

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**DETECÇÃO DE *Cryptosporidium* spp. EM AMOSTRAS FECAIS DE  
GATOS (*Catus felis domesticus*) DE GOIÂNIA, GOIÁS**

Leda Margarita Castaño Barrios  
Orientadora: Profa. Dra. Valéria de Sá Jayme

GOIÂNIA

2017



**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**       Dissertação       Tese

**2. Identificação da Tese ou Dissertação**

Nome completo do autor: Leda Margarita Castaño Barrios

Título do trabalho:

DETECÇÃO DE *Cryptosporidium* spp. EM AMOSTRAS FECAIS DE GATOS (*Catus felis domesticus*) DE GOIÂNIA, GOIÁS

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Leda Castaño Barrios

Assinatura do (a) autor (a) <sup>2</sup>

Data: 03 /04 /2017

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

<sup>2</sup>A assinatura deve ser escaneada.

LEDA MARGARITA CASTAÑO BARRIOS

**DETECÇÃO DE *Cryptosporidium* spp. EM AMOSTRAS FECAIS DE  
GATOS (*Catus felis domesticus*) DE GOIÂNIA, GOIÁS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Ciência Animal junto à Escola de  
Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de  
Goiás

**Área de Concentração**

Sanidade animal, higiene e tecnologia de alimentos

**Orientadora**

Profa. Dra. Valéria de Sá Jayme – EVZ/UFG

**Comitê de Orientação**

Prof. Dr. Guido F. Coelho Linhares – EVZ/UFG

Prof. Dr. Dunya Mara Cardoso Moraes – EVZ/UFG

GOIÂNIA

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

CASTAÑO BARRIOS , LEDA MARGARITA  
DETECÇÃO DE *Cryptosporidium* spp. EM AMOSTRAS FECAIS DE  
GATOS (*Catus felis domesticus*) DE GOIÂNIA, GOIÁS [manuscrito] /  
LEDA MARGARITA CASTAÑO BARRIOS . - 2017.  
xiv, 27 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Valéria de Sá Jayme ; co-orientador Dr.  
Guido F Coelho Linhares ; co-orientador Dr. Dunya Mara Cardoso  
Moraes.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola  
de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal, Goiânia, 2017.

Bibliografia.

Inclui siglas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. *C. felis*. 2. criptosporidiose. 3. felinos. 4. nested PCR. I. Jayme ,  
Valéria de Sá, orient. II. Título.

CDU 639.09

1 ATA NÚMERO 458 DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO PROGRAMA DE  
2 PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
3 DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS. Às 08h30min do dia 03/03/2017, reuniu-se na sala  
4 de defesas do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, a Comissão Julgadora infra  
5 nomeada para proceder ao julgamento da Defesa de Dissertação de Mestrado apresentado (a) pelo  
6 (a) Pós-Graduando (a) **Leda Margarita Castaño Barrios**, intitulada: "*Deteção de*  
7 *Cryptosporidium spp. em amostras fecais de gatos (Felis catus domesticus) de Goiânia, Goiás,*  
8 *utilizando a PCR em tempo real e NESTED PCR*", apresentado para obtenção do Título de Mestre  
9 em Ciência Animal, junto à Área de Concentração: **Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de**  
10 **Alimentos**, desta Universidade. O Presidente da Comissão Julgadora, **Profa. Dra. Valéria de Sá**  
11 **Jayme**, iniciando os trabalhos, concedeu a palavra ao (a) candidato (a) **Leda Margarita Castaño**  
12 **Barrios** para exposição em **quarenta** minutos do seu trabalho. A seguir, o senhor Presidente  
13 concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a arguir o (a)  
14 candidato (a), durante o prazo máximo de **vinte** minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para  
15 responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição, que se desenvolveu nos termos  
16 regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o (a)  
17 candidato (a) **Aprovado (a) ou Reprovado (a):**

18 Profa. Dra. Valéria de Sá Jayme (Orientador (a))

*Aprovada*

19 Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles

*APROVADA*

20 Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade

*aprovada*

21 Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o(a) candidato(a) **Leda Margarita**  
22 **Castaño Barrios**, *habilitada* [(Habilitado(a) ou não Habilitado(a))  
23 pelo(s) motivo(s) abaixo exposto(s):

24 \_\_\_\_\_  
25 \_\_\_\_\_  
26 \_\_\_\_\_  
27 \_\_\_\_\_  
28 \_\_\_\_\_  
29 \_\_\_\_\_  
30 \_\_\_\_\_  
31 \_\_\_\_\_  
32 \_\_\_\_\_  
33 \_\_\_\_\_

34

35

36 A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da dissertação:

37 *Deteção de Cryptosporidium spp. em amostras fecais*  
38 *de gado (Feliscatus domestica) de Goiânia, Goiás*

39

40

41

42

43 Nada mais havendo a tratar, eu **Profa. Dra. Valéria de Sá Jayme** lavrei a presente ata que, após  
44 lida e achada conforme foi por todos assinada.

45 Profa. Dra. Valéria de Sá Jayme

46 Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles

47 Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mi señora madre, mi super heroína, mi apoyo incondicional, por todos sus sacrificios, por nunca desistir de sus hijos, por muy tontos que seamos, por hacernos creer que podemos lograr todo lo que queremos, por siempre estar ahí sin importar cuantas veces caímos, por apoyarme en todos mis proyectos por locos que fueran.

A mi hermana, mi gran hermana mayor, por todo su amor y cariño, es mi gran inspiración y mi motivo de orgullo, por apoyarme en todo momento y por ser un ser especial e incondicional para mí.

## AGRADECIMENTOS

À Organização dos Estados Americanos (OEA) pela concessão da bolsa de estudo, para realizar o curso de Pós Graduação em Ciência Animal

À minha família, pela motivação e a força de sempre. Por incrível que pareça, aos meus filhos não humanos Garu e Humo, pela felicidade que me proporciona sua companhia, nunca me deixam sentir solidão.

A Mauricio Rodriguez Garzón, pela companhia, apoio e amor brindado durante toda esta fase da minha vida.

A minha orientadora, Prof. Dr. Valéria de Sá Jayme pela disposição para execução do projeto e a preocupação com minha saúde e bem-estar, sei que orientar estrangeiros não é fácil, é trabalho duplo graças às dificuldades na comunicação e redação (meu portunhol).

Ao meu coorientador, Prof Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares e a minha coorientadora Dr. Dunya Mara Cardoso Moraes pela disposição em me coorientar neste processo.

Aos escassos amigos com quem sempre posso contar, embora sejam poucos, sempre me estendem sua mão: Adriana Ortiz Bedoya, Alejandra Gómez Echavarría, Alejandro Valencia Zuleta, Dina Maria Beltran, Gisana Alves Bueno, Jeyli Luz Bravo e Mélyny Madrid.

À Universidade Federal de Goiás, em especial ao Departamento de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (EVZ/UFG).

Agradeço a toda à equipe do Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP, Campus de Araçatuba, em especial ao Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles, pelo apoio e orientação na realização da PCR.

À Prof Dr Iolanda Aparecida Nunes, pela colaboração com o teste da viabilidade das amostras desta pesquisa e ao Centro de Pesquisa em Alimentos da UFG.

À médica veterinária Ms. Rebeqa Cristine de Bastos Costa pela disposição e colaboração para que este projeto fosse possível.

As pessoas que fizeram parte desta etapa e que por coisas do destino hoje não acompanham meu andar. Devo muito agradecimento.



*“Vivir sin ataduras, caminar  
bajo la luna, andar por el  
mundo nutriendo el intelecto.  
Ser un ave de alas largas”.*

Leda Castaño Barrios

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Biologia de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	3
2.1. 2. Ciclo biológico .....	4
2.2. Patogenia.....	6
2.2.1. Criptosporidiose em gatos .....	7
2.3. Transmissão de <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	7
2.4. Importância em saúde pública.....	8
2.5. Diagnóstico de <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	10
3. OBJETIVO.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	12
3.1. Local.....	12
3.3. Preparação do material fecal e extração de DNA.....	13
3.4. Ensaio da reação em cadeia da polimerase (PCR).....	13
3.5. Purificação de DNA e caracterização molecular.....	14
4. RESULTADOS.....	16
6. DISCUSSÃO.....	19
7. CONCLUSÃO .....	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	23

**LISTA DE FIGURAS**

FIGURA 1 – Ciclo biológico de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	5
FIGURA 2- Frequência de amostras positivas e negativas em gatos de Goiânia. Estilo de vida (A), o sexo (B), a idade (C) e a localidade de coleta dos gatos (D).....	17
FIGURA 3- Area Under the Curve (AUC) do modelo de regressão logística multivariada sem a variável localidade (AUC=0,64) .....	18

**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 - Animais amostrados por cada uma das variáveis registradas.....	12
TABELA 2- Distribuição de animais positivos ao <i>Cryptosporidium</i> spp. do total das amostras avaliadas segundo as variáveis analisadas.....	16
TABELA 4 - Análise de regressão logística para determinação dos fatores risco da infecção por <i>Cryptosporidium</i> spp. em gatos do município de Goiânia .....	18

## RESUMO

Os objetivos do presente estudo foram detectar a presença de *Cryptosporidium* spp. por meio da técnica de *nested*-PCR em 95 amostras de fezes de gatos coletados em quatro localidades de Goiânia, Goiás (Brasil) e determinar (i) a frequência de *Cryptosporidium* spp., (ii) as espécies presentes, por meio de análise de sequências no *BLAST* e (iii) avaliar os fatores de risco: sexo, idade e estilo de vida dos gatos, por meio de regressão logística e OR (*odds ratio*). Detectou-se 17,9% (17/95) de infecção por *Cryptosporidium* spp., sendo 8,4% (8/95) em machos e 9,5% (9/95) em fêmeas. Do total dos animais amostrados, 7,4% (7/95) eram de vida livre e 10,5% (10/95) não livre. Dentre os positivos, 13,7% (13/95) tinham idade inferior a seis meses e 4,2% (4/95) idade igual ou superior a seis meses. Quanto à origem, 7,4 % (7/95) eram oriundos de Organização Não Governamental, 6,3% (6/95) do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás e 4,2 (4/95) do Campus Samambaia da Universidade Federal de Goiás. Foi detectada a circulação nos animais amostrados de *Cryptosporidium felis*, 88,2 % (15/17), *C. muris*, 5,9 % (1/17) e *Cryptosporidium* sp., 5,9 % (1/17). O único fator de risco identificado foi a idade inferior a seis meses ( $\chi^2 = 4,3$ ,  $p = 0.04$ , OR = 3,4). Conclui-se que, nas condições em que o estudo foi realizado, há animais positivos para *Cryptosporidium* spp. Pelo menos duas espécies de *Cryptosporidium* circulam entre os gatos amostrados e afetam principalmente aqueles animais com idade inferior aos seis meses.

