



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA  
SERGIO AROUCA  
ENSP

Mariane Marques da Guarda Pinto

**Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. na fauna silvestre e doméstica residente no Campus  
Fiocruz da Mata Atlântica, município do Rio de Janeiro.**

**Rio de Janeiro**

**2016**

Mariane Marques da Guarda Pinto

**Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. na fauna silvestre e doméstica residente no Campus  
Fiocruz da Mata Atlântica, município do Rio de Janeiro.**

Trabalho de dissertação apresentado ao curso de Pós-graduação em Saúde Pública, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito à obtenção do título de Mestre em Saúde Pública, Área Saúde Pública e Subárea de concentração Abordagem Ecológica de Doenças Transmissíveis.

**Orientador principal:** Dr. Fabiano Borges Figueiredo

**Segunda orientadora:** Dr<sup>a</sup>. Teresa Cristina Bergamo do Bonfim

**Rio de Janeiro**

**2016**

Catálogo na fonte

Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica

Biblioteca de Saúde Pública

P659o Pinto, Mariane Marques da Guarda

Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. na fauna silvestre e doméstica residente no campus Fiocruz da Mata Atlântica, município do Rio de Janeiro. / Mariane Marques da Guarda Pinto. -- 2016.  
xi, 75f.: il.; tab.

Orientador: Fabiano Borges Figueiredo  
Teresa Cristina Bergamo do Bonfim

Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2016.

1. Animais Domésticos. 2. Animais Selvagens. 3. Técnicas Imunoenzimáticas. 4. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. 5. *Cryptosporidium*. 6. Epidemiologia. I. Título.

CDD – 22.ed. – 616.936098153

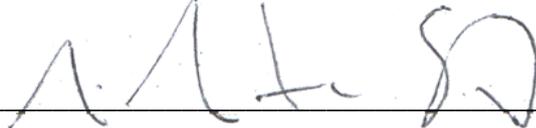
Mariane Marques da Guarda Pinto

**Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. na fauna silvestre e doméstica residente no Campus  
Fiocruz da Mata Atlântica, município do Rio de Janeiro.**

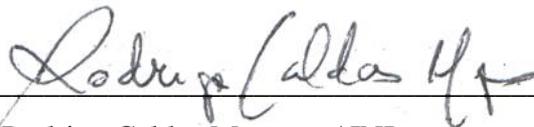
Trabalho de dissertação apresentado ao curso de Pós-graduação em Saúde Pública, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito à obtenção do título de Mestre em Saúde Pública, Área Saúde Pública e Subárea de concentração Abordagem Ecológica de Doenças Transmissíveis.

Aprovada em: 31 de março de 2016.

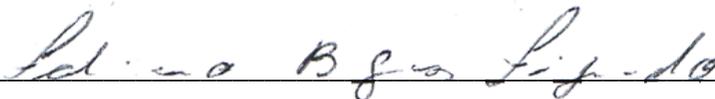
Banca Examinadora



Dr. Valmir Laurentino Silva / ENSP



Dr. Rodrigo Caldas Menezes / INI



Dr. Fabiano Borges Figueiredo / INI – Orientador

Rio de Janeiro

2016.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me fortalecer a cada momento de minha vida;

À toda minha família. Ao meu pai Manoel Pinto e irmãs, Luciane Oliveira e Cristiane Oliveira, pelo apoio e por acreditarem em mim;

Ao meu namorado, amigo e parceiro de todas as horas, Luiz Paulo Bustamante, pela paciência, companheirismo incondicional e por acreditar sempre no que há de melhor em mim;

Ao meu querido orientador, Dr. Fabiano Borges Figueiredo, pela orientação, pelas palavras de incentivo e motivação e amizade que contribuíram imensamente para meu amadurecimento pessoal e evolução profissional;

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup>. Teresa Cristina Bergamo do Bonfim, pela orientação para desenvolvimento do trabalho;

Ao Valmir Laurentino, pela colaboração neste trabalho e pela disponibilização de seu laboratório para realização do experimento.

À Monique Campos, pela paciência e auxílio no desenvolvimento da técnica molecular;

À equipe do Campus Fiocruz da Mata Atlântica, pelas coletas;

À grande família do Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos- INI, em especial Artur Junior e Adilson Benedito, pela amizade e disponibilidade em me ajudar sempre; a Emília e Thaís pelos momentos alegres; e aos demais, pela simpatia e alegria no dia-a-dia do laboratório.

À Pós-graduação em Saúde Pública, pela oportunidade.

À FAPERJ, pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho;

Meus sinceros agradecimentos!

*”... cada momento, cada situação, que enfrentamos em nossas trajetórias é um desafio, uma oportunidade única de aprender, de se tornar uma pessoa melhor. Só depende de nós, das nossas escolhas...”*

*Albert Einstein*

*“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia... pois o triunfo pertence a quem se atreve.”*

*Charles Chaplin*

## RESUMO

A criptosporidiose é causada por espécies de protozoários do gênero *Cryptosporidium*, apresentando distribuição mundial, ocorrendo nos seres humanos e em várias espécies de animais domésticos e silvestres, possuindo importância em saúde pública e veterinária. O estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. nos animais capturados no Campus Fiocruz da Mata Atlântica, situado em região de transição entre área de mata nativa e antropizada, com marcante interação entre seres humanos e animais domésticos e silvestres. Foram coletadas 55 amostras de fezes de animais, sendo 46 de cães domésticos (*Canis lupus familiaris*), cinco de gambás-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*) e quatro pools de fezes de galinhas de capoeira (*Gallus gallus domesticus*). As amostras de cães domésticos e os pools de fezes de galinhas de capoeira foram analisadas por meio das técnicas ELISA e qPCR. Na técnica ELISA, a positividade foi de 6,52% (3/46) entre as amostras caninas e nenhum pool de fezes das galinhas de capoeira foi positiva. Na qPCR, 10,86% (5/46) das amostras caninas e 75% (3/4) dos pools de fezes de galinhas de capoeira apresentaram positividade. Enquanto que nas amostras de gambás analisadas pela qPCR apresentaram 80% (4/5) de positividade. Os resultados apresentados no presente estudo, demonstraram a presença de *Cryptosporidium* spp. em fezes de animais domésticos e silvestres de área antropizada de Mata Atlântica e indica uma maior capacidade de detecção para pesquisa de *Cryptosporidium* spp. pela técnica qPCR, quando comparada a técnica ELISA.

**Palavras-chave:** Animais Domésticos, Animais Selvagens, Mata Atlântica, Ensaio imunoenzimático, Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real, *Cryptosporidium* spp., Epidemiologia.

## ABSTRACT

Cryptosporidiosis is caused by species of *Cryptosporidium* protozoa of the genus, with worldwide distribution, occurring in humans and several species of domestic and wild animals having importance for public and animal health. The study aimed to evaluate the occurrence of *Cryptosporidium* spp. of animals trapped in Campus Fiocruz Atlantic Forest, located in the transition region between area native and disturbed forest, with remarkable interaction between humans and domestic and wild animals. Fifty-five samples of animal feces were collected, forty six of domestic dogs (*Canis lupus familiaris*), five possum-eared black (*Didelphis aurita*) and four pools of feces from poultry chickens (*Gallus gallus domesticus*). Samples of domestic dogs and pools of farmyard chickens feces were analyzed by means of ELISA and qPCR techniques. In ELISA, the positivity was 6.52% (3/46) of the canine samples and no pool of feces of poultry chickens was positive. In qPCR, 10.86% (5/46) of the canine samples and 75% (3/4) of polls of farmyard chickens feces were positive. While in opossums samples analyzed by qPCR showed 80% (4/5) of positivity. The results presented in this study demonstrated the presence of *Cryptosporidium* spp. in domestic and wild animal feces of disturbed areas of the Atlantic Forest and indicates a greater detection capability for *Cryptosporidium* spp. research by qPCR technique compared to ELISA.

**Keywords:** Domestic Animals, Wildlife, Atlantic Forest, Enzyme Immunoassay, Real Time Reaction Polymerase Chain, *Cryptosporidium* spp., Epidemiology.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1-** Ciclo biológico *Cryptosporidium* spp. .... p. 21

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1** - Espécies de *Cryptosporidium* em mamíferos..... p. 18

**Quadro 2** - Espécies de *Cryptosporidium* em aves, anfíbios, peixes e répteis..... p. 20

## LISTA DE SIGLAS

- CDPKs - Proteínas Cinases Dependentes de Cálcio
- CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
- CFMA - Campus Fiocruz da Mata Atlântica
- CJM - Colônia Juliano Moreira
- Cq – “Quantification cycle” / Ciclo de quantificação
- COWP – Proteína de parede do oocisto
- DNA - Ácido Desoxirribonucleico
- ELISA – “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”/Ensaio de Imunoabsorção Ligado à Enzima
- EUA - Estados Unidos da América
- FDA – “Food and Drug Administration” / Administração de Alimentos e Fármacos
- FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
- FAO – ‘Food and Agriculture Organization of the United Nations’/ Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
- GP60 -- Codificante de glicoproteína 60KDa
- HAART - Terapia Anti-retroviral Altamente Ativa
- HIV – Vírus da imunodeficiência humana
- HSP70 -- Gene codificador de proteína de choque térmico 70 kDa
- IMPDH - Inosina 5'-monofosfato desidrogenase
- INI- Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
- IFD - Imunofluorescência Direta
- IOC - Instituto Oswaldo Cruz
- Nested-PCR – “Nested Polymerase Chain Reaction”/ Reação em Cadeia da Polimerase Nested
- OMS – Organização das Nações Unidas
- PCR – “Polymerase Chain Reaction”/ Reação em Cadeia da Polimerase
- qPCR – Quantitative PCR / Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
- RFLP-PCR – “Restriction Fragment Length Polymorphism Polymerase Chain Reaction”/ Reação em Cadeia da Polimerase - Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
- rpm – Rotação por minuto
- (RT) –PCR – “Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction”/ Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa
- SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- SSU rRNA -- Gene Codificante da Subunidade Menor Microssomal

## SUMÁRIO

---

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2.</b>	<b>PRESSUPOSTO TEÓRICO</b>	<b>16</b>
	2.1. ASPECTO HISTÓRICO	16
	2.2. TAXONOMIA	16
	2.3. ASPECTOS BIOLÓGICOS E CLÍNICOS	21
	2.3.1. Aspectos clínicos nos seres humanos	23
	2.3.2. Aspectos clínicos em cães	23
	2.3.3. Aspectos clínicos em aves	24
	2.3.4. Aspectos clínicos em Gambás	25
	2.4. TRATAMENTO	25
	2.5. IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA E EPIDEMIOLOGIA	25
	2.6. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	28
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
	3.1. OBJETIVO GERAL	31
	3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>32</b>
	4.1. TRABALHO DE CAMPO	32
	4.1.1. Área de estudo: Campus Fiocruz da Mata Atlântica (CFMA)	32
	4.1.2. Coleta das amostras fecais	33
	a) Amostras provenientes de cães	33
	b) Amostras provenientes de galinhas de capoeira	34
	c) Amostras provenientes de marsupiais (Gambás)	34
	4.2. TRABALHO LABORATORIAL	34
	4.2.1. Processamento das amostras fecais	34
	4.2.2. Ensaio imunoenzimático (ELISA)	35
	4.2.3. Método molecular	35
	4.2.3.1. Extração do DNA genômico	35
	4.2.3.2. Quantificação de DNA por fluorimetria	36
	4.2.3.3. PCR quantitativo - Protocolo de amplificação de DNA	36
	4.2.3.4. Teste de inibição	37
	4.3. ASPECTOS ÉTICOS	37

<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>38</b>
5.1.	ARTIGO	
	Ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> spp. em animais domésticos de área antropizada da Mata Atlântica, município do Rio de Janeiro.	38
5.2.	RELATO DE CASO	
	Primeiro relato de infecção em gambá-de-orelha-preta ( <i>Didelphis aurita</i> ) por <i>Cryptosporidium</i> spp. no Brasil.	49
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>57</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>58</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>72</b>
8.1.	LICENÇA CEUA CÃES	72
8.2.	LICENÇA CEUA AVES	73
8.3.	LICENÇA CEUA GAMBÁS	74
8.4.	AUTORIZAÇÃO DE PESQUISA CIENTÍFICA INEA	76

## 1. INTRODUÇÃO

---

*Cryptosporidium* é um protozoário causador da criptosporidiose em seres humanos e animais, doença emergente considerada uma das principais causas de gastroenterite mundialmente e um grave problema de saúde pública em crianças e indivíduos imunodeficientes, principalmente portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) / Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). A criptosporidiose pode causar desnutrição e em longo prazo o comprometimento da aptidão física e cognitiva em crianças menores de cinco anos de idade, bem como o aumento do risco de mortalidade em indivíduos imunodeficientes.

O agente é um parasito intracelular obrigatório, passando por desenvolvimento em um vacúolo parasitóforo e evoluindo para encistamento, fase de formação dos oocistos, o estágio infectante e de resistência do parasito (FAYER; MORGAN; UPTON, 2000).

Transmitido por via feco-oral, normalmente por meio da ingestão de qualquer material contaminado com fezes, contendo a forma infectante em concentração suficiente para que cause infecção num hospedeiro susceptível. Por meio do contato pessoa-pessoa, pessoa-animal e animal-animal; ingestão de água potável ou de recreio (piscinas e lagos) e alimentos infectados com oocistos; e supostamente pelo ar (SAVIOLI; SMITH; THOMPSON 2006; SMITH et al., 2007).

Por ser um patógeno de significativa importância para a saúde pública e considerando sua relevância em surtos por veiculação hídrica, a Organização Mundial da Saúde (OMS) o classifica como um dos patógenos de referência na análise de água potável, sendo um indicativo da qualidade da água em âmbito mundial. Este protozoário ainda é classificado como o quinto entre os dez patógenos de maior importância na transmissão por meio de alimentos pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO)/(OMS), transmitido principalmente por produtos frescos, suco de fruta e leite (FAO, 2014; SMITH; NICHOLS; GRIMASON, 2005).

Embora as pesquisas ao longo dos últimos anos tenham ampliado nosso conhecimento sobre *Cryptosporidium*, questões-chaves em relação a interação parasito- hospedeiro, invasão celular, transmissão e epidemiologia ainda permanecem indefinidos. No Brasil, apesar do crescente aumento na investigação do agente, fatores relacionadas a epidemiologia e classificação das espécies desse patógeno no país, ainda não estão completamente esclarecidos (MEIRELES, 2010).

Não existem estudos relacionados ao *Cryptosporidium* no Campus Fiocruz da Mata Atlântica (CFMA). Essa área fica dentro dos limites urbanos da cidade do Rio de Janeiro, cercada por floresta preservada e protegida, constantemente influenciada por ação antrópica. A região é composta por comunidades que se desenvolvem com precário saneamento básico e infraestrutura urbana. O CFMA se torna uma área de importância para investigação de doenças zoonóticas devido a forma precária e insalubre em que vivem grande parte dos habitantes e pela circulação de animais domésticos e silvestres no peridomicílio.

## 2. PRESSUPOSTO TEÓRICO

---

### 2.1. ASPECTO HISTÓRICO

O protozoário *Cryptosporidium* foi observado pela primeira vez em 1907 no epitélio gástrico de camundongos por Ernest Edward Tyzzer (TYZZER, 1907), médico parasitologista da Universidade de Harvard, em Boston, USA (WELLER, 1978). O autor é responsável pelas três primeiras publicações sobre o agente, definindo o que sabemos atualmente sobre a biologia e ciclo de vida das espécies *Cryptosporidium muris* e *C. parvum* (SLAVIN, 1995).

O parasito torna-se foco de pesquisa, quando em 1955 foi associado pela primeira vez como agente causador de doença em animais, sendo encontrado como causa de diarreia em perus (PANCIERA; THOMASSEN; GARNER, 1971). Porém, somente em 1970 ganha maior atenção médica veterinária, quando descrito acometendo bezerros (NIME et al., 1976). Desde então, o contato com bovinos tem sido considerado uma importante causa de criptosporidiose zoonótica.

O primeiro relato em humanos foi em 1976 (D'ANTONIO et al., 1985), tendo o reconhecimento de sua importância para saúde pública no final do século passado, como ameaça aos indivíduos com HIV/SIDA e a outros indivíduos imunodeficientes, assim como causa de surtos por veiculação hídrica (CURRENT et al., 1983; HAYES et al., 1989; MAC KENZIE et al., 1994; SMITH; ROSE, 1998).

No Brasil, o primeiro registo de criptosporidiose em seres humanos data de 1985 (WEIKEL et al., 1985), estando relacionado à pacientes com sintomatologia diarreica, com imunodeficiência ou não. Nos anos seguintes, os trabalhos voltaram-se para pacientes portadores de HIV (COURA, 1987; DIAS et al, 1988; LOUREIRO; LINHARES, 1986).

### 2.2. TAXONOMIA

O gênero *Cryptosporidium* (localiza-se no interior da membrana celular do hospedeiro; possui a capacidade de autoinfecção; e resistência a quaisquer agente antiparasitário) é classificado como pertencente ao Filo Apicomplexa (possui complexo apical), Classe Sporozoa (reproduz por ciclos sexuado e assexuado), Subclasse Coccidia (ciclo de vida por gametogonia, esporogonia e merogonia; e o oocisto composto por esporozoítas infectantes resultantes da esporogonia), Ordem Eucoccidiida (reprodução por esquizogonia), Subordem Eimeriina (desenvolvimento de macrogametas e microgametas), Família Cryptosporidiidae

(possui quatro esporozoítos no interior do oocisto de parede espessa) (LEVINE, 1988; RYAN; FAYER; XIAO, 2014).

