

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

**WALTER BERTEQUINI NAGATA**

**VALIDAÇÃO DA TÉCNICA *TF-Test Coccidia***  
**PARA DETECÇÃO DE *Cryptosporidium* spp. E *Giardia* spp.**  
**EM CRIANÇAS DE PRÉ-ESCOLA E SEUS RESPECTIVOS**  
**CÃES (*Canis familiaris*)**

ARAÇATUBA - SP

2019

**WALTER BERTEQUINI NAGATA**

**VALIDAÇÃO DA TÉCNICA *TF-Test Coccidia*  
PARA DETECÇÃO DE *Cryptosporidium* spp. E *Giardia* spp.  
EM CRIANÇAS DE PRÉ-ESCOLA E SEUS RESPECTIVOS  
CÃES (*Canis familiaris*)**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

Orientadora: Prof. Ass. Sílvia Helena Venturoli Perri  
Coorientadora: Prof. Ass. Katia Denise Saraiva Bresciani

ARAÇATUBA - SP

2019

N147v	<p>Nagata, Walter Bertequini</p> <p>Validação da técnica TF-Test Coccidia para detecção de <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp. em crianças de pré-escola e seus respectivos cães (<i>Canis familiaris</i>) / Walter Bertequini Nagata. -- Araçatuba, 2019</p> <p>46 f. : tabs.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba</p> <p>Orientadora: Sílvia Helena Venturoli Perri</p> <p>Coorientadora: Katia Denise Saraiva Bresciani</p> <p>1. Cão. 2. Coccidia. 3. Parasitologia. 4. Homem. I. Título.</p>
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: VALIDAÇÃO DA TÉCNICA TF-TEST *Coccidia* PARA DETECÇÃO DE *Cryptosporidium ssp.* e *Giardia ssp.* EM CRIANÇAS DE PRÉ-ESCOLA E SEUS RESPECTIVOS CÃES (*Canis familiaris*)

AUTOR: WALTER BERTEQUINI NAGATA  
ORIENTADORA: SILVIA HELENA VENTUROLI PERRI  
COORIENTADORA: KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI

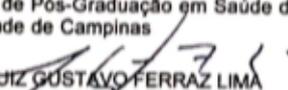
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

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

  
Profa. Dra. DANIELA BERNADETE ROZZA  
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

  
Profa. Dra. LUZIA HELENA QUEIROZ  
Professora Aposentada da Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. JANCARLO FERREIRA GOMES  
Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente / Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas

  
Prof. Dr. LUIZ GUSTAVO FERRAZ LIMA  
Curso de Ciências Biológicas / Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium - UNISALESIANO/Araçatuba

Araçatuba, 12 de agosto de 2019.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

Título: VALIDAÇÃO DA TÉCNICA TF-TEST *Coccidia* PARA DETECÇÃO DE *Cryptosporidium* ssp. e *Giardia* ssp. EM CRIANÇAS DE PRÉ-ESCOLA E SEUS RESPECTIVOS CÃES (*Canis familiaris*)

AUTOR: WALTER BERTEQUINI NAGATA  
ORIENTADORA: SILVIA HELENA VENTUROLI PERRI  
COORIENTADORA: KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI

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

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

Profa. Dra. DANIELA BERNADETE ROZZA  
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. LUZIA HELENA QUEIROZ  
Professora Aposentada da Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. JANCARLO FERREIRA GOMES  
Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente / Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas

Prof. Dr. LUIZ GUSTAVO FERRAZ LIMA  
Curso de Ciências Biológicas / Centro Universitário Católica Salesiano Auxilium - UNISALESIANO/Araçatuba

Araçatuba, 12 de agosto de 2019.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Walter Bertequini Nagata - Birigui, São Paulo, nascido em 23 de março de 1990. Graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), na Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA), no ano de 2014. Bolsista FAPESP de Iniciação Científica no período de 2011 a 2012 e 2013 a 2014 (Nº Processo 2011/12648-0 e 2013/07329-8), respectivamente. Mestrado em Ciência Animal (Área de Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal) pela FMVA, UNESP, no ano de 2017 com Bolsa FAPESP (Nº Processo 2014/26413-2). Doutorando em Ciência Animal (Área de Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal) pela FMVA, UNESP, com Bolsa CAPES.

A toda minha Família, que com toda certeza, representa tudo em minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, eu gostaria de agradecer a Deus por tudo em minha vida.

À minha querida esposa e minha filha por sempre estarem ao meu lado, ajudando-me e apoiando-me em todos os momentos da minha vida, incentivando-me a nunca desistir dos meus sonhos.

Aos meus queridos pais e irmã por toda educação, orientação, conselhos e incentivo para nunca desistir dos meus sonhos e sempre lutar por eles.

A toda minha família por toda torcida de apoio que sempre me deram.

À minha orientadora, Sílvia Helena Venturoli Perri, que me orienta desde praticamente o início da graduação, mestrado e doutorado ajudando-me e incentivando e dando conselhos para crescer como profissional e pessoa, sempre com muita atenção e respeito.

À minha coorientadora, Katia Denise Saraiva Bresciani, que me coorientou no mestrado e doutorado e por todos os conselhos, ajuda e incentivos, sempre procurando ajudar a todos com muito respeito e atenção.

Ao Professor Jancarlo Ferreira Gomes por todos conselhos, atenção e ajuda no desenvolvimento do presente projeto de pesquisa.

À ImmunoCamp ciência e tecnologia pelo apoio científico no presente projeto de pesquisa.

A Todos os meus amigos que torceram e me acompanharam durante este trajeto da pós-graduação.

A todos os professores e amigos que me ajudaram a realizar e concluir esse trabalho, seja pelos conselhos, conhecimentos e auxílio em todas as partes do projeto de pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos do curso de doutorado.

À Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, campus de Araçatuba e todos seus funcionários pelo acolhimento e suporte.

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso”.

Charles Chaplin

NAGATA, W. B. **Validação da técnica *TF-Test Coccidia* para detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em crianças de pré-escola e seus respectivos cães (*Canis familiaris*).** 2019. 47 f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

## RESUMO

A criptosporidiose e a giardíase são doenças gastrointestinais, com distribuição cosmopolita, causada, respectivamente, por um protozoário coccídeo intracelular obrigatório e um parasito flagelado, que pode afetar humanos e animais. O objetivo neste projeto foi detectar por meio da técnica *TF-Test Coccidia* e pela reação em cadeia da polimerase (RCP), a ocorrência do *Cryptosporidium* spp. e a *Giardia* spp. em crianças de pré-escola e seus respectivos cães (*Canis familiaris*) do Município de Araçatuba, São Paulo, de maneira inédita. Para a identificação dos oocistos do parasito supramencionado foi empregada a nova técnica parasitológica *TF-Test Coccidia* e RCP. A partir da análise destas amostras, verificou-se que 35,00% (35/100) das crianças estavam infectadas por alguma espécie de parasito intestinal, sendo que 5,00% eram positivas microscopicamente para *Cryptosporidium* spp. e 30,00% para *Giardia* spp. Nos cães, 3,13% (1/32) foram considerados positivos para *Giardia* spp., embora nenhum animal apresentasse oocisto de *Cryptosporidium* spp. nas fezes. Pela PCR 3,00% das crianças foram positivas para *Cryptosporidium* spp. e 35,00% para *Giardia* spp.. Enquanto que para os cães, pela mesma técnica molecular, nenhum animal foi considerado positivo para *Cryptosporidium* spp. e apenas 6,25% foram positivos para *Giardia* spp.. Dessa forma, foi verificado que a técnica parasitológica *TF-Test Coccidia* apresentou boa concentração e morfologia dos parasitos encontrados, com baixa quantidade de debris no esfregaço fecal. Pela primeira vez, *Cryptosporidium* spp. e a *Giardia* spp. foram detectados em crianças de pré-escola e seus respectivos cães (*Canis familiaris*) por meio da técnica *TF-Test Coccidia* e RCP.

**Palavras-chave:** Cão. Coccidia. Parasitologia. Homem.

NAGATA, W. B. **Validation of the *TF-Test Coccidia* technique for the detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in pre-school children and their respective dogs (*Canis familiaris*).** 2019. 47 f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

### ABSTRACT

Cryptosporidiosis and giardiasis are gastrointestinal diseases with cosmopolitan distribution, caused respectively by a compulsory intracellular coccidial protozoan and a flagellated parasite, which can affect humans and animals. The objective of this project was to detect by the technique TF-Test Coccidia and polymerase chain reaction (PCR), the occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in pre-school children and their respective dogs (*Canis familiaris*) from the Municipality of Araçatuba, São Paulo. For the identification of oocysts of the parasite the new parasitological technique *TF-Test Coccidia* and PCR were used. From the analysis of these samples, it was verified that 35.00% (35/100) of the children were infected by some kind of intestinal parasite, and 5.00% were microscopically positive for *Cryptosporidium* spp. and 30,00% for *Giardia* spp.. In dogs, 3.13% (1/32) were considered positive for *Giardia* spp., although no animal presented *Cryptosporidium* spp. Oocyst. in the stool. By PCR 3.00% of the children were positive for *Cryptosporidium* spp. and 35.00% for *Giardia* spp.. While for dogs, by the same molecular technique, no animals were considered positive for *Cryptosporidium* spp. and only 6.25% were positive for *Giardia* spp.. Thus, was verified that the parasitological technique TF-Test Coccidia presented good concentration and morphology of the parasites found, with a low amount of debris in the fecal smear. For the first time, *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. were detected in pre-school children and their respective dogs (*Canis familiaris*) by *TF-Test Coccidia* and PCR technique.