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

## ABSTRACT

The purpose of this study was to detect the presence of *Cryptosporidium* spp. by the nested PCR in 95 samples of cat feces collected in four localities in Goiânia, Goiás, Brazil. In positive samples, we determined: (i) the frequency of *Cryptosporidium* spp., (ii) the species present, through BLAST sequences analysis, and (iii) risk factors (age, sex, and lifestyle of cats) using logistic regression and odds ratio (OR). We identified 17.9% (17/95) of samples were positive for *Cryptosporidium* spp. infection and, of these, 8.4% (8/95) were from males and 9.5% (9/95) from females. Among total samples, 7.4% (7/95) were from free-living animals and 10.5% (10/95) from non-free; 13.7% (13/95) were under six months of age and 4.2% (4/95) over six months of age. Regarding their origins, 7.4% (7/95) were from NGOs, 6.3% (6/95) from the University Veterinary Hospital, and 4.2 (4/95) from the premises of “Campus Samambaia”. was detected circulating of *C. felis* 88.2 % (15/17), *C. muris* 5.9% (1/17) and *Cryptosporidium* sp. 5.9% (1/17) in the sampled animals. The only risk factor was age, for cats younger than six months ( $\chi^2 = 4.3$ ,  $p = 0.04$ , OR = 3.4). This study demonstrated the existence of positive animals for *Cryptosporidium* spp. At least two species of *Cryptosporidium* circulate among the cats studied, affecting mainly cats under the age of six months.

**Key-words:** *C. felis* criptosporidiose, felinos, nested PCR.

## 1. INTRODUÇÃO

A valorização do gato como animal de companhia tem permitido o incremento do número destes animais nos lares em áreas urbanas principalmente, graças ao fácil manejo dos exemplares, sua capacidade de preencher o espaço afetivo nos entornos familiares e a boa companhia que oferecem, além da influência positiva na saúde e bem-estar humanas. Este cenário tem estreitado o contato dos gatos com o homem, aumentando as chances de exposição a agentes zoonóticos<sup>1</sup>.

A população de gatos em domicílios brasileiros é estimada em 22,1 milhões, o que representa aproximadamente 1,9 gato por domicílio, equivalente a 11,5 milhões de unidades domiciliares (17,7%) com presença de pelo menos um animal. As estimativas apontam que 14,3% da população nacional de gatos domiciliados encontra-se concentrada na região Centro - Oeste<sup>2</sup>.

Esses animais têm importância epidemiológica na dispersão de doenças parasitárias, devido ao seu comportamento independente e o hábito de se alimentarem, quando livres, de presas animais de tamanho inferior. Normalmente, percorrem distâncias consideráveis ao redor do domicílio e tendem à eliminação de fezes fora da moradia, o que dificulta estudos epidemiológicos que incluam exames coproparasitológicos<sup>3</sup>.

Além disso, têm sido apontados como hospedeiros de protozoários com potencial zoonótico como o *Cryptosporidium* spp.<sup>4</sup>, parasita intracelular obrigatório, relatado como problema de saúde pública em diversos países e como uma doença negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), devido principalmente a suas características biológicas<sup>5</sup>.

O diagnóstico e classificação taxonômica de *Cryptosporidium* spp. apresentam ainda dificuldades, seja pelos custos das técnicas que oferecem maior confiabilidade ou pelo fato de ainda existirem lacunas no conhecimento. A utilização de técnicas moleculares avançadas tem permitido uma ampliação nos conhecimentos taxonômicos e sistemáticos do *Cryptosporidium*<sup>6,7</sup>. Ainda assim, não estão totalmente elucidadas as taxas reais de prevalência, o papel dos animais de companhia na transmissão da doença, seu impacto na saúde humana e animal e a taxonomia, já que alguns autores sugerem que o *Cryptosporidium* é um protozoário gregariano e não coccídio<sup>7-10</sup>. Assim, estudos são imprescindíveis para uma melhor

identificação, entendimento da biologia e a interação existente entre este parasito e seus hospedeiros.

Portanto, é necessária a realização de mais estudos de caracterização epidemiológica e molecular desse protozoário, que permitam identificar as espécies circulantes no Brasil em humanos e animais, para ampliar o conhecimento sobre a epidemiologia da doença, as formas de transmissão prováveis e a prevenção de possíveis surtos<sup>10</sup>, o que justifica a realização do presente estudo.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Biologia de *Cryptosporidium* spp.

Foram identificadas e reconhecidas cerca de 30 espécies de *Cryptosporidium* (Quadro 1), das quais 20 têm mamíferos como hospedeiros, sendo 17 classificadas como zoonóticas ou identificadas nos seres humanos<sup>11</sup>. A taxonomia deste protozoário apresenta problemas<sup>8, 9</sup>, assim, até a data o número real das espécies existentes gera controvérsia<sup>12</sup>. Além disso há uma constante descrição de novas espécies, como o caso do *C. rubeyi*, descrita em esquilos (*Spermophilus* sp.)<sup>13</sup>, *C. huwi*, em peixes (*Poecilia reticulata*)<sup>14</sup> e *C. avium* em aves<sup>15</sup>.

Por meio da análise genética foram identificados pelo menos 61 genótipos diferentes em diversas espécies<sup>11</sup>, destacando-se que este protozoário apresenta um comportamento espécie-específico. Oocistos recuperados de amostras fecais de gatos, cães e humanos têm revelado que estes hospedeiros são infectados com espécies específicas, assim, os gatos são geralmente infectados com *C. felis*, os cães com *C. canis* e o humano com *C. hominis* e *C. parvum*<sup>16</sup>. Não entanto, existem algumas espécies de baixa especificidade ou pouco específicas, como o *C. muris* que tem sido ocasionalmente relatado em cães e gatos<sup>17-19</sup>, assim como *C. meleagridis*, *C. felis* e *C. canis* relatadas em humanos<sup>20</sup>.

QUADRO 1- Espécies de *Cryptosporidium* spp. e seus principais hospedeiros.

Nome da espécie	Hospedeiro	Autor
<i>C. andersoni</i>	Bovinos, humanos (A)	Lindsay et al. (2000)
<i>C. avium</i>	Aves	Holubova N et al. (2016)
<i>C. baileyi</i>	Aves (B, C, TR)	Current et al. (1986)
<i>C. bovis</i>	Bovinos (ID)	Fayer et al. (2005)
<i>C. canis</i>	Caninos, humanos (ID)	Fayer et al. (2001)
<i>C. cuniculus</i>	Coelhos (D)	Robinson et al. (2010)
<i>C. fayeri</i>	Canguru vermelho, humanos	Ryan et al. (2008)
<i>C. felis</i>	Felinos, humanos (ID)	Iseki (1979)
<i>C. fragile</i>	Anfíbios (E)	Jirku et al. (2008)
<i>C. galli</i>	Aves (P)	Pavlásek (1999); Ryan et al. (2003)
<i>C. hominis</i>	Humanos (ID)	Morgan-Ryan et al. (2002)
<i>C. huwis</i>	Peixes	Ryan, et al. (2015)
<i>C. macropodum</i>	Canguru gigante	Power e Ryan (2008)
<i>C. meleagridis</i>	Aves, mamíferos, humanos (ID)	Slavin (1955)
<i>C. molnari</i>	Peixes (E)	Alvarez-Pellitero e Sitja-Bobadilla (2002)
<i>C. muris</i>	Roedores, mamíferos, humanos (E)	Tyzzer (1910)
<i>C. parvum</i>	Camundongo, bovinos, homem (ID)	Tyzzer (1912)
<i>c. rubeyi</i>	Esquilos	Li et al. (2015)

QUADRO 1- Espécies de *Cryptosporidium* spp. e seus principais hospedeiros (continuação).

Nome da espécie	Hospedeiro	Autor
<i>C. ryanae</i>	Bovinos (D)	Fayer et al. (2008)
<i>C. saurophilum</i>	Lagartos (E, ID)	Koudela e Modrý (1998)
<i>C. serpentis</i>	Lagartos, serpentes (E)	Brownstein et al. (1977); Levine (1980)
<i>C. scophthalmi</i>	Peixes (E, ID)	Alvarez-Pellitero et al. (2004)
<i>C. suis</i>	Suíños, humanos (ID, IG)	Ryan et al. (2004)
<i>C. tyzzeri</i>	Camundongos (ID)	Ren et al. (2012)
<i>C. ubiquitum</i>	Ruminantes, humanos (ID)	Fayer et al. (2010)
<i>C. varanii</i>	Lagartos	Pavlásek et al. (1995)
<i>C. viatorum</i>	Mamíferos, humanos (D)	Elwin et al. (2012)
<i>C. wrairi</i>	Cobaia (ID)	Vetterling et al. (1971)
<i>C. xiaoi</i>	Ovinos (D)	Fayer e Santin (2009)

**Legenda:** Espécies de *Cryptosporidium*, principais hospedeiros e principais locais de infecção: Principais sítios de infecção do parasito no hospedeiro: A-abomaso; B-bursa; C-cloaca; Eestômago; ID-intestino delgado; IG-intestino grosso; P-proventrículo; TR-trato respiratório.

Fonte: modificado de Xiao, Fayer<sup>21</sup>

## 2.1. 2. Ciclo biológico

O ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. caracteriza-se por ser monoxeno, eliminando a necessidade de um hospedeiro intermediário, o que o diferencia dos demais coccídios<sup>22</sup>.

O ciclo compreende seis estágios de desenvolvimento: (i) excistação dos oocistos, (ii) merogonia, (iii) gametogonia, (iv) fertilização, (v) esporogonia e (vi) formação da parede dos oocistos<sup>23</sup>. A eliminação de oocistos esporulados nas fezes ou secreções respiratórias do hospedeiro infectado são responsáveis pela contaminação ambiental e transmissão da doença<sup>24</sup> (Figura 1).

