RENATA CAROLINA FERNANDES SANTOS

Importância de mamíferos neotropicais na epidemiologia de protozooses:

diagnóstico, caracterização molecular e aspectos ecológicos

da infecção por *Giardia* e *Cryptosporidium*

São Paulo

2011

RENATA CAROLINA FERNANDES SANTOS

Importância de mamíferos neotropicais na epidemiologia de protozooses:

diagnóstico, caracterização molecular e aspectos ecológicos

da infecção por *Giardia* e *Cryptosporidium*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:
Departamento de Patologia

Área de concentração:
Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:
Prof. Dra. Eliana Reiko Matushima

São Paulo
2011

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2488
FMVZ

Santos, Renata Carolina Fernandes
Importância de mamíferos neotropicais na epidemiologia de protozooses: diagnóstico, caracterização molecular e aspectos ecológicos da infecção por *Giardia* e *Cryptosporidium* / Renata Carolina Fernandes Santos. -- 2011.
165 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima.

1. *Giardia* spp. 2. *Cryptosporidium* spp. 3. Caracterização molecular. 4. Mamíferos neotropicais. 5. Medicina da conservação. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Levantamento e caracterização genotípica de *Cryptosporidium spp. E Giárdia spp.* isolados de amostras fecais de mamíferos silvestres *in situ* e *ex situ* nos Estados de São Paulo e Paraná, Brasil, com ênfase em Medicina da Conservação", utilizando 100 (cem) mamíferos silvestres, protocolado sob o nº1765/2009, sob a responsabilidade da Profa Dra Eliana Reiko Matushima, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 14/10/09.

We certify that the Research "Survey and genotypic characterization of *Cryptosporidium spp and Giardia spp.* isolated from fecal samples of wild mammals *in situ* and *ex situ*, in states of Sao Paulo and Parana, Brazil, with emphasis in Conservation Medicine", utilizing 100 (one hundred) wild mammals, protocol number 1765/2009, under the responsibility Profa Dra Eliana Reiko Matushima, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/14/09.

São Paulo, 16 de outubro de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

USP FMVZ 75

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SANTOS, Renata Carolina Fernandes

Título: **Importância de mamíferos neotropicais na epidemiologia de protozooses:** diagnóstico, caracterização molecular e aspectos ecológicos da infecção por *Giardia* e *Cryptosporidium*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

Aos meus maiores incentivadores.

Sempre presentes, me encorajando nas horas difíceis

E me aplaudindo nos momentos de glória.

Celso José Santos e Maria de Lourdes Fernandes Vara Santos

Meus amados pais, grandes exemplos, fontes de inspiração.

Amor puro e incondicional...

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof. Dra. Eliana Reiko Matushima, por ter me recebido na USP de maneira tão carinhosa e por ter aberto as portas deste mundo de possibilidades de pesquisas na medicina de animais silvestres. Pelas palavras incentivadoras e momentos de sensatez nas horas difíceis, pela liberdade e constante apoio e, especialmente, pela confiança no meu trabalho.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, que abraçou a causa desde o início, assumindo-a como compromisso e honrando-o com mais que louvor. Agradeço pelo carinho, preocupação, orientação, confiança e amizade, que levo comigo para a vida.

Ao querido amigo Dr. Paulo Rogerio Mangini, por todo o apoio e incentivo desde o princípio da minha formação acadêmica, pelas inúmeras e enriquecedoras discussões sobre este trabalho, por ser para mim um grande exemplo de profissional na Medicina da Conservação.

À minha família...

Aos meus pais, Celso José Santos e Maria de Lourdes Fernandes Vara Santos, por nada mais que tudo! Por sofrerem e vibrarem junto a cada passo, por serem motivos de orgulho e inspiração, por serem meus maiores exemplos de garra, serenidade, integridade e caráter, indispensáveis a esta e a qualquer conquista. Pelo amor que me sustenta.

Ao meu Guilherme Neves Carreira, companheiro mais que especial e imprescindível para o sucesso deste trabalho. Meu alento e equilíbrio nas horas de desespero, minha alegria e conforto em todas as horas! Pelo companheirismo, carinho, paciência, dedicação e amor. Por simplesmente existir e estar aqui ao meu lado.

Aos meus avôs, os portuguesinhos Vô Antônio e Vó Ana, por toda preocupação e carinho. Por serem exemplos de companheirismo e por transbordarem uma vontade de aprender que tanto me orgulha e inspira. E aos catarinas, Vô Gonzaguinha (in memoriam), de quem só tenho boas lembranças, e minha Vózinha Ângela, que no auge dos seus 93 anos me ensina tanto sobre a vida.

Ao meu irmão, Raphael Eduardo Fernandes Santos, pelo constante incentivo e carinho, por ser exemplo de profissional dedicado e competente. À tia Su, uma segunda mãe e grande amiga. Ao padrinho Silvio. Enfim, a todos os integrantes desta linda família que tenho, tias, tios, primos, primas, minha base sólida, porto seguro.

E também à minha segunda família, Fátima, Sebastião, Carla e meu irmãozinho Márcio, que me acolheram com tanto carinho.

Aos parceiros e colaboradores desta pesquisa...

À Itaipu Binacional, nas figuras de João Antonio Cordoni e Edson Zanlorensi, que permitiram a realização de mais este trabalho no Refúgio. Aos queridos amigos Zalmir Silvino Cubas, Wanderlei de Moraes, Leonilda Correia dos Santos, Marcos José de Oliveira e Rosana Pinto de Almeida, maiores

responsáveis pelo surgimento deste estudo e grandes incentivadores. Pelas experiências compartilhadas desde a época do meu estágio, pelo carinho, amizade, apoio e confiança. Pessoas que admiro pelos excelentes profissionais que são e pelos grandes amigos que para mim se tornaram. A toda equipe de tratadores, um a um, pela dedicação, prontidão, eficiência e pelo carinho.

À Central Elétrica Anhanguera (Celan) e à Wildlife Management (WLM) Consultoria Veterinária Ltda, esta na figura de Rodrigo del Rio do Valle, pela oportunidade de coletar amostras durante a construção da PCH Anhanguera, em São Joaquim da Barra e Guará, SP.

À EMBRAPA Pantanal, especialmente ao Dr. Guilherme de Miranda Mourão e à Carolina Carvalho Cheida, pela oportunidade de coletar amostras e de acompanhar as pesquisas com a fauna na Fazenda Nhumirim, uma excelente experiência. Agradeço também à Pâmela Antunes, Gustavo e Macca, pela ajuda com as coletas e pelos bons momentos compartilhados.

Ao querido Prof. Dr. José Luiz Catão Dias, à amiga Marina Galvão Bueno e ao Museu de Zoologia da USP pelas amostras amazônicas. Ao Prof. Dr. Luciano Verdade e à querida amiga Alice Soares de Oliveira pelas amostras de Angatuba, SP. Ao CRAS-PET, em particular à Liliane Milanelo e à querida amiga Thaís Guimarães Luiz, pelas amostras de animais recebidos nesta instituição. Ao pessoal do VPT, funcionários, residentes e amigos, pelas amostras coletadas durante as necropsias.

Aos amigos com quem convivi no VPS de Pirassununga: Lara Borges Keid, João Augusto Metzner, Estela Galucchi, Seu Antônio, Ni, Cris e Núbia, pelos muitos momentos agradáveis, pelas palavras amigas nos momentos não tão agradáveis e pela indispensável ajuda.

Ao pessoal do VPS de São Paulo: Dra. Hilda Fátima de Jesus Pena, Renato Caravieri e Pedro Ferreira da Silva; do Laboratório de Doenças Parasitárias; e Sheila Oliveira de Souza Silva; do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia (LABMAS); bem como ao Dr. Silvio Luís Pereira de Souza e Leonardo Vaz de Almeida. Pelo agradável convívio, pelos ensinamentos, esclarecimentos de dúvidas e pela imprescindível ajuda na reta final.

A todos os professores, funcionários e pós-graduandos dos departamentos VPT e VPS da FMVZ-USP que de alguma forma contribuíram para minha formação acadêmica e realização deste trabalho.

Ao pessoal da UNESP, Campus de Araçatuba, especialmente ao Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles, por me receber em seu laboratório, pelo grande apoio e pelas engrandecedoras discussões. À Camila, Deuvânia, Dodô e Guto pela gentil hospitalidade e auxílio enquanto estive por lá.

Aos amigos...

Aos companheiros do Laboratório de Patologia Comparada de Animais Silvestres, nosso LAPCOM, no VPT: Alex Genoy-Puerto, Angie Sarmiento, Catia Dejuste, Kátia Groch, Marina Bueno, Alice Oliveira, Omar Gonzales-Viera, Pedro Oliveira, Fabiola Prioste, Sávio Sant'anna, Gustavo Bauer, Stéfanie Santos, Silmara Rossi, Cláudia Niemeyer, Ticiana Zwarg, Flávia Miranda e, especialmente, Jorge Oyakawa, pela chegada em excelente hora e pelas inúmeras ajudas no laboratório; e Ralph Vanstreels, nosso querido estatístico, que deu a maior força na análise final dos resultados deste trabalho em meio à correria com os pinguins.

À amiga Marina de Oliveira Cesar, que além de companheira de LAPCOM foi parceira de inúmeras viagens à Pirassununga, vários sufocos e muitas boas conversas e risadas. Agradeço por toda a ajuda, desde o início!

Aos amigos de coração e alma, Simone, Ferzinha, Elaine, Franz e Tati, que independente do tempo e da distância, sempre estiveram e estarão mais que presentes.

Aos amigos de São Joaquim da Barra, SP, agora dispersos por aí, Tuca, Roger, Alex, Taís, Fer Rosa, Ligia, Neno, Elsio, Michele, Mário, Flávio e Francisco.

Aos amigos, professores (especialmente ao Prof. Dr. Rogério Ribas Lange, grande inspirador e exemplo) e funcionários da UFPR, onde está a base da minha formação como médica veterinária.

E mais...

Ao Claudio Luiz Mangini, pela linda capa desta dissertação.

Ao Zalmir Silvino Cubas, José Luiz Catão Dias e Jean Carlos Ramos Silva, pela confiança e incentivo, que culminaram na redação de um capítulo para a mais renomada bibliografia nacional na medicina de animais selvagens, o Tratado. Motivo de imensa honra.

À minha parceirinha Tubica, meu Tufinho preto, por ser uma companheira maravilhosa durante a redação desta dissertação. Aos animais que contribuíram, involuntariamente, para a realização deste trabalho. A todos os animais, especialmente à fauna silvestre, com quem temos tanto a aprender sobre convívio em sociedade, adaptação às situações adversas, transparência, equilíbrio... À natureza, perfeita e inspiradora. Aos meus guias espirituais.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo n° 2010/04653-0) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho, fazem parte desta conquista e merecem meu carinho.

"Se você tem dez tempos para cumprir uma tarefa,

gaste nove deles planejando."

(Autor desconhecido)

"À medida que o conhecimento biológico cresça,

a ética mudará fundamentalmente para que,

em todos os lugares, a fauna e a flora de um país

sejam consideradas uma parte da herança nacional

tão importante quanto sua arte, seu idioma

e aquela estonteante mistura de conquistas

e farsas que sempre definiram nossa espécie".

E. O. Wilson (1984)

Livro Mamíferos do Brasil (REIS et al., 2011)

RESUMO

SANTOS, R. C. F. **Importância de mamíferos neotropicais na epidemiologia de protozooses**: diagnóstico, caracterização molecular e aspectos ecológicos da infecção por *Giardia* e *Cryptosporidium*. [Importance of neotropical mammals in the epidemiology of protozoosis: diagnosis, molecular characterization and ecological aspects of infection by *Giardia* and *Cryptosporidium*]. 2011. 165 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Giardia e *Cryptosporidium* são protozoários cosmopolitas cuja epidemiologia é especialmente importante devido ao seu expressivo potencial zoonótico. Animais silvestres são frequentemente relatados como reservatórios da giardiose e criptosporidiose humanas, todavia, são escassas as evidências sobre sua real importância na manutenção e disseminação destas protozooses. No intuito de avaliar a ocorrência e determinar os genótipos responsáveis pela infecção de mamíferos neotropicais, 452 amostras fecais procedentes de 52 diferentes espécies, *in situ* e *ex situ,* de sete localidades distintas foram avaliadas por métodos de diagnóstico microscópico, seguidos por técnicas moleculares de amplificação (*Nested* PCR), sequenciamento e caracterização genotípica. Os resultados revelaram prevalência aparente de 6,2% para *Giardia* spp. e de 4,8% para *Cryptosporidium* spp. (n=343). Dezessete diferentes espécies de mamíferos silvestres foram positivas, sendo 11 para *Giardia* spp., nove para *Cryptosporidium* spp. e três para ambos os protozoários. A caracterização molecular revelou a predominante presença de genótipos zoonóticos em mamíferos cativos (*Giardia duodenalis* genótipo AI) e de genótipos hospedeiro-específicos em animais de vida livre (*Cryptosporidium* sp. *rat genotype* III e *Cryptosporidium wrairi*). Foram também identificados *Giardia duodenalis* genótipo D em cachorro-do-mato *Cerdocyon thous* e *Cryptosporidium* sp. *deer mouse genotype* IV em bugio-preto *Alouatta caraya*, ambos mantidos em cativeiro. Aspectos ecológicos, como habitat, guilda trófica, estratégia do uso do ambiente e influência antrópica, foram considerados relevantes para a ocorrência dos parasitas. Tais achados demonstraram que animais silvestres podem ser infectados por genótipos zoonóticos e específicos dos agentes, o que revela a importância de estudos envolvendo esta abordagem para sugerir possíveis relações entre os protozoários, hospedeiros humanos, animais domésticos e silvestres perante diferentes características ambientais.

Palavras-chave: *Giardia* spp. *Cryptosporidium* spp. Caracterização molecular. Mamíferos neotropicais. Medicina da conservação.

ABSTRACT

SANTOS, R. C. F. **Importance of neotropical mammals in the epidemiology of protozoosis:** diagnosis, molecular characterization and ecological aspects of infection by *Giardia* and *Cryptosporidium.* [Importância de mamíferos neotropicais na epidemiologia de protozooses: diagnóstico, caracterização molecular e aspectos ecológicos da infecção por *Giardia* e *Cryptosporidium*]. 2011. 165 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Giardia and *Cryptosporidium* are cosmopolitan protozoans whose epidemiology is especially important due to its significant zoonotic potencial. Wild animals are often reported as reservoirs of human giardiosis and cryptosporidiosis, however, there is little evidence about their real importance in the maintenance and dissemination of these protozoosis. In order to evaluate the occurrence and determine the genotypes responsible for neotropical mammals infection, 452 fecal samples of 52 different species, *in situ* and *ex situ*, of seven locations were evaluated by microscopic methods of diagnosis, followed by molecular amplification (*Nested* PCR), sequencing and genotypic chacacterization techniques. The results revealed an apparent prevalence of 6,2% for *Giardia* spp. and 4,8% for *Cryptosporidium* spp. (n=343). Seventeen different species of wild mammals were positive, 11 for *Giardia* spp., nine for *Cryptosporidium* spp. and three for both protozoans. Molecular characterization shows predominant presence of zoonotic genotypes in captive mammals (*Giardia duodenalis* genotype AI) and host-specific genotypes in free-living animals (*Cryptosporidium* sp. *rat genotype* III and *Cryptosporidium wrairi*). *Giardia duodenalis* genotype D in crab-eating fox *Cerdocyon thous* and *Cryptosporidium* sp. *deer mouse genotype* IV in black howler monkey *Alouatta caraya*, both in captivity, were also identified. Ecological aspects, like habitat, trophic guilds, strategy of using the environment and human influence, were considered relevant to occurrence of the parasites. These findings could demonstrate wild mammals can be infected by zoonotic and specific genotypes of agents, which shows the importance of studies using this approach to suggest possible relationships between protozoans, human hosts, domestic animals and wildlife facing different environmental characteristics.

Keywords: *Giardia* spp. *Cryptosporidium* spp. Molecular characterization. Neotropical mammals. Conservation medicine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição geográfica dos biomas terrestres brasileiros no território nacional segundo o Ministério do Meio Ambiente – São Paulo - 2011... 29

Figura 2 – Ciclo biológico de *Giardia* spp. – São Paulo – 2010 35

Figura 3 – Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. – São Paulo – 2010 37

Figura 4 – Imagem de satélite demonstrando a localização geográfica dos sete locais de coleta de amostras fecais para o presente estudo – São Paulo – 2011 54

Figura 5 – Localização geográfica da área de estudo descrita no subitem 4.1.1.1, entre os municípios de São Joaquim da Barra e Guará, nordeste do estado de São Paulo. A área diretamente afetada (ADA) pelo empreendimento fica a montante do eixo da PCH Anhanguera (asterisco branco), abrangendo os fragmentos de mata nas margens do rio Sapucaí-mirim, até o cruzamento com a Rodovia Anhanguera (traço amarelo). A seta branca indica a direção do rio. Note as extensas áreas agrícolas adjacentes às áreas de mata (bioma Cerrado) – São Paulo - 2011 57

Figura 6 – Imagem aérea da Pequena Central Hidrelétrica (PCH) Anhanguera durante construção. Canteiro de obras (asterisco preto), eixo da barragem (asterisco branco) e área diretamente afetada (ADA) pelo empreendimento (setas pretas), na qual se realizou o monitoramento faunístico e coleta de amostras – São Paulo - 2011 57

Figura 7 – Rio Sapucaí-mirim (à esquerda) e supressão da vegetação no eixo da PCH Anhanguera (à direita). As áreas de mata compreendem a ADA da PCH Anhanguera – São Paulo – 2009 58

Figura 8 – Coleta de amostras fecais *in situ* na ADA da PCH Anhanguera. À esquerda, cuíca *Gracilinanus agilis* e, à direita, rato-do-mato *Oligoryzomys nigripes*, ambos defecando durante contenção física – São Paulo - 2009 58

Figura 9 – Imagens ilustrando a influência antrópica e a interface entre animais silvestres, humanos e animais domésticos na ADA da PCH Anhanguera. À esquerda, bugio-preto *Alouatta caraya* demonstrando-se habituado à aproximação humana. À direita, cachorro-do-mato *Cerdocyon thous* flagrado forrageando em área de plantio de cana-de-açúcar (acima) e cão doméstico *Canis familiaris* capturado acidentalmente em armadilha para carnívoros silvestres instalada na ADA – São Paulo - 2009 58

Figura 10 – Localização geográfica e imagem aérea da Fazenda Nhumirim, campo experimental da EMBRAPA Pantanal, município de Corumbá, MS. À direita, área de reserva ambiental compreendida dentro dos limites da fazenda – São Paulo – 2010 60

Figura 11 – Interação entre homem, animais domésticos (bovinos, equinos, caninos) e animais silvestres (cervídeos, canídeos) na Fazenda Nhumirim, EMBRAPA Pantanal. À direita, cachorro-do-mato *Cerdocyon thous* alimentando-se de carcaça bovina – São Paulo - 2010..... 60

Figura 12 – Grupo de capivaras *Hydrochoerus hydrochaeris* próximo à baía natural (à esquerda) e quati *Nasua nasua* tentando utilizar a fonte artificial de água oferecida pelos produtores ao gado nos períodos de seca no Pantanal (à direita) – São Paulo – 2010..... 60

Figura 13 – Localização geográfica da área de estudo descrita no subitem 4.1.1.4, próxima ao município de Abunã, RO, 212km da capital Porto Velho – São Paulo - 2011 62

Figura 14 – Locais de coleta de amostras fecais procedentes de primatas neotropicais da região amazônica. À direita, macaco-barrigudo *Lagothrix* sp. *in situ* (acima) e habitação de ribeirinhos em frente a área de mata densa (abaixo), na margem do Rio Madeira, próximo ao município de Abunã, RO – São Paulo - 2010 62

Figura 15 – Local de coleta de amostras descrito no subitem 4.1.1.5, no municípo de Angatuba, SP. Aspecto geral da Fazenda Três Lagoas (acima, à esquerda) e áreas de instalação de armadilhas de interceptação e queda (*pitfall*) em regiões de mata nativa (Cerrado) (acima, à direita) e de agroecossistema (abaixo) – São Paulo - 2011 ... 63

Figura 16 – Localização geográfica do Refúgio Biológico Bela Vista, Itaipu Binacional, no município de Foz do Iguaçu, PR. A imagem maior ilustra a área construída do RBV, na qual está localizado o Departamento de Fauna, composto por Hospital Veterinário, Quarentenário, Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (CASIB) e Zoológico Roberto Ribas Lange, onde foram coletadas amostras de animais cativos. Na imagem menor (abaixo, à esquerda) é possível visualizar grande parte da extensão do RBV, onde foram coletadas amostras de animais de vida livre – São Paulo - 2011 65

Figura 17 – Recintos coletivos para mamíferos silvestres do Zoológico Roberto Ribas Lange, RBV, Itaipu Binacional. À esquerda, ilha para primatas neotropicais (macaco-prego *Cebus apella*) em frente ao recinto para Cervo-do-Pantanal *Blastocerus dichotomus* e tamanduá-bandeira *Myrmecophaga tridactyla*. À direita, recinto para anta *Tapirus terrestris*, capivara *Hydrochoerus hydrochaeris* e cateto *Pecari tajacu* – São Paulo – 2010 65

Figura 18 – Instalações do Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (CASIB). À direita, recinto ambientado para gato-maracajá *Leopardus wiedii* (seta) – São Paulo – 2010 66

Figura 19 – Grupo de bugio-preto *Alouatta caraya* mantido em cativeiro em Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) provisório, após captura *in situ* na ADA da PCH Anhanguera. À direita, indivíduo que veio a óbito após severo quadro clínico sugestivo de doença gastroentérica – São Paulo - 2009 66

Figura 20 – Armadilha de interceptação e queda (AIQ) ou *pitfall*. As imagens à direita ilustram a captura de um exemplar de cuíca *Gracilinanus agilis* por meio deste método. ADA, PCH Anhanguera – São Paulo – 2009..... 69

Figura 21 – Armadilha do tipo *Tomahawk,* de desarme automático. À direita, exemplar de quati *Nasua nasua* capturado por meio deste método. Fazenda Nhumirim, EMBRAPA Pantanal – São Paulo - 2010..... 69

Figura 22 – Armadilha de espera (AE) para captura de primatas não humanos. À esquerda, gaiola de captura e, à direita, cabana para monitoramento. Desarme manual por meio de cordas. ADA, PCH Anhanguera – São Paulo – 2009 70

Figura 23 – Armadilha metálica do tipo *Sherman* instalada em subosque (à esquerda) e armadilha do tipo guilhotina (AG) instalada no solo (à direita), ambas de desarme automático. Note exemplar de cutia *Dasyprocta azarae* capturado em AG (à direita). ADA, PCH Anhanguera – São Paulo – 2009 70

Figura 24 – Curral de captura para Tayassuidae (à esquerda) e exemplar de cateto *Pecari tajacu* capturado por meio deste método (à direita), na Fazenda Nhumirim, EMBRAPA Pantanal – São Paulo – 2010..... 70

Figura 25 – Coleta de amostras fecais de mamíferos silvestres cativos do RBV, Itaipu Binacional. À esquerda, coleta de amostra proveniente de dois exemplares de mão-pelada *Procyon cancrivorus*, mantidos juntos no recinto (amostra de *pool*). À direita, imediato acondicionamento de amostra fecal em solução de dicromato de potássio a 2,5% – São Paulo - 2010..... 71

Figura 26 – Coleta de amostras fecais de mamíferos silvestres de vida livre por meio de encontro ocasional de amostras no solo, sem envolver captura, na ADA da PCH Anhanguera. À direita, amostra fecal fresca de bugio-preto *Alouatta caraya* – São Paulo - 2009 71

Figura 27 – Coleta de amostras fecais de mamíferos silvestres de vida livre por meio de encontro ocasional de amostras recentemente excretadas por capivaras *Hydrochoerus hydrochaeris* (seta), no RBV, Itaipu Binacional – São Paulo - 2010 71

Figura 28 – Fluxograma do processamento de amostras fecais para diagnóstico microscópico de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. nas amostras do *grupo A* – São Paulo – 2011 74

Figura 29 – Fluxograma do processamento de amostras fecais para diagnóstico microscópico de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. nas amostras do *grupo B* – São Paulo – 2011 74

Figura 30 – À esquerda, fotomicrografia de cistos de *Giardia* spp. corados com lugol procedentes de amostra fecal de ratão-do-banhado *Myocastor coypus*; técnica de centrífugo-sedimentação em formol-éter (método de Ritchie), aumento de 400x. À direita, fotomicrografia de oocistos de *Cryptosporidium* spp. corados pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada, aumento de 1000x – São Paulo - 2011 94

Figura 31 – Distribuição amostral conforme bioma (Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal e Amazônia) e origem da amostra (*in situ* ou *ex situ*) (gráfico à esquerda) e conforme ordem taxonômica dos indivíduos amostrados (gráfico à direita). Nos biomas Pantanal e Amazônia apenas amostras *in situ* foram coletadas – São Paulo - 2011 97

Figura 32 – À esquerda, fotomicrografia de cistos de *Giardia* spp. procedentes de amostra fecal de jaguatirica *Leopardus pardalis;* técnica de centrífugo-flutuação em solução hipersaturada de sacarose, aumento de 400x. À direita, fotomicrografia de oocistos de *Cryptosporidium* spp. procedentes de amostra fecal de capivara *Hydrochoerus hydrochaeris;* técnica de centrífugo-flutuação em solução hipersaturada de sacarose, aumento de 800x – São Paulo - 2010..... 100

Figura 33 – Número de amostras positivas para os protozoários estudados de acordo com a amostragem total (n=343) e a amostragem utilizada para as análises estatísticas, na qual foram desconsideradas amostras de *pool* (n=292) – São Paulo - 2011..... 102

Figura 34 – Ocorrência de *Giardia* spp. (Giardia) e *Cryptosporidium* spp. (Crypto) conforme o local de coleta das amostras – São Paulo – 2011 103

Figura 35 – Ocorrência de *Giardia* spp. segundo origem das amostras, sexo e grupo etário dos espécimes amostrados e estação climática na qual a amostra foi coletada – São Paulo - 2011..... 105

