

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**DIFERENTES TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO EMPREGADAS
NA ESTIMATIVA DE PREVALÊNCIA POPULACIONAL DE
INFECÇÃO POR *Cryptosporidium felis* EM GATOS
DOMICILIADOS NO MUNICÍPIO DE ARAÇATUBA, SÃO
PAULO**

Luiz da Silveira Neto

Médico veterinário

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DIFERENTES TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO EMPREGADAS
NA ESTIMATIVA DE PREVALÊNCIA POPULACIONAL DE
INFECÇÃO POR *Cryptosporidium felis* EM GATOS
DOMICILIADOS NO MUNICÍPIO DE ARAÇATUBA, SÃO
PAULO**

Luiz da Silveira Neto

Orientadora: Profa. Adj. Katia Denise Saraiva Bresciani

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva)

2014

S587d Silveira Neto, Luiz da
Diferentes técnicas de diagnóstico empregadas na estimativa de prevalência populacional de infecção por *Cryptosporidium felis* em gatos domiciliados no município de Araçatuba, São Paulo / Luiz da Silveira Neto. -- Jaboticabal, 2014
xii, 34 p. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014
Orientadora: Katia Denise Saraiva Bresciani
Banca examinadora: Carlos Noriyuki Kaneto, Solange Maria Gennari, Sílvia Helena Venturoli Perri, Jancarlo Ferreira Gomes

Bibliografia

1. Criptosporidiose. 2. ELISA. 3. Epidemiologia. 4. Felinos. 5. Kinyoun. 6. Nested-PCR I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.98:636.8

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO: DIFERENTES TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO EMPREGADAS NA ESTIMATIVA DE PREVALÊNCIA POPULACIONAL DE INFECÇÃO POR *Cryptosporidium felis* EM GATOS DOMICILIADOS NO MUNICÍPIO DE ARAÇATUBA, SÃO PAULO

AUTOR: LUIZ DA SILVEIRA NETO

ORIENTADORA: Profa. Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI


Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba


Prof. Dr. CARLOS NORIYUKI KANETO
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba


Profa. Dra. SOLANGE MARIA GENNARI
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP / Pirassununga/SP


Profa. Dra. SILVIA HELENA VENTUROLI PERRI
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba


Prof. Dr. JANCARLO FERREIRA GOMES
Departamento de Sistemas de Informação / Universidade Estadual de Campinas

Data da realização: 08 de maio de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUIZ DA SILVEIRA NETO – nascido no dia 4 de março de 1984 na cidade de Araçatuba, SP. É médico veterinário formado pela Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA) da UNESP (2003-2007). Durante a graduação, realizou estágio regular em Histologia (2003) e Imunologia (2004-2005), iniciação científica em Tecnologia de Alimentos de Origem Animal (2006) e estágio curricular no departamento técnico da Fort Dodge Saúde Animal (2007). É mestre em Ciência Animal (FMVA), cujo título da dissertação é “Uso dos antígenos total, FML e rK39 em ELISA indireto para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em *Felis catus*” (2008-2009), com bolsa FAPESP (proc. 2008/51201-8). Foi chefe de seção de fiscalização sanitária na Secretaria Municipal de Saúde de Birigui, atuando, principalmente, no gerenciamento de agentes de combate a endemias e na elaboração de projetos de controle e prevenção de dengue e leishmaniose visceral americana (Jan-Abr/2010). No mês de agosto de 2010, iniciou o curso de doutorado em Medicina Veterinária, área de concentração Medicina Veterinária Preventiva, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), da UNESP, Jaboticabal, SP, com bolsa FAPESP (proc. 51111-9). Foi colaborador em três projetos de iniciações científicas durante o mestrado e orientou alunos em quatro iniciações científicas e sete projetos de extensão durante o doutorado. Foi professor da disciplina de Ética e Bioética nos cursos de especialização *lato sensu* em Saúde Pública e da Família (2010) e Enfermagem do Trabalho (2011) pelo INBRAPE no câmpus do UniSalesiano em Araçatuba, o que possibilitou ser orientador de um trabalho de conclusão de curso de especialização. Foi convidado para ministrar aulas e palestras para graduação e pós-graduação em diversas instituições, tais como: FMVA, FCAV, Ordem dos Advogados do Brasil (OAB) de São José do Rio Preto, Associação Nacional de Clínicos Veterinários (ANCLIVEPA) do Estado de São Paulo, e Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) sobre temas envolvendo parasitologia e enfermidades parasitárias de interesse em Saúde Pública, com ênfase em temas como leishmaniose, toxoplasmose, criptosporidiose e giardíase (2008-2013). Ministrou um curso sobre padronização de ELISA indireto no diagnóstico de enfermidades parasitárias imunomediadas na Universidade Estadual de Maringá (2013). Até o momento, é autor/coautor de sete artigos científicos publicados para publicação em periódicos internacionais: *Veterinary Parasitology* (3), *Acta Tropica* (1), *Research Journal of Infectious Diseases* (1) e nacionais: *Semina. Ciências Agrárias* (2), e autor/coautor de um capítulo de livro sobre toxoplasmose e de cinco capítulos sobre principais zoonoses protozoárias em cães pela Nova Science Publishers de Nova Iorque, EUA.

EPÍGRAFE

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina” (Cora Coralina)

DEDICATÓRIA

À comunidade carente que circunda os muros da universidade e fomenta indiretamente o desenvolvimento científico-tecnológico por meio de tributos, à minha família, aos meus amigos, aos meus colegas, e ao meu amor, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Katia Denise Saraiva Bresciani, minha orientadora, um exemplo de humildade, de profissionalismo e de delicadeza com o próximo. Agradeço profundamente tudo o que fez por mim, cada momento de orientação, de conversa, de investimento, de perseverança, de respeito, de compreensão, de abraço, de sorriso e de amizade. Você é a minha “mãe na universidade”;

Ao Prof. Marcelo Vasconcelos Meireles, por ter contribuído para minha formação em nested-PCR;

Aos graduandos Marcel Gambin Marques, Ana Elisa Gregui Watanabe, Mariele Fernanda Cruz Panegossi, Fernando Vissani Fernandes e Letícia Nunes de Oliveira, por ajudarem na concretização desta ideia;

À colega pós-graduanda, minha parceira de guerra laboratorial, Sandra Valéria Inácio. Só nós sabemos o quanto gastamos de tempo, reagentes, energia mental durante finais de semana, feriados e madrugadas, até aprendermos como conduzir as técnicas laboratoriais adequadamente;

Ao meu amigo e colega Lucas Vinícius Shigaki de Matos por tornar tão agradável a fase final desta pesquisa, quando a energia já estava se esgotando, foi meu grande companheiro e incentivador;

Aos meus pais, por estarem sempre ao meu lado, especialmente em um momento tão difícil que coincidiu com a execução desta tese. Obrigado por duas vezes me darem a vida e à Vida;

Ao meu amor, sempre ao meu lado como um anjo da guarda, incentivando minha vontade de desenvolver, de encontrar, de perder para reencontrar, de redimir e reinventar, de acobertar para redescobrir a gana por uma vida feliz;

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária e à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), por terem aberto suas portas para que minha mente pudesse se abrir também;

À seção de pós-graduação da FCAV, por terem sido tão atenciosos e prestativos sempre que precisei;

Aos membros da banca de meu exame geral de qualificação, Luiz Augusto do Amaral, Luis Antonio Mathias, Karina Paes Bürger e Antônio Sérgio Ferraudó, e aos membros da banca examinadora da defesa desta tese, Solange Maria Gennari, Jancarlo Ferreira Gomes, Sílvia Helena Venturoli Perri e Carlos Noriyuki Kaneto, por suas contribuições significativas para o aperfeiçoamento dessa tese;

À equipe do Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba, São Paulo, por terem realizado o censo da população de gatos do município, cujos dados foram cruciais para o desenvolvimento desta tese;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, por financiar este trabalho (processo 2010/51111-9).

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. OBJETIVOS.....	10
3.1 Objetivo geral	10
3.2 Objetivos específicos	10
4. MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1 Área de estudo.....	11
4.2 Amostragem e população de estudo.....	11
4.3 Acondicionamentos das amostras	12
4.4 Microscopia.....	13
4.5 ELISA de captura.....	13
4.6 Extração de DNA e nested-PCR	13
4.7 Purificação de DNA e caracterização molecular.....	14
4.8 Análise estatística.....	14
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
5.1 População de estudo e composição das amostras.....	16
5.2 Comparação entre os métodos de diagnóstico	17
5.3 Ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> spp.	21
6. CONCLUSÃO	24
7. REFERÊNCIAS.....	25



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "DETECÇÃO DE *Cryptosporidium spp.* e *Giárdia spp.* EM FELINOS DO MUNICÍPIO DE ARAÇATUBA-SP" sob responsabilidade da Prof^a. Ass. Dr^a. KÁTIA DENISE SARAIVA BRESCIANI e colaboração do Prof. Ass. Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES, Prof^a. Titular SOLANGE MARIA GENNARI, Prof. Dr. ALESSANDRO FRANCISCO TALAMINI DO AMARANTE, SARA AFFONSO E ROBERTA SOLIGA VOLTAM, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 28 de março de 2008 de acordo com o protocolo no. 2008-002166.

Araçatuba, 28 de abril de 2008.