A classificação taxonômica do *Cryptosporidium* vem sendo questionada, embora seja ainda classificado como coccídeo (TZIPORI, 1983). Certas particularidades o diferenciam deste, como a localização do *Cryptosporidium* no interior da célula hospedeira em um compartimento extracitoplasmático; a presença de uma organela alimentar; a presença de dois tipos de oocisto, de parede espessa e de parede fina; a capacidade de autoinfecção por meio do oocisto de parede fina; e a resistência a todos os anticoccidianos (CARRENO; MARTIN; BARTA, 1999; ROSALES et al., 2005).

Estudos detalhados de suas características filogenéticas, biológicas e morfológicas demonstram similaridades com os gregarinas (HIJAWI et al., 2002; VALIGUROVA et al., 2007). A alta proximidade filogenética com este grupo é constatada mediante a análise molecular do gene SSU rRNA (gene codificante da subunidade menor microssomal) (HIJAWI; BOXELL; THOMPSON, 2009) e similaridades morfológicas e biológicas, como o estágio de desenvolvimento *gamont-like* (PLUTZER; KARANIS, 2009). Porém, apesar de todas divergências taxonômicas relacionadas ao protozoário, esse ainda é atribuído a subclasse Coccídia.

Atualmente, são 29 espécies válidas (RYAN; FAYER; XIAO, 2014; ZAHEDI et al, 2016) (Tabela 1) e cerca de 50 genótipos (FAYER, 2010; XIAO; FENG, 2008a). Das espécies descritas, dezessete são reportadas causando criptosporidiose em humanos, sendo dezesseis com potencial zoonótico, como: *Cryptosporidium muris*, *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. canis*, *C. suis*, *C. bovis*, *C. fayeri*, *C. xiaoi*, *C. ubiquitum*, *C. cuniculus*, *C. tyzzeri*, *C. viatorum*, *C. scrofarum*. *C. erinacei*. O *C. hominis* e o *C. parvum* são as espécies mais importantes em saúde pública, responsáveis pela maior parte das infecções em seres humanos e esporadicamente são descritos *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. suis*, *C. muris*, *C. andersoni*, *C. canis* e *C. cuniculus* (CHALMERS; KATZER, 2013; XIAO et al, 2001). Segundo Chalmers e Katzer (2013), as espécies de importância sintomatológica e econômica para os animais são o *C. parvum* (ruminantes pré-desmame), o *C. meleagridis* (aves), o *C. canis* (cães filhotes), o *C. felis* (gatos filhotes), o *C. serpentis* (cobras), e o *C. varanii* (répteis).

Quadro 1- Espécies de *Cryptosporidium* em mamíferos

<u>Espécie</u>	<u>Autor</u>	<u>Principal hospedeiro</u>	<u>Reportado em seres humanos</u>
<i>C. muris</i>	Tyzzler (1907,1910)	Roedores	Inúmeros relatos Guyot et al., 2001; Gatei et al., 2002; Tiangtip; Jongwutiwes, 2002; Gatei et al., 2003; Palmer et al., 2003; Gatei et al., 2006; Leoni et al., 2006; Muthusamy et al., 2006; Azami et al., 2007; Al-Brikan et al., 2008; Neira et al., 2012; Hasajová et al., 2014; Petrincová et al., 2015; Spanakos et al., 2015
<i>C. wrairi</i>	Vetterling et al. (1971)	Porquinho-da-índia	Não relatado
<i>C. felis</i>	Iseki (1979)	Felinos	Muitos relatos (cf. Lucio-Forster et al.2010)
<i>C. parvum</i>	Tyzzler (1912)	Ruminantes	Relato comum em humanos
<i>C. andersoni</i>	Lindsay et al. (2000)	Bovinos	Leoni et al.(2006); Morse et al.(2007); Waldron et al.(2011); Agholi et al.(2013); Jiang et al., 2014; Liu et al.(2014)
<i>C. canis</i>	Fayer et al. (2001)	Cães	Muitos relatos (cf. Lucio-Forster et al.2010)
<i>C. hominis</i>	Morgan-Ryan et al. (2002)	Homens	Relato comum em humanos
<i>C. suis</i>	Ryan et al. (2004)	Porcos	Xiao et al. (2002)a; Leoni et al. (2006); Cama et al. (2007); Wang et al.(2013)a
<i>C. bovis</i>	Fayer et al.(2005)	Bovinos	Khan et al.(2010); Ng et al.(2012); Helmy et al.(2013)
<i>C. fayeri</i>	Ryan et al.(2008)	Marsupiais	Waldron et al. (2010)
<i>C. macropodum</i>	Power and Ryan (2008)	Marsupiais	Não relatado

**Quadro 1- Espécies de *Cryptosporidium* em mamíferos (continuação)**

<i>C. ryanae</i>	Fayer et al. (2008)	Bovinos	Não relatado
<i>C. xiaoi</i>	Fayer et al. (2010)	Ovinos e caprinos	Adamu et al. (2014)
<i>C. ubiquitum</i>	Fayer et al. (2010)	Ruminantes, roedores e primatas	Fayer et al.2010; Elwin et al.2012
<i>C. cuniculus</i>	Re: Robinson et al.(2010) Inman & Takeuchi, (1 979)a	Coelhos	Chalmers et al.(2009); Anon (2010); Molloy et al.(2010); Chalmers et al.(2011); Anson et al., 2014; Koehler et al., 2014; Chalmers, 2012
<i>C. tyzzeri</i>	Re: Ren et al.(2012) Tyzzer (1912) ( <i>C. parvum</i> )a	Camundongos	Raskovaet al.(2013)
<i>C. viatorum</i>	Elwinet al.(2012)	Homens	Elwinet al.(2012); Insulander et al.(2013)
<i>C. scrofarum</i>	Kváč et al.(2013)	Porcos	Kváč et al.(2009a); Kváč et al.(2009b)
<i>C. erinacei</i>	Kváč et al.(2014)	Ouriços e cavalos	Kváč et al.(2014)
<i>C. rubeyi</i>	Li et al.(2015)	Esquilos	Não relatado

Re: Rediscricção; a: Descricção inicial

**Fonte:** Adaptado de RYAN; FAYER; XIAO, 2014; ZAHEDI et al, 2016.

**Quadro 2- Espécies de *Cryptosporidium* em aves, anfíbios, peixes e répteis.**

<u>Espécie</u>	<u>Autor</u>	<u>Principal hospedeiro</u>	<u>Reportado em seres humanos</u>
<i>C. serpentis</i>	Levine (1980)	Cobras e lagartos	Não relatado
<i>C. meleagridis</i>	Slavin (1955)	Aves	Relato comum em humanos
<i>C. varanii</i>	Pavlásek et al. (1995)	Lagartos	Não relatado
<i>C. baileyi</i>	Current et al. (1986)	Aves	Não relatado
<i>C. molnari</i>	Alvarez-Pellitero & Sitja-Bobadilla (2002)	Peixes	Não relatado
<i>C. galli</i>	Re: Ryan et al.(2003) Pavlásek (1999)a	Aves	Não relatado
<i>C. fragile</i>	Jirkuet al. (2008)	Sapos	Não relatado
<i>C. huwi</i>	Ryan et al. (2015)	Peixes	Não relatado
<i>C. scophthalmi</i>	Alvarez-Pellitero et al., 2004; Costa et al., 2015	Peixe (Psetta maxima)	Não relatado

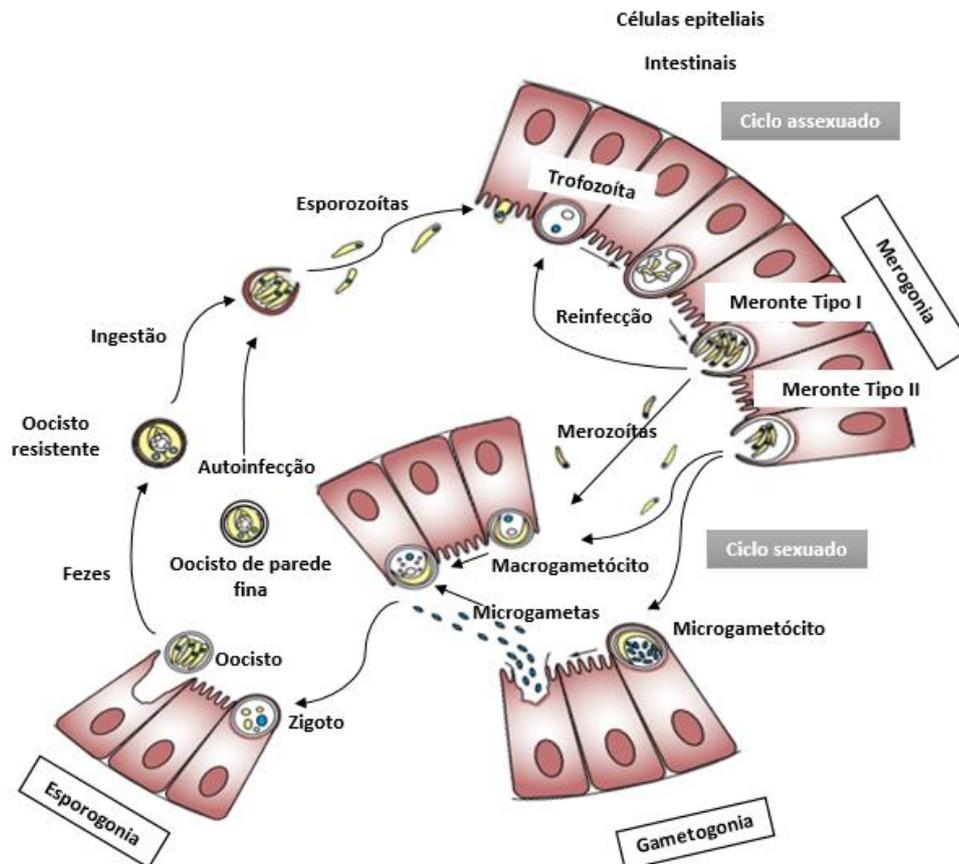
a: Descrição inicial

**Fonte:** Adaptado de RYAN; FAYER; XIAO, 2014; ZAHEDI et al, 2016.

### 2.3. ASPECTOS BIOLÓGICOS E CLÍNICOS

O ciclo biológico é monóxeno, concluído dentro do trato gastrointestinal de um único hospedeiro (ROSALES et al., 2005), passando pelas fases de merogonia, gametogonia e esporogonia (Figura 1).

**Figura 1- Ciclo biológico *Cryptosporidium* spp.**



**Fonte:** Adaptado de SMITH; NICHOLS; GRIMASON, 2005.

O mecanismo de transmissão ocorre principalmente por via feco-oral, por meio do contato direto com fezes humanas ou de animais (JOHANSEN et al., 2014; SMITH, 2006), pelo contato pessoa-pessoa, comum em locais de aglomerações como escolas (HELLARD et al., 2003) e hospitais e em atividade sexual (SPONSELLER; GRIFFITHS; TZIPORI, 2014); ou de forma zoonótica, transmitida do animal vertebrado para o homem; pela exposição indireta por ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos (SMITH, 2007); e há relatos de transmissão por via inalatória (BARTA; THOMPSON, 2006; STEIN et al, 2006).

Normalmente o *Cryptosporidium* spp. acomete o intestino delgado, porém pode ser encontrado no intestino grosso e em locais extra-intestinais, tais como: trato respiratório, vesícula biliar, pâncreas, esôfago, estômago, fígado, faringe e apêndice (BOUZID et al., 2013; CHACÍN-BONILLA; CHENG-NG, 2008).

O oocisto ingerido sofre ação da temperatura, pH, sais biliares e proteases que agem em sua parede causando o desencistamento e liberação dos quatro esporozoítas contidos em seu interior. Os esporozoítas são móveis e se deslocam para a região apical das células do trato intestinal. Por meio de receptores específicos (SMITH; NICHOLS; GRIMASON, 2005), aderem as células epiteliais do intestino e são englobados pela membrana da célula hospedeira, internalizando e formando um vacúolo parasitóforo intracelular, mas extracitoplasmático, onde diferenciam-se em trofozoítas. Estes, após múltiplas divisões assexuadas (merogonia), desenvolvem-se em duas gerações de merontes, tipo I e II (BARTA; THOMPSON, 2006; VALIGUROVA et al., 2007). Os merontes do tipo I, liberam de seis a oito merozoítas no lúmen intestinal, que invadem outras células, podendo continuar o ciclo assexuado, através da formação de merontes do tipo I ou se diferenciar em meronte tipo II. Os quatro merozoítas produzidos pelo meronte tipo II são liberados e iniciam a fase sexuada do ciclo, diferenciando-se em macro e microgametócitos. Os macrogametócitos evoluem para macrogametas imóveis e permanecem no interior da célula hospedeira. Já os microgametócitos evoluem para microgametas móveis e quando livres, fertilizam os macrogametas gerando zigotos, que encistam dando origem a oocistos de parede grossa ou de parede fina, que são liberados no lúmen intestinal e esporulam. Os oocistos de parede fina tornam-se fonte de autoinfecção, desencistando e liberando esporozoítas que continuaram a infectar as células intestinais, e os oocistos de parede grossa são eliminados junto as fezes para o ambiente (ALBUQUERQUE et al., 2012; BARTA; THOMPSON, 2006).

A perda estrutural das vilosidades intestinal, devido a invasão das células epiteliais na borda luminal e as reações imunológica e inflamatória do hospedeiro, leva ao comprometimento da osmolaridade, diminuindo a absorção e aumentando a secreção intestinal, que desencadeiam a diarreia. A sintomatologia é dependente do estado imunológico do hospedeiro, podendo ser autolimitante ou assintomática em hospedeiros imunocompetentes e crônica a fatal em hospedeiros imunodeficientes. A gravidade dos sintomas é influenciada pela idade, estado nutricional, imunidade, número de oocistos ingeridos e a espécie infectante (CHALMERS; DAVIES, 2010).

### **2.3.1. Aspectos clínicos nos seres humanos**

Nos seres humanos, indivíduos imunodeficientes, particularmente portadores HIV e crianças menores de cinco anos de idade, possuem maior pré-disposição à infecção por *Cryptosporidium* spp. e o desenvolvimento da forma mais grave da doença (BOUZID et al., 2013). Em indivíduos imunocompetentes, normalmente a criptosporidiose é assintomática ou autolimitante.

Os sintomas comuns são diarreia leve a grave, desconforto abdominal, náuseas, febre baixa, e sintomas inespecíficos, tais como: mialgia, dor de cabeça e anorexia, que podem durar de uma a duas semanas em indivíduos imunocompetentes ou até meses em indivíduos imunodeficientes (BARTA; THOMPSON, 2006; JOKIPII, 1986). Em crianças menores de cinco anos de idade, pode gerar desnutrição afetando seu desenvolvimento físico e intelectual a longo prazo, associado a episódios prolongados de diarreia (BARTELT et al., 2013; LIMA et al., 2000).

O grau de comprometimento imunológico do hospedeiro está relacionado as infecções em regiões diferentes do local comumente afetado, como acometimento de todo o sistema gastrointestinal (vesícula biliar e ducto pancreático), causando pancreatite, colecistite e colangite esclerosante, e o sistema respiratório, com envolvimento tráqueo-brônquica e dos seios nasais (CHALMERS; DAVIES, 2010).

Apresenta baixa dose infectante (10-30 oocistos), mesmo em indivíduos imunocompetentes. O período de incubação médio da doença tende a ser de 7 dias (intervalo de 1 a 12 dias), com duração média de 12 dias (variação 2-26 dias), podendo haver excreção de oocistos pelo hospedeiro por até 60 dias após a recuperação clínica (CACCIO; POZIO, 2001; DUPONT et al., 1995; OKHUYSEN et al., 1999).

### **2.3.2. Aspectos clínicos em cães**

Os animais infectados, normalmente são assintomáticos ou podem manifestar diarreia crônica ou intermitentes. O imunocomprometimento do animal, geralmente associada a doenças imunossupressoras e coinfeções com outros patógenos é o fator predisponente para aumento da susceptibilidade a infecção por *Cryptosporidium* spp. e a gravidade dos sintomas (ABE et al., 2002; FAYER et al., 2001; MORGAN et al., 2000). Normalmente a infecção ocorre pela espécie *C. canis*, porém *C. parvum* e *C. muris* também foram detectados (ABE; KIMATA; ISEKI, 2002; FAYER et al., 2001; LUPO et al., 2008)

A sintomatologia está relacionada com diarreia aquosa, anorexia e perda de peso, ocorrendo o agravamento dos sintomas em caso de infecções concomitantes (SCORZ; TANGTRONGSUP, 2010).

### 2.3.3. Aspectos clínicos em aves

Em aves, a criptosporidiose acomete o trato respiratório e gastrointestinal, normalmente apenas uma forma da doença é encontrada. Porém, pode ser encontrado em outras regiões, como a bursa de Fabricius, conjuntiva ocular, ouvido médio, pâncreas e rins (NAKAMURA; MEIRELES, 2015).

As espécies *Cryptosporidium baileyi*, *C. meleagridis* e *C. galli* são as mais encontradas infectando diversas espécies de aves e o genótipo aviário (I–V), genótipo de ganso (I–IV), o genótipo galinhola euro-asiático e genótipo pato preto, já foram reportados (NAKAMURA; MEIRELES, 2015; RYAN, 2010).

A infecção por *Cryptosporidium* spp. pode estar associada a co-infecções, podendo resultar em mortalidade. A espécie *C. baileyi* e genótipo aviário II, são responsáveis por infectar o sistema respiratório (cornetos nasais, nasofaringe, seios nasais, laringe, traquéia, pulmões e sacos aéreos), ouvido médio e conjuntiva ocular. Causando sinusite (“cabeça inchada”), espirros, dispneia, conjuntivite, depressão, letargia, anorexia, podendo desencadear o aumento da mortalidade (SRÉTER; VARGA, 2000; NAKAMURA; MEIRELES, 2015). Na infecção pela espécie *C. baileyi*, causa infecção grave da bursa de Fabricius, podendo levar a supressão da resposta humoral em aves (HAMIDINEJAT et al., 2014; LINDSAY; BLAGBURN, 1990; NAKAMURA; MEIRELES, 2015).