Figura 36 – Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. segundo origem das amostras, sexo e grupo etário dos espécimes amostrados e estação climática na qual a amostra foi coletada – São Paulo - 2011 105

Figura 37 – Prevalência aparente de *Giardia* spp. ao exame coproparasitológico ao longo do ano – São Paulo – 2011..... 106

Figura 38 – Prevalência aparente de *Cryptosporidium* spp. ao exame coproparasitológico ao longo do ano – São Paulo – 2011 107

Figura 39 – Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. segundo ordem taxonômica, guilda trófica, estratégia de uso do habitat e bioma de origem dos espécimes amostrados. Foram ocultadas da imagem as variáveis nas quais não houve resultados positivos para o coccídio na microscopia – São Paulo – 2011 109

Figura 40 – Ocorrência de *Giardia* spp. segundo ordem taxonômica, guilda trófica, estratégia de uso do habitat e bioma de origem dos espécimes amostrados. Foram ocultadas da imagem as variáveis nas quais não houve resultados positivos para o parasita flagelado na microscopia. Todos os resultados foram não significativos – São Paulo - 2011 109

Figura 41 – Bugio-preto *Alouatta caraya* com severo quadro clínico sugestivo de doença gastroentérica. As manifestações clínicas observadas incluem diarréia, desidratação e apatia – São Paulo - 2011 110

Figura 42 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de *Nested* PCR resultantes da amplificação do gene GDH de amostras positivas para *Giardia* spp. na microscopia – São Paulo – 2011 111

Figura 43 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de *Nested* PCR resultantes da amplificação do gene β-giardina de amostras positivas para *Giardia* spp. na microscopia. Note que as amostras estão em duplicata – São Paulo – 2011 112

Figura 44 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de *Nested* PCR resultantes da amplificação do gene SSU rDNA de amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. na microscopia. Note que as amostras estão em duplicata – São Paulo – 2011 112

Figura 45 – Alinhamento das sequências referentes às amostras #233, #293 e #289 com sequências homólogas com as quais houve maior identidade; obtido com o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*. Observar transições, inserções e deleções de nucleotídeos. (A régua é meramente ilustrativa e não corresponde ao posicionamento real dos nucleotídeos no gene) – São Paulo - 2011... 119

Figura 46 – Árvore filogenética enraizada gerada a partir de sequências do gene SSU rDNA de isolados de *Cryptosporidium* spp., inferida por método de distância com o algoritmo *Neighbor-Joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *Maximum Composite Likelihood*, construída com auxílio do programa MEGA 5.0 121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação taxonômica, guildas tróficas e estratégias de uso do habitat dos espécimes amostrados, considerados para análise estatística – São Paulo - 2011 96

Tabela 2 – Distribuição da amostragem estatística em função de sua origem (*in situ* ou *ex situ*) e bioma (Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica ou Pantanal) – São Paulo - 2011 97

Tabela 3 – Relação dos locais de coleta das amostras fecais do *grupo B*, localidade e bioma brasileiro ao qual pertencem, número de amostras coletadas *in situ* e *ex situ* e número de espécies de mamíferos silvestres amostradas para cada localidade – São Paulo – 2011 98

Tabela 4 – Relação de espécies amostradas, número de amostras coletadas e número de amostras positivas na microscopia para *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. para cada espécie – São Paulo – 2011 101

Tabela 5 – Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. ao diagnóstico microscópico em função das categorias de origem, sexo, grupo etário, estação e mês da coleta. Note que os valores percentuais foram arredondados para facilitar a avaliação comparativa entre os resultados – São Paulo - 2011 104

Tabela 6 – Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. ao diagnóstico microscópico em função das categorias de ordem, guilda trófica, uso do habitat e bioma. Note que os valores percentuais foram arredondados para facilitar a avaliação comparativa entre os resultados – São Paulo - 2011 108

Tabela 7 – Resultados da *Nested* PCR para diagnóstico de *Giardia* spp. em amostras sabidamente positivas à microscopia, para os genes GDH e β-giardina – São Paulo - 2011 113

Tabela 8 – Resultados da *Nested* PCR para diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. em amostras sabidamente positivas à microscopia – São Paulo - 2011 113

Tabela 9 – Comparação entre os resultados de *Nested* PCR para os genes GDH e β-giardina para diagnóstico de *Giardia* spp. em amostras sabidamente positivas à microscopia – São Paulo - 2011 115

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Espécies e genótipos (*assemblages*) de *Giardia* spp., referências e seus respectivos hospedeiros suscetíveis – São Paulo - 2011 40

Quadro 2 – Espécies de *Cryptosporidium* spp. descritas em literatura, respectivas referências, tamanho dos oocistos, sítio(s) primário(s) de replicação e hospedeiros suscetíveis – São Paulo - 2011..... 41

Quadro 3 – Relação dos locais de coleta de amostras biológicas (fezes), respectivas localidades (municípios e coordenadas geográficas) e bioma brasileiro ao qual pertencem – São Paulo – 2011..... 54

Quadro 4 – Parâmetros utilizados para avaliação semiquantitativa de cistos e oocistos dos protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. nas amostras fecais do *grupo B* – São Paulo - 2011..... 74

Quadro 5 – *Primers* utilizados nas reações de PCR e *Nested* PCR para amplificação de fragmentos do gene codificador da menor subunidade do DNA ribossomal (SSU rDNA) de isolados de *Cryptosporidium* spp. e suas respectivas sequências, tamanhos dos fragmentos amplificados (em pares de bases) e referências – São Paulo – 2011..... 81

Quadro 6 – *Primers* utilizados nas reações de PCR e *Nested* PCR para amplificação de fragmentos dos genes codificadores da glutamato-desidrogenase e β-giardina de isolados de *Giardia* spp. e suas respectivas sequências, tamanhos dos fragmentos amplificados (em pares de bases) e referências – São Paulo - 2011 81

Quadro 7 – Relação das espécies hospedeiras, procedência das amostras e resultados obtidos com os diagnósticos microscópico (avaliação quantitativa segundo Huetink et al. (2001)) e molecular – São Paulo - 2011 114

Quadro 8 – Detalhes da identificação molecular de isolados de *Giardia duodenalis* provenientes de mamíferos silvestres para os genes GDH e β-giardina – São Paulo - 2011 116

Quadro 9 – Detalhes da identificação molecular de isolados de *Cryptosporidium* spp. provenientes de mamíferos silvestres para o gene ribossomal SSU rDNA – São Paulo - 2011 118

Quadro 10 – Detalhes da identificação dos espécimes hospedeiros, locais de coleta e origem das amostras e identificação molecular dos respectivos isolados de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. – São Paulo - 2011 120

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 23

2 OBJETIVOS 26

2.1 OBJETIVO GERAL 26

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 26

3 REVISÃO DE LITERATURA 28

3.1 DIVERSIDADE DA MASTOFAUNA BRASILEIRA 28

3.2 ZOONOSES E ANIMAIS SILVESTRES: MEDICINA DA CONSERVAÇÃO 29

3.3 PROTOZOÁRIOS COSMOPOLITAS: *Giardia* E *Cryptosporidium* 31

3.3.1 Ciclos biológicos 34

3.3.2 Aspectos clínicos e anatomopatológicos da infecção em mamíferos 37

3.3.3 Epidemiologia molecular 39

3.3.4 Epizootiologia em mamíferos silvestres 42

3.3.5 Diagnóstico 46

3.3.6 Importância da contaminação ambiental 49

3.3.7 Ecologia da relação entre parasitas e hospedeiros 50

4 MATERIAIS E MÉTODOS 53

4.1 DESCRIÇÃO DAS ÁREAS DE ESTUDO 53

4.1.1 Áreas de coleta de amostras fecais de mamíferos silvestres *in situ* 55

4.1.1.1 Área diretamente afetada (ADA) pela Pequena Central Hidrelétrica (PCH) Anhanguera, São Joaquim da Barra e Guará, SP 55

4.1.1.2 Refúgio Biológico Bela Vista (RBV), Itaipu Binacional, Foz do Iguaçu, PR 56

4.1.1.3 Fazenda Nhumirim, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Pantanal, Corumbá, MS 59

4.1.1.4 Margens do Rio Madeira, Abunã – RO 61

4.1.1.5 Fazenda Três Lagoas, Angatuba, SP 61

4.1.1.6 Outras amostras 63

4.1.2 Áreas de coleta de amostras fecais de mamíferos silvestres *ex situ* 64

4.1.2.1 Refúgio Biológico Bela Vista (RBV), Itaipu Binacional, Foz do Iguaçu, PR .. 64

4.1.2.2 Outras amostras 66

4.2 PROTOCOLOS DE COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS FECAIS 67

4.3 DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO 72

4.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR 75

4.4.1 Métodos de Extração de Ácido Nucléico (DNA) 75

4.4.2 Iniciadores (*primers*) utilizados nas reações de PCR e *Nested* PCR 80

4.4.3 Reações em Cadeia pela Polimerase (PCR e *Nested* PCR) 81

*4.4.3.1 Condições de amplificação: Gene SSU rDNA (*Cryptosporidium *spp.)* 82

*4.4.3.2 Condições de amplificação: Gene GDH (*Giardia *spp.)* 83

*4.4.3.3 Condições de amplificação: Gene β-giardina (*Giardia *spp.)* 84

4.4.4 Análise dos produtos amplificados 85

4.5 SEQUENCIAMENTO MOLECULAR 86

4.5.1 Purificação dos produtos amplificados 86

4.5.2 Reação de sequenciamento molecular 86

4.5.3 Precipitação do produto amplificado 87

4.5.4 Eletroforese de sequenciamento 87

4.5.5 Edição das sequências gênicas 88

4.5.6 Inferências filogenéticas 88

4.6 CRITÉRIOS ADOTADOS PARA ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS 88

5 RESULTADOS 92

5.1 RESULTADOS REFERENTES AO *grupo A* DE AMOSTRAS FECAIS 93

5.1.1 Diagnóstico microscópico 93

5.1.2 Diagnóstico molecular 94

5.2 RESULTADOS REFERENTES AO *grupo B* DE AMOSTRAS FECAIS 95

5.2.1 Espécies da mastofauna brasileira e biomas amostrados 98

5.2.2 Diagnóstico microscópico 98

5.2.2.1 Ocorrência dos protozoários na população avaliada 99

5.2.2.2 Ocorrência segundo o local de coleta 103

*5.2.2.3 Ocorrência segundo origem (*in situ *x* ex situ*), sexo, grupo etário e estação climática* 104

5.2.2.4 Ocorrência segundo táxon, guilda trófica, estratégias de uso do habitat e bioma 107

5.2.2.5 Caso particular: bugio-preto Alouatta caraya *(amostras #21 e #296)* 110

5.2.2.6 Carga parasitária 111

5.2.3 Diagnóstico molecular 111

5.2.4 Caracterização molecular 115

5.2.4.1 Identificação molecular de isolados de Giardia *spp.* 115

5.2.4.2 Identificação molecular de isolados de Cryptosporidium *spp*. 117

5.2.4.3 Inferências Filogenéticas 120

5.2.4.4 Subgenotipagem de isolados de Giardia duodenalis 122

6 DISCUSSÃO 125

6.1 DIAGNÓSTICO DE *Giardia* E/OU *Cryptosporidium* EM AMOSTRAS FECAIS. 126

6.2 OCORRÊNCIA DOS PROTOZOÁRIOS EM MAMÍFEROS NEOTROPICAIS... 132

6.3 CASO PARTICULAR: BUGIO-PRETO *Alouatta caraya* (AMOSTRAS #21 E #296) 137

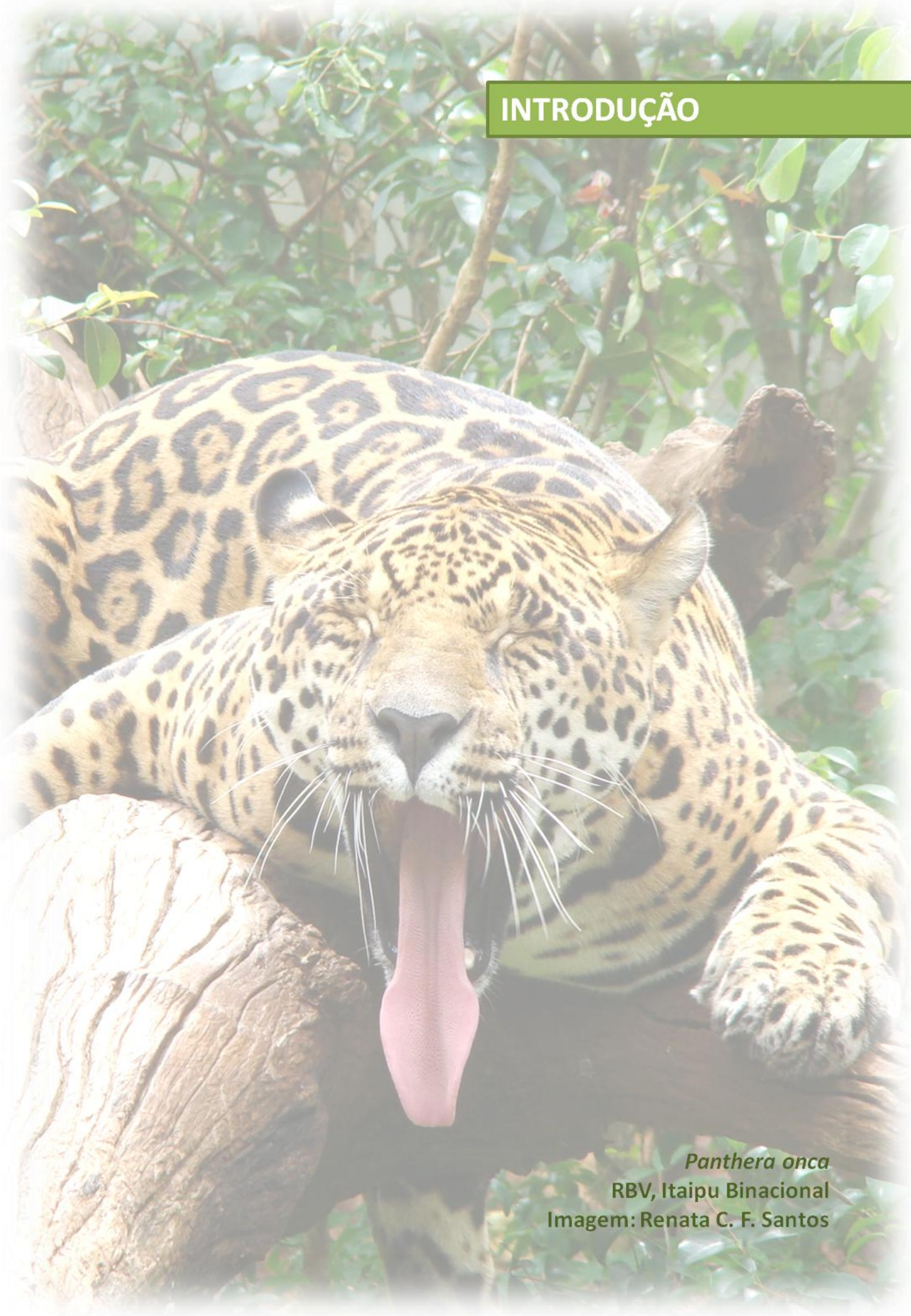
6.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E INFERÊNCIAS FILOGENÉTICAS 139

6.5 IMPLICAÇÕES PARA A SAÚDE PÚBLICA, ANIMAL E AMBIENTAL 143

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS 147

REFERÊNCIAS 150

INTRODUÇÃO



Panthera onca
RBV, Itaipu Binacional
Imagem: Renata C. F. Santos

1 INTRODUÇÃO

Giardia e *Cryptosporidium* são protozoários oportunistas causadores de doenças predominantemente gastroentéricas e capazes de infectar todos os grupos faunísticos de vertebrados, sendo mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes possíveis hospedeiros e dispersores destes agentes (OLSON; OLSON; WALLIS, 2002; FAYER; XIAO, 2008; ORTEGA-PIERRES et al., 2009b).

Relatados frequentemente como causadores de surtos epidêmicos e epizoóticos por todo o mundo, tais protozoários são responsáveis por duas das mais graves enfermidades transmitidas pela água, tendo como principal agravante o difícil controle da contaminação ambiental (MAC KENZIE et al., 1994; OLSON; OLSON; WALLIS, 2002; FAYER; XIAO, 2008; CHALMERS; DAVIES, 2010). A eliminação de resistentes formas infectantes, como cistos e oocistos, nas fezes do hospedeiro é uma importante característica de ambas as referidas parasitoses, de tal modo que sua transmissão é predominantemente fecal-oral, sendo a veiculação hídrica a principal via. Infecções por *Giardia* e *Cryptosporidium* podem resultar em óbito, especialmente quando em pacientes imunossuprimidos (ORTEGA-PIERRES et al., 2009b).

Tais parasitas possuem expressiva importância epidemiológica devido ao seu significativo potencial zoonótico, distribuição cosmopolita, amplo número de hospedeiros susceptíveis, grande variabilidade genética, fácil disseminação e significativa resistência ambiental (CACCIÒ et al., 2005; ORTEGA-PIERRES et al., 2009b, a; FAYER; SANTÍN; MACARISIN, 2010).

Muitos dos estudos precedentes consideravam os animais silvestres importantes reservatórios para a giardiose (ou giardíase) e para a criptosporidiose humanas (ATWILL et al., 1997; BAJER; BEDNARSKA; SINSKI, 1997; ABD EL-WAHED; SALEM; EL-ASSALY, 1999). Todavia, recentes pesquisas referentes à epidemiologia molecular dos agentes estão provocando nítidas mudanças neste cenário. Estudos têm demonstrado certa especificidade por hospedeiros para

isolados de *Giardia* e *Cryptosporidium* por meio da caracterização molecular, que sugere que animais silvestres podem albergar tanto espécies zoonóticas, quanto genótipos espécie-específicos dos parasitas (HEITMAN et al., 2002; ZHOU et al., 2004; APPELBEE; THOMPSON; OLSON, 2005; XIAO; FAYER, 2008).

No contexto zoonótico, a influência antrópica no ambiente tem sido constantemente citada como um potencial fator de transmissão cruzada de patógenos entre animais silvestres, domésticos e o próprio homem; e um manejo inadequado destas e outras enfermidades poderia resultar em desconhecimento de quais são os animais reservatórios e de todos os fatores envolvidos no ciclo epidemiológico dos patógenos potencialmente zoonóticos (GRACZYK, 2002).

Apesar da abundante literatura a respeito da ocorrência e caracterização molecular dos referidos protozoários em hospedeiros humanos e em animais domésticos, pouco se sabe sobre o papel da fauna silvestre na manutenção e disseminação de tais agentes (APPELBEE; THOMPSON; OLSON, 2005; THOMPSON; LYMBERY; SMITH, 2010). Ainda mais escassas são as pesquisas quanto aos aspectos ecológicos capazes de influenciar a infecção, como diferentes habitats e condições ambientais, características do ambiente cativo, hábitos alimentares e comportamentais de espécies hospedeiras e, sobretudo, quanto a aspectos decorrentes da tênue interface observada atualmente entre humanos, animais domésticos e espécies silvestres. Deste modo, estudos epidemiológicos com uma perspectiva ecológica poderiam contribuir no esclarecimento dos mecanismos por meio dos quais os parasitas ocorrem em determinados ecossitemas (ZIEGLER et al., 2007b; FENG, 2010).

A carência de informações sobre o envolvimento de espécies silvestres na transmissão das protozooses giardiose e criptosporidiose, assim como a crescente demanda de pesquisas na área de medicina da conservação, justificam a necessidade da investigação científica a respeito das relações parasitárias entre estes protozoários, hospedeiros humanos, animais domésticos e a fauna neotropical.

OBJETIVOS

Alouatta caraya
ADA, PCH Anhanguera
Imagem: Renata C. F. Santos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter informações de natureza epidemiológica por meio da identificação e caracterização molecular de isolados de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. procedentes de amostras fecais de mamíferos neotropicais *in situ* e *ex situ*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar a ocorrência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em diferentes populações de mamíferos neotropicais;
- ✓ Efetuar a caracterização molecular dos protozoários isolados de amostras fecais de mamíferos silvestres e verificar suas relações filogenéticas;
- ✓ Avaliar, por meio da caracterização molecular, o potencial zoonótico dos isolados destes enteroparasitas encontrados em animais da mastofauna;
- ✓ Verificar relações entre variáveis como espécie hospedeira, habitat, guilda trófica, utilização espacial do ambiente, características do ambiente cativo e interface com humanos e espécies domésticas para a ocorrência dos referidos protozoários;
- ✓ Produzir informações capazes de contribuir para a promoção da saúde pública, animal e ambiental e promover subsídio técnico-científico para motivação e desenvolvimento de futuros projetos nesta mesma linha de pesquisa.

REVISÃO DE LITERATURA

Blastocerus dichotomus
Fazenda Nhumirim, EMBRAPA Pantanal
Imagem: Renata C. F. Santos

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 DIVERSIDADE DA MASTOFAUNA BRASILEIRA

O Brasil, como país megadiverso, abriga cerca de 680 espécies nativas de mamíferos silvestres, número este que deve aumentar nas mesmas proporções com as quais se desenvolvem as metodologias para pesquisas e inventários faunísticos (REIS et al., 2011).

De acordo com Reis, Peracchi e Santos (2008) e Reis et al. (2011), estas espécies estão distribuídas em 12 diferentes ordens, sendo elas: **Didelphimorphia** (cuícas e gambás; 55 espécies), **Sirenia** (peixe-boi; duas espécies), **Cingulata** (tatus; 11 espécies), **Pilosa** (tamanduás e preguiças; oito espécies), **Primates** (macacos; 111 espécies), **Lagomorpha** (coelhos e lebres; somente uma espécie nativa), **Chiroptera** (morcegos; 172 espécies), **Carnivora** (canídeos, como cachorro-do-mato, lobo-guará, raposa-do-campo; felídeos, como onça, jaguatirica e gato-do-mato; procionídeos, como quati e mão-pelada; mustelídeos, como furão, lontra, irara; totalizando 28 espécies), **Perissodactyla** (anta; uma espécie), **Artiodactyla** (cateto, queixada e veados; 13 espécies), **Cetacea** (baleias e golfinhos; 42 espécies) e **Rodentia** (ratos, cutia, preá, capivara, paca; a mais abundante, com 243 espécies).

Tais ordens ocorrem de forma heterogênea em diferentes ambientes e biomas no território nacional. De acordo com dados do Ministério do Meio Ambiente (BRASIL, 2010), Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal, Amazônia, Caatinga e Campos Sulinos compreendem os seis biomas terrestres brasileiros (Figura 1), e estão na Amazônia e na Mata Atlântica as maiores diversidades de espécies da mastofauna (311 e 250 espécies, respectivamente) (REIS et al., 2011). A Amazônia corresponde, ainda, ao bioma que apresenta maior taxa relativa de endemismos (55,9%). O Cerrado é o terceiro bioma em número de espécies (195), seguido pela Caatinga (148), Pantanal (132) e Campos Sulinos (102) (REIS et al., 2011).

Fonte: Adaptado de Brasil (2010)

Figura 1 – Distribuição geográfica dos biomas terrestres brasileiros no território nacional segundo o Ministério do Meio Ambiente – São Paulo - 2011

A diversidade de espécies de mamíferos silvestres e a abundância de diferentes paisagens no território nacional possibilitam a ocorrência de uma grande variedade de hábitos alimentares, comportamentais e estratégias de uso do habitat característicos a cada espécie da fauna. Isto é resultante de uma gama de atributos ambientais, bióticos e abióticos, que tendem a favorecer a sobrevivência de dada espécie no meio (REIS; PERACCHI; SANTOS, 2008; REIS et al., 2011), bem como são capazes de influenciar direta ou indiretamente no aparecimento, manutenção e adaptação de patógenos no ecossistema (PAVLOVSKY, 1966).

3.2 ZOONOSES E ANIMAIS SILVESTRES: MEDICINA DA CONSERVAÇÃO

Como doenças ou infecções naturalmente transmissíveis entre animais vertebrados e o homem, as zoonoses podem estar associadas ao ambiente silvestre, rural ou urbano, envolvendo ampla variedade de mecanismos de transmissão e disseminação de patógenos (MARVULO, 2007).

Diferentes abordagens acerca das inter-relações entre humanos, animais domésticos e a fauna silvestre corroboram com a hipótese de que a influência antrópica corresponde a um importante fator para a transmissão de diferentes

patógenos entre hospedeiros na atualidade, influenciando de uma forma geral a saúde humana e animal, bem como a saúde ambiental (TABOR, 2002; MANGINI; SILVA, 2007).

Neste contexto, uma série de mecanismos poderia justificar a disseminação de agentes patogênicos em determinadas populações, sendo a perda do habitat natural (para a monocultura, fragmentação ou pecuária) e o estreitamento da interface entre hospedeiros humanos, animais domésticos e silvestres os mais relevantes (DASZAK; CUNNINGHAM, 2002; EPSTEIN, 2002).

Na medicina de animais silvestres, sabe-se que o ambiente cativo, por uma série de quesitos, propicia a transmissão de agentes patogênicos entre indivíduos, sendo o estresse causado pela manutenção em cativeiro considerado o mais relevante fator para tal condição, especialmente por provocar expressiva imunossupressão (MARVULO, 2007).

Em paralelo, alterações de origem antrópica no ambiente natural poderiam, da mesma forma, provocar estresse e imunossupressão em espécies de vida livre, assim como propiciar a adaptação de patógenos à diferentes situações e organismos hospedeiros (DASZAK; CUNNINGHAM, 2002; MANGINI; SILVA, 2007), e um manejo inadequado desta realidade poderia resultar no desconhecimento dos fatores envolvidos no ciclo epidemiológico dos patógenos zoonóticos (GRACZYK, 2002).

O desenvolvimento de estudos na área de medicina da conservação demonstra a importância de avaliar a dinâmica das zoonoses por uma perspectiva ecológica, frente a características físicas e biológicas do ambiente, dos hospedeiros envolvidos, bem como do agente etiológico (PAVLOVSKY, 1966; MANGINI; SILVA, 2007; THOMPSON; LYMBERY; SMITH, 2010).