Prof^a Dr^a CRISTINA ANTONIALI SILVA

Presidente da CEEA - FOA/UNESP

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre as técnicas de ELISA de captura e nested-PCR em relação à análise morfológica por microscopia utilizando a técnica de centrífugo-flutuação em água-éter seguida de coloração por Kinyoun modificada (padrão-ouro) na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em fezes de gatos..... 17

Tabela 2. Distribuição da intensidade da densidade óptica para detecção de antígenos, segundo a amplificação por nested-PCR para detecção de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de gatos..... 19

Tabela 3. Distribuição da amostragem e número de amostras de fezes de gatos positivas para *Cryptosporidium* spp. em pelo menos dois métodos de diagnóstico (ELISA de captura, análise morfológica por microscopia utilizando técnica de centrífugo flutuação em água-éter seguida de coloração de Kinyoun modificada e nested-PCR), segundo idade e sexo. 21

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Tamanho amostral (n) e número de gatos para <i>Cryptosporidium</i> spp. por diferentes métodos de diagnósticos.....	4
Quadro 2. Sensibilidade, especificidade e valores preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN) do ELISA de captura e da nested-PCR comparados à análise morfológica por microscopia utilizando a técnica de centrifugo-flutuação em água-éter seguida de coloração por Kinyoun modificada (padrão-ouro) usados na detecção de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. em fezes de gatos (IC95%).	18

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto microscópico de esfregaço de fezes obtido por técnica de centrifugo-flutuação em água-éter seguida de coloração de Kinyoun modificada e observado ao microscópio óptico com objetiva de 40x e óleo de imersão. Notar oocisto de *Cryptosporidium* spp. apontado pela seta. 20

DIFERENTES TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO EMPREGADAS NA ESTIMATIVA DE PREVALÊNCIA POPULACIONAL DE INFECÇÃO POR *Cryptosporidium felis* EM GATOS DOMICILIADOS NO MUNICÍPIO DE ARAÇATUBA, SÃO PAULO

RESUMO – Os objetivos deste trabalho foram comparar os métodos de diagnóstico por ensaio imunoenzimático (ELISA) de captura e reação em cadeia da polimerase (nested-PCR) à análise morfológica utilizando a técnica de centrífugo-flutuação em água-éter seguida de coloração de Kinyoun modificada (microscopia) para estimar a taxa de eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. na população de gatos domiciliados na zona urbana do Município de Araçatuba, São Paulo. O potencial zoonótico do coccídio isolado em fezes deste hospedeiro foi investigado por meio de caracterização molecular. Um total de 138 amostras fecais foi colhido de forma aleatória simples e proporcional à população de gatos de cada uma das sete áreas censitárias pertencentes à zona urbana do município. Não houve discordância entre ELISA de captura e microscopia ($p = 1,0000$) nem entre nested-PCR e microscopia ($p = 0,1094$); entretanto, o grau de concordância variou de substancial ($Kappa = 0,7948$) a moderado ($Kappa = 0,4647$), respectivamente, entre estes métodos. Especificidade da nested-PCR e do ELISA de captura foi semelhante; entretanto, a nested-PCR apresentou menor sensibilidade, justificada pela associação entre a intensidade da densidade óptica e a amplificação da subunidade 18S do rRNA. Detectamos oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 9,4% das amostras por pelo menos dois métodos diagnósticos. Com intervalo de 95% de confiança, estimamos que a taxa de eliminação de oocistos desse protozoário na população felina do município variou de 4,5% a 14,3%. Todos os isolados sequenciados apresentaram 100% de similaridade com *Cryptosporidium felis*. Concluímos que gatos domiciliados possam contribuir para a contaminação ambiental de um município, ainda que *C. felis* não seja o principal agente etiológico da criptosporidiose em seres humanos.

Palavras-chave: Criptosporidiose, ELISA, Epidemiologia, Felinos, Kinyoun, Nested-PCR

DIFFERENT DIAGNOSTIC TECHNIQUES EMPLOYED IN THE ESTIMATIVE OF POPULATION PREVALENCE OF INFECTION BY *Cryptosporidium felis* IN DOMICILED CATS IN THE MUNICIPALITY OF ARAÇATUBA, SÃO PAULO

ABSTRACT – The aim of this work was to compare the diagnostic methods by capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and polymerase chain reaction (nested-PCR) to morphological analysis using the technique of flotation in water-ether followed by modified Kinyoun staining (microscopy) to estimate the shedding rate of *Cryptosporidium* spp. in stool samples of cats domiciled in urban area of municipality of Araçatuba, São Paulo State. Zoonotic potential of coccidian isolated in feces was investigated by molecular characterization. A total of 138 stool samples were collected random and proportionally from to cat population in each of the seven census areas belonging to the urban area. There was no disagreement between capture ELISA and microscopy ($p = 1.0000$) or between nested-PCR and microscopy ($p = 0.1094$); however, the degree of agreement varied from substantial ($Kappa = 0.7948$) to moderate ($Kappa = 0.4647$), respectively, in these diagnostic methods. Specificity of nested-PCR and ELISA capture were similar; however, the nested-PCR showed lower sensitivity, justified by the association between the intensity of the optical density and amplification of 18S rRNA subunit. We detected *Cryptosporidium* spp. in 9.4% of the samples by at least two diagnostic methods. With the 95% confidence, we estimate that shedding rate of *Cryptosporidium* oocysts ranged from 4.5% to 14.3% in the feline population of Araçatuba. All isolates sequenced showed 100% similarity with *Cryptosporidium felis*. We conclude that cats domiciled can contribute to environmental contamination of a municipality, although *C. felis* is not the primary etiologic agent of cryptosporidiosis in humans.

Keywords: Criptosporidiosis, ELISA, Epidemiology, Feline, Kinyoun, Nested-PCR

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Cryptosporidium* é representado por protozoários intracelulares obrigatórios que parasitam principalmente a superfície epitelial do trato gastrointestinal de seus hospedeiros (FAYER; MORGAN; UPTON, 2000; XIAO et al., 2004; KARANIS; ALDEYARBI, 2011; CHALMERS; KATZER, 2013).

A criptosporidiose é mais frequente em pacientes imunossuprimidos, tornando-se crônica e, eventualmente fatal, embora possa ocorrer em indivíduos imunocompetentes, que desenvolvem gastroenterite aguda (NAVIN; JURANEK, 1984). Devido à sua gravidade e estreita relação com a deficiência de saneamento básico e com o baixo poder aquisitivo da população de risco, a enfermidade foi incluída na Iniciativa das Doenças Negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (SAVIOLI; SMITH; THOMPSON, 2006; ASSIS et al., 2013).

Surtos de *Cryptosporidium* por veiculação hídrica afetaram 5.000 pessoas em Swindon e Oxfordshire, Reino Unido, em 1989 (RICHARDSON et al., 1991) e 403.000 indivíduos em 1993, em Milwaukee, Estados Unidos (MACKENZIE et al., 1994). Tais fatos implicaram a água contaminada, ainda que tratada, como a principal forma de transmissão desta enfermidade (TZIPORI; WIDMER, 2008).

A identificação morfológica por microscopia óptica e os testes imunológicos são gênero-específicos devido à grande semelhança morfológica entre as espécies e à presença de antígenos conservados (MEIRELES, 2006; FAYER, 2008). Por isso, a utilização de ferramentas moleculares em investigações epidemiológicas tem proporcionado novas perspectivas sobre a diversidade de *Cryptosporidium* spp., e seu potencial zoonótico (XIAO et al., 2004; BAJER, 2008).

Atualmente, são reconhecidas 30 espécies do gênero *Cryptosporidium*, 20 são encontradas em mamíferos e 13 são consideradas zoonóticas. Análise genética tem identificado 61 genótipos diferentes em diversas espécies (PLUTZER; KARANIS, 2009; SMITH; NICHOLS, 2010; CHALMERS; KATZER, 2013; SLAPETA, 2013).

Apesar de o gênero *Cryptosporidium* tender a um comportamento espécie-específico, pode haver infecção acidental em outros hospedeiros. Seres humanos costumam ser parasitados por *Cryptosporidium hominis* e *Cryptosporidium parvum*, mas infecções pelas espécies *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium canis*, *Cryptosporidium felis*, *Cryptosporidium suis*, *Cryptosporidium muris* e *Cryptosporidium andersoni* podem ocorrer acidentalmente. O potencial zoonótico dos genótipos cervine, monkey, skunk, rabbit e chipmunk também já foi descrito (FENG et al., 2009; SMITH; NICHOLS, 2010).

Os objetivos desse trabalho são comparar os exames laboratoriais por ELISA de captura, identificação morfológica por microscopia feita a partir da técnica de centrífugo-flutuação em água-éter seguida de coloração por Kinyoun modificada e nested-PCR para estimar a taxa de eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e realizar a caracterização molecular de isolados obtidos em fezes de gatos domiciliados no Município de Araçatuba, SP.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Cryptosporidium foi encontrado pela primeira vez na mucosa gástrica de um rato, e foi denominado *Cryptosporidium muris* (do latim, *Crypto*: ausente, oculto; *Sporidium*: esporo) por não apresentar esporocistos, apenas esporozoítos (TYZZER, 1907).

Somente quase 70 anos após a descoberta do protozoário foram relatados os primeiros casos em humanos (MEISEL et al., 1976; NIME et al., 1976). Inicialmente, pesquisadores verificaram que seis entre sete pacientes com criptosporidiose estavam imunossuprimidos, o que definiu a enfermidade como oportunista e emergente (BIRD; SMITH, 1980). Quatro anos depois, concluiu-se que criptosporidiose ocorria principalmente em pacientes imunodeficientes, tornando-se crônica e eventualmente fatal, embora também pudesse ocorrer em indivíduos imunocompetentes, que geralmente desenvolvem gastroenterite aguda (NAVIN; JURANEK, 1984).

O primeiro relato de criptosporidiose em gatos foi realizado por Iseki (1979), que nomeou a espécie como *C. felis*, a espécie mais prevalente em felinos até os dias atuais. Posteriormente, identificaram-se neste hospedeiro *C. muris* (PAVLASEK; RYAN, 2007) e *C. parvum* (SARGENT et al., 1998), tendo este um elevado potencial zoonótico.