A infecção pela espécie *C. galli*, o genótipo aviário III e o genótipo galinhola euro-asiático, acometem o sistema gástrico, causando vômitos, perda de peso e lesões no proventrículo (NAKAMURA; MEIRELES, 2015).

Normalmente, a infecção por *C. meleagridis* é subclínica, mas quando sintomático a infecção acomete o sistema entérico, levando a enterite, diarreia, distensão intestinal e mortalidade (BAROUDI, D. et al., 2013; NAKAMURA; MEIRELES, 2015; MORGAN et al., 2001; RYAN, 2010).

O período pré-patente é em média de 2-7 dias e o período patente de 4-32 dias (SRÉTER; VARGA, 2000).

#### **2.3.4. Aspectos clínicos em Gambás**

São escassas as informações sobre os aspectos clínicos da doença em animais silvestres.

Os gambás são aparentemente assintomáticos (HILL; DEANE; POWER, 2008). As espécies *C. fayeri* e *C. macropodum* são descritas infectando marsupiais (POWER, 2010).

#### **2.4. TRATAMENTO**

Atualmente não existe tratamento preconizado para a criptosporidiose. A doença é autolimitante em indivíduos imunocompetentes, reduzindo os sintomas espontaneamente. As principais estratégias de tratamento estão relacionadas a administração de tratamento sintomático associado a terapia de suporte, incluindo terapia de reidratação, reposição de eletrólitos, suporte nutricional e agentes antimotilidade.

A Nitrozoamida, composto tiazole, é o único medicamento licenciado pelo Food and Drug Administration (FDA) nos EUA, para o tratamento da criptosporidiose no homem imunocompetente e crianças maiores de um ano de idade, não sendo recomendado para pacientes imunodeficientes (FOX; SARAVOLATZ, 2005). Para os imunodeficientes, o tratamento baseia-se na melhora do estado imunológico, já que o grau de imunossupressão está associado com a manifestação mais crônica e debilitante da criptosporidiose.

Para os animais, há estudos da efetividade no tratamento da doença com Nitrozoamida, Lactato Halofuginona (PATERMANN et al., 2014), associações de Metronidazol e Furazolidona (RANDHAWA, 2012), Paramomicina, Azitromicina (NASIR, 2013), e outras drogas (SHAHIDUZZAMAN; DAUGSCHIES, 2012).

É necessário o desenvolvimento de fármacos eficazes contra o *Cryptosporidium*, principalmente para os indivíduos imunodeficientes, e uma vacina segura e eficaz.

#### **2.5. IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA E EPIDEMIOLOGIA**

O gênero *Cryptosporidium* acomete diferentes espécies de vertebrados, tais como aves, répteis, peixes, anfíbios, humanos e outros mamíferos, podendo infectar um ou vários hospedeiros, dependendo da espécie ou genótipo do agente. Possui distribuição cosmopolita, exceto na Antártica, sendo reportado em países desenvolvidos e em desenvolvimento, afetando pessoas em mais de 106 países (FAYER; XIAO, 2008; XIAO et al., 2001).

O agente é responsável por causar diarreia moderada a grave, desnutrição e consequente deficiência de desenvolvimento físico e intelectual em crianças de vários países, incluindo o

Brasil (BARTELT et al., 2013). É apontado como um dos quatro principais agentes etiológicos graves associados a diarreia infantil nos países em desenvolvimento. Na África Subsaariana e sul da Ásia é considerado o segundo agente causador de diarreia em crianças, perdendo apenas para rotavírus (KOTLOFF et al., 2013).

Representa uma importante causa de morbidade e mortalidade em pacientes com SIDA. Estudos em todo o mundo têm demonstrado uma prevalência de até 47% de criptosporidiose em pacientes imunodeficientes (YOUSSEF et al., 2008). Em regiões onde o agente é endêmico, há risco de morte para pacientes em tratamento com imunossupressores, por exemplo transplantados (EDVINSSON et al., 2009).

Surtos de criptosporidiose vêm ocorrendo em todo o mundo, principalmente devido a contaminação de fontes de água potável com oocistos, correspondendo a 60,3% dos surtos reportados, tendo maior ocorrência na Austrália, América do Norte e Europa (BALDURSSON; KARANIS, 2011; GUZMAN-HERRADOR, et al., 2015). Os surtos estão relacionados a veiculação hídrica (água potável ou de recreação - piscinas, lagos), alimentar (alimentos não alcoólicos como cidra, produtos frescos, suco de fruta, vegetais crus, leite), contato com animais de fazenda durante visitas e pessoas com diarreia (COPE et al., 2015; HUNTER et al., 2004; ROSE; SLIFKO, 1999; SMITH; NICHOLS, 2010).

Devido à importância para a saúde pública e relevância como causa de surtos por veiculação hídrica, a OMS classifica o *Cryptosporidium* como um dos patógenos de referência na análise de água potável, sendo um indicativo da qualidade de água em âmbito mundial, e o quinto entre os dez patógenos de maior importância na transmissão de alimentos pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) / OMS (FOA, 2014; RYAN; FAYER; XIAO, 2014; SAVIOLI; SMITH; THOMPSON, 2006).

As espécies responsáveis pela maior parte dos surtos são o *C. parvum* e o *C. hominis*. Recentemente, o *C. cuniculus* causou um surto por veiculação hídrica na Inglaterra (RACHEL et al, 2009). O maior surto de transmissão por veiculação hídrica ocorreu em 1993 nos EUA, em Milwaukee, onde 400.000 pessoas se infectaram após consumirem água potável (MAC KENZIE et al, 1994). O segundo maior surto ocorreu recentemente em 2010 na Suécia, em Östersund, onde 27.000 pessoas se infectaram com *C. hominis* após o consumo de água potável, sendo considerado o maior surto conhecido na Europa (MICAEL et al, 2014).

Existem vários fatores que corroboram para o elevado nível de contaminação ambiental, o aumento da probabilidade de transmissão e o desenvolvimento da doença, tais como: o acometimento de um ampla gama de hospedeiros; a eliminação de oocistos na forma infectante; a baixa dose infectante; o tempo de eliminação dos oocistos, que pode ocorrer mesmo após a

eliminação dos sintomas; o número de oocistos eliminados; a resistência ao estresse ambiental e a desinfecção padrão, podendo sobreviver por meses no ambiente ou a cloração da água de beber; a concentração de oocistos ingeridos e a virulência da espécie; e o nível de imunológico do hospedeiro (GRACZYK; FRIED, 2007; PUTIGNANI; MENICHELLA, 2010). Os principais fatores de risco estão relacionados a idade (crianças menores de cinco anos), ao estado imunológico (imunodeficientes), ao contato com indivíduos diarreicos e animais de fazenda, viagens para áreas endêmica, água de recreio e a ingestão de água não tratada adequadamente para eliminação de oocisto (CACCIÒ et al, 2005).

A criptosporidiose demonstra diferença sazonal global em relação aos picos de infecção, com altos índices no verão e outono, podendo existir uma associação entre os picos em períodos chuvosos, devido a maior probabilidade de contaminação dos recursos hídricos (PUTIGNANI; MENICHELLA, 2010; TELLEVIK, et al., 2015). Os países da Oceania (Austrália, Nova Zelândia) e do Reino Unido apresentam altos picos na primavera e picos menores no outono. Na América do Norte, Canadá e parte da Europa, apresentam altos picos no final do verão (LAL et al, 2012). No Brasil, não existem estudos que possam contribuir para estas informações.

As espécies zoonóticas de *Cryptosporidium* e a espécie *C. hominis*, demonstram diferenças no modo de transmissão entre países em desenvolvimento e desenvolvido, e entre áreas rurais e urbanas em países desenvolvidos, especialmente em relação a transmissão zoonótica (XIAO; FAYER, 2008b). Das espécies de *Cryptosporidium* comumente encontradas infectando o homem, o *C. parvum* e *C. hominis* são responsáveis por mais de 90% dos casos humanos de criptosporidiose na maioria das regiões (XIAO et al, 2004).

A prevalência da infecção em seres humanos e animais varia dependendo da localização geográfica, padrão de higiene, estação do ano, idade, proximidade de exploração e contato direto com animais de fazenda. Valores altos de prevalência tendem a serem observados em áreas de baixas condições socioeconômicas, ligado ao baixa qualidade alimentar e infraestrutura de moradia (BECKER; OLOYA; EZEAMAMA, 2015), e em área rural comparado as comunidades urbanas, locais de clima quente, países em desenvolvimento e acometendo indivíduos jovens e imunodeficientes (GIANGASPERO; BERRILLI; BRANDONISIO, 2007; HUANG; WHITE, 2006; MAK, 2004).

Em geral, a prevalência de *C. hominis* e *C. parvum* em humanos, varia em diferentes regiões do mundo, sendo em média de 62% em alguns locais na América do Norte e Sul, Austrália e África, e de 57% em áreas da Europa, principalmente no Reino Unido (CACCIÒ et al, 2005). O *C. parvum* é mais comum no Oriente e o *C. hominis* é dominante no restante do

mundo, principalmente em países desenvolvidos. Na Europa predomina de *C. parvum* e *C. hominis* em igual proporção (XIAO, 2010).

Segundo Bushen et al. (2007), apesar de não haver diferenças entre *C. hominis* e *C. parvum* na ocorrência de diarreia, estes apresentam diferentes efeitos nutricionais em crianças infectadas. O *C. hominis* tende a causar maiores deficiências de crescimento infantil, mesmo na ausência de sintomas.

Economicamente, *Cryptosporidium* spp. é responsável por afetar bezerros e cordeiros, retardando o desenvolvimento, diminuindo a produção e podendo levar a mortalidade, além de causar doença respiratória em aves domésticas e de caça (BOUZID et al., 2013).

Os animais são potenciais hospedeiros de *Cryptosporidium* spp., podendo desempenhar um importante papel na transmissão e contaminação ambiental para os seres humanos e outros animais. O contato com bovinos ou animais de fazenda tem sido incriminado como um alto indício de transmissão zoonótica por *C. parvum*, para estudantes de veterinária, pesquisadores e crianças (XIAO; FAYER, 2008b).

A importância dos cães e gatos na transmissão zoonótica ainda não está muito clara, apesar das espécies *C. canis* e *C. felis*, comuns nessas espécies de hospedeiros, serem relatadas infectando indivíduos imunodeficientes (LUCIO-FORSTER et al, 2010; THOMPSON; PALMER; O'HANDLEY, 2008).

Várias espécies de animais silvestres são infectadas por *Cryptosporidium* spp., apesar da pouca informação sobre as espécies e genótipos que parasitam esses animais e a interação entre estas e os seres humanos, podem ser fonte de contaminação e manutenção de agente no ambiente (APPELBEE; THOMPSON; OLSON, 2005; FENG, 2008; REBOREDO-FERNANDEZ et al. 2015). Para a saúde pública, o genótipo cervine, infecta diferentes hospedeiros, sendo descrito com significativo potencial zoonótico, além do *C. parvum* e *C. muris* identificados infectando animais silvestres (FENG, 2008). Porém, estudos são necessários para melhor determinar a sua importância zoonótica.

## **2.6. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL**

A criptosporidiose humana ou animal pode ser diagnosticada através de vários métodos laboratoriais pela detecção de oocistos nas fezes, em ambiente, água ou alimentos (CHEN et al, 2002; JEX et al, 2008). O diagnóstico da infecção pelo *Cryptosporidium* spp. é comumente feito por análise fecal utilizando exame microscópico, sendo normalmente combinada com técnicas de coloração ( Ziehl-Neelsen, Auramina, Safranina, Kinyoun, Verde de Malaquita),

podendo o esfregaço fecal ser corado diretamente ou após técnicas de concentração, como a técnica de flutuação por meio da utilização de soluções saturadas de sacarose ou técnica de sedimentação, com o formaldeído-éter, para facilitar a detecção do oocisto (LALLO; BONDAN, 2006; MUNDIM et al., 2007). A combinação das técnicas facilita a visualização e detecção do patógeno, devido ao pequeno tamanho do oocisto que mede de 4-6µm de diâmetro e por possuir ciclo de eliminação intermitente, com variação na densidade de oocistos eliminados nas fezes. Essas técnicas demandam tempo e apresentam sensibilidade e especificidade variadas (SMITH et al., 2007).

A técnica microscópica possui algumas limitações ligadas a sensibilidade em relação ao número de oocistos presentes nas amostras, a experiência do microscopista, a demora na obtenção do resultado e a presença de artefatos na amostra. Esses artefatos, possuem morfologia e característica álcool-ácido-resistente semelhante ao oocisto de *Cryptosporidium*, que podem gerar resultado falso-positivo. Uma outra limitação da técnica é o fato de não ser possível diferenciar por meio da morfologia e morfometria as espécies (FAYER; MORGAN; UPTON, 2000; VAN DEN BOSSCHE et al, 2015).

Os métodos imunológicos utilizados em amostras clínicas e ambientais, como o ensaio imunoenzimático ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”) e testes Imunocromatográficos, apresentam vantagens em relação a microscopia convencional, sendo mais sensíveis e específicos, de fácil execução e permitindo o processamento de um grande número de amostras num curto período.

A Imunofluorescência Direta (IFD), também um método imunológico, emprega anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium* marcados com isotiocianato de fluoresceína, apresentando alta sensibilidade e especificidade em amostras clínicas e ambientais (JEX et al., 2008). É uma técnica dispendiosa, com necessidade de um microscópio de fluorescência e uma equipe treinada (CHALMERS et al., 2011; GARCIA; SHIMIZU, 1997).

A detecção de coproantígenos (antígenos em amostra fecal) por meio de ensaio imunoenzimático ELISA é frequentemente utilizado em laboratórios e em pesquisas epidemiológicas, apresentando maior sensibilidade que a técnica de microscopia convencional (CHALMERS et al., 2011; GIADINIS et al., 2012; MORGAN; THOMPSON, 1998).

A utilização de técnicas baseadas no reconhecimento molecular de um alvo específico do patógeno estão cada vez mais sendo empregadas para o diagnóstico e pesquisa da infecção por *Cryptosporidium* spp.. Essas contribuem para a melhor compreensão da epidemiologia, transmissão, taxonomia, interação parasita-hospedeiro, biologia e diferenciação entre as espécies de *Cryptosporidium* (XIAO et al., 2004).

Entre as técnicas moleculares, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é amplamente utilizada como uma ferramenta de diagnóstico em amostras clínicas e ambientais para a detecção e diferenciação em nível de espécie, genótipo e subgenótipo do patógeno em intervalos de tempo relativamente curtos. Baseia-se na amplificação exponencial de um fragmento de ácido nucléico selecionado por replicação mediada por enzimas *in vitro*. Essa é extremamente sensível e específica na detecção de *Cryptosporidium*, com disponibilidade de aplicação em diferentes variações da técnica (MORGAN; THOMPSON, 1998; SAEED; AHMAD, 2013).

As variações da PCR são: “Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction” (RT – PCR), “Nested Polymerase Chain Reaction” (Nested-PCR), “Restriction Fragment Length Polymorphism Polymerase Chain Reaction” (RFLP-PCR), “Quantitative PCR” (qPCR), entre outras. A PCR pode ser multiplex, detectando e diferenciando simultaneamente diferentes espécies de patógenos (STARK et al., 2011).

A PCR quantitativa (qPCR) é uma variação da PCR convencional, segue os princípios gerais desta, no entanto, permite a quantificação do produto por meio de fluorescência à medida que a reação progride. É usada com sucesso para estimar carga parasitária e realizar o diagnóstico pela pesquisa do DNA do parasito, constituindo uma grande vantagem no monitoramento da infecção (ALONSO; AMOROS; CANIGRAL, 2011; HIGGINS et al., 2001).

Apesar da técnica de PCR apresentar maior sensibilidade em relação as técnicas imunológicas, seu resultado pode ser comprometido devido a qualidade e quantidade do DNA extraído e a presença de inibidores (ácido húmicos, bilirrubina, sais biliares e polissacarídeos complexos) na amostra (JIANG, J. et al., 2005; SAEED; AHMAD, 2013; SMITH et al., 2007). Outra desvantagem do método é que ela apresenta alto custo e necessidade de infraestrutura, assim como a alta competência técnica.

Para o diagnóstico do *Cryptosporidium* por PCR, o gene Codificante da Subunidade Menor Microssomal (SSU rRNA) é o alvo mais utilizado, por ser uma região conservada, de menor polimorfismo e permitir uma identificação específica do parasita. A Proteína de Parede do oocisto (COWP), o codificante de glicoproteína 60KDa (GP60), a proteína de choque térmico de 70KDa (HSP-70), os lócus de microssatélite 1 e 2, entre outros, também são empregados para identificar e classificar as espécies, genótipos ou subgenótipos (BAKHEIT et al., 2008; SKOTARCZAK, 2010).

### 3. OBJETIVOS

---

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

I. Avaliar a ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp. em cães, galinhas de capoeira e gambás provenientes do Campus Fiocruz da Mata Atlântica (CFMA).

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Pesquisar coproantígenos de *Cryptosporidium* spp. por meio do ELISA em amostras de cães e galinhas domésticas.

II. Pesquisar o DNA de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de cães, galinhas domésticas e gambás por meio da PCR quantitativa (qPCR).

