

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DETECÇÃO MOLECULAR E SUBTIPAGEM DE
Cryptosporidium spp. EM CAPRINOS, OVINOS, BOVINOS,
LEITÕES E EQUINOS JOVENS**

Willian Marinho Dourado Coelho

Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DETECÇÃO MOLECULAR E SUBTIPAGEM DE
Cryptosporidium spp. EM CAPRINOS, OVINOS, BOVINOS,
LEITÕES E EQUINOS JOVENS**

Willian Marinho Dourado Coelho

Orientadora: Profa. Adj. Dra. Katia Denise Saraiva Bresciani

Co-orientador: Prof. Adj. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles

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.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

agosto – 2011

Coelho, Willian Marinho Dourado
C672d Detecção molecular e subtipagem de *Cryptosporidium* spp. em caprinos, ovinos, bovinos, leitões e eqüinos jovens / Willian Marinho Dourado Coelho. – – Jaboticabal, 2011
xi, 84 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011
Orientadora: Katia Denise Saraiva Bresciani
Banca examinadora: Luiz Eduardo Corrêa Fonseca, Adjair Antonio do Nascimento, Jancarlo Ferreira Gomes, Luiz Augusto do Amaral

Bibliografia

1. Criptosporidiose. 2. *Cryptosporidium parvum*. 3. IlaA15G2R1. 4. Subgenotipagem. 5. Zoonose. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 614.9:636.3

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

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

WILLIAN MARINHO DOURADO COELHO – nascido na cidade de Andradina-SP em 25 de maio de 1981, filho de Geovani dos Santos Coelho e Miriam Marinho Dourado Coelho. Ingressou na fileira da corporação Polícia Militar do Estado de São Paulo no ano de 2001, exercendo a atividade de Policial Militar Rodoviário. Durante este período, concluiu graduação em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina (FCAA) no ano de 2006. Foi aprovado no curso de Pós-Graduação (mestrado) em Ciência Animal na Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP - campus de Araçatuba em 2007, sob a orientação da profa. Dra. Katia Denise Saraiva Bresciani, período este em que desempenhou o cargo de supervisor do Laboratório de Análises Clínicas, Parasitologia e Enfermidades Parasitárias da FCAA, atuando como docente das disciplinas de Imunologia e Laboratório Clínico Veterinário. Em 2009 foi admitido no Programa de Pós-Graduação (doutorado) em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - campus de Jaboticabal. Durante o curso de mestrado e doutorado, obteve apoio financeiro tipo bolsa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP.

EPÍGRAFE

*"Você é quem decide o que será eterno em você, no seu coração.
Deus nos dá o dom de eternizar em nós o que vale a pena e
esquecer definitivamente aquilo que não vale"*
(Fabio de Melo)

DEDICATÓRIA

Consagro esta vitória a Deus, certo de que a mim compete a labuta, o suor, as lágrimas e, a Ele, toda a glória gerada neste sacrifício. Dedico o êxito desta etapa aos meus pais Geovani e Miriam, faróis que sempre me restituem o bom caminho. Oferto este triunfo à minha noiva Juliana que foi, nas horas incertas da vida, a pessoa mais certa.

AGRADECIMENTOS

À profa. Katia Denise Saraiva Bresciani, por toda a ajuda e dedicação. Pela sua sincera amizade e por demonstrar que a vida é fruto da decisão de cada momento.

Ao prof. Marcelo Vasconcelos Meireles, idealizador deste projeto, minha gratidão pela presteza, ensinamento e paciência que sempre me foi dispensada.

À Joji e Léa Ariki, amigos que me impeliram a seguir semeando amizades, com humildade e firmeza nas decisões. Pessoas cuja vida serve como elo, unindo as pontas que outrora se partiram.

Aos professores Maria da Glória Buzinaro, Luiz Eduardo Corrêa Fonseca, Jancarlo Ferreira Gomes, Adjair Antônio do Nascimento, Alessandro Francisco Talamini do Amarante e Luíz Augusto do Amaral, amigos cuja existência nos faz permanecer desejosos do retorno.

A todos os funcionários da FCAV – Jaboticabal, em especial àqueles pertencentes ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, minha medida em reconhecimento aos seus ofícios.

À minha família e amigos, seres que perpetuam os mistérios de Deus em minha vida.

SUMÁRIO

	Página
1. CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	12
1.1. Introdução.....	12
1.2. Objetivo.....	15
1.3. Revisão de literatura.....	15
1.4. Epidemiologia.....	18
1.4.1. Hospedeiros naturais.....	19
1.4.2. Ocorrência.....	22
1.5. Importância em saúde pública.....	23
1.6. Agente etiológico.....	24
1.6.1. Características morfológicas e tintoriais.....	26
1.6.2. Análise molecular.....	27
1.6.3. Aspectos patogênicos e virulência.....	29
1.6.4. Imunogenicidade e antigenicidade.....	31
1.6.5. Resistência.....	32
1.6.6. Transmissão.....	33
1.7. Manifestações clínicas.....	35
1.8. Exames laboratoriais.....	36
1.9. Tratamento.....	37
1.10. Prevenção e controle.....	38
1.11. REFERÊNCIAS.....	39
 2. CAPÍTULO 2 – LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADRO	
FIGURA 1 - Diarréia sanguinolenta em bezerro positivo para <i>C. parvum</i> , rotavírus e <i>Escherichia coli</i>	17
FIGURA 2 - Amostra fecal de cabrito com conteúdo sanguinolento. Constatado oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e, na cultura, colônias de <i>E. coli</i> e bacilos Gram-positivos.....	17

FIGURA 3 - Aspecto microscópico de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. em fezes de cabritos pelo método de Kinyoun, observados em aumento de 400x.....	27
FIGURA 4 - Aspecto microscópico de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostra fecal de cabrito utilizando técnica de Sheather, com microscópio ótico em aumento de 400x.....	36
TABELA 1 - Ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> em caprinos de diversos de diversos países.....	20, 21
TABELA 2 - Espécies de <i>Cryptosporidium</i> descritas em ordem cronológica a partir de seu relato em camundongos, seres humanos e nos principais animais domésticos.....	22
TABELA 3 - Ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> spp. em caprinos, por diversos métodos de diagnóstico, provenientes de diferentes estados brasileiros.....	23
TABELA 4 - Principais drogas utilizadas no tratamento da criptosporidiose em cabritos.....	38
QUADRO 1 - Principais produtos utilizados com eficácia na desinfecção contra oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	33

3. CAPÍTULO 3 – LISTA DE ANEXOS

Molecular Detection and Subtyping of <i>Cryptosporidium</i> spp. in Goat Kids, Calves, Lambs, Piglets and Colts in Brazil.....	71
Detection of <i>Cryptosporidium</i> in fecal samples of goat kids, calves and pigs: comparison between methods of concentration, coloration and molecular analysis.....	77

DETECÇÃO MOLECULAR E SUBTIPAGEM DE *Cryptosporidium* spp. EM CAPRINOS, OVINOS, BOVINOS, LEITÕES E EQUINOS JOVENS

RESUMO - A criptosporidiose é uma doença entérica grave, economicamente significativa, caracterizada principalmente por desordens intestinais, podendo ocasionar manifestações clínicas variadas e eventual mortalidade, principalmente em animais jovens. Este estudo objetivou detectar molecularmente genótipos e subgenótipos de *Cryptosporidium* spp. em fezes de cabritos provenientes dos estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo, Brasil. Amostras fecais foram colhidas diretamente do reto de 192 cabritos de diferentes raças, machos e fêmeas, com até doze meses de idade. Adicionalmente, foram analisadas amostras fecais de ovinos, bovinos, suínos e eqüinos jovens. A eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. foi observada por meio das técnicas de Sheather e Kinyoun, seguindo-se a micrometragem dos oocistos com ocular de campo amplo micrométrica 10x (Bioval®) em aumento microscópico de 400 e 1000x. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada para amplificação dos fragmentos dos genes da subunidade 18S do rRNA e da glicoproteína GP60. Presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram observados pela análise microscópica em 11,45% (22/192) das amostras analisadas. Amplificação gênica positiva para *Cryptosporidium* foi demonstrada em 16,66% (32/192) destas amostras. Com o sequenciamento dos produtos da PCR do gene 18S rRNA, todas as amostras foram identificadas como *Cryptosporidium parvum*. Por meio da subgenotipagem com o sequenciamento do gene GP60, foi encontrado exclusivamente o subgenótipo de *C. parvum* IIaA15G2R1. Através dos resultados obtidos, pode-se

inferir que a infecção por *C. parvum* está presente em rebanhos caprinos de diferentes estados brasileiros podendo, esta espécie animal, atuar como uma importante fonte de infecção do subtipo zoonótico de *Cryptosporidium* para outras espécies animais, em especial para o ser humano.

Palavras-Chave: Criptosporidiose, *Cryptosporidium parvum*, IlaA15G2R1, Subgenotipagem, Zoonose

MOLECULAR DETECTION AND SUBTYPING OF *Cryptosporidium* spp. IN GOATS, SHEEP, CATTLE, PIGS AND YOUNG HORSES

SUMMARY - Cryptosporidiosis is a serious enteric disease, economically significant, mainly characterized by intestinal disorders, may cause various clinical manifestations and eventual mortality, especially in young animals. This study aimed to detect and molecularly genotypes and subgenotypes of *Cryptosporidium* spp. in feces of goat kids from the states of Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais and São Paulo, Brazil. Fecal samples were collected directly from the rectum of 192 goat kids of different breeds, males and females, with up to twelve months old. Additionally, were analyzed fecal samples from cattle, sheep, pigs and young horses. The elimination of oocysts of *Cryptosporidium* spp. was observed using the Sheather and Kinyoun techniques, followed by micrometric analysis with ocular micrometer wide-field 10x (Bioval ®) in increase from 400 and 1000x. The polymerase chain reaction (PCR) was performed to amplify fragments of genes of the subunit 18S rRNA and glycoprotein GP60. Presence of *Cryptosporidium* spp. was observed by microscopic examination in 11.45% (22/192) of the samples. Gene amplification for *Cryptosporidium* was demonstrated in 16.66% (32/192) of these samples. With the sequencing of the PCR products of 18S rRNA gene, all samples were identified as *Cryptosporidium parvum*. Through of subgenotyping with sequencing of GP60 gene was found exclusively the subtype of *C. parvum* IIaA15G2R1. By the results obtained, it can be inferred that infection with *C. parvum* is present in goat kids in different brazilian states may, this animal species act as an important source of

infection with zoonotic subtype of *Cryptosporidium* to other animal species, especially for humans.

Keywords: Criptosporidiosis, *Cryptosporidium parvum*, IIaA15G2R1, Subgenotyping, Zoonosis

1. CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1. Introdução

O Brasil ocupa o décimo primeiro lugar no ranking mundial em produção de caprinos. Existem aproximadamente 286.553 estabelecimentos destinados à criação desta espécie animal no território brasileiro, predominando, esta atividade, entre pequenos e médios produtores. Deste modo, diversos estados brasileiros têm promovido o desenvolvimento da caprinocultura leiteira e de corte, sendo considerado o detentor do maior rebanho na América Latina (FAO, 2009).

As parasitoses correspondem a um dos principais fatores limitantes no desenvolvimento deste setor. Algumas espécies de *Cryptosporidium* afetam negativamente a produção animal, com elevada taxa de infecção, principalmente entre animais jovens, acarretando em destruição e atrofia das microvilosidades intestinais, com consequente diminuição da absorção dos nutrientes, diarreia, acentuada queda na produtividade (TZIPORI, 1982; FORTES, 2004; SOLTANE et al., 2007) e eventual mortalidade (LLAMAS TRUJILLO et al., 1994; VIEIRA et al., 1997).

Na caprinocultura, o *Cryptosporidium parvum* é considerado como o principal agente causador da síndrome diarreia neonatal em caprinos (DE GRAAF et al., 1999; RIET-CORREA et al., 2004; DELAFOSSE et al., 2006; GEURDEN et al., 2008), promovendo grandes prejuízos econômicos ao setor, em decorrência da acentuada diminuição dos índices produtivos (KOUDELA & JIRÍ, 1997; VIEIRA, 1999; CARDOSO et al., 2008).

Estudos conduzidos por PARK et al. (2006) no Sul da Coreia, evidenciaram que a única espécie de *Cryptosporidium* encontrada em caprinos, humanos e bovinos foi o *Cryptosporidium hominis*. Este achado foi observado também em caprinos no Reino Unido (GILES et al., 2009), sugerindo-se que, nestes países, este seja o genótipo definitivo nesta espécie animal (RYAN et al., 2005). Lindsay et al. (2000) verificaram em sua pesquisa que os caprinos são resistentes à infecção experimental por *Cryptosporidium andersoni*.

A criptosporidiose é uma doença gastrointestinal de distribuição cosmopolita, causada por protozoários do gênero *Cryptosporidium*, originalmente isolados por Ernest Edward Tyzzer (TYZZER, 1907,1910,1912). Esta infecção é considerada como uma enfermidade negligenciada de grande importância em saúde pública, devido à sua elevada ocorrência (SAVIOLI et al., 2006; CARVALHO, 2009), difícil tratamento (VIEL et al., 2007; SCHNYDER et al., 2009; ROSSIGNOL, 2010) e por apresentar aspectos epidemiológicos singulares como o modo de transmissão, potencial zoonótico (EL-SHERBINI et al., 2006), variação dos subtipos entre as regiões geográficas, dentre outros atributos (HUNTER et al., 2008; XIAO, 2010).

Os oocistos de *C. parvum* isolados de caprinos adultos assintomáticos permanecem altamente infectantes. Quando estes oocistos são inoculados experimentalmente por via oral em camundongos e cabritos, há o desenvolvimento padrão da infecção natural em termos de excreção de oocistos, sinais clínicos e lesões intestinais, representando maior impacto na epidemiologia da criptosporidiose em animais de vida livre e no ser humano (NOORDEEN et al., 2002).

Além da enteroinfecção em caprinos (MASON et al., 1981; CASTRO-HERMIDA et al., 2007; GILES et al., 2009), este coccídeo foi relatado em amostras fecais de diversas espécies de animais domésticos (QUÍLEZ ET AL., 2003; HUBER et al., 2004; EDERLI et al., 2005; JACOBSEN et al., 2006; THOMAZ et al., 2007; GRINBERG et al., 2008; PALMER et al., 2008; SANTIN et al., 2008; BALLWEBER, et al., 2009; IMHASLY et al., 2009), selvagens (DELGADO et al., 2003; RYAN et al., 2008; SOARES et al., 2008; RYAN, 2010) e em humanos (CIMMERMAN et al., 1999a; ARAÚJO et al., 2008; ULÇAY et al., 2008; XIAO & FENG, 2008; SPÓSITO-FILHA & OLIVEIRA, 2009).

A transmissão da criptosporidiose ocorre por qualquer meio contaminado com fezes humanas ou animais, desde que contenham oocistos infectantes e hospedeiros susceptíveis (SMITH, 2008). Esta infecção causa vários níveis de morbidade e mortalidade em animais e humanos (FAYER, 2004), sendo sua ocorrência particularmente elevada quando há contato íntimo entre os mesmos (OLIVEIRA-SILVA, 2004), evidenciando a transmissão inter-espécie deste protozoário (ABE et al., 2002;

CACCIÒ et al., 2002; EL-SHERBINI et al., 2006; KIANG et al., 2006; BORGES et al., 2007; STARKEY et al., 2007; WIELINGA et al., 2008).

Resultados de um estudo realizado por XIAO et al. (2007) demonstraram que, sob condições favoráveis, o *Cryptosporidium canis* pode exercer atividade antroponótica. Esta condição de favorecimento está vinculada a fatores imunossupressores, principalmente relacionados a pessoas portadoras do vírus da imunodeficiência humana (HIV). GATEI et al. (2008) observaram ocorrência de *C. parvum*, *C. hominis*, *C. canis* e *C. felis* em humanos HIV-positivos.

A baixa especificidade em relação ao hospedeiro requerida por pelos parasitos pertencentes a este gênero foi demonstrada em pesquisas utilizando animais neonatos livre de patógenos específicos, sendo constatado que, algumas espécies de *Cryptosporidium* podem infectar uma grande variedade de hospedeiros (TZIPORI, 1980), estabelecendo-se a infecção por meio de sítios específicos de ligação (TZIPORI, 1982; TZIPORI, 1983).

Este fato confirma-se com estudo realizado na Austrália por O'BRIEN et al. (2008) por meio de investigação epidemiológica molecular de *Cryptosporidium* em crianças com transtornos gastrintestinais, utilizando genotipagem (18S rDNA) e subgenotipagem (GP60). Estes pesquisadores verificaram que a maioria destas crianças estavam infectadas por *C. hominis*, seguido por *C. parvum*, fato este igualmente notado nos animais domésticos, sugerindo-se a possibilidade de transmissão zoonótica. Estas duas espécies de *Cryptosporidium* têm sido reportadas também em crianças no Brasil, prevalecendo a infecção por *C. hominis* (BUSHEN et al., 2007).

C. parvum e *C. hominis* são considerados como as espécies de maior importância em humanos jovens, imunossuprimidos ou com doenças hematológicas (CIMMERMAN et al., 1999b; CIMMERMAN et al., 2002; LEE et al., 2002; CHIEFFI et al., 2005), tidos como enteropatógenos mais frequentes em crianças (VALDERRAMA et al., 2009), altamente infectivos (DUPONT et al. 1995; YONG et al., 2004), promovendo diversos níveis de lesões intestinais, má absorção e inflamação (COUTINHO et al.,

2008), podendo apresentar diarreia ou não (SCHNACK et al., 2003; CARVALHO-ALMEIDA et al., 2006; BUSHEN et al., 2007).

Este fato reveste-se de grande interesse em saúde pública, principalmente naqueles locais onde as condições higiênico-sanitárias não são adequadas (EDERLI et al., 2008) e, eventualmente, há presença de fezes humanas ou de animais domésticos próximos às fontes de água (BERINO, 2004; HELLER et al., 2004; GARRIDO, 2005; KARANIS et al., 2007; BOUZID et al., 2008; DIAS et al., 2008; KING et al., 2008; YODER et al., 2010).

Devido às sutis diferenças morfológicas e ao reduzido tamanho dos oocistos deste parasito, bem como os diferentes subtipos existentes dentro de uma única espécie, métodos moleculares têm sido desenvolvidos com o intuito de elucidar a complexa epidemiologia do *Cryptosporidium*, principalmente no que diz respeito aos genótipos com capacidade zoonótica e antroponótica (MEIRELES, 2010).

Considerando a escassa literatura em informações sobre esta protozoose em caprinos, principalmente no Brasil, torna-se relevante conhecer as espécies de *Cryptosporidium* que estão envolvidas nas infecções entéricas de cabritos, evidenciando a atuação desta espécie animal como fonte de infecção da criptosporidiose humana.

1.2. Objetivo

O objetivo deste estudo foi verificar a prevalência e detectar molecularmente os genótipos e subgenótipos de *Cryptosporidium* com ocorrência em cabritos com até um ano de idade.

1.3. Revisão de literatura

A criptosporidiose é uma doença entérica, cujos agentes etiológicos são parasitos intracelulares extracitoplasmáticos pertencentes ao gênero *Cryptosporidium*. A infecção por este protozoário manifesta-se principalmente com diarreia em animais (BECHER et al., 2004; FAYER et al., 2005; FEITOSA et al., 2008; ZLOTOWSKI et al., 2008) e humanos (PERIN et al., 2001; BRANTLEY et al., 2003; SIDDIQUI et al., 2007),

variando estes sinais de acordo com a espécie de *Cryptosporidium* envolvida, principalmente em indivíduos jovens e imunodeprimidos (MATOS et al., 2004; CAMA et al., 2007; GATEI et al., 2008).

Esta enfermidade parasitária de distribuição cosmopolita representa uma das causas mais comuns de doença entérica, com repercussões severas em saúde pública, especialmente após o descobrimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (LAUGHON et al., 1988; ANGUS, 1990; ARAÚJO et al., 2008), ocasionando quadros de má nutrição (PERIN et al., 2001; ROSSIGNOL et al., 2010), diarreia severa, irreversível e morte (NAVIN & JURANEK, 1984).

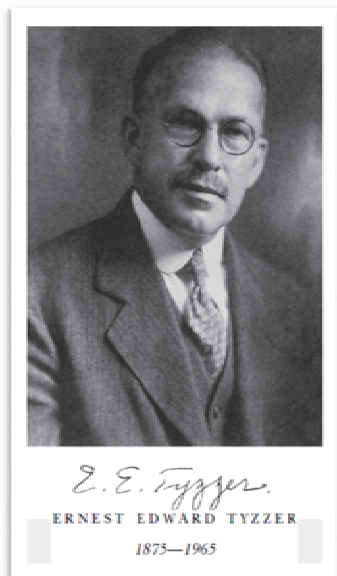
Além do aspecto zoonótico, animais acometidos pelo *Cryptosporidium* spp. ficam predispostos às infecções oportunistas (RADOSTISTIS et al., 2000) originando elevadas perdas econômicas na produção animal (ALFIERI et al., 1994; OLSON et al., 2004; NYDAM et al., 2005; O'HANDLEY & OLSON et al., 2006; FEITOSA et al., 2008). A diarreia pode ser constatada em animais co-infectados por *Cryptosporidium* spp., *Escherichia coli* e rotavírus (Figuras 1 e 2).