3.3 PROTOZOÁRIOS COSMOPOLITAS: *Giardia* E *Cryptosporidium*

Giardia e *Cryptosporidium* são protozoários predominantemente gastroentéricos, de distribuição cosmopolita, capazes de acometer humanos, animais domésticos e copioso número de espécies silvestres, dentre mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes (ORTEGA-PIERRES et al., 2009b; FAYER; SANTÍN; MACARISIN, 2010; RYAN, 2010).

O gênero *Giardia* pertence ao Filo Sarcomastigophora, Subfilo Mastigophora, Classe Zoomastigophora, Ordem Diplomonadida e compreende o principal grupo de parasitas da Familia Hexamitidae (THOMPSON, 1994; SAMUEL; PYBUS; KOCAN, 2001; OLSON; OLSON; WALLIS, 2002).

O protozoário foi descrito pela primeira vez em 1681, pelo cientista holandês Anton Van Leeuwenhoek, ao examinar suas próprias fezes diarréicas em um simples aparelho de aumento por ele próprio criado. Em 1859, Wilhelm Duszan Lambl observou o protozoário em fezes diarréicas de crianças e novamente o descreveu, denominando-o *Cercomonas intestinalis*. Somente em 1882, o gênero *Giardia* foi cunhado, em homenagem ao biólogo francês Alfred Giard (SAMUEL; PYBUS; KOCAN, 2001; OLSON; OLSON; WALLIS, 2002).

As espécies de *Giardia* foram tradicionalmente denominadas com base na especificidade pelo hospedeiro (como *G. canis* parasitando cães, *G. cati* em gatos, *G. bovis* em bovinos) e, desta forma, numerosas espécies do protozoário foram relatadas ao longo dos anos. Em 1952, foi proposta e aceita uma diferenciação das espécies de *Giardia* conforme a morfologia de seus trofozoítos (principalmente relacionada ao formato de estruturas microtubulares centrais, os corpos medianos) (THOMPSON, 1994; SAMUEL; PYBUS; KOCAN, 2001).

Desta forma, o gênero foi dividido em três grupos principais: *1) Giardia agilis*, parasita de anfíbios cujo trofozoíto é de formato alongado, medindo de 20-30µm de comprimento por 4-5µm de largura, com corpos medianos estreitos e longos; *2) Giardia muris*, parasita de roedores, possivelmente de algumas aves, répteis e outros mamíferos, no qual o trofozoíto tem um formato arredondado (9-12µm de

comprimento por 5-7µm de largura), assim como seus pequenos corpos medianos; e *3) Giardia duodenalis* (sinonímia: *G. intestinalis, G. lamblia* e *G. enterica)*, parasita de uma ampla variedade de mamíferos silvestres e domésticos, incluindo o homem e possivelmente aves e répteis, e cujo trofozoíto tem o formato de pêra, medindo de 11-16µm de comprimento por 5-9µm de largura, com corpos medianos transversais ao maior eixo do trofozoíto. Neste último grupo, alvo de numerosos estudos recentes, concentrou-se o maior número das espécies anteriormente descritas (FEELY; ERLANDSEN, 1985; KASPRZAK; PAWLOWSKI, 1989; ADAM, 1991; SAMUEL; PYBUS; KOCAN, 2001).

O uso da microscopia eletrônica permitiu a detecção de outras características estruturais distinguíveis morfologicamente, proporcionando a descrição de: *4) Giardia psittaci*, parasita de aves, especialmente periquitos-australianos *Melopsittacus undulatus*, cuja morfologia se assemelha a *G. duodenalis*, exceto pela ausência da margem anterolateral do disco suctorial ventral; *5) Giardia ardea*, parasita de aves, especialmente garça-azul-grande *Ardea herodias*, com corpos medianos longitudinais ao maior eixo do trofozoíto e um flagelo caudal rudimentar; e *6) Giardia microti*, espécie proposta para os roedores cujos cistos apresentam dois trofozoítos inteiramente formados e na qual a avaliação molecular demonstrou características diferenças de *G. duodenalis* (ERLANDSEN; BEMRICK, 1987; FEELY, 1988; ERLANDSEN et al., 1990; SAMUEL; PYBUS; KOCAN, 2001; OLSON; OLSON; WALLIS, 2002).

A princípio, considerava-se o protozoário como um micro-organismo comensal do intestino delgado. Somente após a segunda metade do último século é que se notou sua importância clínica, sendo o gênero *Giardia* então reconhecido como um importante patógeno cosmopolita (OLSON; OLSON; WALLIS, 2002).

Atualmente, a expressiva maioria dos pesquisadores considera a existência de seis espécies do gênero *Giardia*: *G. agilis*, *G. ardeae, G. psittaci*, *G. duodenalis, G. microti* e *G. muris* (SAMUEL; PYBUS; KOCAN, 2001; OLSON; OLSON; WALLIS, 2002; ORTEGA-PIERRES et al., 2009b; FENG; XIAO, 2011). Todavia, existem relatos de uma espécie descrita unicamente em lagartos, *Giardia varani*, bem como se espera que peixes possuam espécie(s) exclusiva(s) para este grupo (FENG; XIAO, 2011).

Espécies do gênero *Cryptosporidium* são classificadas taxonomicamente como pertencente ao Filo Apicomplexa, Classe Coccidia, Subclasse Coccidiasina, Ordem Eucoccidiorida, Subordem Eimeriorina e como únicos representantes da Família Cryptosporidiidae. Estudos moleculares recentes sugerem que o organismo está mais intimamente relacionado à subclasse Gregarinia, parasitas de invertebrados, do que aos coccídios verdadeiros, de vertebrados (HIJJAWI et al., 2002; FAYER; XIAO, 2008; LINDSAY; BLAGBURN, 2008).

Relatado pela primeira vez em 1907, pelo médico norte-americano e parasitologista Ernest Edward Tyzzer (1875-1965), o protozoário foi encontrado em glândulas gástricas de camundongos de laboratório *Mus musculus* e detalhadamente descrito quanto às fases assexuada e sexuada de seu ciclo biológico (FAYER; XIAO, 2008). Seus aspectos morfológicos eram bastante semelhantes aos apresentados por J. Jackson Clarke, médico consagrado por seus estudos em neoplasia, em organismos também encontrados em glândulas gástricas de camundongos, muitos anos antes. O gênero recebeu o nome de *Cryptosporidium* em 1910, quando Tyzzer o classificou como um esporozoário, fez alusão a possíveis mecanismos de autoinfecção no hospedeiro e sugeriu a denominação da espécie descrita como *Cryptosporidium muris* (TYZZER, 1910; FAYER; XIAO, 2008). Em 1912, Tyzzer propôs uma nova espécie, *Cryptosporidium parvum*, cujos oocistos eram menores e a reprodução se dava somente no intestino delgado de diferentes espécies hospedeiras, como camundongos, ratos e coelhos. A primeira descrição em aves foi em 1929, pelo mesmo pesquisador, ao ilustrar diferentes estágios reprodutivos do protozoário no epitélio cecal de galinhas domésticas *Gallus gallus* (SRETER; VARGA, 2000; FAYER; XIAO, 2008).

Após anos sem avanços nos estudos do protozoário em decorrência da sua então considerada irrelevante importância clínica e econômica, em 1955, *Cryptosporidium* foi relatado como responsável por ocasionar doença e óbito em perus *Meleagris gallopavo* e, posteriormente, como agente causador de graves quadros de diarréia em bovinos *Bos taurus* (LINDSAY; BLAGBURN, 2008). Em humanos, foi mencionado pela primeira vez em 1976. Entretanto, a importância clínica e epidemiológica da criptosporidiose despontou somente anos depois, em meados de 1980, com a identificação do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o

reconhecimento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), cuja patogenia remete à imunossupressão e óbito comumente associado a enfermidades como a criptosporidiose. A partir de então, *Cryptosporidium* spp. tem sido relatado em crescente número de espécies hospedeiras, ora como responsável por infecção auto-limitante, ora como organismo altamente patogênico (XIAO et al., 2000b; FAYER; XIAO, 2008; ORTEGA-PIERRES et al., 2009b).

Atualmente, é reconhecida a ocorrência de aproximadamente 20 diferentes espécies e mais de 40 genótipos distintos de *Cryptosporidium*, dentre os quais é possível observar uma série de divergências quanto à especificidade por hospedeiros, sítio de replicação primária, morfologia, prevalência e patogenicidade (ORTEGA-PIERRES et al., 2009b; FAYER, 2010).

3.3.1 Ciclos biológicos

Giardia possui um ciclo biológico direto e bastante simples. Assim como *Cryptosporidium*, seu ciclo é monoxeno, ou seja, completa-se em um único hospedeiro. Como doença de transmissão fecal-oral, a série de eventos se inicia com a infecção do hospedeiro suscetível pela ingestão de cistos, principalmente por meio de alimentos ou água contaminados. Após exposição à acidez estomacal e ação de enzimas digestivas, ocorre fragilização da parede do cisto e consequente ruptura (processo de excistamento), liberando seu conteúdo que rapidamente se diferencia em dois trofozoítos. Estes se multiplicam por divisão binária (forma assexuada de reprodução) e colonizam a mucosa do intestino delgado proximal, na qual podem permanecer aderidos ao epitélio por meio do disco suctorial ventral. Em condições favoráveis, os trofozoítos iniciam o processo de encistamento, geralmente na porção proximal do intestino grosso. Os cistos formados são então eliminados nas fezes do hospedeiro, podendo permanecer viáveis no ambiente por mais de dois meses, sob apropriadas condições de temperatura e umidade (SAMUEL; PYBUS; KOCAN, 2001; OLSON; OLSON; WALLIS, 2002; ORTEGA-PIERRES et al., 2009b).

Detalhes do ciclo biológico de *Giardia* e os aspectos morfológicos dos cistos e trofozoítos podem ser visualizados na figura 2.

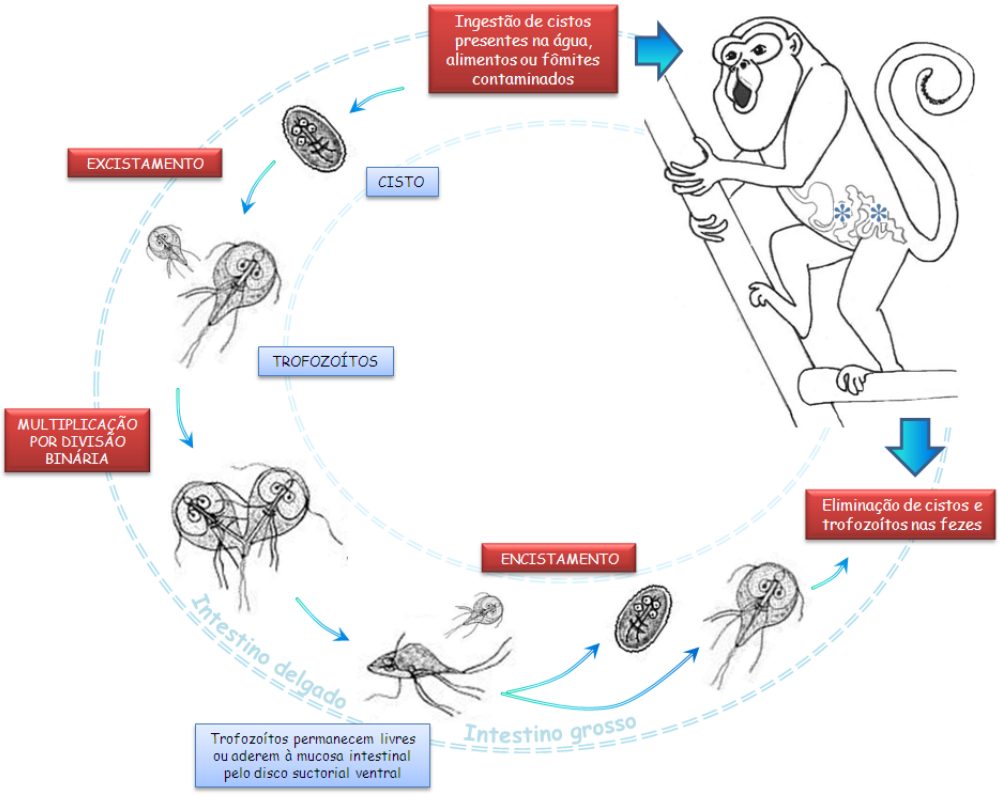


Ilustração: Renata Carolina Fernandes Santos

Fonte: Ilustração de Renata Carolina Fernandes Santos (2010), adaptada de Olson, Olson e Wallis (2002) e *Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern* (DPDx, 2010), *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC)

Figura 2 – Ciclo biológico de *Giardia* spp. – São Paulo – 2010

O ciclo biológico de *Cryptosporidium* é expressivamente mais complexo, apresentando duas fases bastante distintas entre si: uma fase assexuada (esquizogonia) e uma fase sexuada (singamia). Dá-se início ao ciclo com a ingestão do oocisto (forma infectante) pelo hospedeiro suscetível. O oocisto ingerido sofre rompimento (excistamento) e libera quatro esporozoítos. Os esporozoítos são carreados até a luz intestinal, onde, em contato com a superfície do epitélio, são englobados pelas microvilosidades, formando um vacúolo parasitóforo. Em seguida, diferenciam-se em trofozoítos, dando início ao processo de reprodução assexuada. São formados os merontes (ou esquizontes) de primeira geração, com oito merozoítos cada quando maduros. Os merozoítos liberados podem sofrer

desenvolvimento cíclico e dar origem a novos merontes de primeira geração, ou prosseguir o ciclo, originando merontes de segunda geração, com quatro merozoítos cada. *Cryptosporidium baileyi* apresenta, ainda, uma terceira geração de merontes, com oito merozoítos. Os merozoítos de segunda ou terceira geração são responsáveis pelo início da fase sexuada do ciclo biológico, diferenciando-se em microgametócitos e macrogametócitos, que formam microgametas e macrogametas, respectivamente. Ocorre então a fertilização e origina-se o zigoto, que irá se diferenciar em dois possíveis tipos de oocisto: oocisto de parede fina, que se mantém no organismo hospedeiro, sofre excistamento e é responsável pela auto-infecção (20%), e o oocisto de parede espessa (80%), que será eliminado nas fezes ou, menos frequentemente, nas secreções respiratórias (quando a infecção ocorre por inalação). Este tipo de oocisto, eliminado já na forma infectante, é altamente resistente em condições ambientais e poderá ser transmitido para um próximo hospedeiro por meio de água, alimentos ou fômites contaminados, dando início a um novo ciclo. A transmissão é, portanto, predominantemente fecal-oral, sendo a veiculação hídrica a principal via (DUBEY; SPEER; FAYER, 1990; SAMUEL; PYBUS; KOCAN, 2001; FAYER; XIAO, 2008; LINDSAY; BLAGBURN, 2008).

É importante ressaltar que o oocisto de *Cryptosporidium* não necessita do contato com enzimas digestivas ou sais biliares para que ocorra o excistamento, sendo este processo também decorrente da presença de receptores específicos no organismo do hospedeiro. Portanto, o coccídio pode completar seu ciclo em sítios extraintestinais, como no epitélio pulmonar, quando a infecção do hospedeiro ocorre por inalação de oocistos em suspensão (via menos comum) (FAYER; XIAO, 2008). Todavia, a presença de sais biliares e tripsina aumenta a porcentagem de excistamento (HIJJAWI et al., 2004; HIJJAWI et al., 2010).

Detalhes do ciclo biológico de *Cryptosporidium* e os aspectos morfológicos dos estágios evolutivos podem ser visualizados na figura 3.

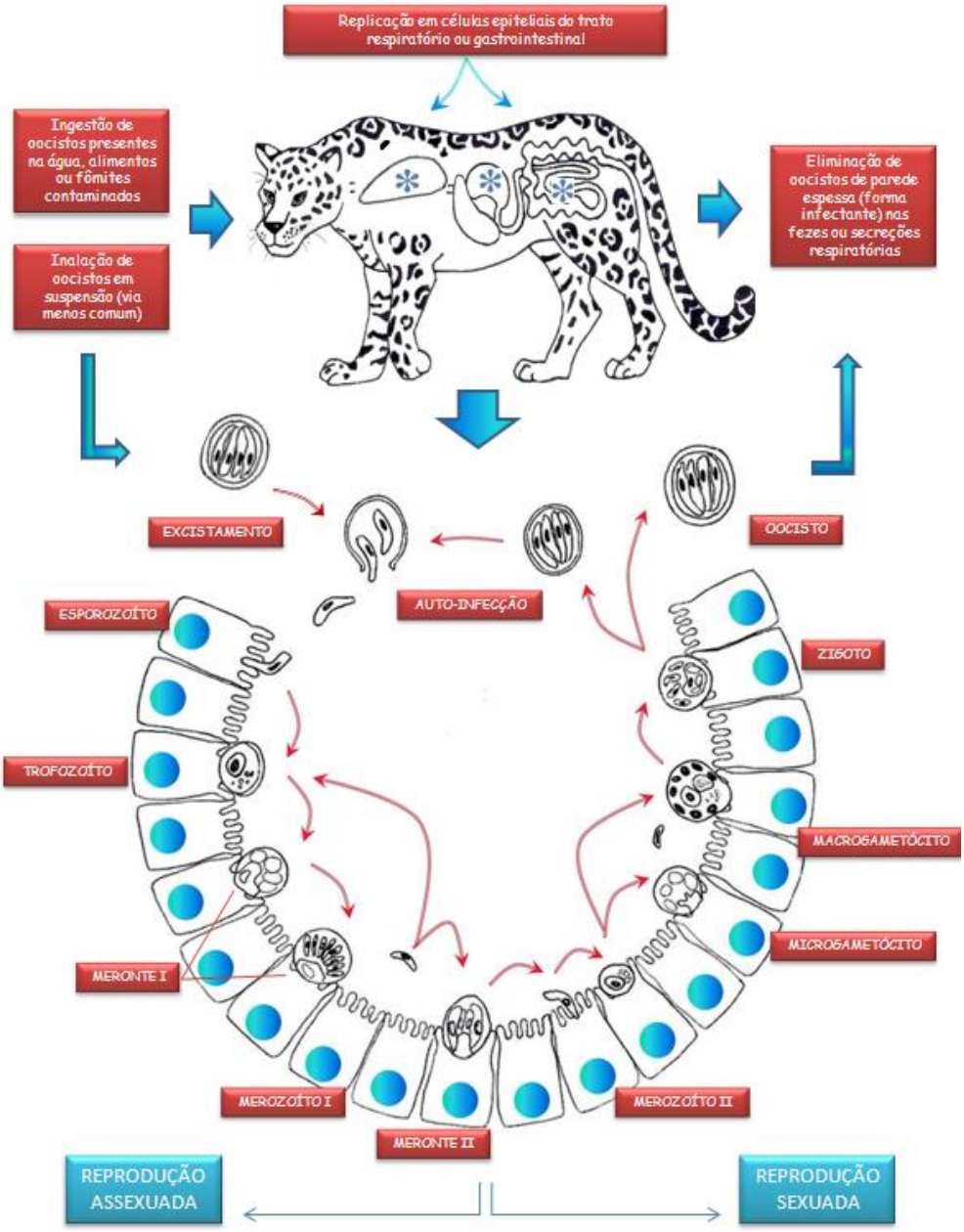


Ilustração: Renata Carolina Fernandes Santos

Fonte: Ilustração de Renata Carolina Fernandes Santos (2010), adaptada de Fayer e Xiao (2008)

Figura 3 - Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. – São Paulo – 2010

3.3.2 Aspectos clínicos e anatomopatológicos da infecção em mamíferos

Assim como em outras enfermidades de natureza infecciosa, as manifestações clínicas tanto da giardiose quanto da criptosporidiose estão intimamente relacionadas ao estado imune do hospedeiro, patogenicidade da

espécie infectante e concentração do agente no organismo. Indivíduos jovens e imunossuprimidos são sabidamente mais suscetíveis às doenças, que ocorrem com maior severidade e cujos períodos de duração das manifestações clínicas são mais extensos (SAMUEL; PYBUS; KOCAN, 2001; OLSON; OLSON; WALLIS, 2002; CHALMERS; DAVIES, 2010; FENG; XIAO, 2011). Em hospedeiros imunocompetentes, as protozooses geralmente se manifestam como gastroenterites agudas e de natureza auto-limitante, podendo inclusive ocorrer infecção assintomática, sendo esta bastante comum em espécies silvestres (SAMUEL; PYBUS; KOCAN, 2001; FAYER; XIAO, 2008; ORTEGA-PIERRES et al., 2009b).

A patogenia das referidas parasitoses, como processo de eventos desde a ingestão (via mais comum) do cisto/oocisto até a expressão morfofisiológica da doença, é principalmente decorrente da lise de células epiteliais do trato gastrointestinal do hospedeiro. A fisiopatologia envolve atrofia de vilosidades, apoptose de células do epitélio e diminuição ou destruição dos microvilos das células epiteliais do intestino, aumentando a permeabilidade intestinal e provocando má-absorção de eletrólitos e nutrientes. O resultado é a manifestação clínica das doenças, cujo principal sinal é a diarréia intermitente, predominantemente líquida e profusa, e consequente desidratação. Dor e distensão abdominal, vômito, má absorção, febre baixa, apatia, letargia, inapetência, perda progressiva de peso e anorexia são outras importantes manifestações clínicas das doenças (OLSON; OLSON; WALLIS, 2002; HUANG; WHITE, 2006; FAYER; XIAO, 2008; ORTEGA-PIERRES et al., 2009b; CHALMERS; DAVIES, 2010).

Em casos mais severos de criptosporidiose, pode ocorrer enterite, colite, cistite, hepatite, pancreatite e manifestações clínicas relacionadas à doença respiratória, como sinusite e pneumonia (CHALMERS; DAVIES, 2010). Doenças alérgicas e urticária já foram associadas à giardiose em humanos, equinos e aves e alguns autores sugerem que casos de atopia podem ser relacionados a esta protozoose (SAMUEL; PYBUS; KOCAN, 2001; KOSKI, 2002).

Algumas espécies silvestres ou grupos são aparentemente mais sensíveis à infecção pelos protozoários, manifestando sinais clínicos mesmo quando em indivíduos adultos e imunocompetentes. É o caso de chinchilas *Chinchilla lanigera,*

hamsters *Mesocricetus auratus* e primatas não-humanos (SAMUEL; PYBUS; KOCAN, 2001).

De uma forma geral, achados anatomopatológicos incluem hiperemia da mucosa intestinal e emaciação. Edema da parede cecal pode ser observado na criptosporidiose. Na giardiose, pode-se notar a presença de exsudato inflamatório catarral no intestino delgado (enterite catarral), presença de petéquias e de focos necróticos em mucosa e, eventualmente em serosa do intestino (OLSON; OLSON; WALLIS, 2002; FAYER; XIAO, 2008).

Descrições acerca das alterações microscópicas decorrentes da infecção por *Giardia* ou *Cryptosporidium* envolvem atrofia das vilosidades intestinais em variados graus, hiperplasia de células da cripta intestinal, presença de infiltrado inflamatório mononuclear em lâmina própria, degeneração de enterócitos, diminuição do comprimento das vilosidades intestinais e diminuição quantitativa de microvilos (FAYER; XIAO, 2008; ORTEGA-PIERRES et al., 2009b).

3.3.3 Epidemiologia molecular

Estudos relatam a ocorrência de significativa variedade genética em populações de *Giardia duodenalis,* caracterizando a espécie em sete grupos distintos, também denominados *assemblages* ou genótipos. Os mesmos são classificados de A a G, sendo os grupos A e B ainda subdivididos em AI, AII, BIII e BIV. Apenas esses genótipos (A e B), isolados em diversas espécies de mamíferos domésticos e silvestres, são detectados em humanos até o momento. Os genótipos C e D são isolados principalmente de canídeos domésticos e silvestres; o E é considerado o mais prevalente em animais de produção, sendo encontrado em ruminantes domésticos e suínos. O genótipo F somente foi isolado de gatos domésticos, até o presente momento, assim como o G, encontrado apenas em roedores (Quadro 1) (MONIS; THOMPSON, 2003; WIELINGA; THOMPSON, 2007; CACCIÒ et al., 2008; FENG; XIAO, 2011). Alguns autores sugerem, ainda, a ocorrência do genótipo H, procedente de mamíferos marinhos (FENG; XIAO, 2011).

Até o presente momento, apenas *G. duodenalis* genótipos A e B demonstraram ser potencialmente zoonóticos. A probabilidade de transmissão dos demais genótipos e espécies do gênero *Giardia* para humanos não está clara (ORTEGA-PIERRES et al., 2009b; FENG; XIAO, 2011).

Espécies / Genótipos	Referências	Hospedeiros
Giardia agilis	Kunstler, 1882	Anfíbios
Giardia ardea	Noller, 1920	Aves
Giardia psittaci	Erlandsen and Bemrick, 1987	Aves
Giardia microti	Benson, 1908	Roedores
Giardia muris	Benson, 1908	Roedores
Giardia duodenalis	Davaine, 1875	Mamíferos
Giardia duodenalis genótipo A	-	Homem e outros mamíferos domésticos e silvestres
Giardia duodenalis genótipo B	-	Homem, primatas não-humanos, cães, bovinos, equinos, roedores
Giardia duodenalis genótipos C e D	-	Canídeos
Giardia duodenalis genótipo E	-	Ruminantes domésticos, suínos
Giardia duodenalis genótipo F	-	Gatos domésticos
Giardia duodenalis genótipo G	-	Roedores

Fonte: Adaptado de Ortega-Pierres et al.(2009) e Feng e Xiao (2011)

Quadro 1 – Espécies e genótipos (*assemblages*) de *Giardia* spp., referências e seus respectivos hospedeiros suscetíveis – São Paulo - 2011

Para *Cryptosporidium* spp. são descritas atualmente mais de 20 espécies e 40 diferentes genótipos (Quadro 2) (ORTEGA-PIERRES et al., 2009b; FAYER, 2010). Com o decorrer dos anos, estudos demonstraram que é aparentemente significativa a especificidade por hospedeiros por parte do coccídio, sendo possível notar característica similaridade entre genótipos descritos em animais de grupos próximos, atributo mais evidente em mamíferos. É o caso dos genótipos relatados em canídeos silvestres, bastante semelhantes à espécie *Cryptosporidium canis*, de cães domésticos; e do genótipo de cervídeos e a espécie *Cryptosporidium bovis*, de bovinos (ZHOU et al., 2004; ORTEGA-PIERRES et al., 2009b). Contudo, espécies como *Cryptosporidium parvum* demonstram características contrárias a esta suposição, sendo capazes de infectar grande gama de hospedeiros e, deste modo,

representando a espécie de maior preocupação quanto à transmissão zoonótica do protozoário (DUBEY; SPEER; FAYER, 1990; FAYER; XIAO, 2008).