III. Estabelecer parâmetros comparativos frente aos resultados obtidos com as técnicas imunológica e molecular.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 4.1. TRABALHO DE CAMPO

#### 4.1.1. Área de estudo: Campus Fiocruz da Mata Atlântica (CFMA)

A área de estudo localiza-se na região de Jacarepaguá, zona oeste da cidade do Rio de Janeiro, ocupando a área cedida pela União, o Setor 1 administrado pela Fiocruz. Compõe a maior parte do fracionamento da Colônia Juliano Moreira (CJM), antigo hospital psiquiátrico do Ministério da Saúde que após sua municipalização pelo Sistema Único de Saúde foi subdividido em setores. Esse é o setor com área de floresta mais bem conservado da antiga colônia, estende-se por cerca de 5 milhões de metros quadrados, sendo composto por 65% da antiga CJM e 50% do Parque Estadual da Pedra Branca, que juntos somam cerca de 80% de área remanescente da Mata Atlântica. O CFMA constitui ainda uma Área de Proteção Ambiental na parte que se encontra acima da cota dos 100 metros de altitude, formando um corredor ecológico entre as encostas do Maciço da Pedra Branca e do Maciço da Tijuca. Além disso, possui um rico conjunto arquitetônico e patrimônio cultural tombado pelos órgãos de defesa do patrimônio histórico (FIOCRUZ, 2004; VIANA, 2012).

Ao longo dos anos, a área sofreu com o desmatamento devido a utilização de madeira para lenha, apropriação da área para plantio comercial (cafeicultura) e de subsistência, assim como a ampliação de áreas de pastagem e de crescimento urbano, que comprometeram parte da área de floresta.

Atualmente, encontram-se instaladas no território do CFMA cinco comunidades (Caminho da Cachoeira, Viana do Castelo, Sampaio Corrêa, Faixa Azul e Fincão) que totalizam cerca de 225 famílias, aproximadamente 800 moradores, a maioria descendentes de antigos funcionários da CJM (ISER/FIOCRUZ, 2004).

Na maioria das comunidades, existe a presença de animais domésticos e de criação, como: cães, galinhas, gansos, patos, porcos e cavalos. Em cerca de 63% das residências há a presença de animais, que em sua maioria são criados soltos. Além destes, é comum a presença de animais errantes. A proximidade com a mata leva ao contato constante com animais silvestres (pequenos roedores, marsupiais, cobras, lagartos, micos, tatus, lebres, saguis, preás, ouriços e aves), que são encontrados no peridomicílio (GOUVEIA, 2008).

As comunidades apresentam diferenças marcantes em relação as condições de salubridade, escolaridade e renda familiar. As comunidades Viana do Castelo e Sampaio Corrêa apresentam melhores condições socioeconômicas. As três comunidades mais isoladas,

Caminho da Cachoeira, Faixa Azul e Fincão, muito se assemelham as comunidades rurais, desprovidas dos benefícios da urbanização.

Os principais problemas das comunidades estão relacionados com a falta de rede de esgoto e tratamento de água. Grande parte das moradias possuem esgoto improvisado com despejo de efluentes residenciais em valas a céu aberto próximo as residências ou diretamente nos rios. A captação de água é feita diretamente das cachoeiras locais, através de canos e tubulações, muitas vezes danificados (VANINI et al., 2011).

A maior parte das moradias são precárias e em locais de risco, sujeitas a alagamento e desmoraonamento nos períodos de chuva. A falta de pavimentação e estrutura de escoamento de água das chuvas e das cachoeiras, que tendem a transbordar na mesma época, agravam a situação. Parte das comunidades não apresentam coleta regular de lixo, que são colocados em caçambas coletivas ou coletores individuais, ato que atrai animais (VANINI et al., 2011).

É uma área marcada por assentamentos irregulares e condições socioeconômicas precárias. Tais situações propiciam a proliferação de vetores e disseminação de doenças, como: dengue, leishmaniose e infecções gastrointestinais (verminoses e outras doenças).

#### **4.1.2. Coleta das amostras fecais**

As amostras fecais foram coletadas entre 2014 e 2015, mediante a expedições semanais domiciliares nas comunidades que se encontram no Campus Fiocruz da Mata Atlântica, pela equipe que desenvolve o “Programa de Manejo da Fauna Silvestre e Controle de Zoonoses no Campus Fiocruz da Mata Atlântica”, composta por quatro veterinários e sob coordenação do Dr. Fabiano Borges Figueiredo, do Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos- Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas - INI - FIOCRUZ. A amostragem foi por conveniência, frente aos animais disponíveis no momento da coleta.

##### **a) Amostras provenientes de cães**

Os animais foram contidos fisicamente de forma manual e as amostras fecais coletadas diretamente da ampola retal, transferidas para um tubo de polipropileno estéril (1,5mL) e acondicionada em isopor com gelo, sendo posteriormente congelada a temperatura de -20°C até o momento do processamento.

**b) Amostras provenientes de galinhas de capoeira**

O chão dos galinheiros ou locais onde as aves pernoitavam foram cobertos com plástico ao entardecer e verificados na manhã seguinte. Um *pool* de cinco fezes aleatórias depositadas sobre a área coberta foi coletado com espátulas descartáveis e armazenado em frascos coletores estéreis. As amostras foram acondicionadas sob refrigeração em isopor e posteriormente congeladas a temperatura  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do processamento.

**c) Amostras provenientes de marsupiais (Gambás)**

As coletas foram realizadas em expedições com duração de cinco noites consecutivas. As armadilhas tipo Tomahawk (14x14x40cm) com iscas contendo uma mistura composta de pasta de amendoim, bacon, aveia e banana, foram colocadas em dois transectos lineares em intervalos de 20m.

As armadilhas foram verificadas a cada manhã dos dias de expedição para captura dos animais, reposição das iscas e coleta de fezes disponíveis nas armadilhas. Os animais foram triados para eutanásia pela equipe do projeto envolvido. Somente animais adultos foram selecionados. Animais pequenos, fêmeas prenhes ou com filhotes e animais agressivos foram excluídos e identificados com um brinco e soltos no local de captura. Os animais triados foram submetidos a eutanásia e seus órgãos de interesse foram coletados para os trabalhos envolvidos.

As amostras fecais individuais foram coletadas diretamente do intestino durante a necropsia e colocadas em tubos de polipropileno estéreis (1,5mL), armazenadas em isopor com gelo e posteriormente congeladas a temperatura  $-20^{\circ}\text{C}$  até a análise.

**4.2. TRABALHO LABORATORIAL****4.2.1. Processamento das amostras fecais**

No laboratório, as amostras fecais foram catalogadas e processadas. Inicialmente cada amostra foi homogeneizada com água destilada e filtrada com auxílio de gaze para retirada de resíduos grosseiros. Após a filtragem a solução foi distribuída em tubos de polipropileno estéreis de 1,5mL e centrifugada durante 10 minutos a  $402,4 \text{ xg}$ . Após este procedimento, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento separado em tubos de polipropileno estérreo (1,5mL) para realização das técnicas ELISA e qPCR. De cada sedimento da amostra, foi aliquoteado um volume de  $220\mu\text{L}$ , que foram acondicionados à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  para os procedimentos posteriores de extração de DNA e o restante sendo armazenado sob refrigeração a uma temperatura de aproximadamente  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.2.2. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

No Laboratório de Imunodiagnóstico- Departamento de Ciências Biológicas/ENSP foi realizado a detecção de coproantígenos de *Cryptosporidium* spp., através da utilização do kit imunoenzimático ELISA *Cryptosporidium stool antigen detection* (© IVD Research, Inc., Carlsbad, CA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Para tal procedimento, uma alíquota de 100µL de cada amostra processada sem conservante foi homogeneizada com 100µL do tampão de diluição em uma placa de diluição. Aos micropoços da placa previamente sensibilizados com anticorpos anti-*Cryptosporidium*, foi adicionado 100µL das amostras diluídas, tendo um controle negativo e um positivo, ambos fornecidos pelo fabricante. Após incubação por 60 minutos à temperatura ambiente, os micropoços foram lavados cinco vezes com solução de lavagem previamente diluída e invertidos em um papel absorvente para remoção do excesso de solução de lavagem e resíduos. Após este procedimento, foi adicionado duas gotas de conjugado (anticorpos anti-*Cryptosporidium* conjugados com peroxidase) a cada micropoço, seguido de incubação por 30 minutos à temperatura ambiente e posteriormente foi realizado nova lavagem. Logo após, duas gotas de cromógeno Tetrametilbenzidina (TMB) foi adicionado a cada micropoço e incubado por 10 minutos, em seguida foi adicionado duas gotas da solução de bloqueio contendo ácido fosfórico. A leitura da reação foi realizada 5 minutos após a adição da solução de bloqueio.

A interpretação dos resultados foi realizada mediante a avaliação da densidade óptica (DO) das amostras utilizando o Leitor Automático de Microplacas (Testline Elx800) com filtro de 450/630 nm. O material avaliado visualmente foi considerado positivo para a presença de antígenos de *Cryptosporidium* spp. quando apresentou leitura de absorbância igual ou superior a 0,08 DO.

#### 4.2.3. Método molecular

##### 4.2.3.1. Extração do DNA genômico

A extração de DNA foi realizada no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos- INI – FIOCRUZ, utilizando a plataforma de extração automatizada QIAcube com o kit comercial “*QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit*” (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, 1000µL do tampão Inhibitex foi adicionado a cerca de 200µL em cada amostra, em seguida utilizou-se vortex por um minuto e levado ao banho seco a 95°C por 5 minutos. Posteriormente utilizou-se vortex por 15 segundos seguido da centrifugação por um minuto a 14.000 rpm. Após este procedimento, 200µl do sobrenadante foi transferido para tubo RB e colocado na QIAcube para extração

automatizada. Ao final da extração, as amostras foram eluídas em 200 µl de tampão AE (fornecido pelo fabricante) e armazenadas a -20°C.

#### **4.2.3.2. Quantificação de DNA por fluorimetria**

Esta técnica permite a quantificação de DNA utilizando corantes fluorescentes, que são detectados pela plataforma Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen®) quando utilizado o kit Qubit® dsDNA HS Assay, seguindo as instruções do fabricante.

Para a quantificação, inicialmente são realizadas curvas utilizando os dois padrões do kit, sendo que um representa o menor ponto da curva (padrão 1) e o outro o maior (padrão 2). A solução de trabalho foi preparada em um microtubo, utilizando-se 199 µL de tampão Qubit e 1 µL de reagente Qubit para cada amostra. Para a preparação dos padrões da curva (padrão 1 e padrão 2) foram adicionados 190 µL da solução de trabalho e 10 µL do padrão 1 ou 2, respectivamente, sendo as preparações homogêneas e incubadas a temperatura ambiente por dois minutos. Para a quantificação das amostras, foram adicionados 199 µL da solução de trabalho e 1 µL da amostra de DNA a ser quantificada e incubada a temperatura ambiente por dois minutos. Após a leitura no fluorímetro, a concentração de DNA em nanogramas por microlitro (ng/ µL) será definida através da curva-padrão, sendo os valores registrados. O limite de detecção desta metodologia foi de 0,0005 ng de DNA em 1 µL.

#### **4.2.3.3. PCR quantitativo - Protocolo de amplificação de DNA**

Para a amplificação por PCR quantitativo, utilizou-se a plataforma StepOne™ (Applied Biosystems®) e sonda de hidrólise TaqMan® MGB. Com a finalidade de reconhecer a região conservada do gene 18S rDNA *Cryptosporidium* spp., utilizando *primers* CRU18S Forward GAG GTA GTG ACA AGA AAT AAC AAT ACA GG e Reverse CTG CTT TAA GCA CTC TAA TTT TCT CAA AG e a sonda TAC GAG CTT TTT AAC TGC AAC AA, descritas por Hadfield et al. (2011).

As reações foram realizadas num volume final de 25 µL, sendo 4 µL de amostra e 21 µL da mistura de reação, que continha 12,5 µL do reagente Universal Mastermix (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), 1,5 µL dos iniciadores CRU18S a 900nM, 2,5 µL da sonda a 200nM e 3 µL de soro albumina bovina (BSA) (Sigma- Aldrich®) numa concentração de 400ng/µL, segundo Hadfield et al. (2011) e Staggs et al. (2013).

As reações foram realizadas em placa de 48 poços (Applied Biosystems), vedada com filme adesivo (Applied Biosystems) após a pipetagem da reação, utilizando o seguinte

protocolo de amplificação: 1 ciclo de 50°C por 2 minutos, 1 ciclo de desnaturação a 95°C por 10 minutos e 55 ciclos de desnaturação a 95°C por 10 segundos e de anelamento/extensão a 60°C por 1min, segundo Hadfield et al. (2010).

Em cada placa de amplificação foi utilizado controles positivos e negativos e o ciclo de quantificação (Cq) ou threshold foi fixado em 0,02. Considerando positiva as amostras cujo o gráfico de amplificação ultrapassou o limiar threshold de 0.02 e apresentaram curva típica de amplificação (fase linear, exponencial e platô).

#### **4.2.3.4. Teste de inibição**

A fim de identificar a presença de inibidores na reação, um teste foi realizado em todas as amostras negativas pela qPCR. Foi utilizado o mesmo ensaio para detecção com qPCR, contendo o par de iniciadores e sonda pré-definidos, num volume final de reação de 29 µL, contendo 4 µL de DNA da amostra negativa na qPCR, 4 µL de DNA de amostra *Cryptosporidium* spp. positiva e 21 µL de mistura de reação composta de 12,5 µL de Universal Mastermix, 1,5 µL dos iniciadores CRU18S a 900nM, 2,5 µL da sonda a 200nM e 3 µL de soro albumina bovina (BSA) (Sigma- Aldrich®) a 400ng/ µL. As amostras de DNA que apresentaram amplificação foram consideradas positivas e livre de inibidores.

### **4.3. ASPECTOS ÉTICOS**

O presente estudo está arrolado aos projetos de pesquisa “Diagnóstico da infecção por tripanossomatídeos em mamíferos potenciais reservatórios no Brasil”, sob a coordenação do Dr. André Luiz Rodrigues Roque, do Instituto Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ , para captura de animais silvestres, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob licença LW-81/12 (ANEXO 1), pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e de Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (licença nº 13373-1) e Instituto Estadual do Ambiente (INEA), licença de coleta no Parque Estadual da Pedra Branca número 020/2011; projeto “Programa de Manejo da Fauna Silvestre e Controle de Zoonoses no Campus Fiocruz da Mata Atlântica”, sob coordenação do Dr. Fabiano Borges Figueiredo, do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas - IPEC/FIOCRUZ, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob as licença LW-7/15 (ANEXO 2) para *Canis lupus familiaris* e LW-22/15 (ANEXO 3) para *Gallus gallus domesticus*.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

---

Os resultados e discussões foram apresentados em forma de dois artigos. O primeiro artigo será submetido à Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária e o relato de caso, submetido à Revista Acta Tropica.

### 5.1. ARTIGO

#### **Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em animais domésticos de área antropizada da Mata Atlântica, município do Rio de Janeiro.**

**Marques, M.; Bonfim, T. C. B.; Campos, M.; Laurentino-Silva, V.; Ornellas, R. O.; Figueiredo, F. B.**

#### **Resumo**

*Cryptosporidium* é um protozoário de importância em saúde pública, que possui potencial de infectar os seres humanos e diferentes espécies de animais, através da transmissão por meio da água e alimentos infectados com oocistos. Este estudo foi conduzido para avaliar a ocorrência de *Cryptosporidium* em animais domésticos (cães e galinhas de capoeira) provenientes de área de Mata Atlântica no Rio de Janeiro, utilizando a análise fecal através da detecção de coproantígeno por ELISA e o método molecular PCR quantitativo. Neste estudo, foram analisadas 50 amostras fecais, sendo 46 amostras individuais de cães domésticos (*Canis lupus familiaris*) e quatro *pools* de fezes de galinhas de capoeira (*Gallus gallus domesticus*) de diferentes propriedades. Foram detectados coproantígenos em 6,52% (3/46) das amostras caninas analisadas, sendo que nas amostras de galinhas não houve detecção. Pela técnica qPCR, cinco amostras de cão 10,86%(5/46) e três *pools* de galinhas de capoeira 75%(3/4) foram positivas, correspondendo a 16% das amostras avaliadas. A técnica qPCR apresentou maior eficácia na detecção do *Cryptosporidium*, quando comparada a técnica ELISA. Esses resultados sugerem um potencial risco de contaminação ambiental e infecção para a população local.

**Palavras-chave:** Aves de capoeira, cães, *Cryptosporidium* spp., ELISA, Mata Atlântica, PCR quantitativo.

## Abstract

*Cryptosporidium* is a protozoan of importance in public health, which has the potential to infect humans and different animal species, known by transmission through food and water infected with oocysts. This study was conducted to evaluate the occurrence of *Cryptosporidium* in domestic animals (dogs and poultry chickens) from Atlantic Forest in Rio de Janeiro, using fecal analysis by coproantígeno detection by ELISA and molecular method quantitative PCR. In this study, 50 fecal samples were analyzed, and forty six individual samples of domestic dog (*Canis lupus familiaris*) and four pools of stool poultry chickens (*Gallus gallus domesticus*) of different properties. Coproantigens were detected in 6.52% (3/46) of canine samples analyzed, where in the samples of chickens was not detected. For the qPCR technique, five dog samples 10.86% (5/46) and three pools of farmyard chickens 75% (3/4) were positive, corresponding to 16% of the samples. The qPCR was more efficient technique for the detection of *Cryptosporidium* compared to ELISA. These results suggest a potential risk of environmental contamination and infection for the local population.

**Keywords:** Atlantic Forest, *Cryptosporidium* spp., dogs, ELISA, Poultry chicken, quantitative PCR.

## Introdução

*Cryptosporidium* spp. possui a capacidade de infectar diferentes espécies de hospedeiros, incluindo os seres humanos, causando a criptosporidiose, doença emergente relatada em países desenvolvidos e em desenvolvimento (XIAO; FENG, 2008). Os animais domésticos são comumente parasitados, podendo desempenhar um importante papel na transmissão zoonótica (RYAN, 2012).

A ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp. em cães e galinhas domésticas no Brasil ainda é pouco conhecida. Na criptosporidiose em cães, a sintomatologia é restrita ao sistema gastrointestinal, caracterizando-se por diarreia, anorexia e perda de peso (SCORZA; TANGTRONGSUP, 2010). Porém, em aves pode ocorrer o acometimento não somente do sistema gastrointestinal, como também do sistema respiratório, sendo os sintomas comuns a sinusite, letargia, anorexia, tosse, espirros, dispneia, conjuntivite, redução no ganho de peso corporal, podendo levar a óbito (SRÉTER; VARGA, 2000).

A transmissão em seres humanos e animais ocorre por via feco-oral, normalmente por meio da ingestão de qualquer material contaminado com fezes contendo o oocisto (forma infectante) em concentração suficiente para causar infecção (SMITH et al., 2006; CACCIO; POZIO, 2001). Pode ser transmitido de forma direta, por meio do contato pessoa-pessoa, animal- pessoa e animal-animal, ou de forma indireta por ingestão de água potável ou recreio (piscinas e lagos) e alimentos infectados (FAYER; MORGAN; UPTON, 2000; SMITH et al., 2007).

No painel mundial, o *Cryptosporidium* é um dos principais agentes etiológicos causadores de gastroenterite em crianças menores de cinco anos de idade e indivíduos imunodeficientes, principalmente portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (BARTLER et al., 2013; EDVISSON et al., 2009; YOUSSEF et al., 2008). Surto de criptosporidiose vêm ocorrendo em todo o mundo, principalmente por veiculação hídrica (fonte de água potável ou de recreio) e alimentar (produtos frescos, suco de fruta e leite), como também pelo contato com animais de fazenda durante visitas (BALDURSSON; KARANIS, 2011; SMITH; NICHOLS, 2010; HUNTER et al., 2006; ROSE; SLIFKO, 1999).

Das espécies descritas, o *Cryptosporidium parvum* e *C. hominis* são responsáveis pelo maior número de casos de criptosporidiose relacionados aos seres humanos, e outras espécies são descritas esporadicamente, como o *C. meleagridis*, o *C. felis*, o *C. canis* e o *C. cuniculus*, (XIAO et al., 2001; XIAO; FENG, 2008).

A infecção tende a ser mais frequente em países em desenvolvimento, principalmente em locais com falta ou precariedade de saneamento básico e infraestrutura urbana, muitas vezes relacionado ao baixo padrão de higiene (HUANG; WHITE, 2006; YOUSSEF et al., 2008).

O presente estudo possui o objetivo de investigar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em animais domésticos (cães e galinhas capoeira) encontrados no Campus Fiocruz da Mata Atlântica (CFMA), área antropizada da Mata Atlântica, município do Rio de Janeiro, utilizando método imunoenzimático-ELISA e PCR quantitativo.

## **Materias e métodos**

### **Área de estudo**

As amostras fecais foram coletadas dos animais encontrados CFMA. O CFMA é uma área composta por 5 milhões de metros quadrados, localizado na região de Jacarepaguá, zona oeste da cidade do Rio de Janeiro. Composta por grande extensão da Mata Atlântica, área de preservação ambiental, entre o Maciço da Pedra Branca e do Maciço da Tijuca. A região sofre influência da ação do homem, sendo detectado desmatamento e invasões em área de mata. As comunidades instaladas próxima a borda da mata, não possuem infraestrutura urbana, saneamento básico e tratamento de água, vivendo precariamente. É comum a presença de animais de companhia e de criação transitando livremente pelas comunidades, assim como a presença de animais silvestres peridomicílio (FIOCRUZ, 2004).

### **Grupo amostral e coleta de amostras**

Foram estudadas 50 amostras de fezes, coletadas entre 2014 e 2015, sendo 46 amostras fecais individuais de cães domésticos (*Canis lupus familiaris*) e 4 amostras de *pool* de fezes de galinhas de capoeira (*Gallus gallus domesticus*), coletadas por conveniência frente aos animais encontrados no momento das visitas aos domicílios.

As amostras fecais de cães domésticos foram coletadas por via retal, de animais adultos e aparentemente saudáveis. As amostras de galinha foram coletadas aleatoriamente das fezes depositadas sobre o chão da área de pernoite dos animais, forrado com plástico do entardecer a manhã do dia seguinte, em um *pool* de cinco fezes cada, contendo em média 3g. Todas as amostras foram coletadas em frascos estéreis, refrigeradas durante o transporte e congeladas a -20°C até o processamento.

As amostras foram descongeladas, homogeneizadas com água destilada e filtradas com auxílio de gaze para retirada de resíduos grosseiros. Após a filtração, as amostras foram centrifugadas para concentrar durante 10 minutos a 402,4 xg. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento separado em tubos de polipropileno estéreis para realização das técnicas ELISA e qPCR.

### **Ensaio Imunoenzimático (ELISA)**

A detecção de antígenos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais foi realizada através da utilização de um kit ELISA comercial “*Cryptosporidium stool antigen detection*” (© IVD Research, Inc., Carlsbad, CA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante.

### PCR quantitativo (qPCR)

Para o ensaio molecular, o DNA foi extraído utilizando a plataforma automatizada QIAcube (Qiagen, Hilden, Germany) com o kit comercial “*QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit*” (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante.

O ensaio qPCR utilizado neste estudo foi baseado na metodologia descrita por Hadfield et al. (2011) e Staggs et al. (2013). O gene alvo 18S SSU rRNA foi usado para detecção de *Cryptosporidium* spp., mediante a utilização dos primers CRU18S Forward GAG GTA GTG ACA AGA AAT AAC AAT ACA GG e Reverse CTG CTT TAA GCA CTC TAA TTT TCT CAA AG e a sonda de hidrólise TaqMan® MGB TAC GAG CTT TTT AAC TGC AAC AA. A solução de reação foi preparada contendo 12,5 µL do reagente Universal Mastermix (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), 1,5 µL dos iniciadores CRU18S a 900nM, 2,5 µL da sonda a 200nM e 3 µL de soro albumina bovina (BSA) (Sigma- Aldrich®) numa concentração de 400ng/µL. As reações da qPCR foram realizadas em um volume 4 µL de amostra e 21 µL da mistura de reação, totalizando um volume final de 25 µL.

Para amplificação, utilizou-se a plataforma StepOne™ (Applied Biosystems®) e o seguinte protocolo de amplificação: um ciclo de desnaturação a 95°C por 10 minutos e 55 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e de anelamento/extensão a 60°C por 1min. Todas as amostras foram testadas em triplicata. Em cada placa de amplificação foi utilizado controles positivos e negativos e o Threshold foi fixado em 0,02.

As amostras negativas na qPCR passaram por teste de inibição, onde foi utilizado o mesmo ensaio de detecção qPCR, contendo o par de iniciadores e sonda pré-definidos, num volume final de reação de 29 µL, contendo 4 µL de DNA da amostra negativa na qPCR, 4 µL de DNA de amostra positiva de *Cryptosporidium* spp. e 21 µL de mistura de reação semelhante ao usado no ensaio qPCR. As amostras de DNA que apresentaram amplificação foram consideradas positivas e livres de inibidores.

## Resultados

No presente estudo, com base na detecção de coproantígenos pela técnica de ELISA de 46 amostras caninas e 4 *pools* de fezes de galinha de capoeira, o *Cryptosporidium* foi detectado somente em 6,52% (3/46) das amostras caninas.

Utilizando a técnica qPCR, 10,86%(5/46) das amostras caninas e 75%(3/4) *pools* de galinhas domésticas foram positivas, equivalendo a 16% das amostras avaliadas. As curvas de amplificação das amostras apresentaram  $Cq \geq 47$ , variando entre 47,4 a 52,8.

Das três amostras de cão positivas no ELISA, duas amostras apresentaram divergência na qPCR, apresentando negatividade.

No teste de inibição, não foi possível detectar inibição nas amostras testadas.

## Discussão

O estudo forneceu introspecções sobre epidemiologia de *Cryptosporidium* spp. em cães domésticos (*Canis lupus familiaris*) e galinhas de capoeira (*Gallus gallus domesticus*) encontrados em área da Mata Atlântica em constante influência antrópica.

Pesquisas de coproantígenos por meio de ensaios comerciais imunoenzimático ELISA e técnicas em biologia molecular são amplamente utilizados para o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp., apresentando alta sensibilidade e especificidade em análise de amostras fecais (GIADINIS et al., 2012; SAEED; AHMAD, 2013).

Duas amostras caninas positivas no ELISA mostraram-se divergentes em relação ao resultado da qPCR. A discordância do resultado pode ter ocorrido devido a permanência de antígenos e a inexistência de oocistos íntegros nas fezes, podendo caracterizar resultados falsos-positivos (JOHNSTON, S. P. et al., 2003). Newman (1993) e colaboradores encontraram resultados semelhantes em uma criança que se recuperava da doença, possivelmente em decorrência da debelação da infecção pelo hospedeiro. O teste de inibição descartou a presença de inibidores nas amostras fecais que pudessem interferir no resultado da qPCR. Entretanto, não foi realizado teste para avaliação da integridade do DNA, o que poderia estar influenciando no resultado, acarretando falso-negativos. O presente estudo não analisou a concentração de oocistos nas amostras ou a integridade dos mesmos.

A análise também apresentou quatro amostras negativas no ensaio imunoenzimático, que foram positivas na qPCR. A baixa detecção de coproantígeno de *Cryptosporidium* spp. no

ELISA, provavelmente devido ao número reduzido de oocistos presentes nas amostras, uma vez que a maioria dos animais são assintomáticos ou podem estar em remissão da infecção, podendo apresentar liberação reduzida de oocistos nas fezes, o que limitaria a detecção de coproantígenos (MCLAUHLIN et al., 2003). Coletas consecutivas de no mínimo três dias poderiam diminuir o viés de falso-negativo dos métodos de diagnóstico, uma vez que a eliminação de oocistos pelo hospedeiro tende a ser intermitente (VAN GOOL et al., 2003). A variedade de espécies descritas possivelmente pode interferir na detecção de antígeno pelo ELISA, devido a variação antigênica entre essas, visto que as mesmas podem apresentar antígenos não detectáveis pelos anticorpos monoclonais utilizados nos kits comerciais desenvolvidos para detecção de criptosporidiose em humanos (CHALMERS; KATZER, 2013; DA SILVA et al., 2012).

A maior positividade do ensaio qPCR possivelmente ocorreu pela utilização do sistema TaqMan<sup>®</sup> MGB, que confere ao ensaio uma maior precisão na detecção da sequência alvo (KUTYAVIN et al., 2000; MARY et al., 2013). No entanto, os *primers* genéricos utilizados em nosso ensaio podem não detectar todas as espécies de *Cryptosporidium* spp., podendo não apresentar qualquer homologia em sua sequência genérica com algumas espécies ou hibridização da sonda em todas as espécies descritas.

No Brasil, Seva et al. (2010) em um estudo em área antropizada de Mata Atlântica no estado de São Paulo, encontrou frequência de positividade semelhante de 10,7% (3/28) em cães, utilizando nested-PCR. Em nosso estudo, foi elevada a positividade se comparada a detectada por Oates et al. (2012) de 1,1% (2/182) no estudo em área de transição na Califórnia (USA), por meio qPCR.

Pouco se conhece sobre a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em galinhas de capoeira (*Gallus gallus domesticus*) de criação familiar no Brasil, os trabalhos restringem-se a centros comerciais, sendo necessário maior estudo dos animais em ambiente de criação.

Este estudo teve algumas limitações. As amostras das galinhas de capoeira foram coletadas em *pools* (5 amostras = 1 *pool*), devido à dificuldade de isolar individualmente os animais, que normalmente são criados livres, de modo que poderia superestimar a infecção nos animais individualmente.

A escassez de infraestrutura básica nas comunidades que compõem o CFMA, somada a presença de animais domésticos e silvestres positivos para *Cryptosporidium* spp., pode ser um risco de contaminação ambiental e infecção para os moradores locais, visto que a população local vive em situação sanitária precária e sem tratamento de água.

A utilização de técnicas de biologia molecular torna o diagnóstico mais sensível e promove melhor entendimento da epidemiologia, sendo essencial para a compreensão da inter-relação entre animal-homem-ambiente e padrões de transmissão do agente (PAINTER et al., 2015). Para um melhor entendimento epidemiológico é necessário identificar as espécies circulantes na área e os animais, principalmente os silvestres, que possam agir como possíveis hospedeiros e fonte de contaminação.

### Referências

BARTELT, L. A. et al. "Barriers" to child development and human potential: the case for including the "neglected enteric protozoa" (NEP) and other enteropathy-associated pathogens in the NTDs. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 4, p. e2125, 2013. ISSN 1935-2727.

BALDURSSON, S.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks – An update 2004–2010. **Water Research**, v. 45, n. 20, p. 6603-6614, 2011. ISSN 0043-1354. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135411006117> >. Acesso em: 02 Feb 2015.

CACCIO, S.; POZIO, E. Molecular identification of food-borne and water-borne protozoa. Southeast Asian **J Trop Med Public Health**, v. 32 Suppl 2, p. 156-8, 2001. ISSN 0125-1562.

DA SILVA, B. A. et al. Comparative study of parasitological techniques and elisa for analysis environmental samples, rj, brasil. **Revista Iberolatinoamericana de Parasitologia**, v.71, n.1, p. 90-96, 2012.

EDVINSSON, B. et al. Toxoplasmosis in immunocompromized patients. **Scand J Infect Dis**, v. 41, n. 5, p. 368-71, 2009. ISSN 0036-5548.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **Int J Parasitol**, v. 30, n. 12-13, p. 1305-22, Nov 2000. ISSN 0020-7519.

FIOCRUZ. Colônia Juliano Moreira: infra-estrutura urbana - diagnóstico. FIOCRUZ. 2004

GOMES, A. H. S. et al. Detecção de *Cryptosporidium* em amostras fecais por técnica de Nested-PCR e comparação com métodos imunológico e parasitológico. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 63, n 2, p. 255-61, 2004.

HADFIELD, S. J. et al. Detection and Differentiation of *Cryptosporidium* spp. in Human Clinical Samples by Use of Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 918-924, 2011. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/49/3/918.abstract>>.

HIGGINS, J. A. et al. Real-time PCR for the detection of *Cryptosporidium parvum*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 47, n. 3, p. 323-337, 2001. ISSN 0167-7012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701201003396>>.

HUANG, D. B.; WHITE, A. C. An updated review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Gastroenterol Clin North Am**, v. 35, n. 2, p. 291-314, viii, Jun 2006. ISSN 0889-8553.

HUNTER, P. R. et al. Sporadic cryptosporidiosis case-control study with genotyping. **Emerg Infect Dis**, v. 10, n. 7, p. 1241-9, Jul 2004. ISSN 1080-6040.

JOHNSTON, S. P. et al. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 2, p. 623-6, Feb 2003. ISSN 0095-1137.

KUTYAVIN, I. V. et al. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. **Nucleic Acids Res**, v. 28, n. 2, p. 655-61, Jan 15 2000. ISSN 0305-1048.

MARY, C. et al. Multicentric evaluation of a new real-time PCR assay for quantification of *Cryptosporidium* spp. and identification of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 8, p. 2556-63, Aug 2013. ISSN 1098-660X.

MCLAUCHLIN, J. et al. Polymerase chain reaction-based diagnosis of infection with *Cryptosporidium* in children with primary immunodeficiencies. **Pediatr Infect Dis J**, v. 22, n. 4, p. 329-35, Apr 2003. ISSN 0891-3668.

NEWMAN, R. D. et al. Evaluation of an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Cryptosporidium* oocysts. **J Clin Microbiol**, v. 31, n. 8, p. 2080-4, Aug 1993a. ISSN 0095-1137.

OATES, S. C. et al. Prevalence, environmental loading, and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from domestic and wild animals along the Central California Coast. **Appl Environ Microbiol**, v. 78, n. 24, p. 8762-72, Dec 2012. ISSN 0099-2240.

PAINTER, J.E. et al. Cryptosporidiosis Surveillance — United States, 2011–2012 **Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)**, v. 64, n. 3, p. 1-14, May 2015.

ROSE, J. B.; SLIFKO, T. R. *Giardia*, *Cryptosporidium*, and *Cyclospora* and their impact on foods: a review. **J Food Prot**, v. 62, n. 9, p. 1059-70, Sep 1999. ISSN 0362-028X.

RYAN, U. *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. **Exp Parasitol**, v. 124, n. 1, p. 113-20, Jan 2010. ISSN 0014-4894.

SAEED, K. B. A.; AHMAD, N. S. **Real-Time Polymerase Chain Reaction: Applications in Diagnostic Microbiology**. 2013. ISBN 2076-6327. Disponível em: < <http://www.ijms.info/ojs/index.php/IJMS/article/view/9> >.

SEVA ADA, P. et al. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from domestic animals in a rural area surrounding Atlantic dry forest fragments in Teodoro Sampaio municipality, State of Sao Paulo, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 19, n. 4, p. 249-53, Oct-Dec 2010. ISSN 0103-846x.

SCORZA, V.; TANGTRONGSUP, S. Update on the diagnosis and management of *Cryptosporidium* spp infections in dogs and cats. **Top Companion Anim Med**, v. 25, n. 3, p. 163-9, Aug 2010. ISSN 1938-9736.

SMITH, H. V. et al. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 4, p. 160-167, 2006. ISSN 1471-4922. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492206000547>>.

SMITH, H. V. et al. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. **Vet Parasitol**, v. 149, n. 1-2, p. 29-40, Oct 21 2007. ISSN 0304-4017.

SMITH, H. V.; NICHOLS, R. A. B. *Cryptosporidium*: Detection in water and food. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 61-79, 2010. ISSN 0014-4894. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489409001520>>.

STAGGS, S. E. et al. The Applicability of TaqMan-Based Quantitative Real-Time PCR Assays for Detecting and Enumerating spp. Oocysts in the Environment. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66562, 2013. ISSN 1932-6203.