FIGURA 1. Diarréia sanguinolenta em bezerro positivo para *C. parvum*, rotavírus e *Escherichia coli*.



FIGURA 2. Amostra fecal de cabrito com conteúdo sanguinolento. Constatado oocistos de *Cryptosporidium* spp. e, na cultura, colônias de *E. coli* e bacilos Gram-positivos.



Ernest Edward Tyzzer foi o primeiro pesquisador a relatar o protozoário *Cryptosporidium*. Este pesquisador nasceu em 30 de agosto de 1875 e faleceu em 23 de janeiro de 1965, em Wakefield, Massachusetts, Boston, estando engajado como um dos principais parasitologistas do mundo. Com linha de pesquisa ampla, Tyzzer possuía especial interesse pelos agentes infecciosos encontrados em pequenos roedores (WELLER, 1978). Sua primeira descrição do protozoário *Cryptosporidium* spp. em células das glândulas gástricas de camundongos ocorreu em 1907, ficando, este parasito, denominado como *Cryptosporidium muris*, achado publicado posteriormente no ano de 1910 (TYZZER, 1910). Mais tarde, em 1911, este mesmo pesquisador observou um coccídeo extracelular de menor tamanho nas células do intestino delgado deste mesmo roedor, classificando-o como *C. parvum* em sua publicação no ano de 1912 (TYZZER, 1912).

1.4. Epidemiologia

A ocorrência emergente da criptosporidiose apresenta caráter cosmopolita (SPÓSITO-FILHA & OLIVEIRA, 2009) e, desde os registros iniciais, este parasito têm sido observado infectando uma grande diversidade de hospedeiros mamíferos, anfíbios, peixes e répteis (EYGED et al., 2003; MONIS et al., 2003; FAYER, 2008), inclusive habitando em moluscos bivalves filtradores (MILLER et al., 2005). A dispersão via hídrica é considerada a principal forma de veiculação deste parasito, podendo estar presente em mais de 90% das águas superficiais, 50% das águas tratadas (LUNA et al., 2002) e de modo especial nos efluentes (SMITH & ROSE, 1988; ROBERTSON et al., 2000; DIAS et al., 2008).

Devido às particularidades epidemiológicas desta protozoose, sua ocorrência está vinculada principalmente a países em desenvolvimento, onde há maior carência de tratamento e distribuição da água, de saneamento básico e higiene pessoal (SAVIOLI et al., 2006; DÍAS et al., 2008; LAKE et al., 2009). Entretanto, mesmo em países

industrializados, diversos surtos desta enfermidade têm sido relatados (MACKENZIE et al., 1994; 1995; KARANIS et al., 2007).

Na maioria dos países em desenvolvimento, o *C. parvum* e o *C. hominis* são responsáveis por mais de 90% dos casos de criptosporidiose em humanos. Por meio da subgenotipagem com o gene GP60, verificou-se que a transmissão zoonótica ocorre predominantemente pelo *C. parvum*, subtipo IIa e antroponótica pelo IIc (XIAO et al., 2004; AKIYOSHI et al., 2006), podendo ocorrer também a infecção entre humanos pelo subtipo IIe (PENG et al., 2003; XIAO et al., 2004; CAMA et al., 2007).

C. parvum é a espécie predominantemente encontrada em ruminantes no mundo, na presença de uma ampla variedade de subtipos, alguns destes com elevado potencial zoonótico. Dentre estes subtipos, o IIaA15G2R1 é o principal agente etiológico da criptosporidiose em animais (ALVES, 2006; FENG, 2007) e humanos (STRONG et al., 2000; TROTZ-WILLIAMS et al., 2006; XIAO, 2009).

1.4.1. Hospedeiros naturais

Dentre os animais pertencentes ao filo Cordados, o *Cryptosporidium* já foi descrito em todas as classes (LEVINE, 1980; XIAO & FAYER, 2008; FAYER, 2009), de modo especial em aves (CARDOZO et al., 2005; HUBER et al., 2007) e mamíferos (XIAO, 2010).

XIAO et al. (2004) e APPELBEE et al. (2005) descrevem em seus trabalhos a relação de humanos e primatas como hospedeiros habituais para *C. hominis* e humanos e ruminantes para *C. parvum*. Em bovinos, a infecção natural é destacada pelo *C. bovis* e *C. andersoni*, em roedores o *C. muris*, em suínos o *C. suis*, em cães o *C. canis*, em gatos o *C. felis* e em perus o *C. meleagridis*.

C. parvum destaca-se com especial importância na saúde humana e animal. Seus genótipos estão atualmente classificados em três, de acordo com o hospedeiro de origem. O *C. parvum*, primeiramente descrito por Tyzzer (1912), foi reclassificado como *C. parvum* “mouse genotype”, isolado em camundongos *Mus musculus*, Massachusetts, EUA (XIAO et al., 2002; XIAO et al., 2004). O *C. hominis* (MORGAN-RYAN et al., 2002), classificado como *C. parvum* “human genotype”, possui o *Homo sapiens* como

hospedeiro, isolado em Perth, Austrália (XIAO et al., 2002). ŠLAPETA et al. (2006) classificaram o *C. parvum* “bovine genotype” como *C. pestis*, encontrado em *Bos taurus*, Iowa, EUA.

No Brasil, o primeiro relato de surto de infecção por *Cryptosporidium* em caprinos foi realizado por VIEIRA et al. (1997), seguido por BOMFIM et al. (2005), com registros em diversos países do mundo (MUÑOZ et al., 1996; NOORDEEN et al., 2001; CASTRO-HERMIDA et al., 2007; GILES et al., 2009; SANZ CEBALLOS et al., 2009; PAVILOVIĆ et al., 2010).

Os relatos de infecções em caprinos estão dispostos de acordo com o gênero, tipo, subtipo e local (país) de descrição (Tabela 1).

TABELA 1. Ocorrência de *Cryptosporidium* em caprinos de diversos países e sua classificação de acordo com o tipo e subtipo.

Gênero	Espécie	Subtipo	Local	Referência
<i>Cryptosporidium</i>	---	---	Austrália	Mason et al. (1981)
<i>Cryptosporidium</i>	---	---	Chile	Araya et al., (1987)
<i>Cryptosporidium</i>	<i>parvum</i>	---	Espanha	Matos-Fernández et al. (1993)
<i>Cryptosporidium</i>	---	---	Estados Unidos	Caver et al. (1996)
<i>Cryptosporidium</i>	---	---	França	Chartier et al. (1996)
<i>Cryptosporidium</i>	<i>parvum</i>	---	Espanha	Muños et al. (1996)
<i>Cryptosporidium</i>	---	---	Brasil	Vieira et al., (1997)
<i>Cryptosporidium</i>	---	---	Chile	Alcaino et al. (1999)
<i>Cryptosporidium</i>	---	---	Oman	Johnson et al. (1999)
<i>Cryptosporidium</i>	---	---	Turquia	Erman et al. (2000)
<i>Cryptosporidium</i>	---	---	Oman	Johnson et al. (2000)
<i>Cryptosporidium</i>	---	---	Polônia	Majewska et al. (2000)
<i>Cryptosporidium</i>	---	---	Sri Lanka	Noordeen et al. (2000)
<i>Cryptosporidium</i>	---	---	Sri Lanka	Noordeen et al. (2001)
<i>Cryptosporidium</i>	---	---	França	Chartier et al. (2002)
<i>Cryptosporidium</i>	<i>parvum</i> “bovine”	---	República Tcheca	Hajdušek et al. (2004)
<i>Cryptosporidium</i>	---	---	Brasil	Huber et al. (2004)
<i>Cryptosporidium</i>	---	---	Brasil	Bomfim et al. (2005)
<i>Cryptosporidium</i>	<i>parvum</i>	---	França	Castro-Hermida et al. (2005a)
<i>Cryptosporidium</i>	<i>parvum</i>	---	França	Castro-Hermida et al. (2005b)
<i>Cryptosporidium</i>	---	---	Espanha	Ferre et al. (2005)
<i>Cryptosporidium</i>	<i>parvum</i>	---	França	Delafosse et al. (2006)

<i>Cryptosporidium</i>	<i>hominis</i>	---	Coréia	Park et al. (2006)
<i>Cryptosporidium</i>	---	---	Sérvia	Zorana et al. (2006)
<i>Cryptosporidium</i>	<i>parvum</i>	---	França	Castro-Hermida et al. (2007)
<i>Cryptosporidium</i>	<i>parvum</i>	---	Zâmbia	Goma et al. (2007)
<i>Cryptosporidium</i>	---	---	Tunísia	Soltane et al. (2007)
<i>Cryptosporidium</i>	<i>parvum</i>	IlaA15G2R1 IldA22G1	Bélgica	Geurden et al. (2008)
<i>Cryptosporidium</i>	<i>parvum</i>	IldA17G1a IldA19G1 IldA25G1 IldA26G1	Espanha	Quílez et al. (2008)
<i>Cryptosporidium</i>	<i>parvum</i>	Ila	Itália	O'Brien et al. (2008)
<i>Cryptosporidium</i>	<i>parvum</i>	---	Espanha	Sanz Ceballos et al. (2008)
<i>Cryptosporidium</i>	<i>hominis</i>	---	Reino Unido	Giles et al. (2009)
<i>Cryptosporidium</i>	<i>parvum</i>	---	Espanha	Sanz Ceballos et al. (2009)
<i>Cryptosporidium</i>	<i>xiaoi</i>	---	Espanha	Díaz et al. (2010)
<i>Cryptosporidium</i>	<i>ubiquitum</i>	---	Estados Unidos	Fayer et al. (2010)*
<i>Cryptosporidium</i>	---	---	República da Sérvia	Pavlović et al. (2010)

Infecção experimental (*); Não pesquisado (---)

Por meio de diferenças morfológicas, biológicas e moleculares, 12 espécies de *Cryptosporidium* foram relatadas em mamíferos (FAYER, 2010). Embora não tenha sido observada uma intensa seletividade de hospedeiros, alguns animais atuam como hospedeiros naturais/habituais de genótipos de *Cryptosporidium*. As espécies deste parasito mais frequentemente encontrado em humanos e nos principais animais domésticos desde sua descoberta em camundongos estão demonstradas na Tabela 2.

TABELA 2. Espécies de *Cryptosporidium* descritas em ordem cronológica a partir de seu relato em camundongos, seres humanos e nos principais animais domésticos.

Hospedeiro	<i>Cryptosporidium</i>	Referência
Camundongo (<i>Mus musculus</i>)	<i>C. parvum</i> *	TYZZER (1912)
Camundongo (<i>Mus musculus</i>)	<i>C. muris</i> *	TYZZER (1907)
Peru (<i>Alectura lathamii</i>)	<i>C. meleagridis</i> *	SLAVIN, (1955)
Gato (<i>Felis catus</i>)	<i>C. felis</i> *	ISEKI (1979)
Bovino (<i>Bos taurus</i>)	<i>C. andersoni</i> *	LINDSAY et al. (2000)
Cão (<i>Canis familiaris</i>)	<i>C. canis</i> *	FAYER et al. (2001)
Humano (<i>Homo sapiens</i>)	<i>C. hominis</i> *	MORGAN-RYAN et al. (2002)
Suíno (<i>Sus scrofa</i>)	<i>C. suis</i> *	RYAN et al. (2004)
Bovino (<i>Bos taurus</i>)	<i>C. bovis</i>	FAYER et al. (2005)
Bovino (<i>Bos taurus</i>)	<i>C. ryanae</i>	FAYER et al. (2008)
Humanos, animais domésticos e selvagens	<i>C. ubiquitum</i> *	FAYER et al. (2010)

* Espécies de *Cryptosporidium* detectadas em humanos (KATSUMATA et al., 2000; LEONI et al., 2000; GATEI et al., 2002; FAYER et al., 2010).

1.4.2. Ocorrência

A infecção por parasitos do gênero *Cryptosporidium* encontra-se amplamente difundida em animais no Brasil (MEIRELES, 2010) e no mundo (XIAO, 2010). Esta enfermidade parasitária está presente predominantemente em rebanhos de ruminantes, sendo preponderantemente observado o *C. parvum* (XIAO et al., 2007; ZINTL et al., 2007; GEURDEN et al., 2008; PRITCHARD et al., 2008).

A ocorrência da enteroinfecção por *Cryptosporidium* spp. em caprinos, no Brasil encontra-se exposta na Tabela 3.

TABELA 3. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em caprinos, por diversos métodos de diagnóstico, provenientes de diferentes estados brasileiros.

Local	Técnica*	Total	Porcentagem	Referência
Minas Gerais	Histopatológico	22	100%	VIEIRA et al. (1997)
Rio de Janeiro	ZN			
	Sq	105	1,9%	HUBER et al. (2004)
	Cfs	105	4,76%	
Rio de Janeiro	Sam	105	1,9%	BOMFIM et al. (2005)
	Cfs			
		105	4,76%	

* Cfs: Centrífugo-flutuação em solução de sacarose; Sam: Safranina-azul de metileno; Sq: Safranina a quente; ZN: Ziehl-Neelsen

1.5. Importância em saúde pública

Considerada como uma enfermidade negligenciada, a criptosporidiose é de grande valor em saúde pública devido à sua elevada ocorrência (CARVALHO, 2009; SAVIOLI et al., 2006) e difícil tratamento (VIEL et al., 2007; SCHNYDER et al., 2009; ROSSIGNOL, 2010) principalmente quando há o acometimento de humanos portadores do vírus HIV (BLANSHARD et al., 1992; O'DONOGHE, 1995; GOLDSTEIN et al., 1996; XIAO & FENG, 2008) e de crianças (GLAESER et al., 2004; SAMIE et al., 2006; CAMA et al., 2008).

Nos seres humanos, esta enfermidade ganhou destaque a partir dos primeiros relatos da SIDA, que ocorreram no final da década de 70 (MEISEL et al., 1976; NIME et al., 1976; ANDREOLI, 2008). Durante este período, o *Cryptosporidium* revelou-se como o principal agente causador da diarreia em imunossuprimidos (LIM et al., 2005; ARAÚJO et al., 2008; ASSEFA et al., 2009).

A atividade antroponótica de algumas espécies de *Cryptosporidium* foi referida por XIAO & RYAN et al. (2004). Estes pesquisadores demonstraram que, sob condições favoráveis, o *C. canis* pode ser transmitido entre cães e humanos. Amparando esta observação, GATEI et al. (2008) relataram a ocorrência de *C. parvum*, *C. hominis*, *C. canis* e *C. felis* em pessoas portadoras do HIV na Jamaica.

Além das espécies de *Cryptosporidium* acima citadas, o *C. meleagridis* (ARAÚJO

et al., 2007; CAMA et al., 2007, 2008), *C. muris*, *C. suis*, *C. andersoni*, *C. cervine*, horse, rabbit, skunk and chipmunk genotype foram ocasionalmente relatados em humanos (XIAO & RYAN, 2004; ROBINSON et al., 2008; XIAO & FAYER, 2008). Mamíferos selvagens podem contribuir para a contaminação ambiental por *Cryptosporidium* (LEONI et al., 2000; FENG, 2007; FENG, 2010), podendo ser observado o genótipo *Cryptosporidium* deer-like inclusive em bovinos (SZONY et al., 2008).

Favorecida por uma epidemiologia diversificada, a infecção por este parasito é constantemente descrita em humanos de diferentes países como no Brasil (CIPOLLARI et al., 2010), Uganda (AKIYOSHI et al., 2006), Peru (CAMA et al., 2003, 2008), Austrália (HELLARD et al., 2000), Suíça (FRETZ et al., 2003), Jamaica (GATEI et al., 2008), Coréia (GUK et al., 2004), França (GUYOT et al., 2001), Nova Zelândia (LEARMONTH et al., 2004), Espanha (LLORENTE et al., 2007), África do Sul (SAMIE et al., 2006) e Eslovênia (SOBA & LOGAR, 2008).

1.6. Agente etiológico

Observações do desenvolvimento *in vivo* e *in vitro* do *Cryptosporidium*, indicaram que o seu ciclo de vida é similar ao das gregarinas (HIJJAWI et al., 2004; ROSALES et al., 2005).

Complementarmente, tendo como base a análise filogenética, após amplificação do gene da subunidade 18S do rRNA, os membros pertencentes ao gênero *Cryptosporidium* passaram a ser classificados como mais próximos da subclasse Gregarinia (CARRENO et al., 1999; BARTA & THOMPSON, 2006).

Algumas das similaridades que evidenciam a classificação do gênero *Cryptosporidium* com algumas espécies de arquigregarinas são a localização em enterócitos intestinais, desenvolvimento extracelular, presença de dupla membrana no vacúolo parasitóforo, apicoplasto ausente, sizígia presente, ciclo de vida monoxeno, três gerações de esquizontes, tamanho dos oocistos, número de camadas e esporozoítos (HIJJAWI et al., 2009). Entretanto, na biologia do *Cryptosporidium* e das arquigregarinas, a merogonia é uma fase presente e ausente respectivamente (LEVINE, 1985).

Embora o *Cryptosporidium* possua o complexo apical e ciclo semelhante a outros coccídeos, algumas peculiaridades importantes o diferenciam dos protozoários desta subclasse, como a localização intracelular extracitoplasmática, formação de vacúolo parasitóforo para captação de nutrientes da célula hospedeira, formação de oocistos de parede espessa e parede fina, além da resistência às drogas anticoccidianas (PUTIGNANI et al., 2009).

Ainda que existam divergências na classificação taxonômica deste microrganismo (BOWMAN, 2005; ŠLAPETA, 2006), atualmente está estabelecido que o gênero *Cryptosporidium* pertence ao Filo Apicomplexa (complexo apical), Classe Sporozoa (ciclos de reprodução sexuada e assexuada, com formação de oocistos), subclasse Coccidia (ciclo de vida envolvendo merogonia, gametogonia e esporogonia), ordem Eucoccidiida (esquizogonia), sub-ordem Eimeriina (desenvolvimento de macrogametas e microgametas), Família Cryptosporidiidae (oocisto com quatro esporozoítos e sem esporocistos), Gênero *Cryptosporidium* (FAYER, 2008; PLUTZER & KARANIS, 2009), Genótipos (FAYER, 2010) e Subtipos (SULAIMAN et al., 2005).

Em sua biologia, os oocistos esporulados de *Cryptosporidium* são ingeridos pelo hospedeiro e, após ser exposto ao suco gástrico e enzimas pancreáticas, a excitação ocorre no duodeno com a liberação de quatro esporozoítos. Estes esporozoítos são englobados por microvilosidades e se localizam em um vacúolo parasitóforo, iniciando a reprodução assexuada. Neste evento, desenvolvem-se sucessivas merogonias, com liberação de oito e quatro esporozoítos, respectivamente (FORTES et al., 2004).

Os quatro merozoítos liberados da segunda merogonia dão origem aos estádios sexuais, resultando na gênese de microgametas e macrogametas que se unem, formando o zigoto. A esporulação ocorre no interior do oocisto com desenvolvimento de quatro esporozoítos. Neste evento são formados oocistos de parede delgada (capazes de iniciar um novo ciclo dentro do mesmo hospedeiro por meio da reinfecção) e também os oocistos de parede espessa (altamente resistentes em condições ambientais, que são eliminados nas fezes). A infecção em pessoas saudáveis geralmente permanece localizada no trato gastrointestinal (TZIPORI, 1998; AKIYOSHI et al., 2003).

1.6.1. Características morfológicas e tintoriais

A partir dos primeiros relatos do *Cryptosporidium*, oocistos encontrados em fezes de mamíferos com tamanho aproximado de 5 µm eram considerados como *C. parvum*. Entretanto, a classificação morfológica dos oocistos não corresponde precisamente à espécie envolvida na infecção, uma vez que, diferentes espécies de *Cryptosporidium* podem apresentar similaridades (XIAO et al., 2004) ou diferenças em sua morfometria (BOMFIM & LOPES, 1995).

Os oocistos de *Cryptosporidium* são pequenos de modo geral. Os extremos das espécies referem-se a 7,4 x 5,6 µm para *C. muris* e 5,0 x 4,5 µm para *C. parvum* (HIJJAWI et al., 2009).

As dimensões dos oocistos podem variar de acordo com a espécie de *Cryptosporidium* envolvida e também de acordo com as diferentes fontes consultadas (PLUTZER & KARANIS et al., 2009). Oocistos de *C. hominis* possuem 4,5 x 5,5 µm, *C. suis* 5,05 x 4,41 µm, *C. felis* 4,5 x 5,0 µm, *C. canis* 4,75 x 4,91 µm, *C. meleagridis* 4,5-4,0 x 4,6-5,2 µm e *C. andersoni* 5,0-6,5 x 6,0-8,1 µm (SMITH et al., 2009). Embora tradicionalmente a taxonomia seja baseada na morfologia, hospedeiro de origem e local, esta prática na rotina laboratorial ficou impraticável devido à semelhança biológica de alguns oocistos e suas dimensões médias, podendo ser morfológicamente indistinguíveis como o *C. bovis* e o *C. parvum* (XIAO et al., 2004).