Embora a taxonomia ainda não esteja bem definida, sendo necessário o aprimoramento de parâmetros genéticos e bioquímicos (PLUTZER; KARANIS, 2009), o gênero *Cryptosporidium* é classificado como pertencente ao Filo Apicomplexa (possui complexo apical), Classe Sporozoa (apresenta ciclos de reprodução sexuada e assexuada com formação de oocistos), subclasse Coccidia (seu ciclo de vida envolve merogonia, gametogonia e esporogonia), ordem Eucoccidiida (ocorre esquizogonia), sub-ordem Eimeriina (desenvolve macrogametas e microgametas), Família Cryptosporidiidae (presença de um oocisto com quatro esporozoítos e sem esporocistos) (LEVINE, 1985).

A taxa de detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em gatos pode variar entre 0 e 30% em diversas regiões geográficas, conforme ilustrado no Quadro 1.

Quadro 1. Tamanho amostral (n) e número de gatos para *Cryptosporidium* spp. por diferentes métodos de diagnósticos.

Ano	Autor	Diagnóstico*	n	Positivos (%)	Local
1998	SARGENT et al.	VM	162	2 (1,2)	Perth, Austrália
1999	GENNARI et al.	S	187	27 (14,4)	São Paulo-SP
1999	McREYNOLDS et al.	ELISA-IgG	600	50 (8,3)	EUA
2002	HUBER et al.	S	48	6 (12,5)	Rio de Janeiro-RJ
2002	RAGOZZO et al.	S	138	2 (1,4)	São Paulo-SP Guarulhos-SP
2007	HUBER et al.	S	30	9 (30,0)	Rio de Janeiro-RJ
2007	FUNADA et al.	S	327	37 (11,3)	São Paulo-SP
2007	RAMBOZZI et al.	S	200	49 (24,5)	Turin, Itália
2008	TZANNES et al.	FA	1355	13 (1)	Reino Unido
2009	COELHO et al.	VM	51	2 (3,9)	Andradina-SP
2009	BALLWEBER et al.	RIFI	250	30 (12)	EUA
2009	OVERGAAW et al.	ZN	22	1 (4,6)	Holanda
2011	PAOLETTI et al.	RIFI	108	0	Itália
2012	PEREIRA; FERREIRA	ZN	102	13 (12,7)	Rio de Janeiro-RJ Terezópolis-RJ
2013	PIVOTO et al.	SZ	191	17 (8,9)	Santa Maria-RS

*S: técnica de centrifugo flutuação em solução saturada de sacarose; FA: coloração fenol-auramina; VM: coloração verde malaquita; RIFI: reação de imunofluorescência indireta; ZN: coloração de Ziehl-Neelsen; SZ: técnica de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco.

Foi observada maior prevalência da eliminação de oocistos em felinos abaixo de um ano de idade em estudos conduzidos na Itália (RAMBOZZI et al., 2007) e nos Estados Unidos da América (BALLWEBER et al., 2009). Isso poderia estar relacionado a um sistema imune ainda imaturo, debilitado ou em casos de enfermidades imunossupressoras intercorrentes, como a co-infecção por vírus da imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia felina (FeLV) (OLIVEIRA LEMOS et al., 2012).

Gatos com acesso a ruas tiveram cinco vezes mais chance de se infectar por *Cryptosporidium* spp. quando comparados a gatos mantidos somente dentro de casa (McREYNOLDS et al., 1999), contudo isso ainda é controverso (RAMBOZZI et al., 2007 e BALLWEBER et al., 2009). Tal divergência poderia ser explicada pelo

fato de essas pesquisas terem sido conduzidos em tempos e em diferentes regiões geográficas. Além disso, os fatores de risco de infecção podem ser multifatoriais.

Gatos alimentados por dieta caseira tiveram quase sete vezes mais chance de adquirir criptosporidiose quando comparados àqueles que ingeriam somente ração (RAMBOZZI et al., 2007), o que confirma a importância dos alimentos contaminados na epidemiologia da doença.

A ocorrência de sinais clínicos ainda é discutível. Animais imunossuprimidos são mais susceptíveis ao desenvolvimento da enfermidade (MONTICELLO et al., 1987), embora muitos felinos sejam assintomáticos (MTAMBO et al., 1991; NASH; MTAMBO; GIBBS, 1993; FAYER et al., 2006)

A chance de detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. foi duas vezes maior em gatos com diarreia (McREYNOLDS et al., 1999; RAMBOZZI et al., 2007). Entretanto, também pode haver associação entre a criptosporidiose e a co-infecção por outros enteroparasitos, como *Toxascaris leonina*, *Toxocara cati*, *Cystoisospora* spp., *Aelurostrongylus abstrusus* e *Dipylidium caninum* (RAMBOZZI et al., 2007), o que dificulta determinar a causa primária da diarreia.

Em caso de infecção ativa, *Cryptosporidium* spp. pode induzir à atrofia e à fusão das microvilosidades dos enterócitos e à inflamação local, reduzindo a superfície de absorção (KOUDELA; JIRÍ, 1997). Há indícios de esta interação induzir à apoptose de enterócitos no hospedeiro (BURET; CHIN; SCOTT, 2003; MELE et al., 2004), e esta patogenia ocasionaria o desequilíbrio no transporte de nutrientes (THOMPSON; PALMER; O'HANDLEY, 2008; VADLAMUDI et al., 2013).

As técnicas de diagnóstico podem ser divididas em três grandes grupos: microscopia, ensaios imunoenzimáticos e molecular. A microscopia é amplamente utilizada na rotina clínica. Oocistos podem ser visualizados por microscópio de contraste de fase após a realização do método de flutuação de Sheather (TEIXEIRA et al., 2011), ou pelo emprego de diversos corantes, tais como: Ziehl-Neelsen modificado (HENRIKSEN; POHLENZ, 1981); Kinyoun modificado (MA; SOAVE, 1983) e verde malaquita (ELLIOT et al., 1999). Embora esses métodos sejam relativamente simples e de baixo custo, nenhuma delas é capaz de diferenciar as espécies de *Cryptosporidium* spp. Além disso, requerem grande habilidade do microscopista e apresentam baixa especificidade e sensibilidade reduzida em casos

de baixa eliminação de oocistos (QUÍLEZ et al., 1996; MORGAN et al., 1998; CLARK, 1999).

Diversas técnicas de imunoensaio, ou seja, fundamentadas na ligação antígeno-anticorpo, podem ser usadas no diagnóstico da criptosporidiose, dentre as quais se destacam: imunofluorescência direta (IFD), ensaio imunoenzimático direto (ELISA de captura) e imunocromatografia. Como desvantagem, esses métodos podem ser mais complexos, onerosos, e requerem uma rotina laboratorial mais intensa, quando comparados à microscopia.

A IFD apresenta alta sensibilidade (98,5 – 100%) e especificidade (96 – 100%) (STERLING; ARROWOOD, 1986; STIBBS; ONGERTH, 1986, GARCIA et al., 1987; McLAUHLIN et al., 1987; ONGERTH; STIBBS, 1987; ARROWOOD; STERLING, 1989; GRIGORIEW et al., 1994; NIEMINSKI; SCHAEFER III; ONGERTH, 1995; GRACZYK; CRANFIELD; FAYER, 1996; GARCIA; SHIMIZU, 1997; SMITH; GRIMASON, 2003). As técnicas de ELISA de captura e imunocromatografia apresentam especificidade entre 98 e 100% (ROBERT et al., 1990; UNGAR, 1990; NEWMAN et al., 1993; GARCIA; SHIMIZU, 1997; CHAN et al., 2000; KATANIK et al., 2001; JOHNSTON et al., 2003). A sensibilidade da imunocromatografia ainda é controversa (JOHNSTON et al., 2003), mas a do ELISA de captura pode chegar a 100% (ELGUN; KOLTAS, 2011).

Diversas técnicas moleculares fundamentadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) também podem ser empregadas no diagnóstico da enfermidade, contudo são mais complexas e de alto custo. Como vantagem, possibilitam a diferenciação das espécies de *Cryptosporidium* e auxiliam no estudo da epidemiologia e ecologia da enfermidade, por isso são mais utilizadas em pesquisas científicas (THOMPSON; CONSTANTINE; MORGAN, 1998; FAYER; MORGAN; UPTON, 2000; MORGAN, 2000; JIANG; XIAO, 2003; MONIS et al., 2005; GASSER, 2006).

Há poucos relatos sobre o tratamento de criptosporidiose em gatos, porque as drogas disponíveis até o momento são pouco eficazes. Os sinais clínicos, quando ocorrem, costumam ser autolimitantes entre os animais imunocompetentes.

Tilosina, via oral, na dose de 11 mg/kg, foi administrada duas vezes ao dia por 28 dias, para felinos infectados por *Cryptosporidium* spp. e houve a remissão

dos sinais clínicos na primeira semana de tratamento (LAPPIN et al., 1997). Devido ao fato de o animal apresentar diarreia crônica, a possibilidade de ter havido uma cura espontânea é pequena e a eficácia da tilosina, neste caso, parece ser a hipótese mais plausível. A tilosina é um antibiótico macrolídeo com efeitos também imunomodulatórios (BABA et al., 1998)

Uma gata de seis meses de idade com diarreia crônica foi tratada com paromomicina por via oral, na dose de 165 mg/kg duas vezes ao dia por cinco dias, e o fármaco foi capaz de reduzir a eliminação de oocistos abaixo dos níveis de detecção, contudo não foi possível determinar se a infecção foi completamente eliminada (BARR et al., 1994). Em caso de hematoquezia, essa droga não é recomendada, pois pode ser absorvida e provocar ação nefrotóxica e ototóxica (GOOKIN et al., 1999).

A nitazoxanida já foi usada no tratamento de co-infecção entre *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em gatos na dose de 25 mg/kg por via oral duas vezes ao dia por pelo menos cinco dias (SCORZA; LAPPIN, 2007). Entretanto, este fármaco pode causar emese e gastroenterite (SCORZA; TANGTRONGSUP, 2010).