### i. Excistação

O ciclo biológico é iniciado com a ingestão de oocistos viáveis (esporulados) presentes na água e alimentos contaminados, fezes de animais e humanos e, com menor frequência, pela inalação<sup>22, 23</sup>.

O oocisto possui uma parede de duas camadas muito resistentes, composto por quatro esporozoítos haploides. Após a ingestão dos oocistos, no trato gastrointestinal, ocorre a ruptura da parede do oocisto, mediante a ação de enzimas parasitárias como a proteinase da cistina, responsável de degradar muco, assim como a ação de enzimas intestinais do hospedeiro<sup>25</sup>. Além da ação do pH, temperatura, sais biliares, enzimas pancreáticas, proteasas ao nível intestinal e o contato direto dos oocistos e o ácido siálico, presentes na superfície das células intestinais ocasionando a liberação dos esporozoítos infectantes<sup>23</sup>. Este processo ocorre

só em parasitas metabolicamente ativos<sup>25</sup>.

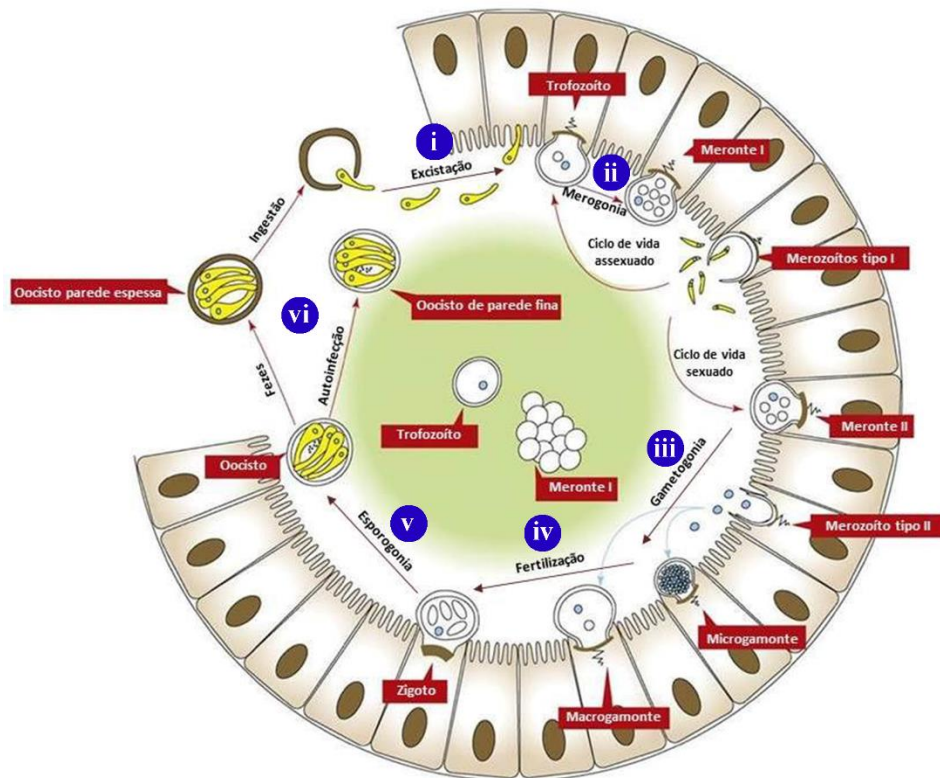


FIGURA 1 – Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp.

Fonte: Barta JR, Thompson ARC<sup>8</sup>.

## ii. Merogonia

Os esporozoítos liberados aderem-se ou fixam à superfície das células epiteliais do trato gastrintestinal, através do antígeno tipo circumporozoíto, a um receptor presente nas vilosidades intestinais e penetram ao interior dos entéroцитos, iniciando o processo de invasão, onde são envolvidos ou englobados pelas células epiteliais do hospedeiro na superfície luminal, e formam um vacúolo parasitóforo de localização intracelular extra citoplasmática<sup>26</sup>. Uma organela de fixação ou de nutrição desenvolve-se e os esporozoítos tornam-se mais esféricos, convertendo-se em trofozoítos ou merozoítos<sup>23</sup>.

Os trofozoítos iniciam o processo de maturação, fase correspondente à multiplicação assexuada (esquizogonia ou merogonia), sofrendo três divisões nucleares e originam merontes tipo I, que contêm seis a oito merozoítos haploides. A ruptura do esquizonte resulta na liberação dos merozoítos, que invadem as células epiteliais adjacentes, onde eles desenvolvem-se subsequentemente em esquizontes tipo II que contêm quatro merozoítos<sup>26, 27</sup>.

## iii. Gametogonia

Os merozoítos tipo I podem originar novos merontes tipo I, possibilitando a

reinfeção do animal, ou originar merontes tipo II, que são liberados no lúmen intestinal e infestam novas células, onde iniciam a fase sexuado do ciclo ou gametogonia<sup>28</sup>. Os merozoítos da segunda geração, ao infectarem novas células, diferenciam-se em macrogamontes, que originarão o gameta feminino, ou em microgamontes, que originarão os gametas masculinos (microgametas), e iniciam o ciclo sexuado<sup>24</sup>.

iv. Fertilização

Os microgamontes tornam-se multinucleados e liberam os microgametas maduros que fertilizam os macrogametas dentro do macrogamonte feminino, produzindo um zigoto<sup>28</sup>.

v. Esporogonia

Após da fertilização, o zigoto sofre duas divisões nucleares, fase denominada esporogonia, e origina o oocisto esporulado contendo quatro esporozoítos. Estes encontram-se contidos dentro do oocisto, que finalmente é liberado do entérocito e eliminado ao meio ambiente ou na luz intestinal<sup>24</sup>.

vi. Formação de parede

A formação de uma parede ao redor do zigoto origina o oocisto. Esta, resulta da união dos corpos formadores de parede presentes no macrogameto antes de ser fertilizado. Os oocistos formados podem ser de parede espessa (80% deles), estes possuem parede trilaminar, e são liberados do vacúolo parasitóforo e excretados nas fezes ou pela secreção nasal. Na forma esporulada (infectante), são responsáveis pela transmissão (i) entre hospedeiros, pois resistem às condições ambientais, ou (ii) autoinfecção, aqueles de parede delgada (cerca de 20%), que constituem a forma exógena infectante e permanecem no hospedeiro, já que estes oocistos sofrem o processo de excitação endogenamente e os esporozoítos são liberados na luz intestinal, os quais parasitam novos entérocitos<sup>24</sup>.

O processo de autoinfecção é importante em indivíduos imunocomprometidos, pelo fato de manter ou agravar o quadro clínico e possibilitar o caráter crônico da doença.

## 2.2. Patogenia

Fatores como o estado imunitário do hospedeiro, virulência da espécie infectante, e o tamanho do inóculo determinam a patogenicidade do parasita. A instauração da infecção é dada pela ingestão de oocistos na forma infectante<sup>22</sup>.

Este protozoó pode ser localizado por todo o trato gastrointestinal, além, existem reportes da presença de alguns estágios de desenvolvimento de *Cryptosporidium* spp. a nível biliar<sup>29</sup> e respiratório<sup>30,31</sup>. Lesões como colecistite, hepatite e pancreatite tem sido relacionados

com criptosporidiose extra-intestinal<sup>32</sup>.

A invasão das células do hospedeiro é restrita ao bordo luminal dos enterócitos e produz deslocamento da borda dos microvilos e perda do epitélio da superfície. Isso causa mudanças na arquitetura dos vilos, com inflamação e atrofia dos mesmos, destruição e hiperplasia das células da cripta e infiltração da célula mononuclear na lâmina própria, resultando em perda da superfície de absorção e desequilíbrio no transporte de nutrientes<sup>23</sup>.

A criptosporidiose apresenta mecanismos osmóticos, inflamatórios e secretórios, sendo estes multifatoriais, relacionados à ação do parasito e seus produtos na camada epitelial e às respostas imunológicas e inflamatórias do hospedeiro<sup>23</sup>.

### **2.2.1. Criptosporidiose em gatos**

A criptosporidiose em gatos geralmente é assintomática, mas caracteriza-se pela apresentação de episódios recorrentes de diarreia, perda de peso e com frequência apresenta-se junto a outras infecções e doenças imunossupressoras. A excreção dos oocistos nas fezes pode persistir por mais de seis meses com sinais clínicos oscilantes<sup>33</sup>.

O aspecto mais comum é a diarreia aquosa profusa, geralmente de coloração amarelo palha e odor desagradável. Outros sinais clínicos observados incluem desidratação, má-absorção, febre, anorexia, perda de peso, fraqueza, depressão, sonolência e algumas vezes distensão abdominal. A maioria dos animais exibe recuperação espontânea dentro de uma a duas semanas de infecção, mas a letalidade pode ser significativa em animais jovens, animais imunossuprimidos ou imunodeficientes, nos quais infecções graves têm sido detectadas, podendo ocorrer definhamento e morte<sup>34</sup>.

A taxa real de prevalência do parasito em gatos não é bem conhecida. Os estudos são limitados à identificação da infecção por *Cryptosporidium* spp. em gatos no mundo, com taxas de prevalência variando de 0% a 29,4%<sup>35-37</sup>. No Brasil, a prevalência de criptosporidiose em gatos é variável, relatando-se taxas entre 3,9% a 14,44%, prevalecendo a infecção por *C. felis*, e em menor quantidade infecção por *C. muris*<sup>38, 39</sup>.

### **2.3. Transmissão de *Cryptosporidium* spp.**

A transmissão de *Cryptosporidium* spp. pode ocorrer pela (i) inalação de ar infectado, (ii) via fecal-oral, (iii) por contato direto com pessoas ou animais infectados, e (iv) de forma indireta pela ingestão de alimento e água contaminados<sup>35</sup>.

Casos de transmissão de *Cryptosporidium* spp. inter-humana têm sido frequentemente relatada entre pessoas com contato frequente, como membros da mesma residência ou família<sup>40</sup>, parceiros sexuais (monogâmicos e poligâmicos, tanto heterossexuais como homossexuais)<sup>41</sup> e entre crianças-crianças, assim como crianças-funcionários, em creches<sup>42</sup>.