As soluções corantes favorecem a visualização de enteroparasitos fecais, principalmente as formas evolutivas de protozoários (DE SOUZA, 2005; JACOBSEN et al., 2006; ELLIOT et al., 1999). Observa-se na Figura 3, esfregaço de fezes de cabrito corado pelo método de Kinyoun.

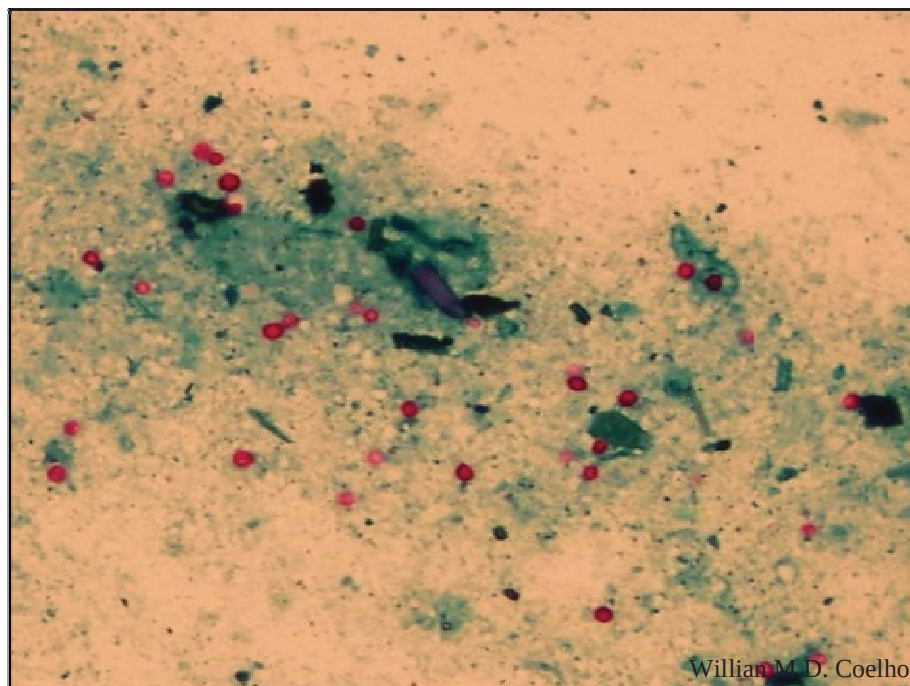


FIGURA 3. Aspecto microscópico de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em fezes de cabritos pelo método de Kinyoun, observados em aumento de 400x.

1.6.2. Análise molecular

A utilização de ferramentas moleculares possibilitou a efetiva análise genômica do gênero *Cryptosporidium*. Deste modo, pôde-se estabelecer o cariótipo da espécie *C. parvum*, determinado por meio de seu perfil eletroforético, com oito cromossomos, 3807 genes, num tamanho total do genoma de 10,4 Mbp (BANKIER et al., 2003; ABRAHAMSEN et al., 2004).

As principais moléculas utilizadas em testes moleculares para amplificação do DNA deste parasito, capazes de viabilizar a classificação das espécies ou genótipos são a pequena subunidade 18S do gene RNA (18SS rRNA), proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP 70), proteína de parede de oocisto de *Cryptosporidium* (COWP) e os genes da actina e β tubulina. A identificação de subgenótipos ou subtipos é realizada, mais comumente, com a amplificação de fragmentos do gene da glicoproteína de 60kDa (GP60), RNA extracromossomal, micro e minisatélites (FENG et al., 2000; CACCIÒ et al., 2005; SMITH et al., 2006; XIAO & RYAN, 2008).

As técnicas de PCR constituem-se em valiosos métodos de diagnóstico, extremamente sensíveis e específicos na detecção do *Cryptosporidium*, com disponibilidade de aplicação de diferentes técnicas e protocolos de extração de DNA deste parasito (XIAO et al., 2004; COUPE et al., 2005; MEIRELES et al., 2007; GONÇALVES et al., 2008).

A nested-PCR é utilizada como um dos principais métodos de diagnóstico molecular do *Cryptosporidium* (NIKAEEN et al., 2005), capaz de amplificar eficazmente a molécula de interesse em amostras com um pequeno número de oocistos (MONIS et al., 2001), demonstrando sensibilidade de aproximadamente 97% na detecção deste coccídeo (BIALEK et al., 2002).

A descrição dos primer's externos e internos do gene 18S rRNA de *C. parvum* correspondem:

Forward: Outer primer set CPr I	(5'-AAA CCC CTT TAC AAG TAT CAA TTG GA-3')
Reverse: Outer primer set CPr II	(5'-TTC CTA TGT CTG GAC CTG GTG AGT T-3')
Produto 676 bp	Acesso Gen Bank – AF093492
Forward: Inner primer set CPr III	(5'- TGC TTA AAG CAG GCA TAT GCC TTG AA-3')
Reverse: Inner primer set CPr IV	(5'-AAC CTC CAA TCT CTA GTT GGC ATA GT-3')
Produto 285 bp	Acesso Gen Bank – AF093492

(BIALEK et al., 2002)

Os genótipos de *Cryptosporidium* são diferenciados principalmente através da amplificação do gene 18S rRNA (XIAO et al., 1999), que apresenta limitadas possibilidades de reações cruzadas entre os diferentes genótipos de *Cryptosporidium* presentes em animais (XIAO et al., 1999; SANTÍN et al., 2007; FENG et al., 2007; KARANIS et al., 2007), humanos (ROBINSON et al., 2008; SOBA & LOGAR, 2008) e em amostras de água (XIAO et al., 2000; CASTRO-HERMIDA et al., 2009). Contudo, estudos revelam que este gene pode variar entre as espécies de *C. parvum*, de acordo com as diferentes áreas geográficas analisadas (KALANI & WENMAN, 1994).

O gênero *Cryptosporidium* apresenta um elevado grau de polimorfismo genético entre suas espécies. Deste modo, as técnicas moleculares propiciaram uma melhor

identificação deste parasito, inclusive comparando-os com os dados morfológicos de trabalhos antigos. A genotipagem de *Cryptosporidium* baseado na amplificação de fragmentos da subunidade rRNA, provê a diferenciação de *C. parvum*, *C. hominis* e *C. meleagridis* daquelas espécies filogeneticamente mais distantes. A subgenotipagem a partir da amplificação do gene GP60 é similar à seqüência do microsatélite de trinucleotídeos TCA/TCG/TCT ao 5' do final do gene. A variação no número de repetições de trinucleotídeos permite categorizar *C. parvum*, *C. hominis* e os subtipos Ia, Ib, Id, Ie e If para *C. hominis* e IIa, IIc, IId e IIe para *C. parvum* (XIAO, 2009).

Assim sendo, a subgenotipagem com o gene GP60 evidenciou o elevado grau de polimorfismo existente entre as espécies de *Cryptosporidium* e propiciou a identificação dos grupos e subgrupos de *C. parvum* capazes de atuar como agentes causadores de zoonoses, destacando-se o IIa e IId (PLUTZER & KARANIS, 2009).

A identificação de espécies de *Cryptosporidium* que apresentam potencial zoonótico, como o *C. parvum* e o *C. hominis*, baseia-se especialmente em protocolos para amplificação do gene GP60. Esta glicoproteína foi considerada um marcador ideal para identificação dos isolados predominantemente humanos, permitindo descrever a sua subgenotipagem (PENG, 2003; ALVES, 2003; XIAO & RYAN, 2004), devendo ser empregado sempre em caracterizações epidemiológicas humanas e animais (O'BRIEN et al., 2008).

Deste modo, diversos trabalhos tem sido conduzidos com o intuito de elucidar os recursos bioquímicos e a genômica de espécies de *Cryptosporidium*, principalmente aqueles muito próximos como o *C. parvum* e o *C. hominis* (RIDER JR et al., 2010), que apresentam genomas homólogos (ABRAHAMSEN et al., 2004), divergindo sutilmente em sua região variável, devido a presença de micro ou mini-satélites (TANRIVERDI et al., 2006).

1.6.3. Aspectos patogênicos e virulência

Um dos mais preocupantes fatores epidemiológicos da criptosporidiose é a sua capacidade infectiva. Elevadas porcentagens de infecção foram observadas com a administração de aproximadamente 30 oocistos (DUPPONT et al., 1995), podendo

chegar a 0,5% de possibilidade de infecção a ingestão de um único oocisto (TEUNIS et al., 1996).

Em estudo conduzido no Brasil por MARTINS-VIEIRA et al. (2009), a infecção experimental com inoculação via oral com 5×10^6 oocistos de *C. parvum* em um bezerro resultou na excreção de aproximadamente 25×10^6 de oocistos por mL de fezes. Este fato prova que a capacidade de eliminação do agente etiológico no ambiente é alta, colocando em risco de infecção os seres humanos e animais que entrem em contato com estas fezes de maneira direta ou indireta.

Além disto, quando se instala a infecção em um organismo, o gênero *Cryptosporidium* demonstra capacidade de desenvolver-se em um vacúolo parasitóforo, permanecendo protegido do sistema imune celular e do ambiente hostil do intestino, com acesso irrestrito às reservas nutricionais da célula hospedeira (THOMPSON et al., 2008).

O mecanismo patofisiológico da criptosporidiose compreende o seu estágio intra-enterocitário. Esta enteroinfecção causa atrofia, fusão das vilosidades intestinais e inflamação, que resultam em perda da superfície absorviva e transporte desequilibrado de nutrientes. Ainda não está claro se o parasito interfere na função celular, mas parece ser capaz de induzir ou inibir a apoptose celular (CHEN et al., 1998; OJCIUS et al., 1999; DAGCI et al., 2002; BURET et al., 2003; LEAV et al., 2003).

Análises histopatológicas revelaram que a criptosporidiose pode ocasionar infiltrado inflamatório mínimo e embotamento do vilo, sendo as alterações mais pronunciadas em indivíduos imunossuprimidos, como alterações inflamatórias maiores, rompimento da barreira celular epitelial com elevada infiltração celular inflamatória mais extensa e intensa. A infecção maça do parasito nos enterócitos, estimula uma reação inflamatória local, com aumento das concentrações de prostaglandinas, citocinas diversas, principalmente o interferon. Esses mediadores inflamatórios alteram o transporte de solutos na célula do epitélio intestinal, levando à diarreia osmótica (LEAV et al., 2003).

A diarreia por má absorção resulta da interação entre produtos parasitários, como as proteinases, que rompem a barreira epitelial e as respostas

imunológicas/inflamatórias do hospedeiro, promovendo absorção deficiente de eletrólitos, nutrientes, combinados com a hipersecreção de cloro e água (ARGENZIO et al., 1990; HUANG & WHITE, 2006), induzindo o surgimento de anormalidades intestinais, principalmente devido a ativação de linfócitos CD8⁺ no compartimento intraepitelial, com aumento da atividade citotóxica (MULLER et al., 1998; CHAI et al., 1999; BURET, 2009).

A infecção pelo *Cryptosporidium* é auto-limitante em indivíduos imunologicamente normais. Entretanto, em humanos imunodeprimidos, esta doença está associada a elevados índices de morbidade e mortalidade (HUNTER & NICHOLS, 2002), especialmente em HIV-positivos (CAMA et al., 2003), transplantados (DENKINGER et al., 2007) e crianças (GLAESER et al., 2004), em que a contagem global de linfócitos T CD4⁺ esteja deficiente (BRANDONISIO et al., 1999; ASSEFA et al., 2009).

1.6.4. Imunogenicidade e antigenicidade

A infecção pelo *Cryptosporidium* é antigênicamente eficaz, capaz de promover imunidade duradoura através do desenvolvimento da imunidade humoral específica com produção de anticorpos (ELLIOT et al., 1997; DENG et al., 2004; MOSS et al., 2004), capazes de neutralizar os esporozoítos (FAYER et al., 1989; FAYER et al., 1990; GREENBERG et al., 1996), resultando em resistência à infecção (JOHNSON et al., 2004; AKILI et al., 2006).

Todavia, as alterações imunológicas decorrentes da infecção pelo *Cryptosporidium* não permanecem restritas ao trato gastrintestinal, levando também à ocorrência de alterações sistêmicas na população de linfócitos, principalmente em baço e placas de Peyer, com aumento do número de linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e expressão de TCR αβ⁺, TCRγδ⁺ e CD45B/220⁺ (MARIOTTE et al., 2004).

Diferentes proteínas foram descritas como essenciais no processo da patogênese do *Cryptosporidium*, fundamentais durante os eventos de ataque e invasão celular, sendo denominadas como antígenos de superfície ou glicoproteínas Gp15, Gp40/45, Gp900, Gp25-200, P23/27, CSL, CP15/17, Cpa135, CPS-500, COWP e

TRAP-C1/P786 (ENRIQUEZ & RIGGS, 1998; LEAV et al., 2003; BOULTER-BITZER et al., 2007).

A diferenciação entre diferentes aminoácidos que codificam CPGp40/60, P23 e Gp900 elucidam os padrões de infecção e as diferenças entre *C. hominis* e *C. parvum* em genótipos I e II (STURBAUM et al., 2003) e o polimorfismo entre estes isolados de humanos e animais (SULAIMAN et al., 1998; WU et al., 2003; CACCIÒ, 2005).

Assim, os antígenos de *C. parvum* envolvidos no processo de infecção são fundamentais para o desenvolvimento da resposta imune, gerando anticorpos neutralizantes (FAYER and UNGAR, 1986) que reduzem os sintomas da criptosporidiose (FAYER et al., 1989a; FAYER et al., 1989b; PERRYMAN et al., 1990), sendo igualmente úteis nas técnicas de diagnóstico (ANUSZ et al., 1990) e em estratégias de imunoterapia (UNGAR et al., 1990; GREENBERG and CELLO, 1996; JENKINS et al., 1999).

1.6.5. Resistência

Após a formação do zigoto, ocorre a auto-infecção do hospedeiro pelos oocistos de parede fina e contaminação do ambiente em decorrência da liberação de oocistos de parede espessa, que se apresentam prontamente esporulados e infectantes ainda no hospedeiro. Estes oocistos diferem-se dos demais coccídeos principalmente pela presença de membrana dupla, pontes de dissulfeto, carboidratos, lipídeos e actina (ROBERTSON & GJERDE, 2007), conferindo-lhe resistência e persistência ambiental (ROBERTSON et al. 1992; CAREY et al., 2004; SUNNOTEL et al., 2006).

A viabilidade dos oocistos em suspensão aquosa com temperatura entre 15 a 20°C é de aproximadamente três meses, podendo chegar à um ano em condições de refrigeração. A infectividade de oocistos é reduzida após aquecimento (KING et al., 2005) à 65°C durante 30 minutos (TZIPORI, 1983), congelamento -70°C (CAMPBELL et al. 1982), desidratação mínima de quatro horas (ROBERTSON et al., 1992) ou quando expostos à luz ultravioleta (UV) (CLANCY et al., 2004).

Os principais produtos utilizados na desinfecção contra oocistos de *Cryptosporidium* encontram-se dispostos no Quadro 1.

QUADRO 1. Principais produtos utilizados com eficácia na desinfecção contra oocistos de *Cryptosporidium* spp.

Aplicação			
Produto	Concentração	Horas	Referência
Ácido hipocloroso	2 p.p.m	2 horas	PEREIRA (2007)
Amônia	5%	2 horas	CAMPBELL et al. (1982)
Amônia	50%	30 minutos	SUNDERMANN et al. (1987)
Dióxido de cloro	0,4 p.p.m	15 minutos	PEETERS et al. (1989)
Dióxido de cloro	5 p.p.m.	1,5 horas	PEREIRA (2007)
Formol-salina	10%	2 horas	CAMPBELL et al. (1982)
Peróxido de hidrogênio	3% (10 vol.)	10 minutos	BLEWETT (1989)
Ozônio	1,11 p.p.m.	6 minutos	PEETERS et al. (1989)
Ozônio	1 p.p.m	5 minutos	KORICH et al. (1989)
Ozônio	0,18 mg/L 0,24 mg/L	Sistema fechado	PEREIRA (2007)
Ozônio	0,7 mg/L	Sistema aberto	PEREIRA (2007)

1.6.6. Transmissão

O parasito *Cryptosporidium* foi incluído na Iniciativa das Doenças Negligenciadas da Organização Mundial da Saúde, por sua estreita relação com saneamento básico deficiente e nas populações com baixo poder aquisitivo (SAVIOLI et al., 2006; THOMPSON et al., 2008; BOWMAN & LUCIO-FOSTER, 2010).

Os hospedeiros são infectados por oocistos esporulados altamente resistentes às condições ambientais, cuja via de eliminação e porta de entrada corresponde à rota fecal-oral respectivamente (FAYER et al., 1997). Estas formas evolutivas eliminadas pelas fezes de seus respectivos hospedeiros acabam contaminando o ambiente (GRACZYK et al., 2000; CARDOSO, 2004; ALMEIDA et al., 2008) e os recursos hídricos locais (DÍAS et al., 2008; XU et al., 2008), ocasionando surtos de criptosporidiose (SMITH et al., 1995; KARANIS et al., 2007; CASTRO-HERMIDA et al., 2008) com quadros de diarreia, má-nutrição e morte, principalmente em crianças (SMITH & NICHOLS, 2010).

A transmissão pode ocorrer entre humanos, entre humanos e animais, e entre animais e humanos pelo contato direto ou indireto (ROBERTSON, 2009), ingestão hídrica (GOLDSTEIN et al., 1996; ELWIN et al., 2002) e de alimentos contaminados

com oocistos deste parasito, especialmente em locais com condições higiênico-sanitárias precárias (DIXON, 2003; DAWSON, 2005; FAYER et al., 2000). Estes surtos são descritos na literatura científica em locais de acesso público como parques, áreas de recreação e piscinas (FAYER, 2004; SMITH et al., 2006).

Frente ao crescimento populacional e ao aumento da demanda por água para uso doméstico e industrial, os efluentes resultantes destes usos promovem o surgimento de enfermidades parasitárias de veiculação hídrica (DOWBOR & TAGNIN, 2005), de modo especial a criptosporidiose (ROSE et al., 1997; FRANCO, 2007; KARANIS et al., 2007).

O surto histórico de criptosporidiose com maior destaque ocorreu em Milwaukee/EUA, com o acometimento de 403 mil pessoas (MACKENZIE, 1994; HOXIE et al., 1997; NEIL, 1997). Entretanto, o primeiro relato da transmissão desta doença por veiculação hídrica foi referida em 1984 no estado do Texas, com aproximadamente 13 mil pessoas infectadas (LISLE & ROSE, 1995).

Diversos pesquisadores, em diferentes partes do mundo, relatam a poluição fecal humana e animal no ambiente, sendo os oocistos deste parasito facilmente recuperados de água de piscinas (JOCE et al., 1991), tratadas por filtração (LELAND et al., 1993), superfície de águas de abastecimento (D'ANTONIO et al., 1985; ROSE et al., 1986; HANSEN & ONGERTH, 1991; WARD et al., 2002; CASTRO-HERMIDA et al., 2009) e alimentos (SLIFKO et al., 2000; HELLER et al., 2004),

Por veiculação hídrica, este parasito normalmente é observado em águas superficiais, uma vez que, devido ao seu diminuto tamanho, alta viabilidade e baixa densidade específica, são capazes de ser veiculados por longas distâncias (ROSE, 1990).

Cerca de 31 surtos de criptosporidiose, envolvendo mais de 10.000 pessoas, foram associados com a exposição a águas de recreio, ainda que devidamente tratadas com cloro. Diversos surtos foram ainda correlacionados com a ingestão de cidra, leite pasteurizado, gelo de bebida e alimentos, com ingestão (DILLINGHAM et al., 2002) (ou inalação) de oocistos infectantes excretado pelos hospedeiros infectados (O'DONOGHUE, 1995).

1.7. Manifestações clínicas

Em caprinos (VIEIRA, 1997; 1999) e nas demais espécies animais (MEIRELES, 2010), a criptosporidiose manifesta-se principalmente sobre a forma de diarreia.

Nos humanos (HOLLAND, 1990; CHIN, 2000; NWOKEDIUKO et al., 2002; LIM et al., 2005), podem ser observado vômitos, náuseas, flatulência, perda de apetite, peso e dor abdominal (KORTBEEK, 2009). Em alguns casos, este parasito pode acometer o trato respiratório (FAYER et al., 1997; MERCADO et al., 2007), principalmente em indivíduos imunossuprimidos (BLANSHARD ET AL., 1982; BRANTLEY et al., 2003; ASSEFA et al., 2009), em que a variação das manifestações clínicas, persistência da infecção e gravidade dos sintomas estão diretamente correlacionados com a contagem de linfócitos TCD4⁺ (KELLY et al., 2002; HOUPPT et al., 2005; GUPTA et al., 2008).

