPCR apresentaram valores de Ct mais elevados quando comparadas às amostras positivas nas duas reações, provavelmente pelo fato de que nessas amostras havia um pequeno número de cópias de DNA, que foram detectadas pela técnica de qPCR por apresentar maior sensibilidade que a nPCR. Vários estudos relatam uma maior sensibilidade da qPCR quando comparada com a nPCR (DE WAELE et al., 2011; HOMEM et al., 2012; NAKAMURA et al., 2014; SILVA et al., 2014; YANG et al., 2009). Nakamura et al. (2014) também observaram que amostras negativas para *Cryptosporidium galli* e *Cryptosporidium* genótipo III pela nPCR, foram positivas pela qPCR com valores de mais elevados.

A eletroforese dos fragmentos amplificados pela qPCR demonstrou amplificação de um fragmento de 150 pb, com ausência de amplificação inespecífica. A determinação da sensibilidade analítica permitiu a identificação de até uma cópia de DNA de *C. canis* por reação. Pela análise da especificidade analítica, não foi observada amplificação para outras espécies ou genótipos de *Cryptosporidium*. Embora não houvesse disponibilidade de DNA de todas as espécies de *Cryptosporidium* para análise da especificidade analítica da qPCR, a determinação da especificidade *in silico* demonstrou que os oligonucleotídeos iniciadores são altamente específicos para *C. canis*.

Foi observada uma maior positividade em filhotes quando comparados com cães adultos da cidade de Araçatuba. A técnica de nPCR identificou como positivos 28,6% (6/21) dos filhotes e 7,9% (17/214) dos adultos, enquanto a qPCR revelou positividade de 33,3% (7/21) para filhotes e 10,7% (23/214) para

adultos (Quadro 3). Alguns estudos indicam que *Cryptosporidium* spp. é mais prevalente em filhotes (ITOH et al., 2014; JIAN, et al., 2014; OSMAN et al., 2015; UEHLINGER et al., 2013). Itoh et al. (2014) encontraram positividade de 31,6% em cães filhotes provenientes de Pet Shops por meio de nPCR, se aproximando aos valores encontrados em nosso estudo. Como não foram colhidas amostras fecais de cães filhotes na cidade de Jaboticabal, não se pode analisar o fator idade.

Como a nPCR é específica para *Cryptosporidium* spp. e a qPCR é específica para *C. canis*, e pelo fato de que não foi possível realizar o sequenciamento de todas as amostras amplificadas pela nPCR, não foi possível determinar a sensibilidade e especificidade epidemiológicas da qPCR. No entanto, o sequenciamento dos fragmentos amplificados pela nPCR em seis amostras, que também foram positivas pela PCR em tempo real, permitiu a identificação de *C. canis*.

Quadro 3 – Descrição das amostras, número amostral (n), número de positivos dentro de cada grupo amostral e suas respectivas porcentagens para as técnicas de *nested* PCR (nPCR) e PCR em tempo real (qPCR).

Amostras	n	Positivos nPCR	% Positivos	Positivos qPCR	% Positivos
Cães adultos Araçatuba	214	17	7,9	23	10,7
Cães filhotes Araçatuba	21	6	28,6	7	33,3
Cães adultos Jaboticabal	132	15	11,4	26	19,7
Cães filhotes Jaboticabal	0	0	0	0	0

Duas amostras positivas pela nPCR foram negativas pela qPCR. Como a nPCR amplifica fragmentos de *Cryptosporidium* spp., o resultado negativo para *C. canis* possivelmente se deve ao fato dessas amostras conterem DNA

de outra espécie ou genótipo de *Cryptosporidium*. *Cryptosporidium parvum* e *C. ubiquitum* já foram identificadas em amostras fecais de cães (LI et al., 2015; SIMONATO et al., 2015; SOTIRIADOU et al., 2013).

Conclui-se que o presente estudo permitiu o desenvolvimento de uma técnica rápida, sensível e específica para detecção da espécie que mais comumente infecta cães (*C. canis*), sem a necessidade de análise de fragmentos amplificados.

4. Referências bibliográficas

ADAMU, H.; PETROS B.; ZHANG, G.; KASSA, H.; AMER, S.; YE, J.; FENG, Y.; XIAO, L. Distribution and clinical manifestations of *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV/AIDS patients in Ethiopia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, doi: 10.1371, 2014.

APPLIED BIOSYSTEMS, S.D. Creating standard curves with genomicDNA or plasmid DNA templates for use in quantitative PCR. Disponível em: http://www6.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/quant_pcr.pdf. Acesso em 24 ago 2016.

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

BAJER, A.; BEDNARKSA, M.; RODO, A. Risk factors and control of intestinal parasite infections in sled dogs in Poland. **Veterinary Parasitology**, v.175, p.343-350, 2011.

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, p.466-468, 2008.

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.76-84, 2011.