Até o momento, a paromomicina é a droga de escolha para tratar a criptosporidiose (SHAHIDUZZAMAN; DAUGSCHIES, 2012).

O controle e a prevenção da criptosporidiose devem ser fundamentados na epidemiologia da doença, cuja forma de transmissão é fecal-oral. Boas condições de higiene e saneamento básico são aspectos primordiais que visam não só à redução do risco de ingestão de oocistos como à redução da contaminação ambiental.

A resistência de oocistos de *C. parvum* foi avaliada em diversas condições ambientais, e após um mês de congelamento, apenas 1,8% dos oocistos permaneceram viáveis. Essas formas evolutivas resistiram por no máximo quatro horas de dessecação e após este período 100% deles estavam inativados, entretanto, podem permanecer viáveis por mais vários meses quando estiverem contidos em fezes. A floculação em sulfato de alumínio, a exemplo do que é realizado em estações de tratamento de água, não foi efetiva para a eliminação do protozoário (ROBERTSON; CAMPBELL, SMITH, 1992).

Métodos de filtração comumente utilizados por estações de tratamento de água removem a maioria dos agentes contidos na água, porém oocistos de

Cryptosporidium spp. foram encontrados em 3,8-40% das amostras de água avaliadas com uma concentração de até 0,5 oocistos por litro (ROSE; LISLE; LeCHEVALLIER, 1997). Por outro lado, oocistos presentes em pequena quantidade de água podem ser inativados quando submetidos a pelo menos seis horas de exposição solar (MÉNDEZ-HERMIDA et al., 2007). Isto poderia ser realizado antes de o gato ter acesso à água, contudo, esta espécie de animal tem como hábito a preferência por água fresca. Outra forma de inativar os oocistos é a fervura da água por mais de um minuto (CDC, 1999)

Os oocistos não são inativados pela maioria dos desinfetantes utilizados, tais como: hipoclorito, ácido peracético, orto-ftalaldeído, álcool etílico, glutaraldeído, fenol, iodo povidine, amônia quaternária e peróxido de hidrogênio em concentrações inferiores a 6%.

Cryptosporidium spp. é sensível à dessecação, aos raios ultravioletas da irradiação solar (ROCHELLE et al., 2005), ao peróxido de hidrogênio 6-7,5% a 20°C por 20 minutos. Esterilização de material por meio de autoclave e óxido etileno é eficaz (BARBEE et al., 1999).

Além dos cuidados da fonte de água dos animais, recomenda-se evitar o acesso dos animais a ruas e fornecer somente rações comerciais aos gatos, que também são boas alternativas para evitar a infecção (McREYNOLDS et al., 1999; RAMBOZZI et al., 2007).

Cães e gatos parecem exercer um risco mínimo de potencial reservatório, porque na maioria das vezes são infectados por *C. canis* e *C. felis*, respectivamente, que são pouco encontrados em seres humanos, os quais, geralmente, infectam-se por *C. parvum* e *C. hominis*. A ausente ou baixa associação relatada na literatura científica entre a ocorrência de criptosporidiose e o contato com um animal de estimação reforça essa hipótese (LUCIO-FORSTER et al., 2010). Entretanto, 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.

Portanto, há alguns pontos controversos, obscuros, e que ainda precisam ser elucidados em relação à infecção por *Cryptosporidium* spp. em gatos. A detecção do parasito em fezes desse hospedeiro é comum, embora hajam poucos

estudos conduzidos no Brasil (GENNARI et al., 1999; RAGOZO et al., 2002; HUBER; BOMFIM; GOMES, 2002; FUNADA et al., 2007; HUBER et al., 2007; COELHO et al., 2009), dentre os quais, somente dois realizaram a caracterização molecular (HUBER et al., 2007; THOMAZ et al., 2007). Por se tratar de uma parasitose subdiagnosticada na rotina clínica veterinária de pequenos animais, é importante verificar qual é a melhor técnica de diagnóstico dessa enfermidade e suas implicações. Microscopia e ensaios imunoenzimáticos não são capazes de identificar a espécie do coccídio, o que limita a compreensão de sua relevância em Saúde Pública. Até o momento, não existem drogas eficazes no tratamento da criptosporidiose, e esta enfermidade continua apresentando potencial de causar surtos, podendo ser fatal em indivíduos imunossuprimidos. Esses fatos justificam a importância do presente trabalho.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Comparar técnicas de diagnóstico para estimar a taxa de eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. na população de gatos domiciliados no Município de Araçatuba, São Paulo.

3.2 Objetivos específicos

- Comparar os métodos de diagnóstico por ELISA de captura, análise morfológico por microscopia utilizando técnica de centrífugo-flutuação em água-éter seguida de coloração de Kinyoun modificada e nested-PCR na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em fezes de gatos;
- Estimar a taxa de eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em gatos domiciliados no Município de Araçatuba, SP;
- Realizar a caracterização molecular de isolados de *Cryptosporidium* spp. obtidos em fezes de gatos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

O estudo foi realizado no Município de Araçatuba, localizado na longitude -50,43° e na latitude -21,2°, região Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. A cidade possuía uma população estimada de 182.204 habitantes, distribuídos em 1.167 km², divididos em oito áreas censitárias, dentre as quais sete (1-7) são pertencentes à zona urbana (IBGE, 2010). A oitava área censitária, que abrange a zona rural, foi excluída por não fazer parte do escopo desta pesquisa.

4.2 Amostragem e população de estudo

Para o cálculo de tamanho amostral mínimo para estudos de prevalência consideraram-se 10% de prevalência estimada, 5% de erro amostral absoluto, 5% de nível de significância, corrigido pelo número da população de gatos pertencentes à área de estudo, o que resultou em 138 amostras (De TORRES et al., 2009). A prevalência estimada foi adotada segundo resultados de estudos conduzidos anteriormente no Brasil (GENNARI et al., 1999; RAGOZO et al., 2002; HUBER; BOMFIM; GOMES, 2002; FUNADA et al., 2007; COELHO et al., 2009).

A população de gatos de Araçatuba foi quantificada por meio de censo realizado pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) entre os meses de agosto de 2010 e janeiro de 2011. Os agentes comunitários de saúde (ACS) registraram 1.061 gatos na área 1; 1.033 na área 2; 1.104 na área 3; 416 na área 4; 544 na área 5; 744 na área 6, e 812 na área 7, totalizando 5.774 gatos residentes na zona urbana municipal.

Durante este procedimento, ACS preencheram um formulário onde constava o nome do munícipe entrevistado, o número de cães e de gatos pertencentes à família e o endereço, incluindo nome do logradouro e os números da residência, da quadra e da área censitária, além da identificação do ACS. Os formulários preenchidos foram agrupados segundo a área censitária em pastas armazenadas no CCZ.

A amostragem aleatória simples foi realizada por meio de sorteio proporcional à população felina de cada área censitária. Este tipo de delineamento experimental foi escolhido para reduzir eventuais influências de fatores ambientais que pudessem interferir na prevalência (De TORRES et al., 2009).

Após o sorteio de cada gato, o nome do logradouro e o número da residência foram registrados em uma nova planilha para que, posteriormente, esses dados fossem utilizados na pesquisa do número telefônico de proprietários cadastrados na lista telefônica. Logo, a presença de um telefone fixo residencial foi critério de inclusão neste estudo.

Durante o contato telefônico inicial, os proprietários foram esclarecidos quanto aos objetivos de pesquisa. Em caso de adesão ao experimento, agendava-se uma visita domiciliar para a realização da entrega do coletor universal, seguida de explicação sobre a quantidade de fezes a ser colhida e o modo de armazenamento. Diariamente, os proprietários eram contatados para verificação se a colheita havia sido feita. Quando a resposta era afirmativa, as amostras eram buscadas imediatamente para que o acondicionamento no laboratório fosse realizado em menos de 24 horas.

As amostras foram provenientes de gatos domiciliados e de ambos os sexos e de raças variadas ou indefinidas. Os animais foram categorizados por idade: jovens (0 a 12 meses); adultos (12 a 84 meses), e idosos (acima de 84 meses), segundo a estimativa dos proprietários e inspeção do médico veterinário.

4.3 Acondicionamentos das amostras

As amostras coletadas foram devidamente identificadas e acondicionadas de acordo com os métodos a serem utilizados para o diagnóstico. Assim, as fezes foram separadas da seguinte forma: 2 g em dicromato de potássio a 5,0% na proporção 1:1 (massa/volume) para uso em microscopia; 1 g em formol a 10% para ELISA de captura, e 200 µg, em duplicata, foram congelados a -20°C em microtubos de 1,5 mL livres de DNase e RNase para nested-PCR.

4.4 Microscopia

As amostras foram concentradas por meio da técnica de centrifugação em água-éter (MELONI; THOMPSON, 1996). Posteriormente, uma gota do sedimento foi utilizada para esfregação em lâmina, que foi corada pelo método de Kinyoun modificado (LENNETTE, 1985; GONÇALVES, 2002). Para visualização das lâminas, utilizou-se microscópio óptico com objetiva de 40x com óleo de imersão.

4.5 ELISA de captura

As amostras fecais mantidas em formol 10% foram processadas por ELISA de captura, em monocata, utilizando-se o kit comercial *Cryptosporidium stool antigen* ELISA[®] (IVD Research, Estados Unidos da América[™]), desenvolvido para o diagnóstico em humanos. Amostras com densidade óptica (DO) maiores que 0,080 foram consideradas positivas, conforme as recomendações do fabricante. As DOs foram obtidas por meio de espectrofotômetro (Packard Bio Science Company[™]) com o comprimento de onda de 490 nm.