**Keywords:** Dog. Coccidia. Parasitology. Men.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Parasitos identificados nas crianças pela técnica parasitológica *TF-Test Coccidia*.....28
- Tabela 2.** Número de crianças positivos e negativos para *Cryptosporidium* spp. pelo *TF-Test Coccidia* de acordo com o RCP.....28
- Tabela 3.** Número de crianças positivas e negativas para *Giardia* spp. pelo *TF-Test Coccidia* de acordo com a RCP.....29

## LISTA DE ABREVIATURAS

ELISA - Ensaio Imunoenzimático Indireto

RCP - Reação em Cadeia da Polimerase

PCR - Polymerase Chain Reaction

CDC - Center for Disease Control and Prevention

VIH - Vírus da Imunodeficiência Humana

DNA - Ácido desoxirribonucleico

nPCR - nested Polymerase Chain Reaction

g – Força da gravidade

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL .....	15
1.1.	Objetivo .....	20
2.	CAPÍTULO 1 - DETECÇÃO DE <i>Cryptosporidium</i> spp. E <i>Giardia</i> spp. EM CRIANÇAS DE PRÉ-ESCOLA E SEUS RESPECTIVOS CÃES ( <i>Canis familiaris</i> ) POR MEIO DA TÉCNICA <i>TF-Test Coccidia</i> E PCR	21
2.1	Introdução .....	21
2.2	Material e métodos.....	23
2.2.1	Comitê de ética .....	23
2.2.2	População de estudo: crianças e seus respectivos cães.....	23
2.2.3	Caracterização do sujeito amostral.....	23
2.2.4	Colheita e conservação das amostras.....	23
2.2.5	Processamento das amostras fecais .....	24
2.2.6	Técnica de <i>TF-Test Coccidia</i> .....	24
2.2.7	Extração de DNA .....	25
2.2.8	Caracterização molecular .....	26
2.2.8.1	PCR para <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	26
2.2.8.2	PCR para <i>Giardia</i> spp.....	26
2.2.9	Análise estatística .....	27
2.3	Resultados .....	27
2.4	Discussão .....	29
2.5	Conclusão .....	31
2.6	Referências.....	32
	APÊNDICES.....	38
	ANEXOS.....	46

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A maior proximidade do homem com os animais domésticos, associada às diversas alterações ambientais decorrentes das modificações climáticas, do comportamento humano e da infraestrutura, tem permitido maior contato entre as pessoas e diversos patógenos diferentes. Isso tem causado a ocorrência de muitas enfermidades emergentes e reemergentes, incluindo doenças zoonóticas (OTRANTO; EBERHARD, 2011; COELHO et al., 2013).

Animais de produção, principalmente bovinos e ovinos, de estimação, como cães e gatos, bem como os silvestres podem, particularmente, ser reservatórios de doenças parasitárias e, atuar tanto na transmissão quanto na disseminação dessas infecções, direta e/ou indiretamente (YOUSSEF; UGA, 2014).

Em vista da proximidade entre os animais de companhia e o homem, associada ao potencial zoonótico de determinadas parasitoses (SANTARÉM et al., 2004), percebe-se a importância em estudar e avaliar a ocorrência e prevalência de parasitos gastrointestinais nessas populações (BRESCIANI et al., 2008).

Atualmente, observa-se que os parasitos intestinais ainda são abundantes em animais de companhia, mesmo com toda a medicação disponível e com as medidas de controle adotadas pelos proprietários e médicos veterinários (ITOH et al., 2015; NIJSSE et al., 2016). No geral, estes parasitos, como *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. e *Toxocara* spp., são responsáveis por causar algumas das zoonoses mais importantes (MACPHERSON, 2013; PEREIRA et al., 2016).

A criptosporidiose é uma doença gastrointestinal com distribuição cosmopolita que pode afetar tanto humanos como animais (O'DONOGHUE, 1995). Vinte e seis espécies e 61 genótipos válidos desse protozoário já foram descritos a partir de vários vertebrados, causando doença gastrointestinal assintomática ou leve em sua espécie hospedeira (RYAN et al., 2014).

As espécies patogênicas descritas na literatura são: *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium muris*, *Cryptosporidium felis* e *Cryptosporidium canis*. As espécies *C. parvum* e *C. hominis* são as principais que infectam os seres humanos (XIAO, 2010). No entanto, estudos têm mostrado que essa doença pode ser causada por vários genótipos e / ou

espécies de *Cryptosporidium*, incluindo também o *C. canis* e *C. felis* sendo essas duas últimas espécies responsáveis por causar infecções em países em desenvolvimento (XIAO; FENG, 2008). Nos cães, a espécie *C. canis* é a mais frequentemente encontrada (LI et al, 2015), mas também já foram relatadas infecções nesse animais por *C. parvum* (SIMONATO et al., 2015; SOTIRIADOU et al., 2013) e *C. ubiquitum* (LI et al., 2015).

Humanos e animais podem adquirir a infecção quando consomem alimentos e água contendo oocistos esporulados desses protozoários (PUMIPUNTU; PIRATAE, 2016). Devido a isso, a incidência e prevalência da criptosporidiose tendem a ser maiores e mais relevantes em países menos desenvolvidos e em desenvolvimento, onde não há adequada infraestrutura básica ou instalações fundamentais para evitar a contaminação por oocistos infectantes, que são liberados juntamente com as fezes (BURNET et al., 2014).

Apesar da mortalidade por esta infecção ser baixa, a combinação com alguns fatores, como a ocorrência concomitante com outros agentes infecciosos, imunidade e estado nutricional do hospedeiro, esta taxa pode se elevar. Na maioria dos casos, esta enfermidade leva a gastroenterite e diarreia de gravidade variável tanto em animais domésticos, quanto em humanos (XIAO et al., 2004, AMER et al., 2013).

Embora esta doença possa levar a altas taxas de morbidade e mortalidade, em indivíduos imunocomprometidos, a infecção por *Cryptosporidium* é autolimitada em indivíduos imunologicamente normais (HUNTER; NICHOLS, 2002), Em níveis alarmantes, a infecções oportunistas por *Cryptosporidium*, já foram relacionadas em pacientes com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), sendo considerado um importante patógeno em termos de Saúde Pública (CIELOSZYK et al. 2012,).

Além disso, os oocistos desempenham um papel potencial na resistência do *Cryptosporidium* spp. porque eles são tolerantes a vários produtos químicos e desinfetantes (dependendo da sua concentração), incluindo o cloro, que são comumente usados no processamento da água potável, podendo sobreviver por um longo período no meio ambiente (FAYER et al., 2001; XIAO; RYAN, 2004)

Atualmente são utilizados vários procedimentos laboratoriais para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp., tais como: técnicas parasitológicas de concentração (com uso de Formalina-Acetato de Etila, sacarose saturada, cloreto de sódio ou soluções de sulfato de zinco), associadas ao emprego de colorações

específicas (Ácido Rápido Modificado, Kinyoun, Ziehl - Neelsen Modificado, Safranina-Azul de Metileno e Métodos de Giemsa) (GARCIA, 2009); detecção de antígenos (Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA)) ou do genoma por meio da técnica Reação em Cadeia da Polimerase (RCP); com variações na sensibilidade e especificidade (AREESHI, 2007).

Particularmente, o diagnóstico da criptosporidiose exige bastante atenção: diferente de outros coccídios, o *Cryptosporidium* spp. apresenta oocistos e outros estágios evolutivos menores; não apresentam esporocistos (CASEMORE, 1991).

Muitas técnicas de diagnóstico têm sido descritas para a detecção dos estágios evolutivos do *Cryptosporidium* spp. (WEBSTER, 1993), sendo que as baseadas na microscopia são as mais utilizadas e que apresentam menor custo. Estas envolvem detecção de oocistos após flotação e centrifugação em solução de Sheather, seguido por microscopia de contraste de fase ou microscopia de campo brilhante (TEIXEIRA et al., 2011). Além disso, envolvem a coloração negativa de verde maquita (ELLIOT et al., 1999) e ácido-resistente (CARDOZO et al., 2008).

Em relação aos exames imunológicos, o diagnóstico por imunoenaios de captura ligado a enzima (ELISA), por exemplo, pode ser usado em amostras fecais. Apesar de ser aplicado para detectar antígenos de *C. parvum*, ele também é útil para o diagnóstico de criptosporidiose aviária (ROHELA et al., 2005; PAGÈS-MANTÉ et al., 2007).

As análises morfológicas de oocistos não são capazes de determinar as espécies de *Cryptosporidium*, já que as estruturas parasitárias eliminadas nas fezes, os oocistos, são muito pequenas e de difícil visualização. O uso de ferramentas moleculares em estudos epidemiológicos proporciona novos conhecimentos sobre a diversidade de *Cryptosporidium* spp. capazes de infectar humanos e animais (XIAO, et al., 2004).

A caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp., realizada pela PCR, pode ser útil no estudo da epidemiologia destes parasitos (WEBSTER, 1993). Esta caracterização, seguido por sequenciamento dos fragmentos amplificados apresenta elevada sensibilidade e especificidade.

Como pode-se notar, há várias técnicas parasitológicas empregadas na rotina para o diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium* spp. Além disso, o diagnóstico desta parasitose exige a utilização de técnicas específicas de concentração e de coloração, dificultando, muitas vezes, as suas implantações em

rotina de laboratórios de análises clínicas, por serem trabalhosas e onerosas (GOMES et al., 2004; GARCIA, 2007; GARCIA, 2009). Por estes motivos, é importante o desenvolvimento de técnicas mais apuradas e práticas para esta finalidade diagnóstica.

Em relação a *Giardia duodenalis*, este protozoário flagelado e unicelular, pode habitar o trato intestinal tanto de animais quanto de humanos (XIAO E FAYER, 2008). Devido à sua estreita relação com o saneamento básico precário e o baixo poder aquisitivo populacional, a giardíase foi incluída na Iniciativa das Doenças Negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (SAVIOLI et al., 2006) e apresenta distribuição mundial, com 250 a 300 milhões de casos sintomáticos em humanos, relatados anualmente (CACCIÒ et al., 2017).

Este protozoário flagelado afeta principalmente crianças, indivíduos desnutridos e imunocomprometidos (ANKARKLEV et al., 2010). Particularmente, os indivíduos parasitados podem apresentar vários agravos, como retardo no desenvolvimento, diminuição da função cognitiva e também efeitos prejudiciais sobre o seu estado nutricional (ROBERTSON et al., 2010). De forma geral, no homem, apesar do aparecimento de quadros de diarreia, desidratação, dor abdominal, vômitos, náuseas e perda de peso, a maioria das infecções por *G. duodenalis* são assintomáticas (COTTON, et al., 2011; BARTELT; SARTOR, 2015;).

A giardíase é reconhecida como uma enfermidade de veiculação hídrica, com muitos surtos relacionados com águas destinadas à recreação, consumo de água local por viajantes e, até mesmo água potável (KARANIS et al., 2007). Um dos motivos para a ocorrência de surtos podem ser possíveis falhas no processo de tratamento de água potável (KARANIS et al., 2007), o que pode ser observado com mais frequência América do Norte e Europa, onde há melhores sistemas de vigilância (FENG; XIAO, 2011).

Na Medicina Veterinária, a *G. duodenalis* pode causar diferentes sinais clínicos nos animais: a infecção clínica por este protozoário pode causar diarreia que não responde ao tratamento (GEURDEN et al., 2010); e a presença de fezes pastosas a líquidas pode ser sugestiva de giardíase em cães jovens (THOMPSON, 2004; GEURDEN et al., 2010).

Com estudos realizados por meio de técnicas moleculares com isolados de *Giardia* de casos humanos e animais, notou-se que a *G. duodenalis* é uma espécie que abrange oito grupos genéticos, designados “assemblages” (A, B, C, D, E, F e H),

sendo que os “assemblages” A e B, considerados zoonóticos, são patógenos de humanos e que também têm sido observados em mamíferos (FENG; XIAO, 2011). Os “assemblages” de animais também já foram identificados em humanos (ABDEL-MOEINE; SAEED, 2016; FANTINATTI et al., 2016; ŠTRKOLCOVÁ et al., 2015; ZAHEDI, et al., 2017).

Em relação ao diagnóstico dessa doença, na microscopia direta das fezes, pode-se observar a presença de trofozoítos ou cistos de *Giardia*. Dependendo da experiência do técnico, esse exame pode apresentar sensibilidade de 75% a 95% (MMBAGA; HOUP, 2017). A técnica de imunoensaio enzimático tem alcançado resultados similares ou melhores que o exame microscópico (GAAFAR, 2011; JOSKO, 2012) e a RCP já está disponível há anos (MAHBUBANI et al., 1991; SINGH, 1997).

Em vista deste contexto, percebe-se que a criptosporidiose e a giardíase, que são doenças importantes de ponto de vista de Saúde Pública e Saúde Animal, tem o seu diagnóstico baseado em várias técnicas laboratoriais, sendo a microscopia uma das mais empregadas (TEIXEIRA et al., 2011; KOEHLER et al., 2014).

O *TF-Test* ou *Three Fecal Test*, que tem como base o princípio de centrífugo-sedimentação com formalina-acetato de etila (GOMES et al., 2004) é uma técnica microscópica recomendada para o diagnóstico laboratorial de enteroparasitoses pelo Ministério da Saúde do Brasil, por meio do Plano Nacional de Vigilância e Controle das Enteroparasitoses (BRASIL, 2005). Por permitir um único processamento laboratorial de três amostras fecais obtidas em dias alternados, o seu diagnóstico é considerado mais eficaz (CARVALHO et al., 2012).

Particularmente, desde o seu desenvolvimento, o *TF-Test* tem passado por melhorias e adaptações: com o intuito de promover uma maior redução na quantidade de detritos fecais e maior concentração de estruturas parasitárias, uma segunda etapa de centrifugação foi acrescentada à técnica de Gomes et al. (2004), originando assim a técnica de *TF-Test Modified* (CARVALHO et al., 2016); e a partir da utilização e adaptação dos princípios das técnicas *TF-Test* e *TF-Test Modified* foi possível aplicá-los no diagnóstico de parasitos intestinais de animais, originando, assim, novas técnicas para o exame coproparasitológico na área de medicina veterinária, como técnica de *TF-Test Conventional* (LUMINA et al., 2006), *TF-Test Modified/Dog* (COELHO et al., 2013), *TFGII/Dog* (COELHO et al., 2015) e *TF-Test Coccidia* (INÁCIO et al., 2016).

Em relação a técnica *TF-Test Coccidia*, que é a adaptação mais recente das técnicas *TF-Test* e *TF-Test Modified*, ela foi validada para análise microscópica de amostras fecais de bovino para otimizar o diagnóstico do protozoário do gênero *Cryptosporidium* spp.. Esta técnica permitiu não só realizar uma lâmina temporária para leitura de microscopia em rotina laboratorial, mas também possibilitou uma melhor visualização dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. por concentrar estas estruturas parasitárias e, ao mesmo tempo, filtrar uma grande quantidade de debris da amostra (INÁCIO, et al., 2016).

### **1.1. Objetivo**

Esse estudo foi elaborado com o objetivo de validar em laboratório a técnica *TF- Test Coccidia* para detecção da ocorrência do protozoário *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em crianças de pré-escola e seus respectivos cães (*Canis familiaris*).

## **2. CAPÍTULO 1 - DETECÇÃO DE *Cryptosporidium* spp. E *Giardia* spp. EM CRIANÇAS DE PRÉ-ESCOLA E SEUS RESPECTIVOS CÃES (*Canis familiaris*) POR MEIO DA TÉCNICA *TF-Test Coccidia* E PCR**

### **2.1. Introdução**

Animais de estimação desempenham papel importante em relação ao bem-estar de seus donos. No entanto, podem abrigar várias espécies de parasitos intestinais (ITOH et al., 2015; NIJSSE et al., 2016), como os protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., com reconhecido potencial zoonótico (MACPHERSON, 2013, PEREIRA et al., 2016). Estes dois agentes etiológicos são associados a deficiência de estrutura sanitária, principalmente em áreas rurais (FONSECA, et al. 2010) e sob condições socioeconômicas baixas (CACCIÒ et al., 2017), podem ocasionar diarreia, mas são muitas vezes negligenciados (CERTAD et al., 2017), apesar de serem relevantes do ponto de vista de saúde pública.

A giardíase é ocasionada pela espécie *Giardia duodenalis*, parasito flagelado e unicelular, que pode habitar o trato intestinal de vários hospedeiros, incluindo o ser humano (XIAO E FAYER, 2008), sendo que afeta principalmente crianças, indivíduos desnutridos e imunocomprometidos (ANKARKLEV et al., 2010), com impacto significativo tanto em humanos como em animais (THOMPSON E MONIS, 2011). Enfermidade comum em filhotes caninos, responsável por ocasionar episódios de diarreia intermitente, de coloração clara e odor fétido (SILVA et al., 2014).

Seu diagnóstico é feito a partir de exame coproparasitológico, exame de custo reduzido que permite também a detecção de outros parasitos (O'HANDLEY; OLSON, 2006), é realizado por meio da identificação microscópica de trofozoítos ou cistos em amostras fecais, que nos esfregaços, podem ser corados com tricrômico e iodo (KOEHLER et al., 2014).