Espécies	Referências	Tamanho dos oocistos (média e intervalo), em µm	Sítio(s) primário(s) de replicação	Hospedeiros suscetíveis
Cryptosporidium parvum	Tyzzer, 1912	4.5 x 4.5	Intestino delgado	Homem, mamíferos domésticos e silvestres
Cryptosporidium scophthalmi	Alvarez-Pellitero et al., 2004	4.4 (3.7 - 5.0) x 3.9 (3.0 - 4.7)	Estômago, Intestino delgado	Peixes
Cryptosporidium hominis	Morgan-Ryan et al., 2002	5.2 (4.4 - 5.9) x 4.9 (4.4 - 5.4)	Intestino delgado	Homem, bovinos e outros mamíferos
Cryptosporidium andersoni	Lindsay et al., 2000	7.4 (6.0 - 8.1) x 5.5 (5.0 - 6.5)	Abomaso, estômago	Bovinos, homem
Cryptosporidium meleagridis	Slavin, 1955	5.2 (4.5 - 6.0) x 4.6 (4.2 - 5.3)	Intestino delgado	Aves, homem
Cryptosporidium serpentis	Brownstein et al., 1977; Levine, 1980; Tilley et al., 1990	2.8 x 3.6	Estômago	Répteis (especialmente serpentes)
Cryptosporidium canis	Fayer et al., 2001	5.0 (3.7 - 5.9) x 4.7 (3.7 - 5.9)	Intestino delgado	Canídeos, homem
Cryptosporidium felis	Iseki, 1979	5.0 x 4.5	Intestino delgado	Felídeos, homem
Cryptosporidium baileyi	Current et al., 1986	6.2 (5.6 - 6.3) x 4.6 (4.5 - 4.8)	Trato respiratório, bursa de Fabricius, cloaca	Aves
Cryptosporidium bovis	Fayer et al., 2005	4.9 (4.8 - 5.4) x 4.6 (4.2 - 4.8)	Intestino delgado	Bovinos
Cryptosporidium molnari	Alvarez-Pellitero e Sitja-Bobadilla, 2002	4.7 (3.2 - 5.5) x 4.5 (3.0 - 5.0)	Estômago	Peixes
Cryptosporidium galli	Pavlaseki, 1999; 2001; Ryan et al., 2003	8.3 (8.0 - 8.5) x 6.3 (6.2 - 6.4)	Proventrículo	Aves
Cryptosporidium muris	Tyzzer, 1910	5,5 x 7,4	Estômago	Roedores
Cryptosporidium suis	Ryan et al., 2004	4.6 (4.4 - 4.9) x 4.2 (4.0 - 4.3)	Intestino delgado, intestino grosso	Suinos, bovinos, homem
*Cryptosporidium varanii**	Pavlaseki et al., 1995; Pavlaseki e Ryan, 2008	4.8 (4.8 - 5.1) x 4.7 (4.4 - 4.8)	Estômago, Intestino delgado	Répteis (especialmente lagartos)
Cryptosporidium wrairi	Vetterling et al., 1971	5.4 (4.8 - 5.6) x 4.6 (4.0 - 5.0)	Intestino delgado	Porquinho-da-Índia *Cavia porcellus*
Cryptosporidium fragile	Jirku et al, 2008	-	Estômago	Anfíbios
Cryptosporidium fayeri	Ryan et al., 2008	-	-	Canguru-vermelho *Macropus rufus* e outros marsupiais
Cryptosporidium macropodum	Power e Ryan, 2008	-	-	Canguru-gigante *Macropus giganteus*
Cryptosporidium ryanae	Fayer et al., 2008	-	Intestino delgado	Bovinos
Cryptosporidium cuniculus	Inman e Takeuchi, 1979	-	-	Coelho-europeu *Oryctolagus cuniculus*, homem
Cryptosporidium nasoris	Hoover et al., 1981	-	-	Peixes
Cryptosporidium cichlidis	Paperna e Vilenkin, 1996	-	-	Peixes
Cryptosporidium reichenbachklinkei	Paperna e Vilenkin, 1996	-	-	Peixes
Cryptosporidium pestis	Slapeta, 2006 Slapeta, 2011	-	-	Homem, bovinos e outros mamíferos

*Sinonímia: *C. saurophilum*

Fonte: Adaptado de Fayer e Xiao (2008), Ortega-Pierres et al. (2009) e Fayer (2010)

Quadro 2 – Espécies de *Cryptosporidium* spp. descritas em literatura, respectivas referências, tamanho dos oocistos, sítio(s) primário(s) de replicação e hospedeiros suscetíveis – São Paulo - 2011

São reconhecidas 12 espécies de *Cryptosporidium* cujos hospedeiros são mamíferos, sendo elas: *C. andersoni*, *C. hominis*, *C. parvum*, *C. canis*, *C. felis*, *C. wrairi*, *C. suis*, *C. muris*, *C. bovis* e, mais recentemente, *C. fayeri*, *C. ryanae* e *C. macropodum* (FAYER; SANTÍN; TROUT, 2008; POWER; RYAN, 2008; RYAN; POWER; XIAO, 2008; ORTEGA-PIERRES et al., 2009b; FAYER, 2010). Foi recém-sugerida a classificação de *Cryptosporidium parvum* genótipo bovino como uma nova espécie: *Cryptosporidium pestis*; assim como a de um genótipo semelhante ao *Cryptosporidium hominis* como *Cryptosporidium cuniculus*, cujos hospedeiros seriam coelhos *Oryctolagus cuniculus* e humanos (ROBINSON et al., 2010; SLAPETA, 2011).

A classificação taxonômica de *Cryptosporidium* spp. sofre constantes adaptações ao longo dos anos em decorrência da descoberta de singulares características genotípicas, o que corrobora com as frequentes descrições de novas espécies por todo o mundo. Entretanto, para que um novo genótipo seja reconhecido como uma nova espécie do coccídio, devem ser seguidas as normas determinadas pelo *International Code for Zoological Nomenclature* (ICZN) e estudos minuciosos quanto a aspectos biológicos, informações acerca de infecções experimentais e dados morfométricos, além dos genotípicos, são fundamentais (FAYER; XIAO, 2008; ORTEGA-PIERRES et al., 2009b).

Assim sendo, considera-se que as espécies relatadas em humanos compreendem: *C. parvum, C. hominis, C. andersoni, C. canis, C. felis, C. meleagridis, C. muris* e *C. suis*, sendo *C. parvum* e *C. hominis* as mais comumente descritas neste hospedeiro (ORTEGA-PIERRES et al., 2009b).

3.3.4 Epizootiologia em mamíferos silvestres

Os valores encontrados na literatura para a ocorrência dos referidos protozoários em mamíferos silvestres são bastante variáveis. Não está claro se esta variação está relacionada às espécies envolvidas, localização geográfica, preferências alimentares, sazonalidade ou se seria um artefato decorrente das

técnicas de amostragem e diagnóstico utilizadas (APPELBEE; THOMPSON; OLSON, 2005). Autores sugerem que, de uma forma geral, a infecção é mais prevalente em países subdesenvolvidos e que os períodos do ano nos quais a ocorrência é maior são verão e outono (ORTEGA-PIERRES et al., 2009b).

Para infecções por *Giardia* spp. em espécies silvestres, nota-se que os valores relatados flutuam entre menos de 1% a até 100%, sendo mais comum em indivíduos mantidos em cativeiro, ambiente que, aparentemente, favorece a disseminação do parasita (SAMUEL; PYBUS; KOCAN, 2001). O protozoário já foi descrito em marsupiais, roedores, primatas, ungulados, felídeos, canídeos, ursídeos e em mamíferos marinhos (ORTEGA-PIERRES et al., 2009b).

Em um estudo retrospectivo, realizado por Santos et al. (2008) no sul do Brasil, foram colhidas ao longo de mais de 16 anos e avaliadas por meio de exames coproparasitológicos de centrífugo-sedimentação 4838 amostras fecais oriundas de animais silvestres mantidos em cativeiro. Obteve-se uma ocorrência total de apenas 1,7% para *Giardia* spp., sendo a maioria (91,46%) proveniente de mamíferos, representantes de 18 diferentes espécies. Animais da família Felidae foram os que apresentaram maior número de resultados positivos para *Giardia* spp., demonstrando, isoladamente, uma ocorrência de 3% (de um total de 994 amostras).

Já em estudo realizado com 131 amostras fecais de 57 diferentes espécies de mamíferos silvestres, obteve-se 29% de positividade para *Giardia* spp. A ocorrência foi considerada alta pelos autores. As amostras foram provenientes de animais assintomáticos mantidos em um zoológico na Croácia e o diagnóstico foi realizado por meio de microscopia de fluorescência, seguida de PCR e sequenciamento molecular. *G. duodenalis assemblages* A e C foram isolados em Artiodactyla, B em Primates, Rodentia e Hyracoidea e os *assemblages* A, B, C e D, bem como *Giardia microti*, em Carnivora (BECK et al., 2011).

Giardia duodenalis subgrupo AI (genótipo zoonótico) já foi isolado de animais da mastofauna brasileira, como onça-pintada *Panthera onca.* Em cachorro-do-mato *Cerdocyon thous* já foram detectados os genótipos C e D, predominantes dentre os isolados de cães domésticos. O mesmo estudo demonstrou a ocorrência do

genótipo BIV em amostras de bugios *Alouatta fusca* e chinchilas *Chinchila lanigera* (SOUZA, 2007; SOARES et al., 2011).

São comuns os relatos de giardiose em bugios, especialmente na espécie *Alouatta caraya*. Autores sugerem que populações de vida livre desta espécie poderiam servir como sentinelas da giardiose e, consequentemente, da saúde do ecossistema. Estudo realizado no norte da Argentina com 90 amostras de fezes de bugio-preto *Alouatta caraya* demonstrou uma alta ocorrência em animais de área rural (67%), áreas remotas da floresta nativa (57%) e áreas próximas a vilarejos (40%). A alta ocorrência nesses locais sugere que a espécie pode ser um importante reservatório do protozoário (KOWALEWSKI et al., 2011).

Volotão et al. (2008) descreveram a ocorrência de *Giardia* spp. em 28 bugios *Alouatta clamitans* mantidos em cativeiro no Brasil, sendo *Giardia duodenalis* genótipo AI isolado em todos os animais para os quais obteve-se produtos de PCR (16). Por se tratar de genótipo zoonótico do parasita, tal espécie de primata neotropical foi considerada pelos autores como um potencial reservatório do protozoário, podendo representar risco de contaminação ambiental e, consequentemente, à saúde pública.

A ocorrência de giardiose em carnívoros e em animais com hábitos coprofágicos é, também, relativamente comum, o que poderia ilustrar a possibilidade de ocorrer infecção alimentar, assim como sustentar a hipótese de que a auto-infecção é mais prevalente nestes animais (SAMUEL; PYBUS; KOCAN, 2001).

Quanto à infecção por *Cryptosporidium* spp. em mamíferos silvestres, a ocorrência do coccídio é geralmente baixa. Isto ocorre principalmente em populações de vida livre, nas quais gira em torno de 1% a 8%, podendo atingir valores inferiores a 1%. Em populações cativas, prevalências de até 74% já foram descritas (GRACENEA et al., 2002; FAYER; XIAO, 2008). Os relatos envolvem mais de 150 diferentes espécies, sendo que animais pertencentes às 12 ordens da classe Mammalia (Didelphimorphia, Sirenia, Cingulata, Pilosa, Primates, Lagomorpha, Chiroptera, Carnivora, Perissodactyla, Artiodactyla, Cetacea, Rodentia) de ocorrência nacional já foram descritos como hospedeiros (FAYER, 2010). A carga

parasitária tende a ser menor em mamíferos silvestres, quando comparada à infecção em mamíferos domésticos (FAYER; XIAO, 2008).

A criptosporidiose em mamíferos silvestres está, na maioria dos casos, relacionada à infecção por *C. parvum* ou genótipos bastante similares. *C. parvum* já foi descrito em espécies das ordens Artiodactyla, Perissodactyla, Rodentia, Didelphimorphia, Chiroptera e Primates (DUBEY; SPEER; FAYER, 1990; SAMUEL; PYBUS; KOCAN, 2001; FAYER; XIAO, 2008; NG et al., 2011). Primatas brasileiros, como sagui-do-tufo-branco *Callithrix jacchus*, macaco-aranha *Ateles belzebuth* e mico-de-cheiro *Saimiri sciureus* já foram relatados como hospedeiros (KINDLOVITS; KINDLOVITS, 2009). Cervídeos são aparentemente bastante suscetíveis às infecções por *C. parvum* e altas taxas de mortalidade e morbidade podem ocorrer (SAMUEL; PYBUS; KOCAN, 2001).

Em estudo desenvolvido com 471 amostras fecais de mamíferos selvagens, incluindo roedores, procionídeos, mustelídeos e canídeos capturados em Maryland, Estados Unidos, encontrou-se uma prevalência de 8% para *Cryptosporidium*, sendo a maioria destes pertencentes a genótipos específicos a cada espécie hospedeira. A única espécie encontrada que já teve descrição em humanos foi *C. canis*, detectado em um único canídeo (ZHOU et al., 2004).

Em roedores silvestres a ocorrência de *Cryptosporidium* varia entre 5 a 39,2% e, além de genótipos específicos para o táxon, já foram descritos *C. muris*, *C. meleagridis* e *C. parvum* (ORTEGA-PIERRES et al., 2009b). No Brasil, em estudo realizado com 145 amostras de fezes de capivaras *Hydrochoerus hydrochaeris* de vida livre, no estado de São Paulo, obteve-se 5,52% de positividade para o protozoário, sendo a espécie zoonótica *C. parvum* isolada em todos os casos (MEIRELES et al., 2007).

Um recente estudo desenvolvido com 445 amostras de fezes de elefantes *Loxodonta africana*, búfalos *Syncerus caffer* e impalas *Aepyceros melampus* no *Kruger National Park*, África do Sul, demonstrou maior prevalência para oocistos de *Cryptosporidium* em animais que habitam áreas adjacentes ao parque, próximas a propriedades rurais, quando em comparação aos animais de uma área central do parque (ABU SAMRA et al., 2011). Tais resultados poderiam sustentar a hipótese de

que a criptosporidiose em animais selvagens está intimamente relacionada a ambientes antropizados (APPELBEE; THOMPSON; OLSON, 2005; ABU SAMRA et al., 2011).

Quanto às possíveis influências do ambiente na ocorrência, disseminação e manutenção dos protozoários, estudos sugerem que o ambiente cativo propicia a transmissão cruzada de *Cryptosporidium* entre diferentes espécies hospedeiras (FENG, 2010). Uma pesquisa desenvolvida ao longo de um ano em um parque zoológico de Barcelona atribuiu a disseminação de *Cryptosporidium* à estrutura física de recintos, sugerindo que a transmissão primária da protozoose em cativeiro se dá em decorrência de indivíduos com infecção crônica, que mantêm o protozoário no ambiente e provocam sucessivas reinfecções em outros animais (GRACENEA et al., 2002).

Por outro lado, sabe-se que a contaminação ambiental com material fecal de humanos e animais domésticos é reconhecida como uma potencial via de transmissão para animais silvestres, colocando em risco, do mesmo modo, populações *in situ* (SAMUEL; PYBUS; KOCAN, 2001; APPELBEE; THOMPSON; OLSON, 2005; ORTEGA-PIERRES et al., 2009b).

3.3.5 Diagnóstico

O diagnóstico da infecção por *Giardia* e/ou *Cryptosporidium* em amostras clínicas pode ser realizado por uma grande variedade de métodos. Dentre os princípios básicos, estão: *a)* a detecção de resistentes formas infectantes eliminadas nas fezes do indivíduo parasitado, os cistos e oocistos; *b)* a detecção de outros estágios parasitários dos agentes, como trofozoítos (*Giardia*), merontes e gametócitos (*Cryptosporidium*), em cortes histológicos do hospedeiro; *c)* a detecção de características antigênicas do parasita, por meio de técnicas sorológicas; ou *d)* extração e amplificação de determinados fragmentos de DNA dos protozoários, por meio de técnicas moleculares (FISCHER et al., 1998; DRYDEN; PAYNE; SMITH, 2006; EL-NAGGAR et al., 2006; FAYER; XIAO, 2008; ORTEGA-PIERRES et al.,

2009b). Para tanto, podem ser avaliadas amostras de fezes ou de outros substratos biológicos, como soro, plasma, tecidos, aspirado duodenal, bile, saliva e secreções respiratórias. Todavia, os métodos diretos de diagnóstico utilizando amostras fecais são os mais amplamente utilizados (DRYDEN; PAYNE; SMITH, 2006; FAYER; XIAO, 2008; ORTEGA-PIERRES et al., 2009b).

Para o diagnóstico coproparasitológico dos referidos agentes, técnicas como centrífugo-flutuação em solução hipersaturada de sacarose (densidade específica de 1,205g/cm³) e outras técnicas de flutuação, como em solução de sulfato de zinco a 33% (densidade específica de 1,18g/cm³), são as mais indicadas, demonstrando maior sensibilidade analítica (GARDINER; FAYER; DUBEY, 1988; SRETER; VARGA, 2000; SAMUEL; PYBUS; KOCAN, 2001; FAYER; XIAO, 2008). Segundo McNabb, Hensel e Welch (1985); Santos (1999) e Bowman (2010), técnicas de sedimentação, como Hoffmann, Pons e Janer e centrífugo-sedimentação com formol-éter (ou método de Ritchie) também podem ser utilizadas. A microscopia de contraste de fase representa um importante método para a visualização de oocistos, sendo outra interessante ferramenta (SRETER; VARGA, 2000).

Técnicas de coloração específica são largamente aplicadas no diagnóstico microscópico de protozoários. Para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* são mais comuns as técnicas de Kinyoun, Ziehl-Nielsen, Giemsa, safranina azul de metileno e suas variáveis, capazes de diferenciar estruturas álcool-ácido resistentes, assim como as colorações negativas, como por verde-malaquita (GARCIA et al., 1983; MA; SOAVE, 1983; CASEMORE, 1991; EL NAGGAR et al., 1999; FAYER; XIAO, 2008; TULI et al., 2010). As soluções de iodo, como lugol, são amplamente indicadas para a coloração de cistos de *Giardia*. As colorações permanentes são utilizadas para a identificação de trofozoítos e, ocasionalmente, de cistos, sendo as mais utilizadas a hematoxilina férrica e a coloração tricrômica (BAKER; STROMBECK; GERSHWIN, 1987; SHETTY; PRABHU, 1988; EL-NAGGAR et al., 2006; BADPARVA et al., 2009).

Técnicas imunológicas são rotineiramente utilizadas na detecção de coproantígenos de *Cryptosporidium* e/ou *Giardia* e envolvem métodos de imunofluorescência direta, testes imunoenzimáticos (pelas técnicas de ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) (ROSENBLATT; SLOAN, 1993; WEITZEL

et al., 2006; RIMHANEN-FINNE et al., 2007), imunocromatografia (TZANETOU et al., 2003; PAPINI; CARDINI, 2006) e separação imunomagnética (COKLIN et al., 2011). A imunofluorescência direta com anticorpos monoclonais marcados com isotiocianato de fluoresceína consiste em uma das técnicas imunológicas mais largamente utilizadas, inclusive para amostras provenientes de animais silvestres (SAMUEL; PYBUS; KOCAN, 2001; ORTEGA-PIERRES et al., 2009b).

Contudo, métodos imunológicos de diagnóstico apresentam maior custo quando comparados às técnicas de microscopia, além de não oferecerem relevantes vantagens quanto às propriedades de sensibilidade e especificidade (GARCIA; SHIMIZU, 1997).

O emprego da análise molecular, em particular de métodos baseados na reação em cadeia pela polimerase (PCR), como *Nested* PCR, RFLP-PCR (*Random Fragment Length Polymorphism*), PCR em tempo real, PCR transcriptase reversa (RT-PCR), multiplex PCR, além da utilização de mini e microssatélites e da subsequente tipificação multilocus de sequências gênicas, oferece uma série de benefícios quando comparado aos demais métodos diagnósticos; sobretudo por permitir a caracterização molecular e consequente identificação dos agentes etiológicos em espécies e genótipos (WIELINGA; THOMPSON, 2007; FAYER; XIAO, 2008; ORTEGA-PIERRES et al., 2009b). Isto torna as técnicas moleculares fundamentais para o entendimento de processos epidemiológicos (ZHOU et al., 2004; APPELBEE; THOMPSON; OLSON, 2005).

Os genes empregados na amplificação molecular de isolados de *Cryptosporidium* spp. compreendem: gene codificador da menor subunidade do ácido nucléico ribossomal (SSU rDNA ou 18S rDNA) (JOHNSON et al., 1990; XIAO et al., 1999), e genes capazes de demonstrar maior polimorfismo entre diferentes espécies, como glicoproteína 60 (GP60) (ABE et al., 2006), actina (SULAIMAN; LAL; XIAO, 2002), proteínas de choque térmico (HSP70) (KHRAMTSOV et al., 1995) e proteínas da parede do oocisto (COWP) (XIAO et al., 2000a). A amplificação do gene SSU rDNA corresponde à mais indicada quando não se sabe que espécies de *Cryptosporidium* podem estar envolvidas na infecção (FAYER; XIAO, 2008; ORTEGA-PIERRES et al., 2009b).

Técnicas de PCR utilizadas na detecção de isolados de *Giardia* spp. são baseadas na natureza polimórfica das sequências de DNA dos genes da menor subunidade do DNA ribossomal (SSU rDNA) (CACCIÒ et al., 2008) e codificadores da glutamato desidrogenase (GDH) (MONIS, 1996), fator de elongação 1α (ef1α) (WIELINGA; THOMPSON, 2007), triosefosfato isomerase (TFI) (MONIS et al., 1999) e β-giardina (LALLE et al., 2005). Segundo Wielinga e Thompson (2007), o gene SSU rDNA não é indicado para inferências filogenéticas devido a seu reduzido polimorfismo e consequente baixa especificidade para genotipagem.

Em decorrência da riqueza de inibidores da PCR encontrados nas fezes, protocolos de purificação realizados previamente à extração de DNA, assim como adequadas técnicas de extração, contribuem para a maior sensibilidade da reação (FAYER; XIAO, 2008).

Considerando os atributos diagnósticos de todas as técnicas disponíveis atualmente, a abordagem polifásica baseada na utilização paralela de diferentes métodos compreende a melhor estratégia. Técnicas microscópicas permanecem como as mais indicadas para o diagnóstico *a priori*, devendo ser complementadas por métodos moleculares, que além de aumentarem consideravelmente a sensibilidade diagnóstica, permitem distinguir as espécies e genótipos dos agentes envolvidos na infecção (SCHUURMAN et al., 2007; KAUSHIK et al., 2008; ORTEGA-PIERRES et al., 2009b).

3.3.6 Importância da contaminação ambiental

Numerosos surtos das enfermidades giardiose e criptosporidiose decorrentes de contaminação ambiental já foram relatados por todo o mundo (ORTEGA-PIERRES et al., 2009b). O maior já descrito data de 1993, em Milwaukee, Wiscosin, quando mais de 400mil pessoas apresentaram quadros de diarréia em decorrência da ingestão de água contaminada por oocistos de *Cryptosporidium* (MAC KENZIE et al., 1994). Em paralelo, a giardiose, considerada uma das causas mais comuns de diarréia por protozoários no mundo, possui incidência em humanos subestimada em

500 mil novos casos a cada ano, sendo os surtos desta doença predominantemente atribuídos à contaminação de recursos hídricos (SAMUEL; PYBUS; KOCAN, 2001; ORTEGA-PIERRES et al., 2009b).

Os cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* não são inativados pelo processo de cloração comumente empregado no tratamento de água. Desta forma, a água proveniente da rede pública de abastecimento e as fontes e reservatórios de águas superficiais sem tratamento ou deficientemente tratadas constituem um importante fator de disseminação e manutenção destes agentes (SRETER; VARGA, 2000; OLSON; OLSON; WALLIS, 2002; FAYER; XIAO, 2008; RAZZOLINI; SANTOS; BASTOS, 2010). Práticas de manejo agropecuário e a configuração de redes de esgoto doméstico favorecem o carreamento do agente para cursos d'água, nos quais ocorre sua diluição e disseminação por longas distâncias (ORTEGA-PIERRES et al., 2009b).

Todas as espécies e genótipos dos protozoários em questão podem ser encontrados no ambiente. Entretanto, as espécies mais comumente isoladas são *C. parvum*, *C. hominis* e *C. andersoni* (XIAO et al., 2001; ORTEGA-PIERRES et al., 2009b), bem como os genótipos A e B de *Giardia duodenalis* (BAQUE et al., 2011; LIU et al., 2011), o que sugere que a principal fonte de contaminação ambiental seja o manejo inadequado de dejetos humanos e da produção animal. Tal fator pode ser relevante na transmissão zoonótica das protozooses e poderia representar uma importante fonte de infecção para animais silvestres (ORTEGA-PIERRES et al., 2009b).

3.3.7 Ecologia da relação entre parasitas e hospedeiros

Relações entre parasitas e hospedeiros podem ser mais bem compreendidas quando analisadas por uma perspectiva ecológica, especialmente quando envolvem animais silvestres. Tal ponto de vista permite observar como o ciclo biológico do parasita se completa em diferentes habitats e espécies hospedeiras, bem como

considera o organismo hospedeiro como o próprio habitat do parasita (BUSH et al., 2001a).

Segundo Mangini e Silva (2007), mudanças em condições ambientais podem influenciar a dinâmica das relações entre parasitas e hospedeiros, favorecendo o trânsito e a capacidade de adaptação de micro-organismos, processo denominado como "*spill-over*".