4.6 Extração de DNA e nested-PCR

A extração de DNA das amostras foi por *kit* comercial QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit (Qiagen[™], Estados Unidos da América), conforme as recomendações do fabricante. Posteriormente, para amplificação de fragmentos do gene da subunidade 18S do RNA ribossômico, realizou-se a técnica de nested-PCR com os primers 5' TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG 3' e 5' CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA 3' para a reação primária (1325 bp) e 5' GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG 3' e 5' AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A 3' para a reação secundária (826-840 bp) (XIAO et al., 1999a), sob as seguintes condições de reação: preparação de 25 µL de solução contendo 2,5 µL de tampão para PCR 10 x, 2,5 mM MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase, 200 µM de cada desoxirribonucleotídeo, 100 nM de cada oligonucleotídeo (primer) e 2,5 µL de DNA-alvo. 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 55° C e 60 segundos de extensão a 72° C, com extensão final a 72° C por 7

minutos. Para eletroforese, utilizou-se gel contendo 1,5 g de agarose e 5,0 μ L de brometo de etídio em 100 mL de TBE. A corrida foi feita a 99V, durante 50 minutos.

4.7 Purificação de DNA e caracterização molecular

Os fragmentos resultantes das reações de PCR foram purificados por kit comercial QIAamp[®] DNA Mini Kit (Qiagen[™], Estados Unidos da América), segundo as recomendações do fabricante, e submetidos a sequenciamento, utilizando-se o DYEnamic[®]ET dye terminator Cycle Sequencing Kit (MegaBACE[™], Estados Unidos da América). As reações de sequenciamento foram realizadas em duplicata e nas duas direções.

A determinação da sequência-consenso foi realizada com o uso do programa computacional CodonCode Aligner v.1.5.2. (CodonCode Corp. Dedham[™]). Somente consideraram-se nucleotídeos com valores de qualidade de sequenciamento maior ou igual a 20. Após determinação da sequência-consenso dos fragmentos amplificados por PCR, as mesmas foram alinhadas com o auxílio dos programas CLUSTAL_X (THOMPSON et al., 1997) e BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999), tomando-se como base sequências homólogas disponíveis no GenBank.

4.8 Análise estatística

O ELISA de captura e a nested-PCR foram comparados à microscopia, a qual inicialmente foi adotada como padrão-ouro. Para evitar uma interpretação tendenciosa, a leitura das lâminas coradas por Kinyoun foi realizada antes das demais técnicas.

A discordância e o grau de concordância entre os métodos de diagnósticos foram calculados pelo teste de McNemar e pelo coeficiente *Kappa*, respectivamente, utilizando o programa computacional Bioestat 5.0 (AYRES et al., 2007). Para a classificação do coeficiente *Kappa* adotou-se os seguintes intervalos: 0 a 0,19 (concordância pobre); 0,20 a 0,39 (concordância razoável); 0,40 a 0,59 (concordância moderada); 0,60 a 0,79 (concordância substancial), e 0,80 a 1,00 (concordância quase perfeita) (LANDIS; KOCH, 1977).

Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da nested-PCR e do ELISA de captura foram calculados por meio do programa computacional GraphPad Prism 5.0.

Para estimar a taxa de eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. na população de gatos domiciliados no município em questão, apenas amostras positivas em pelo menos dois métodos de diagnóstico foram consideradas. Adotou-se a seguinte fórmula matemática, na qual p é a prevalência amostral, n é o tamanho amostral, z é relativo a uma distribuição normal com intervalo de confiança de 95%.

$$IC95\% = P \pm Z \sqrt{\frac{P(1 - P)}{n}}$$

A associação entre a intensidade de densidade óptica obtida por ELISA de captura e a amplificação por nested-PCR foi verificada por Teste Exato de Fisher. Os dados da densidade óptica foram categorizados como negativo ($<0,079$), fraco positivo ($0,080 - 0,105$) e forte positivo ($>0,105$).

Os dados foram tabulados por meio do programa computacional Microsoft Office Excel 2010 para realização da análise estatística descritiva de distribuição das amostras.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 População de estudo e composição das amostras

Para conseguir o tamanho amostral mínimo ($n=138$), precisamos cadastrar 612 proprietários de 2.290 gatos. Em média, colheram-se amostras de três, variando de dois a cinco gatos, dentre as 55 residências investigadas. A taxa de recusa de adesão à pesquisa foi de 91%.

As principais justificativas da elevada taxa de recusa foram o desconhecimento do local onde o gato defeca; a indisponibilidade de tempo; a repulsa pelo procedimento de colheita das fezes, e o desinteresse pela pesquisa. Notamos, também, que ao citarmos que os endereços haviam sido sorteados a partir de dados cadastrados pelo CCZ, alguns proprietários tiveram receio de que os animais positivos pudessem ser eutanasiados, ainda que explicássemos que este não era o objetivo da pesquisa. Araçatuba é cidade endêmica para leishmaniose visceral canina e o CCZ é o órgão responsável pelo diagnóstico sorológico e pela eutanásia compulsória de cães soropositivos, obedecendo às normas de controle desta enfermidade vigentes no país (BRASIL, 2003). Outra possível explicação para esta elevada taxa de recusa seria viés do contato telefônico, uma via de comunicação que costuma transmitir menor credibilidade, quando comparada à forma presencial. Contudo, essa ferramenta foi a mais exequível para a obtenção das amostras, devido à dimensão geográfica da cidade.

É recomendável a colheita de uma única amostra por residência, visando ao controle de variáveis ambientais e de manejo sanitário e animal (De TORRES et al., 2009). Entretanto, foi necessário cadastrar 40% da população felina do município para a obtenção do tamanho amostral mínimo para um estudo de prevalência. O uso daquele método de amostragem seria impraticável devido à elevada taxa de recusa dos proprietários. Além disso, 37/55 (67%) dos proprietários afirmaram que seus gatos tinham acesso a ruas, e isso é uma prática comum em municípios do interior do Estado de São Paulo. Por esse motivo, a colheita de amostras de mais de um gato por residência deixa de ser um viés amostral, mas uma representação da realidade do município, ou seja, os gatos domiciliados podem ter acesso a um

ambiente contaminado em peridomicílio ou em vias públicas, tornando o desafio ambiental da região em que se encontra a unidade amostral tão importante quanto o ambiente peridomiciliar.

5.2 Comparação entre os métodos de diagnóstico

Não houve discordância entre o ensaio imunoenzimático e a microscopia ($p=1,0000$) nem entre a nested-PCR e a microscopia ($p=0,1094$). Entretanto, o grau de concordância variou de substancial ($kappa=0,7948$) a moderado ($kappa=0,4647$), respectivamente, entre as técnicas, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Comparação entre as técnicas de ELISA de captura e nested-PCR em relação à análise morfológica por microscopia utilizando a técnica de centrífugo-flutuação em água-éter seguida de coloração por Kinyoun modificada (padrão-ouro) na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em fezes de gatos.

Técnicas	Kinyoun		McNemar	Kappa
	Positivo	Negativo		
ELISA				
Positivo	11	3	1,0000	0,7948*
Negativo	2	122		
Nested-PCR				
Positivo	5	2	0,1094	0,4647**
Negativo	8	123		

*Concordância substancial; **concordância moderada.

Entre as três amostras positivas por ELISA de captura e negativas por microscopia, duas (66,7%) tiveram o diagnóstico confirmado por nested-PCR, o que representa 29% das amostras sequenciadas.

O ELISA de captura e a nested-PCR apresentaram especificidades semelhantes; entretanto, a técnica molecular foi pouco sensível (Quadro 2). Ainda assim, a interpretação da especificidade do ensaio imunoenzimático utilizado nesta pesquisa deve ser feita com cautela. Entre as três amostras positivas por ELISA de captura e negativas por análise morfológica por microscopia, duas (66,7%) tiveram

diagnóstico confirmado por nested-PCR, o que representa 29% das amostras sequenciadas. Por isso, não há indícios de que tenha havido reação inespecífica entre antígeno da amostra e anticorpo monoclonal contido no kit comercial de ELISA de captura, mas a ausência de detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. por microscopia.

Quadro 2. Sensibilidade, especificidade e valores preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN) do ELISA de captura e da nested-PCR comparados à análise morfológica por microscopia utilizando a técnica de centrífugo-flutuação em água-éter seguida de coloração por Kinyoun modificada (padrão-ouro) usados na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em fezes de gatos (IC95%).

Parâmetros	ELISA de captura	Nested-PCR
Sensibilidade	84,6% (54,6 - 98,1)	38,5% (13,9 - 68,4)
Especificidade	97,6% (93,2 - 99,5)	98,4% (94,3 - 99,8)
VPP	78,6% (49,2 - 95,3)	71,4% (29,0 - 96,3)
VPN	98,4% (94,3 - 99,8)	93,9% (88,3 - 97,3)

O presente estudo sugere que o kit comercial de ELISA de captura utilizado seja mais sensível do que a análise morfológica por microscopia, ainda que não tenha havido discordância entre estes métodos ($p=1,0000$).

Houve amplificação de DNA em apenas cinco (38,5%) das 13 amostras positivas por microscopia. Não houve amplificação de DNA em nenhuma amostra positiva por Kinyoun e negativa no ELISA de captura nem em amostras que tenham sido negativas por microscopia e ensaio imunoenzimático, o que confirma a elevada especificidade da nested-PCR.

A dificuldade na amplificação da subunidade 18S do RNA ribossômico por nested-PCR está de acordo com outros trabalhos da literatura (HUBER et al., 2007; THOMAZ et al., 2007). Isso não indica que a técnica molecular seja mais específica do que as demais utilizadas neste estudo, mas, sim, menos sensível. Essa hipótese é reforçada pela concordância substancial do ensaio imunoenzimático em contraste com a concordância moderada da nested-PCR, quando comparada à microscopia.