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

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

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

FONTAINE, M.; GUILLOT, E. An immunomagnetic separation–real-time PCR method for quantification of *Cryptosporidium parvum* in water samples. **Journal of Microbiology Methods**, v.54, p.29-36, 2003.

GATEI, W.; WAMAE, C.; 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. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.75, p.78–82, 2006.

GATEI, W.; BARRETT, D.; LINDO, J.F.; ELDEMIRE-SHEARER, D.; CAMA, V.; XIAO, L. Unique *Cryptosporidium* Population in HIV-Infected Persons, Jamaica. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, p.841-843, 2008.

GIZZI, A.B.R.; OLIVEIRA, S.T.; LEUTENEGGER, C.M.; ESTRADA, M.; KOZEMJAKIN, D.A.; STEDILE, R.; MARCONDES, M.; BIONDO, A.W. Presence of infectious agents and co-infections in diarrheic dogs determined with a real-time polymerase chain reaction-based panel. **BMC Veterinary Research**, v.10, p.23-30, 2014.

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

HANNES, 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, p.22-31, 2007.

HIJJAWI, N.; NG, J.; YANG, R.; ATOUM, M.F.M.; RYAN, U. Identification of rare and novel *Cryptosporidium* GP60 subtypes in human isolates from Jordan. **Experimental Parasitology**, v.125, p.161–164, 2010.

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

HOMEM, C.G.; NAKAMURA, A.A.; SILVA, D.C.; TEIXEIRA, W.F.P.; COELHO, W.M.D.; MEIRELES, M.V. Real-time PCR assay targeting the actin gene for the detection of *Cryptosporidium parvum* in calf fecal samples. **Parasitology Research**, v.110, p.1741-1745, 2012.

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

JIAN, F.; QI, M.; HE, X.; WANG, R.; ZHANG, S.; DONG, H.; ZHANG, L. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* in dogs in Henan Province, China. **BMC Veterinary Research**, v.10, p.26-29, 2014.

KATAGIRI, S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G. Prevalence of Dog Intestinal Parasites and Risk Perception of Zoonotic Infection by Dog Owners in São Paulo State, Brazil. **Zoonoses and Public Health**, v.55, p.406–413, 2008.

KUMAR, T.; ABD MAJID, M.A.; ONICHANDRAN, S.; JATURAS, N.; ANDIAPPAN, H.; SALIBAY, C.C.; TABO, N.; DUNGCA, J.Z.; TANGPONG, J.; PHIRIYASAMITH,S.; YUTTAYONG, B.; POLSEELA, R.; DO, B.N.; SAWANGJAROEN, N.; TAN, T.C.; LIM, Y.A.; NISSAPATORN, V. Presence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water samples from Southeast Asia: towards an integrated water detection system. **Infectious Diseases of Poverty**, v.5, p.1-12, 2016.

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

KVÁC, M.; HOFMANNOVÁ, L.; HLÁSKOVÁ, L.; KVETONOVÁ, D.; VÍTOVEC, J.; MCEVOY, J.; SAK, B. *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. **Veterinary Parasitology**, v.201, p.9-17, 2014.

KVÁČ, M.; HAVRDOVÁ, N.; HLÁSKOVÁ, L.; DAŇKOVÁ, T.; KANDĚRA, J.; JEŽKOVÁ, J.; VÍTOVEC, J.; SAK, B.; ORTEGA, Y.; XIAO, L.; MODRÝ, D.; CHELLADURAI, J.R.J.J.; PRANTLOVÁ, V.; McEVOY, J. *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Molecular and biological evidence of cryptic species within gastric *Cryptosporidium* of mammals. **PLoS One**, v.11, doi: 10.1371, 2016.

LALONDE, L.F.; REYES, J.; GAJADHAR, A.A. Application of a qPCR assay with melting curve analysis for detection and differentiation of protozoan oocysts in human fecal samples from Dominican Republic. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.89, p.892–898, 2013.

LA SALA, L.F.; LEIBOFF, A.; BURGOS, J.M.; COSTAMAGNA, S.R. Spatial distribution of canine zoonotic enteroparasites in Bahía Blanca, Argentina. **Revista Argentina Microbiología**, v.47, p.17-24, 2015.

LI, X.; PEREIRA, M.G.C.; LARSEN, R.; XIAO, C.; PHILLIPS, R.; STRIBY, K.; MCCOWAN, B.; ATWILL, E.R. *Cryptosporidium rubeyi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in multiple *Spermophilus* ground squirrel species. **Internacional Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v.4, p.343-350, 2015a.

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

LUCCA, P.; GASPARI, E.M.; BOZZO, L.M.; FUNADA, M.R.; SILVA, S.O.S.; LULIANO, W.; SOARES, R.M. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from HIV infected patients from an urban area of Brazil. **Journal of the São Paulo Medicine of Tropical Institute**, v.51, p.341-343, 2009.

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

MOLLOY, S.F.; SMITH, H.V.; KIRWAN, P.; NICHOLS, R.A.B.; 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. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.82, p.608–613, 2010.