Em decorrência da longa coevolução entre parasita e hospedeiros, *Giardia* e *Cryptosporidium* aparentemente demonstraram alto nível de adaptação a diferentes espécies e ambientes (ORTEGA-PIERRES et al., 2009b).

Estudos relatam a grande probabilidade de ocorrer um tipo de especiação alopátrica nas populações do coccídio *Cryptosporidium*, por meio da qual barreiras geográficas favoreceriam o aparecimento de populações geneticamente distintas do protozoário (TANRIVERDI et al., 2008).

Neste contexto, estudos que considerem atributos biológicos e genotípicos dos parasitas, assim como condições ambientais e características particulares às espécies hospedeiras, permitem um melhor entendimento da dinâmica da transmissão de organismos patogênicos (GRENFELL; GULLAND, 1995; DASZAK; CUNNINGHAM, 2002; APPELBEE; THOMPSON; OLSON, 2005).

De acordo com as teorias propostas por Pavlovsky (1966), avaliar características físicas do habitat, como aspectos geográficos e estações climáticas, bem como características biológicas do ecossistema, como dinâmica populacional, nicho ecológico das espécies envolvidas no processo e localização de tais espécies na cadeia trófica, são de importância fundamental ao entendimento das relações entre parasitas e hospedeiros.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cerdocyon thous
Fazenda Nhumirim, EMBRAPA Pantanal
Imagem: Renata C. F. Santos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Segundo Appelbee, Thompson e Olson (2005) e Feng (2010), infecções por *Giardia* e *Cryptosporidium* têm sido relatadas em uma grande variedade de animais silvestres cativos e de vida livre por todo o mundo, especialmente em mamíferos. Dessa forma, estes poderiam representar o grupo de animais silvestres de maior relevância no contexto zoonótico da transmissão desses protozoários, motivo pelo qual se optou pela Classe Mammalia como alvo do presente estudo.

Com a finalidade de comparar diferentes variáveis consideradas epidemiologicamente e ecologicamente relevantes, foram selecionadas populações de mamíferos silvestres de vida livre (*in situ*) e populações mantidas em cativeiro (*ex situ*). Neste contexto, procurou-se amostrar espécies similares de ambas as populações.

No intuito de aumentar a abrangência do presente estudo no que se refere ao número de amostras positivas para os protozoários estudados, número de espécies de mamíferos silvestres amostradas e para avaliar o perfil de diferentes habitats e condições ambientais frente a tais protozoários oportunistas, foram determinadas sete diferentes áreas de estudo.

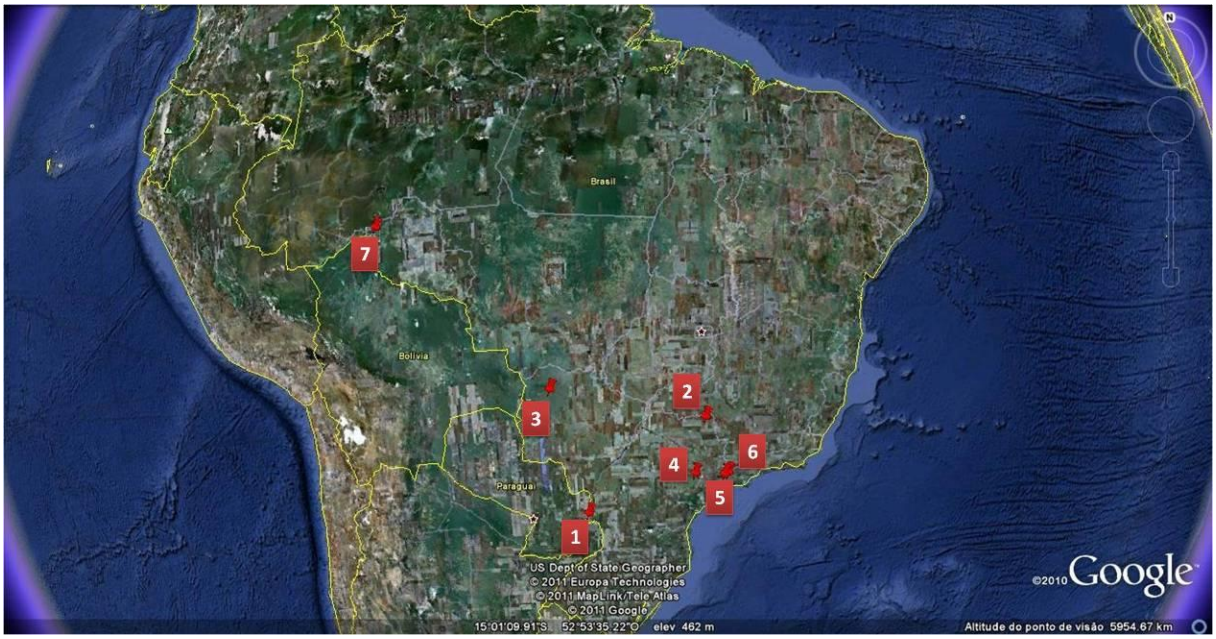
4.1 DESCRIÇÃO DAS ÁREAS DE ESTUDO

Os sete locais de coleta de amostras biológicas (fezes) procedentes de animais da mastofauna brasileira estão descritos e ilustrados a seguir (Figura 4).

Informações referentes às suas localizações geográficas e respectivos biomas podem ser visualizadas no quadro 3.

Locais de coleta	Municípios	Coordenadas geográficas	Bioma
Refúgio Biológico Bela Vista, ITAIPU Binacional	Foz do Iguaçu - PR	25°26´S e 54°33´W	Mata Atlântica
Área diretamente afetada, PCH Anhanguera	São Joaquim da Barra e Guará - SP	20°28´S e 47°52´W	Cerrado
Fazenda Nhumirim, EMBRAPA Pantanal	Corumbá - MS	18°48´S e 56°20´W	Pantanal
Fazenda Três Lagoas	Angatuba - SP	23°48´S e 48°41´W	Cerrado
Departamento de Patologia FMVZ - USP	São Paulo - SP	23°57´S e 46°54´W	Mata Atlântica
CRAS, Parque Ecológico do Tietê	São Paulo - SP	23°28´S e 46°30´W	Mata Atlântica
Margens do Rio Madeira	Abunã - RO	9°69´S e 65°35´W	Amazônia
Total > 7	7	-	4

Quadro 3 – Relação dos locais de coleta de amostras biológicas (fezes), respectivas localidades (municípios e coordenadas geográficas) e bioma brasileiro ao qual pertencem – São Paulo – 2011



Fonte: Google Inc. ©2010, Google Earth 5.1

Figura 4 – Imagem de satélite demonstrando a localização geográfica dos sete locais de coleta de amostras fecais para o presente estudo – São Paulo – 2011

1 = Refúgio Biológico Bela Vista, Itaipu Binacional, Foz do Iguaçu, PR
2 = Área diretamente afetada, PCH Anhanguera, São Joaquim da Barra e Guará, SP
3 = Fazenda Nhumirim, EMBRAPA Pantanal, Corumbá, MS
4 = Fazenda Três Lagoas, Angatuba, SP
5 = Departamento de Patologia FMVZ – USP, São Paulo, SP
6 = CRAS, Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, SP
7 = Margens do Rio Madeira, Abunã, RO

4.1.1 Áreas de coleta de amostras fecais de mamíferos silvestres *in situ*

Foram consideradas amostras biológicas provenientes de animais *in situ*:

a) aquelas coletadas de indivíduos encontrados em vida livre e procedentes da mastofauna de ocorrência natural de cada uma das regiões selecionadas para o estudo;

b) amostras coletadas de animais capturados *in situ*, entretanto encaminhados para ambiente cativo e mantidos em cativeiro por até dois dias. Tal metodologia foi adotada levando-se em conta o ciclo biológico dos protozoários em questão e seus respectivos períodos pré-patentes (espaço de tempo entre o momento em que ocorreu a infecção e a eliminação da forma infectante nas fezes) mínimos descritos em literatura (BEIER; SIDORENKO; GRIGOR'EV, 1995; DUPONT et al., 1995; CERTAD et al., 2007; FAYER; XIAO, 2008; BOWMAN et al., 2009; CHALMERS; DAVIES, 2010). Adotou-se o princípio de que animais capturados *in situ*, mantidos em cativeiro por até dois dias antes da coleta de fezes e positivos para *Cryptosporidium* spp. e/ou *Giardia* spp. em exame coproparasitológico, provavelmente tenham sido infectados em vida livre.

4.1.1.1 Área diretamente afetada (ADA) pela Pequena Central Hidrelétrica (PCH) Anhanguera, São Joaquim da Barra e Guará, SP

O eixo da PCH Anhanguera, com potência de 22,5 MW, foi construído no curso do Rio Sapucaí-mirim, entre os municípios de São Joaquim da Barra e Guará, nordeste do estado de São Paulo (20°28'S e 47°52'W), área na qual o bioma predominante é o Cerrado. Para a formação do reservatório, foram inundados aproximadamente 2,05km^2 de áreas ciliares com vegetação remanescente e terrenos agrícolas (Figuras 5 e 6). A ADA da PCH Anhanguera é caracterizada por floresta ciliar com estrutura já bastante alterada, geralmente com subosque pouco denso, abundância de lianas, dossel baixo e, menos frequentemente, com a

presença de algumas árvores emergentes (Figura 7). Ocorrem brejos com taboas, ciperáceas e gramíneas, geralmente restritas a pequenas manchas entre os demais tipos de vegetação. Caracteriza-se pela mata paludosa e pela floresta estacional semidecidual em suas partes mais elevadas.

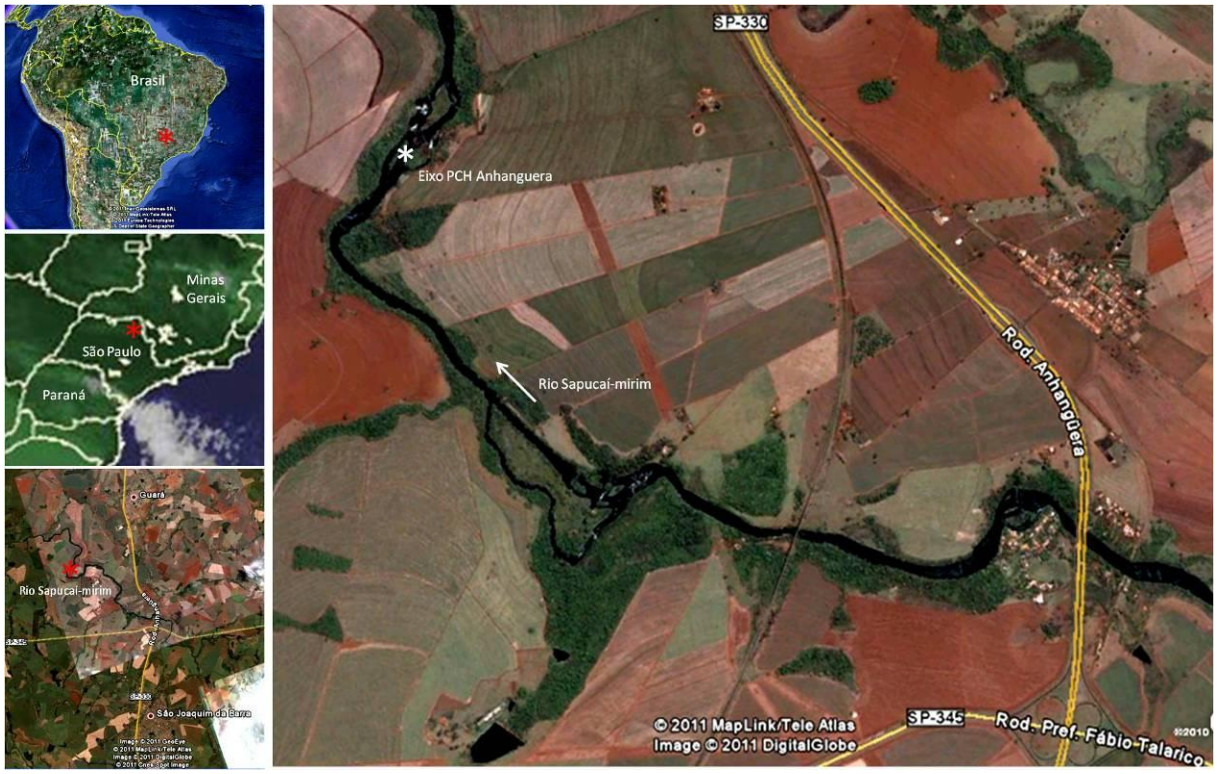
No Programa de Monitoramento e Conservação da Fauna de Vertebrados Terrestres da PCH Anhanguera, conduzido de dezembro de 2007 a março de 2010, foi realizado o monitoramento e resgate faunístico da área diretamente afetada pelo empreendimento, assim como de área controle e possíveis áreas para soltura da fauna residente resgatada. Constatou-se, com o monitoramento durante as estações seca e chuvosa de um ano completo, riqueza absoluta de 35 espécies pertencentes a nove diferentes famílias da Classe Mammalia, sendo a família mais abundante a Cricetidae (83,5%), seguida pela Didelphidae (13,8%). Os animais capturados durante este período foram submetidos à avaliação clínica, biometria, marcação individual e coleta de amostras biológicas para posterior destinação (Figura 8).

A influência antrópica na área (Figura 9) é principalmente decorrente das propriedades rurais e produção de cana-de-açúcar *Saccharum* sp., que ocupa grande extensão das áreas adjacentes.

4.1.1.2 Refúgio Biológico Bela Vista (RBV), Itaipu Binacional, Foz do Iguaçu, PR

A Itaipu Binacional mantém oito reservas e refúgios biológicos localizados no Brasil e no Paraguai. A área total protegida, que inclui mata nativa e trechos de reflorestamento, soma 41.039 hectares. O Refúgio Biológico Bela Vista (RBV) (25°26´S e 54°33´W), com área total de 1.920ha no bioma Mata Atlântica, é o maior dos localizados em território brasileiro.

Sabe-se que ampla variedade de espécies silvestres habita esta região e que suas áreas de uso abrangem os limites da empresa Itaipu Binacional, em Foz do Iguaçu, PR.



Fonte: Google Inc. ©2010, Google Earth 5.1

Figura 5 – Localização geográfica da área de estudo descrita no subitem 4.1.1.1, entre os municípios de São Joaquim da Barra e Guará, nordeste do estado de São Paulo. A área diretamente afetada (ADA) pelo empreendimento fica a montante do eixo da PCH Anhanguera (asterisco branco), abrangendo os fragmentos de mata nas margens do rio Sapucaí-mirim, até o cruzamento com a Rodovia Anhanguera (traço amarelo). A seta branca indica a direção do rio. Note as extensas áreas agrícolas adjacentes às áreas de mata (bioma Cerrado) – São Paulo - 2011

Fonte: www.celan.com.br

Figura 6 – Imagem aérea da Pequena Central Hidrelétrica (PCH) Anhanguera durante construção. Canteiro de obras (asterisco preto), eixo da barragem (asterisco branco) e área diretamente afetada (ADA) pelo empreendimento (setas pretas), na qual se realizou o monitoramento faunístico e coleta de amostras – São Paulo - 2011

Figura 7 – Rio Sapucaí-mirim (à esquerda) e supressão da vegetação no eixo da PCH Anhanguera (à direita). As áreas de mata compreendem a ADA da PCH Anhanguera – São Paulo – 2009

Figura 8 – Coleta de amostras fecais *in situ* na ADA da PCH Anhanguera. À esquerda, cuíca *Gracilinanus agilis* e, à direita, rato-do-mato *Oligoryzomys nigripes*, ambos defecando durante contenção física – São Paulo - 2009

Figura 9 – Imagens ilustrando a influência antrópica e a interface entre animais silvestres, humanos e animais domésticos na ADA da PCH Anhanguera. À esquerda, bugio-preto *Alouatta caraya* demonstrando-se habituado à aproximação humana. À direita, cachorro-do-mato *Cerdocyon thous* flagrado forrageando em área de plantio de cana-de-açúcar (acima) e cão doméstico *Canis familiaris* capturado acidentalmente em armadilha para carnívoros silvestres instalada na ADA – São Paulo - 2009

4.1.1.3 Fazenda Nhumirim, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Pantanal, Corumbá, MS

A Fazenda Nhumirim, cuja área abrange 4.310ha da sub-região da Nhecolândia, Pantanal do Mato Grosso do Sul (18º48´S e 56º20´W), corresponde ao campo experimental da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Pantanal. Distante aproximadamente 150km da cidade de Corumbá, MS, a fazenda apresenta fisionomia dominada por um mosaico de lagoas e cordilheiras, e compreende uma área de reserva ambiental de aproximadamente 680ha (Figura 10). A mudança na fisionomia da paisagem é marcante de acordo com a época do ano (períodos de seca e cheia).

O Pantanal é formado por grandes propriedades privadas, cuja economia é voltada principalmente para a exploração extensiva da pecuária de corte, introduzida na região em meados do século XVIII (DESBIEZ et al., 2011). Deste modo, é nítida a interação entre espécies domésticas e silvestres na área (Figura 11).

Sabe-se, com base em estudos de ocorrência, distribuição e abundância de mastofauna, que a área apresenta rica diversidade de mamíferos silvestres, sendo descritas para o bioma Pantanal aproximadamente 130 espécies de 28 diferentes famílias da classe Mammalia (RODRIGUES et al., 2002; REIS et al., 2011). Em um levantamento de médios e grandes mamíferos realizado especificamente na Fazenda Nhumirim, foi relatada a ocorrência de 20 diferentes espécies de 14 famílias, sendo *Nasua nasua* (quati) a espécie mais frequentemente observada nos censos diurnos e *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato) nos noturnos (ALHO et al., 1987).

Cabe ressaltar que a coleta de amostras nesta localidade ocorreu em período de seca (agosto/2010), nas quais o acesso à água pelos animais esteve restrito a pequenas baías naturais e piletas artificiais oferecidas pelos produtores ao gado (Figura 12).

Fontes: Google Inc. ©2010, Google Earth 5.1, EMBRAPA Pantanal e Renata C. F. Santos

Figura 10 – Localização geográfica e imagem aérea da Fazenda Nhumirim, campo experimental da EMBRAPA Pantanal, município de Corumbá, MS. À direita, área de reserva ambiental compreendida dentro dos limites da fazenda – São Paulo – 2010

Figura 11 – Interação entre homem, animais domésticos (bovinos, equinos, caninos) e animais silvestres (cervídeos, canídeos) na Fazenda Nhumirim, EMBRAPA Pantanal. À direita, cachorro-do-mato *Cerdocyon thous* alimentando-se de carcaça bovina – São Paulo - 2010

Figura 12 – Grupo de capivaras *Hydrochoerus hydrochaeris* próximo à baía natural (à esquerda) e quati *Nasua nasua* tentando utilizar a fonte artificial de água oferecida pelos produtores ao gado nos períodos de seca no Pantanal (à direita) – São Paulo – 2010

4.1.1.4 Margens do Rio Madeira, Abunã – RO

O Rio Madeira, cuja extensão total aproximada é de 3.315km, faz parte da bacia do Rio Amazonas e banha os estados de Rondônia e Amazonas. Em áreas próximas ao município de Abunã (9°69´S e 65°35´W), em Rondônia (bioma Amazônia), foram coletadas amostras de fezes de primatas neotropicais (Figura 13).

As coletas ocorreram predominantemente em regiões próximas às margens do Rio Madeira, em áreas de mata densa nas quais é possível visualizar algumas poucas moradias de ribeirinhos (Figura 14).

O material de referência destes espécimes encontra-se depositado no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), conforme licença de captura, coleta e transporte de material biológico do IBAMA n° 02001.006797/2008-30. Estas amostras foram cedidas ao Laboratório de Patologia Comparada (LAPCOM), do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

4.1.1.5 Fazenda Três Lagoas, Angatuba, SP

Localizada no município de Angatuba, região do Alto Paranapanema, centro-sul do estado de São Paulo, a Fazenda Três Lagoas (23°48´S e 48°41´W) representa uma região de agroecossistema, na qual sua área total, de 3.242ha, inclui 541ha de fragmentos remanescentes de Cerrado e 2.590ha de espécies exóticas, como *Brachiaria* sp. e *Eucalyptus* sp. (Figura 15). Sabe-se que, em decorrência da intervenção humana, espécies silvestres e domésticas coabitam a região.

Fonte: Google Inc. ©2010, Google Earth 5.1

Figura 13 - Localização geográfica da área de estudo descrita no subitem 4.1.1.4, próxima ao município de Abunã, RO, 212km da capital Porto Velho – São Paulo - 2011

Fonte: Marina Galvão Bueno (2010)

Figura 14 – Locais de coleta de amostras fecais procedentes de primatas neotropicais da região amazônica. À direita, macaco-barrigudo *Lagothrix* sp. *in situ* (acima) e habitação de ribeirinhos em frente a área de mata densa (abaixo), na margem do Rio Madeira, próximo ao município de Abunã, RO – São Paulo - 2010

Fonte: Alice de Oliveira (2010)

Figura 15 – Local de coleta de amostras descrito no subitem 4.1.1.5, no municípo de Angatuba, SP. Aspecto geral da Fazenda Três Lagoas (acima, à esquerda) e áreas de instalação de armadilhas de interceptação e queda (*pitfall*) em regiões de mata nativa (Cerrado) (acima, à direita) e de agroecossistema (abaixo) – São Paulo - 2011

4.1.1.6 Outras amostras

Foram coletadas amostras fecais de mamíferos silvestres recebidos para procedimento necroscópico no Departamento de Patologia (VPT), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP), bem como de indivíduos do Centro de Recepção de Animais Silvestres (CRAS), do Parque Ecológico do Tietê (PET), que gentilmente cedeu amostras ao presente estudo.

4.1.2 Áreas de coleta de amostras fecais de mamíferos silvestres *ex situ*

Foram consideradas amostras provenientes de animais *ex situ* aquelas coletadas de indivíduos mantidos em cativeiro há mais de dois dias, independente da procedência do animal (originário de cativeiro ou de vida livre). Amostras do mesmo indivíduo coletadas em momentos distintos, desde que com um intervalo mínimo de um mês entre as coletas, foram consideradas amostras diferentes.

4.1.2.1 Refúgio Biológico Bela Vista (RBV), Itaipu Binacional, Foz do Iguaçu, PR

Os trabalhos referentes ao manejo de fauna na Itaipu Binacional estão concentrados no Refúgio Biológico Bela Vista (RBV), localizado na margem esquerda do reservatório de Itaipu e no qual o Departamento de Fauna se divide em três setores: Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (CASIB); Zoológico Roberto Ribas Lange e complexo Hospital Veterinário – Quarentenário (Figura 16).

O Zoológico Roberto Ribas Lange (Figura 17) foi implantado em 2004 e está registrado na *categoria A* de jardins zoológicos, segundo a Instrução Normativa nº 04, de 04 de março de 2002, do IBAMA.

Criado inicialmente para o alojamento de espécimes provenientes da operação de resgate de fauna durante a construção da usina hidrelétrica, o CASIB teve seu registro no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) em 1988 e atualmente é considerado uma das principais instituições do país nas áreas de pesquisa e proteção de fauna silvestre nativa. Não é permitida a visitação pública ao Criadouro (Figura 18).

O Hospital Veterinário é destinado ao atendimento de animais silvestres mantidos no CASIB, Zoológico Roberto Ribas Lange e, sob a forma de apoio regional, a animais de outras instituições que necessitem de apoio diagnóstico e

atendimento especializado. Além disso, recebe animais de vida livre apreendidos e encaminhados pelas autoridades competentes, como IBAMA, Instituto Ambiental do Paraná (IAP) e Polícia Militar Ambiental (PMA).

Fonte: Google Inc. ©2010, Google Earth 5.1

Figura 16 – Localização geográfica do Refúgio Biológico Bela Vista, Itaipu Binacional, no município de Foz do Iguaçu, PR. A imagem maior ilustra a área construída do RBV, na qual está localizado o Departamento de Fauna, composto por Hospital Veterinário, Quarentenário, Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (CASIB) e Zoológico Roberto Ribas Lange, onde foram coletadas amostras de animais cativos. Na imagem menor (abaixo, à esquerda) é possível visualizar grande parte da extensão do RBV, onde foram coletadas amostras de animais de vida livre – São Paulo - 2011

Figura 17 – Recintos coletivos para mamíferos silvestres do Zoológico Roberto Ribas Lange, RBV, Itaipu Binacional. À esquerda, ilha para primatas neotropicais (macaco-prego *Cebus apella*) em frente ao recinto para Cervo-do-Pantanal *Blastocerus dichotomus* e tamanduá-bandeira *Myrmecophaga tridactyla*. À direita, recinto para anta *Tapirus terrestris*, capivara *Hydrochoerus hydrochaeris* e cateto *Pecari tajacu* – São Paulo – 2010

Figura 18 – Instalações do Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (CASIB). À direita, recinto ambientado para gato-maracajá *Leopardus wiedii* (seta) – São Paulo – 2010

4.1.2.2 Outras amostras

Fazem parte do presente estudo amostras procedentes de primatas neotropicais mantidos em cativeiro no Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) provisório (Figura 19), construído e sustentado pela empresa responsável pela instalação e operação da PCH Anhanguera, no município de Guará, SP.

Fontes: Elmer Alexander Genoy-Puerto (2009) e Thalita Calvi (2009)

Figura 19 – Grupo de bugio-preto *Alouatta caraya* mantido em cativeiro em Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) provisório, após captura *in situ* na ADA da PCH Anhanguera. À direita, indivíduo que veio a óbito após severo quadro clínico sugestivo de doença gastroentérica – São Paulo - 2009

Tais amostras foram coletadas e incluídas na avaliação em decorrência da observação de manifestações clínicas compatíveis com doença gastroentérica (diarréia, desidratação, emagrecimento, apatia) desenvolvidas pelos animais durante o período de observação em cativeiro, realizado previamente à destinação.

Parte dos indivíduos capturados e mantidos em cativeiro veio a óbito após poucos meses de observação (Figura 19). Nestes, foi realizado procedimento necroscópico e coleta de amostras para avaliação histopatológica.

4.2 PROTOCOLOS DE COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS FECAIS

As amostras fecais foram todas coletadas frescas, sempre priorizando a porção central do bolo fecal, sem contado direto com o ambiente.