A baixa sensibilidade da nested-PCR pode ter ocorrido devido à presença de inibidores nas fezes, tais como complexos polissacarídeos, sais de bile, lipídeos e

uratos já descritos na literatura (SCHRADER et al., 2012). Adicionalmente, verificamos uma associação entre a intensidade da densidade óptica e a amplificação por nested-PCR ($p < 0,0001$), havendo maior número de amplificação entre amostras que obtiveram densidade óptica superior a 0,105, classificada como fortemente reagente (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição da intensidade da densidade óptica para detecção de antígenos, segundo a amplificação por nested-PCR para detecção de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de gatos.

Densidade óptica	Nested-PCR		p-valor*
	Negativo	Positivo	
<0,079	124	0	
0,080 a 0,105	4	1	<0,0001
>0,105	3	6	
Total	131	7	

*Teste Exato de Fisher ($p < 0,05$)

A densidade óptica pode representar indiretamente a quantidade de oocistos presentes nas fezes devido à ligação antígeno-anticorpo e ao complexo enzimático. Essa baixa quantidade de oocistos foi confirmada por microscopia. Na maioria das amostras, observaram-se de um a cinco oocistos por lâmina (Figura 1). A baixa eliminação de *Cryptosporidium* spp. em gatos já foi constada em outros estudos (HUBER et al., 2007; COELHO et al., 2009). Isso também explica a dificuldade de amplificação por nested-PCR.

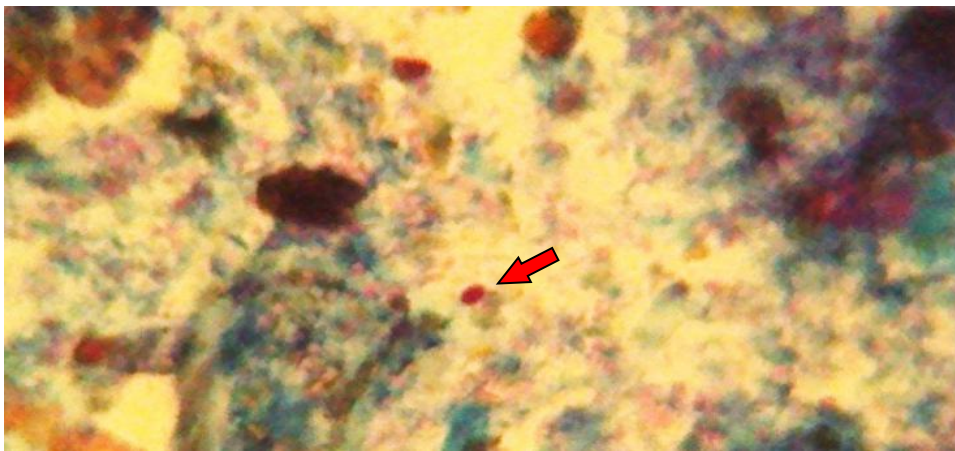


Figura 1. Aspecto microscópico de esfregaço de fezes obtido por técnica de centrífugo-flutuação em água-éter seguida de coloração de Kinyoun modificada e observado ao microscópio óptico com objetiva de 40x e óleo de imersão. Notar oocisto de *Cryptosporidium* spp. apontado pela seta.

5.3 Ocorrência de *Cryptosporidium* spp.

Oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram detectados por pelo menos dois métodos de diagnóstico em 9,4% das amostras de fezes examinadas. Seis amostras foram positivas somente por ELISA de captura e por análise morfológica por microscopia utilizando a técnica de centrífugo-flutuação em água-éter seguida de coloração por Kinyoun modificado (microscopia); duas amostras foram positivas somente por ELISA de captura e nested-PCR, e cinco amostras foram positivas em todos os métodos de diagnóstico utilizados. Com intervalo de confiança de 95%, a estimativa da taxa de eliminação de oocistos pela população de gatos domiciliados na zona urbana do município variou entre 4,5% e 14,3%. Todos os isolados sequenciados apresentaram 100% de similaridade com *C. felis*, referência AF.112575.1 do GenBank (XIAO et al., 1999b), conforme ilustrado na Tabela 3.

Tabela 3. Distribuição da amostragem, número de amostras de fezes de gatos positivas para *Cryptosporidium* spp. em pelo menos dois métodos de diagnóstico (ELISA de captura; análise morfológica por microscopia utilizando técnica de centrífugo flutuação em água-éter seguida de coloração de Kinyoun modificada, e nested-PCR) e número de isolados caracterizados, segundo idade e sexo.

Variável	Amostragem (%)	Positivas (%)	Caracterizadas (%)
Idade (meses)			
Até 12	72 (52,2)	8 (11,1)	3 (4,2)
12 a 84	56 (40,6)	5 (8,9)	4 (7,1)
Acima de 84	10 (7,2)	-	-
Sexo			
Macho	57 (41,3)	6 (10,5)	4 (7,0)
Fêmea	81 (58,7)	7 (8,6)	3 (3,7)

*As sete amostras amplificadas tiveram 100% de similaridade ao *C. felis*, referência AF.112575.1 do GenBank (XIAO et al., 1999b)

A maior taxa de prevalência entre gatos jovens obtida em nosso trabalho é semelhante aos de outros estudos que visaram à investigação de fatores de risco de infecção (RAMBOZZI et al., 2007; BALLWEBER et al., 2009). Houve maior taxa de eliminação de oocistos em felinos abaixo de um ano de idade, estando de acordo com outros estudos conduzidos na Itália (RAMBOZZI et al., 2007) e nos Estados Unidos da América (BALLWEBER et al., 2009). Nossos resultados discordam dos achados de McReynolds et al. (1999), que verificaram que felinos com mais de 10 anos de idade tinham quatro vezes mais chance de se infectar pelo protozoário quando comparados a filhotes abaixo de um ano de idade. Entretanto, apenas 10/138 (7,2%) dos gatos examinados em nosso estudo tinham mais de 10 anos de idade, o que poderia subestimar a prevalência nesta faixa etária, impossibilitando a comparação com os achados de McReynolds et al. (1999).

A maior ocorrência de criptosporidiose em felinos jovens ou idosos pode estar relacionada a uma deficiência no sistema imune, frequente nesses grupos etários. A imunossupressão em felinos pode ser um fator predisponente à doença, segundo Oliveira Lemos et al. (2012), que detectaram liberação de oocistos em 8,3% de amostras fecais, dentre as quais, 80% dos animais eram positivos para FIV e FeLV por sorologia.

A prevalência amostral e o intervalo de confiança encontrados nesta investigação estão de acordo com outros estudos conduzidos no Brasil, cuja ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. varia de 1,4% a 14,4% em amostras fecais avaliadas por microscopia utilizando as técnicas de centrífugo-flutuação em solução saturada de sacarose ou por coloração de verde malaquita ou de Ziehl-Neelsen (GENNARI et al., 1999; HUBER; BOMFIM; GOMES, 2002; RAGOZO et al., 2002; FUNADA et al., 2007; COELHO et al., 2009; PEREIRA; FERREIRA, 2012; PIVOTO et al., 2013). Há relato de uma prevalência amostral de 30% neste hospedeiro no país (HUBER et al., 2007). Entretanto, as fezes examinadas por microscopia utilizando a técnica de centrífugo-flutuação em solução saturada de sacarose foram colhidas de gatos mantidos em um único abrigo, o que não representa adequadamente a prevalência da enfermidade em uma população. Neste caso, é provável que naquele ambiente houvesse maior contaminação ambiental, o

que justificaria este achado discrepante em relação aos demais estudos conduzidos no Brasil.

A ocorrência exclusivamente de *C. felis* em amostras fecais de gatos está de acordo com outros estudos realizados no país (HUBER et al., 2007; THOMAZ et al., 2007), o que confere um risco à Saúde Pública. Embora os humanos sejam parasitados principalmente por *C. hominis* e *C. parvum*, a ocorrência de infecções por *C. meleagridis*, *C. canis* e *C. felis* também já foi descrita (FENG et al., 2009).

6. CONCLUSÃO

Concluimos que análise morfológica utilizando a técnica de centrífugo-flutuação em água-éter seguida de coloração de Kinyoun modificada (microscopia), por se tratar de uma técnica simples e de baixo custo, pode ser utilizada no diagnóstico da criptosporidiose em amostras fecais de gatos na rotina do atendimento de clínicas médicas veterinárias. Entretanto, é recomendável a utilização do ELISA de captura na rotina laboratorial visando ao diagnóstico em larga escala populacional, por ter sido mais sensível do que as demais. A microscopia pode ser usada para triagem de amostras fecais de gatos destinadas à nested-PCR, embora o ensaio imunoenzimático seja mais recomendável, quando o objetivo é realizar o sequenciamento genético seguido de caracterização molecular. A nested-PCR é menos sensível do que as demais técnicas empregadas neste estudo devido à baixa carga parasitária de *C. felis*. A prevalência amostral encontrada em nosso estudo sugere que os gatos domiciliados possam contribuir para a contaminação ambiental de um município, ainda que o *C. felis* não seja o principal agente etiológico da criptosporidiose em seres humanos.