Em humanos HIV-positivos, com contagem de linfócitos TCD4⁺ inferior a 50/mm³, a doença desenvolve-se de modo fulminante, provocando evacuações de até dois litros de fezes por dia (HUNTER & NICHOLS, 2002).

A manifestação dos sintomas podem ocorrer de modo diversificado, dependendo da espécie de *Cryptosporidium* envolvida e status imunitário do hospedeiro (HOUPPT et al., 2005; DEKINGER et al., 2007), podendo ainda ser observadas infecções assintomáticas em portadores sãos (ARROWOOD, 1997; SIWILA et al., 2007).

A infecção por *Cryptosporidium* pode apresentar-se sob a forma de síndromes em humanos. A forma de síndrome denominada criptosporidiose intestinal fulminante ou *cólera-like*, acontece em pessoas portadoras do vírus HIV ou imunossuprimidas por quimioterapia. Nestes casos pode ocorrer choque hipovolêmico e elevada escala de mortalidade. Um tempo de sobrevida muito curto (cinco semanas) foi estipulado por BLANSHARD et al. (1992), principalmente devido ao aumento de infecções intercorrentes (GRIFFITHS, 1998).

Outras formas de manifestações desta enfermidade ocorrem sob a forma de síndrome respiratória, com acometimento da mucosa brônquica (ARROWOOD, 1997; GRIFFITS et al., 1998), criptosporidiose hepatobiliar e pancreática (ARROWOOD, 1997; HUNTER & NICHOLS, 2002).

1.8. Exames laboratoriais

O diagnóstico do *Cryptosporidium* pode ser realizado por diferentes métodos diretos e indiretos. O diagnóstico microscópico de oocistos de *Cryptosporidium* requer tempo e experiência do pesquisador, devido ao seu reduzido tamanho e dificuldade de visualização e diferenciação. Este tipo de diagnóstico é realizado principalmente pelas técnicas que utilizam colorações específicas, que coram os oocistos e contrastam com o fundo da lâmina (BROOK et al., 2008).

As técnicas de concentração com solução de açúcar (SLOSS et al., 1999), sulfato de zinco (FAUST et al., 1938) e sedimentação (McNABB et al., 1985) são empregadas com sucesso no diagnóstico deste parasito. A concentração de oocistos de *Cryptosporidium* em amostra de fezes pela técnica de Sheather está demonstrada na Figura 4.

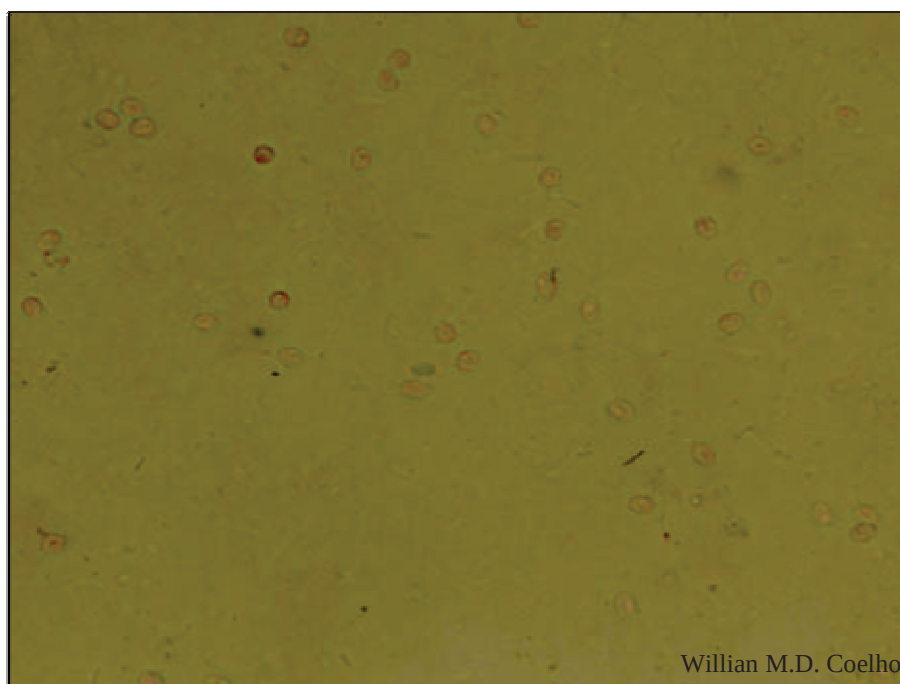


FIGURA 4. Aspecto microscópico de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostra fecal de cabrito utilizando técnica de Sheather, com microscópio óptico em aumento de 400x.

Em decorrência da excreção intermitente de oocistos de *Cryptosporidium*, faz-se necessário a repetição dos exames coproparasitológicos, com nova colheita da amostra, mesmo após um resultado negativo (HUBER et al., 2005; RAMBOZZI et al., 2007).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido utilizada com sucesso no diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras fecais e ambientais, principalmente em locais de surtos, possibilitando determinar os fatores de risco e as fontes de infecção. Este método possibilita a identificação genotípica do parasito (MAGI et al., 2006) com o seqüenciamento dos genes codificadores 18S rRNA, actina, HSP-70, GP-60 e a proteína de parede do oocisto de *Cryptosporidium* (COWP), resultando na distinção dos diversos subgenótipos existentes (JEX et al., 2008; PLUTZER & KARANIS, 2009; FAYER, 2010; FAYER et al., 2010; KHAN et al., 2010).

1.9. Tratamento

O tratamento da criptosporidiose em animais e humanos baseia-se na intervenção direta nos sinais e sintomas apresentados. LEMETEIL et al. (1993) analisaram a eficácia de mais de 30 drogas em ratos imunodeprimidos como modelo terapêutico humano da criptosporidiose, observando-se pouca eficácia curativa em muitos destes medicamentos.

Outros compostos como Octreotida, Amprólio, Ciclosporina A, Co-trimoxazole, Difenoxilato, Eritromicina, Sulfato de morfina, Espiramicina, Azidotimidina e Diclazuril têm sido referidos por diversos pesquisadores ao longo da história como capazes de exercer alguma atividade anti-*Cryptosporidium*, de modo especial a Lasalocida, Metronidazol e Sulfadimetoxina por LEMETEIL et al. (1993).

Estudiosos relataram a ação eficaz de algumas drogas no tratamento da criptosporidiose em cabritos neonatos e em caprinos adultos. As moléculas químicas e o tempo de administração dos medicamentos em cabritos estão demonstrados na Tabela 4.

TABELA 4. Principais drogas utilizadas no tratamento da criptosporidiose em cabritos.

Princípio ativo	Dose	
Nitazoxanida	50-250 mg/kg-24 h por 8 dias	VIEL et al. (2007)
Decoquinato	2,5 mg/kg-24h por 21 dias	FERRE et al. (2005)
α -Ciclodextrina	500 mg/kg-24 h por 6 dias	CASTRO-HERMIDA et al. (2004)
Decoquinato	2,5 mg/kg-24h por 21 dias	MANCASSOLA et al. (1997)
Paramomicina	100 mg/kg-24 h por 11 dias	CHARTIER et al. (1996)
	100 mg/kg-24 h por 10 dias	MANCASSOLA et al. (1995)

1.10. Prevenção e controle

Adoções de medidas preventivas contra a criptosporidiose são de fundamental importância, principalmente naqueles locais onde ainda não foram identificados focos da doença e onde há presença de pessoas imunodeficientes. Como a transmissão ocorre na maioria das vezes pela rota fecal-oral, noções básicas de higiene pessoal e saneamento ambiental são indispensáveis na profilaxia desta e de outras parasitoses (ROSE, 1997; DE GRAAF et al., 1999; LEAV et al., 2003).

O controle da veiculação hídrica do *Cryptosporidium* pode ser realizado com o impedimento da poluição de rios e mananciais por fezes de animais e humanos, interrompendo a propagação deste e outros agentes parasitários pela água de bebida (KANJO et al., 2000; HELLER et al., 2004; CAUSER et al., 2006; DIAS et al., 2008; HARGY et al., 2009).

Devido à ausência de resultados satisfatórios com relação às drogas utilizadas no tratamento da criptosporidiose (KADAPPU et al., 2002), a intervenção ambiental, com medidas preventivas da transmissão do *Cryptosporidium* ainda são consideradas como as melhores alternativas no controle da doença, principalmente nas regiões onde esta enfermidade é endêmica, com presença de crianças, idosos e imunossuprimidos (PEREIRA et al., 2009).

1.11. REFERÊNCIAS

- ABE, N.; KIMATA, I.; ISEKI, M. Identification of genotypes of *Cryptosporidium parvum* isolates from a patient and a dog in Japan. **Journal of Medicine Science**, v.64, n.2, p.165-168, 2002.
- ABRAHAMSEN, M.S.; TEMPLETON, T.J.; ENOMOTO, S.; ABRAHANTE, J.E.; ZHU, G.; LANETO, C.A.; DENG, M.; LIU, C.; WIDMER, G.; TZIPORI, S.; BUCK, G.A.; XU, P.; BANKIER, A.T.; DEAR, P.H.; KONFORTOV, B.A.; SPRIGGS, H.F.; IYER, L.; ANANTHARAMAN, V.; ARAVIND, L.; KAPUR, V. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. **Science**, v.304, n.5669, p.441-445, 2004.
- AKILI, D.; HEIDARI, M.; WELTER, L.M.; REINHARDT, T.A.; HARP, J.A. Characterization of a factor from bovine intestine that protects against *Cryptosporidium parvum* infection. **Veterinary Parasitology**, v.142, n.1, p.168-172, 2006.
- AKIYOSHI, D.E.; TUMWINE, J.K.; BAKEERA-KITAKA, TZIPORI, S. Subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from children in Uganda. **The Journal of Parasitology**, v.92, n.5, p.1097-1100, 2006.
- AKIYOSHI, D.E.; DILO, J.; PEARSON, C.; CHAPMAN, S.; TUMWINE, J.; TZIPORI, S. Characterization of *Cryptosporidium meleagridis* of human origin passaged through different host species. **Infection and Immunity**, v.71, n.4, p.1828-1832, 2003.
- ALCAINO, H.; GORMA, T. Parasitos de los animales domésticos em Chile. **Parasitología al día**, v.23, n.1, p.33-41, 1999.
- ALMEIDA, A.J.; MONTEIRO, M.I.; BRAGA, R.S.; MARIANO, F.A.; CALDEIRA, M.S. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em animais errantes apreendidos em campos do Goytacazes, RJ. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, v.1, n.2, p.66-75, 2008.
- ALVES, M.; XIAO, L.; ANTUNES, F.; MATOS, O. Distribution of *Cryptosporidium* subtypes in humans and domestic and wild ruminants in Portugal. **Parasitology Research**, v.99, n.3, p.287-292, 2006.
- ALVES, M.; XIAO, L.; SULAIMAN, I.; LAL, A.A.; MATOS, O.; ANTUNES, F. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle and zoo ruminants in Portugal. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.6, p.2744-2747, 2003.

ANDREOLI, A. **As pessoas que vivem com HIV/AIDS: uma revisão de literatura científica**. 2008. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Saúde Pública) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

ANGUS, K.W. Cryptosporidiosis and AIDS. **Baillière's Clinical Gastroenterology**, v.4, n.2, p.425-41, 1990.

ANUSZ, K.Z.; MANSON, P.H.; RIGGS, M.W.; PERRYMAN, L.E. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in bovine feces by monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n.12, p.2770–2774, 1990.

APPELBEE, A.J.; ANDREW THOMPSON, R.C.; OLSON, M.E. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife – current status and future needs. **Trends in Parasitology**, v.21, n.8, p.370-376, 2005.

ARAYA, J.; GONZALEZ, J.; SAGUA, H.; WILSON, O.; CLAUDIO, R.; MAURÍCIO, V. Cryptosporidiosis en el Norte de Chile. I Prevalencia en animales domésticos, sinantrópicos y silvestres. **Boletín Chileno de Parasitología**, v.42, n.1, p.7-11, 1987.

ARAÚJO, A.J.U.S.; KANAMURA, H.Y.; ALMEIDA, M.E.; GOMES, A.H.S.; PINTO, T.H.L.; DA SILVA, A.J. Identificação genotípica de *Cryptosporidium* spp. isolados a partir de pacientes com HIV e crianças imunocompetentes de São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.50, n.3, p.139-143, 2008.

ARAÚJO, A.J.U.S.; GOMES, A.H.S.; ALMEIDA, M.E.; KANAMURA, H.Y. Detecção de *Cryptosporidium meleagridis* em amostras fecais de pacientes HIV positivos no Brasil. **Revista Panamericana de Infectologia**, v.9, n.2, p.38-40, 2007.

ARGENZIO, R.A.; LIACOS, J.A; LEVY, M.L.; MEUTEN, D.J.; LECCE, J.G.; POWELL, D.W. Villous atrophy, crypt hyperplasia, cellular infiltration, and impaired glucose-NA absorption in enteric cryptosporidiosis of pigs. **Gastroenterology**, v.98, n.5, p.1129-1140, 1990.

ASSEFA, S.; ERKO, B.; MEDHIN, G.; ASSEFA, Z.; SHIMELIS, T. Intestinal parasitic infection in relation to HIV/AIDS status, diarrhea and CD4 T-cell count. **BMC Infectious Diseases**, v.18, n.9, p.155, 2009.

BARTA, J.R.; THOMPSON, R.C.A. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. **Trends in Parasitology**, v.22, n.10, p.463-468, 2006.

BALLWEBER, L.R.; PANUSKA, C.; HUSTON, C.L.; VASILOPULOS, R.; PHARR, G.T.; MACKIN, A. Prevalence 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.

BANKIER, A.T.; SPRIGGS, H.F.; FARTMANN, B.; KONFORTOV, B.A.; MADERA, M.; VOGEL, C.; TEICHMANN, S.A.; IVENS, A.; DEAR, P.H. Integrated mapping, chromosomal sequencing and sequence analysis of *Cryptosporidium parvum*, **Genome Research**, v.13, n.8, p.1787-1799, 2003.

BECHER, K.A.; ROBERTSON, I.D.; FRESER, D.M.; PALMER, D.G.; THOMPSON, R.C.A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dairy calves originating from three sources in Western Australia. **Veterinary Parasitology**, v.123, n.1, p.1-9, 2004.

BIALEK, R.; BINDER, N.; DIETZ, K.; JOACHIM, A.; KNOBLOCH, J.; ZELCK, U.E. Comparison of fluorescence, antigen and PCR assays to detect *Cryptosporidium parvum* in fecal specimens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.43, n.4, p.283-288, 2002.

BLANSHARD, C.; JACKSON, A.M.; SHANSON, D.C.; FRANCIS, N.; GAZZARD, B.Z. Cryptosporidiosis in HIV-Seropositive patients. **Quarterly Journal of Medicine**, v.85, n.307-308, p.813-823, 1992.

BLEWETT, D.A. 1989. Quantitative techniques in *Cryptosporidium* research, p. 85-95. In: K.W. ANGUS and D.A. BLEWETT (eds.), **Proceedings of the 1st International Workshop on Cryptosporidiosis**. Edinburgh, Scotland.

BOMFIM, T.C.B.; HUBER, F.; GOMES, R.S.; ALVES, L.L. Natural infection by *Giardia* sp. and *Cryptosporidium* sp. in dairy goats, associated with possible risk factors of the studied properties. **Veterinary Parasitology**, v.134, n.1, p. 9-13, 2005.

BOULTER-BITZER, J.I.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Molecular targets for detection and immunotherapy in *Cryptosporidium parvum*. **Biotechnology Advances**, v.25, n.1, p.13-44, 2007.

BERINO, E.C.S. **Ocorrência e detecção de *Cryptosporidium* sp. e *Giardia* sp. em águas brutas de abastecimento de formadores do lago Guaíba.** 2004. 173 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Recursos Hídricos) – Instituto de Pesquisas Hidráulicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BOUZID, M.; STEVERDING, D.; TYLER, K.M. Detection and surveillance of waterborne protozoan parasites. **Current Opinion in Biotechnology**, v.19, n.3, p.302-306, 2008.

BORGES, J.C.G.; ALVES, L.C.; FAUSTINO, M.A.G.; LIMA, A.M.A. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em peixes-boi-marinhos (*Trichechus manatus*) e funcionários envolvidos no manejo da espécie. **Estudos de Biologia**, v.29, n.66, p.33-41, 2007.

BRANTLEY, R.K.; WILLIAMS, K.R.; SILVA, T.M.J.; SISTROM, M.; THIELMAN, N.M.; WARD, H.; LIMA, A.A.M.; GUERRANT, R.L. AIDS-associated diarrhea and wasting in Northeast Brazil is associated with subtherapeutic plasma levels of antiretroviral medications and with both bovine and human subtypes of *Cryptosporidium parvum*. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.7, n.1, p.16-22, 2003.

BROOK, E.J.; CHRISTLEY, R.M.; FRENCH, N.P.; HART, C.A. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in fresh and frozen cattle feces: comparison of three methods. **Letters in Applied Microbiology**, v.46, n.1, p.26-31, 2008.

BOWMAN, D.D.; LUCIO-FORSTER, A. Cryptosporidiosis and giardiasis in dogs and cats: Veterinary and public health importance. **Experimental Parasitology**, v.124, n.1, p.121-127, 2010.

BOWMAN, D.D. What's in a name?. **TRENDS in Parasitology**, v.21, n.5, p.267-269, 2005.

BURET, A.G. Pathogenic mechanisms in giardiasis and cryptosporidiosis. In: Ortega-Pierres, G. et al. ***Giardia and Cryptosporidium: from molecules to disease***, CAB international, 2009. cap.35, p. 428-441.

BURET, A.G.; CHIN, A.C.; SCOTT, K.G.E. Infection of human and bovine epithelial cells with *C. 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.

BUSHEN, O.Y.; KOHLI, A.; PINKERTON, R.C.; DUPNIK, K.; NEWMAN, R.D.; SEARS, C.L.; FAYER, R.; LIMA, A.A.M.; GUERRANT, R.L. Heavy cryptosporidial infections in children in Northeast Brazil; comparasion of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum*. **The Royal Society of Tropical Medicine & Higiene**, v.101, n.4, p.378-384, 2007.

CAMPBELL, I.; TZIPORI, S.; HUTCHISON, G.E.; ANGUS, K.W. Effect of disinfectants on survival of *Cryptosporidium* oocysts. **The Veterinary Record**, v.111, n.18, p.414-415, 1982.

CACCIÒ, S.M. Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. **Parassitologia**, v.47, n.2, p.185-192, 2005.

CACCIÒ, S.M.; PINTER, E.; FANTINI, R.; MEZZAROMA, I.; POZIO, E. Human infection with *Cryptosporidium felis*: case report and literature review. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.1, 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, n.10, p.1567-1574, 2008.

CAMA, V.A.; ROSS, J.M.; CRAWFORD, S.; KAWAI, V.; CHAVEZ-VALDEZ, R.; VARGAS, D.; VIVAR, A.; TICONA, E.; NAVINCOPA, M.; WILLIAMSON, J.; ORTEGA, Y.; GILMAN, R.H.; BERN, C.; XIAO, L. Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. **Journal of Infectious Diseases**, v.196, n.5, p.684-691, 2007.

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

CARDOSO, M.V.; LARA, M.C.C.S.H.; CHIEBAO, D. GABRIEL, F.H.L.; VILLALOBOS, E.M.C.; PAULIN, L.M.; CASTRO, V.; NASSAR, A.; CUNHA, E.M.S.; PIATTI, R.M.; PITUCO, E.M. Determinação das condições sanitárias de caprinos e ovinos na região sudoeste do estado de São Paulo, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35., 2008, Gramado. Anais eletrônicos do Congresso

Brasileiro de Medicina Veterinária. Gramado: Rio Grande do Sul, 2008. Disponível em: <<http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0611-2.pdf>>

Acesso em: 20 fev. 2011.

CARDOSO, A.B. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.13, n.2, p.79-92, 2004.

CARRENO, R.A.; MARTIN, D.S.; BARTA, J.R. *Cryptosporidium* is more closely related to gregarines than to coccidian as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. **Parasitology Research**, v.85, n.11, p.899-904, 1999.

CARVALHO, T.T.R. Estado atual do conhecimento de *Cryptosporidium* e *Giardia*. **Revista de Patologia Tropical**, v.38, n.1, p.1-16, 2009.

CARVALHO-ALMEIDA, T.T.; PINTO, P.L.S.; QUADROS, C.M.S.; TORRES, D.M.A.G.V.; KANAMURA, H.Y.; CASIMIRO, H.M. Detecção de *Cryptosporidium* sp. em fezes não diarreicas de crianças, em uma escola de educação infantil de São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, n.1, p.27-32, 2006.

CASTRO-HERMIDA, J.A.; GARCÍA-PRESEDO, I.; ALMEIDA, A.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; COSTA, J.M.C.; MEZO, M. Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in surface water: a health risk for humans and animals. **Water Research**, v.43, n.17, p.4133-4142, 2009.