MUNDIM, M.J.S.; ROSA, L.A.G.; HORTÊNCIO, S.M.; FARIA, E.S.M.; RODRIGUES, R.M.; CURY, M.C. Prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. In dogs from different living conditions in Uberlândia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.144, p.356–359, 2007.

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

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

PAOLETTI, B.; OTRANTO, D.; WEIGL, S.; GIANGASPERO, A.; DI CESARE, A.; TRAVERSA, D. Prevalence and genetic characterization of *Giardia* and *Cryptosporidium* in cats from Italy. **Research in Veterinary Science**, v.91, p.397–399, 2015.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v.29, p.2002–2007, 2001.

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. Redescription of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): morphology, biology and phylogeny. **Internacional Journal of Parasitology**, v.40, p.1539-1548, 2010.

RYAN, U.; PAPARINI, A.; TONG, K.; YANG, R.; GIBSON-KUEH, S.; O'HARA, A.; LYMBERY, A.; XIAO, L. *Cryptosporidium huwin.* sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia reticulata*). **Experimental Parasitology**, v.150, p.31-35, 2015.

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

SIMONATO, G.; DI REGALBONO, A.F.; CASSINI, R.; TRAVERSA, D.; BERALDO, P.; TESSARIN, C.; PIETROBELLI, M. Copromicroscopic and molecular investigations on intestinal parasites in kennel dogs. **Parasitology Research**, v.114, p.1963-1970, 2015.

SILVA, D.C.; HOMEM, C.G.; NAKAMURA, A.A.; TEIXEIRA, W.F.P.; PERRI, S.H.V.; MEIRELES, M.V. Physical, epidemiological, and molecular evaluation of infection by *Cryptosporidium galli* in Passeriformes. **Parasitology Research**, v.107, p.271–277, 2010.

SILVA, D.C.; PAIVA, P.R.C.S.O., NAKAMURA, A.A.; HOMEM, C.G.; SOUZA, M.S.; GREGO, K.F.; MEIRELES, M.V. The detection of *Cryptosporidium serpentis* in snake fecal samples by real-time PCR. **Veterinary Parasitology**, v.204, p.134-138, 2014.

SKOTARCZAKANN, B. Progress in the molecular methods for the detection and genetic characterization of *Cryptosporidium* in water samples. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v.17, p.1–8, 2010.

SOTIRIADOU, I.; PANTCHEV, N.; GASSMANN, D.; KARANIS, P. Molecular identification of *Giardia* and *Cryptosporidium* from dogs and cats. **Parasite**, v.20, p.8-14, 2013.

SULAIMAN, I.M.; MORGAN, U.M.; THOMPSON, R.C.A.; LAL, A.A.; XIAO, L. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.2385–2391, 2000.

TANRIVERD, S.; TANYELI, A.; BASLAMISLI, F.; KOKSAL, F.; YURDANUR, K.; XIAOCHUAN, F.; BATZER, G.; TIZIPORI, S.; WIDMER, G. Detection and genotyping of oocysts of *Cryptosporidium parvum* by real-time PCR and melting curve analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.3237-3244, 2002.

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

UEHLINGER, F.D.; GREENWOOD, S.J.; MCCLURE, J.T.; CONBOY, G.; O'HANDLEY, R.; BARKEMA, H.W. Zoonotic potential of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. and prevalence of intestinal parasites in young dogs from different populations on Prince Edward Island, Canada. **Veterinary Parasitology**, v.196, p.509–514, 2013.

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.; CAMA, V.A.; CABRERA, L.; ORTEGA, Y.; PEARSON, J.; GILMAN R.H. Possible Transmission of *Cryptosporidium canis* among Children and a Dog in a Household. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.2014-2016, 2007.

XU, H.; JIN, H.; WU, W.; LI, P.; WANG, L.; LI, N.; FENG, Y.; XIAO, L. Genotypes of *Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon bieneusi* and *Giardia duodenalis* in dogs and cats in Shanghai, China. **Parasites & Vectors**, v.9, p.121-129, 2016.

YANG, R.; JACOBSON, C.; GORDON, C.; RYAN, U. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species in pre-weaned sheep in Australia. **Veterinary Parasitology**, v.161, p.19–24, 2009.

YOSHIUCHI, R.; MATSUBAYASHI, M.; KIMATA, I.; FURUYA, M.; TANI, T.; SASAI, K. Survey and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in owned companion animal, dogs and cats, in Japan. **Veterinary Parasitology**, v.174, p.313–316, 2010.

ZEBARDAST, M.; YEGANEH, F.; GHARAVI, M.J.; ABADI, A.; TABAEIE, S.J.S.; HAGHIGHI, A. Simultaneous detection and differentiation of *Entamoeba histolytica*, *E.dispar*, *E. moshkovskii*, *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium* spp. in human fecal samples using multiplex PCR and qPCR-MCA. **Acta Tropica**, v.162, p.233–238, 2016.