SRETER, T.; VARGA, I. Cryptosporidiosis in birds--a review. **Vet Parasitol**, v. 87, n. 4, p. 261-79, Feb 1 2000. ISSN 0304-4017.

VAN GOOL, T. et al. Triple Faeces Test: an effective tool for detection of intestinal parasites in routine clinical practice. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 22, n. 5, p. 284-90, May 2003. ISSN 0934-9723.

YOUSSEF, F. G. et al. A review of cryptosporidiosis in Egypt. **J Egypt Soc Parasitol**, v. 38, n. 1, p. 9-28, Apr 2008a. ISSN 1110-0583.

XIAO, L. et al. Identification of 5 Types of *Cryptosporidium* Parasites in Children in Lima, Peru. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 3, p. 492-497, February 1, 2001 2001. Disponível em: <<http://jid.oxfordjournals.org/content/183/3/492.abstract>>.

XIAO, L.; FENG, Y. Zoonotic cryptosporidiosis. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 52, n. 3, p. 309-23, Apr 2008a. ISSN 0928-8244.

## 5.2. RELATO DE CASO

### Primeiro relato de infecção em gambá-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*) por *Cryptosporidium* spp. no Brasil.

Marques, M.; Bonfim, T. C. B.; Campos, M; Cordeiro, J. L.; Gentile, R.;  
Figueiredo, F. B.

#### Resumo

A Mata Atlântica sofre constante degradação de sua área de floresta por influência de ações antrópicas, o que leva ao desequilíbrio na fauna e flora local, além de mudanças na ecologia de doenças zoonóticas. No presente estudo, buscamos investigar a ocorrência da infecção de *Cryptosporidium* spp. na espécie *Didelphis aurita* encontrada em área da Mata Atlântica do Rio de Janeiro, Brasil. Utilizando a técnica molecular qPCR foi possível detectar frequência de positividade de 80% (4/5) entre os animais. No entanto, estudos aprofundados são necessários, principalmente em relação ao hospedeiro e espécies do parasita circulante, para uma melhor compreensão da epidemiologia do parasita na área.

**Palavras-chave:** *Cryptosporidium* spp., *Didelphis aurita*, Mata Atlântica, qPCR.

#### Abstract

The Atlantic Forest suffers constant degradation of their forest area under the influence of human activities, which leads to an imbalance in the local fauna and flora, as well as changes in the ecology of zoonotic diseases. In the present study, we sought to investigate the occurrence of infection of *Cryptosporidium* spp. in *Didelphis aurita* found in an area of the Atlantic Forest of Rio de Janeiro, Brazil. qPCR using the molecular technique was detectable positivity rate of 80% (4/5) of the animals. However, extensive studies are needed, especially in relation to the host and parasite species circulating for a better understanding of the epidemiology of the parasite in the area.

**Keywords:** *Cryptosporidium*, *Didelphis aurita*, Atlantic Forest, qPCR.

## Introdução

O coccídeo do gênero *Cryptosporidium* possui distribuição cosmopolita e infecta diferentes espécies de vertebrados, normalmente por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos (SMITH et al., 2007; TZIPORI; WIDMER, 2008). Várias espécies de animais silvestres vêm sendo identificados como possíveis reservatórios do *Cryptosporidium* spp. (RHYAN, 2010; THOMPSON; LYMBERG; SMITH, A, 2010).

O gênero *Didelphis* é descrito como sendo infectado por diferentes agentes infecciosos que causam doenças de importância em saúde pública em toda América, tais como: Leishmaniose, Leptospirose, Salmonelose, Rickettsioses, Doença de Chagas, entre outras. Sendo assim possível fonte de infecção para humanos, como descrito para as espécies *Didelphis virginiana*, *D. albiventris* e *D. aurita* (BHARTI et al., 2003; CARREIRA et al., 2012; CASAGRANDE et al., 2011).

O contínuo processo de urbanização e expansão das atividades humanas sobre as áreas florestais desestruturam os habitats naturais, alterando os padrões de diversidade e abundância das espécies. Em ecossistemas perturbados e simplificados, poucas espécies de animais (generalistas/oportunistas) são favorecidas, possibilitando frequentemente, o incremento de suas densidades e a dispersão para áreas rurais e de peri-domicílio humano. Tais alterações na demografia das populações naturais, principalmente nas áreas de interface entre ambientes peri-urbanos / rurais e ambientes silvestres influenciam diretamente na dinâmica natural de transmissão de ciclos silvestres de parasitos (KRUSE; KIRKEMO; HANDELAND, 2004), podendo trazer para o ambiente urbano parasitoses e viroses de ciclos silvestres desconhecidos do homem ou introduzir um ciclo silvestre de doenças originalmente humanas.

A espécie *Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826, (gambá-de-orelha-preta), endêmica da Mata Atlântica, um excelente exemplo deste processo de transformação da paisagem. É uma espécie generalista, que se adapta bem as áreas antropizadas (GENTILE; FERNANDEZ, 1999), e apresenta uma dieta bastante ampla e oportunista (LESSA; GEISE, 2010; SANTORI; ASTÚA DE MORAES; CERQUEIRA, 1995). É capaz de apresentar deslocamentos relativamente grandes (LORRETO; VIEIRA, 2005; SUNQUIST; AUSTAD; SUNQUIST, 1987), podendo desempenhar um papel importante na disseminação de patógenos (PINHO et al., 2000; VAZ; D'ANDREA; JANSEN, 2007)

No Brasil, são poucos os estudos envolvendo a identificação de *Cryptosporidium* em áreas antropizadas próximas a remanescentes florestais, caracterizadas por elevada interação entre seres humanos, animais domésticos e silvestres.

Visando aumentar o conhecimento epidemiológico do *Cryptosporidium* spp. em áreas antropizadas, o presente estudo teve como objetivo investigar a ocorrência da infecção de *Cryptosporidium* spp. na espécie *Didelphis aurita* em uma região de contato entre o ambiente urbano e o natural, próxima ao maior fragmento florestal de Mata Atlântica do município do Rio de Janeiro, o Parque Estadual da Pedra Branca.

## **Materiais e Métodos**

Para a captura dos animais do gênero *Didelphis* foi realizada uma expedição com duração de quatro noites consecutivas em ambiente antropizado da Mata Atlântica. O estudo foi realizado na região de Jacarepaguá, que constitui uma das principais zonas de expansão urbana no município do Rio de Janeiro (RJ). Representando assim um contexto de ocupação humana em borda de remanescentes florestais, de Mata Atlântica, com diferentes graus de antropização. Foram estabelecidos dois transectos lineares com 20 estações de captura, nas quais foram colocadas uma armadilha tipo Tomahawk do modelo 201 (40,64cm x 12,70cm x 12,70cm) (Tomahawk®). Ambos os transectos foram dispostos em ambiente de peri-domicílio, ou seja, em fragmentos florestais antropizados nos arredores das habitações humanas.

Os animais capturados passaram por triagem, sendo selecionados somente animais adultos, exceto fêmeas com filhotes. As amostras fecais foram coletadas diretamente da ampola retal durante a necropsia e colocadas em tubos de polipropileno estéreis 1,5ml, armazenadas em caixa térmica com gelo e posteriormente congeladas a temperatura -20°C até a análise.

Todos os procedimentos foram baseados em protocolos autorizados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) (licença LW-81/12) e Instituto Estadual do Ambiente (INEA), licença de coleta no Parque Estadual da Pedra Branca número 020/2011.

Visando a detecção de *Cryptosporidium* ssp. nas fezes desses animais foi realizado o PCR quantitativo (qPCR). O DNA foi extraído utilizado a plataforma automatizada QIAcube (Qiagen, Hilden, Germany) com o kit comercial “*QIAamp® Fast DNA Stool Mini*” (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante.

A qPCR teve como alvo o gene SSU rRNA, sendo realizada com volume de 1,5 µL primers CRU18S Forward GAG GTA GTG ACA AGA AAT AAC AAT ACA GG e Reverse CTG CTT TAA GCA CTC TAA TTT TCT CAA AG na concentração 900nM e 2,5 µL sonda de hidrólise TaqMan® MGB TAC GAG CTT TTT AAC TGC AAC AA na concentração 200nM, e 12,5 µL de 1x reagente Universal Mastermix (Perkin-Elmer Applied Biosystems,

Carlsbad, CA, USA), 3 µL de soro albumina bovina (BSA) (Sigma- Aldrich®) 400ng/µL e 4µl amostra de DNA. O protocolo de amplificação seguiu 1 ciclo de desnaturação a 95°C por 10 minutos e 55 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e de anelamento/extensão a 60°C por 1min, utilizando a plataforma StepOne™ (Applied Biosystems®) (HADFIELD et al.2011; STAGGS et al. 2013). Foram utilizados controles negativos e positivos, todas as amostras foram testadas em triplicata e Threshold foi fixado em 0,02.

As amostras negativas na qPCR passaram por teste de inibição, no qual foi utilizado o mesmo ensaio de detecção qPCR, contendo o par de iniciadores e sonda pré-definidos, com algumas modificações. A reação continha volume final de 29 µL, com 4 µL de DNA da amostra negativa na qPCR, 4 µL de DNA de amostra positiva de *Cryptosporidium* spp. e 21 µL do mix de reação semelhante ao usado no ensaio qPCR. As amostras de DNA que apresentaram amplificação foram consideradas positivas e livres de inibidores.

### **Resultado e Discussão**

No Brasil a floresta de Mata Atlântica vem sendo degradada de maneira muito intensa, através de um processo de exploração extrativista e ocupação desordenada, sendo hoje o habitat mais afetado do nosso país, restando apenas poucos fragmentos de floresta remanescentes (SOS MATA ATLÂNTICA, 2014). Uma dessas áreas compõe o Parque Estadual da Pedra Branca, situado no município do Rio de Janeiro, local de trabalho do nosso estudo.

Neste contexto, a presença de animais de companhia (cães e gatos) e de criação (equinos, bovinos, suínos, aves) soltos na proximidade do parque, proporciona um cenário de intensa interação entre humanos, seus animais e a fauna silvestre, compondo um ambiente favorável à transmissão de patógenos causadores de zoonoses (FIOCRUZ, 2004).

Em nosso estudo, a partir de uma expedição em uma área antropizada do Parque, foram capturados cinco indivíduos adultos da espécie *Didelphis aurita*. Através da análise molecular qPCR, foi detectado DNA de *Cryptosporidium* spp. na amostra de fezes de quatro animais. A única amostra negativa não apresentou inibição no teste. A realização de teste de integridade do DNA torna-se necessário para descartar possíveis resultados falso-negativos, entretanto, não foi possível avaliar a integridade do DNA neste estudo.

Este é o primeiro relato de parasitismo por *Cryptosporidium* spp. na espécie *Didelphis aurita* no Brasil. Lolla e colaboradores (2009), não conseguiram detectar o parasita nessa espécie de hospedeiro por análise coproparasitológica em área em desmatamento no estado de São Paulo, sudeste do Brasil. Outras espécies do gênero *Didelphis*, como *D. albiventris*

(MÜLLER; PESENTI; MASCARENHAS, 2009; ZANETTE et al., 2008) já foi relatada parasitada por *Cryptosporidium* spp. na região sul do Brasil, por análise coproparasitológica, e *D. virginiana* (XIAO et al., 2002) na Califórnia, USA, por meio de nested-PCR. Entretanto, em nosso estudo, mesmo avaliando um pequeno número de indivíduos, foi possível confirmar a positividade em 80% (4/5) das amostras, o que sugere um grande potencial na transmissão zoonótica e de contaminação ambiental por essa espécie.

É importante ressaltar que em nossa pesquisa foi utilizada a técnica qPCR com sistema TaqMan® MGB, descrita por muitos autores como uma ferramenta altamente sensível e específica no diagnóstico de parasitos (CHALMERS; KATZER, 2013).

Holsback e colaboradores (2013) obtiveram resultados negativos na detecção do *Cryptosporidium* spp. em gambá da espécie *D. marsupialis* por meio de análise coproparasitológica, o que poderia ser justificado pela ausência desse parasito nessa região ou pela baixa sensibilidade da ferramenta utilizada.

No presente trabalho, não foi possível identificar as espécies de *Cryptosporidium*, o que pode ser explicado pela baixa carga parasitária nesses indivíduos que normalmente são adultos ou a não obtenção da quantidade necessária de *amplicons* para a realização do sequenciamento. Outro ponto importante é que sem essa caracterização não se pode excluir a possibilidade desses gambás estarem parasitados por espécies de *Cryptosporidium* potencialmente zoonóticas.

A partir desses resultados torna-se importante a intensificação dos estudos relacionados a essa espécie de gambá parasitada por *Cryptosporidium*, avaliando a frequência dessa doença numa maior população, em diferentes regiões e se possível, com a caracterização das espécies e genótipos do parasita, podendo identificar espécies ainda não classificadas e a compreensão do potencial zoonótico.

## Referências

BHARTI, AR et al. Leptospirose: Uma zoonose de importância mundial. **Lancet Infect Dis**, v. 3, n. 12, p. 757-71, Dez 2003. ISSN 1473-3099.

CARREIRA, J. C. et al. Natural infection of *Didelphis aurita* (Mammalia: Marsupialia) with *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasit Vectors**, v. 5, p. 111, 2012. ISSN 1756-3305.

CASAGRANDE, R.A. et al. Isolamento de Salmonella enterica em gambás (*Didelphis aurita* e *Didelphis albiventris*) do Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v.41, n.3, p. 492-496.

CHALMERS, R. M.; KATZER, F. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. **Trends Parasitol**, v. 29, n. 5, p. 237-51, May 2013. ISSN 1471-4922.

FIOCRUCZ. **Diagnóstico Urbanístico do Setor 1 da Colônia Juliano Moreira**. FIOCRUZ. 2004.

HADFIELD, S. J. et al. Detection and Differentiation of *Cryptosporidium* spp. in Human Clinical Samples by Use of Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 918-924, 2011. Disponível em: < <http://jcm.asm.org/content/49/3/918.abstract> >.

HOLSBACK, L. et al. Natural infection by endoparasites among free-living wild animals. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 22, n. 2, p. 302-6, Apr-Jun 2013. ISSN 0103-846x.

KRUSE, H.; KIRKEMO, A. M.; HANDELAND, K. Wildlife as source of zoonotic infections. **Emerg Infect Dis**, v. 10, n. 12, p. 2067-72, Dec 2004. ISSN 1080-6040.

LESSA, L. G.; GEISE, L. Hábitos alimentares de marsupiais didelfídeos brasileiros: análise do estado de conhecimento atual. **Oecologia Australis**, v. 14, p. 918-927, 2010.

LORETTO, D.; VIEIRA, M. V. The Effects of Reproductive and Climatic Seasons on Movements in the Black-Eared Opossum (*Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826). **Journal of Mammalogy**, v. 86, n. 2, p. 287-293, 2005-04-15 00:00:00 2005. Disponível em: <<http://jmammal.oxfordjournals.org/jmammal/86/2/287.full.pdf>>.

MÜLLER, G.; PESENTI, T. C.; MASCARENHAS, C. S. Parasitos de animais silvestres com potencial zoonótico no Rio Grande do Sul. **Veterinária em Foco**, [S.l.], v. 6, n. 2, p. 185-190, jan-jun. 2009. ISSN 1679-5237. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/vetfoco/article/view/28343>>.

PINHO, A. P. et al. Trypanosoma cruzi in the sylvatic environment: distinct transmission cycles involving two sympatric marsupials. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 5, p. 509-514, 2000.

RYAN, U. *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. **Exp Parasitol**, v. 124, n. 1, p. 113-20, Jan 2010. ISSN 0014-4894.

SANTORI, R. T.; ASTÚA DE MORAES, D.; CERQUEIRA, R. Diet composition of *Metachirus nudicaudatus* and *Didelphis aurita* (Marsupialia, Didelphoidea) in southeastern Brazil. **Mammalia**, v. 59, n. 4, p. 511-516, 1995.

SMITH, H. V. et al. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. **Vet Parasitol**, v. 149, n. 1-2, p. 29-40, Oct 21 2007. ISSN 0304-4017.

SOS MATA ATLÂNTICA. Fundação divulga novos dados sobre a situação da Mata Atlântica. Maio 2015. Disponível em: <https://www.sosma.org.br/103045/fundacao-divulga-novos-dados-sobre-situacao-da-mata-atlantica/>.

STAGGS, S. E. et al. The Applicability of TaqMan-Based Quantitative Real-Time PCR Assays for Detecting and Enumerating spp. Oocysts in the Environment. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66562, 2013. ISSN 1932-6203

SUNQUIST, M. E.; AUSTAD, S. N.; SUNQUIST, F. Movement patterns and home range in the common opossum (*Didelphis marsupialis*). **Journal of Mammalogy**, v. 68, n. 1, p. 173-176, 1987.

THOMPSON, R. C.; LYMBERY, A. J.; SMITH, A. Parasites, emerging disease and wildlife conservation. **Int J Parasitol**, v. 40, n. 10, p. 1163-70, Aug 15 2010. ISSN 0020-7519.

TZIPORI, S.; WIDMER, G. A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 4, p. 184-189, 2008. ISSN 1471-4922. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S147149220800055X> >.

VAZ, V. C.; D'ANDREA, P. S.; JANSEN, A. M. Effects of habitat fragmentation on wild mammal infection by *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 134, n. 12, p. 1785-1793, 2007.

XIAO, L. et al. Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. **Int J Parasitol**, v. 32, n. 14, p. 1773-85, Dec 19 2002. ISSN 0020-7519.

ZANETTE, R. A. et al. Occurrence of gastrointestinal protozoa in *Didelphis albiventris* (opossum) in the central region of Rio Grande do Sul state. **Parasitol Int**, v. 57, n. 2, p. 217-8, Jun 2008. ISSN 1383-5769.

## 6. CONCLUSÕES

---

- ✓ Constatou-se a ocorrência do *Cryptosporidium* spp. na área de estudo (CFMA), apresentando alta ocorrência de infecção em relação as aves e gambás, e relativa ocorrência em relação aos cães.
  