CASTRO-HERMIDA, J.A.; GARCÍA-PRESEDO, I.; ALMEIDA, A.; GONZÁLES-WARLETA, M.; CORREIA DA COSTA, J.M.; MEZO, M. Presence of *Cryptosporidium* spp and *Giardia duodenalis* through drinking water. **The Science of Total Environment**, v.405, n.1, p.45-53, 2008.

CASTRO-HERMIDA, J.A.; ALMEIDA, A.; GONZÁLES-WARLETA, M.; COSTA, J.M.C.; RUMBO-LORENZO, C.; MEZO, M. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in healthy adult domestic ruminants. **Parasitology Research**, v.101, n.5, p.1443-1448, 2007.

CASTRO-HERMIDA, J.A.; PORS, I.; POUPIN, B.; ARES-MAZÁS, E.; CHARTIER, C. Prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium parvum* in goat kids in Western France. **Small Ruminant Research**, v.56, n.1, p.259-264, 2005a.

CASTRO-HERMIDA, J.A.; DELAFOSSE, A.; PORS, I.; ARES-MAZÁS, E.; CHARTIER, C. *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium parvum* infections in adult goats and their implications for neonatal kids. **Veterinary Record**, v.157, n.20, p.623-627, 2005b.

CASTRO-HERMIDA, J.A.; PORS, I.; OTERO-ESPINAR, F.; LUZARDO-ALVAREZ, A.; ARES-MAZÁS, E.; CHARTIER, C. Efficacy of α -cyclodextrin against experimental cryptosporidiosis in neonatal goats. **Veterinary Parasitology**, v.120, n.1, p.35-41, 2004.

CAUSER, L.M.; HANDZEL, T.; WELCH, P.; CARR, M.; CULP, D.; LUCHT, R.; MUDAHAR, K.; ROBINSON, D.; NEAVEAR, E.; FENTON, S.; ROSE, C.; CRAIG, L.; ARROWOOD, M.; WAHLQUIST, S.; XIAO, L.; LEE, Y.M.; MIREL, L.; LEVY, D.; BEACH, M.J.; POQUETTE, G.; DWORKIN, M.S. An outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection at an Illinois recreational waterpark. **Epidemiology and Infection**, v.134, n.1, p.147-156, 2006.

CAVER, J.A.; HILL, J.E.; THOMPSON, S.H. Surveillance of Cryptosporidia in a veterinary diagnostic laboratory. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.8, n.4, p.497-500, 1996.

CIMMERMAN, S.; CATANEDA, C.G.; JULIANO, W.A.; PALACIOS, R. Perfil das enteroparasitoses diagnosticadas em pacientes com infecção pelo vírus HIV na era da terapia antiretroviral potente em um centro de referência em São Paulo, Brasil. **Parasitología Latinoamericana**, v.57, n.3-4, p.111- 119, 2002.

CIMMERMAN, S.; CIMMERMAN, B.; LEWI, D.S. Enteric parasites and AIDS. **São Paulo Medical Journal**. v.117, n.6, p.266-273, 1999a.

CIMMERMAN, S.; CIMMERMAN, B.; LEWI, D.S. Avaliação da relação entre parasitoses intestinais e fatores de risco para o HIV em pacientes com AIDS. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, n.2, p.181-185, 1999b.

CHAI, J.Y.; GUK, S.M.; HAN, H.K.; YUN, C.K. Role of intra-epithelial lymphocytes in mucosal immune responses of mice experimentally infected with *Cryptosporidium parvum*. **Journal of Parasitology**, v.85, n.2, p.234-239, 1999.

CHARTIER, C.; MALLEREAU-PELLET, M.P.; NACIRI, M. Prophylaxis using paramomycin of natural cryptosporidial infection in neonatal kids. **Preventive Veterinary Medicine**, v.25, n.3, p.357-361, 1996.

CHARTIER, C.; MALLEREAU-PELLET, M.P.; MANCASSOLA, R.; NUSSBAUM, D. Détection des oocystes de *Cryptosporidium* dans les fèces de caprins: comparaison entre un test d'agglutination au latex et trois autres techniques conventionnelles. **Veterinary Research**, v.33, n.2, p.169-177, 2002.

CHEN, X.M. LEVINE, S.A.; TIETZ, P.; KRUEGER, E.; JEFFERSON, M.A.; JEFFERSON, D.M.; MAHLE, M.; LARUSSO, N.F. *Cryptosporidium parvum* is cytopathic for cultured human biliary epithelia via an apoptotic mechanism. **Hepatology**, v.28, n.4, p.906-913, 1998.

CHIEFFI, P.P.; PASCHOALOTTI, M.A.; VERGUEIRO, C.S.; CHIATTONE, C.S. Infection by *Cryptosporidium* sp. immunocompromised haematological patients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.47, n.5, p.301-302, 2005.

CIPOLLARI, P.M.; SELIGER, S.M.P.A.; CONDE, R.L.A.; SOARES, V.C.; RIBEIRO, M.A.C.; CASTRO, J.M. Surto de criptosporidiose em creche do distrito administrativo de vila Guilherme, zona Norte de São Paulo/SP. **Revista Saúde**, v.4, n.1, p.70, 2010.

CLANCY, J.L.; MARSHALL, M.M.; HARGY, T.; KORICH, D.G. Susceptibility of five strains of *Cryptosporidium parvum* oocysts to UV light. **Journal of the American Water Works Association**, v.96, n.3, p.84-93, 2004.

COUPE, S.; SARFATI, C.; HAMANE, S.; DEROUIN, F. Detection of *Cryptosporidium* and identification to the species level by nested PCR and restriction fragment length polymorphism. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.3, p.1017-1023, 2005.

COUTINHO, P.; ORIÁ, R.B.; VIEIRA, C.M.G.; SEVILLEJA, J.E.A.D.; WARREN, C.A.; MACIEL, J.G.; THOMPSON, M.R.; PINKERTON, R.C.; LIMA, A.A.M.; GUERRANT, R.L. *Cryptosporidium* infection causes undernutrition and, conversely, weanling undernutrition intensifies infection. **Journal of Parasitology**, v.94, n.6, 1225-1232, 2008.

D'ANTONIO, R.G.; WINN, R.E.; TAYLOR, J.P.; GUSTAFSON, T.L.; CURRENT, W.L.; RHODES, M.M.; GARY, G.W. Jr, ZAJAC, R.A. A waterborne outbreak of

cryptosporidiosis in normal hosts. **Annals of Internal Medicine**, v.103, n.6, p.886-888, 1985.

DAGCI, H.; USTON, S.; TANER, M.S. Protozoan infections and intestinal permeability. **Acta Tropica**, v.81, n.1, p.1-5, 2002.

DAWSON, D. Foodborne protozoan parasites. **International Journal of Food Microbiology**, v.103, n.2, p.207-227, 2005.

DE GRAAF, D.; VANOPDENBOSH, E.; ORTEGA-MORA, M.; ABASSI, H.; PEETERS, J.E. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. **International Journal for Parasitology**, v.29, n.8, p.1269-1287, 1999.

DEKINGER, C.M.; HARIGOPAL, P.; RUIZ, P.; DOWDY, L.M. *Cryptosporidium parvum*-associated sclerosing colangitis in a liver transplant patient. **Transplant Infectious Disease**, v.10, n.2, p.133-136, 2007.

DELAFOSSÉ, A.; CASTRO-HERMIDA, J.A.; BAUDRY, C.; ARES-MAZÁS, E.; CHARTIER, C. Herd-level risk factors for *Cryptosporidium* infection in dairy-goat kids in western France. **Preventive veterinary Medicine**, v.77, n.1, p.109-121, 2006.

DELGADO, E.; FONSECA, I.P.; FAZENDEIRO, M.I.; MATOS, O.; ANTUNES, F.; CUNHA, M.B. Estudo preliminary da criptosporidiose em ruminantes silváticos do jardim zoológico de Lisboa. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.98, n.545, p.39-42, 2003.

DE SOUZA, P.X. **Nova abordagem laboratorial na investigação das enteroparasitoses em humanos**. 2005. Dissertação. Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro.

DÍAZ, P.; QUÍLEZ, J.; ROBINSON, G.; CHALMERS, R.M.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P. Identification of *Cryptosporidium xiaoi* in diarrhoeic goat kids (*Capra hircus*) in Spain. **Veterinary Parasitology**, v.172, n.1, p.132-134, 2010.

DÍAS, G.M.F.; BEVILACQUA, P.D.; BASTOS, R.K.X.; OLIVEIRA, A.A.; CAMPOS, G.M.M. *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em água de manancial superficial de abastecimento contaminada por dejetos humano e animal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.6, p.1291-1300, 2008.

DIXON, B.B. The prevalence and control of foodborne protozoan parasites. In: Blais, B.W. (ed.) **Current Challenges in Food Microbiology**. Research Signpost, Kerala, India, pp.31-76, 2003.

DUPONT, H.L.; CHAPPELL, C.L.; STERLING, C.R. OKHUYSEN, P.C.; ROSE, J.B.; JAKUBOWSKI, W. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. **The New England Journal of Medicine**, v.332, n.13, p.855-859, 1995.

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

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

ELLIOT, A.; MORGAN, U. M.; THOMPSON, A. 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.139-142, 1999.

ELLIOT, B.C.; WISNEWSKI, A.V.; JOHNSON, J.; FENWICK-SMITH, D.; WIEST, P.; HAMER, D.; KRESINA, T.; FLANIGAN, T.P. In vitro inhibition of *Cryptosporidium parvum* infection by human monoclonal antibodies. **Infection and Immunity**, v.65, n.9, p. 3933-3935, 1997.

ERMAN, N.; BEYAZIT, A.; ÖZ, I. The prevalence of cryptosporidiosis in lambs and goat kids in Izmir province. **Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi**, v.25, n.39, p.33-38, 2000.

EYGED, Z.; SRÉTER, T.; SZÉLL, Z.; VARGA, I. Characterization of *Cryptosporidium* spp. – recent developments and future needs. **Veterinary Parasitology**, v.111, n.2, p.103-114, 2003.

FAO. Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. FAOSTAT – FAO [2009] Statistics Division/ProdSTAT: livestock (primary and processed). Disponível em:

<http://www.fao.org/fileadmin/templates/ess/documents/publications_studies/statistical_yearbook/FAO_statistical_yearbook_2007-2008/b10.xls> Acesso em: 12 dez. 2010.

FAUST, E. C.; D'ANTONI, J.S.; ODOM, V.; MILLER, M.J.; PERES, C.; SAWITZ, W.; THOMEN, L.F.; TOBIE, J.; WALKER, H. et al. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces: I. preliminary communication. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 18, n. 2, p. 169-183, 1938.

FAYER, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Experimental Parasitology**, v.124, n.1, p.90-97, 2010.

FAYER, R.; SANTÍN, M.; MACARISIN, D. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. **Veterinary Parasitology**, v.172, n.1, p.23-32, 2010.

FAYER, R. General biology. In: FAYER, R.; XIAO, L. ***Cryptosporidium and cryptosporidiosis***, Boca Raton: CRC, 2008. p.1-42.

FAYER, R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. **Veterinary Parasitology**, v.126, n.1, p.37-56, 2004.

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.; GUIDRY, A.; BLAGBURN, B.L. Immunotherapeutic efficacy of bovine colostral immunoglobulin from a hyperimmunized cow against cryptosporidiosis in neonatal mice. **Infection and Immunity**, v.58, n.9, p.2962, 1990

FAYER, R.; ANDREWS, C.; UNGAR B.L, BLAGBURN B. Efficacy of hyperimmune bovine colostrum for prophylaxis of cryptosporidiosis in neonatal calves. **The Journal of Parasitology**, v.75, n.3, p.393-397, 1989a.

FAYER, R., PERRYMAN, L.E.; RIGGS, M.W. Hyperimmune bovine colostrums neutralizes *Cryptosporidium* sporozoites and protects mice against oocyst challenge. **The Journal of Parasitology**, v.75, n.1, p.151–3, 1989b.

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

FEITOSA, F.L.F.; SHIMAMURA, G.M.; ROBERTO, T.; MENDES, L.C.N.; PEIRÓ, J.R.; FERES, F.C.; BOVINO, F.; PERRI, S.H.V.; MEIRELES, M.V. Importância de *Cryptosporidium* spp. como causa de diarreia em, bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.10, p.452-456, 2008.

FENG, Y. *Cryptosporidium* in wild placental mammals. **Experimental Parasitology**, v.124, n.1, p.128-137, 2010.

FENG, Y.; ALDERISIO, K.A.; YANG, W.; BLANCERO, L.A.; KUHNE, W.G.; NADARESKI, C.A.; REID, M.; XIAO, L. *Cryptosporidium* genotypes in wildlife from a New York watershed. **Applied Environmental Microbiology**, v.73, n.20, p.6475-6483, 2007.

FENG, X.; RICH, S.M.; AKIYOSHI, D.; TUMWINE, J.K.; KEKITIINWA, A.; NABUKEERA, N.; TZIPORI, S.; WIDMER, G. Extensive polymorphism in *Cryptosporidium parvum* identified by multilocus microsatellite analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.8, p.3344-3349, 2000.

FERRE, I.; BENITO-PEÑA, A.; GARCÍA, U.; OSORO, K.; ORTEGA-MORA, L.M. Effect of different decoquinate treatments on cryptosporidiosis in naturally infected cashmere goat kids. **Veterinary Record**, v.157, n.9, p.261-262, 2005.

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

FRANCO, R.M.B. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em saúde pública. **Revista Panamericana de Infectologia**, v.9, n.4, p.36-43, 2007.

GARRIDO, L.E.M. ***Cryptosporidium parvum*: patógeno emergente de veiculação hídrica: desafios metodológicos de detecção ambiental**. 2005. Dissertação Mestrado - FIOCRUZ/ENSP, Rio de Janeiro.

GATEI, W.; BARRET, D.; LINDO, J.F.; ELDEMIRE-SHEARER, D.; CAMA, V.; XIAO, L. Unique *Cryptosporidium* population in HIV-infected persons, Jamaica. **Journal of Emerging infectious diseases**. v.14, n.5, p.841-843, 2008.

GATEI, W.; ASHFORD, R.W.; BEECHING, N.J.; KAMWATI, S.K.; GREENSILL, J.; HART, C.A. *Cryptosporidium muris* infection in HIV-infected adult, Kenya. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.2, p.204-206, 2002.

GEURDEN, T.; THOMAS, P.; CASAERT, S.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOU, E. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in lambs and goat kids in Belgium. **Veterinary Parasitology**, v.155, n.1, p.142-145, 2008.

GILES, M.; CHALMERS, R.M.; PRICHARD, G.; ELWIN, K.; MUELLER-DOBLIES, D.; CLIFTON-HADLEY, F.A. *Cryptosporidium hominis* in a goat and sheep in the UK. **Veterinary Record**, v.164, n.1, p.24-25, 2009.

GOLDSTEIN, S.T.; JURANEK, D.D.; RAVENHOLT, O.; HIGHTOWER, A.W.; MARTIN, D.G.; MESNIK, J.L.; GRIFFITHS, S.D.; BRYANT, A.J.; REICH, R.R.; HERWALDT, B.L. Cryptosporidiosis: an outbreak associated with drinking water despite state-of-the-art water treatment. **Annals of Internal Medicine**, v.124, N.5, p.459-468, 1996.

GRINBERG, A.; LEARMONTH, J.; KWAN, E.; POMROY, W.; LOPEZ VILLALOBOS, N.; GIBSON, N.; WIDMER, G. Genetic diversity and zoonotic potential of *Cryptosporidium parvum* causing foal diarrhoea. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.7, p.2396-2398, 2008.

GUYOT, K.; FOLLET-DUMOULIN, A.; LELIÈVRE, E.; SARFATI, C.; RABODONIRINA, M.; NEVEZ, G.; CAILLIEZ, J.C.; CAMUS, D.; DEI-CAS, E. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.10, p. 3472-3480, 2001.

ELWIN, K.; ROONEY, P.J.; MILLAR, B.C.; DOOLEY, J.S.G.; LAL, A.A.; XIAO, L. Three drinking-water-associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. **Emerging Infectious Diseases**. v.8, n.6, p.631-633, 2002.

EL-SHERBINI, G.T.; MOHAMMAD, K.A. Zoonotic cryptosporidiosis in man and animal in farms, Giza Governorate, Egypt. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v.36, n.2, p.49-58, 2006.

GLAESER, C.; GRIMM, F.; MATHIS, A.; WEBER, R.; NADAL, D.; DEPLAZES., P. Detection and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. Isolated from diarrheic children in Switzerland. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v.23, n.4, p.359-361, 2004.

GOMA, F.Y.; GEURDEN, T.; SIWILA, J.; PHIRI, I.G.K.; GABRIEL, S.; CLAEREBOU, E.; VERCRUYSSSE, J. The prevalence and molecular characterization of

Cryptosporidium spp. in small ruminants in Zambia. **Small Ruminants Research**, v.72, n.1, p.77-80, 2007.

GONÇALVES, E.M.N.; ARAÚJO, R.S.; ORBAN, M.; MATTÉ, G.R.; CORBETT, C.E.P. Protocol form DNA extraction of *Cryptosporidium* spp. oocysts in fecal samples. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.50, n.3, p.165-167, 2008.

GRACZYK, T.K.; EVANS, B.M.; ZIF, C.J.; KARREMAN, H.J.; PATZ, J.A. Environmental and geographical factors contributing to watershed contamination with *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Environmental Research**, v.82, n.3, p.263-271, 2000.

GUK, S.M.; YONG, T.S.; PARK, S.J.; PARK, J.H.; CHAI, J.Y. Genotype and animal infectivity of a human isolate of *Cryptosporidium parvum* in the Republic of Korea. **The Korean Journal of Parasitology**, v.42, n.8, p.85-89, 2004.

GREENBERG, P.D.; CELLO, J.P. Treatment of severe diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum* with oral bovine immunoglobulin concentrate in patients with AIDS. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, v.13, n.4, p.348-54, 1996.

GUPTA, S.; NARANG, S.; NUNAVATH, V.; SINGH, S. Chronic diarrhea in HIV patients: prevalence of coccidian parasites. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v.26, n.2, p.172-175, 2008.

HAJDUŠEK, O.; DITRICH, O.; ŠLAPETA, J. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. **Veterinary Parasitology**, v.122, n.3, p.183-192, 2004.

HANSEN, J.S.; ONGERTH, J.E. Effects of time and watershed characteristics on the concentration of *Cryptosporidium* oocysts in river water. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.2790-2795, 1991.

HARGY, T.M.; CLANCY, J.L.; LANDRY, L.P. **Control of *Cryptosporidium* and *Giardia* in surface water by disinfection**. CAB International. p.158-178, 2009.

HELLARD, M.E.; SINCLAIR, M.I.; FAIRLEY, C.K.; ANDREWS, R.M.; BAILEY, M.; BLACK, J.; DHARMAGE, S.C.; KIRK, M.D. An outbreak of cryptosporidiosis in an urban swimming pool: why are such outbreaks difficult to detect?. **Australian and New Zealand Journal of Public Health**, v.24, n.3, p.272-275, 2000.

HELLER, L.; BASTOS, R.K.X.; VIEIRA, M.B.C.M.; BEVILACQUA, P.D.; BRITO, L.L.A.; MOTA, S.M.M.; OLIVEIRA, A.A.; MACHADO, P.M.; SALVADOR, D.P.; CARODSO, A.B. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.13, n.2, p.79-92, 2004.

HIJJAWI, N.S.; BOXELL, A.C.; THOMPSON, R.C.A. **Recent advances in the developmental biology and life cycle of *Cryptosporidium***. CAB International, p.255-265, 2009.

HIJJAWI, N.S.; MELONI, B.P.; Ng'ANZO, M.; RYAN, U.M.; OLSON, M.E.; COX, P.T.; MONIS, P.T.; THOMPSON, R.C.A. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. **International Journal for Parasitology**. v.34, n.7, p.769-777, 2004.

HOUP, E.R.; BUSHEN, O.Y.; SAM, N.E.; KOHLI, A.; ASGHARPOUR, A.; NG, C.T.; CLAFEE, D.P.; GUERRANT, R.L.; MARO, V.; OLE-NGUYAINE, S.; SHAO, J.F. Short report: asymptomatic *Cryptosporidium hominis* infection among human immunodeficiency virus-infected patients in Tanzania. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.73, n.3, p.520-522, 2005.

HUANG, D.B.; WHITE, A.C. An update review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Gastroenterology Clinics of North America**. v.35, n.2, p.291-314, 2006.

HUBER, F. et al. Genotypic characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.150, n.1, p.65-74, 2007.

HUBER, F.; BOMFIM, T.C.B.; GOMES, R.S. Comparison between natural infection by *Cryptosporidium* sp., *Giardia* sp. in dogs in two living situations in the West Zone of the municipality of Rio de Janeiro. **Veterinary Parasitology**, v.130, n.1, p.69-72, 2005.