A criptosporidiose é uma doença gastrointestinal, com distribuição cosmopolita, causada por um protozoário coccídeo intracelular obrigatório que pode afetar tanto humanos como animais (O'DONOGHUE, 1995). Embora seja frequente a presença de *Cryptosporidium* em fezes diarreicas (GIANGASPERO et al. 2006), os hospedeiros podem ser assintomáticos ou apresentarem quadros leves (RYAN et al.,

2014). Em indivíduos imunocompetentes a doença é auto limitante, entretanto em imunocomprometidos os sintomas podem ser mais graves e prolongados. Em pacientes HIV positivos, por exemplo, a infecção pode ser extra intestinal, afetando a vesícula biliar, pâncreas e sistema respiratório (RYAN, HIJJAWI, 2015).

O diagnóstico das infecções por *Cryptosporidium* spp. pode ser realizado por técnicas de coloração de amostras fecais, como verde malaquita (ELLIOT et al., 1999) e ácido-resistente (CARDOZO et al., 2008), que por serem trabalhosas e onerosas podem ter seu uso minimizado em rotina de laboratórios de análises clínicas, (GOMES et al., 2004; GARCIA, 2007; GARCIA, 2009). Assim, técnicas microscópicas são as mais utilizadas e que apresentam menor custo e podem consistir na detecção de oocistos após flotação e centrifugação em solução de Sheather (TEIXEIRA et al., 2011).

O *TF-Test* ou *Three Fecal Test*, que tem como base o princípio de centrifugo-sedimentação com formalina-acetato de etila (GOMES et al., 2004) é uma técnica microscópica que, por permitir um único processamento laboratorial de três amostras fecais obtidas em dias alternados, apresenta um diagnóstico mais eficaz (CARVALHO et al., 2012).

Desde o seu desenvolvimento, o *TF-Test* tem passado por melhorias e adaptações: como adição de uma segunda etapa de centrifugação para promover uma maior redução na quantidade de detritos fecais e maior concentração de estruturas parasitárias, originando assim a técnica de *TF-Test Modified* (CARVALHO et al., 2016); e a sua adaptação para o diagnóstico de parasitos intestinais de animais, dando origem a novas técnicas para o exame coproparasitológico na área de medicina veterinária, como a técnica de *TF-Test Coccidia* (INÁCIO et al., 2016), que foi validada para análise microscópica de amostras fecais de bovino para otimizar o diagnóstico do protozoário do gênero *Cryptosporidium* spp.

Neste contexto, devido a necessidade do desenvolvimento de uma técnica mais sensível, prática e economicamente viável para a rotina laboratorial, neste projeto o objetivo foi detectar por meio das técnicas *TF-Test Coccidia* e RCP, a ocorrência do *Cryptosporidium* spp. e da *Giardia* spp. em crianças de pré-escola e seus respectivos cães (*Canis familiaris*) do Município de Araçatuba, São Paulo, de maneira inédita na literatura consultada.

## **2.2. Material e métodos**

### **2.2.1. Comitê de ética**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) e Comitê de Ética em Pesquisa – Humanos da Faculdade de Odontologia de Araçatuba e da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA) UNESP, Campus de Araçatuba, processo FOA nº 2012-01343 e nº 06794212.9.1001.5420.

### **2.2.2. População de estudo: crianças e seus respectivos cães**

A amostragem mínima necessária para a execução deste projeto, no nível de confiança de 95% e com precisão absoluta de 10%, foi calculada em 96 amostras, usando uma proporção populacional de 50% (LWANGA, LEMESHOW, 1991). Como margem de segurança, foram coletadas 100 amostras fecais de crianças provenientes do Município de Araçatuba (SP).

### **2.2.3. Caracterização do sujeito amostral**

De acordo com a análise descritiva dos dados, observou-se que das 100 amostras de crianças examinadas, 60,00% (60/100) eram do gênero masculino e 40,00% (40/100) do feminino, sendo 65,00% (65/100) com idade igual ou menor a três anos de idade e 35,00% (35/100) maior que três anos.

Das 32 amostras de cães que foram analisadas, 81,25% (26/32) eram fêmeas, 18,75% (6/32) machos, 6,25% (2/32) com faixa etária inferior ou igual a um ano de idade e 93,75% (30/32) acima desta faixa etária.

### **2.2.4. Colheita e conservação das amostras**

Para obtenção das amostras, foram realizadas reuniões com as diretoras de escolas de educação infantil do município de Araçatuba, SP, pais ou responsáveis das crianças para esclarecimento do projeto em questão e obtenção de autorização da participação de cada indivíduo, como também para a distribuição e recolhimento dos Kits.

Levando em consideração a irregularidade de eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. (GARCIA, 2007, 2009; CDC, 2016), amostras fecais foram coletadas em três dias alternados e acondicionadas simultaneamente, nos tubos do kit TF-TEST e também no pote coletor universal que continha dicromato de potássio. As amostras coletadas no kit TF-Test foram utilizadas para processar a técnica parasitológica *TF-Test Coccidia* e as amostras armazenadas no pote coletor universal foram purificadas por centrífugo-sedimentação com água/acetato de etila com posterior extração de DNA e análise molecular.

### **2.2.5. Processamento das amostras fecais**

Para a identificação das estruturas de resistência do parasito e estudo estatístico de avaliação comparativa entre técnicas, além da técnica de *TF-Test Coccidia*, foi empregada uma técnica consagrada pela literatura científica: Nested-PCR.

### **2.2.6. Técnica de TF-Test Coccidia**

Esta técnica foi composta das seguintes etapas:

Em uma estante apropriada acondicionaram-se três tubos coletores-usuário padrão *TF-Test Coccidia*, agitando cada um deles vigorosamente por 30 segundos com o uso de equipamento tipo vórtex em 3000 rpm (rotações por minuto); posteriormente, adicionou-se em um dos tubos 25 µL de solvente orgânico surfactante (detergente neutro incolor) e 3 mL do reagente químico acetado de etila pró-análise (Fórmula C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>).

Em seguida, os tubos foram fechados com as suas tampas e agitados vigorosamente por 30 segundos com o uso de equipamento tipo vórtex (3000 rpm); seguido da retirar das tampas dos tubos e conexão a uma peça denominada conjunto processador, composta por conjunto de filtros e tubo de centrifugação unificados.

Este conjunto foi centrifugado por dois minutos a 500 x g (gravitational force, em inglês) e, após esta centrifugação, desacoplou-se cuidadosamente o tubo de centrifugação do conjunto de filtros e tubos coletores-usuários.

A seguir, decantou-se o líquido sobrenadante do tubo de centrifugação, de modo a deixar cerca de 500 µL de sedimento no fundo cônico deste tubo; a este

sedimento, adicionou-se cerca de 250  $\mu\text{L}$  de água tratada e homogeneizou-se manualmente todo material, proporcionando a formação de uma suspensão fecal, da qual com um auxílio de uma pipeta automática, resgatou-se 150  $\mu\text{L}$  que foram transferidos a um tubo de colheita padrão *TF-Test Coccidia*.

Posteriormente, adicionou-se sobre este material uma gota de detergente neutro incolor e homogeneizou-se manualmente toda suspensão a qual foram adicionadas 3 mL de solução neutra de formalina, seguida de homogeneização vigorosa por um tempo de 30 segundos no equipamento tipo vórtex.

Na sequência, adicionou-se sobre este material 3 mL do reagente químico acetato de etila e agitou-se novamente por mais 30 segundos no equipamento tipo vórtex.

Logo após, centrifugou-se este tubo contendo todo material homogeneizado a 333 x g por um minuto; e após esta centrifugação, decantou-se o material sobrenadante com o uso de pipeta até proporcionar uma pequena alíquota de suspensão na parte inferior demarcada do tubo.

Transferiu-se 25  $\mu\text{L}$  deste material para uma lâmina de microscopia; sendo após, acrescentado sobre a alíquota da lâmina 25  $\mu\text{L}$  da composição corante desenvolvida e padronizada no estudo (25 $\mu\text{L}$  de solução de iodo D'Antony modificado para 50 $\mu\text{L}$  do corante Tricrômico modificado).

Por último, foi feito um esfregão fecal deste material ao qual é sobreposta uma lamínula para a leitura em microscopia óptica de luz convencional, com ampliação de 20x e posteriormente 40x (INÁCIO et al., 2016).

### **2.2.7.Extração de DNA**

A extração de DNA foi realizada com utilização do Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit (Zymo Research Corp, Irvine, CA, USA), de acordo com protocolo sugerido pelo fabricante.

## 2.2.8. Caracterização molecular

### 2.2.8.1. PCR para *Cryptosporidium* spp.

Para amplificação de fragmentos do gene da subunidade 18S do rRNA foi utilizada a técnica de nPCR, com os primers 5' TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG 3' (Primer 1) e 5' CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA 3' (Primer 2) para a reação primária, com 1325 pares de base (pb) e 5' GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG 3' (Primer 3) e 5' AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A 3' (Primer 4) para a reação secundária (826-840 pb). Para realização das seguintes condições de reação, foi preparada uma solução com volume final de 26.1µL. Para a reação primária foi utilizado: 22,5 µL de Platinum® PCR SuperMix, 0,5 µL do Primer 1, 0,5 µL do Primer 2, 0,1 µL MgCl<sub>2</sub> e 2,5 µL do DNA alvo. Para a reação secundária foi utilizado: 22,5 µL de Platinum® PCR SuperMix, 0,5 µL do Primer 3, 0,5 µL do Primer 4, 0,1 µL MgCl<sub>2</sub> e 2,5 µL do DNA alvo. As amostras foram submetidas à desnaturação inicial do DNA a 94° C por três minutos, seguida de 34 ciclos, cada um consistindo em desnaturação por 45 segundos a 94° C, 45 segundos de anelamento a 55°C e 60 segundos de extensão a 72° C, com extensão final a 72°C por sete minutos (XIAO et al., 2000). O DNA genômico de *C. parvum* e água ultrapura, foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. Os fragmentos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com GelRed® (Biotium) e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta.