Numerosos casos de transmissão zoonótica de *Cryptosporidium* spp. têm sido reportados em estudos epidemiológicos, a maioria envolvendo humanos que cuidavam de animais de estimação ou de produção<sup>4, 43-46</sup>. Nesta modalidade destaca-se um estudo de associação entre a criptosporidiose em idosos e seus respectivos gatos domiciliados, embora não tenha sido realizada a caracterização molecular para determinação da espécie isolada<sup>4</sup>.

#### **2.4. Importância em saúde pública**

A criptosporidiose é uma doença descrita em muitos países, sendo muito factível o surgimento em países onde ainda não foi registrada e disseminar-se conforme o crescimento populacional<sup>47</sup>. Esta doença é classificada como negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS)<sup>5</sup>. Além disso, o risco que representa à saúde é subestimado. Apesar da importância do protozoário na saúde pública, o número de pessoas infectadas é incerto, e ainda não se tem uma estimativa exata da prevalência desta doença<sup>47</sup>.

O fato de não ser uma doença de notificação obrigatória, somado à deficiência da notificação dos casos confirmados aos órgãos responsáveis, assim com a dificuldades no diagnóstico, inadequada procura por assistência médica, apresentação de infecções assintomáticas, falta de informação dos médicos, ausência de requisição de exames laboratoriais, estreito relacionamento com condições de vida precárias, além de hábitos de higiene deficientes podem ser consideradas como razões influentes na subestimativa dos valores reais da prevalência da doença em humanos<sup>23</sup>.

Já que o protozoário é um organismo ubíquo e altamente infeccioso, com grande variedade de reservatórios, o risco de adquirir a infecção é alto. O oocisto possui grande potencial de contaminação ambiental, relacionada a uma variedade de determinantes, como: (i) as características de resistência e viabilidade no meio ambiente e de eliminação<sup>11</sup>, (ii) a facilidade de disseminação que leva a existência de um grande número de animais infectados, (iii) quantidade de oocistos excretados, (iv) as práticas agrícolas, (v) a conduta e atividade do hospedeiro, (vi) as condições socioeconômicas e étnicas nas ações humanas, (vii) a distribuição

geográfica, (viii) o saneamento, (ix) a proteção de fontes e suprimentos de água potável e alimento e (x) o clima e hidrogeologia da área<sup>11, 48</sup>.

Outro aspecto importante quanto à transmissão de *Cryptosporidium* spp., é o fato do humano participar no processo de dispersão dos oocistos, ao usar fezes de animais ou próprias como adubo orgânico e ao realizar o lançamento indevido de resíduos agrícolas e de esgoto não tratado ou tratado inadequadamente nos rios e mares<sup>23, 48</sup>

Além, acredita-se que a dose infectante de *Cryptosporidium* spp. em humanos seja baixa, sendo 10 - 100 oocistos suficientes para desencadear a infecção. Esta pode variar dependendo da fonte, subtipo ou cepa do parasita, umidade, viabilidade dos oocistos, exposição dos oocistos ao estresse ambiental e virulência. A apresentação da doença e os sintomas manifestados, ocorrem em função das características do parasita, da dose infectante e da imunidade dos indivíduos expostos. Baixa dose infectante pode resultar em período de incubação prolongado ou reduzir a probabilidade de manifestações clínicas<sup>22</sup>.

Graças ao potencial de contaminação ambiental desse protozoário e a alta capacidade de infectar com uma dose infectante baixa, os surtos ocorrem com muita facilidade, com vários registros em diferentes países. Estes surtos além de representarem riscos à saúde, interferem na economia devido aos custos médicos e perda da produtividade<sup>47, 49</sup>.

As espécies que usualmente acometem humanos são *C. hominis* e *C. parvum*. Infecções por *C. parvum* são comuns nos países desenvolvidos, em quanto que, *C. hominis* está presente em mais de 70% dos casos apresentados em crianças nos países em desenvolvimento<sup>50</sup>.

A frequência de apresentação da infecção em crianças tem sido relatada por diversos autores que destacam o fato das mesmas apresentarem sistema imunológico imaturo, hábitos de higiene ainda em formação e terem maior contato com o solo, o que as predispõem e as tornam susceptíveis à infecção por este protozoário. Isso posiciona o patógeno entre os principais agentes de diarreia infecciosa e importante causa de morbimortalidade em crianças abaixo de cinco anos de idade<sup>51</sup>.

Destaca-se que, apesar do impacto socioeconômico, diversos países onde a doença está presente ainda não têm um adequado programa de monitoramento e prevenção. Esse cenário contribui para o desconhecimento do real impacto da doença em países em desenvolvimento, como o Brasil. Os métodos de diagnóstico moleculares e de tipificação ideais para a identificação desse parasita, contam com a desvantagem de terem um elevado custo, pelo que comumente métodos de diagnóstico pouco sensíveis são empregados. Estes métodos não oferecerem a possibilidade de identificação das espécies, o que impossibilita avaliar as rotas de transmissão e elucidar formas de prevenção eficazes<sup>10, 47</sup>.

## 2.5. Diagnóstico de *Cryptosporidium* spp.

Para detectar a infecção por *Cryptosporidium* spp. em seres humanos e animais têm sido utilizados métodos como os: (i) microscópicos, (ii) imunológicos e (iii) moleculares<sup>52</sup>.

Os diferentes métodos empregados apresentam vantagens e desvantagens quanto à eficácia do diagnóstico. A microscopia é considerada o método de eleição por ser um método relativamente simples, de baixo custo e que oferece boa sensibilidade<sup>53</sup>. Entretanto, apresenta a desvantagem de demandar um técnico experiente, além de estar sujeito a erros. Este método não é útil para avaliar amostras submetidas a condições desfavoráveis, como as amostras ambientais, nas quais pode-se encontrar modificada a morfologia do oocisto<sup>54</sup> e, mais importante, não permite a identificação da espécie de *Cryptosporidium* spp. presente na amostra<sup>55</sup>.

Os métodos imunológicos e moleculares, dependendo do objetivo ou tipo de amostras, oferecem um diagnóstico de melhor qualidade. Por exemplo, as técnicas imunológicas permitem identificar oocistos nas fezes expostas a condições ambientais adversas e em amostras ambientais<sup>56</sup>. Já as técnicas moleculares permitem identificação da espécie e genótipo, apresentam uma boa sensibilidade e especificidade e podem ser empregadas nas amostras clínicas e ambientais, possibilitando um resultado confiável em amostras com baixa quantidade de oocistos<sup>57</sup>. Porém, estes métodos têm a desvantagem de ser mais custosos que os microscópicos, além da probabilidade de apresentar resultados falsos positivos<sup>53</sup>.



### 3. OBJETIVO

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de detectar a presença, identificar as espécies de *Cryptosporidium* spp. e os fatores de risco para a infecção em gatos (*Catus felis*), através da técnica de *nested* PCR.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Local

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Doenças Parasitárias do Setor de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (SMVP/EVZ/UFG) e no Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Araçatuba.

### 3.2. Material analisado

Foram utilizadas 95 amostras fecais de gatos oriundas do banco de amostras criopreservadas no Laboratório de Doenças Parasitárias da EVZ/UFG. As amostras analisadas foram colhidas no Campus Samambaia/UFG, em uma Organização Não Governamental (ONG), no Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental (DVSA) e de gatos atendidos no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (HV/EVZ/UFG). Cada amostra de fezes passou por processo de lavagem, recuperação de oocistos e extração de DNA de acordo com Salant et al.<sup>59</sup>. O material obtido após este processo foi mantido a -20°C, até a realização do *nested* PCR no Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP.

Foram considerados os seguintes dados relativos a cada gato amostrado: (i) sexo, (ii) estilo de vida dos animais (vida livre ou não) e (iii) idade. Registra-se que no momento da colheita das amostras, a idade dos animais foi determinada pela cronologia dental, segundo Gorrel<sup>58</sup>, sendo que os animais com a perceptível troca dos dentes e ausência de dentes molares foram classificados com idade inferior a seis meses (< seis meses) e os animais que tinham visível a presença dos dentes molares como igual ou superior a seis meses ( $\geq$  seis meses).

O *n* amostral estudado, de 95 animais, foi dividido em categorias segundo o sexo, estilo de vida, idade e localidade (Tabela 1).

TABELA 1 - Animais amostrados por cada uma das variáveis registradas

Categoria	Variável	Total	%
Sexo	Machos	46	48,4
	Fêmeas	49	51,6
Estilo de vida	Vida livre	47	49,5
	Não livre	48	50,5
Fase de vida	$\geq$ seis meses	51	53,7
	< seis meses	44	46,3
Localidade	Campus	33	34,7
	ONG	44	46,3
	DVSA	6	6,3
	HV	12	12,6

### 3.3. Preparação do material fecal e extração de DNA

O protocolo descrito por Salant et al.<sup>59</sup> foi empregado para recuperação dos possíveis oocistos presentes nas amostras avaliadas, com a seguinte modificação: uso do *kit* PureLink™ Genomic DNA *Mini Kit* – 50 preps (Invitrogen®) em vez do *kit* QIAamp DNA *Stool Mini Kit* (Qiagen®) para a extração de DNA.

Inicialmente, 1g de fezes de cada amostra foi misturado com 10mL de água bidestilada e centrifugada a 2000g /10 min, o sobrenadante foi descartado e novamente foram acrescentados mais 10mL de água bidestilada. Após este procedimento, o processo foi repetido por mais duas vezes.

Após a quarta lavagem, o sobrenadante foi descartado, restando aproximadamente 1mL de material fecal. A esta amostra foi acrescentado 1mL de solução de *Sheather* (106 g de açúcar, 100mL de água bidestilada, 0.8mL fenol, GE=1,26). A mistura resultante foi centrifugada a 1.000g / 10min. Após a centrifugação 1mL do sobrenadante foi transferido para tubos de ensaio, e adicionados 9mL de água bidestilada. Esta solução foi centrifugada a 2.500g/10 min.