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

HUNTER, P.R. Geographic linkage and variation in *Cryptosporidium hominis*. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, n.3, p.496-498, 2008.

HUNTER, P.R.; NICHOLS, G. Epidemiological and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. **Clinical Microbiology Reviews**. v.15, n.1, p.145-154, 2002.

IMHASLY, A.; FREY, C.F.; MATHIS, A.; STRAUB, R.; GERBER, V. Cryptosporidiose (*C. parvum*) in a foal with diarrhea. **Sweizer Archive fur Tierheilkunde**, v.151, n.1, p.21-26, 2009.

JENKINS, M.C.; O'BRIEN, C.; TROUT, J.; GUIDRY, A.; FAYER, R. Hyperimmune bovine colostrum specific for recombinant *Cryptosporidium parvum* antigen confers partial protection against cryptosporidiosis in immunosuppressed adult mice. **Vaccine**, v.17, n.19, p. 2453-2460, 1999.

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, n.4, p.304-317, 2008.

JOHNSON, J.K.; SCHMIDT, J.; GELBERG, H.B.; KUHLENSCHMIDT, M.S. Microbial adhesion of *Cryptosporidium parvum* sporozoites: purification of an inhibitory lipid from bovine mucosa. **The Journal of Parasitology**, v.90, n.5, p.980-990, 2004.

JOHNSON, E.H.; WINDSOR, J.J.; MUIRHEAD, D.E.; KING, G.J.; AL-BUSAIDY, R. Confirmation of prophylactic value of paramomycin in a natural outbreak of caprine cryptosporidiosis. **Veterinary Research Communications**, v.24, n.1, p.63-67, 2000.

JOHNSON, E.H.; MUIRHEAD, D.E.; WINDSOR, J.J.; KING, G.J.; AL-BUSAIDY, R.; CORNELIUS, R. Atypical outbreak of caprine cryptosporidiosis in the Sultanate of Oman. **The Veterinary Record**, v.145, n.18, p.521–524, 1999.

JOCE, R.E.; BRUCE, J.; KIELY, D.; NOAH, N.D.; DEMPSTER, W.B.; STALKER, R.; GUMSLEY, P.; CHAPMAN, P.A.; NORMAN, P.; WATKINS, J. An outbreak of cryptosporidiosis associated with a swimming pool. **Epidemiology and Infection**, v.107, n.3, p.497-508, 1991.

KADAPPU, K.K., NAGARAJA, M.V., RAO, P.V., SHASTRY, B.A. Azithromycin as treatment for cryptosporidiosis in human immunodeficiency virus disease. **Journal of Postgraduate Medicine**, v.48, n.3, p.179-181, 2002.

KALANI, R.T.; WENMAN, W.M. Geographical variation in 18S rRNA gene sequence of *Cryptosporidium parvum*. **International Journal for Parasitology**, v.24, n.2, p.303-306, 1994.

KANJO, Y.; KIMATA, I.; MIYANAGA, S.; OKADA, H.; BANNO, C.; MATSUMOTO, M.; SHIMADA, Y. Inactivation of *Cryptosporidium* spp. oocysts with ozone and ultraviolet irradiation evaluated by in vitro excystation and animal infectivity. **Water Science and Technology**, v.41, n.7, p.119-125, 2000.

KARANIS, P.; PLUTZER, J.; HALIM, N.A.; IGORI, K.; NAGASAWA, H.; ONGERTH, J.; LIQING, M. Molecular characterization of *Cryptosporidium* from animal sources in Qinghai province of China. **Parasitology Research**, v.101, n.6, p.1575-1580, 2007.

KHAN, S.M.; DEBNATH, C.; PRAMANIK, A.K.; XIAO, L.; NOZAKI, T.; GANGULY, S. Molecular characterization and assessment of zoonotic transmission of *Cryptosporidium* from dairy cattle in West Bengal, India. **Veterinary Parasitology**, v.171, n.1, p.41-47, 2010.

KIANG, K.M.; SCHEFTEL, J.M.; LEANO, F.T.; TAYLOR, C.M.; BELLE-ISLE, P.A.; CEBELINSKI, E.A.; DANILA, R.; SMITH, K.E. Recurrent outbreaks of cryptosporidiosis associated with calves among students at an educational farm programme, Minnesota, 2003. **Epidemiology and Infection**, v.134, n.4, p.878–886, 2006.

KING, B.J.; HOEFEL, D.; DAMINATO, D.P.; FANOK, S.; MONIS, P.T. Solar UV reduces *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in environmental waters. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, n.5, p.1311-1323, 2008.

KING, B.J.; KEEGAN, A.R.; MONIS, P.T.; SAINT, C.P. Environmental temperatures controls *Cryptosporidium* oocyst metabolic rate and associated retention of infectivity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.7, p.3848-3857, 2005.

KORICH, D.G.; MEAD, J.R.; MADORE, M.S.; SINCLAIR, N.A.; STERLING, C.R.; Chlorine and ozone inactivation of *Cryptosporidium* oocysts. In: Proceedings Water Quality Technology Conference, 1989. Philadelphia. **Anais...** Denver CO: American Water Works Association, 1989, p.681-693.

KORTBEEK, L.M. **Clinical presentation in *Cryptosporidium*-infected patients**. CAB International, p.131, 2009.

KOUDELA, B.; JIRÍ, V. Experimental cryptosporidiosis in kids. **Veterinary Parasitology**, v.71, n.4, p.273–281, 1997.

LAKE, I.R.; NICHOLS, G.; HARRISON, F.C.D.; BENTHAN, G.; KOVATS, R.S.; GRUNDY, C.; HUNTER, P.R. Using infectious intestinal disease surveillance data to explore illness aetiology; a cryptosporidiosis case study. **Health & Place**, v.15, n.1, p.333-339, 2009.

LAUGHON, B.E.; DRUCKMAN, D.A.; VERNON, A.; QUINN, T.C.; POLK, B.F.; MODIN, J.F.; YOLKEN, R.H.; BARTTET, J.G. Prevalence of enteric pathogens in homosexual men with and without acquired immunodeficiency syndrome. **Gastroenterology**, v.94, n.4, p. 984-93, 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, n.7, p.3973-3978, 2004.

LEAV, B.A.; MACKAY, M.; WARD, H.D. *Cryptosporidium* species: new insights and old challenges. **Clinical Infectious Diseases**, v.36, n.7, p.903-908, 2003.

LEE, S. H.; LEVY, D. A.; CRAUN, G. F.; BEACH, M. J.; CALDERON, R.L. Surveillance for waterborne-disease outbreaks – United States, 1999-2000. **Morbidity and Mortality Weekly Report: MWR Surveillance Summaries**, v.51, n.8, p.1-47, 2002.

LELAND, D.; MCANULTY, J.; KEENE, W.; STEVENS, G. A cryptosporidiosis outbreak in a filtered water supply. **Journal of the American Water Works Association**, v.85, p.34-42, 1993.

LLORENTE, M.T.; CLAVEL, A.; GOÑI, M.P.; VAREA, M.; SERAL, C.; BECERRIL, R.; SUAREZ, L.; GÓMES-LUS, R. **Parasitology International**, v.56, n.3, p.201-205, 2007.

LEMETEIL, D.; ROUSSEL, F.; FAVENNEC, L.; BALLEST, J.J.; BRASSEUR, P. Assesment of candidate experimental anticryptosporidial agents in an immunossupressed rat model. **Journal of Infectious Diseases**, v.167, p.766-769, 1993.

LEVINE, N.D. Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. **The Journal of Parasitology**, v.66, n.5, p.830–834, 1980.

LEVINE, N.D. Pylum II: Apicomplexa Levine (1970). In LEE, J.J.; HUNTER, S.H.; BOVEE, E.C. (Eds) Illustrated Guide to the Protozoa. **Society of Parasitologists**, Laerence, KS, p.322-374, 1985.

LISLE, J.T.; ROSE, J.B. *Cryptosporidium* contamination of water in the USA and UK: a mini-review. **Journal of Water Supply Research and Technology**, v.44, n.33, p.103-110, 1995.

LIM, Y.; ROHELA, M.; SIM, B.L.H.; JAMAIAH, I.; NURBAYAH, M. Prevalence of cryptosporidiosis in HIV-infected patients in Kajang Hospital, Selangor. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**. v.36, n.4, p.30-33, 2005.

LINDSAY, D.S.; UPTON, S.J.; OWENS, D.S.; MORGAN, U.M.; MEAD, J.R.; BLAGBURN, D.L. *Cryptosporidium andersoni* n.sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos Taurus*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**. v.47, n.1, p.91-95, 2000.

LLAMAS TRUJILLO, R.; ILLESCAS GÓMEZ, P.; ARDPY DEL HOYO, L.; LLAMAS CRUZ, A. Criptosporidiosis en ovinos y caprinos en la provincia de Granada. **Anales de la real Academia de Ciências Veterinárias de Andalucía Oriental**, v.7, p.255-263, 1994.

LUNA, S.; REYES, L.; CHINCHILLA, M.; CATARINELLA, G. Presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en aguas superficiales en Costa Rica. **Parasitologia Latinoamericana**, v.57, n.1, p.63-65, 2002.

McNABB, S.J.N.; HENZEL, D.M.; WELCH, D.F.; HEIJBEL, H.; McKEE, G.L.; ISTRE, G.R. Comparison of sedimentation and flotation techniques for identification of *Cryptosporidium* sp. oocysts in a large outbreak of human diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v.22, n.4, p.587-589, 1985.

MACKENZIE, W.R.; KAZMIERCZAK, J.J.; DAVIS, J.P.. An outbreak of cryptosporidiosis associated with a resort swimming pool. **Epidemiology and Infection**, v.115, n.3, p.545-553, 1995.

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. 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.

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

MANCASSOLA, R.; RICHARD, A.; NACIRI, M. Evaluation of decoquinate to treat experimental cryptosporidiosis in kids. **Veterinary Parasitology**, v.69, n.1, p.31-37, 1997.

MANCASSOLA, R.; RÉPÉRANT, J.M.; NACIRI, M.; CHARTIER, C. Chemoprophylaxis of *Cryptosporidium parvum* infection with paromomycin in kids and immunological study. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, n.1, p.75-78, 1995.

MARIOTTE, D.; COMBY, E.; BRASSEUR, P.; BALLEST, J.J. Kinetics of spleen and Peyer's patch lymphocyte population during gut parasite cleaning in *Cryptosporidium parvum* infected suckling mice. **Parasite Immunology**, v.26, p.1-6, 2004.

MARTINS-VIEIRA, BRITO, L.A.L.; HELLER, L. Oocistos de *Cryptosporidium parvum* em fezes de bezerro infectado experimentalmente. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.6, p.1454-1458, 2009.

MASON, R.W.; HARTLEY, W.J.; TILT, L. Intestinal cryptosporidiosis in a kid goat. **The Journal of the Australian Veterinary Association**, v.57, n.8, p.386-388, 1981.

MATOS, O.; ALVES, M.; XIAO, L.; CAMA, V.; ANTUNES, F. *Cryptosporidium felis* and *C. meleagridis* in persons with HIV, Portugal. **Emerging Infectious Disease**, v.10, n.2, p.2256–7, 2004.

MATOS-FERNÁNDEZ, M.J.; PEIRERA-BUENO, J.; ORTEGA-MORA, L.M.; PILAR-IZQUIERDO, M.; FERRE, I.; ROJO-VAZQUEZ, F.A. Prevalencia de la infección por *Cryptosporidium parvum* en corderos, cabritos y terneros en la provincial de L´eon. **Acta Parasite Portuguesa**, v.1, n.1, p.211, 1993.

MEIRELES, M.V. *Cryptosporidium* infection in Brazil: implication for veterinary medicine and public health. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, n.4, p.197-204, 2010.

MEIRELES, M.V.; SOARES, R.M.; BONELLO, F.; GENNARI, S.M. Natural infection with zoonotic subtype of *Cryptosporidium parvum* in *Capybara (Hydrochoerus hydrochaeris)* from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.147, n.1, p.166-170, 2007.

MEISEL, J.L.; PERERA, D.R.; MELIGRO, C.; RUBIN, C.E. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. **Gastroenterology**, v.70, n.6, p.1156, 1976.

MERCADO, R.; BUCK, G.A.; MANQUE, P.A.; OZAKI, LS. *Cryptosporidium hominis* infection of the human respiratory tract. **Emerging Infectious Diseases**, v.33, n.3, p.462-464, 2007.

MILLER, W.A.; ATWILL, E.R.; GARDNER, I.; MILLER, M.; FRITZ, H.; HEDRICK, R.; MELLI, A.; BARNES, N.; CONRAD, P.A. Clams (*Corbicula fluminea*) as bioindicators of fecal contamination with *Cryptosporidium* and *Giardia* in freshwater ecosystems of California. **International Journal for Parasitology**, v.35, n.6, p.673-684, 2005.

MONIS, P.T.; THOMPSON, R.C. *Cryptosporidium* and *Giardia* zoonoses: fact or fiction?. **Infection Genetics and Evolution**, v.3, n.4, p.233-44, 2003.

MONIS, P.T.; SAINT, C.P. Development of Nested-PCR assay for the detection of *Cryptosporidium parvum* in finished water. **Water Research**, v.35, n.7, p.1641-1648, 2001.

MOSS, D.M.; MONTGOMERY, J.M.; NEWLAND, S.V.; PRIEST, J.W.; LAMMIE, P.J. Detection of *Cryptosporidium* antibodies in sera and oral fluids using multiplex bead assay. **The Journal of Parasitology**, v.90, n.2, p.397-404, 2004.

MULLER, S.; LORY, J.; CORAZZA, N.; GRIFFITHS, G.M.; Z'GRAGGEN, K.; MAZZUCHELLI, L.; KAPPELER, A.; MUELLER, C. Activated CD4 and CD8 cytotoxic cells are present in increased numbers in the intestinal mucosa from patients with active inflammatory bowel disease. **American Journal of Pathology**, v.152, n.1, p.261-268, 1998.

MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M.; ALVAREZ M, LANZA I.; CARMENES, P. Role of enteric pathogens in the aethiology of neonatal diarrhoea in lambs and goat kids in Spain. **Epidemiology and Infection**, v.117, p.203-211, 1996.

HOXIE, N.J.; DAVIS, J.P.; VERGERONT, J.M.; NASHOLD, R.D.; BLAIR, K.A. Cryptosporidiosis-Associated Mortality Following a Massive Waterborne Outbreak in Milwaukee, Wisconsin. **American Journal of Public Health**, v.87, n.12, p.2032-2035, 1997.

NAVIN, T.R.; JURANEK, D.D. Cryptosporidiosis: clinical, epidemiologic, and parasitologic review. **Reviews of infectious diseases**. v.6, n.3, p.313-327, 1984.

NIKAEEN, M.; MESDAGHINIA, A.R.; JEDDI TEHRANI, M.; REZAEIAN, M.; MAKIMURA, K. A Nested-PCR assay for detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water samples. **Iranian Journal of Public Health**, v.34, n.1, p.13-18, 2005.

NIME, F.A.; BURCK, 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.592-8, 1976.

NOORDEEN, F.; HORADAGODA, N.U.; FAIZAL, A.C.M.; RAJAPAKSE, R.P.V.J.; RAZAK, M.A.A.; ARULKANTHAN, A. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* isolated from asymptomatic adult goats to mice and goat kids. **Veterinary Parasitology**, v.103, n.3, p.217-225, 2002.

NOORDEN, F.; FAIZAL, A.C.M.; RAJAPAKSE, R.P.V.J.; HORADAGODA, N.U.; ARULKANTHAN, A. Excretion of *Cryptosporidium* oocysts by goats in relation to age and season in the dry zone of Sri Lanka. **Veterinary Parasitology**, v.99, n.1, p.79-85, 2001.

NOORDEN, F.; RAJAPAKSE, R.P.V.J.; FAIZAL, A.C.M.; HORADAGODA, N.U.; ARULKANTHAN, A. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in goats in selected locations in three agroclimatic zones of Sri Lanka. **Veterinary Parasitology**, v.93, n.2, p.95-101, 2000.

NYDAM, D.V.; LINDERGARD, G.; SANTUCCI, F.; SCHAAF, S.L.; WADE, S.E.; MOHAMMED, H.O. Risk of infection with *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* in dairy cattle in the New York City watershed. **American Journal of Veterinary Research**, v.66, n.3, p.97-105.2005

- O'BRIEN, E.; MCINNES, L.; RYAN, U. *Cryptosporidium* GP60 genotypes from humans and domesticated animals in Austrália, North América and Europe. **Experimental Parasitology**, v.118, n.1, p.118-121, 2008
- O'DONOGHUE, P.J. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis in man and animals, **International Journal for Parasitology**, v. 25, n.2, p.139-195, 1995.
- O'HANDLEY, R.M.; OLSON, M.E. Giardiasis and cryptosporidiosis in ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.22, n.3, p.623-643, 2006.
- OJCIUS, J.D.M.; PERFETTINI, J.L.; BONNIN, A.; LAURENT, F. Caspase dependent apoptosis during infection with *Cryptosporidium parvum*. **Microbes and Infection**, v.1, n.14, p.1163-1168, 1999.
- OLIVEIRA SILVA, M.B. Caracterização genética de *Cryptosporidium parvum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, n.1, p.20-22, 2004.
- OLSON, M.E.; O'HANDLEY, R.M.; RALSTON, B.J.; MCALLISTER, T.A.; THOMPSON, R.C.A. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. **Trends in Parasitology**, v.20, n.4, p.185-191, 2004.
- PALMER, C.S.; TRAUB, R.J.; ROBERTSON, I.D.; DEVLIN, G.; REES, R.; ANDREW, R.C. Determining the zoonotic significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Australian dogs and cats. **Veterinary Parasitology**, v.154, n.1, p.142-147, 2008.
- PAVILOVIĆ, I.; IVANOVIĆ, S.; ŽUJOVIĆ, M.; TOMIĆ, Z. Goat cryptosporidiosis and its importance at goat production pathology. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v.26, n.3, p.187-192, 2010.
- PARK, J.H.; GUK, S.M.; HAN, E.T.; SHIN, E.H.; KIM, J.L.; CHAI, J.Y. Genotype analysis of *Cryptosporidium* spp. prevalent in a rural village in Hwasun-gun, Republic of Korea. **Korean Journal of Parasitology**. v.44, n.1, p.27-33, 2006.
- PEETERS, J.E.; MAZÁS, E.A.; MASSCHELEIN, W.J.; MARTINEZ DE MATURAMA, I.V.; DEBACKER, E. Effect of disinfection of drinkin water with ozone or chlorine dioxide on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, n.6, p.1519-1522, 1989.
- PENG, M.M.; WILSON, M.L.; HOLLAND, R.E.; MESHNICK, S.R.; LAL, A.A.; XIAO, L.

Genetic diversity of *Cryptosporidium* in cattle in Michigan: implications for understanding the transmission dynamics. **Parasitology Research**, v.90, n.3, p.175-180, 2003.

PEREIRA, J.T. **Métodos de desinfecção em água contendo *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) e sua detecção por técnica de biologia molecular**. 2007. 104f. Dissertação (Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

PERIN, N.M.; PIRES, M.M.S.; NASSAR, S.M. Absorção intestinal de D-Xilose em crianças infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana⁺. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.38, n.4, p.261-268, 2001.

PERRYMAN, L.E.; RIGGS, M.W.; MASON, P.H.; FAYER, R. Kinetics of *Cryptosporidium parvum* sporozoite naturalization by monoclonal antibodies, immune bovine serum, and immune bovine colostrum. **Infection and Immunology**, v.58, n.1, p.257-259, 1990.

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

PUTIGNANI, L.; SANDERSON, S.J.; RUSSO, C.; KISSINGER, J.; MENICHELLA, D.; WASTLING, J.M. **Proteomic and genomic approaches to understanding the “power plant” of *Cryptosporidium***. CAB international, 345-346 p, 2009.

QUÍLEZ, J.; TORRES, E.; CHALMERS, R.M.; HADFIELD, S.J.; del CACHO, E.; SÁNCHEZ-ACEDO, C. Genotype and subtype characterization of *Cryptosporidium* in lambs and goat kids in Spain. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, n.19, p.6026-6031, 2008.

QUÍLEZ, J.; ACEDO, C.S.; CACHO, E. Criptosporidioses de los pequenos ruminantes. **Pequenos Ruminantes**, v.4, n.2, p.1-20, 2003.

RAMBOZZI, L.; MENZANO, A.; MANNELLI, A.; ROMANO, S. 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.

RIDER Jr., S.D.; ZHU, G. *Cryptosporidium*: genomic and biochemical features. **Experimental Parasitology**, v.124, n.1, p.2-9, 2010.

RIET-CORREA, F.; TABOSA, I.V.; VASCONCELOS, J.S.; MEDEIROS, J.M. Síndrome do cabrito mole ("Floopy Kid"). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, n.2, p.111-113, 2004.

ROBERTSON, L.J. *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in sheep and goats: a review of the potential for transmission to humans via environmental contamination. **Epidemiology and Infection**, v.137, n.7, p.913-921, 2009.