### 2.2.8.2. PCR para *Giardia* spp.

A caracterização genética de *Giardia* foi realizada por meio da reação em cadeia pela polimerase (nPCR) utilizando o gene SSU rRNA em todas as amostras fecais (HOPKINS et al., 1997; APPELBEE et al., 2003). A reação com o gene ssu rRNA foi feita com a utilização de 12,5 µL de JumpStart Taq ReadyMix® (Sigma-Aldrich), 5% de DMSO, 400 nM de cada oligonucleotídeo iniciador, 2,5 µL e 1 µL de DNA nas reações primária e secundária, respectivamente, e a quantidade de água ultrapura necessária para completar o volume final de 25 µL de solução. As amostras foram submetidas à desnaturação inicial do DNA a 94° C por 3 minutos, seguida de 39 ciclos de desnaturação por 30 segundos a 94° C, anelamento por 30 segundos a

58°C e extensão por 60 segundos a 72° C, com extensão final a 72°C, por 7 minutos. Na reação secundária a temperatura de anelamento foi de 57°C. Como controles positivo e negativo foram utilizados DNA genômico de *Giardia duodenalis* e água ultrapura, respectivamente.

### **2.2.9. Análise estatística**

A análise estatística consistiu de estatística descritiva e inferencial, utilizando o teste de McNemar para comparar a proporção de resultados positivos das técnicas e coeficiente de concordância Kappa. As estatísticas foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## **2.3. Resultados**

Por meio da técnica parasitológica *TF-Test Coccidia*, foram positivos para protozoários intestinais 35,00% (35/100) das crianças e 3,13% (1/32) dos cães.

Em relação aos resultados positivos das crianças no *TF-Test Coccidia*, apenas 14,29% (5/35) estavam relacionados com um resultado positivo para *Cryptosporidium* spp., sendo que a maioria, 85,71% (30/35), foram positivos para *Giardia* (Tabela 1).

Nos exames parasitológicos dos cães, nenhum cão foi considerado positivo para *Cryptosporidium* spp., mas um animal, 3,13% (1/32), foi considerado positivo para *Giardia* spp.

Pela técnica molecular, 3,00% (3/100) das crianças foram consideradas positivas para *Cryptosporidium* spp. e 35,00% (35/100) foram diagnosticadas com *Giardia* spp. No caso dos cães, apenas 6,25% (2/32), foram considerados positivos para *Giardia* spp. por esta técnica molecular.

**Tabela 1.** Parasitos identificados nas crianças pela técnica parasitológica *TF-Test Coccidia*.

<b>Parasito</b>	<b>Número</b>	<b>%</b>
<i>Cryptosporidium</i> spp.	5	14,29
<i>Giardia</i> spp.	30	85,71
<b>Total</b>	<b>35</b>	<b>100</b>

Fonte: Elaborada pelo Autor

A proporção de resultados positivos para detecção de *Cryptosporidium* spp. entre as técnicas de diagnóstico *TF-Test Coccidia* e RCP não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) (Tabela 2). Em relação à concordância da técnica microscópica quando comparado a RCP para os resultados desse protozoário, o coeficiente Kappa foi de 0,2201.

**Tabela 2.** Número de crianças positivas e negativas para *Cryptosporidium* spp. pelo *TF-Test Coccidia* de acordo com a RCP.

<b>TF-Test <i>Coccidia</i></b>	<b>RCP</b>		<b>Total</b>
	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	
<b>Positivo</b>	1	4	5
<b>Negativo</b>	2	93	95
<b>Total</b>	3	97	100

\*Teste de McNemar ( $p = 0.6875$ )

Fonte: Elaborada pelo Autor

No caso da proporção de resultados positivos entre as técnicas de diagnóstico *TF-Test Coccidia* e RCP para detecção de *Giardia* spp., observou-se também que os resultados não tiveram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) (Tabela 3) e quanto à concordância da técnica microscópica quando comparado a PCR para este protozoário, o coeficiente Kappa foi de 0,4318.

**Tabela 3.** Número de crianças positivas e negativas para *Giardia* spp. pelo *TF-Test Coccidia* de acordo com a RCP.

TF-Test Coccidia	RCP		Total
	Positivo	Negativo	
<b>Positivo</b>	20	10	30
<b>Negativo</b>	15	55	70
<b>Total</b>	35	65	100

\*Teste de McNemar (p = 0.4237)

Fonte: Elaborada pelo Autor

## 2.4. Discussão

Pela primeira vez, *Cryptosporidium* spp. e a *Giardia* spp. foram detectados em crianças de pré-escola e seus respectivos cães (*Canis familiaris*) por meio da técnica *TF-Test Coccidia* e da PCR.

No nosso estudo, apenas 5% das amostras de fezes de crianças e 0% das dos cães examinados pelo *TF-Test Coccidia* foram consideradas positivas para o protozoário *Cryptosporidium* spp. Enquanto que 30,00% das crianças e 3,13% dos cães apresentaram positividade microscópicas para *Giardia*. O fato de existir essa diferença entre a detecção dessas duas doenças pela mesma técnica, não quer dizer que a técnica apresente um desempenho melhor para pesquisa de um parasito e pior para outro.

Como podemos verificar na literatura, o protozoário do gênero *Cryptosporidium* tem distribuição mundial e sua prevalência na Ásia, África e América Latina está entre 5 a 10% (WHITE, 2010). No Brasil, estudos já demonstraram que a prevalência desse coccídio em crianças pode ser baixa, como ao redor de 1,10% (OSHIRO et al., 2000), o que mostra que nossa proporção de resultados positivos para essa doença condiz com o que a literatura nos traz. Além disso, o *TF-Test Coccidia*, para detecção de *Giardia*, também mostrou resultados semelhantes com a prevalência da giardiase em humanos relatada em outros estudos, que varia entre 0,4 e 7,5% em países desenvolvidos e se encontra entre 8 a 30% em países em desenvolvimento (FENG E XIAO, 2011; DI CRISTANZIANO et al., 2014).

Em relação aos nossos resultados dos cães, não detectamos nenhum animal positivo para *Cryptosporidium*. A literatura mostrar que a prevalência desse

coccídeo em cães varia de 1% (BRESCIANI et al., 2008) a 26,2% (MOREIRA et al., 2018). O fato dessa doença acometer, principalmente, filhotes e animais idosos e associar-se a doenças imunossupressoras (THOMAZ et al., 2007), pode explicar essa nossa ocorrência, uma vez que a população de cães do nosso estudo apresentava em sua maioria faixa etária adulta. Por outro lado, a proporção 3,13% (1/32) dos animais que foram considerados positivos para *Giardia* por esta nova técnica parasitológica, mostra que esse resultado corrobora com outros achados no Brasil, no qual estudos mostram que o índice de prevalência dessa doença pode variar entre 0,8 a 41% (MUNDIM et al., 2003; DAVID et al., 2015).

Apesar dos resultados de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. do *TF-Test Coccidia* apresentarem, respectivamente, sofrível e regular concordância com os resultados da PCR, de acordo com os critérios sugeridos por Pereira (2001), ao se comparar a proporção de resultados positivos entre as duas técnicas de diagnóstico estudadas, por meio do teste de McNemar, pode-se notar que as técnicas não apresentaram diferença significativa entre si ( $p < 0,05$ ).

Com a utilização da nova técnica parasitológica *TF-Test Coccidia* foi possível detectar parasitos intestinais relevantes do ponto de vista de saúde pública, como *Cryptosporidium* spp. em crianças e *Giardia* em crianças e cães. Este é um fato importante considerando que desde 2004 a Organização Mundial da Saúde (OMS) incluiu a giardíase e a criptosporidiose entre as doenças negligenciadas no mundo (SAVIOLI et al., 2006).

Outro aspecto que deve ser levado em consideração é que a Criptosporidiose e outras parasitoses intestinais, como Giardíase relatadas como endêmicas em crianças que frequentam creches em países desenvolvidos e emergentes (CORDELL E ADDISSI 1994), apresentaram prevalência compatível com a literatura em nosso estudo, que usou essa amostra populacional, inferindo-se que a Técnica *TF-Test Coccidia* apresenta-nos resultados confiáveis e importantes para mostrar a realidade das crianças e seus respectivos cães em relação a essas infecções.

Em vista desses resultados apresentados, e somado ao fato de que a avaliação/diagnóstico clínico de parasitose intestinal não nos permite ter um diagnóstico conclusivo (BERGQUIST et al., 2009) mas uma suspeita de doença, percebe-se a necessidade da adoção e implementação de exames parasitológicos que possam nos auxiliar nessas situações, mostrando diferentes e possíveis

estruturas parasitárias que podem ser encontradas nos pacientes e com isso chegar em um diagnóstico definitivo (GARCIA 2010, 2018).