Após descartar o sobrenadante, 200µL do tampão ASL (*Buffer ASL for Stool Lysis Buffer*, Qiagen®) foram acrescentados juntamente pérolas de vidro, com agitação em vortex, totalizando um volume de 400µL. A mistura foi agitada, com intermitente congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria, a 60°C, por cerca de 1 min, com intervalos de 10 min e com três repetições, para ruptura dos oocistos que estivessem presentes nas amostras.

Após esse processo, o material foi centrifugado a 1.000g por 10min e retirados 200µL do sobrenadante para a extração de DNA, sendo que a incubação com proteinase K a 60°C foi realizada por uma hora<sup>59</sup>. O eluato combinado obtido da extração, 100µL por amostra, foi dividido em três alíquotas e armazenado a -20°C até análise de *nested* PCR.

### 3.4. Ensaios da reação em cadeia da polimerase (PCR)

A amplificação de fragmentos do gene da subunidade 18S do RNA ribossômico, foi realizada pela técnica de *nested* PCR<sup>60</sup>.

Para a reação primária um produto de PCR de 763 pares de bases (pb) foi amplificado empregando os *primers* senso 18SiCF2 (5-GAC ATA TCA TTC AAG TTT CTG ACC-3) e antisenso 18SiCR2 (5-CTG AAG GAG TAA GGA ACA ACC-3). Para a reação secundária um fragmento de ~587 pb foi amplificado utilizando 1 µl do produto da PCR primária e os *primers* senso 18SiCF1 (5-CCT ATC AGC TTT AGA CGG TAG G-3) e

antisense 18SiCR1 (5-TCT AAG AAT TTC ACC TCT GAC TG-3) desenhados por Ryan et al.<sup>61</sup>.

As ampliações pela *nested* PCR foram realizadas em um volume final de 25µl de solução contendo 12,50 µL do Mix PCR (*Jump start - sigma*), 200nM de cada oligonucleotido (*primers*), 1 µL de cada DNA alvo e 0,6 µg/µl de BSA (albumina sérica bovina). A cada reação de amplificação foram incluídos dois controles positivos (*C parvum*), previamente testados, e dois controles negativos (água ultrapura).

As amostras foram submetidas à desnaturação inicial do DNA a 94° C por três minutos, seguida de 39 ciclos, cada uma consistindo em desnaturação a 94° C por 45 segundos, 45 segundos de anelamento a 55° C e 60 segundos de extensão a 72° C, com extensão final a 72° C por sete minutos.

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

### 3.5. Purificação de DNA e caracterização molecular

Os fragmentos resultantes da *nested* PCR foram purificados utilizando-se o *kit* comercial QIAquick® Gel Extraction *kit* 50 (Qiagen, Alemanha), segundo as recomendações do fabricante, quantificados e submetidos ao sequenciamento bidirecional no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) da UNESP Campus de Jaboticabal, mediante o uso do ABI Prism ®*Dye Terminator* 3.1 (Applied Biosystems, EUA), em sequenciador automático ABI 3730XL (Applied Biosystems, EUA).

A determinação da sequência consenso foi realizada por meio do *software* *Codoncode Aligner v. 1.5.2.* (*CodonCode Corp.*, EUA). Somente foram considerados nucleotídeos com valores de qualidade de sequenciamento maior ou igual a 20. Após determinação da sequência consenso dos fragmentos amplificados pela *nested* PCR, foi realizado seu alinhamento com auxílio dos programas *Clustal W*<sup>62</sup> e *BioEdit® Sequence Alignment Editor*<sup>63</sup>, tomando-se como base sequências homólogas disponíveis no *GenBank*, por meio da análise com o *BLAST*.

### 3.6. Análise de dados

Avaliou-se o efeito que as variáveis sexo, idade e estilo de vida exercem sobre a infecção por *Cryptosporidium* spp. por meio do teste Chi quadrado ( $\chi^2$ ) do pacote MASS<sup>64</sup>. Para a localidade foi usado o teste exato de Fisher por meio da função “*fisher.test*” para avaliar a dependência com a presença de *Cryptosporidium* spp. Posteriormente, comparações entre as

diferentes localidades foram feitas com a função “*pairwise.fisher.test*” do pacote *fmbs*<sup>65</sup> para determinar onde encontrava-se a possível variação.

Foi realizado um modelo de regressão logística multivariada com as variáveis sexo, idade e estilo de vida, por meio da função “*glm*” para determinar a influência das variáveis sobre a presença de *Cryptosporidium* spp. A partir do modelo foram calculados valores estimados para cada gato amostrado com a função “*predict.glm*”, para avaliar a eficácia do modelo com “*roc*” do pacote *pROC*<sup>66</sup>.

A chance da infecção ocorrer foi calculada pelo *odds ratio* (OR) com o intervalo de confiança (IC), usando a função “*logistic.display*” do pacote *epiDisplay*<sup>67</sup> para cada variável por separado e o valor ajustado baseado no modelo. Todas as análises foram feitas utilizando o *R software*<sup>68</sup>, considerando um nível de significância de  $p = 0,05$ .

#### 4. RESULTADOS

Das 95 amostras avaliadas, 17,9% (17/95) foram positivas. Destas 41,2% (7/17) eram correspondentes a animais de vida livre e 58,8% (10/17) não livre. Em relação ao sexo, 52,9% (9/17) eram fêmeas e 47,1% (8/17) machos. Dentre os positivos, 76,5% (13/17) tinham idade inferior a seis meses e 23,5% (4/17) igual ou superior a seis meses. Quanto à origem 41,2% (7/17) eram oriundos de ONG, 35,3% (6/17) do HV/EVZ/UFG e 23,5% (4/17) do Campus Samambaia/UFG (Tabela 2).

TABELA 2- Distribuição de animais positivos ao *Cryptosporidium* spp. do total das amostras avaliadas segundo as variáveis analisadas.

Variável	Categoria	Positivos	%
Sexo	Fêmea	9/49	52,9
	Macho	8/46	47,1
Estilo de vida	Livre	7/47	41,2
	Não livre	10/48	58,8
Idade	< 6 meses	13/44	76,5
	≥ 6 meses	4/51	23,5
Localidade	Campus	4/33	23,5
	ONG	6/44	35,3
	DVSA	0/6	0,0
	HV	7/12	41,2

Foram identificadas duas espécies: *C. felis* 88,2% (15/17) e *C. muris* 5,9% (1/17). Já em uma amostra (5,9%; 1/17) não foi possível identificar a espécie. *C. felis* apresentou 100% de similaridade com a referência de *C. felis* AF108862 e *C. muris* 100% de similaridade com referência de *C. muris* estirpe rato AF093498.

Avaliando-se a idade, verificou-se um efeito de dependência ( $\chi^2_{gl=1; 0,05} = 4, p = 0,04$ , Figura 2A). Assim, os gatos positivos com idade inferior aos seis meses (13/95) apresentaram maior frequência de *Cryptosporidium* spp. em relação aos gatos com idade igual ou superior a seis meses de idade (4/95), tendo a idade se constituído em fator de risco.

A variável estilo de vida foi independente ( $\chi^2_{gl=1; 0,05} = 0,57, p = 0,45$ ; Figura 2B) entre os gatos livres (7/95) e não livres (10/95). De forma similar, o sexo foi independente ( $\chi^2_{gl=1; 0,05} = 0,02, p = 0,90$ ; Figura 2C), não havendo associação com o número de machos (8/95) e fêmeas (9/95) positivos.

Houve associação significativa com a localidade ( $p < 0,01$ ; Figura 2D). Entretanto, esta foi uma dependência em relação aos animais do HV quando comparado com as outras

localidades: HV versus Campus Samambaia ( $p=0,021$ ), versus DVSA ( $p=0,037$ ) e versus ONG ( $p=0,02$ ). Os gatos amostrados no HV apresentaram o maior número de amostras positivas (7/95), seguidos pelos oriundos da ONG (6/95) e do Campus Samambaia (4/95). Já no DVSA não se detectou nenhum gato com a presença de *Cryptosporidium* spp..

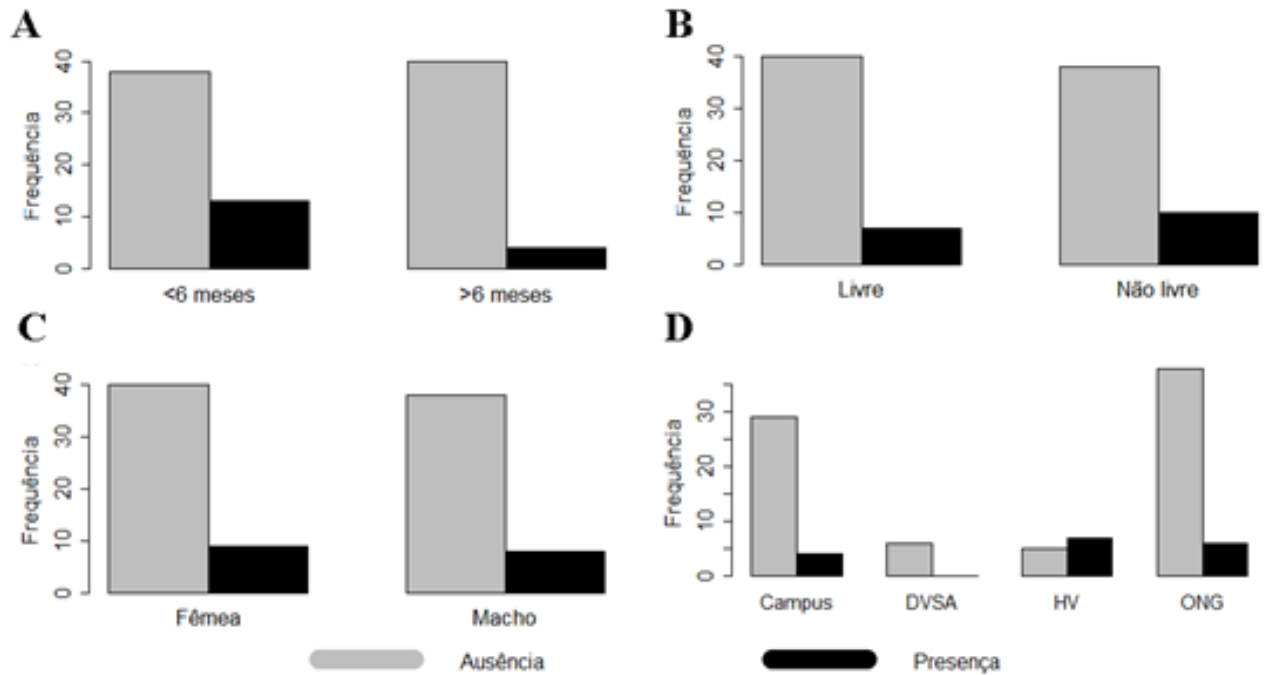


FIGURA 2- Frequência de amostras positivas e negativas em gatos de Goiânia. Estilo de vida (A), o sexo (B), a idade (C) e a localidade de coleta dos gatos (D).