A coleta das amostras oriundas de animais *in situ* foi decorrente de captura prévia com armadilhamento apropriado para cada grupo animal; encontro ocasional de amostras no solo, somente coletadas quando frescas e corretamente identificadas quanto à espécie animal a que pertenciam (sem envolver captura) (Figuras 26 e 27); ou provenientes de coletas durante exame necroscópico. Todas as atividades de captura e coleta de material biológico foram vinculadas a programas faunísticos regularizados pelos órgãos ambientais responsáveis, autorizadas por meio de documentação específica (Autorizações IBAMA n°159/2009, n°052/2008, n°053/2008; n°02001.006797/2008-30; SISBIO 23167-1; SISBIO 23167-2) e sob consentimento oficial das instituições envolvidas.

Quanto ao armadilhamento utilizado para captura de indivíduos em vida livre, foram empregados métodos direcionados aos grupos taxonômicos de interesse, sendo: armadilhas de interceptação e queda (AIQ), também denominadas *pitfalls*, e armadilhas metálicas (AM) do tipo *Sherman* e/ou *Tomahawk* para pequenos roedores e marsupiais; armadilhas do tipo guilhotina (AG) ou *Tomahawk* para mamíferos de médio porte; currais de captura para ungulados como Tayassuidae;

armadilhas de espera (AE) para primatas não humanos e espreita e perseguição para Dasypodidae (Figuras 20 a 24) (MANGINI; NICOLA, 2004).

Todas as amostras provenientes de mamíferos silvestres *ex situ* foram coletadas diretamente dos recintos em que os animais estavam alojados (Figura 25). Na impossibilidade de separar determinados animais mantidos em cativeiro em casais ou grupos, bem como animais de vida livre capturados na mesma armadilha, parte das amostras não pode ser particularizada, sendo avaliada como referente a um *pool* de determinados indivíduos da mesma espécie.

Em decorrência de expressivas diferenças metodológicas, a amostragem total foi subdividida em dois grupamentos distintos: *A* e *B*, descritos detalhadamente a seguir.

Grupo A: O *grupo A* refere-se à parte das amostras fecais das quais uma porção de aproximadamente 500µl foi armazenada *in natura* ou em pequena quantidade de água destilada, a -80°C, após diagnóstico microscópico positivo para *Cryptosporidium* spp. e/ou *Giardia* spp. (n=109). Estas amostras foram coletadas entre os anos de 2007 e 2010 no Refúgio Biológico Bela Vista, ITAIPU Binacional. O diagnóstico (descrito no subitem a seguir) foi realizado no Laboratório Ambiental, pertencente à própria Itaipu Binacional, que gentilmente cedeu estas amostras para o presente estudo.

Grupo B: Todas as demais amostras, referentes ao *grupo B*, foram coletadas ao longo dos anos de 2009 e 2011 e imediatamente acondicionadas em frascos coletores estéreis, preservadas em solução de dicromato de potássio a 2,5% ($K_2Cr_2O_7$) e refrigeradas a 4°C para armazenamento até a data de processamento, que ocorreu em um período máximo de dois meses após a coleta (SANTOS, 1999; LINDERGARD et al., 2003).

Fontes: Renata C. F. Santos (2009) e Thaís Guimarães Luiz (2009)

Figura 20 – Armadilha de interceptação e queda (AIQ) ou *pitfall*. As imagens à direita ilustram a captura de um exemplar de cuíca *Gracilinanus agilis* por meio deste método. ADA, PCH Anhanguera – São Paulo – 2009

Figura 21 – Armadilha do tipo *Tomahawk,* de desarme automático. À direita, exemplar de quati *Nasua nasua* capturado por meio deste método. Fazenda Nhumirim, EMBRAPA Pantanal – São Paulo - 2010

Figura 22 – Armadilha de espera (AE) para captura de primatas não humanos. À esquerda, gaiola de captura e, à direita, cabana para monitoramento. Desarme manual por meio de cordas. ADA, PCH Anhanguera – São Paulo – 2009

Figura 23 – Armadilha metálica do tipo *Sherman* instalada em subosque (à esquerda) e armadilha do tipo guilhotina (AG) instalada no solo (à direita), ambas de desarme automático. Note exemplar de cutia *Dasyprocta azarae* capturado em AG (à direita). ADA, PCH Anhanguera – São Paulo – 2009

Figura 24 – Curral de captura para Tayassuidae (à esquerda) e exemplar de cateto *Pecari tajacu* capturado por meio deste método (à direita), na Fazenda Nhumirim, EMBRAPA Pantanal – São Paulo – 2010

Figura 25 – Coleta de amostras fecais de mamíferos silvestres cativos do RBV, Itaipu Binacional. À esquerda, coleta de amostra proveniente de dois exemplares de mão-pelada *Procyon cancrivorus*, mantidos juntos no recinto (amostra de *pool*). À direita, imediato acondicionamento de amostra fecal em solução de dicromato de potássio a 2,5% – São Paulo - 2010

Figura 26 – Coleta de amostras fecais de mamíferos silvestres de vida livre por meio de encontro ocasional de amostras no solo, sem envolver captura, na ADA da PCH Anhanguera. À direita, amostra fecal fresca de bugio-preto *Alouatta caraya* – São Paulo - 2009

Figura 27 - Coleta de amostras fecais de mamíferos silvestres de vida livre por meio de encontro ocasional de amostras recentemente excretadas por capivaras *Hydrochoerus hydrochaeris* (seta), no RBV, Itaipu Binacional – São Paulo - 2010

4.3 DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO

O diagnóstico microscópico de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. das amostras do *grupo A,* efetuado no Laboratório Ambiental, Itaipu Binacional, foi realizado por meio de exames coproparasitológicos de sedimentação e por métodos de coloração específica.

As técnicas empregadas foram: sedimentação espontânea (método de Hoffmann, Pons & Janer) e método de centrífugo-sedimentação com concentração pelo formol-éter (método de Ritchie) (SANTOS, 1999; BOWMAN, 2010). Todas as amostras do *grupo A* foram analisadas por ambas as técnicas e o material final obtido para avaliação microscópica foi acrescido de corantes, sendo: coloração com lugol, para melhor visualização de cistos de *Giardia* spp., e coloração pela técnica de Kinyoun, que evidencia estruturas álcool-ácido resistentes, como os oocistos de *Cryptosporidium* spp.; conforme fluxograma representado na figura 28 (SANTOS, 1999; TULI et al., 2010). As amostras foram observadas em lâminas recobertas por lamínulas, em microscópio óptico de campo claro, sob aumento de 100x e 400x. Para as lâminas coradas pela técnica de Kinyoun, não foram utilizadas lamínulas e foi empregado, também, o aumento de 1000x.

Em caso de positividade para os referidos protozoários na avaliação microscópica, sendo esta por qualquer um dos protocolos descritos, aproximadamente 500µL do material fecal sedimentado pela técnica de Hoffmann, Pons & Janer foi armazenado em microtubos e acondicionado a -80°C. Considerando que o formol utilizado no método de Ritchie para fixação dos cistos/oocistos representa um importante inibidor de reações moleculares, o sedimento procedente desta técnica foi descartado.

As demais amostras (*grupo B*) foram processadas no Laboratório de Patologia Comparada de Animais Silvestres (LAPCOM), Departamento de Patologia (VPT), e/ou no Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS), ambos na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP).

Os exames coproparasitológicos para o *grupo B* de amostras foram realizados por meio da técnica de centrífugo-flutuação em solução hipersaturada de sacarose (d=1,205g/cm³), modificada de Fayer e Xiao (2008), conforme descrição a seguir: o preparo da solução de sacarose consistiu na mistura de três partes de uma solução "A" (sendo esta feita por meio da adição de 128g de açúcar refinado a 100 mL de água destilada e subsequente fervura até completa dissolução do soluto e obtenção de solução homogênea e transparente) para cada parte de água destilada. Após centrifugação da amostra fecal na solução de sacarose a 400*g* por 10 minutos, uma gota do sobrenadante foi observada em lâmina recoberta por lamínula de 1cm^2, em microscópio óptico de campo claro, sob aumento de 100x e 400x.

Para as amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. e/ou *Giardia* spp., foram realizadas lavagens das lâminas utilizadas na leitura com solução tampão TE (10mM TrisHCL pH8,0; 1mM EDTA pH8,0) para uma placa de Petri. O material lavado foi acondicionado em microtubo, ao qual foram acrescidos 50µL do sobrenadante da amostra em solução de sacarose e TE qsp 2ml. Os microtubos foram centrifugados a 12000*g* por cinco minutos e o sobrenadante foi descartado, mantendo-se 200µL da solução. Adicionou-se TE qsp 2ml, repetindo o protocolo de centrifugação e descarte do sobrenadante. Ao término, as amostras foram armazenadas a -20°C (Figura 29) (SOUZA et al., 2007; SEVÁ et al., 2011).

Além da avaliação coproparasitológica qualitativa (descrita acima), foi efetuada análise semiquantitativa para os protozoários estudados nas amostras do *grupo B*, sendo esta de acordo com Huetink et al. (2001) com modificações, conforme retratado no quadro 4.

Em paralelo, foi realizada avaliação qualitativa e semiquantitativa (utilizando os mesmos parâmetros para a contagem de ovos) de outros parasitas eventualmente visualizados durante a leitura das lâminas.

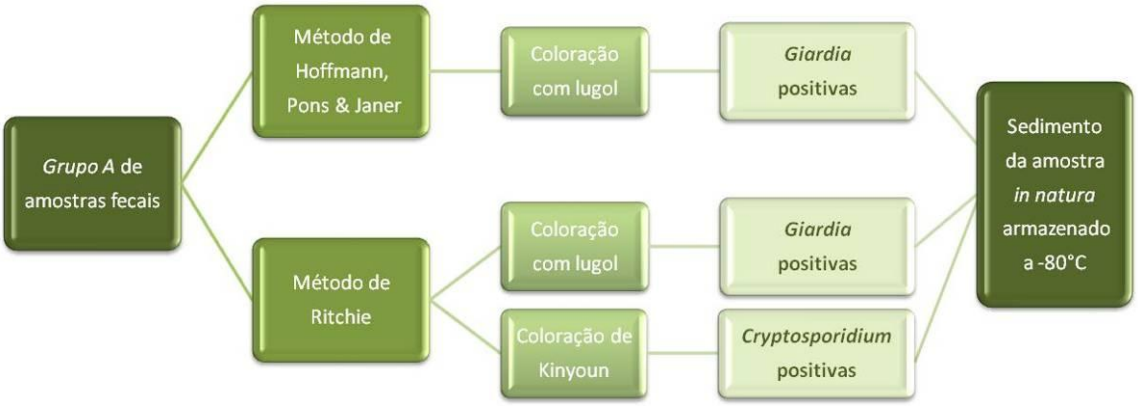


Figura 28 – Fluxograma do processamento de amostras fecais para diagnóstico microscópico de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. nas amostras do *grupo A* – São Paulo – 2011

Figura 29 - Fluxograma do processamento de amostras fecais para diagnóstico microscópico de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. nas amostras do *grupo B* – São Paulo – 2011

Escore	Número de cistos/oocistos
Negativo	Ausência de cistos/oocistos
+	1-5 cistos/oocistos por lâmina
++	6-25 cistos/oocistos por lâmina
+++	26-50 cistos/oocistos por lâmina
++++	>50 cistos/oocistos por lâmina

Fonte: Modificado de Huetink et al. (2001)

Quadro 4 – Parâmetros utilizados para avaliação semiquantitativa de cistos e oocistos dos protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. nas amostras fecais do *grupo B* – São Paulo - 2011

4.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

O diagnóstico molecular foi efetuado no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da FMVZ, USP, dos *Campi* de Pirassununga, SP e São Paulo, SP. Para tanto, foram adotadas seis diferentes metodologias, descritas a seguir como os métodos 1, 2, 3, 4, 5 e 7. Realizou-se, ainda, uma visita técnica à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Araçatuba, SP, onde foi possível submeter as amostras do *grupo A* positivas para *Cryptosporidium* spp. a um sétimo protocolo (método 6).

Todos os protocolos utilizados estão descritos a seguir.

4.4.1 Métodos de Extração de Ácido Nucléico (DNA)

As amostras do *grupo A* foram submetidas a diferentes técnicas de rompimento de oocistos e/ou cistos e purificação de DNA, descritas detalhadamente a seguir. Devido à pequena quantidade de material fecal disponível neste grupo, cada amostra foi submetida a até três protocolos de extração de DNA distintos.

Os cistos e oocistos concentrados e purificados, após lavagem das lâminas em solução tampão e referentes ao *grupo B* de amostras, foram submetidos à extração de ácido nucléico (DNA) pelo emprego de choque térmico, proteinase K e fenol / clorofórmio, protocolo descrito a seguir como método 7.

Em todos os métodos, água ultrapura autoclavada foi utilizada como controle negativo, sendo utilizado um microtubo contendo água para cada três microtubos com amostras fecais alvo do estudo.

Os diferentes métodos utilizados para extração de DNA foram:

a. **Método 1:** *Kit* de extração de DNA QIAGEN® (*QIAmp DNA Stool Mini Kit*)
b. **Método 2:** Choque térmico + *QIAmp DNA Stool Mini Kit*

c. **Método 3:** Proteinase K + Choque térmico + *QIAmp DNA Stool Mini Kit*

d. **Método 4:** Ácido taurocólico + *QIAmp DNA Stool Mini Kit*

e. **Método 5:** Ácido taurocólico + Choque térmico + *QIAmp DNA Stool Mini Kit*

f. **Método 6:** Choque térmico + Tiocianato de guanidina / Sílica

g. **Método 7:** Choque térmico + Fenol / Clorofórmio

a. **Método 1***: Kit* de extração de DNA QIAGEN® (*QIAmp DNA Stool Mini Kit*)

Aos aproximadamente 500µl de cada amostra acondicionada *in natura* a -80°C foi adicionado TE (10mM TrisHCL pH8,0; 1 mM EDTA pH8,0) qsp 1,5ml. As amostras foram centrifugadas a 12000*g* por cinco minutos e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, deu-se início ao protocolo do *kit* comercial QIAGEN® (*QIAmp DNA Stool Mini Kit*), conforme instruções do fabricante. Ao término, as amostras foram acondicionadas a -20°C (KAUSHIK et al., 2008).

b. **Método 2:** Choque térmico + *QIAmp DNA Stool Mini Kit*

Foram adicionados 1050µl do *buffer* ASL (solução de lise) do *kit* comercial QIAGEN® (DNA Stool Mini Kit) a uma quantidade de 150µl de cada amostra acondicionada *in natura* a -80°C. Os microtubos contendo as amostras e a solução tampão foram submetidos a congelamento em gelo seco seguido imediatamente por descongelamento a 99°C, por três vezes. Em seguida, deu-se continuidade ao protocolo do *kit* comercial, conforme instruções do fabricante. Ao término, as amostras foram acondicionadas a -20°C.

c. **Método 3:** Proteinase K + Choque térmico + *QIAmp DNA Stool Mini Kit*

Aos 500µl de amostra acondicionada *in natura* a -80°C foi adicionado TE qsp 1,5ml. As amostras foram centrifugadas a 12000*g* por cinco minutos e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 15µl de proteinase K (10µg/µL) aos

microtubos, incubados a 37°C por cinco horas. Em seguida, os microtubos foram submetidos a congelamento em gelo seco seguido imediatamente por descongelamento a 99°C, por cinco vezes. Foram acrescidos 15µl de proteinase K (10µg/µL) e os microtubos foram incubados a 37°C por mais cinco horas, seguidas por mais cinco sessões de congelamento e descongelamento. Em seguida, iniciou-se o protocolo do *kit* comercial QIAGEN® (DNA Stool Mini Kit), conforme instruções do fabricante. Ao término, as amostras foram acondicionadas a -20°C.

d. **Método 4:** Ácido taurocólico + *QIAmp DNA Stool Mini Kit*

As amostras acondicionadas *in natura* a -80°C foram ressuspendidas e foram pipetados 500µl do material, centrifugado a 10000*g* por cinco minutos. O sobrenadante foi desprezado e após agitação em vórtex, 50µl foram pipetados para novos microtubos, aos quais foram acrescidos 250µl de ácido taurocólico a 1,8%, atingindo concentração final de 1,5%. Após incubação no ácido taurocólico a 37°C por 12 horas, em agitação de 1000rpm por 15 segundos a cada cinco minutos, o material foi centrifugado a 15000*g* por cinco minutos e lavado com TE qsp 1,5ml. Depois de nova centrifugação e desprezado o sobrenadante, iniciou-se o protocolo do *kit* comercial QIAGEN® (DNA Stool Mini Kit), conforme instruções do fabricante. Ao término, as amostras foram acondicionadas a -20°C.

e. **Método 5:** Ácido taurocólico + Choque térmico + *QIAmp DNA Stool Mini Kit*

As amostras acondicionadas *in natura* a -80°C foram ressuspendidas e foram pipetados 500µl do material, centrifugado a 10000*g* por cinco minutos. O sobrenadante foi desprezado e após agitação em vórtex, 50µl foram pipetados para novos microtubos, aos quais foram acrescidos 250µl de ácido taurocólico a 1,8%, atingindo concentração final de 1,5%. Após incubação no ácido taurocólico a 37°C por duas horas, em agitação de 1000rpm por 15 segundos a cada cinco minutos, o material foi centrifugado a 15000*g* por cinco minutos e lavado com TE qsp 1,5ml. Depois de novamente centrifugado e desprezado o sobrenadante, foram adicionados 1,4ml do *buffer* ASL do *kit* comercial QIAGEN® (DNA Stool Mini Kit). Os

microtubos foram, então, submetidos a congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 37°C, por cinco vezes e, em seguida, deu-se continuidade ao protocolo do *kit* comercial, conforme instruções do fabricante, sendo a eluição final em 75µl do *buffer* AE. Ao término, as amostras foram acondicionadas a -20°C (FUNADA, 2009).

f. **Método 6:** Choque térmico + Tiocianato de guanidina / Sílica

Técnica descrita por Boom et al. (1990) e por Meireles et al. (2007) com adaptações, conforme descrição a seguir: o sedimento acondicionado *in natura* a -80°C foi diluído em 300µl de tampão de lise [(12,5% chelex 100® Bio-rad, Hercules, Califórnia, USA), 1% polivinilpirrolidona K-90 (USB, Cleveland, Ohio, USA), 10mM Tris-HCl, 10mM ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)] + 5µl de 20% dodecil sulfato de sódio (SDS) e vortexado vigorosamente. Os microtubos foram submetidos a congelamento em nitrogênio líquido, por um minuto, e descongelamento a 65°C, por três minutos, por cinco vezes. Em seguida, foram adicionados 20µl de proteinase K (25µg/µl), com incubação a 65°C, por duas horas, a 400rpm. Para remoção de proteínas e lipídeos, 1000µl de tampão L6 [0,1M Tris-Cl pH 6,4, 6M isotiocianato de guanidina (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA), 10mM EDTA (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA), 1% triton X-100)] foram adicionados à suspensão, que foi incubada por 10 minutos a 60°C, a 900 rpm, e em seguida centrifugada a 16100*g*, por cinco minutos, para remoção do chelex e dos debris. O sobrenadante foi recolhido e transferido para outro microtubo, ao qual foram adicionados 100µl de sílica (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), seguindo-se incubação em temperatura ambiente, por 10 minutos, com homogeneização periódica por inversão. Após esse período, os microtubos foram centrifugados a 16100*g*, por três minutos, e o sobrenadante foi descartado em seguida. A sílica presente no sedimento foi lavada por centrifugação a 12000*g*, por dois minutos, com 500µl de tampão L2 (0,1M Tris-Cl pH 6,4, 6M isotiocianato de guanidina) duas vezes, outras duas vezes com 500µl de 80% etanol e uma vez com 500µl de 100% acetona. O microtubo foi invertido para descarte da acetona e colocado em banho seco, a 58°C, por 10 minutos, com a tampa aberta, para evaporação da acetona restante no sedimento. Com o objetivo de recuperação

do DNA, 150µl de TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8,0) foram adicionados à sílica, com incubação por 10 minutos, a 58°C, sob agitação a 900 rpm. Após esse processo, as amostras foram centrifugadas a 16100*g*, por três minutos, e o sobrenadante foi transferido para outro microtubo, armazenado a –20°C.

g. **Método 7:** Choque térmico + Fenol / Clorofórmio

Foram adicionados ao sedimento presente em cada microtubo 90µL de uma solução de digestão (Tris-HCl 10mM; NaCl 100 mM; EDTA 25mM; SDS 1%) e 400µL de água ultrapura. A seguir, foram adicionados 10µl de proteinase K (10µg/µL) e as amostras foram incubadas por 12 horas a 37°C, com agitação de 1400rpm a cada quatro minutos. Após este período, os microtubos foram submetidos a cinco sessões de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 37°C, após as quais foram acrescidos mais 10µl de proteinase K (10µg/µL) e os microtubos foram submetidos a uma segunda incubação, esta por três horas a 37°C, com agitação de 1400rpm a cada quatro minutos. Uma segunda repetição do protocolo de congelamento e descongelamento (por cinco vezes), assim como uma terceira incubação em 10µl de proteinase K (10µg/µL) a 37°C, por 12 horas, foram realizadas. O produto da digestão foi purificado com uma solução de 500µL de fenol/clorofórmio, na proporção de 1:1. Após centrifugação a 12000*g* por cinco minutos, 400µL do sobrenadante foram transferidos para novos microtubos. Em seguida, foi adicionado à solução de DNA igual volume de propanol e a mistura obtida foi incubada durante 12 horas a temperatura de -20°C. Depois deste período, a solução alcoólica foi submetida à centrifugação a 12000*g* por 30 minutos, após a qual o sobrenadante foi descartado por inversão e os microtubos foram mantidos abertos sobre papel toalha por um minuto. Adicionou-se 800µL de etanol 70% e os microtubos foram centrifugados a 12000*g* por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão e os microtubos foram novamente mantidos abertos sobre papel toalha por um minuto, período após o qual foram acondicionados em banho-seco por 10 minutos a 37°C, com as tampas abertas, até completa secagem. O sedimento obtido foi suspenso em 30µL de TE (10mM TrisHCL pH8,0; 1 mM EDTA pH8,0) e incubado em banho-seco a 37°C por 10 minutos. O material extraído foi

mantido a uma temperatura de -20°C até o momento da amplificação (SAUNBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

4.4.2 Iniciadores (*primers*) utilizados nas reações de PCR e *Nested* PCR

Para as reações de PCR e *Nested* PCR, foram selecionados iniciadores (*primers*) capazes de amplificar regiões polimórficas de determinados genes, o que possibilita a diferenciação dos isolados obtidos entre espécies e genótipos dos protozoários estudados, após sequenciamento molecular.

Para isolados de *Cryptosporidium* spp., foram selecionados iniciadores específicos para a amplificação de fragmentos do gene codificador da menor subunidade do DNA ribossomal (SSU rDNA ou 18S rDNA), universal para organismos eucariontes (XIAO et al., 1999, 2000c, 2001; FAYER; XIAO, 2008).

Para as amostras do *grupo A* foram empregados os *primers* SSU-F2, SSU-R2, SSU-F3 e SSU-R3, descritos por Xiao et al. (1999, 2000c). Em parte das amostras (<25%), foi utilizado um segundo grupo de *primers*: SHP1, SHP2 e SHP3, recentemente desenhados pelos pesquisadores do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia (LABMAS) do VPS, FMVZ, USP, associados ao *primer* SSU-R3, de Xiao et al. (1999), para a reação secundária. As amostras do *grupo B* foram todas testadas para ambos os grupos de *primers*.

Os iniciadores utilizados para as reações de PCR e *Nested* PCR de isolados de *Cryptosporidium* spp. podem ser visualizados no quadro 5.

Para isolados de *Giardia* spp., foram utilizados genes codificadores da enzima glutamato desidrogenase (gdh) e β-giardina (CACCIÒ; DE GIACOMO; POZIO, 2002; LALLE et al., 2005; SOUZA et al., 2007), conforme descrito no quadro 6. Todas as amostras positivas para *Giardia* spp. na microscopia foram testadas para ambos os genes.

Gene alvo	Reação	*Primers*	Sequências	Tamanhos dos fragmentos (pb)	Referências
SSU rDNA	PCR	SSU-F2	5'-TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG-3'	~ 1300	Xiao et al. (1999)
		SSU-R2	5'-CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA-3'		Xiao et al. (2000)
	Nested PCR	SSU-F3	5'-GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG-3'	~ 800	Xiao et al. (1999)
		SSU-R3	5'-AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A-3'		
	PCR	SHP1	5'-ACC TAT AGC TTT AGA CGG TAG GGT AT-3'	~ 781	LABMAS/VPS/FMVZ/USP
		SHP2	5'-TTC TCA TAA GGT GCT GAA GGA GTA AGG-3'		
	Nested PCR	SHP3	5'-ACA GGG AGG TAG TGA CAA GAA ATA ACA-3'	~ 620	LABMAS/VPS/FMVZ/USP
		SSU-R3	5'-AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A-3'		Xiao et al. (1999)

Quadro 5 – *Primers* utilizados nas reações de PCR e *Nested* PCR para amplificação de fragmentos do gene codificador da menor subunidade do DNA ribossomal (SSU rDNA) de isolados de *Cryptosporidium* spp. e suas respectivas sequências, tamanhos dos fragmentos amplificados (em pares de bases) e referências – São Paulo – 2011

Gene alvo	Reação	*Primers*	Sequências	Tamanhos dos fragmentos (pb)	Referências
GDH	PCR	GDH-FI	5'-AAY GAG GTY ATG CGC TTC TGC CA-3'	~ 890	Souza et al. (2007)
		#579II	5'-GAT GTT YGC RCC CAT CTG RTA GTT C-3'		
	Nested PCR	GDH-FII	5'-ACT TCC TBG AGG AGA TGT GCA AGG A-3'	~ 560	
		#579II	5'-GAT GTT YGC RCC CAT CTG RTA GTT C-3'		
β-giardina	PCR	G7	5'-AAG CCC GAC GAC CTC ACC CGC AGT GC-3'	~750	Cacciò et al. (2002)
		G759	5'-GAG GCC GCC CTG GAT CTT CGA GAC GAC-3'		
	Nested PCR	bGiarF	5'-GAA CGA GAT CGA GGT CCG-3'	~510	Lalle et al. (2005)
		bGiarR	5'-CTC GAC GAG CTT CGT TGT T-3'		

Quadro 6 – *Primers* utilizados nas reações de PCR e *Nested* PCR para amplificação de fragmentos dos genes codificadores da glutamato-desidrogenase e β-giardina de isolados de *Giardia* spp. e suas respectivas sequências, tamanhos dos fragmentos amplificados (em pares de bases) e referências – São Paulo - 2011

4.4.3 Reações em Cadeia pela Polimerase (PCR e *Nested* PCR)

As amplificações pela PCR e *Nested* PCR foram realizadas para um volume final de 25µL. Para as reações primárias de amplificação (PCR), foram incluídos dois controles positivos, previamente testados, e dois controles negativos, constituídos

por água ultrapura autoclavada. Um terceiro controle negativo foi acrescido à amostragem para as reações secundárias de amplificação (*Nested* PCR). As condições utilizadas para as reações de amplificação primária e secundária estão descritas a seguir, de acordo com cada gene utilizado.