De maneira satisfatória, pela nova técnica parasitológica *TF-Test Coccidia* foram demonstrados resultados bons e condizentes com a literatura, como também características positivas por unir uma série de fatores que possibilitaram um diagnóstico mais prático e preciso.

Diferente de outras técnicas, nas quais os exames parasitológicos eram feitos com apenas uma única amostra de fezes do paciente, o *TF-Test Coccidia* apresenta melhor desempenho por processar juntas, de uma só vez, três amostras fecais, coletadas em dias alternados, aumentando, desta forma, as chances de propiciar diagnósticos corretos, potencializando a confiabilidade dos resultados (NAZER et al., 1993; HIATT et al., 1995) e evitando problemas como na variação da intensidade das infecções parasitárias dos indivíduos e na eliminações intermitentes de estruturas nas fezes por alguns parasitos, como a *Giardia* (CDC, 2015).

Além disso, o seu procedimento de dupla filtragem por meio da centrífugo-sedimentação possibilitou a eliminação do excesso de material fecal (impurezas) separando as estruturas parasitárias e tornando assim o sedimento mais rico com os mesmos, o que facilmente foi verificado pela microscopia. Assim, a dificuldade de leitura das lâminas e identificação das estruturas parasitárias, que podem apresentar fatores confundidores gerando resultados falso-positivos (MEIRELES, 2010), foram diminuídas.

Dessa forma, foi verificado que a técnica parasitológica *TF-Test Coccidia* apresentou boa concentração e morfologia dos parasitos encontrados, com baixa quantidade de debris no esfregaço fecal.

## **2.5. Conclusão**

Pela primeira vez foram detectados os protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em crianças de pré-escola e seus respectivos cães (*Canis familiaris*) por meio da técnica *TF-Test Coccidia* e PCR.

## 2.6. Referências

ANKARKLEV, J.; JERLSTRÖM-HULTQVIST, J.; RINGQVIST, E.; TROELL, K.; SVÄRD, S.G. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 413-422, 2010.

APPELBEE, A. J.; FREDERICK, L. M.; HEITMAN, T. L.; OLSON, M. E. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. **Veterinary parasitology**, v.112, p.289–294, 2003.

BERGQUIST, R., JOHANSEN, M. V. & UTZINGER, J. Diagnostic dilemmas in helminthology: what tools to use and when? **Trends in parasitology**, v.25, p. 151–156, 2009.

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

CACCIÒ, S.M.; LALLE, M.; SVÄRD, S.G. Host specificity in the *Giardia duodenalis* species complex. **Infection, Genetics and Evolution**, v.66, p.335-345, 2018.

CARDOZO, S. V.; TEIXEIRA W. L. Fo; LOPES C. W. G. Avaliação das técnicas de rotina no diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium baileyi* em amostras de fezes de frangos de corte (*Gallus gallus domesticus*). **Brazilian journal of veterinary parasitology**, v. 17(S1 Suppl 1): p.351-353, 2008.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Cryptosporidium: diagnosis & detection*. 2016. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/crypto/diagnosis.html>>. Acesso em 28 ago. 2018.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Giardia: diagnosis & detection*. 2015. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/giardia/diagnosis.html>>. Acesso em 20 nov. 2018.

CERTAD G.; VISCOGLIOSI, E.; CHABÉ, M.; CACCIÒ, S. M. Pathogenic Mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Trends in Parasitology**, v.33, n.7, p.561-576, 2017.

CORDELL, R.L., ADDISS, D.G. Cryptosporidiosis in child care settings: are view of the literature and recommendations for prevention and control. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v.13, n.4, p. 310–7, 1994.

DAVID, E. B.; GUIMARÃES, S.; OLIVEIRA, A. P.; OLIVEIRA-SERQUEIRA, T. C. G.; BITTENCOURT, G. N.; NARDI, A. R. M.; RIBOLLA, P. E. M.; FRANCO, R. M. B.; BRANCO, N.; TOSINI, F.; BELLA, A.; POZIO, E.; CACCIO, S. M. Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of Sao Paulo, *Brazil*. **Parasite & Vectors**, v. 8, p. 103, 2015.

DI CRISTANZIANO, V.; SANTORO, M.; PARISI, F.; ALBONICO, M.; SHAALI, M. A.; DI CAVE, D.; BERRILLI, F. Genetic characterization of *Giardia duodenalis* by sequence analysis in humans and animals in Pemba Island, Tanzania. **Parasitology International**, v. 63, p. 438-441, 2014.

ELLIOT, A.; MORGAN U. M.; THOMPSON R. C. A. 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.

FENG, Y. XIAO, L. Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of *Giardia* Species and Giardiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 110-140, 2011.

FONSECA, E. O. L.; TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L.; CARMO, E. H.; COSTA, M. C. N. Prevalência e fatores associados às geo-helminthíases em crianças residentes em municípios com baixo IDH no Norte e Nordeste brasileiros. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 26, n.1: p. 143-152, 2010.

GARCIA, L. S. Clinical Microbiology Procedures Handbook. **American Society for Microbiology Press**, 2010.

GARCIA, L.C. ***Diagnosis medical parasitology***. 5. ed. Washington: A.S.M. Press, 2007.

GARCIA, L. S. et al. Laboratory Diagnosis of Parasites from the Gastrointestinal Tract. ***Clinical microbiology reviews***, 31, 2018.

GARCIA, L.C. ***Practical Guide to diagnostic parasitology***. 2. ed. Washington: A.S.M. Press, p 288-289, 2009.

GIANGASPERO, A.; IORIO, R.; PAOLETTI, B.; TRAVERSA, D.; CAPELLI, G. Molecular evidence for *Cryptosporidium* infection in dogs in Central Italy. ***Parasitology Research***, v.99, p.297–9, 2006.

GOMES, J.F.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; DIAS, L.C.S., et al. Evaluation of a Novel *Kit (TF-Test)* for the Diagnosis of Intestinal Parasitic Infections. ***Journal of Clinical Laboratory Analysis***, USA, v. 18 n. 2, p.132-8, 2004.

HIATT, R.A.; MARKELL, E.K.; NG, E. How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa? ***The American journal of tropical medicine and hygiene***, v.53, n.1, p.36-9, 1995.

HOPKINS, R. M.; MELONI, B. P; GROTH, D. M.; WETHERALL, J. D.; REYNOLDSON, J. A.; THOMPSON, R. C. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. ***The Journal of parasitology***, v.83, p.44-51, 1997.

INACIO, S.V.; GOMES, J.F.; OLIVEIRA, B.C.M.; FALÇÃO, A.X.; SUZIKI, C.T.N.; SANTOS, B.M.; AQUINO, M.C.C.; RIBEIRO, R.S.P.; ASSUNÇÃO, D.M.; CASEMIRO, P.A.F.; MEIRELES, M.V.; BRESCIANI, K.D.S. Validation of a new technique to detect *Cryptosporidium* spp. oocysts in bovine feces. ***Preventive Veterinary Medicine***, v.134, p1-5, 2016.

ITOH, N.; KANAI, K.; KIMURA, Y.; CHIKAZA, W. A. S.; HORI, Y.; HOSHI, F. Prevalence of intestinal parasites in breeding kennel dogs in Japan. **Parasitology Research**, v.114, n.3, p.1221–4, 2015.

KOEHLER, A.V.; JEX, A.R.; HAYDON, S.R.; STEVENS, M.A.; GASSER, R.B. Giardia/giardiasis: a perspective on diagnostic and analytical tools. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 280–289, 2014.

LWANGA, S.K.; LEMESHOW, S. **Sample size determination in health studies: a practical manual**. Geneva: World Health Organization, 1991. 80 p.

MACPHERSON, C. N. L. The epidemiology and public health importance of toxocariasis: a zoonosis of global importance. **International journal for parasitology**, v.43, p.999–1008, 2013.

MEIRELES, M. V. *Cryptosporidium* infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. **Revista brasileira de parasitologia veterinária**, v.19, n.4, p.197-204, 2010.

MOREIRA, A.S.; BAPTISTA, C.T.; BRASIL, C.L.; VALENTE, J.S.S.; BRUHN, F.R.P.; PEREIRA, D.I.B. Risk factors and infection due to *Cryptosporidium* spp. in dogs and cats in southern Rio Grande do Sul. **Brazilian journal of veterinary parasitology**, v. 27, n. 1, p. 112-117, 2018.

MUNDIM, M. J. S.; SOUZA, S. Z.; HORTÊNCIO, S.M.; CURY, M. C. Frequência de *Giardia* spp. por duas técnicas de diagnóstico em fezes de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**, v. 55, n. 6, p. 770-773, 2003.

NAZER, H.; GREER, W.; DONNELLY, K.; MOHAMED, A.E.; YAISH, H.; KAGALWALLA, A; PAVILLARD, R. The need for three stool specimens in routine laboratory examinations for intestinal parasites. **The British journal of clinical practice**, v.47, n.2, p.76-8, 1993.