A avaliação da eficácia do modelo de regressão logística multivariada sugeriu que as variáveis usadas não proporcionaram suficiente efeito preditivo para os animais predispostos à infecção por *Cryptosporidium* spp. (AUC= 0,64; Figura 3). Assim, foi observado, como já registrado, efeito entre a presença do protozoário e a idade dos animais avaliados, tendo sido verificado que nos animais com idade inferior aos seis meses houve 3,43 vezes mais chance de apresentar infecção por *Cryptosporidium* spp.

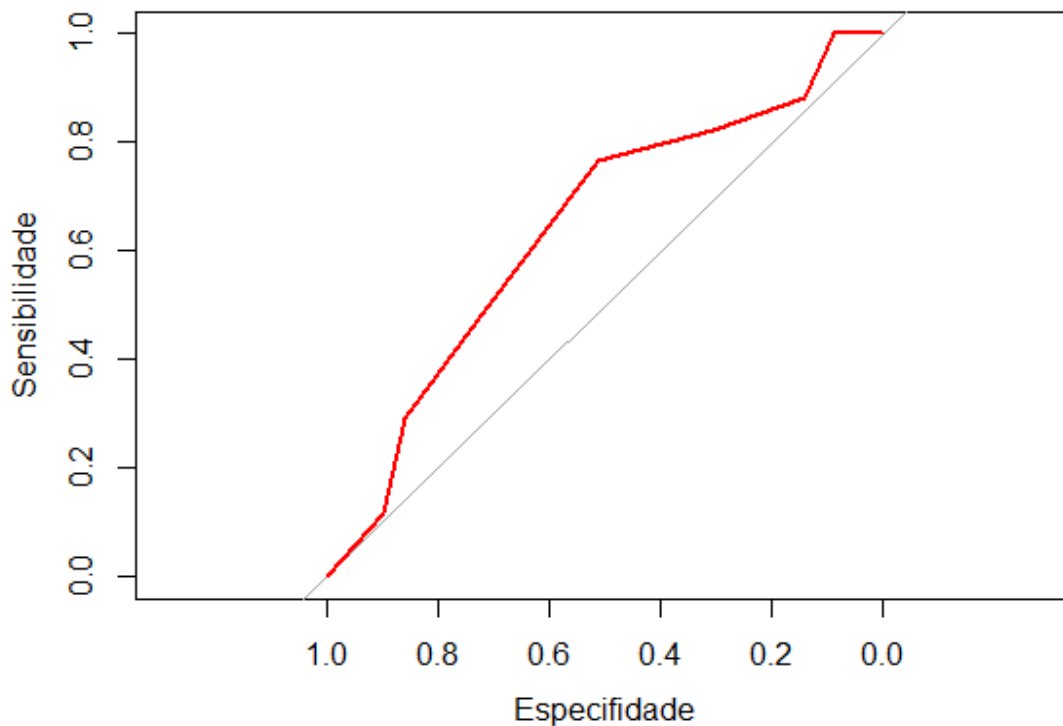


FIGURA 3- *Area Under the Curve* (AUC) do modelo de regressão logística multivariada sem a variável localidade (AUC=0,64)

As variáveis sexo e estilo de vida não influenciaram na predição da presença do parasita ( $p > 0,05$ ) (Tabela 4).

TABELA 3 - Análise de regressão logística para determinar os fatores risco da infecção por *Cryptosporidium* spp. em gatos do município de Goiânia

Variável	Categoria	Positivos	OR (95% IC)	OR ajustado (95% IC)	<i>P</i>
Sexo	Fêmea	9	—	—	0,98
	Macho	8	0,9 (0.33,2.68)	1,0 (0.34,3.03)	
Estilo de vida	Livre	7	—	—	0,99
	Não livre	10	1,6 (0.55,4.58)	0,1 (0.30,3.28)	
Idade	> seis meses	4	—	—	< 0,05
	≤ seis meses	13	3,4 (1.02,11.42)	3,4 (0.94,12.56)	



## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo foi identificada frequência de 17,9% (17/95) de infecção por *Cryptosporidium* spp. Esta frequência foi congruente com a prevalência média mundial estimada de 0 a 29%<sup>69</sup>.

Esses resultados foram contrastantes com resultados de pesquisas que utilizaram a mesma técnica, como a detecção de 13% (6/46) na Colômbia<sup>18</sup>, 3,8% (6/160) na China<sup>70</sup> e 0,19 % (1/19) na Alemanha<sup>37</sup>, embora todos estejam dentro da média mundial reportada. No Brasil, um resultado similar ao obtido neste estudo, porém utilizando técnicas diferentes à *nested* PCR, foi reportado em Recife de 18,8% (6/32)<sup>71</sup>. Já resultados superiores, de 41,7% (5/12) foram reportados em Bom Jesus, Piauí<sup>72</sup>.

As diferenças nas frequências observadas pela infecção por *Cryptosporidium* spp. em gatos entre as pesquisas realizadas podem ser devidas às diferentes metodologias empregadas, técnicas utilizadas, tamanho, quantidade e qualidade das amostras, origem dos animais pesquisados ou às diferenças nas condições ambientais entre as regiões e o tipo de manejo animal<sup>71</sup>.

Não se observou associação significativa relacionada às espécies de *Cryptosporidium* identificadas na presente pesquisa. *C. felis* foi o mais frequente entre as amostras positivas (88,2 %; 15/17), sendo a principal espécie relatada em gatos<sup>16, 70</sup>. A identificação da presença de *C. muris* (5,9 %: 1/17), uma espécie ocasionalmente relatada nesses animais<sup>16-19</sup>, pode ser o resultado da transmissão mecânica pela predação de roedores e não uma infecção real<sup>73</sup>, uma vez que os felinos apresentam o hábito de se alimentarem, quando livres, de presas de tamanho inferior<sup>3</sup>.

Como demonstrado, a espécie detectada com maior frequência foi *C. felis*, específica de gatos, a qual é raramente encontrada em seres humanos e, quando identificada, via de regra está relacionada a uma queda na imunidade ou transmissão acidental<sup>73-75</sup>. A baixa associação reportada na literatura entre a ocorrência de criptosporidiose e o contato com um animal de estimação reforça esta hipótese<sup>69</sup>.

No entanto, esses animais têm sido apontados como potenciais reservatórios de *Cryptosporidium* spp., devido à presença de espécies ou genótipos compartilhados do parasita com os humanos na mesma área geográfica<sup>70</sup>. Os diversos relatos de *C. andersoni*<sup>76</sup>, *C. canis*<sup>74</sup>, *C. cuniculus*<sup>77</sup>, *C. fayeri*<sup>78</sup>, *C. felis*<sup>43, 79</sup>, *C. meleagridis*<sup>80</sup>, *C. muris*<sup>81-85</sup>, *C. tyzzeri*<sup>86</sup> e *C. ubiquitum*<sup>79</sup> afetando acidentalmente humanos tanto imunocompetentes como imunodeprimidos, também apontam que tanto animais domésticos como selvagens, ainda que

assintomáticos, podem atuar como reservatórios e representar fontes de infecção para o humano<sup>6</sup>.

O papel dos gatos na transmissão de *Cryptosporidium* aos humanos ainda não é totalmente claro<sup>43</sup>, embora a maioria dos casos de criptosporidiose em humanos, no mundo, seja devida à infecção por *C. hominis* e *C. parvum*. A hipótese mais provável é que a infecção humana por *C. felis*<sup>43, 79</sup> e *C. muris*<sup>81-85</sup> seja oriunda de gatos. Entretanto, há autores que sugerem que as infecções causadas por estas espécies seja o resultado de uma transmissão antroponótica, em vez de transmissão zoonótica<sup>73-75</sup>.

Os resultados obtidos nesta pesquisa indicaram que a idade foi uma variável dependente ( $\chi^2_{gl=1; 0,05} = 4, p = 0.04$ ), sendo que os animais com menos de seis meses de idade foram mais acometidos pelo *Cryptosporidium* spp. Este resultado corrobora o reportado por Xu et al<sup>70</sup>. No entanto, Santín et al.<sup>18</sup> e Yang et al.<sup>73</sup> relataram maior positividade em animais mais velhos (mais do que seis meses) e relacionaram este resultado ao aumento das possibilidades de contaminação à medida que a idade aumenta<sup>4</sup>. Destaca-se que o estresse pode induzir a eliminação de oocistos em adultos<sup>87</sup>. Além dessa condição, deve-se ressaltar que as infecções podem ser assintomáticas<sup>43</sup>, sugerindo que infecções crônicas e subclínicas possam ser mais frequentes em adultos do que as pesquisas indicam<sup>87</sup>.

Apesar dos resultados reportados por esses últimos autores, considera-se que a criptosporidiose é mais frequente em gatos jovens, especialmente naqueles submetidos a qualquer tipo de estresse como o desmame, deficiência nutricional e sanitário ou introdução em ambientes novos<sup>18, 33</sup>. Portanto, esta faixa etária é mais suscetível ao parasitismo, provavelmente devido à imaturidade do seu sistema imune e falta de imunidade por exposição anterior<sup>87</sup>.

Neste estudo o sexo não foi um fator de risco para a infecção pelo protozoário, ( $\chi^2_{gl=1; 0,05} = 0.02, p = 0.90$ ), coincidindo com os resultados de Pereira et al.<sup>4</sup>, Rambozzi et Wal.<sup>87</sup>, Silva et al.<sup>72</sup>, Coelho et al.<sup>38</sup>, e de Paiva<sup>88</sup>, sinalizando que ambos os sexos são igualmente susceptíveis ao protozoário.