ROBERTSON, L.J.; GJERDE, B.K. *Cryptosporidium* oocysts: challenging adversaries? **Trends in Parasitology**, v.23, n.8, p.344-347, 2007

ROBERTSON, L.J.; PATON, C.A.; CAMPBELL, A.T.; SMITH, P.G.; JACKSON, M.H.; GILMOUR, R.A.; BLACK, S.E.; STEVENSON, D.A.; SMITH, H.V. et al. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts at sewage treatment works in Scotland, UK. **Water Research**, v.34, n.8, p.2310-2322, 2000.

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.

ROSALES, M.J.; PEREZ-CORDON, G.; SANCHEZ-MORENO, M.; MARIN-SANCHEZ, C.; MASCARO, C. Extracellular like-gregarine stages of *Cryptosporidium parvum*. **Acta Tropica**. v.95, n.1, p.74-78, 2005.

ROSE, J.B.; LISLE, J.T.; LECHEVALLIER, M.W. (1997). **Waterborne cryptosporidiosis: incidence, outbreaks and treatment strategies**. In: Fayer R (ed). *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press, Boca Raton, USA. pp. 93-110.

ROSE, J.B. **Ocurrence and control of *Cryptosporidium* in drinking water**. In: *Drinking Water Microbiology*. New York: SpringerVerlag, p.294-321, 1990.

ROSE, J. B. Occurence and significance of *Cryptosporidium* in Water, **Journal American Water Works Association**, v.80, n.2, p.53, 1988.

ROSE, J.B.; CIFRINO, A.; MADORE, M.S.; GERBA, C.P.; STERLING, C.R.; ARROWOOD, M.J. Detection of *Cryptosporidium* from wastewater and freshwater environments. **Water Science and Technology**, v.18, n.10, p.233-239, 1986.

ROSSIGNOL, J.F. *Cryptosporidium* and *Giardia*: treatment options and prospects for new drugs. **Experimental Parasitology**, v.124, n.1, p.45-53, 2010.

- RYAN, U. *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. **Experimental Parasitology**, v.124, n.1, p.113-120, 2010.
- RYAN, U.M.; POWER, M.; XIAO, L. *Cryptosporidium fayeri* n.sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.55, n.1, p.22-26, 2008.
- RYAN, U.; READ, C.; HAWKINS, P.; WARNECKE, M.; SWANSON, P.; GRIFFITH, M.; DEERE, D.; CUNNINGHAM, M.; COX, P. Genotypes of *Cryptosporidium* from Sydney water catchment areas. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, n.5, p.1221-1229, 2005.
- SAMIE, A.; BESSONG, P.O.; OBI, C.L.; SEVILLEJA, J.E.A.D.; STROUP, S.; HOUP, E.; GUERRANT, R.L. *Cryptosporidium* species: preliminary descriptions of the prevalence and genotype distribution among school children and hospital patients in the Venda region, Limpopo province, South Africa. **Experimental Parasitology**, v.114, n.4, p.314-322, 2006.
- SANTÍN, M.; TROUT, J.M.; FAYER, R. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species and genotypes in sheep in Maryland. **Veterinary Parasitology**, v.146, p.17-24, 2007
- SANZ CEBALLOS, L.; IIIESCAS GOMÉZ, P.; SANZ SAMPELAYO, M.R.; GIL EXTREMERA, F.; RODRÍGUEZ OSORIO, M. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in goats maintained under semi-extensive feeding conditions in the southeast of Spain. **Parasite**, v.16, n.4, p.315-318, 2009.
- SANZ CEBALLOS, L.; IIIESCAS GOMÉZ, P.; SANZ SAMPELAYO, M.R.; GIL EXTREMERA, F.; RODRÍGUEZ OSORIO, M. Excreción de ooquistes de *Cryptosporidium* em El ganado caprino de la Provincia d Almería. **Real Academia de Ciências Veterinária de Andalucía Oriental**, v.21, n.1, p.115-123, 2008.
- 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.
- SCHNACK, F.J.; FONTANA, L.M.; BARBOSA, P.R.; DA SILVA, L.S.M.; BAILLARGEON, C.M.M.; BARICHELO, T.; PÓVOA, M.M.; CAVASINI, C.E.; MACHADO, R.L.D. Enteropatógenos associados com diarreia infantil (< 5 anos de

idade) em amostra da população da área metropolitana de Criciúma, Santa Catarina, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.19, n.4, p.1205-1208, 2003.

SCHNYDER, M.; KOHLER, L.; HEMPHILL, A.; DEPLAZES, P. Prophylactic and therapeutic efficacy of nitazoxanide against *Cryptosporidium parvum* in experimentally challenged neonatal calves. **Veterinary Parasitology**, v.160, n.1, p.149-154, 2009.

SIDDIQUI, U.; BINI, E.J.; CHANDARANA, K.; LEONG, J.; RAMSETTY, S.; SCHILIRO, D.; POLES, M. Prevalence and impact of diarrhea on health-related quality of life in HIV-infected patients in the era of highly active antiretroviral therapy. **Journal of Clinical Gastroenterology**. v.41, n.5, p.484-490, 2007.

SIWILA, J.; PHIRI, I.G.; VERCRUYSE, J.; GOMA, F.; GABRIEL, S.; CLEREBOUT, E.; GEURDEN T. Asymptomatic cryptosporidiosis in Zambian dairy farm workers and their household members. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.101, n.7, p.733-734, 2007.

SLIFKO, T.R.; SMITH, H.V.; ROSE, J.B. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. **International Journal for Parasitology**, v.30, n.12, p.1379-1393, 2000.

ŠLAPETA, J. **Centenary of genus *Cryptosporidium*: from morphological to molecular species identification**. CAB international, p.47, 2009.

SLOSS, M.W.; ZAJAC, A.N.; KEMP, R.L. **Parasitologia Clínica Veterinária**. 6 ed., São Paulo: Manole, 1999.

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.; AL-ADHAMI, B.H.; NICHOLS, R.A.B.; KUSEL, J.R.; O'GRADY, J. **Towards methods for detecting UV-induced damage in individual *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocysts by immunofluorescence microscopy**. CAB International, p.181, 2009.

SMITH, H.V. Diagnostics. In: Fayer, R.; Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidiosis of man and animals*. **CRC Press and IWA Publishing**, USA, p.173-208, 2008.

SMITH, H.V.; CACCIÒ, S.M.; TAIT, A.; McLAUHLIN, J.; THOMPSON, R.C.A. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. **Trends in Parasitology**, v.22, n.4, p.160-167, 2006.

SMITH, H.V.; ROSE, J.B. Waterborne cryptosporidiosis: current status. **Parasitology Today** v.14, n.1, p.14-22, 1998.

SMITH, H.V.; ROBERTSON, L.J.; ONGERTH, J.E. Cryptosporidiosis and giardiasis: the impact of waterborne transmission. **Journal of Water Supply: Research and Technology - Aqua**, v.44, n.6, p.258-274, 1995.

SOBA, B.; LOGAR, J. Genetic classification of *Cryptosporidium* isolates from humans and calves in Slovenia. **Parasitology**, v.135, n.11, p.1263-1270, 2008.

SOLTANE, R.; GUYOT, K.; DEI-CAS, E.; AYADI, A. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. (Eucoccidiorida: Cryptosporiidae) in seven species of farm animals in Tunisia. **Parasite**, v.14, n.4, p.335-338, 2007.

SPÓSITO-FILHA, E.; OLIVEIRA, S.M. Divulgação técnica criptosporidiose. **Biológico**, v.71, n.1, p.17-19, 2009.

STARKEY, S.R.; JOHNSON, A.L.; ZIEGLER, P.E.; MOHAMMED, H.O. An outbreak of cryptosporidiosis among alpaca crias and their human caregivers. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.231, n.10, p.1562-1567, 2007.

STRONG, W.B.; GUT, J.; NELSON, R.G. Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60-kilodalton glycoprotein and characterization of its 15-and-45 kilodalton zoite surface antigen products. **Infection and Immunity**, v.68, n.7, p.4117-4134, 2000.

STURBAUM, G.D.; JOST, B.H.; STERLING, C.R. Nucleotide changes within three *Cryptosporidium parvum* surface protein encoding genes differentiate genotype I from genotype II isolates. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.128, n.1, p.87–90, 2003.

SULAIMAN, I.M.; HIRA, P.R.; ZHOU, L.; AL-ALI, F.M.; AL-SHELAHI, F.A.; SHWEIKI, H.M.; IQBAL, J.; KHALID, N.; XIAO, L. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.6, p.2805-2809, 2005.

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, n.4, p.681-685, 1998.

- SUNDERMAN, C.A.; LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L. Evaluation of disinfectants for ability to kill avian *Cryptosporidium* oocysts. **Companion Animal Practice**, v.1, n.6, p.36-39, 1987.
- SUNNOTEL, O.; LOWERY, C.J.; MOORE, J.E.; DOOLEY, J.S.G.; XIAO, L.; MILLAR, B.C.; ROONEY, P.J.; SNELLING, W.J. Under the microscope, *Cryptosporidium*. **Letters in Applied Microbiology**, v.43, p.7-16, 2006.
- TANRIVERDI, S.; WIDMER, G. Differential evolution of repetitive sequences in *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. **Infection, Genetics and Evolution**, v.6, n.2, p.113-122, 2006.
- TEUNIS, P.F.M.; CHAPPEL, C.L.; OKHUYSEN, P.C. *Cryptosporidium* dose-response studies: variation between hosts. **Risk Analysis**, v.22, n.3, p.475-485, 1996.
- THOMPSON, R.C.A.; PALMER, C.S.; O'HANDLEY, R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. **The Veterinary Journal**, v.177, n.1, p.18-25, 2008.
- TROTZ-WILLIAMS, L.A.; MARTIN, D.S.; GATEI, W.; CAMA, V.; PEREGRINE, A.S.; MARTIN, S.W.; NYDAN, D.V.; JAMIESON, F.; XIAO, L. Genotype and subgenotype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. **Parasitology Research**, v.99, n.4, p.346-352, 2006.
- TYZZER, E.E. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. **Archiv für Protistenkunde**, v.26, p.394-412, 1912.
- 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, n.3, p.487-509, 1910.
- TYZZER, E.E. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. **Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine Association**, v.5, n.1, p.12-13, 1907.
- TZIPORI, S.; GRIFFITHS, J.K. Natural History and Biology of *Cryptosporidium parvum*. **Advances in Parasitology**, v.40, p.5-36, 1998.

- TZIPORI, S.; ANGUS, K.W.; CAMPBELL, I. Experimental infection of lambs with *Cryptosporidium* isolated from a human patient with diarrhoea. **Gut**, v.23, n.1, p.71-74, 1982.
- TZIPORI, S. Diarrhoea in goat kids attributed to *Cryptosporidium* infection. **Veterinary Record**, v.111, p.35-36, 1982.
- TZIPORI, S. Cryptosporidiosis in animals and humans. **Microbiological Reviews**, v.47, p.84-96, 1983.
- TZIPORI, S.; ANGUS, K.W.; CAMPBELL, I.; GRAY, E.W. *Cryptosporidium*: evidence for a single species genus. **Infection and Immunity**, v.30, n.3, p.884-886, 1980.
- ULÇAY, A.; GORENECK, L.; COSKUN, O.; ARAZ, E.; ACAR, A.; EYIGUM, C.P. Diagnosis of intestinal protozoa in patients with immune deficiency. **Turkiyei Parazitolojii Dergisi**, v.32, n.4, p.328-333, 2008.
- UNGAR, B.L.P.; WARD, D.J.; FAYER, R.; QUINN, C.A. Cessation of *Cryptosporidium* - associated diarrhea in an AIDS patient after treatment with hyperimmune bovine colostrum. **Gastroenterology**, v.98, n.2, p.486-489, 1990.
- VALDERRAMA, A.L.; HLAVSA, M.C.; CRONQUIST, A.; COSGROVE, S.; JOHNSTON, S.P.; ROBERTS, J.M.; STOCK, M.L.; XIAO, L.; XAVIER, K.; BEACH, M.J. Multiple risk factors associated with a large statewide increase in cryptosporidiosis. **Epidemiology and Infection**, v.137, n.12, p.1781-1788, 2009.
- VIEIRA, L.S. **Surto e criptosporidiose em caprinos lactentes**. Sobral: Embrapa Caprinos, 1999, 2 p.
- VIEIRA, L.S.; SILVA, M.B.O.; TOLENTINO, A.C.V.; LIMA, J.D.; SILVA, A.C. Outbreak of cryptosporidiosis in dairy goats in Brazil. **Veterinary Records**, v.140, n.16, p.427-428, 1997.
- VIEL, H.; ROCQUES, H.; MARTIN, J.; CHARTIER, C. Efficacy of nitazoxanide against experimental cryptosporidiosis in goat neonates. **Parasitology Research**, v.102, n.1, p.163-166, 2007.
- WARD, P.I.; DEPLAZES, P.; REGLI, W.; RINDER, H.; MATHIS, A. Detection of eight *Cryptosporidium* genotypes in surface and waste waters in Europe. **Parasitology**, v.124, n.4, p.359-368, 2002.

- WELLER, T.H. Ernest Edward Tyzzer 1875-1965. Biographical memoir. **National Academy of Sciences**, p.353-359, 1978.
- WIELINGA, P.R.; de VRIES, A.; van der GOOT, T.M.; MANK, T.; MARS, M.H.; KORTBEEK, L.M.; van der GIESSEN, J.W.B. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in human and cattle in the Netherlands. **International Journal for Parasitology**, v.38, n.7, p.809-817, 2008.
- WU, Z.; NAGANO, I.; BOONMARS, T.; NAKADA, T.; TAKAHASHI, Y. Intraspecies polymorphism of *Cryptosporidium parvum* revealed by PCR restriction fragment length polymorphism (RFLP) and RFLP single-strand conformational polymorphism analyses. **Applied Environmental Microbiology**, v.69, n.8, p.4720-4726, 2003.
- XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. **Experimental Parasitology**, v.124, n.1, p.80-89, 2010.
- XIAO, L. **Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis in development countries**. CAB International. p.58, 2009.
- XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. **International Journal for Parasitology** v.38, n.11, p.1239-1255, 2008.
- XIAO, L.; RYAN, U.M. Molecular epidemiology. In: Fayer, R.; Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. **CRC Press and IWA Publishing**, Boca Raton, FL, p.119-171, 2008.
- XIAO, L.; FENG, Y. Zoonotic cryptosporidiosis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.52, n.3, p.309-323, 2008.
- XIAO, L.; CAMA, A.V.; 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, n.6, p.2014–2016, 2007.
- XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S.J. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Critical Reviews in Microbiology**, v.17, n.1, p.72–97, 2004.
- XIAO, L.; RYAN, U.M. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. **Current opinion in Infectious Diseases**. v.17, n.5, p.483-490, 2004.

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

XIAO, L.; SULAIMAN, I.M.; RYAN, U.M.; ZHOU, L.; ATWILL, E.R.; TISCHLER, M.L.; ZHANG, X.; FAYER, R.; LAL, A.A. Host adaptation and host–parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. **International Journal for Parasitology**, v.32, n.14, p.1773-1785, 2002.

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

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, 1999.

XU, P.; WIDMER, G.; WANG, Y.; OZAKI, L.S.; ALVES, J.M.; SERRANO, M.G.; PUIU, D.; MANQUE, P.; AKIYOSHI, D.; MACKEY, A.J.; PEARSON, W.R.; DEAR, P.H.; YODER, J.S.; ROBERTS, V.; CRAUN, G.F.; HILL, V.; HICKS, L.A.; ALEXANDER, N.T.; RADKE, V.; CALDERON, R.L.; HLAUSA, M.C.; BEACH, M.J.; ROY, S.L. Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with drinking water and water not intended for drinking – United States, 2005-2006. Surveillance Summaries. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.57, p.39-69, 2008.

YODER, J.; BEACH, M.J. *Cryptosporidium* surveillance and risk factors in the United States. **Experimental Parasitology**, v.124, n.1, p.31-39, 2010.

YONG, T.S.; PARK, S.J.; PARK, J.H.; CHAL, J.Y. Genotype and animal infectivity of a human isolate of *Cryptosporidium parvum* in the Republic of Korea. **The Korean Journal of Parasitology**, v.42, n.2, p.85-89, 2004.

ZORANA, M.; SOFIJA, K.R.; Z, K. *Cryptosporidium* infection in lambs and goat kids in Serbia. **Acta Veterinaria**, v.56, n.1, p.49-54, 2006.

Capítulo 3 - Molecular Detection and Subtyping of *Cryptosporidium* spp. in Goat Kids, Calves, Lambs, Piglets and Colts in Brazil

Willian Marinho Dourado Coelho¹, Marcelo Vasconcelos Meireles², Alessandro Francisco Talamini Amarante³, Fernando Paes de Oliveira², Weslen Fabrício Pires Teixeira², Katia Denise Saraiva Bresciani²

¹ Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Univ Estadual Paulista - UNESP, Via de acesso prof. Paulo Donatto Castellani, s/n CEP: 14884-900, Jaboticabal, São Paulo, Brazil.

² Faculdade de Medicina Veterinária, Univ Estadual Paulista - UNESP, Rua Clóvis Pestana, 793 CEP: 16050-680, Araçatuba, São Paulo, Brazil.

³ Instituto de Biociências, Univ Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, CEP: 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brazil.

¹ **Corresponding author:** Via de acesso prof. Paulo Donatto Castellani, s/n CEP: 14884-900, Jaboticabal, São Paulo, Brazil. Phone number 055 (18) 37227505, email – willianmarinho@hotmail.com

Financial support: The São Paulo State Research Foundation - FAPESP

Abstract

The aim of this study was to perform the molecular detection and subtyping of *Cryptosporidium* spp. in fecal samples from goat kids, calves, lambs, piglets and colts sharing the same environment. Nested polymerase chain reaction (PCR) for amplification of fragments of the 18S rRNA gene and of the glycoprotein GP60 was carried. Positive amplification for *Cryptosporidium* spp. was obtained in 16.66% (32/192) goat kids, 6.52% (12/184) calves and 2.12% (1/47) piglet. All samples from goat kids and piglet were identified as *Cryptosporidium parvum*. Among calves, were identified *C. parvum* in 41.66% (5/12), *Cryptosporidium andersoni* in 16.66% (2/12), *Cryptosporidium ryanae* in 16.66% (2/12) and *Cryptosporidium bovis* in 25% (3/12) of the samples. The positive samples for *C. parvum* correspond exclusively with subtype IIaA15G2R1. Based on the present results, was observed that the species and subtypes of *Cryptosporidium* that are involved in enteric infections of farm animals in Brazil, especially those who share the same environment may act as sources of zoonotic infection for other animals, including humans.

Keywords: Cryptosporidiosis; *Cryptosporidium* spp.; farm animals;

Introduction

Cryptosporidium infection has been reported in several animals from different countries (Fayer, 2010), including Brazil (Meireles, 2010). This parasite is of great importance in public health (Tzipori and Widmer, 2008), acting, some animal species, as reservoirs of zoonotic subtypes of *Cryptosporidium* (Kváč et al. 2011).

The objective of this study was to detect molecularly the species and subtypes of *Cryptosporidium* present in feces of goat kids, calves, lambs, piglets and colts sharing the same environment, and check whether these animals can share the same type of infection.

Fecal samples were collected directly from the rectum of 192 goat kids, 184 calves, 44 lambs, 47 piglets and 26 colts of different breeds, males and females and under one year old, from different farms, with some of these animals sharing the same environment on the property.

The extraction of *Cryptosporidium* spp. genomic DNA was performed using a protocol described previously (Silva et al., 2010). For identification of *Cryptosporidium* species, a nested polymerase chain reaction (nPCR) was performed for amplification of the 18S subunit of the ribosomal RNA gene (18SrRNA) (Xiao et al., 2001) following sequencing of amplified fragments. Samples identified as *C. parvum* were subjected to subtyping using nPCR for amplification of the glycoprotein GP60 gene fragments (Peng et al., 2003). Ultrapure water was used as negative control and DNA of *C. galli* and *C. parvum* were used as positive control for 18SrRNA gene and GP60 gene, respectively.

Nested PCR products were purified by using the QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) and were sequenced with the ABI Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Consensus sequences were determined by using the software CodonCode Aligner v. 2.0.4® (CodonCode Corporation). Sequences were aligned with ClustalW (Thompson et al., 1997) and BioEdit sequence alignment editor software (Hall, 1999), using GenBank sequences as a reference.

Nested PCR allowed the identification of *Cryptosporidium* spp. in fecal samples of 16.66% (32/192) of goat kids, 6.52% (12/184) of calves and 2.12% (1/47) of piglets. The species and subtypes of *Cryptosporidium* identified in the animals are shown in the Table 1. All sequences reported in this study are identical to those published by Meireles et al. (2011) under the accession numbers HM622119 to HM622122.