NIJSSE, R.; PLOEGER, H. W.; WAGENAAR, J. A.; MUGHINI-GRAS, L. Prevalence and risk factors for patent *Toxocara* infections in cats and cat owners' attitude towards deworming. **Parasitology Research**, v.115, n12, p.4519–25, 2016.

O'DONOGHUE, P.J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. **International Journal of 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, p. 623–643, 2006.

OSHIRO, E. T.; DORVAL, M. E. C.; NUNES, V. L. B.; SILVA, M. A. A.; SAID, L. A. M. Prevalência do *w* em crianças abaixo de 5 anos, residentes na zona urbana de Campo Grande, MS, Brasil, 1996, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33, n.3, p.277-280, 2000.

PEREIRA, A.; MARTINS, A.; BRANCAL, H.; VILHENA, H.; SILVA, P.; PIMENTA, P.; DIZ-LOPES, D.; NEVES, N.; COIMBRA, M.; ALVES, A. C.; CARDOSO, L.; MAIA, C. Parasitic zoonoses associated with dogs and cats: a survey of Portuguese pet owners' awareness and deworming practices, **Parasites and vectors**. v.9, n.245, p.1-9, 2016.

PEREIRA, M.G. **Epidemiologia teoria e prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 596p.

RYAN, U.; FAYER, R.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. **Parasitology**, v.141, p.1667-1685, 2014.

RYAN, U.; HIJJAWI, N.; New developments in *Cryptosporidium* research. **International Journal for Parasitology**, v.45, n.6, p.367-373, 2015.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. Giardia and Cryptosporidium join the “Neglected Diseases Initiative. **Trends in Parasitology**, v.22, n.5, p.203-8., 2006.

SILVA, A.M.B.; BOUTH, R.C.; COSTA, K.S.; CARVALHO, D.C.; HIRAI, K.E.; PRADO, R.R.; ARAÚJO, S.G.; PEREIRA, A.C.L.; RIBEIRO, K.T.S. Ocorrência de

enteroparasitoses em comunidades ribeirinhas. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, p. 45-51. 2014.

TEIXEIRA, W. F. P.; COELHO, W. M. D.; SOUTELLO, R. V. G.; OLIVEIRA, F. P.; HOMEM, C. G.; NUNES, C. M., et al. Diagnóstico de criptosporidiose em amostras fecais de bezerros por imunofluorescência direta e microscopia de contraste de fase. **Ciência Rural**, v.41, n.6, p. 1057-1062, 2011.

THOMAZ, A.; MEIRELES, M. V.; SOARES, R. M.; PENA, H. F.; GENNARI, S. M. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of felines, canines and bovines in the state of São Paulo, Brasil. **Veterinary Parasitology**, v. 150, n. 4, 291-296, 2007.

THOMPSON, R.C.A.; MONIS, P.T. **Taxonomy of Giardia species**. In: LUJAN, H.D., SVÄRD, S. *Giardia a model organism*. New York: Springer Wien. p. 3-15, 2011.

WHITE, C. **Cryptosporidium species**. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds) *Principles and practices of infectious diseases*, 7<sup>th</sup> edn. Churchill Livingstone, Elsevier, Philadelphia, 2010.

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

XIAO, L., LIMOR, J., MORGAN, U.M., SULAIMAN, I.M., THOMPSON, R.C.A., LAL, A.A. Sequence differences in the diagnostic target region of the oocyst wall protein gene of *Cryptosporidium* parasites. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, p. 5499–5502, 2000.

## APÊNDICE A– “Referências da Introdução Geral”

- ABDEL-MOEIN, K.A.; SAEED, H. The zoonotic potential of *Giardia intestinalis* assemblage E in rural settings. **Parasitology Research**, v. 115, p. 3197–2302, 2016.
- AMER, S.; ZIDANC, S.; ADAMU, H.; YE, J.; ROELLIG, D.; XIAO, L.; FENG, Y. Prevalence and characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Nile River delta provinces, Egypt. **Experimental Parasitology** v.135, p.518-23. 2013.
- ANKARKLEV, J.; JERLSTRÖM-HULTQVIST, J.; RINGQVIST, E.; TROELL, K.; SVÄRD, S.G. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 413-422, 2010.
- AREESHI, M.; BEECHING, N.; HART, C. Cryptosporidiosis in Saudi Arabia and Neighboring Countries. **Ann Saudi Medical Journal**, v. 27, n. 5, p. 325-332, 2007.
- BARTELT, L.A.; SARTOR, R.B. Advances in understanding *Giardia*: determinants and mechanisms of chronic sequelae. **F1000 Prime Reports**, v. 7, p. 62, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Plano nacional de vigilância e controle das enteroparasitoses. SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde, 42p., 2005
- BRESCIANI, K.D.S.; ISHIZAKI, M.N.; KANETO, C.N.; MONTANO, T.R.P.; PERRI, S.H.V.; VASCONCELOS, R.O.; DO NASCIMENTO, A.A. Frequência e intensidade parasitária de helmintos gastrointestinais em cães na área urbana do Município de Araçatuba, SP. **ARS Veterinária**, v.24, n.3, p.181-185, 2008.
- BURNET, J.B., PENNY, C., OGORZALY, L. AND CAUCHIE, H.M. Spatial and temporal distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* in a drinking water resource: Implications for monitoring and risk assessment. **Science Total Environment**, v. 472, p. 1023-1035, 2014.

CARDOZO, S. V.; TEIXEIRA W. L. Fo; LOPES C. W. G. Avaliação das técnicas de rotina no diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium baileyi* em amostras de fezes de frangos de corte (*Gallus gallus domesticus*). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p.351-353, 2008.

CACCIÒ, S.M.; LALLE, M.; SVÄRD, S.G. Host specificity in the *Giardia duodenalis* species complex. **Infection, Genetics and Evolution**, v.66, p.335-345, 2018.

CARVALHO, G. L. X.; MOREIRA, L.E.; PENA, J.L.; MARINHO, C.C.; BAHIA, M.T.; MACHADO-COELHO, G.L.L. A comparative study of the TF-Test®, Kato-Katz, Hoffman-Pons-Janer, Willis and Baermann-Moraes coprologic methods for the detection of human parasitosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.107, n.1, p.80–84, 2012.

CARVALHO, J. B.; SANTOS, B.M.; GOMES, J.F.; SUZUKI, C.T.; HOSHINO, S.S.; FALCÃO, A.X.; PIERUCCI, J.C.; MATOS, L.V.; BRESCIANI, K.D. TF-Test Modified: New Diagnostic Tool for Human Enteroparasitosis. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v.30, p.293–300, 2016.

CASEMORE, D. P. Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. **Journal Clinical Pathology**, v.44, n.6, p.445-451. 1991.

CIELOSZYK, J; GOÑI, P.; GARCÍA, A.; REMACHA, M. A.; SÁNCHEZ, E.; CLAVEL, A. Two cases of zoonotic cryptosporidiosis in Spain by the unusual species *Cryptosporidium ubiquitum* and *Cryptosporidium felis*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.2, n.30, p. 549-51, 2012.

COELHO, W. M. D.; GOMES, J. F.; AMARANTE, A. F. T.; BRESCIANI, K. D. S.; LUMINA, G.; KOSHINO-SHIMIZU, S.; LEME, D. P.; FALCÃO, A. X. A new laboratorial method for the diagnosis of gastrointestinal parasites in dogs. **Parasitologia Veterinária**, v 22, n.1, p.1-5, 2013.

COELHO, W. M. D.; GOMES, J.F.; FALCÃO, A.X.; SANTOS, B.M.; SOARES, F.A.; SUZUKI, C.T.; AMARANTE, A.F.; BRESCIANI, K.D. Comparative study of five

techniques for the diagnosis of canine gastrointestinal parasites. **Brazilian journal of veterinary parasitology**, v. 24, n. 2, p. 223-226, 2015.

COTTON, J.A.; BEATTY, J.K.; BURET, A.G. Host-parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. **International Journal for Parasitology**, v. 41, p. 925–933, 2011.

ELLIOT, A.; MORGAN U. M.; THOMPSON R. C. A. Improved staining method for detecting *Cryptosporidium* oocysts in stools using malachite green. **Journal Genetics Applied Microbiology**, v.45, n.3, p.139-142, 1999.

FANTINATTI, M.; BELLO, A.R.; FERNANDES, O.; DA-CRUZ, A.M. Identification of *Giardia lamblia* assemblage E in humans points to a new anthroponotic cycle. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, p. 1256–1259, 2016.

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

FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, p. 110–140, 2011.

GAAFAR, M. R. Evaluation of enzyme immunoassay techniques for diagnosis of the most common intestinal protozoa in fecal samples. **International Journal Infectious Diseases**, v,15, n.8, p.541-4, 2011.

GARCIA, L.C. **Diagnosis medical parasitology**. 5. ed. Washington: A.S.M. Press, 2007.

GARCIA, L.C. **Practical Guide to diagnostic parasitology**. 2. ed. Washington: A.S.M. Press, p 288-289, 2009.