7. REFERÊNCIAS

- 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, n. 7, p. 1490-1495, 1989.
- ASSIS, D. C.; RESENDE, D. V.; SANTOS, M. C.; CORREIA, D.; OLIVEIRA-SILVA, M. B. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Cystoisospora belli* in HIV-infected patients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 3, p. 149-154, 2013.
- AYRES, M., AYRES JÚNIOR, M., AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Ong Mamiraua. Belém, PA, 364p., 2007.
- BABA, T.; YAMASHITA, N.; KODAMA, H.; MUKAMOTO, M.; ASADA, M.; NAKAMOTO, K.; NOSE, Y.; MCGRUDER, E. D. Effect of tylosin tartrate (tylan soluble) on cellular immune responses in chickens. **Poultry Science**, v. 77, n. 9, p.1306-1311, 1998.
- BAJER, A. *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. infections in humans, animals and the environment in Poland. **Parasitology Research**, v. 104, n. 1, p. 1-17, 2008.
- 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, n. 3-4, p. 306-310, 2009.
- BARBEE, S. L.; WEBER, D. J.; SOBSEY, M. D.; RUTALA, W. A. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity by disinfection and sterilization processes. **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 49, n. 5, p. 605-611, 1999.
- BARR, S. C.; JAMROSZ, G. F.; HORNBUCKLE, W. E.; BOWMAN, D. D.; FAYER, R. Use of paromomycin for treatment of cryptosporidiosis in a cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 205, n. 12, p. 1742-1743, 1994.
- BIRD, R. G; SMITH, M. D. Cryptosporidiosis in man: parasite life cycle and fine structural pathology. **The Journal of Pathology**, v.132, n. 3, p. 217-233, 1980.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2003, 120p.

- BURET, A. G.; CHIN, A. C.; SCOTT, K. G. Infection of human and bovine epithelial cells with *Cryptosporidium andersoni* induces apoptosis and disrupts tight junctional ZO-1: effects of epidermal growth factor. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 12, p.1363-1371, 2003.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for the prevention of opportunistic infections in persons infected with human immunodeficiency virus. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.48, p. 1-59, 1999.
- CHALMERS, R. M.; KATZER, F. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 5, p. 237-251, 2013.
- CHAN, R.; CHEN, J.; YORK, M. K.; SETIJONO, N.; KAPLAN, R. L.; GRAHAM, F.; TANOWITZ, H. B. Evaluation of a combination rapid immunoassay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* antigens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 393-394, 2000.
- CLARK, D. P. New insights into human cryptosporidiosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 554-563, 1999.
- COELHO, W. M. D.; AMARANTE, A. F. T.; SOUTELLO, R. V. G.; MEIRELES, M. V.; BRESCIANI, K. D. S. Ocorrência de parasitos gastrintestinais em amostras fecais de felinos no município de Andradina, São Paulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 2, p. 46-49, 2009.
- De TORRES, T. Z. G; MAGNANINI, M. M. F.; LUIZ, R. R. Amostragem. In: MEDRONHO, R. A.; BLOCH, K. V.; LUIZ, R. R.; WERNECK, G. L. **Epidemiologia**. 2 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2009. p. 403-427
- ELGUN, G; KOLTAS, I. S. Investigation of *Cryptosporidium* spp. antigen by ELISA method in stool specimens obtained from patients with diarrhea. **Parasitology Research**, v. 108, n. 2, p. 395-397, 2011.
- ELLIOT, A.; MORGAN, U. M.; THOMPSON, R. C. Improved staining method for detecting *Cryptosporidium* oocysts in stools using malachite green. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 39-42, 1999.
- FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1305 -1322, 2000.
- FAYER, R.; 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, n. 1-2, p. 44-53, 2006.

- FAYER, R. Biology. In: FAYER, R., Xiao, L. (Eds.), ***Cryptosporidium and Cryptosporidiosis***, 2 ed. Boca Raton: CRC Press and IWA Publishing, 2008. p. 1-42.
- FENG Y.; LI N.; DUAN L.; XIAO L. *Cryptosporidium* genotype and subtype distribution in raw wastewater in Shanghai, China: evidence for possible unique *Cryptosporidium hominis* transmission. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 153-157, 2009.
- FUNADA, M. R.; PENA, H. F. J.; SOARES, R. M.; AMAKU, M.; GENNARI, S. M. Frequência de parasitos gastrintestinais em cães e gatos atendidos em hospital-escola veterinário da cidade de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 5, p. 1338-1340, 2007.
- GARCIA, L. S.; BREWER, T. C.; BRUCKNER, D. A. Fluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens by using monoclonal antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 119-121, 1987.
- GARCIA, L. S.; SHIMIZU, R. Y. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 1526-1529, 1997.
- GASSER, R. B. Molecular tools — advances, opportunities and prospects. **Veterinary Parasitology**, v. 136, n. 2, p. 69-89, 2006.
- GENNARI, S. M.; KASAI, N.; PENA, H. F. J.; CORTEZ, A. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 2, p. 87-91, 1999.
- GONÇALVES, E. M. N. ***Cryptosporidium parvum*: avaliação de métodos diagnósticos e aspectos epidemiológicos**. 2002. 103 f. Dissertação de mestrado. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.
- GOOKIN, J. L.; RIVIERE, J. E.; GILGER, B. C.; PAPICH, M. G. Acute renal failure in four cats treated with paromomycin. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 215, n. 12, p. 1821-1823, 1999.
- GRACZYK, T. K.; CRANFIELD, M. R.; FAYER, R. Evaluation of commercial enzyme immunoassay (EIA) and immunofluorescent antibody (FA) test kits for detection of *Cryptosporidium* oocysts of species other than *Cryptosporidium parvum*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 54, n. 3, p. 274-279, 1996.

- GRIGORIEW, G. A.; WALMSLEY, S.; LAW, L.; CHEE, S. L.; YANG, J.; KEYSTONE, J.; KRAJDEN, M. Evaluation of the Merifluor immunofluorescent assay for the detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in sodium acetate formalin-fixed stools. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 19, n. 2, p. 89-91, 1994.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, n. 41, p. 95-98, 1999.
- HENRIKSEN, S. A.; POHLENZ, J. F. L. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. **Acta Veterinary Scandinavica**, v. 22, p. 594-596, 1981.
- HUBER, F.; BOMFIM, T. C. B.; GOMES, R. S. Comparação entre infecção por *Cryptosporidium* spp. e por *Giardia* sp. em gatos sob dois sistemas de criação. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 11, n. 1, p. 7-12, 2002.
- HUBER, F.; Da SILVA, S.; BOMFIM, T. C.; TEIXEIRA, K. R.; BELLO, A. R. Genotypic characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 150, n. 1-2, p. 65-74, 2007.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acessado em 27 de abril de 2010.
- ISEKI, M. *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. **Japanese Journal of Parasitology**, v. 28, p. 285-307, 1979.
- JIANG, J.; XIAO, L. An evaluation of molecular diagnostic tools for the detection and differentiation of human-pathogenic *Cryptosporidium* spp. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 50, p. 542-547, 2003.
- JOHNSTON, S. P.; BALLARD, M. M.; BEACH, M. J.; CAUSER, L.; WILKINS, P. P. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 623-626, 2003.
- KARANIS, P.; ALDEYARBI, H. M. Evolution of *Cryptosporidium in vitro* culture. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 12, p. 1231-1242, 2011.
- KATANIK, M. T.; SCHNEIDER, S. K.; ROSENBLATT, J. E.; HALL, G. S.; PROCOP, G. W. Evaluation of ColorPAC *Giardia/Cryptosporidium* rapid assay and ProSpecT *Giardia/Cryptosporidium* microplate assay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in fecal specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 12, p. 4523-4525, 2001.
- KOUDELA, B.; JIRÍ, V. Experimental cryptosporidiosis in kids. **Veterinary Parasitology**, v.71, n. 4, p.273-281, 1997.

- LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, p. 159-174, 1977.
- LAPPIN, M. R.; DOWERS, K.; EDSELL, D.; CHENEY, J. Cryptosporidiosis and inflammatory bowel disease in a cat. **Feline Practice**, v.25, p.10-13, 1997.
- LENNETTE, E. H. Manual of Clinical Microbiology, (4th edn), American Society of Microbiology, Washington, 1985, 1149 p.
- LEVINE, N.D. Phylum II. Apicomplexa. In: LEE, J.J.; HUTNER, S.H.; BOVEE, E.C. **An Illustrated Guide to the Protozoa**. Lawrence: Allen Press, 1985, p. 322-374.
- 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, n. 4, p.174-179, 2010.
- MA, P.; SOAVE, R. Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. **The Journal of Infectious Diseases**, v.147, n. 5, p. 824-828, 1983.
- MACKENZIE, W. R.; HOXIE, N. J.; PROCTOR, M. E.; STEPHEN-GRADUS, M.; 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. **The New England Journal of Medicine**, v.331, n. 3, p.161-167, 1994.
- McLAUHLIN, J.; CASEMORE, D. P.; HARRISON, T. G.; GERSON, P. J.; SAMUEL, D.; TAYLOR, A. G. Identification of *Cryptosporidium* oocysts by monoclonal antibody. **Lancet**, 1, p. 51, 1987.
- McREYNOLDS, C. A.; LAPPIN, M. R.; UNGAR, B.; McREYNOLDS, L. M.; BRUNS, C.; SPILKER, M. M.; THRALL, M. A.; REIF, J. S. Regional seroprevalence of *Cryptosporidium parvum*-specific IgG of cats in the United States. **Veterinary Parasitology**, v. 80, n. 3, p. 87-195, 1999.
- MEIRELES, M.V. ***Cryptosporidium* e criptosporidiose uma análise crítica**. Mesa redonda. 14^o Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, p.153-154, 2006.
- MEISEL, J. L.; PERERA, D. R.; MELINGRO, C.; RUBIN, C. E. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in a immunosuppressed patient. **Gastroenterology**, v. 70, n. 6, p. 1156-1160, 1976.
- MELE, R.; GOMEZ MORALES, M. A.; TOSINI, F.; POZIO, E. *Cryptosporidium parvum* at different developmental stages modulates host cell apoptosis *in vitro*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 10, p. 6061-6067, 2004.