This work is the first description of molecular identification of *C. parvum* subtypes on goat kids and piglets in Brazil. The occurrence of *C. parvum* can be reported in different farm animals, but less commonly in pigs (Xiao, 2010). Exclusively *C. parvum* subtype IIaA15G2R1 was found concomitantly in goat kids, calves and one piglet sharing the same environment, regardless of place of origin (Tab. 1). In contrast to our study, Kváč et al., (2011) detected five subtypes of *C. parvum* in calves, predominating the IIaA15G2R1 and IIaA16G1R1.

As in our work, investigators have reported in Brazil the occurrence of *C. andersoni*, *C. bovis* and *C. ryanae* in cattle (Meireles et al., 2011). Results similar to ours were obtained by Sevá et al. (2010), who did not observe the occurrence of *Cryptosporidium* in stool samples of equine and ovine.

Further studies are needed to assess the impact of infections caused by different species and subtypes of *Cryptosporidium* in production animals raised in Brazil, especially those who share the same environment and can be considered reservoirs of zoonotic subtypes of this protozoan for other animals, including the man.

References

- Fayer, R., 2010. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. Exp. Parasitol. 124, 90-97.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids Symp. Ser. 41, 95-98.
- Kváč, M., Hromadová, N., Květoňová, D., Rost, M., Sak, B., 2011. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in pre-weaned dairy calves in the Czech Republic: absence of *C. ryanae* and management-associated distribution of *C. andersoni*, *C. bovis* and *C. parvum* subtypes. Vet. Parasitol. 177, 378-382.

- Meireles, M.V., 2010. *Cryptosporidium* infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 19, 197-204.
- Meireles, M.V., Oliveira, F.P.O., Teixeira, W.F.P., Coelho, W.M.D., Mendes, L.C.N., 2011. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves from the State of São Paulo, Brazil. Parasitol. Res. DOI 10.1007/s00436-011-2336-1.
- Peng, M.M., Wilson, M.L., Holland, R.E., Meshnick, S.R., Lal, A.A., Xiao, L., 2003. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in cattle in Michigan: implications for understanding the transmission dynamics. Parasitol. Res. 90, 175-180.
- Sevá, A.P., Funada, M.R., Souza, S.O., Nava, A., Richtzenhain, L.J., Soares, R.M., 2010. 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. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 19, 249-253.
- Silva, D.C., Homem, C.G, Nakamura, A.A., Teixeira, W.F.P., Perri, S.H.V., Meireles, M.V., 2010. Physical, epidemiological, and molecular evaluation of infection by *Cryptosporidium galli* in Passeriformes. Parasitol. Res. 107, 271-277.
- Tzipori, S., Widmer, G., 2008. A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. Trends Parasitol. 24, 184-189.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 25, 4876-4882.
- Xiao, L., 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. Exp. Parasitol. 124, 80-89.

Xiao, L., Bern, C., Limor, J., Sulaiman, I., Roberts, J., Chekley, W., Cabrera, L., Gilman, R.H., Lal, A.A., 2001. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. J. Infect. Dis. 183, 492-497.

Table 1. Detection of *Cryptosporidium* spp. in fecal samples from animals sharing the same area on farm properties, in different municipalities in Brazil.

Municipality	Animal species	No. sampled	Species and subtype (No. positive)
Andradina	Goat kids	8	<i>C. parvum</i> IIaA15G2R1(4)
	Calves	21	*
	Piglets	25	<i>C. parvum</i> IIaA15G2R1 (1)
	Colts	1	*
Castilho	Goat kids	62	<i>C. parvum</i> IIaA15G2R1 (5)
	Calves	24	<i>C. bovis</i> (3)
			<i>C. parvum</i> IIaA15G2R1 (2)
			<i>C. ryanae</i> (2)
	Piglets	6	*
Cassilândia	Colts	2	*
	Goat kids	19	<i>C. parvum</i> IIaA15G2R1 (1)
	Calves	5	*
	Lambs	13	*
Ilha Solteira	Goat kids	33	<i>C. parvum</i> IIaA15G2R1 (8)
	Calves	39	*
	Lambs	7	*
	Piglets	12	*
	Colts	2	*
Itarumã	Goat kids	31	<i>C. parvum</i> IIaA15G2R1 (9)
	Calves	70	<i>C. parvum</i> IIaA15G2R1 (3)
	Lambs	7	*
	Piglets	4	*
	Colts	16	*
Iturama	Goat kids	16	<i>C. parvum</i> IIaA15G2R1 (2)
Três Lagoas	Goat kids	23	<i>C. parvum</i> IIaA15G2R1 (3)
	Calves	25	<i>C. andersoni</i> (2)
	Lambs	17	*
	Colts	5	*

* negative samples for *Cryptosporidium* spp.

Capítulo 3 - DETECÇÃO DE *Cryptosporidium* EM AMOSTRAS FECAIS DE CABRITOS, BEZERROS E LEITÕES: COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE CONCENTRAÇÃO, COLORAÇÃO E ANÁLISE MOLECULAR

DETECTION OF *Cryptosporidium* IN FECAL SAMPLES OF GOAT KIDS, CALVES AND PIGS: COMPARISON BETWEEN METHODS OF CONCENTRATION, COLORATION AND MOLECULAR ANALYSIS

Willian Marinho Dourado Coelho*

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Via de acesso prof. Paulo Donatto Castellani, s/n CEP: 14884-900, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. Fone: 055 (18) 37227505, email: willianmarinho@hotmail.com

Alessandro Francisco Talamini do Amarante

Instituto de Biociências, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Distrito Rubião Jr., s/n CEP: 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil, email: amarante@ibb.unesp.br

Marcelo Vasconcelos Meireles

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, FOA, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Rua Clóvis Pestana, 793 CEP: 16050-680, Araçatuba, São Paulo, Brasil, email: meireles@fmva.unesp.br

Katia Denise Saraiva Bresciani

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, FOA, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Rua Clóvis Pestana, 793 CEP: 16050-680, Araçatuba, São Paulo, Brasil, email: bresciani@fmva.unesp.br

*Corresponding author

Financial support: FAPESP - The São Paulo State Research Foundation.

Resumo - O objetivo deste estudo foi comparar as técnicas de centrífugo-flutuação em solução de sacarose, centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco, Kinyoun modificado e reação em cadeia da polimerase para detecção de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais frescas de caprinos, bovinos e suínos. Fezes foram colhidas diretamente do reto de 192 cabritos, 184 bezerros e 47 leitões. Oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram constatados em 11,45% (22/192) e 5,72% (11/192) dos cabritos, 4,34% (8/184) e 3,26% (6/184) dos bezerros, 2,12% (1/47) e 2,12% (1/47) dos leitões pelos métodos de Sheather e Faust, respectivamente. Nos esfregaços diretos de fezes, corados pelo método de Kinyoun, foram observados oocistos do referido protozoário em 6,77% (13/192), 4,34% (8/184) e 2,12% (1/47) dos cabritos, bezerros e leitões respectivamente. Por meio da análise molecular, 16,66% (32/192) dos cabritos, 6,52% (12/184) dos bezerros e 2,12% (1/47) dos leitões apresentaram amplificação positiva para *Cryptosporidium*. Todas as amostras positivas pelos métodos de concentração e coloração foram igualmente positivas pela técnica de nested-PCR. A partir destes resultados pode-se inferir que a técnica de nested-PCR foi o método superior na detecção de *Cryptosporidium* quando comparado com os demais métodos empregados neste estudo, sendo capaz de revelar este parasito mesmo naquelas amostras com reduzido número de oocistos.

Palavras-chave: Faust, Kinyoun modificado, nested-PCR, Sheather, técnicas coproparasitológicas

Abstract - The aim of this study was to compare the techniques of flotation in sucrose solution, flotation in zinc sulfate solution, modified Kinyoun and polymerase chain reaction type nested for detection of *Cryptosporidium* spp. in fresh fecal samples of goats, cattle and pigs. Feces were collected directly from the rectum of 192 goats, 184 calves and 47 pigs. Oocysts of *Cryptosporidium* spp. were found in 11.45% (22/192) and 5.72% (11/192) of goats, 4.34% (8/184) and 3.26% (6/184) of calves, 2.12% (1/47) and 2.12% (1/47) of piglets by the methods of Sheather and Faust, respectively. In direct smears of feces stained by the Kinyoun oocysts were observed in 6.77% (13/192), 4.34% (8/184) and 2.12% (1/47) of goats, calves and piglets, respectively. Through molecular analysis, 16.66% (32/192) of goats, 6.52% (12/184) of calves and 2.12% (1/47) of the piglets had positive amplification for *Cryptosporidium*. All positive samples by the methods of concentration and staining were also positive by nested-PCR technique. From these results we can infer that the technique of nested-PCR was the superior

method in detection of *Cryptosporidium* compared with the other methods employed in this study, being able to reveal this parasite even in those samples with low number of oocysts.

Keywords: Faust, Modified Kinyoun, nested-PCR, Sheather, Coproparasitological techniques

Introdução

Diversos pesquisadores têm relatado em seus estudos a ocorrência de divergências entre a eficiência dos diferentes métodos coproparasitológicos para a detecção de *Cryptosporidium* (BOMFIM & LOPES, 1994; FEITOSA et al., 2004). Deste modo, técnicas de concentração (BUKHARI & SMITH, 1995), de coloração (LALLO et al., 2009) e nested-PCR (KAUSHIK et al., 2008) têm sido empregadas na detecção deste protozoário em caprinos (BOMFIM et al., 2005), bovinos (HUBER et al., 2004) e suínos (CALDERARO et al., 2001).

O objetivo deste estudo foi determinar e comparar a eficiência das técnicas de centrífugo-flutuação em solução de sacarose (Sheather), centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco (Faust), Kinyoun modificado e reação em cadeia da polimerase tipo nested (n-PCR) para diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais frescas de caprinos, bovinos e suínos.

Fezes foram colhidas diretamente do reto de 192 cabritos, 184 bezerros e 47 leitões, machos e fêmeas, de diferentes raças. Foram utilizadas como técnicas de concentração a centrífugo-flutuação em solução de sacarose (densidade específica de 1,20 g/mL) e a centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco (densidade específica 1.180 kg/m⁻³). Para a coloração dos esfregaços fecais foi empregado o método de Kinyoun modificado..

A análise molecular foi realizada com a técnica de n-PCR, após extração de DNA dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. conforme Meireles et al. (2007), seguindo-se a amplificação de fragmentos do gene da subunidade 18S do RNA (XIAO et al., 1999), permitindo a amplificação de fragmentos de DNA de todas as espécies e genótipos de *Cryptosporidium* conhecidos.

Foi elaborado um índice de contagem média de oocistos por campos de microscopia. Pela visualização aleatória em aumento de 400 vezes, determinou-se: 0 = ausência de oocistos, 1 a 2 = raros, 3 a 4 = +, 5 a 7 = ++, 8 a 10 = +++ e acima de 10 = ++++.

Oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram constatados em 11,45% (22/192) e 5,72% (11/192) dos cabritos, 4,34% (8/184) e 3,26% (6/184) dos bezerros, 2,12% (1/47) e 2,12% (1/47) dos leitões pelos métodos de Sheather e Faust, respectivamente. Pelo método de Kinyoun modificado, oocistos foram observados em 6,77% (13/192), 4,34% (8/184) e 2,12% (1/47) dos

cabritos, bezerros e leitões respectivamente. Por meio da análise molecular, 16,66% (32/192) dos cabritos, 6,52% (12/184) dos bezerros e 2,12% (1/47) dos leitões apresentaram amplificação positiva para *Cryptosporidium*. Todas as amostras positivas pelos métodos de concentração e coloração foram igualmente positivas pela técnica de n-PCR.

Por meio do Teste Qui-Quadrado, nos cabritos, a detecção de oocistos pelo método de Sheather foi superior aos resultados obtidos pelas técnicas de Faust ($P < 0,0009$) e Kinyoun ($P > 0,5930$). Este fato não foi observado nas amostras fecais dos bezerros quando comparadas as técnicas de Sheather e Faust ($P > 0,1573$). O número médio de oocistos observados por campo de microscópio em aumento de 400 vezes foi maior nos bezerros e leitões, e notadamente menor nos cabritos (Tabela 1).

Diversos pesquisadores têm classificado a técnica de Sheather como um dos melhores métodos de concentração de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras fecais de diferentes espécies animais (ANDERSON, 1981; ALVES et al., 2005; CARDOZO et al., 2008). A eficácia do método de Sheather é comparável às técnicas de Ritchie e Kinyoun associados na identificação de oocistos de *Cryptosporidium*, como pode ser observado no trabalho de Scott et al. (1985) que, ao comparar estas técnicas, constataram 18,1% (127/703) e 18,4% (129/703) de amostras positivas respectivamente.

Corroborando com nossos resultados, diversos estudos têm demonstrado a técnica de Sheather como superior na detecção de *Cryptosporidium*, mesmo quando comparada com outras técnicas de coloração (HUBER et al., 2004), ensaio imunoenzimático (FEITOSA et al., 2004) e Faust (ALVES et al., 2005).

Ainda que no presente estudo a técnica de Faust tenha possibilitado recuperar um menor número de oocistos em confronto com a técnica de Sheather, pesquisadores tem empregado este primeiro método como importante ferramenta na detecção de *Cryptosporidium* em amostras de fezes de humanos (CARVALHO et al., 2006), eqüinos (GOMES et al., 2008) e animais silvestres (SOARES et al., 2008; LALLO et al., 2009).

Kaushik et al. (2008) demonstraram em seus estudos que a técnica de n-PCR é considerada como o método mais sensível e específico na detecção de *Cryptosporidium*, em confrontação com diversos métodos de coloração e de ELISA, chegando a 100% de sensibilidade e especificidade. Contrariamente, Magi et al. (2004) constataram que o método de Kinyoun foi

superior à técnica de PCR e testes imunológicos rápidos, sendo considerado como o método mais prático, barato e eficaz no diagnóstico deste protozoário.

O método de coloração de Kinyoun é amplamente utilizado na rotina laboratorial, revelando oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de fezes conservadas (AMATO NETO et al., 2003) ou frescas (FANFA et al., 2010), viabilizando ainda a preservação das amostras coradas e da morfologia dos oocistos (AMATO NETO et al., 1996).

Baseado em nossos resultados, a técnica de nested-PCR foi superior aos demais métodos para a detecção de *Cryptosporidium* em cotejo às demais técnicas empregadas neste estudo, detectando este protozoário mesmo naquelas amostras com reduzido número de oocistos..

Referências

- AMATO NETO, V.; BEZERRA, R.C.; ALARCÓN R.S.R.; BRAZ, L.M.A. Conservação de oocistos de *Cryptosporidium* em fezes para exame parasitológico. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.36, p.303-304, 2003.
- AMATO NETO, V.; BRAZ, L.M.; DI PIETRO, A.O.; MÓDOLO, J.R. Oocysts of *Cryptosporidium* spp. in feces: comparison of the modified Kinyoun and Heine methods. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.29, p.575-578, 1996.
- ANDERSON, B.C. Patterns of shedding of cryptosporidial oocysts in Idaho calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.178, p.892-984, 1981.
- ALVES, O.F.; GOMES, A.G.; DA SILVA, A.C. Ocorrência de enteroparasitos em cães do município de Goiânia, Goiás: comparação de técnicas de diagnóstico. *Ciênc. Anim. Bras.*, v.6, p.127-133, 2005.
- BOMFIM, T.C.B.; LOPES, C.W.G. Avaliação de alguns métodos de identificação de oocistos do gênero *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em surto de diarreia em suínos. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.3, p.37-40, 1994.
- BOMFIM, T.C.B.; HUBER, F.; GOMES, R.S.; ALVES, L.L. Natural infection by *Giardia* sp. and *Cryptosporidium* sp. in dairy goats, associated with possible risk factors on the studied properties. *Vet. Parasitol.*, v.134, p.9-13, 2005.
- CALDERARO, F.F.; BACCARO, M.R.; MORENO, A.M.; FERREIRA, A.J.P.; JEREZ, A.J.; PENA, H.J.F. Frequência de agentes causadores de enterites em leitões lactentes provenientes de sistemas de produção de suínos do Estado de São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, v.68, p.29-34, 2001.

- CARDOZO, S.V.; TEIXEIRA FILHO, W.L.; LOPES, C.W.G. Avaliação das técnicas de rotina no diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium baileyi* em amostras de fezes de frango de corte (*Gallus gallus domesticus*). *Rev.Bras. Parasitol. Vet.*, v.17, p.351-353, 2008.
- CARVALHO, T.B.; CARVALHO, L.R.; MASCARINI, L.M. Occurrence of enteroparasites in day care centers in Botucatu (São Paulo State, Brazil) with emphasis on *Cryptosporidium* sp., *Giardia duodenalis*, and *Enterobius vermicularis*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.*, v.48, p.269-273, 2006.
- FANFA, V.R.; FARRET, M.H.; DA SILVA, A.S.; MONTEIRO, S.G. *Cryptosporidium* spp. em furão (*Mustela putorius furo*) no Sul do Brasil. *Biotemas*, v.23, p.225-227, 2010.
- FEITOSA, F.L.F.; SHIMAMURA, G.M.; ROBERTO, T.; MEIRELES, M.V.; NUNES, C.M.; CIARLINI, P.C.; BORGES, A.S. Prevalência de criptosporidiose em bezerros na região de Araçatuba, Estado de São Paulo, Brasil. *Ciência Rural*, v.34, p.189-193, 2004.
- GOMES, A.D.; BARRETA, C.; ZIEGLER, D.P.; SAUSEN, L.; STOEVEER, N.; SANGIONI, L.A.; VOGEL, F.S.F.; MONTEIRO, S.G.; ZANELLA, A. Prevalência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. em eqüinos estabulados no Jockey Club de Santa Maria-RS, Brasil. *Ciência Rural*, v.38, p.2662-2665, 2008.
- HUBER, F.; BOMFIM, T.C.; GOMES, R.S. Comparação da eficiência da coloração pelo método da safranina a quente e da técnica de centrífugo-flutuação na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras fecais de animais domésticos. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.13,p.81-84, 2004.
- KAUSHIK, K.; KHURANA, S.; WANCHU, A.; MALLA, N. Evaluation of staining techniques, antigen detection and nested PCR for the diagnosis of cryptosporidiosis in HIV seropositive and seronegative patients. *Acta Trop.*, v.107, n.1, p.1-7, 2008.
- LALLO, M.A.; PEREIRA, A.; ARAÚJO, R.; FAVORITO, S.E.; BERTOLLA, P.; BONDAN, E.F. Ocorrência de *Giardia*, *Cryptosporidium* e microsporídios em animais silvestres em área de desmatamento no Estado de São Paulo, Brasil. *Ciência Rural*, v.39, n.5, p.1465-1470, 2009.
- MAGI, B.; CANOCCHI, V.; TORDINI, G.; CELLESI, C.; BARBERI, A. *Cryptosporidium* infection: diagnostic techniques. *Parasitol. Res.*, v.98, p.150-152, 2006.

MEIRELES, M.V.; SOARES, R.M.; BONELLO, F.; GENNARI, S.M. Natural infection with zoonotic subtype of *Cryptosporidium parvum* in Capybara (*Hydrochoerus hidrochaeris*) from Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.147, p.166-170, 2007.

SOARES, J.F.; DA SILVA, A.S.; OLIVEIRA, C.B.; DA SILVA, M.K.; MARISCANO, G.; SALOMÃO, E.L.; MONTEIRO, S.G. Parasitismo por *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* sp. em *Coendou villosus*. *Ciência Rural*, v.38, n.2, p.548-550, 2008.

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. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.65, p.1578-1583, 1999.

Table captions

Tabela 1. Nível estimado de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de 192 cabritos, 184 bezerros e 47 leitões pelas técnicas coproparasitológicas de Sheather, Faust e Kinyoun modificado.

Técnica	Índice	Cabritos	Bezerros	Leitões
		Frequência (Porcentagem)	Frequência (Porcentagem)	Frequência (Porcentagem)
Sheather	Negativo	170 (88,54%)	176 (95,65%)	46 (97,87%)
	raros	4 (2,08%)	1 (0,54%)	0 (0,0%)
	+	6 (3,13%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	++	9 (4,69%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	+++	2 (1,04%)	2 (1,09%)	0 (0,0%)
	++++	1 (0,52%)	5 (2,72%)	1 (2,12%)
Faust	Negativo	181 (94,27%)	178 (96,74%)	46 (97,87%)
	raros	7 (3,65%)	2 (1,09%)	0 (0,0%)
	+	3 (1,56%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	++	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	+++	1 (0,52%)	3 (1,63%)	0 (0,0%)
	++++	0 (0,0%)	1 (0,54%)	1 (2,12%)
Kinyoun modificado	Negativo	179 (93,23%)	176 (95,65%)	46 (97,87%)
	raros	9 (4,69%)	2 (1,09%)	0 (0,0%)
	+	1 (0,52%)	1 (0,54%)	0 (0,0%)
	++	1 (0,52%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	+++	1 (0,52%)	3 (1,63%)	0 (0,0%)
	++++	1 (0,52%)	2 (1,09%)	1 (2,12%)