- ✓ A técnica ELISA foi capaz de detectar a presença de coproantígenos nas fezes de cães e galinhas de capoeira.
  
- ✓ A amplificação de gene-alvo do *Cryptosporidium* por PCR quantitativo em amostras fecais foi capaz de identificar o DNA do agente, em fezes de gambá, cão e galinha de capoeira.
  
- ✓ O PCR quantitativo foi eficaz de detectar maior número de amostras positivas de *Cryptosporidium*, quando comparada ao ELISA, em fezes de cães e galinhas de capoeira.

## 7. REFERÊNCIAS

---

ABE, N.; KIMATA, I.; ISEKI, M. Identification of genotypes of *Cryptosporidium parvum* isolates from a patient and a dog in Japan. **J Vet Med Sci**, v. 64, n. 2, p. 165-8, Feb 2002. ISSN 0916-7250.

ABE, N. et al. *Cryptosporidium* infection in dogs in Osaka, Japan. **Veterinary Parasitology**, v. 108, n. 3, p. 185-193, 2002. ISSN 0304-4017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401702002042>>.

ALBUQUERQUE, Y. M. M. D. et al. Criptosporidiose pulmonar em pacientes com AIDS, uma doença subdiagnosticada. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 38, p. 530-532, 2012. ISSN 1806-3713.

ALONSO, J. L.; AMOROS, I.; CANIGRAL, I. Development and evaluation of a real-time PCR assay for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in sewage samples. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 89, n. 4, p. 1203-11, Feb 2011. ISSN 0175-7598.

APPELBEE, A. J.; THOMPSON, R. C. A.; OLSON, M. E. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife – current status and future needs. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 8, p. 370-376, 2005. ISSN 1471-4922. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492205001613>>.

BAKHEIT, M. A. et al. Sensitive and specific detection of *Cryptosporidium* species in PCR-negative samples by loop-mediated isothermal DNA amplification and confirmation of generated LAMP products by sequencing. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 1–2, p. 11-22, 2008. ISSN 0304-4017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401708004706>>.

BALDURSSON, S.; KARANIS, P. **Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks – An update 2004–2010**. *Water Research*, v. 45, n. 20, p. 6603-6614, 2011. ISSN 0043-1354. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135411006117>>. Acesso em: 02 Feb 2015.

BAROUDI, D. et al. Common occurrence of zoonotic pathogen *Cryptosporidium meleagridis* in broiler chickens and turkeys in Algeria. **Vet Parasitol**, v. 196, n. 3-4, p. 334-40, Sep 23, 2013. ISSN 0304-4017.

BARTELT, L. A. et al. "Barriers" to child development and human potential: the case for including the "neglected enteric protozoa" (NEP) and other enteropathy-associated pathogens in the NTDs. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 4, p. e2125, 2013. ISSN 1935-2727.

BARTA, J. R.; THOMPSON, R. C. A. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 10, p. 463-468, 2006. ISSN 1471-4922. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492206002029> >. Acesso em: 10 Dec 2014.

BECKER, D. J.; OLOYA, J.; EZEAMAMA, A. E. Household Socioeconomic and Demographic Correlates of *Cryptosporidium* Seropositivity in the United States. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 9, p. e0004080, 2015. ISSN 1935-2727.

BOUZID, M. et al. *Cryptosporidium* Pathogenicity and Virulence. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 115-134, January 1, 2013. Disponível em: <  
<http://cmr.asm.org/content/26/1/115.abstract> >. Acesso em: 13 Abr 2014

BUSHEN, O. Y. et al. Heavy cryptosporidial infections in children in northeast Brazil: comparison of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 101, n. 4, p. 378-84, Apr 2007. ISSN 0035-9203.

CACCIO, S.; POZIO, E. Molecular identification of food-borne and water-borne protozoa. Southeast Asian. **J Trop Med Public Health**, v. 32 Suppl 2, p. 156-8, 2001. ISSN 0125-1562.

CARRENO, R. A.; MARTIN, D. S.; BARTA, J. R. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. **Parasitol Res**, v. 85, n. 11, p. 899-904, Nov 1999. ISSN 0932-0113.

CACCIÒ, S. M. et al. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 9, p. 430-437, 2005. ISSN 1471-4922. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492205001881> >.

CHACÍN-BONILLA, L.; CHENG-NG, R. Criptosporidiosis en pacientes con el virus de la inmunodeficiencia humana. **Interciencia**, v. 33, p. 708-716, 2008. ISSN 0378-1844. Disponível em: < [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442008001000004&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442008001000004&nrm=iso) >.

CHALMERS, R. M.; DAVIES, A. P. Minireview: clinical cryptosporidiosis. **Exp Parasitol**, v. 124, n. 1, p. 138-46, Jan 2010. ISSN 0014-4894.

CHALMERS, R. M. et al. Comparison of diagnostic sensitivity and specificity of seven *Cryptosporidium* assays used in the UK. **J Med Microbiol**, v. 60, n. Pt 11, p. 1598-604, Nov 2011. ISSN 0022-2615.

CHALMERS, R. M.; KATZER, F. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. **Trends Parasitol**, v. 29, n. 5, p. 237-51, May 2013. ISSN 1471-4922.

CHEN, X.-M. et al. Cryptosporidiosis. New England. **Journal of Medicine**, v. 346, n. 22, p. 1723-1731, 2002. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra013170> >.

COPE, J. R. et al. Preventing community-wide transmission of *Cryptosporidium*: a proactive public health response to a swimming pool-associated outbreak--Auglaize County, Ohio, USA. **Epidemiol Infect**, v. 143, n. 16, p. 3459-67, Dec 2015. ISSN 0950-2688.

COURA, J. R. Parasitoses nos portadores de AIDS. **J. bras. Med.**, v.53, n. 4, p.42-54, 1987.

CURRENT, W. L. et al. Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. Studies of an outbreak and experimental transmission. **N Engl J Med**, v. 308, n. 21, p. 1252-7, May 26 1983. ISSN 0028-4793.

D'ANTONIO, R. G. et al. A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. **Ann Intern Med**, v. 103, n. 6 ( Pt 1), p. 886-8, Dec 1985. ISSN 0003-4819.

DIAS, R. M. D. S. et al. Cryptosporidiosis among patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in the county of São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 310-312, Aug. 1988.

DUPONT, H. L. et al. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. **N Engl J Med**, v. 332, n. 13, p. 855-9, Mar 30 1995. ISSN 0028-4793.

EDVINSSON, B. et al. Toxoplasmosis in immunocompromized patients. **Scand J Infect Dis**, v. 41, n. 5, p. 368-71, 2009. ISSN 0036-5548.

FAYER, R.; XIAO, L. ***Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis, Second Edition.** 2008. ISBN 9781420052275. Available at: < [http://books.google.com.br/books?id=suJZXO2\\_gK0C](http://books.google.com.br/books?id=suJZXO2_gK0C) >.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol*, v. 30, n. 12-13, p. 1305-22, Nov 2000. ISSN 0020-7519.

FAYER, R. et al. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. **J Parasitol**, v. 87, n. 6, p. 1415-22, Dec 2001. ISSN 0022-3395.

FAYER, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Exp Parasitol**, v. 124, n. 1, p. 90-7, Jan 2010. ISSN 0014-4894.

FOX, LM; SARAVOLATZ, LD. **Nitazoxanide**: a new thiazolide antiparasitic agent. *Clin Infect Dis*. 2005 40(8):1173-80.

FENG, Y. *Cryptosporidium* in wild placental mammals. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 128-137, 2010. ISSN 0014-4894. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489408002919> >.

FIOCRUZ. **Colônia Juliano Moreira: infra-estrutura urbana - diagnóstico.** FIOCRUZ, 2004a.

GARCIA, L. S.; SHIMIZU, R. Y. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. **J Clin Microbiol**, v. 35, n. 6, p. 1526-9, Jun 1997a. ISSN 0095-1137.

GIADINIS, N. D. et al. Comparison of two techniques for diagnosis of cryptosporidiosis in diarrhoeic goat kids and lambs in Cyprus. **Trop Anim Health Prod**, v. 44, n. 7, p. 1561-5, Oct 2012. ISSN 0049-4747.

GIANGASPERO, A.; BERRILLI, F.; BRANDONISIO, O. *Giardia* and *Cryptosporidium* and public health: the epidemiological scenario from the Italian perspective. **Parasitol Res**, v. 101, n. 5, p. 1169-82, Oct 2007. ISSN 0932-0113.

GOUVEIA, C. "**condições Particulares de transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana em Localidades do Campus Fiocruz da Mata Atlântica (Jacarepaguá, Rio de Janeiro/RJ)**". 2008. 119p. (Dissertação de Mestrado). Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro.

GUZMAN-HERRADOR, B. et al. Waterborne outbreaks in the Nordic countries, 1998 to 2012. **Euro Surveill**, v. 20, n. 24, 2015. ISSN 1025-496x.

GRACZYK, T. K.; FRIED, B. Human waterborne trematode and protozoan infections. **Adv Parasitol**, v. 64, p. 111-60, 2007. ISSN 0065-308X.

HADFIELD, S. J. et al. Detection and Differentiation of *Cryptosporidium* spp. in Human Clinical Samples by Use of Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 918-924, 2011. Disponível em: < <http://jcm.asm.org/content/49/3/918.abstract> >.

HAMIDINEJAT, H. et al. Molecular determination and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in fecal and respiratory samples of industrial poultry in Iran. **Asian Pac J Trop Med**, v. 7, n. 7, p. 517-20, Jul 2014. ISSN 1995-7645.

HAYES, E. B. et al. Large community outbreak of cryptosporidiosis due to contamination of a filtered public water supply. **N Engl J Med**, v. 320, n. 21, p. 1372-6, May 25 1989. ISSN 0028-4793.

HELLARD, M. et al. Risk factors leading to *Cryptosporidium* infection in men who have sex with men. **Sex Transm Infect**, v. 79, n. 5, p. 412-4, Oct 2003. ISSN 1368-4973.

HIJJAWI, N.; BOXELL, A. E. T.; THOMPSON, R. C. A. Recent Advances in the Developmental Biology and Life Cycle of *Cryptosporidium*. In: AL., G. O.-P. E. (Ed.). ***Giardia and Cryptosporidium: From Molecules to Disease***. CAB International: 2009 chap. 21 p.255-265.

HIJJAWI, N. S. et al. Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. **Int J Parasitol**, v. 32, n. 14, p. 1719-26, Dec 19 2002. ISSN 0020-7519.

HIGGINS, J. A. et al. Real-time PCR for the detection of *Cryptosporidium parvum*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 47, n. 3, p. 323-337, 2001. ISSN 0167-7012. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701201003396> >.

HILL, N. J.; DEANE, E. M.; POWER, M. L. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* isolates from common brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*) adapted to urban settings. **Appl Environ Microbiol**, v. 74, n. 17, p. 5549-55, Sep 2008. ISSN 0099-2240.

HUANG, D. B.; WHITE, A. C. An updated review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Gastroenterol Clin North Am**, v. 35, n. 2, p. 291-314, Jun 2006. ISSN 0889-8553.

HUNTER, P. R. et al. Sporadic cryptosporidiosis case-control study with genotyping. **Emerg Infect Dis**, v. 10, n. 7, p. 1241-9, Jul 2004. ISSN 1080-6040.

ISER (Instituto de Estudos da Religião); FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Convênio 102/2003. **Estudo das famílias moradoras no campus de Jacarepaguá: diagnóstico e alternativas de ação.** Relatório preliminar. Rio de Janeiro, 2004.

JEX, A. R. et al. *Cryptosporidium* — Biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 4, p. 304-317, Ago 2008. ISSN 0734-9750. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975008000189>>.

JIANG, J. et al. Development of procedures for direct extraction of *Cryptosporidium* DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n. 3, p. 1135-41, Mar 2005. ISSN 0099-2240.

JOHANSEN, O. H. et al. Symptomatic and asymptomatic secondary transmission of *Cryptosporidium parvum* following two related outbreaks in schoolchildren. **Epidemiol Infect**, p. 1-8, Sep 30 2014. ISSN 0950-2688.

JOKIPII, L.; JOKIPII, A. M. Timing of symptoms and oocyst excretion in human cryptosporidiosis. **N Engl J Med**, v. 315, n. 26, p. 1643-7, Dec 25 1986. ISSN 0028-4793.

KOTLOFF, K. L. et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **Lancet**, v. 382, n. 9888, p. 209-22, Jul 20 2013. ISSN 0140-6736.

LAL, A. et al. Seasonality in human zoonotic enteric diseases: a systematic review. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e31883, 2012. ISSN 1932-6203.

LALLO, M. A.; BONDAN, E. F. Prevalência de *Cryptosporidium* sp. em cães de instituições da cidade de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, p. 120-125, 2006. ISSN 0034-8910.

LEVINE, N. D. **The Protozoan Phylum Apicomplexa.** CRC Press, 1988. ISBN 9780849346538. Available at: <<http://books.google.com.br/books?id=1qV9QgAACAAJ>>.

LINDSAY, D.; BLAGBURN, B. Cryptosporidiosis in birds. **Cryptosporidiosis of man and animals**, p. 133-148, 1990. ISSN 0849364019.

LIMA, A. A. et al. Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in northeastern Brazil. **J Infect Dis**, v. 181, n. 5, p. 1643-51, May 2000. ISSN 0022-1899.

LOUREIRO, E. C. B.; LINHARES, A. C.; MATA, L. Acute diarrhoea associated with *Cryptosporidium* sp in Belém, Brazil (preliminary report). **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 138-140, Apr. 1986.

LUCIO-FORSTER, A. et al. Minimal zoonotic risk of cryptosporidiosis from pet dogs and cats. **Trends Parasitol**, v. 26, n. 4, p. 174-9, Apr 2010. ISSN 1471-4922.

LUPO, P. J. et al. *Cryptosporidium muris* in a Texas canine population. **Am J Trop Med Hyg**, v. 78, n. 6, p. 917-21, Jun 2008. ISSN 0002-9637.

MAC KENZIE, W. R. et al. A Massive Outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* Infection Transmitted through the Public Water Supply. **New England Journal of Medicine**, v. 331, n. 3, p. 161-167, 1994. Available at: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199407213310304> >.

MAK, J. W. Important zoonotic intestinal protozoan parasites in Asia. **Trop Biomed**, v. 21, n. 2, p. 39-50, Dec 2004. ISSN 0127-5720.

MEIRELES, M. V. *Cryptosporidium* infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 19, n. 4, p. 197-204, Oct-Dec 2010. ISSN 0103-846x.

MICAEL, W. et al. Large Outbreak of *Cryptosporidium hominis* Infection Transmitted through the Public Water Supply, Sweden. **Emerging Infectious Disease journal**, v. 20, n. 4, p. 581, 2014. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/20/4/12-1415> >.

MORGAN, U. M.; THOMPSON, R. C. A. PCR Detection of *Cryptosporidium*: The Way Forward? **Parasitology Today**, v. 14, n. 6, p. 241-245, 1998. ISSN 0169-4758. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169475898012472> >.

MORGAN, U. M. et al. *Cryptosporidium* spp. in domestic dogs: the "dog" genotype. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, n. 5, p. 2220-3, May 2000. ISSN 0099-2240.

MUNDIM, M. J. S. et al. Prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dogs from different living conditions in Uberlândia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 144, n. 3-4, p. 356-359, 2007. ISSN 0304-4017. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401706005747> >.

NAKAMURA, A. A.; MEIRELES, M. V. *Cryptosporidium* infections in birds--a review. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 24, n. 3, p. 253-67, Jul-Sep 2015. ISSN 0103-846x.

NASIR, A. et al. Treating *Cryptosporidium parvum* infection in calves. **J Parasitol**, v. 99, n. 4, p. 715-7, Aug 2013. ISSN 0022-3395.

NIME, F. A. et al. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. **Gastroenterology**, v. 70, n. 4, p. 592-8, Apr 1976. ISSN 0016-5085.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA. **FAO identifica os dez principais parasitas transmitidos pelos alimentos**, jul. 2014. Disponível em: < <https://www.fao.org.br/FAOidppta.asp> >. Acesso em : 8 out. 2014.

OKHUYSEN, P. C. et al. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. **J Infect Dis**, v. 180, n. 4, p. 1275-81, Oct 1999. ISSN 0022-1899.

PANCIERA, R. J.; THOMASSEN, R. W.; GARNER, F. M. Cryptosporidial Infection in a Calf. **Veterinary Pathology Online**, v. 8, n. 5-6, p. 479-484, September 1, 1971 1971. Disponível em: < <http://vet.sagepub.com/content/8/5-6/479.abstract> >.

PETERMANN, J. et al. Efficacy of halofuginone lactate against experimental cryptosporidiosis in goat neonates. **Vet Parasitol**, v. 202, n. 3-4, p. 326-9, May 28 2014a. ISSN 0304-4017.

PLUTZER, J.; KARANIS, P. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: An update. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 3-4, p. 187-199, 2009. ISSN 0304-4017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401709004002>>.

POWER, M. L. Biology of *Cryptosporidium* from marsupial hosts. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 40-44, 2010. ISSN 0014-4894. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489409002112>>.

PUTIGNANI, L.; MENICHELLA, D. Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen *Cryptosporidium*. **Interdiscip Perspect Infect Dis**, v. 2010, 2010. ISSN 1687-708x.

RANDHAWA, S. S. et al. Drug combination therapy in control of cryptosporidiosis in Ludhiana district of Punjab. **J Parasit Dis**, v. 36, n. 2, p. 269-72, Oct 2012. ISSN 0971-7196.

RACHEL, M. C. et al. *Cryptosporidium* Rabbit Genotype, a Newly Identified Human Pathogen. **Emerging Infectious Disease journal**, v. 15, n. 5, p. 829, 2009. ISSN 1080-6059. Disponível em: <<http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/15/5/08-1419>>.