- MELONI, B. P.; THOMPSON, R. C. A. Simplified methods for obtaining purified oocysts from mice and for growing *Cryptosporidium parvum* in vitro. **The Journal of Parasitology**, v. 82, n. 5, p. 757-762, 1996.
- MÉNDEZ-HERMIDA, F.; ARES-MAZÁS, E.; McGUIGAN, K. G.; BOYLE, M.; SICHEL, C.; FERNÁNDEZ-IBÁÑEZ, P. Disinfection of drinking water contaminated with *Cryptosporidium parvum* oocysts under natural sunlight and using the photocatalyst TiO₂. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 88, n. 2-3, p.105-111, 2007.
- MONIS, P. T.; GIGLIO, S.; KEEGAN, A. R.; THOMPSON, R. C. Emerging technologies for the detection and genetic characterization of protozoan parasites. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 7, p. 340-346, 2005.
- 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. 191, n. 6, p. 705-706, 1987.
- MORGAN, U. M. Detection and characterisation of parasites causing emerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1407-1421, 2000.
- MORGAN, U. M.; PALLANT, L.; DWYER, B. W.; FORBES, D. A.; RICH, G.; THOMPSON, R. C. Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 995-998, 1998.
- 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, n. 23, p. 502-504, 1991.
- NASH, A. S.; MTAMBO, M. M. A.; GIBBS, H. A. *Cryptosporidium* infection in farm cats in the Glasgow area. **The Veterinary Record**, v. 133, n. 23, p. 576-577, 1993.
- NAVIN, T. R., JURANEK, D. D. Cryptosporidiosis: clinical, epidemiologic, and parasitologic review. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 6, n. 3, p. 313-327, 1984.
- NEWMAN, R. D.; JAEGER, K. L.; WUHIB, T.; LIMA, A. A.; GUERRANT, R. L.; SEARS, C. L. Evaluation of an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Cryptosporidium* oocysts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 8, p. 2080-2084, 1993.
- NIEMINSKI, E. C., SCHAEFER III, F. W.; ONGERTH, J. E. Comparison of two methods for detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1714-1719, 1995.

- 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, n. 4, p. 592-598, 1976.
- OLIVEIRA LEMOS, F.; ALMOSNY, N. P.; SOARES, A. M.; ALENCAR, N. X. *Cryptosporidium* species screening using Kinyoun technique in domestic cats with diarrhea. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 14, n. 2, p. 113-117, 2012.
- ONGERTH, J. E.; STIBBS, H. H. Identification of *Cryptosporidium* oocysts in river water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 672-676, 1987.
- OVERGAAUW, P. A. M.; ZUTPHEN, L.; HOEK, D.; YAYA, F. O.; ROELFSEMA, J.; PINELLI, E.; KNAPEN, F.; KORTBEEK, L. M. Zoonotic parasites in fecal samples and fur from dogs and cats in The Netherlands. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 1-2, p. 115-122, 2009.
- PAOLETTI, B.; OTRANTO, D.; WEIGL, S.; GIANGASPERO, A.; CESARE, A.; TRAVERSA, D. Prevalence and genetic characterization of *Giardia* and *Cryptosporidium* in cats from Italy. **Research in Veterinary Science**, v. 91, n. 3, p. 397-399, 2011.
- 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.
- 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, n. 4, p. 681-691, 2012.
- PIVOTO, F. L.; LOPES, L. F. D.; VOGEL, F. S. F.; BOTTON, S. A.; SANGIONI, L. A. Ocorrência de parasitos gastrointestinais e fatores de risco de parasitismo em gatos domésticos urbanos de Santa Maria, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 43 n. 8, p. 1453-1458, 2013.
- PLUTZER, J.; KARANIS, P. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 3-4, p. 187-199, 2009.
- QUÍLEZ, J.; SÁNCHEZ-ACEDO, C.; CLAVEL, A.; del CACHO, E.; LÓPEZ-BERNAD, F. Comparison of an acid fast stain and a monoclonal antibody-based immunofluorescence reagent for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faecal specimens from cattle and pigs. **Veterinary Parasitology**, v. 67, n. 1-2, p. 75-81, 1996.
- RAGOZO, A. M. A.; MURADIAN, V.; RAMOS e SILVA, J. C.; CARAVIERI, R.; AMAJONER, V. R.; MAGNABOSCO, C.; GENNARI, S. M. Ocorrência de parasitos gastrintestinais em fezes de gatos das cidades de São Paulo e Guarulhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 5, 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.
- RICHARDSON, A. J.; FRANKENBERG, R. A.; BUCK, A. C.; SELKON, J. B.; COLBOURNE, J. S.; PARSONS, J. W.; MAYON-WHITE, R. T. An outbreak of waterborne cryptosporidiosis in Swindon and Oxfordshire. **Epidemiology and Infection**, v. 107, n. 3, p. 485-495, 1991.
- ROBERT, B.; GINTER, A.; ANTOINE, H.; COLLARD, A.; COPPE, P. Diagnosis of bovine cryptosporidiosis by an enzyme-linked immunosorbent assay. **Veterinary Parasitology**, v. 37, n. 1, p.1-8, 1990.
- ROBERTSON, L. J.; CAMPBELL, A. T.; SMITH, H. V. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 11, p. 3494-3500, 1992.
- ROCHELLE, P. A.; UPTON, S. J.; MONTELONE, B. A.; WOODS, K. The response of *Cryptosporidium parvum* to UV light. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 2, p. 81-87, 2005.
- ROSE, J. B.; LISLE, J. T.; LeCHEVALLIER, M. Waterborne cryptosporidiosis: incidence, outbreaks, and treatment strategies. In: FAYER, R. **Cryptosporidium and cryptosporidiosis**. Boca Raton: CRC Press, 1997. p.65-83.
- SARGENT, K. D.; MORGAN, U. M.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R. C. Morphological and genetic characterisation of *Cryptosporidium* oocysts from domestic cats. **Veterinary Parasitology**, v. 77, n. 4, p.221-227, 1998.
- SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 5, p. 203-208, 2006.
- SCHRADER, C.; SCHIELKE, A.; ELLERBROEK, L.; JOHNE, R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 5, p. 1014-1026, 2012.
- SCORZA, A.V.; LAPPIN, M.R. Co-infection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in naturally infected cats, in diagnosis and treatment of cryptosporidiosis and giardiasis in cats and dogs in the United States. Fort Collins, CO, **Clinical Sciences**, Colorado State University, 2007
- SCORZA, V.; TANGTRONGSUP, S. Update on the diagnosis and management of *Cryptosporidium* spp Infections in dogs and cats. **Topics in Companion Animal Medicine**, v.25, n. 3, p.163-169, 2010.

- SHAHIDUZZAMAN, M.; DAUGSCHIES, A. Therapy and prevention of cryptosporidiosis in animals. **Veterinary Parasitology**, v.188, n. 3-4, p. 203-214, 2012.
- SLAPETA, J. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: a thirty colour rainbow? **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 12-13, p. 957-70, 2013.
- SMITH, H. V.; NICHOLS, R. A. B. *Cryptosporidium*: detection in water and food. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 61-79, 2010.
- SMITH, H. V.; GRIMASON, A. M. *Giardia* and *Cryptosporidium* in water and wastewater. In: MARA D, HORAN N, editors. **The Handbook of Water and Wastewater microbiology**. Elsevier Science Limited, 2003. p. 619-781
- STERLING, C. R.; ARROWOOD, M. J. Detection of *Cryptosporidium* sp. infections using a direct immunofluorescent assay. **Pediatric Infectious Disease**, v. 5, p. 139-142, 1986.
- STIBBS, H. H.; ONGERTH, J. E. Immunofluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal smears. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 24, n. 4, p. 517-521, 1986.
- TEIXEIRA, W. F. P.; COELHO, W. M. D.; SOUTELLO, R. V. G.; OLVEIRA, F. P.; HOMEM, C. G.; NUNVES, C. M.; MEIRELES, M. V. Diagnóstico de criptosporidiose em amostras fecais de bezerros por imunofluorescência direta e microscopia de contraste de fase. **Ciência Rural**, 2011. Disponível em <http://www.scielo.br/pdf/cr/2011nahead/a2711cr4642.pdf>
- 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, n. 4, p. 291-296, 2007.
- THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997.
- THOMPSON, R. C.; CONSTANTINE, C. C.; MORGAN, U. M. Overview and significance of molecular methods: what role for molecular epidemiology? **Parasitology**, v. 117, p. 161-175, 1998.
- THOMPSON, R. C. A.; PALMER, C. S.; O'HANDLEY, R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. **Veterinary Journal**, v. 177, n. 1, p. 18-25, 2008.

- TYZZER, E. E. A sporozoon found in the peptic glands of the common mouse. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 5, p. 12-13, 1907.
- TZANNES, S.; BATCHELOR, D. J.; GRAHAM, P. A.; PINCHBECK, G. L.; WASTLING, J.; GERMAN, A. J. Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Isospora* species infections in pet cats with clinical signs of gastrointestinal disease. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2008.
- TZIPORI, S.; WIDMER, G. A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 4, p.184-189, 2008.
- UNGAR, B. L. Enzyme-linked immunoassay for detection of *Cryptosporidium* antigens in fecal specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 11, p. 2491-2495, 1990.
- VADLAMUDI, N. B.; HITCH, M. C.; THAME, K. A.; DIMMITT, R. A.; HARRISON, K.; HUISINGH, C.; MACLIN, J. S. Enteric infections in hospitalized pediatric inflammatory bowel disease patients with relapse. **The Internet Journal of Pediatrics and Neonatology**, v. 16, n. 1, 2013. Disponível em <http://ispub.com/IJPN/16/1/1543>.
- 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, n. 4, p. 1578-1583, 1999a.
- XIAO, L.; MORGAN, U. M.; LIMOR, J.; ESCALANTE, A.; ARROWOOD, M.; SHULAW, W.; THOMPSON, R. C.; FAYER, R.; LAL, A. A. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p.3386-3391, 1999b.
- XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S. J. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 1, p. 72-97, 2004.