*4.4.3.1 Condições de amplificação: Gene SSU rDNA (*Cryptosporidium *spp.)*

Para amplificação do gene codificador da menor subunidade do DNA ribossomal de isolados de *Cryptosporidium* spp. cujo DNA foi extraído por meio dos métodos 1, 2, 3, 4, 5 e 7, descritos anteriormente, foram utilizados os seguintes reagentes e protocolos:

- ✓ 14,37µL de água ultrapura autoclavada
- ✓ 2,5µL de 10x PCR Buffer (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM; pH 9,0)
- ✓ 4µL de solução de dNTPs (1,25mM)
- ✓ 0,625µL de cada *primer* (senso e anti-senso) (10pmol/µL)
- ✓ 0,75µL de $MgCl_2$ (50mM)
- ✓ 0,13µL de Taq DNA polimerase (*Taq DNA polymerase platinum*, Invitrogen, CA, USA)
- ✓ 2µL de DNA extraído da amostra alvo

A *Nested* PCR foi realizada nas mesmas condições da PCR, entretanto com o emprego de um segundo par de *primers* (conforme descrito no quadro 5), e com 2µL do produto da primeira reação. Os parâmetros utilizados no termociclador para ambas as amplificações, tanto primária quanto secundária, foram:

- ✓ Desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos;
- ✓ Desnaturação a 94°C por 45 segundos;
- ✓ Hibridização dos *primers* a 55°C por 45 segundos;
- ✓ Extensão a 72°C por 60 segundos;

} 35 ciclos

- ✓ Extensão final a 72°C por sete minutos.

Para amplificação deste mesmo gene em isolados de *Cryptosporidium* spp. cujo DNA foi extraído pelo método 6, foram utilizados os seguintes reagentes e protocolos para a reação primária:

- ✓ 14,9µL de água ultrapura autoclavada
- ✓ 2,5µL de 10x PCR Buffer (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM; pH 9,0)
- ✓ 2µL de solução de dNTPs (1,25mM)
- ✓ 0,5µL de cada *primer* (senso e anti-senso) (10pmol/µL)
- ✓ 1,25µL de $MgCl_2$ (50mM)
- ✓ 0,1µL de Taq DNA polimerase (*Taq DNA polymerase platinum*, Invitrogen, CA, USA)
- ✓ 0,75µL de soroalbumina bovina (BSA)
- ✓ 2,5µL de DNA extraído da amostra alvo

Para a *Nested* PCR, foi utilizado o segundo par de *primers* (conforme descrito no quadro 5), 2,5µL do produto da primeira reação e o volume de soroalbumina bovina utilizado na reação primária foi substituído por água ultrapura autoclavada, totalizando 15,65µL desta. Os parâmetros utilizados no termociclador para ambas as amplificações foram:

- ✓ Desnaturação inicial a 95°C por três minutos;
- ✓ Desnaturação a 95°C por 45 segundos;
- ✓ Hibridização dos *primers* a 50°C por 45 segundos;
- ✓ Extensão a 72°C por 60 segundos;

} 35 ciclos

- ✓ Extensão final a 72°C por sete minutos.

4.4.3.2 Condições de amplificação: Gene GDH (Giardia spp.)

Para amplificação do gene codificador da enzima glutamato-desidrogenase (gdh) de isolados de *Giardia* spp., foram utilizados os seguintes reagentes e protocolos:

- ✓ 12,55µL de água ultrapura autoclavada

- ✓ 2,5µL de 10x PCR Buffer (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM; pH 9,0)
- ✓ 4µL de solução de dNTPs (1,25mM)
- ✓ 1,25µL de cada *primer* (senso e anti-senso) (10pmol/µL)
- ✓ 0,75µL de $MgCl_2$ (50mM)
- ✓ 0,2µL de Taq DNA polimerase (*Taq DNA polymerase platinum*, Invitrogen, CA, USA)
- ✓ 2,5µL de DNA extraído da amostra alvo

A *Nested* PCR foi realizada nas mesmas condições da PCR, entretanto com o emprego de um segundo par de *primers* (conforme descrito no quadro 6), e com 2,5µL do produto da primeira reação. Os parâmetros utilizados no termociclador para ambas as amplificações, tanto primária quanto secundária, foram:

- ✓ Desnaturação inicial a 95°C por três minutos;
- ✓ Desnaturação a 94°C por 30 segundos;
- ✓ Hibridização dos *primers* a 56°C por 30 segundos;
- ✓ Extensão a 72°C por dois minutos;

} 39 ciclos

- ✓ Extensão final a 72°C por cinco minutos.

4.4.3.3 Condições de amplificação: Gene β-giardina (Giardia spp.)

Para amplificação do gene codificador da β-giardina de isolados de *Giardia* spp., foram utilizados os seguintes reagentes e protocolos:

- ✓ 12,1µL de água ultrapura autoclavada
- ✓ 2,5µL de 10x PCR Buffer (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM; pH 9,0)
- ✓ 4µL de solução de dNTPs (1,25mM)
- ✓ 1,25µL de cada *primer* (senso e anti-senso) (10pmol/µL)
- ✓ 0,75µL de $MgCl_2$ (50mM)
- ✓ 0,15µL de Taq DNA polimerase (*Taq DNA polymerase platinum*, Invitrogen, CA, USA)
- ✓ 3µL de DNA extraído da amostra alvo

A *Nested* PCR foi realizada nas mesmas condições da PCR, entretanto com o emprego de um segundo par de *primers* (conforme descrito no quadro 6), e com 3µL do produto da primeira reação. Os parâmetros utilizados no termociclador para ambas as amplificações, tanto primária quanto secundária, foram:

- ✓ Desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos;
- ✓ Desnaturação a 94°C por 30 segundos;
- ✓ Hibridização dos *primers* a 60°C por 60 segundos;
- ✓ Extensão a 72°C por 60 segundos;

} 35 ciclos

- ✓ Extensão final a 72°C por sete minutos.

4.4.4 Análise dos produtos amplificados

Os fragmentos amplificados nas reações de *Nested* PCR foram visualizados por meio da técnica de eletroforese em gel de agarose a 2% em cuba horizontal, imerso em solução tampão Tris-Borato-EDTA (0,045 M Tris-Borato, 1mM EDTA, pH 8,0) e a uma voltagem adequada às dimensões do gel (1 a 10V/cm de gel).

Foram acondicionadas no gel alíquotas de 10µL da amostra amplificada juntamente com 2µL de corante (30% de glicerol, 0,25µL de azul de bromofenol). Após a corrida eletroforética, o gel foi imerso numa solução de brometo de etídeo a 0,5µg/mL durante 20 minutos para posterior observação em transluminador ultravioleta, permitindo a visualização dos produtos amplificados. As dimensões dos fragmentos amplificados foram comparadas a um padrão de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases (GeneRuler^{TM} 100pb DNA *ladder*) disposto no gel juntamente com as amostras analisadas.

4.5 SEQUENCIAMENTO MOLECULAR

4.5.1 Purificação dos produtos amplificados

Após a separação dos produtos de *Nested* PCR por eletroforese em gel de agarose 2%, as bandas de interesse foram eluídas do gel com o auxílio de *kit* comercial (Costar® Spin-X® *Centrifuge Tube Filter*, Pittston cat# 8160, *Corning Life Sciences*, NY, USA), seguindo as instruções do fabricante.

4.5.2 Reação de sequenciamento molecular

Após purificação dos produtos amplificados, alíquotas foram utilizadas para a reação de sequenciamento automático, para a qual foi usado o *kit* comercial *ABI Prism Big Dye TM Terminator – Cycle Sequencing Ready Reaction* (*Applied Biosystems*, CA, USA) (THOMAZ, 2006; ZIEGLER et al., 2007a).

Para uma reação de 10µL de volume final, foram utilizados para cada amostra: 0,5µL de *primer* (senso ou anti-senso) (10pM), 2µL de *BigDye Terminator* v.3.1, 2µL de *Tampão Save Money* 5x (200mM de Tris, 5mM de $MgCl_2$; pH 9,0) e 5,5µL da solução eluída do gel, contendo DNA purificado.

As reações de sequenciamento foram conduzidas em termociclador com o seguinte programa:

- ✓ Desnaturação inicial a 96ºC por 1 minuto;
- ✓ Desnaturação a 96º por 15 segundos;
- ✓ Hibridização a 50ºC por 15 minutos;
- ✓ Extensão a 60ºC por 4 minutos

} 39 ciclos

Os produtos da reação de sequenciamento foram mantidos a 4ºC até a precipitação, realizada com EDTA/etanol, conforme descrito a seguir.

4.5.3 Precipitação do produto amplificado

Foram adicionados a cada amostra 5µL de EDTA a 0,125mM e 60µL de etanol absoluto. Após homogenização, realizou-se incubação em temperatura ambiente e em local protegido da luz por 30 minutos. Em seguida, os microtubos foram centrifugados a 16000*g* por 30 minutos, em centrífuga refrigerada a 12°C. O sobrenadante foi descartado por inversão e foram adicionados 80µL de etanol 70% a cada microtubo, submetidos novamente à centrifugação a 16000*g* por 30 minutos, em centrífuga refrigerada a 12°C. O sobrenadante foi descartado por inversão e o sedimento foi seco em termobloco a 95°C por 10 minutos. Ao término, os microtubos foram armazenados a -20ºC.

4.5.4 Eletroforese de sequenciamento

Após a precipitação, as amostras foram homogenizadas com formamida e corante *Blue Dextran-EDTA* (*Apllied Biosystems*, USA) na proporção de 5:1, colocadas em banho-seco por 2 minutos a 94ºC para desnaturação, mantidas a 4°C por 2 minutos e submetidas à eletroforese em sequenciador automático modelo *ABI Prism® 377 DNA Sequencer* (*Applied Biosystems*, CA, USA).

4.5.5 Edição das sequências gênicas

A qualidade das sequênciais parciais e a união dos fragmentos sequenciados em suas respectivas zonas de intersecção foram obtidas com o auxílio dos programas *Phred* e *Phrap* incluídos na suíte *Codon Code Aligner* v.1.5.2 (*CodonCode Corp. Dedham*, MA, USA), assim como com os programas *Phred online* (http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/) e *BioEdit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999), proporcionando a montagem das sequências totais (contíguas) de cada marcador.

As sequências de nucleotídeos de cada fragmento amplificado foram alinhadas manualmente com o auxílio dos programas Clustal W (THOMPSON et al., 1997) e *BioEdit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999), tomando-se como base sequências homólogas disponíveis no *GenBank* (BLAST, 2011).

4.5.6 Inferências filogenéticas

A reconstrução filogenética das sequências obtidas foi inferida a partir da matriz de alinhamento produzida por métodos de distância com o algoritmo *Neighbor-Joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas. Foram testados os modelos de substituição de nucleotídeos *Maximum Composite Likelihood* e *Kimura 2-parameter*. Para tanto, foi empregado o software MEGA 5.0.

4.6 CRITÉRIOS ADOTADOS PARA ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Considerando que se trata de estudo cuja amostragem é classificada como não paramétrica nominal, na qual as principais variáveis são qualitativas, a maior parcela dos dados obtidos foi avaliada com estatística descritiva. Para comparação

pontual de determinados dados, após extensiva avaliação exploratória, foram utilizadas tabelas de contingência para análises estatísticas por meio do teste Qui-Quadrado. Os resultados foram interpretados de acordo com o nível de significância α igual a 0,05, sendo as comparações com $P<0.05$ consideradas significativas, bem como as com $0.05<P<0.10$ consideradas marginalmente significativas (KAPS; LAMBERSON, 2004).

Para tanto, foram qualificadas como variáveis: classificação taxonômica de cada indivíduo (espécie, família e ordem), origem (*in situ* ou *ex situ*), sexo (macho, fêmea ou indeterminado), grupo etário (filhote, juvenil, adulto ou indeterminado) e data da coleta. As datas de coletas foram qualificadas como pertencentes à estação seca ou chuvosa do ano, sendo estas definidas de modo aproximado, em função dos equinócios solares (estação seca de 21 de março a 21 de setembro e estação chuvosa de 22 de setembro a 20 de março) (DALLACORT et al., 2011; RHEINGANTZ et al., 2011).

As espécies de mamíferos amostradas foram também classificadas segundo suas respectivas guildas tróficas (carnívoro, folívoro, frugívoro, insetívoro, granívoro, onívoro ou combinações entre estas) e hábitos referentes ao uso espacial do ambiente (terrestre, arborícola, escansorial, semifossorial ou semiaquático) segundo (REIS et al., 2011), bem como de acordo com o bioma de origem (Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal ou Amazônia) segundo dados do Ministério do Meio Ambiente (BRASIL, 2010).

A ocorrência, ou prevalência aparente, dos protozoários nas populações estudadas foi definida como o resultado obtido pelo percentual de amostras positivas ao diagnóstico microscópico sobre o total de amostras avaliadas. Cinquenta e uma amostras foram excluídas das análises estatísticas por terem sido coletadas em recintos coletivos ou em outras situações nas quais não foi possível particularizar indivíduos da mesma espécie (amostras de *pool*). Assumiu-se como critério que as amostras coletadas desta forma poderiam mascarar os resultados se incluídas devido ao fato de serem procedentes de grupos de dois a até 17 indivíduos, assim como poderiam não representar com aceitável confiabilidade todos os indivíduos do grupo.

O teste Qui-Quadrado foi utilizado para avaliar a significância estatística entre diferentes categorias de: classificação taxonômica, origem, sexo, grupo etário, guilda trófica, uso do habitat, bioma de origem, estação climática e mês de coleta. Quando comparações de dois ou mais graus de liberdade não puderam ser aplicadas, os dados foram agrupados de modo a instituir relações entre uma categoria e a soma das demais (por exemplo: Amazônia *vs.* soma dos demais biomas). A correção de Bonferroni foi atribuída para estes casos de comparações múltiplas, quando os dados não se enquadraram nas prerrogativas do teste Qui-Quadrado (KLINGENBERG, 2010).

O índice Kappa de Cohen (κ) foi aplicado para determinar a concordância dos resultados obtidos a partir das reações em cadeia pela polimerase (*Nested* PCR) para os genes GDH e β-giardina (KAPS; LAMBERSON, 2004). Os resultados das análises microscópicas e biomoleculares não foram comparados entre si, uma vez que estas apenas foram aplicadas às amostras que já eram sabidamente positivas àquelas.

RESULTADOS

Myocastor coypus
RBV, Itaipu Binacional
Imagem: Renata C. F. Santos

5 RESULTADOS

Ao todo, foram avaliadas no estudo em tela 452 amostras fecais provenientes de animais da mastofauna brasileira, sendo 199 de espécimes *in situ* e 253 de animais *ex situ*. Considerando a amostragem segundo os sete diferentes locais de coleta, obteve-se no total:

- ✓ 101 amostras coletadas *in situ* e cinco amostras *ex situ* na ADA da PCH Anhanguera, São Joaquim da Barra e Guará, SP;
- ✓ 46 amostras coletadas *in situ* e 248 amostras *ex situ* procedentes do RBV, Itaipu Binacional, Foz do Iguaçu, PR;
- ✓ 27 amostras coletadas *in situ* na Fazenda Nhumirim, EMBRAPA Pantanal, Corumbá, MS;
- ✓ Nove amostras coletadas *in situ* nas margenso do Rio Madeira, Abunã, RO;
- ✓ Seis amostras coletadas *in situ* na Fazenda Três Lagoas, Angatuba, SP;
- ✓ Sete amostras procedentes de indivíduos de vida livre, submetidos a exame necroscópico no VPT, FMVZ, USP, São Paulo, SP;
- ✓ Três amostras procedentes de espécimes de vida livre, cedidas pelo CRAS, PET, São Paulo, SP.

Destas, 109 referem-se ao *grupo A* de amostras e 343 ao *grupo B,* conforme será detalhadamente descrito nos subitens a seguir**.** De acordo com o que foi mencionado anteriormente, em decorrência de significativas diferenças metodológicas e distintas abordagens dadas a cada grupo, estes terão seus resultados retratados separadamente.

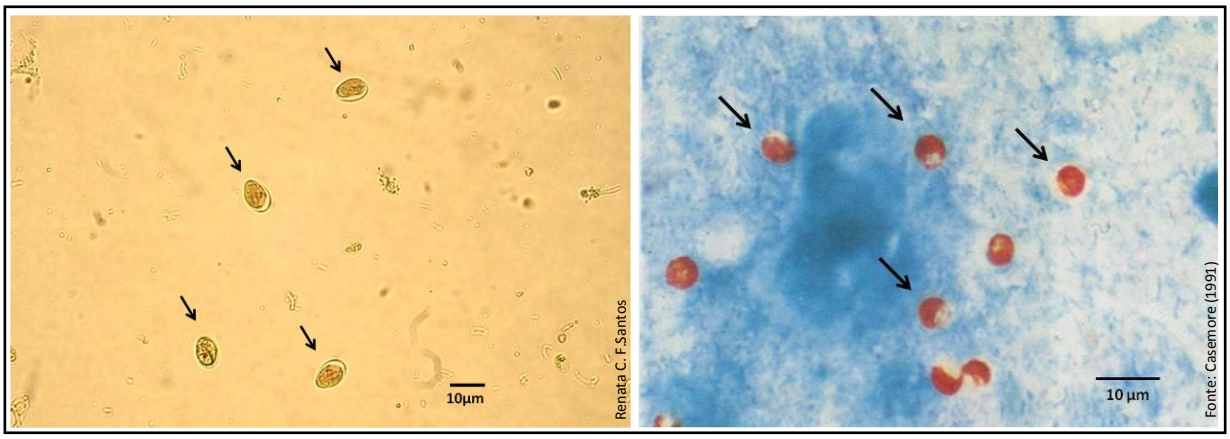
5.1 RESULTADOS REFERENTES AO *grupo A* DE AMOSTRAS FECAIS

Das 109 amostras fecais correspondentes ao *grupo A*, todas oriundas do Refúgio Biológico Bela Vista (RBV), Itaipu Binacional, e positivas para *Cryptosporidium* spp. e/ou *Giardia* spp. na microscopia, 101 foram procedentes de mamíferos mantidos em cativeiro nas dependências do Departamento de Fauna da instituição. As oito demais foram provenientes de animais de vida livre.

5.1.1 Diagnóstico microscópico

Um estudo retrospectivo da amostragem do *grupo A* permitiu avaliar estas 109 amostras dentro de um contexto mais abrangente, por meio do qual foi possível observar uma ocorrência de *Giardia* spp. igual a 1,8%, de um total de 443 amostras procedentes de animais silvestres (incluindo mamíferos, aves e répteis) coletadas entre os anos de 2007 e 2010, no RBV. O diagnóstico foi por meio das técnicas de Hoffman, Pon & Janer e Ritchie, com subsequente coloração com lugol (Figura 30). Todas as amostras positivas foram provenientes de mamíferos silvestres. Tais resultados foram recentemente publicados por Santos et al. (2010).

Em paralelo, neste mesmo estudo, obteve-se uma ocorrência de 34,9% para *Cryptosporidium* spp., de um total de 404 amostras avaliadas pelo método de Ritchie e subsequente coloração de Kinyoun (semelhante ao método de Ziehl-Neelsen modificado, Figura 30), entre os anos de 2007 e 2010. Observou-se que a maior prevalência foi em mamíferos (82,27% das amostras positivas), pertencentes a 23 diferentes espécies neotropicais. (SANTOS et al., 2010).



Fontes: Renata C. F. Santos (2010) e Casemore (1991)

Figura 30 – À esquerda, fotomicrografia de cistos de *Giardia* spp. corados com lugol procedentes de amostra fecal de ratão-do-banhado *Myocastor coypus*; técnica de centrífugo-sedimentação em formol-éter (método de Ritchie), aumento de 400x. À direita, fotomicrografia de oocistos de *Cryptosporidium* spp. corados pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada, aumento de 1000x – São Paulo - 2011

5.1.2 Diagnóstico molecular

Os resultados obtidos no diagnóstico molecular das amostras do *grupo A* foram considerados insatisfatórios para todos os métodos de extração de ácido nucléico e protocolos de amplificação empregados.

Obteve-se resultado negativo para a totalidade das amostras avaliadas por *Nested* PCR para ambos os protozoários estudados. Cabe ressaltar que os controles positivos utilizados nas reações foram normalmente amplificados, o que demonstra os adequados atributos diagnósticos dos métodos utilizados.

Compete salientar que todas as amostras positivas na microscopia foram mantidas armazenadas *in natura* a -80°C por períodos de até três anos, previamente à realização do diagnóstico molecular.

5.2 RESULTADOS REFERENTES AO *grupo B* DE AMOSTRAS FECAIS

Das 343 amostras referentes ao *grupo B,* 191 foram procedentes de animais *in situ*. Destas, 71,2% foram decorrentes de captura prévia com armadilhamento apropriado para cada grupo animal; 20,4% foram coletadas diretamente do solo, sem envolver captura; e os demais 8,4% foram derivadas de coletas durante exame necroscópico.

Das outras 152 amostras, provenientes de animais mantidos em cativeiro, 100% foram coletadas diretamente do recinto no qual cada animal estava alojado.

Na impossibilidade de separar animais mantidos em recintos coletivos ou capturados juntos, uma porcentagem aproximadamente igual a 15% do total de amostras foi avaliada como procedente de um *pool* de indivíduos da mesma espécie. Estas foram desconsideradas da análise estatística, conforme justificado no subitem 4.6, todavia, serão abordadas a seguir de forma descritiva.

Para as análises estatísticas de ocorrência dos referidos protozoários na população estudada foi considerado um total de 292 amostras, qualificadas de acordo com sua classificação taxonômica e características particulares, conforme pode ser observado nas tabelas 1 e 2.

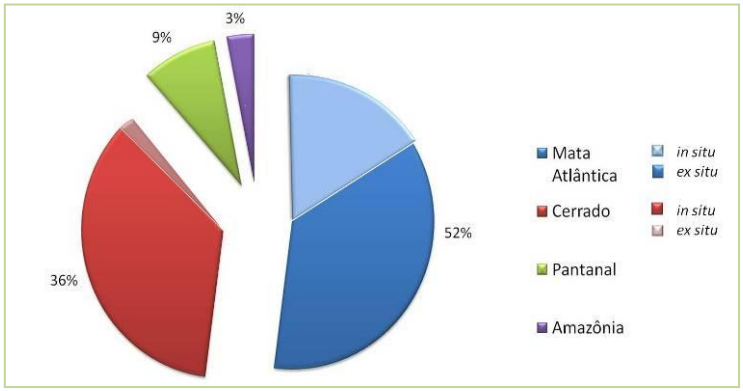
Uma avaliação exploratória dos dados foi capaz de identificar que a estratégia de coleta por conveniência resultou em acentuada heterogeneidade amostral, de modo que as amostras se distribuíram de forma não equilibrada entre as diferentes categorias determinadas como variáveis, conforme se pode visualizar na tabela 2 e na figura 31, a seguir.