Quanto à localidade, verificou-se maior frequência de apresentação em gatos oriundos do HV (7/95), seguidos dos de ONG (6/95) e do Campus Samambaia (4/95), concordando com os resultados apresentados por Hubert et al<sup>3</sup>, que registraram maior frequência de *Cryptosporidium* spp. em gatos domiciliados (1/20) do que em gatos pertencentes a abrigos (ONG: 0/28). Dentre outros fatores, a densidade animal e a utilização de bandejas sanitárias nem sempre adequadamente higienizadas, com acúmulo de fezes, podem aumentar a possibilidade de reinfecção<sup>3, 7</sup>.

Destaca-se que os animais amostrados no HV da EVZ/UFG eram domiciliados, sob cuidado de um tutor, e foram levados a atendimento devido a algum problema de saúde. Isso pode ter influenciado nos resultados, uma vez que estes indivíduos deveriam estar imunocomprometidos, condição que os tornou mais susceptíveis à infecção pelo parasita<sup>89</sup>. Assim, por se tratarem de dados tendenciosos, o local de procedência não foi considerado no modelo de regressão logística.

Dessa forma, os gatos de vida não livre tiveram maior frequência de apresentação de *Cryptosporidium* spp. que os animais de vida livre, contrariando os resultados de Pereira et al<sup>4</sup>, que afirmaram que a condição de estarem domiciliados (sem acesso à rua) age como um fator de proteção, ressaltando que a permanência em ambientes internos oferece condições de menor exposição ao agente.

Devido ao tipo de local amostrado, não foi possível no momento de colheita das amostras obter informação sobre aspectos epidemiológicos e clínicos dos animais que seriam importantes, como hábitos alimentares, fonte de água de bebida, contato com outros animais e número de animais no mesmo ambiente, ocorrência de diarreia. Destaca-se que essas variáveis, entre outras, podem se constituir em risco para a apresentação do protozoário e sua avaliação seria adequada em novos estudos.

Os resultados obtidos, nas condições desta pesquisa, indicaram que os gatos teriam um baixo potencial zoonótico para a transmissão de espécies de *Cryptosporidium* spp., não constituindo um risco à saúde humana, já que este protozoário apresenta comportamento espécie específico como verificado neste estudo. Porém, continua a ser importante a realização de estudos epidemiológicos sobre o *Cryptosporidium* spp., incluindo a importância dos gatos no ciclo epidemiológico, a avaliação de outros fatores de risco e a indicação de medidas mais eficientes e direcionadas para a prevenção e controle da zoonose.

## 7. CONCLUSÃO

Há gatos domésticos positivos para *Cryptosporidium* spp. dentre os animais das diferentes categorias avaliadas. Pelo menos duas espécies de *Cryptosporidium* circulam na população felina local, que afetam principalmente aqueles com idade inferior aos seis meses.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gómez LF, Atehortua CG, Padilla SCO. La influencia de las mascotas en la vida humana. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2007;20(3):377-86.
2. IBGE. Pesquisa Nacional de Saúde: 2013: acesso e utilização dos serviços de saúde, acidentes e violências: Brasil, grandes regiões e unidades da federação. IBGE Rio de Janeiro; 2015.
3. HUBER F, BOMFIM TCB, GOMES RS. Comparação entre infecção por *Cryptosporidium* sp. e por *Giardia* sp. em gatos sob dois sistemas criação. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2002;11(1):7-12.
4. Pereira CRA, Ferreira AP. Ocorrência e fatores de risco da criptosporidiose em felinos de companhia de idosos. *Rev bras geriatr gerontol*. 2012;15(4):681-91.
5. Savioli L, Smith H, Thompson A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'neglected diseases initiative'. *Trends in parasitology*. 2006;22(5):203-8.
6. Ryan U, Fayer R, Xiao L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology*. 2014;141(13):1667-85.
7. Thompson RA, Palmer CS, O'Handley R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *The veterinary journal*. 2008;177(1):18-25.
8. Barta JR, Thompson RA. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. *Trends in parasitology*. 2006;22(10):463-8.
9. Peralta RHS, Velásquez JN, Cunha FdS, Pantano ML, Sodré FC, Silva Sd, et al. Genetic diversity of *Cryptosporidium* identified in clinical samples from cities in Brazil and Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2016;111(1):30-6.
10. Meireles MV. *Cryptosporidium* infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2010;19(4):197-204.
11. Šlapeta J. *Cryptosporidiosis* and *Cryptosporidium* species in animals and humans: a thirty colour rainbow? *International journal for parasitology*. 2013;43(12):957-70.
12. Ghazy AA, Abdel-Shafy S, Shaapan RM. *Cryptosporidiosis* in Animals and Man: 1. Taxonomic Classification, Life Cycle, Epidemiology and Zoonotic Importance. *Asian Journal of Epidemiology*. 2015;8(3):48.
13. Li X, Pereira MdGC, Larsen R, Xiao C, Phillips R, Striby K, et al. *Cryptosporidium rubeyi* n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in multiple Spermophilus ground squirrel species. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 2015;4(3):343-50.
14. Ryan U, Papparini A, Tong K, Yang R, Gibson-Kueh S, O'Hara A, et al. *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia reticulata*). *Exp Parasitol*. 2015 Mar;150:31-5. PubMed PMID: 25637783. Epub 2015/02/01. Eng.
15. Holubova N, Sak B, Horcickova M, Hlaskova L, Kvetonova D, Menchaca S, et al. *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. *Parasitol Res*. 2016 Jun;115(6):2243-51. PubMed PMID: 26905074. Pubmed Central PMCID: PMC4864505. Epub 2016/02/26. eng.
16. Lucio-Forster A, Griffiths JK, Cama VA, Xiao L, Bowman DD. Minimal zoonotic risk of cryptosporidiosis from pet dogs and cats. *Trends in parasitology*. 2010;26(4):174-9.
17. Pavlasek I, Ryan U. The first finding of a natural infection of *Cryptosporidium muris* in a cat. *Veterinary parasitology*. 2007;144(3):349-52.
18. Santín M, Trout JM, Vecino JAC, Dubey J, Fayer R. *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bieneusi* in cats from Bogota (Colombia) and genotyping of isolates. *Veterinary parasitology*. 2006;141(3):334-9.
19. FitzGerald L, Bennett M, Ng J, Nicholls P, James F, Elliot A, et al. Morphological and molecular characterisation of a mixed *Cryptosporidium muris*/*Cryptosporidium felis* infection in a cat. *Veterinary parasitology*. 2011;175(1):160-4.
20. Feng Y, Li N, Duan L, Xiao L. *Cryptosporidium* genotype and subtype distribution in raw wastewater in Shanghai, China: evidence for possible unique *Cryptosporidium hominis* transmission. *Journal of clinical microbiology*. 2009;47(1):153-7.

21. Xiao L, Fayer R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International journal for parasitology*. 2008;38(11):1239-55.
22. Lendner M, Dauschies A. *Cryptosporidium* infections: molecular advances. *Parasitology*. 2014;141(11):1511-32.
23. Chalmers RM, Davies AP. Minireview: clinical cryptosporidiosis. *Experimental parasitology*. 2010;124(1):138-46.
24. Thompson RA, Olson M, Zhu G, Enomoto S, Abrahamsen MS, Hijjawi N. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Advances in parasitology*. 2005;59:77-158.
25. Smith HV, Nichols RA, Grimason AM. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends in parasitology*. 2005;21(3):133-42.
26. Gałęcki R, Sokół R. CRYPTOSPORIDIUM CANIS AND C. FELIS AS A POTENTIAL RISK TO HUMANS. *Pol J Natur Sc*. 2015;30(2):203–12.
27. Smith H, Caccio S, Cook N, Nichols R, Tait A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Veterinary parasitology*. 2007;149(1):29-40.
28. O'Hara SP, Chen X-M. The cell biology of *Cryptosporidium* infection. *Microbes and Infection*. 2011;13(8):721-30.
29. Lopez-Velez R, Tarazona R, Camacho AG, Gomez-Mampaso E, Guerrero A, Moreira V, et al. Intestinal and extraintestinal cryptosporidiosis in AIDS patients. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 1995;14(8):677-81.
30. Sponseller JK, Griffiths JK, Tzipori S. The evolution of respiratory *Cryptosporidiosis*: evidence for transmission by inhalation. *Clinical microbiology reviews*. 2014;27(3):575-86.
31. de Albuquerque YMM, Silva MCF, de Andrade Lima ALM, Magalhães V. Criptosporidiose pulmonar em pacientes com AIDS, uma doença subdiagnosticada. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2012;38(4):530-2.
32. Garcia LS. *Diagnostic medical parasitology*: American Society for Microbiology Press; 2006.
33. Olson M, Ralston B, O'Handley R, Guselle N, Appelbee A. What is the clinical and zoonotic significance of cryptosporidiosis in domestic animals and wildlife. *Cryptosporidium*. 2003:51-68.
34. Bouzid M, Hunter PR, Chalmers RM, Tyler KM. *Cryptosporidium* Pathogenicity and Virulence. *Clin Microbiol Rev*. 2013 Jan;26(1):115-34. PubMed PMID: 23297262. Pubmed Central PMCID: PMC3553671. eng.
35. Bowman DD, Lucio-Forster A. *Cryptosporidiosis* and giardiasis in dogs and cats: veterinary and public health importance. *Experimental parasitology*. 2010;124(1):121-7.
36. Scorza V, Willmott A, Gunn-Moore D, Lappin M. *Cryptosporidium felis* in faeces from cats in the UK. *Veterinary Record*. 2014;174(24):609-.
37. Sotiriadou I, Pantchev N, Gassmann D, Karanis P. Molecular identification of *Giardia* and *Cryptosporidium* from dogs and cats. *Parasite*. 2013;20:8.
38. Coelho WMD, Amarante Ad, Soutello RVGd, Meireles MV, Bresciani KDS. Ocorrência de parasitos gastrintestinais em amostras fecais de felinos no município de Andradina, São Paulo. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2009;18(2):46-9.
39. Gennari SM, de Jesus Pena HF, Cortez A. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 1999;36(2):87-91.
40. Robertson B, Sinclair M, Forbes A, Veitch M, Kirk M, Cunliffe D, et al. Case-control studies of sporadic cryptosporidiosis in Melbourne and Adelaide, Australia. *Epidemiology and Infection*. 2002;128(3):419-31.
41. Hellard M, Hocking J, Willis J, Dore G, Fairley C. Risk factors leading to *Cryptosporidium* infection in men who have sex with men. *Sexually transmitted infections*. 2003;79(5):412-4.
42. Nascimento WRCd, Cavalcanti IMF, Irmão JI, Rocha FJS. Presença de *Cryptosporidium* spp em crianças com diarreia aguda em uma creche pública de Recife, Estado de Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2009;42:175-8.