GEURDEN T.; VERCRUYSSSE J.; CLAEREBOUT E. Is *Giardia* a significant pathogen in production animals? **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 98-110, 2010.

- GOMES, J.F.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; DIAS, L.C.S., et al. Evaluation of a Novel *Kit (TF-Test)* for the Diagnosis of Intestinal Parasitic Infections. **Journal of Clinical Laboratory Analysis, USA**, v. 18 n. 2, p.132-8, 2004.
- HUNTER, PAUL R.; NICHOLS, G. L. Epidemiological and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n.1, p.145-54, 2002.
- INACIO, S.V.; GOMES, J.F.; OLIVEIRA, B.C.M.; FALÇÃO, A.X.; SUZUKI, C.T.N.; SANTOS, B.M.; AQUINO, M.C.C.; RIBEIRO, R.S.P.; ASSUNÇÃO, D.M.; CASEMIRO, P.A.F.; MEIRELES, M.V.; BRESCIANI, K.D.S. Validation of a new technique to detect *Cryptosporidium* spp. oocysts in bovine feces. **Preventive Veterinary Medicine**, v.134, p1-5, 2016.
- ITOH, N.; KANAI, K.; KIMURA, Y.; CHIKAZA, W. A. S.; HORI, Y.; HOSHI, F. Prevalence of intestinal parasites in breeding kennel dogs in Japan. **Parasitology Research**, v.114, n.3, p.1221–4, 2015.
- JOSKO, D. Updates in immunoassays: parasitology. **Clinical Laboratory Science**, v.25, n.3, p.185–90, 2012.
- KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **Journal of Water and Health**, v. 5, p. 1-38, 2007.
- KOEHLER, A.V.; JEX, A.R.; HAYDON, S.R.; STEVENS, M.A.; GASSER, R.B. *Giardia/giardiasis*: a perspective on diagnostic and analytical tools. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 280–289, 2014.
- LI W.; LI Y.; SONG M.; LU Y.; YANG J.; TAO W.; JIANG Y.; WAN Q.; ZHANG S.; XIAO L. Prevalence and genetic characteristics of *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon bieneusi* and *Giardia duodenalis* in cats and dogs in Heilongjiang province, China. **Veterinary Parasitology**, v. 208, n3-4, p. 125-134, 2015.

LUMINA G; BRICARELLO P.A.; GOMES, J.F.; AMARANTE, A.F.T. The evaluation of TF-Test Kit for diagnosis of gastrointestinal parasite infections in sheep. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, p. 496-501, 2006.

MACPHERSON, C. N. L. The epidemiology and public health importance of toxocariasis: a zoonosis of global importance. **International journal for parasitology**, v.43, p.999–1008, 2013.

MAHBUBANI, M. H.; BEJ, A. K.; PERLIN, M.; SCHAEFER, F. W.; JAKUBOWSKI, W.; ATLAS, R. M. Detection of *Giardia* cysts by using the polymerase chain reaction and distinguishing live from dead cysts. **Applied Environmental Microbiol**, v.57, n.12, p.3456–61, 1991.

MMBAGA, B.T.; HOUPPT, E.R. *Cryptosporidium* and *Giardia* Infections in Children: A Review. **Pediatric Clinics of North America**, v.64, n.4, p.837-850, 2017.

NIJSSE, R.; PLOEGER, H. W.; WAGENAAR, J. A.; MUGHINI-GRAS, L. Prevalence and risk factors for patent *Toxocara* infections in cats and cat owners' attitude towards deworming. **Parasitology Research**, v.115, n12, p.4519–25, 2016.

O'DONOGHUE, P.J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. **International Journal of Parasitology**, v.25, n.2, p.139-195, 1995.

OTRANTO, D.; EBERHARD, M. L. Zoonotic helminths affecting the human eye. **Parasites and Vectors**, v.4, n.41, p.1-21, 2011.

PAGÈS-MANTÉ, A.; PAGÈS-BOSCH, M.; MAJÓ-MASFERRER, N.; GÓMEZ-COUSO, H.; ARES-MAZÁS, E. An outbreak of disease associated with cryptosporidia on a red-legged partridge (*Alectoris rufa*) game farm. **Avian Pathology**, v.36, n.4, p.275-278, 2007.

PEREIRA, A.; MARTINS, A.; BRANCAL, H.; VILHENA, H.; SILVA, P.; PIMENTA, P.; DIZ-LOPES, D.; NEVES, N.; COIMBRA, M.; ALVES, A. C.; CARDOSO, L.; MAIA, C.

Parasitic zoonoses associated with dogs and cats: a survey of Portuguese pet owners' awareness and deworming practices, **Parasites and Vectors**. v.9, n. 245, p.1-9, 2016.

PUMIPUNTU, N., PIRATAE, S. Cryptosporidiosis: A zoonotic disease concern. **Veterinary World**, v. 11, n.5, p. 681-686, 2018.

ROBERTSON, L.J., HANEVIK, K., ESCOBEDO, A.A., MØRCH, K., LANGELAND, N. Giardiasis – why do the symptoms sometimes never stop? **Trends in Parasitology**, v. 26, p. 75-82, 2010.

ROHELA, M.; LIM, Y.A.; JAMAIAH, I.; KHADIJAH, P.Y.Y.; LAANG, S.T.; NAZRI, M.H.; NARULHADA, Z. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in wrinkled hornbill and other birds in the Kuala Lumpur National Zoo. **Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health**, v.36, n.4, p.34-40, 2005.

RYAN, U., FAYER, R. AND XIAO, L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. **Parasitology**, v141, p. 1667-1685, 2014.

SANTARÉM, V. A.; GIUFFRIDA, R.; ZANIN, G. A. Cutaneous larva migrans: reports of pediatric cases and contamination by *Ancylostoma* spp larvae in public parks in Taciba, São Paulo State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.37, n.2, p.179-181, 2004.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. **Trends in Parasitology**, v. 22, p. 203–208, 2006.

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

SINGH, B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. **International Journal Parasitology**, v.27, n.10, p.1135–45, 1997.

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

ŠTRKOLCOVÁ, G.; MAĐAR, M.; HINNEY, B.; GOLDOVÁ, M.; MOJŽIŠOVÁ, J.; HALÁNOVÁ, M. Dog's genotype of *Giardia duodenalis* in human: first evidence in Europe. **Acta Parasitologica**, v. 60, p. 796–799, 2015.

TEIXEIRA, W. F. P.; COELHO, W. M. D.; SOUTELLO, R. V. G.; OLIVEIRA, F. P.; HOMEM, C. G.; NUNES, C. M., et al. Diagnóstico de criptosporidiose em amostras fecais de bezerros por imunofluorescência direta e microscopia de contraste de fase. **Ciencia Rural**, v.41, n.6, p. 1057-1062, 2011.

THOMPSON, R.C.A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, p. 15–35, 2004.

WEBSTER, K. A., Molecular methods for the detection and classification of *Cryptosporidium*. **ParasitologyToday**, v.9, p.263–266, 1993.

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

XIAO L.; FENG Y. Zoonotic cryptosporidiosis. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, v.52, n. 3, p. 309-323, 2008.

XIAO, L.; RYAN, U.M. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. **Current opinion in infectious diseases**, v. 17, p. 483–90, 2004.

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

XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. **Experimental**

**Parasitology**, v. 124, p. 80–89, 2010.

YOUSSEF, A. I.; UGA, S. Review of Parasitic Zoonoses in Egypt. **Tropical Medicine and Health**, v.42, n.1, p.3-14, 2014.

ZAHEDI, A.; FIELD, D.; RYAN, U. Molecular typing of *Giardia duodenalis* in humans in Queensland – first report of Assemblage E. **Parasitology**, v. 144, p. 1154–1161, 2017.

## ANEXO A – Comitê de Ética



Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)  
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"Viabilização de um sistema de análise automatizada do protozoário *Cryptosporidium* spp. e detecção da ocorrência em crianças de pré-escola e seus respectivos cães (*Canis familiaris*)"** sob responsabilidade do Pesquisador **KÁTIA DENISE SARAIVA BRESCIANI** e colaboração de Sandra Valéria Inácio, Jancarlo Ferreira Gomes, Alexandre Xavier Falcão, Sumie Hoshino Shimizu, Alessandro Francisco Talamini do Amarante e Celso Tetsuo Nagase Suzuki está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo **01343-2012**.

### CERTIFICATE

We certify that the research **"Feasibility of na Automated System Analysis protozoan *Cryptosporidium* spp. Occurrence and Detection in Pre-School Children and their Respective Dogs (*Canis familiaris*)"**, process number **01343-2012**, under responsibility of **KÁTIA DENISE SARAIVA BRESCIANI** and with collaboration of Sandra Valéria Inácio, Jancarlo Ferreira Gomes, Alexandre Xavier Falcão, Sumie Hoshino Shimizu, Alessandro Francisco Talamini do Amarante and Celso Tetsuo Nagase Suzuki agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



**Prof. Dr. Edilson Ervolino**  
CEUA Vice-Coordenador

Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Rua José Bonifácio, 1193 - CEP 16015-050 - Vila Mendocça - Araçatuba - SP  
Tel. (18) 3636-3234