REBOREDO-FERNANDEZ, A. et al. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in wild birds in Galicia (Northwest Spain). **Parasitology**, v. 142, n. 7, p. 917-25, Jun 2015. ISSN 0031-1820.

ROSALES, M. J. et al. Extracellular like-gregarine stages of *Cryptosporidium parvum*. **Acta Tropica**, v. 95, n. 1, p. 74-78, 2005. ISSN 0001-706X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X0500104X>>.

ROSE, J. B.; SLIFKO, T. R. *Giardia*, *Cryptosporidium*, and *Cyclospora* and their impact on foods: a review. **J Food Prot**, v. 62, n. 9, p. 1059-70, Sep 1999. ISSN 0362-028X.

RYAN, U. *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. **Exp Parasitol**, v. 124, n. 1, p. 113-20, Jan 2010. ISSN 0014-4894.

RYAN, U.; FAYER, R.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. **Parasitology**, v. 141, n. 13, p. 1667-85, Nov 2014. ISSN 0031-1820.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. **Trends Parasitol**, v. 22, n. 5, p. 203-8, May 2006. ISSN 1471-4922.

SAEED, K. B. A.; AHMAD, N. S. **Real-Time Polymerase Chain Reaction: Applications in Diagnostic Microbiology**. 2013. ISBN 2076-6327. Disponível em: <<http://www.ijms.info/ojs/index.php/IJMS/article/view/9>>.

SCORZA, V.; TANGTRONGSUP, S. Update on the diagnosis and management of *Cryptosporidium* spp infections in dogs and cats. **Top Companion Anim Med**, v. 25, n. 3, p. 163-9, Aug 2010. ISSN 1938-9736.

SHAHIDUZZAMAN, M.; DAUGSCHIES, A. Therapy and prevention of cryptosporidiosis in animals. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 3-4, p. 203-214, 2012. ISSN 0304-4017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401712001768>>.

SKOTARCZAK, B. Progress in the molecular methods for the detection and genetic characterization of *Cryptosporidium* in water samples. **Ann Agric Environ Med**, v. 17, n. 1, p. 1-8, Jun 2010. ISSN 1232-1966.

SLAVIN, D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). **J Comp Pathol**, v. 65, n. 3, p. 262-6, Jul 1955. ISSN 0021-9975.

SMITH, H. V.; ROSE, J. B. Waterborne cryptosporidiosis: current status. **Parasitol Today**, v. 14, n. 1, p. 14-22, Jan 1998. ISSN 0169-4758.

SMITH, H. V.; NICHOLS, R. A.; GRIMASON, A. M. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. **Trends Parasitol**, v. 21, n. 3, p. 133-42, Mar 2005. ISSN 1471-4922.

SMITH, H. V. et al. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 4, p. 160-167, 2006. ISSN 1471-4922. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492206000547>>.

SMITH, H. V. et al. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. **Vet Parasitol**, v. 149, n. 1-2, p. 29-40, Oct 21 2007. ISSN 0304-4017.

SMITH, H. V.; NICHOLS, R. A. B. *Cryptosporidium*: Detection in water and food. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 61-79, 2010. ISSN 0014-4894. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489409001520>>.

SPONSELLER, J. K.; GRIFFITHS, J. K.; TZIPORI, S. The Evolution of Respiratory Cryptosporidiosis: Evidence for Transmission by Inhalation. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 575-586, July 1, 2014 2014. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/content/27/3/575.abstract>>.

SRETER, T.; VARGA, I. Cryptosporidiosis in birds--a review. **Vet Parasitol**, v. 87, n. 4, p. 261-79, Feb 1 2000. ISSN 0304-4017.

STAGGS, S. E. et al. The Applicability of TaqMan-Based Quantitative Real-Time PCR Assays for Detecting and Enumerating spp. Oocysts in the Environment. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66562, 2013. ISSN 1932-6203.

STARK, D. et al. Evaluation of multiplex tandem real-time PCR for detection of *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*, and *Giardia intestinalis* in clinical stool samples. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 1, p. 257-62, Jan 2011. ISSN 0095-1137.

STEIN, B. et al. The effect of lectins on *Cryptosporidium parvum* oocyst in vitro attachment to host cells. **J Parasitol**, v. 92, n. 1, p. 1-9, Feb 2006. ISSN 0022-3395.

TELLEVIK, M. G. et al. Prevalence of *Cryptosporidium parvum/hominis*, *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* among Young Children with and without Diarrhea in Dar es Salaam, Tanzania. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 10, p. e0004125, 2015. ISSN 1935-2735.

THOMPSON, R. C. A.; PALMER, C. S.; O'HANDLEY, R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. **The Veterinary Journal**, v. 177, n. 1, p. 18-25, 2008. ISSN 1090-0233. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023307003425>>.

TYZZER, E. E. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. **Experimental Biology and Medicine**, v. 5, n. 1, p. 12-13, 1907. Disponível em: <<http://ebm.sagepub.com/content/5/1/12.short>>.

TZIPORI, S. et al. Cryptosporidiosis in hospital patients with gastroenteritis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 32, n. 5, p. 931-934, 1983. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0020551302&partnerID=40&md5=7fb800b68da9dcbae531370fbecd2a85>>.

VALIGUROVA, A. et al. An ultrastructural comparison of the attachment sites between *Gregarina steini* and *Cryptosporidium muris*. **J Eukaryot Microbiol**, v. 54, n. 6, p. 495-510, Nov-Dec 2007. ISSN 1066-5234.

VAN DEN BOSSCHE, D. et al. Comparison of four rapid diagnostic tests, ELISA, microscopy and PCR for the detection of *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium spp.* and *Entamoeba histolytica* in feces. **J Microbiol Methods**, v. 110, p. 78-84, Mar 2015. ISSN 0167-7012.

VIANA, G. S. B. **Perspectivas e Limites nos Programas de Regularização Fundiária em Terras Públicas da União no Rio de Janeiro: O caso do setor 1 da Colônia Juliano Moreira**. 2012. 164 (Mestre). Departamento de Serviço Social, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro- PUC-Rio

WELLER, T. H. **Ernest Edward Tyzzer**. National Academy of Sciences, 1978. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books?id=OgxXuAAACAAJ>>.

VANINI, A. et al. **Mudanças climáticas, desigualdades sociais e populações vulneráveis no Brasil: construindo capacidades - Subprojeto populações**. Centro de Referência em Segurança Alimentar e Nutricional (CERESAN). 2011.

WEIKEL, C. S. et al. Cryptosporidiosis in Northeastern Brazil: Association with Sporadic Diarrhea. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 151, n. 5, p. 963–965, May 1985.

XIAO, L. et al. Identification of 5 Types of *Cryptosporidium* Parasites in Children in Lima, Peru. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 3, p. 492-497, February, 2001. Disponível em: <<http://jid.oxfordjournals.org/content/183/3/492.abstract>>.

XIAO, L. et al. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin Microbiol Rev*, v. 17, n. 1, p. 72-97, Jan 2004. ISSN 0893-8512.

XIAO, L.; FENG, Y. Zoonotic cryptosporidiosis. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 52, n. 3, p. 309-23, Apr 2008a. ISSN 0928-8244.

XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. **Int J Parasitol**, v. 38, n. 11, p. 1239-55, Sep 2008b. ISSN 0020-7519.

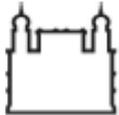
XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 80-89, 2010. ISSN 0014-4894. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489409000927>>.

YOUSSEF, F. G. et al. A review of cryptosporidiosis in Egypt. **J Egypt Soc Parasitol**, v. 38, n. 1, p. 9-28, Apr 2008a. ISSN 1110-0583.

ZAHEDI, A. et al. Public health significance of zoonotic *Cryptosporidium* species in wildlife: Critical insights into better drinking water management. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 5, n. 1, p. 88-109, 2016a. ISSN 2213-2244. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213224415300262>>.

## 8. ANEXOS

### 8.1. LICENÇA CEUA CÃES



Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
 Fundação Oswaldo Cruz  
 Vice-presidência de Pesquisa e  
 Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética  
 no Uso de Animais**

## LICENÇA

**LW-7/15**

Certificamos que o protocolo (P-31/14-3), intitulado "Avaliação da Ocorrência das zoonoses em cães no Campus da Fiocruz, Jacarepaguá, Município do Rio de Janeiro.", sob a responsabilidade de **FABIANO BORGES FIGUEIREDO**, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

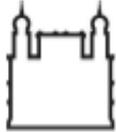
Esta licença tem validade até 08/12/2018 e inclui o uso total de :

- Canis familiaris*
- 200 Machos.
  - 200 Fêmeas.

Rio de Janeiro, 8 de dezembro de

**Octavio Augusto França Presgrave**  
 Coordenador da CEUA

## 8.2. LICENÇA CEUA AVES



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e  
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética  
no Uso de Animais

### LICENÇA

LW-22/15

Certificamos que o protocolo (P-43/14-3), intitulado "Avaliação da Ocorrência das zoonoses em aves de produção (*Gallus gallus domesticus*) no Campus da Fiocruz, Jacarepaguá, Município do Rio de Janeiro.", sob a responsabilidade de FABIANO BORGES FIGUEIREDO, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 13/04/2019 e inclui o uso total de :

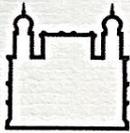
*Gallus gallus domesticus*

- 10 Machos.
- 50 Fêmeas.

Rio de Janeiro, 13 de abril de

**Octavio Augusto França Presgrave**  
Coordenador da CEUA

### 8.3. LICENÇA CEUA GAMBÁS



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e  
Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética  
no Uso de Animais**

1

## LICENÇA

**LW-81/12**

Certificamos que o protocolo (P-42/12.1), intitulado "DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR TRIPANOSOMATÍDEOS EM MAMÍFEROS POTENCIAIS RESERVATÓRIOS NO BRASIL.", sob a responsabilidade de **ANDRE LUIZ RODRIGUES ROQUE**, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 26/11/2016 e inclui o uso total de:

***Rodentia***

- 600 Machos.
- 600 Fêmeas.

***Marsupialia***

- 600 Machos.
- 600 Fêmeas.

***Chiroptera***

- 200 Machos.
- 200 Fêmeas.

***Carnivora***

- 75 Machos.
- 75 Fêmeas.

(continua)

  
Octavio A. F. Presgrave  
Coordenador  
CEUA/FIOCRUZ  
SIAPE 04626550

Comissão de Ética no Uso de Animais  
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz  
Av. Brasil, 4036 – Prédio da Expansão – sala 200 – Manguinhos – Rio de Janeiro / RJ  
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br

**LICENÇA****LW-81/12**

(continuação da licença LW-81/12 - protocolo 42/12.1)

***Cingulata***

- 10 Machos.
- 10 Fêmeas.

***Pilosa***

- 10 Machos.
- 10 Fêmeas.

***Canis familiaris***

- 460 Machos.
- 460 Fêmeas.

***Sus domesticus***

- 100 Machos.
- 100 Fêmeas.

***Bovinae***

- 40 Machos.
- 40 Fêmeas.

***Capra aegagrus hircus***

- 40 Machos.
- 40 Fêmeas.

Rio de Janeiro, 26 de novembro de 2012.



**Octavio Augusto França Presgrave**

**Coordenador da CEUA/FIOCRUZ**

**Octavio A. F. Presgrave**  
Coordenador  
CEUA/FIOCRUZ  
SIAPE 04626550

## 8.4. AUTORIZAÇÃO DE PESQUISA CIENTÍFICA INEA



GOVERNO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
SECRETARIA DE ESTADO DO AMBIENTE – SEA  
INSTITUTO ESTADUAL DO AMBIENTE - INEA

**AUTORIZAÇÃO DE PESQUISA CIENTÍFICA INEA Nº 020/2011**

### **AUTORIZAÇÃO PARA PESQUISA CIENTÍFICA** **EM UNIDADE DE CONSERVAÇÃO**

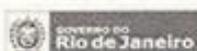
O Diretor de Biodiversidade e Áreas Protegidas do Instituto Estadual do Ambiente – INEA, no uso de suas atribuições legais, considerando a Portaria IEF/RJ/PR nº 227, de 18/12/2007, e considerando ainda o que consta no procedimento administrativo E-07/500.901/2010, **AUTORIZA** o pesquisador **PAULO SERGIO D'ANDREA**, vinculado à Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, e sua equipe, Ana Maria Jansen-Franken, André Luiz Rodrigues Roque, Arnaldo Maldonado Júnior, Cibele Rodrigues Bonvicino, Elba Regina Sampaio Lemos, Fabiano Araújo Fernandes, José Luis Passos Cordeiro, José Roberto Machado Silva, Márcio Neves Bóia, Pedro Cordeiro Estrela, Ricardo Moratelli Mendonça da Rocha, Rosana Gentile, Rosângela Rodrigues Silva, Bernardo Rodrigues Teixeira, Carla Nunes Kauffman, Cecília Silianky de Andreazzi, Cinthia Coutinho Rosa, Fernanda Bittencourt de Oliveira, Gabriele de Almeida Liano, Ingrid Lorenzato Ferreira Viana, Jonathan Gonçalves, Juberlan Silva Garcia, Juliana Ferraz, Liana Stretch Pereira, Marta Júlia Faro dos Santos, Raquel de Oliveira Simões, Renata Carvalho de Oliveira Pires dos Santos, Rodrigo Agrellos e Sócrates Fraga da Costa Neto a obter dados no Parque Estadual da Pedra Branca – PEPB, com vistas à execução do projeto de pesquisa “**Estudos taxonômicos, ecológicos, genéticos e parasitológicos sobre mamíferos reservatórios de zoonoses de importância para a saúde pública em um mosaico de ocupação antrópica no Campus da Fiocruz da Mata Atlântica e áreas adjacentes, RJ**”, devendo ser observadas as condições discriminadas no verso deste documento e ainda aquelas previstas na Portaria supra mencionada.

A presente autorização tem validade de **05 (cinco) anos** a partir da data de sua assinatura.

Rio de Janeiro, 31 de *MARÇO* de 2011.

**André Ilha**

**Diretor de Biodiversidade e Áreas Protegidas**



**inea** instituto estadual  
do ambiente



**Condicionantes desta autorização:**

1. Fica o pesquisador autorizado a:

a) Capturar:

a.1) espécimes dos táxons Rodentia, Didelphimorphia, por meio de armadilhas do tipo *Tomahawk* e *Sherman*, coletar sangue, fezes e ectoparasitos e utilizar brincos para marcação; e  
a.2) espécimes do táxon Chiroptera, por meio de rede de neblina (mist-net) e puçás, coletar sangue, fezes e ectoparasitos e utilizar colares para marcação.

b) Coletar, por excursão e por localidade, até:

b.1) 10 (dez) espécimes de *Oligoryzomys nigripes* e *Akodon cursor*, assim como sangue, fezes, ectoparasitos, endoparasitos, tecidos e órgãos;

b.2) 06 (seis) espécimes de *Didelphis aurita*, *Philander frenatus*, *Metachirus nudicaudatus*, *Monodelphis americana*, *Micoreus demerare*, *Gracilinanus microtarsus*, *Eurioryzomys sp.*, *Sphiggurus villosus*, *Cavia aperea*, *Cavia fulgida* e *Trinomys dimidiatus*, assim como sangue, fezes, ectoparasitos, endoparasitos, tecidos e órgãos;

b.3) 01 (um) espécime de *Dasyprocta leporin*, assim como sangue, fezes, ectoparasitos, endoparasitos, tecidos e órgãos;

b.4) todos os espécimes de *Mus musculus*, *Rattus rattus*, *Rattus norvergicus*, assim como sangue, fezes, ectoparasitos, endoparasitos, tecidos e órgãos; e

2. Fica o pesquisador autorizado, durante todo o projeto, a coletar até 10 (dez) machos e 10 (dez) fêmeas por espécie do táxon Chiroptera, , assim como sangue, fezes, ectoparasitos, endoparasitos, tecidos e órgãos.

3. Esta autorização não autoriza a coleta das espécies presentes nas listas oficiais de espécies ameaçadas.

4. O pesquisador deverá entrar em contato com o Serviço de Planejamento e Pesquisa da Diretoria de Biodiversidade e Áreas Protegidas, pelo telefone (21) 2334-6207, bem como com o administrador da unidade de conservação pelo telefone (21) 3347- 1786 para agendamento das atividades.

5. O pesquisador deverá apresentar ao INEA relatórios parciais semestrais da atividade de pesquisa.

6. Ao término da pesquisa científica deverão ser encaminhadas ao INEA duas cópias impressas e assinadas do relatório final de pesquisa e uma cópia em meio digital em formato pdf, não podendo ser ultrapassado o prazo máximo de 3 (três) meses após o término da pesquisa, bem como duas cópias das publicações científicas e quaisquer outros materiais produzidos a partir dos dados obtidos.

7. O pesquisador deverá mencionar o nome da unidade de conservação nos trabalhos publicados a partir desta pesquisa.

9. O pesquisador deverá dar entrada no pedido de renovação da Autorização de pesquisa 30 (trinta) dias antes de seu término, caso necessite dar continuidade à mesma.

9. O pesquisador e sua equipe ficam comprometidos em apresentar a Autorização de pesquisa, acompanhada de um documento de identidade, sempre que solicitado por servidor do INEA, bem como a executar exclusivamente o que foi previsto no projeto de pesquisa aprovado pelo INEA.

10. Fica o pesquisador comprometido a comunicar qualquer alteração do projeto antes de sua execução, devidamente justificada, para prévia aprovação.

11. A inobservância das determinações relacionadas, bem como qualquer intervenção não autorizada na Unidade de Conservação em questão, implicará na suspensão total ou parcial da referida Autorização, e na aplicação de sanções administrativas previstas na Lei 3.467/2000 e na Lei 9.605/1998.