43. Beser J, Toresson L, Eitrem R, Troell K, Winięcka-Krusnell J, Lebbad M. Possible zoonotic transmission of *Cryptosporidium felis* in a household. 2015. 2015-10-06;5. Epub 2015-01-14.
44. Ehsan AM, Geurden T, Casaert S, Parvin SM, Islam TM, Ahmed UM, et al. Assessment of zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium* between cattle and humans in rural villages in Bangladesh. *PloS one*. 2015;10(2):e0118239.
45. Feltus DC, Giddings CW, Schneck BL, Monson T, Warshauer D, McEvoy JM. Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* spp. in Wisconsin. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(12):4303-8.
46. Ng J, Eastwood K, Durrheim D, Massey P, Walker B, Armson A, et al. Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* in rural New South Wales. *Experimental parasitology*. 2008;119(1):192-5.
47. Madrid DMdC, Bastos TSA, Jayme VdS. Emergência da criptosporidiose e impactos na saúde humana e animal. *ENCICLOPÉDIA BIOSFERA*. 2015;11 (22):1150 - 71.
48. Almeida AJ, Lima VS, Rodrigues AB, Di Filippo PA. Contaminação por *Cryptosporidium* spp. em esterco utilizado como adubo em hortas urbanas Contamination with *Cryptosporidium* spp. in manure used as fertilizer in urban gardens. *CEP*. 2013;8903:000.
49. Arredondo A, Lockett LY, Icaza Ed. Cost of diseases in Brazil: breast cancer, enteritis, cardiac valve disease and bronchopneumonia. *Revista de Saúde Pública*. 1995;29:349-54.
50. Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Experimental parasitology*. 2010;124(1):80-9.
51. Bhutta ZA, Black RE. Global maternal, newborn, and child health—so near and yet so far. *New England Journal of Medicine*. 2013;369(23):2226-35.
52. Fayer R. *General Biology In: Fayer R, Xiao L, editor (s). Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. 2008;2:1-42.
53. Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol*. 2000 Nov;30(12-13):1305-22. PubMed PMID: 11113257. Epub 2000/12/13. eng.
54. Almeida TTCd. Padronização e avaliação de métodos moleculares para detecção de ocistos de *Cryptosporidium* spp (Apicomplexa: Cryptosporiidae) em amostras fecais: extração de DNA genômico e PCR (reação em cadeia pela polimerase): Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública. Departamento de Prática de Saúde Pública; 2004.
55. Jex AR, Smith HV, Monis PT, Campbell BE, Gasser RB. *Cryptosporidium*--biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotechnol Adv*. 2008 Jul-Aug;26(4):304-17. PubMed PMID: 18430539. Epub 2008/04/24. eng.
56. Smith H, Grimason A. *Giardia and Cryptosporidium in water and wastewater. The handbook of water and wastewater microbiology Elsevier, Oxford, UK*. 2003:619-781.
57. Chalmers RM, Katzer F. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends Parasitol*. 2013 May;29(5):237-51. PubMed PMID: 23566713. Epub 2013/04/10. eng.
58. Gorrel C. *Odontologia em pequenos animais: Elsevier Brasil; 2011*.
59. Salant H, Markovics A, Spira DT, Hamburger J. The development of a molecular approach for coprodiagnosis of *Toxoplasma gondii*. *Veterinary parasitology*. 2007;146(3):214-20.
60. Xiao L, Alderisio K, Limor J, Royer M, Lal AA. Identification of Species and Sources of *Cryptosporidium* Oocysts in Storm Waters with a Small-Subunit rRNA-Based Diagnostic and Genotyping Tool. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000;66(12):5492-8.
61. Ryan U, Xiao L, Read C, Zhou L, Lal AA, Pavlasek I. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Applied and environmental microbiology*. 2003;69(7):4302-7.
62. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research*. 1997;25(24):4876-82.
63. Hall TA, editor *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic acids symposium series; 1999*.

64. Venables W, Ripley B. Modern Applied Statistics Using S. Springer, New York, NY, USA; 2002.
65. Nakazawa M. fmsb: Functions for medical statistics book with some demographic data. R package version 04. 2014;5.
66. Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lisacek F, Sanchez J-C, et al. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. BMC bioinformatics. 2011;12(1):1.
67. Chongsuvivatwong V. Epidemiological Data Display Package. 2015.
68. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2016.
69. Lucio-Forster A, Griffiths JK, Cama VA, Xiao L, Bowman DD. Minimal zoonotic risk of cryptosporidiosis from pet dogs and cats. Trends Parasitol. 2010 Apr;26(4):174-9. PubMed PMID: 20176507. Epub 2010/02/24. eng.
70. Xu H, Jin Y, Wu W, Li P, Wang L, Li N, et al. Genotypes of *Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon bieneusi* and *Giardia duodenalis* in dogs and cats in Shanghai, China. Parasites & vectors. 2016;9(1):1.
71. Silva GRd, Santana IMd, Ferreira ACMdS, Borges JCG, Alves LC, Faustino MAdG. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em felinos de Recife, PE, Brasil. Veterinária e Zootecnia. 2015;22(3):408-17.
72. Almeida MdS, Sousa RÁd, Ribeiro KHC, Santos KRd, Catenacci LSC. Ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp. em cães e gatos de Bom Jesus, Piauí, Brasil. 2015; 11 (21):1421 - 31.
73. Yang R, Ying JLJ, Monis P, Ryan U. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* in cats (*Felis catus*) in Western Australia. Experimental parasitology. 2015;155:13-8.
74. Xiao L, Cama VA, Cabrera L, Ortega Y, Pearson J, Gilman RH. Possible transmission of *Cryptosporidium canis* among children and a dog in a household. Journal of clinical microbiology. 2007;45(6):2014-6.
75. Cama V. Mixed *Cryptosporidium* Infections and HIV-Volume 12, Number 6—June 2006-Emerging Infectious Disease journal-CDC. 2006.
76. Jiang Y, Ren J, Yuan Z, Liu A, Zhao H, Liu H, et al. *Cryptosporidium andersoni* as a novel predominant *Cryptosporidium* species in outpatients with diarrhea in Jiangsu Province, China. BMC Infectious Diseases. 2014;14(1):555.
77. Koehler AV, Whipp MJ, Haydon SR, Gasser RB. *Cryptosporidium cuniculus* - new records in human and kangaroo in Australia. Parasit Vectors. 2014;7. PubMed PMID: 25359081. Pubmed Central PMCID: PMC4221722. eng.
78. Waldron LS. Wildlife-associated *Cryptosporidium fayeri* in Human, Australia-Volume 16, Number 12—December 2010-Emerging Infectious Disease journal-CDC. 2010.
79. Cieloszyk J, Goñi P, García A, Remacha MA, Sánchez E, Clavel A. Two cases of zoonotic cryptosporidiosis in Spain by the unusual species *Cryptosporidium ubiquitum* and *Cryptosporidium felis*. Enfermedades infecciosas y microbiología clinica. 2012;30(9):549-51.
80. Silverlas C, Mattsson JG, Insulander M, Lebbad M. Zoonotic transmission of *Cryptosporidium meleagridis* on an organic Swedish farm. Int J Parasitol. 2012 Oct;42(11):963-7. PubMed PMID: 23022616. Epub 2012/10/02. eng.
81. Palmer CJ, Xiao L, Terashima A, Guerra H, Gotuzzo E, Saldías G, et al. *Cryptosporidium muris*, a Rodent Pathogen, Recovered from a Human in Perú. Emerg Infect Dis. 2003 Sep;9(9):1174-6. PubMed PMID: 14519260. Pubmed Central PMCID: PMC3016761. eng.
82. Gatei W, Ashford RW, Beeching NJ, Kamwati SK, Greensill J, Hart CA. *Cryptosporidium muris* infection in an HIV-infected adult, Kenya. Emerg Infect Dis. 2002 Feb;8(2):204-6. PubMed PMID: 11897075. Pubmed Central PMCID: PMC2732451. Epub 2002/03/19. eng.
83. Guyot K, Follet-Dumoulin A, Lelievre E, Sarfati C, Rabodonirina M, Nevez G, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. J Clin Microbiol. 2001 Oct;39(10):3472-80. PubMed PMID: 11574558. Pubmed Central PMCID: PMC88374. Epub 2001/09/28. eng.
84. Tiangtip R, Jongwutiwes S. Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV-infected patients in Thailand. Trop Med Int Health. 2002 Apr;7(4):357-64. PubMed PMID: 11952952. Epub 2002/04/16. eng.



85. Katsumata T, Hosea D, Ranuh IG, Uga S, Yanagi T, Kohno S. Short report: possible *Cryptosporidium muris* infection in humans. *Am J Trop Med Hyg.* 2000 Jan;62(1):70-2. PubMed PMID: 10761726. Epub 2000/04/13. eng.
86. Raskova V, Kvetonova D, Sak B, McEvoy J, Edwinson A, Stenger B, et al. Human cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium tyzzeri* and *C. parvum* isolates presumably transmitted from wild mice. *J Clin Microbiol.* 2013 Jan;51(1):360-2. PubMed PMID: 23100342. Pubmed Central PMCID: PMC3536213. Epub 2012/10/27. eng.
87. Rambozzi L, Menzano A, Mannelli A, Romano S, Isaia MC. Prevalence of cryptosporidian infection in cats in Turin and analysis of risk factors. *Journal of feline medicine and surgery.* 2007;9(5):392-6.
88. de Paiva APOM. Frequência de parasitos gastrintestinais em cães e gatos atendidos em hospital-escola veterinário da cidade de São Paulo. *Arq Bras Med.* 2007;59(5):1338-40.
89. Monticello T, Levy M, Bunch S, Fairley R. Cryptosporidiosis in a feline leukemia virus-positive cat. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 1987;191(6):705-6.