Tabela 1 - Classificação taxonômica, guildas tróficas e estratégias de uso do habitat dos espécimes amostrados, considerados para análise estatística – São Paulo - 2011

Ordem	Família	Espécie	Guilda trófica	Uso do habitat	Total
Artiodactyla	Cervidae	*Blastocerus dichotomus*	Folívoro	Terrestre	6
		Mazama americana	Folívoro / Frugívoro	Terrestre	1
		Mazama gouazoubira	Folívoro / Frugívoro	Terrestre	3
		Mazama nana	Folívoro / Frugívoro	Terrestre	8
Carnivora	Canidae	*Cerdocyon thous*	Onívoro	Terrestre	4
		Lycalopex vetulus	Carnívoro	Terrestre	2
	Felidae	*Leopardus pardalis*	Carnívoro	Terrestre	16
		Leopardus tigrinus	Carnívoro	Terrestre	12
		Leopardus wiedii	Carnívoro	Terrestre	12
		Panthera onca	Carnívoro	Terrestre	4
		Puma yagouaroundi	Carnívoro	Terrestre	3
	Mustelidae	*Eira barbara*	Carnívoro	Terrestre	3
		Galictis cuja	Carnívoro	Terrestre	5
	Procyonidae	*Nasua nasua*	Onívoro	Terrestre	9
		Procyon cancrivorus	Carnívoro	Terrestre	2
Marsupialia	Didelphidae	*Caluromys lanatus*	Frugívoro / Onívoro	Arborícola	1
		Caluromys phinlander	Frugívoro / Onívoro	Arborícola	3
		Didelphis albiventris	Frugívoro / Onívoro	Escansorial	5
		Didelphis aurita	Onívoro	Escansorial	1
		Gracilinanus agilis	Insetívoro / Onívoro	Arborícola	16
		Monodelphis domestica	Insetívoro / Onívoro	Terrestre	6
		Monodelphis kunsi	Insetívoro / Onívoro	Terrestre	2
Perissodactyla	Tapiridae	*Tapirus terrestris*	Folívoro / Frugívoro	Terrestre	3
	Tayassuidae	*Pecari tajacu*	Onívoro	Terrestre	8
Primates	Aotidae	*Aotus* aff. *infulatus*	Frugívoro	Arborícola	1
	Atelidae	*Alouatta caraya*	Folívoro / Frugívoro	Arborícola	17
		Alouatta guariba	Folívoro / Frugívoro	Arborícola	2
		Lagothrix cana	Frugívoro	Arborícola	2
	Callithrichidae	*Callithrix penicillata*	Onívoro	Arborícola	37
	Cebidae	*Cebus apella*	Onívoro	Arborícola	2
		Saimiri boliviensis	Frugívoro / Insetívoro	Arborícola	1
	Pitheciidae	*Callicebus* aff. *brunneus*	Frugívoro	Arborícola	2
		Callicebus dubius	Frugívoro	Arborícola	1
		Pithecia sp.	Frugívoro	Arborícola	1
Rodentia	Caviidae	*Hydrochoerus hydrochaeris*	Folívoro	Semiaquática	41
	Cricetidae	*Akodon sp.*	Insetívoro / Onívoro	Terrestre	2
		Necromys lasiurus	Onívoro	Terrestre	1
		Oecomys cf. *catherinae*	Frugívoro	Arborícola	13
		Oecomys mamorae	Frugívoro	Arborícola	1
		Oligoryzomys nigripes	Frugívoro / Onívoro	Terrestre	4
		Rhipidomys cf. *mastacalis*	Granívoro / Insetívoro	Arborícola	1
	Dasyproctidae	*Dasyprocta azarae*	Folívoro / Frugívoro	Terrestre	1
	Echimyidae	*Clyomys laticeps*	Onívoro	Semifossorial	1
	Erethizontidae	*Coendou prehensilis*	Insetívoro	Arborícola	1
		Sphigurus spinosus	Insetívoro	Arborícola	6
	Myocastoridae	*Myocastor coypus*	Folívoro	Semiaquática	8
Pilosa	Bradypodidae	*Bradypus variegatus*	Folívoro	Arborícola	1
	Myrmecophagidae	*Myrmecophaga tridactyla*	Insetívoro	Terrestre	2
		Tamandua tetradactyla	Insetívoro	Terrestre	1
Cingulata	Dasypodidae	*Cabassous unicinctus*	Insetívoro	Semifossorial	2
		Dasypus novemcinctus	Insetívoro	Semifossorial	3
		Euphractus sexcinctus	Onívoro	Semifossorial	2
Total	22	52			292

Tabela 2 – Distribuição da amostragem estatística em função de sua origem (*in situ* ou *ex situ*) e bioma (Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica ou Pantanal) – São Paulo - 2011

		Origem		Bioma				Total
		in situ	*ex situ*	Amazônia	Cerrado	Mata Atlântica	Pantanal	
Origem	Natureza (*in situ*)	-	-	9	101	48	25	183
	Cativeiro (*ex situ*)	-	-	0	5	104	0	109
Bioma	Amazônia	9	0	-	-	-	-	9
	Cerrado	101	5	-	-	-	-	106
	Mata Atlântica	48	104	-	-	-	-	152
	Pantanal	25	0	-	-	-	-	25
Ordem	Artiodactyla	3	15	0	0	18	0	18
	Carnivora	9	63	0	1	64	7	72
	Marsupialia	33	1	0	22	1	11	34
	Perissodactyla	4	7	0	0	7	4	11
	Primates	57	9	9	52	5	0	66
	Rodentia	68	12	0	26	52	2	80
	Pilosa	2	2	0	0	4	0	4
	Cingulata	7	0	0	5	1	1	7
Guilda trófica	Carnívoro	2	57	0	1	57	1	59
	Folívoro	40	16	0	0	56	0	56
	Folívoro / Frugívoro	18	17	0	16	17	2	35
	Frugívoro	21	0	7	13	0	1	21
	Frugívoro / Insetívoro	1	0	1	0	0	0	1
	Frugívoro / Onívoro	12	1	0	12	1	0	13
	Granívoro / Insetívoro	1	0	0	1	0	0	1
	Insetívoro	11	4	0	8	7	0	15
	Insetívoro / Onívoro	26	0	0	15	0	11	26
	Onívoro	51	14	1	40	14	10	65
Uso do habitat	Arborícola	97	12	9	84	10	6	109
	Escansorial	6	0	0	6	0	0	6
	Semiaquática	39	10	0	0	49	0	49
	Semifossorial	8	0	0	5	1	2	8
	Terrestre	33	87	0	11	92	17	120



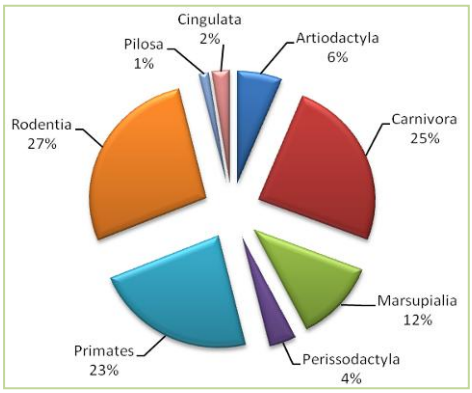


Figura 31 – Distribuição amostral conforme bioma (Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal e Amazônia) e origem da amostra (*in situ* ou *ex situ*) (gráfico à esquerda) e conforme ordem taxonômica dos indivíduos amostrados (gráfico à direita). Nos biomas Pantanal e Amazônia apenas amostras *in situ* foram coletadas – São Paulo - 2011

5.2.1 Espécies da mastofauna brasileira e biomas amostrados

As 343 amostras biológicas correspondentes ao *grupo B* foram oriundas de 52 diferentes espécies de animais da mastofauna brasileira, sendo estas pertencentes a 22 famílias de oito das 12 ordens da classe Mammalia de ocorrência nacional (Tabela 1) (REIS; PERACCHI; SANTOS, 2008).

As sete localidades nas quais se realizou coleta de amostras fecais estão compreendidas em quatro diferentes biomas terrestres brasileiros: Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal e Amazônia, conforme se pode observar na tabela 3.

Tabela 3 – Relação dos locais de coleta das amostras fecais do *grupo B*, localidade e bioma brasileiro ao qual pertencem, número de amostras coletadas *in situ* e *ex situ* e número de espécies de mamíferos silvestres amostradas para cada localidade – São Paulo – 2011

Locais de coleta	Municípios	Coordenadas geográficas	Bioma	Número de amostras coletadas			Número de espécies amostradas
				in situ	*ex situ*	Total	
Refúgio Biológico Bela Vista ITAIPU Binacional	Foz do Iguaçu - PR	25°26´S e 54°33´W	Mata Atlântica	38	147	185	25
Área diretamente afetada PCH Anhanguera	São Joaquim da Barra e Guará - SP	20°28´S e 47°52´W	Cerrado	101	5	106	16
Fazenda Nhumirim EMBRAPA Pantanal	Corumbá - MS	18°48´S e 56°20´W	Pantanal	27	0	27	10
Fazenda Três Lagoas	Angatuba - SP	23°48´S e 48°41´W	Cerrado	6	0	6	5
Departamento de Patologia FMVZ - USP	São Paulo - SP	23°57´S e 46°54´W	Mata Atlântica	7	0	7	4
CRAS Parque Ecológico do Tietê	São Paulo - SP	23°28´S e 46°30´W	Mata Atlântica	3	0	3	3
Margens do Rio Madeira	Abunã - RO	9°69´S e 65°35´W	Amazônia	9	0	9	7
Total > 7	**7**	**-**	**4**	**191**	**152**	**343**	**52***

* O número total de espécies de mamíferos silvestres avaliadas não corresponde à somatória dos valores no quadro, pois algumas das espécies incluídas foram amostradas em mais de uma localidade.

5.2.2 Diagnóstico microscópico

Estão relatados a seguir os resultados obtidos a partir da avaliação microscópica das amostras do *grupo B* por meio da técnica de centrífugo-flutuação em solução hipersaturada de sacarose.

Os resultados compreendem a ocorrência geral dos protozoários na população estudada, bem como a ocorrência obtida por meio da comparação de variáveis, como: classificação taxonômica, local de coleta, origem (*in situ* ou *ex situ*), sexo, grupo etário, guilda trófica, uso do habitat, bioma de origem, estação climática e mês de coleta.

Apesar de os resultados referentes às análises estatísticas não incluírem amostras coletadas como *pool* de indivíduos, os resultados seguintes descrevem os casos em que tais amostras foram positivas para os parasitas estudados.

5.2.2.1 Ocorrência dos protozoários na população avaliada

Obteve-se um resultado total de 22 amostras fecais positivas para *Giardia* spp. na microscopia, procedentes de 11 diferentes espécies de mamíferos silvestres, descritas a seguir: cachorro-do-mato *Cerdocyon thous* (1/4); jaguatirica *Leopardus pardalis* (1/21) (Figura 32), anta *Tapirus terrestris* (1/6), bugio-preto *Alouatta caraya* (5/20), sagui-do-tufo-preto *Callithrix penicillata* (1/41), rato-do-mato *Oecomys mamorae* (2/3), rato-do-espinho *Clyomys laticeps* (1/1), ratão-do-banhado *Myocastor coypus* (7/12), tatu-do-rabo-mole *Cabassous unicinctus* (1/2), tatu-peba *Euphractus sexcinctus* (1/2) e tamanduá-mirim *Tamandua tetradactyla* (1/1), conforme pode ser visualizado na tabela 4.

Foram desconsideradas das análises estatísticas quatro amostras: #248, procedente de quatro machos adultos de ratão-do-banhado *Myocastor coypus* cativos; #273, de um casal adulto de rato-do-mato *Oecomys mamorae* de vida livre; #329, de um casal adulto de bugio-preto *Alouatta caraya* cativo; e #396, referente a um *pool* de oito indivíduos adultos de ratão-do-banhado *Myocastor coypus* cativos.

Sendo assim, foi caracterizada uma prevalência aparente de 6,2% para *Giardia* spp. na população de mamíferos silvestres analisada.

Para *Cryptosporidium* spp., 16 amostras foram positivas no diagnóstico microscópico, sendo nove as espécies hospedeiras: cuíca *Gracilinanus agilis* (2/17);

cuíca-do-rabo-curto *Monodelphis domestica* (1/6), bugio-preto *Alouatta caraya* (1/20), macaco-barrigudo *Lagothrix cana* (1/2), macaco-parauacu *Pithecia* sp. (1/1), capivara *Hydrochoerus hydrochaeris* (5/41) (Figura 32), rato-do-mato *Oecomys* cf. *catherinae* (2/13), ratão-do-banhado *Myocastor coypus* (2/12) e tamanduá-mirim *Tamandua tetradactyla* (1/1), conforme pode ser visualizado na tabela 4.

Foram desconsideradas da análise estatística duas amostras: a de número #90, procedente de duas fêmeas juvenis de cuíca *Gracilinanus agilis* de vida livre; e a de número #248, proveniente de quatro machos adultos de ratão-do-banhado *Myocastor coypus* cativos.

Desta forma, obteve-se uma prevalência aparente de 4,8% para *Cryptosporidium* spp. na população avaliada. O número de amostras positivas para os protozoários na população amostrada podem ser visualizados na figura 33.

Os valores obtidos nos cálculos de ocorrência para infecções por *Giardia* spp. ou *Cryptosporidium* spp. não foram significativamente diferentes (X^2=0.529, gl=1, P=0.467). Considerando os casos positivos para os dois gêneros de parasitas combinados, obteve-se presença destes em 10,3% das amostras, procedentes de 17 diferentes espécies de mamíferos neotropicais.

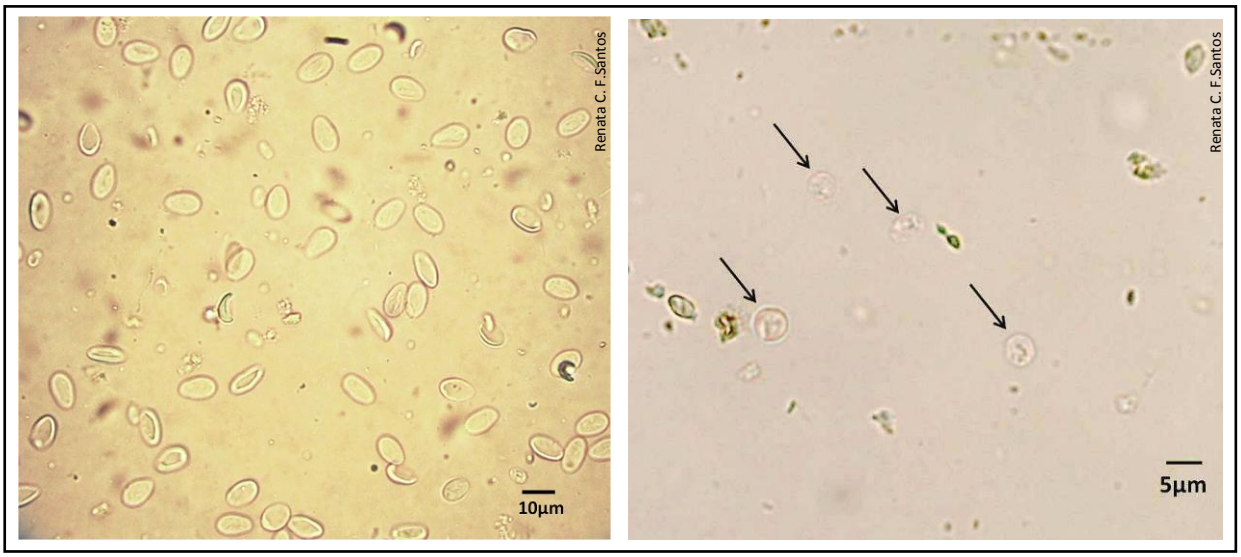


Figura 32 – À esquerda, fotomicrografia de cistos de *Giardia* spp. procedentes de amostra fecal de jaguatirica *Leopardus pardalis;* técnica de centrífugo-flutuação em solução hipersaturada de sacarose, aumento de 400x. À direita, fotomicrografia de oocistos de *Cryptosporidium* spp. procedentes de amostra fecal de capivara *Hydrochoerus hydrochaeris;* técnica de centrífugo-flutuação em solução hipersaturada de sacarose, aumento de 800x – São Paulo - 2010

Tabela 4 – Relação de espécies amostradas, número de amostras coletadas e número de amostras positivas na microscopia para *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. para cada espécie – São Paulo – 2011

(Continua)

Espécies da mastofauna brasileira amostradas				Número de amostras coletadas			Número de amostras positivas na microscopia	
Ordem	Família	Espécie	Nome comum	*in situ*	*ex situ*	Total	*Cryptosporidium* spp.	*Giardia* spp.
Artiodactyla	Cervidae	*Blastocerus dichotomus*	Cervo-do-Pantanal	0	6	6	0	0
		Mazama americana	Veado-mateiro	0	2	2	0	0
		Mazama gouazoubira	Veado-catingueiro	3	0	3	0	0
		Mazama nana	Veado-bororó	0	14	14	0	0
	Tayassuidae	*Pecari tajacu*	Cateto	2	6	8	0	0
Carnivora	Canidae	*Cerdocyon thous*	Cachorro-do-mato	3	1	4	0	1
		Lycalopex vetulus	Raposinha-do-campo	1	1	2	0	0
	Felidae	*Leopardus pardalis*	Jaguatirica	1	20	21	0	1
		Leopardus tigrinus	Gato-do-mato-pequeno	0	20	20	0	0
		Leopardus wiedii	Gato-maracajá	0	15	15	0	0
		Panthera onca	Onça-pintada	0	5	5	0	0
		Puma yagouaroundi	Gato-mourisco	0	3	3	0	0
	Mustelidae	*Eira barbaria*	Irara	0	3	3	0	0
		Galictis cuja	Furão	0	6	6	0	0
	Procyonidae	*Nasua nasua*	Quati	4	6	10	0	0
		Procyon cancrivorus	Mão-pelada	0	3	3	0	0
Didelphimorphia	Didelphidae	*Caluromys lanatus*	Cuíca-lanosa	0	1	1	0	0
		Caluromys philander	Cuíca	3	0	3	0	0
		Didelphis albiventris	Gambá-de-orelha-branca	5	0	5	0	0
		Didelphis aurita	Gambá-de-orelha-preta	1	0	1	0	0
		Gracilinanus agilis	Cuíca	17	0	17	2	0
		Monodelphis domestica	Cuíca-do-rabo-curto	6	0	6	1	0
		Monodelphis kunsi	Cuíca	2	0	2	0	0
Perissodactyla	Tapiridae	*Tapirus terrestris*	Anta	2	4	6	0	1
Primates	Aotidae	*Aotus* aff. *infulatus*	Macaco-da-noite	1	0	1	0	0
	Atelidae	*Alouatta caraya*	Bugio-preto	12	8	20	1	5
		Alouatta guariba	Bugio-ruivo	1	1	2	0	0
		Lagothrix cana	Macaco-barrigudo	2	0	2	1	0
	Callithrichidae	*Callithrix penicillata*	Sagui-do-tufo-preto	40	1	41	0	1
	Cebidae	*Cebus apella*	Macaco-prego	1	6	7	0	0
		Saimiri boliviensis	Mico-de-cheiro	1	0	1	0	0
	Pitheciidae	*Callicebus* aff. *brunneus*	Guigó	2	0	2	0	0
		Callicebus dubius	Guigó	1	0	1	0	0
		Pithecia sp.	Macaco-parauacu	1	0	1	1	0

(Conclusão)

Espécies da mastofauna brasileira amostradas				Número de amostras coletadas			Número de amostras positivas na microscopia	
Ordem	Família	Espécie	Nome comum	*in situ*	*ex situ*	Total	*Cryptosporidium* spp.	*Giardia* spp.
Rodentia	Caviidae	*Hydrochoerus hydrochaeris*	Capivara	37	4	41	5	0
	Cricetidae	*Akodon* sp.	Rato-do-mato	2	0	2	0	0
		Necromys lasiurus	Rato-do-mato	1	0	1	0	0
		Oecomys cf. *catherinae*	Rato-do-mato	13	0	13	2	0
		Oecomys mamorae	Rato-do-mato	3	0	3	0	2
		Oligoryzomys nigripes	Rato-do-mato	4	0	4	0	0
		Rhipidomys cf. *mastacalis*	Rato-trepador	1	0	1	0	0
	Dasyproctidae	*Dasyprocta azarae*	Cutia	1	2	3	0	0
	Echimyidae	*Clyomys laticeps*	Rato-do-espinho	1	0	1	0	1
	Erethizontidae	*Coendou prehensilis*	Ouriço-cacheiro	1	0	1	0	0
		Sphigurus spinosus	Ouriço-cacheiro	4	2	6	0	0
	Myocastoridae	*Myocastor coypus*	Ratão-do-banhado	2	10	12	2	7
Cingulata	Dasypodidae	*Cabassous unicinctus*	Tatu-do-rabo-mole	2	0	2	0	1
		Dasypus novemcinctus	Tatu-galinha	3	0	3	0	0
		Euphractus sexcinctus	Tatu-peba	2	0	2	0	1
Pilosa	Bradypodidae	*Bradypus variegatus*	Preguiça-de-três-dedos	1	0	1	0	0
	Myrmecophagidae	*Myrmecophaga tridactyla*	Tamanduá-bandeira	0	2	2	0	0
		Tamandua tetradactyla	Tamanduá-mirim	1	0	1	1	1
Total > 8	22	52		191	152	343	16	22

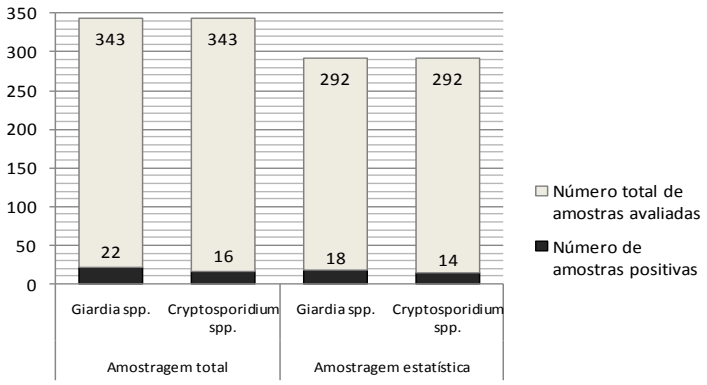


Figura 33 – Número de amostras positivas para os protozoários estudados de acordo com a amostragem total (n=343) e a amostragem utilizada para as análises estatísticas, na qual foram desconsideradas amostras de *pool* (n=292) – São Paulo - 2011

Três amostras (0,9%) apresentaram infecções mistas por ambos os gêneros de protozoários, sendo uma procedente de tamanduá-mirim *Tamandua tetradactyla* de vida livre e duas de ratão-do-banhado *Myocastor coypus* mantidos em cativeiro.

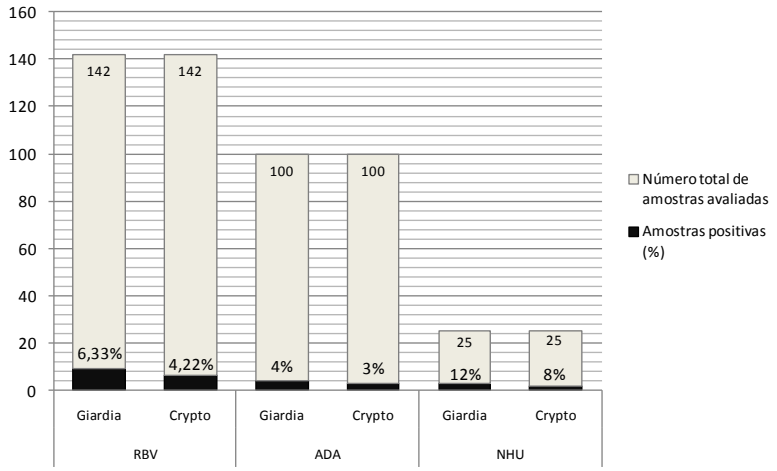
5.2.2.2 Ocorrência segundo o local de coleta

Considerando somente o local de coleta das amostras do *grupo B* como variável para determinar a ocorrência de *Cryptosporidium* e *Giardia* nas populações estudadas, têm-se os seguintes resultados (Figura 34).

No Refúgio Biológico Bela Vista, Itaipu Binacional, PR, obteve-se 4,22% (6/142) de amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. e de 6,33% (9/142) para o protozoário flagelado *Giardia* spp.

Obteve-se um resultado de 3% (3/100) para o parasita *Cryptosporidium* spp. na ADA, PCH Anhanguera, SP; enquanto a ocorrência de *Giardia* spp. para esta mesma localidade foi equivalente a 4% (4/100).

Quanto às amostras procedentes da Fazenda Nhumirim, EMBRAPA Pantanal, MS, a presença de *Cryptosporidium* spp. foi consideravelmente superior: em 8% (2/25) das amostras; assim como a de *Giardia* spp., em 12% (3/25). Não está claro se este resultado decorre de uma efetiva superioridade de casos positivos no local ou se representa um artefato da reduzida amostragem. Por este motivo, o cálculo de ocorrência não foi aplicável às demais localidades, com número de amostras avaliadas bastante inferior.



RBV = Refúgio Biológico Bela Vista, Itaipu Binacional; ADA = área diretamente afetada, PCH Anhanguera; NHU = Fazenda Nhumirim, EMBRAPA Pantanal

Figura 34 – Ocorrência de *Giardia* spp. (Giardia) e *Cryptosporidium* spp. (Crypto) conforme o local de coleta das amostras – São Paulo – 2011

*5.2.2.3 Ocorrência segundo origem (*in situ *x* ex situ*), sexo, grupo etário e estação climática*

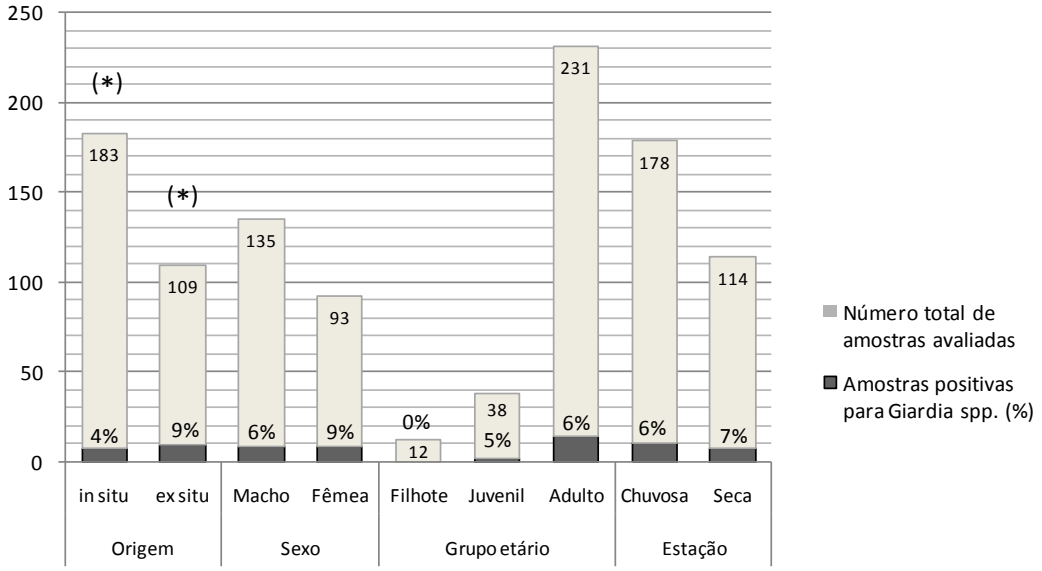
No intuito de demonstrar a influência da origem dos indivíduos amostrados na infecção para os referidos protozoários, foram realizadas análises estatísticas que evidenciaram situações divergentes entre infecções por *Cryptosporidium* e por *Giardia*, conforme será descrito a seguir.

A estratificação dos resultados obtidos a partir da análise de prevalência aparente dos parasitas segundo as variáveis origem, sexo, grupo etário, estação climática e meses do ano está demonstrada na tabela 5 e nas figuras 35 a 38.

Tabela 5 – Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. ao diagnóstico microscópico em função das categorias de origem, sexo, grupo etário, estação e mês da coleta. Note que os valores percentuais foram arredondados para facilitar a avaliação comparativa entre os resultados – São Paulo - 2011

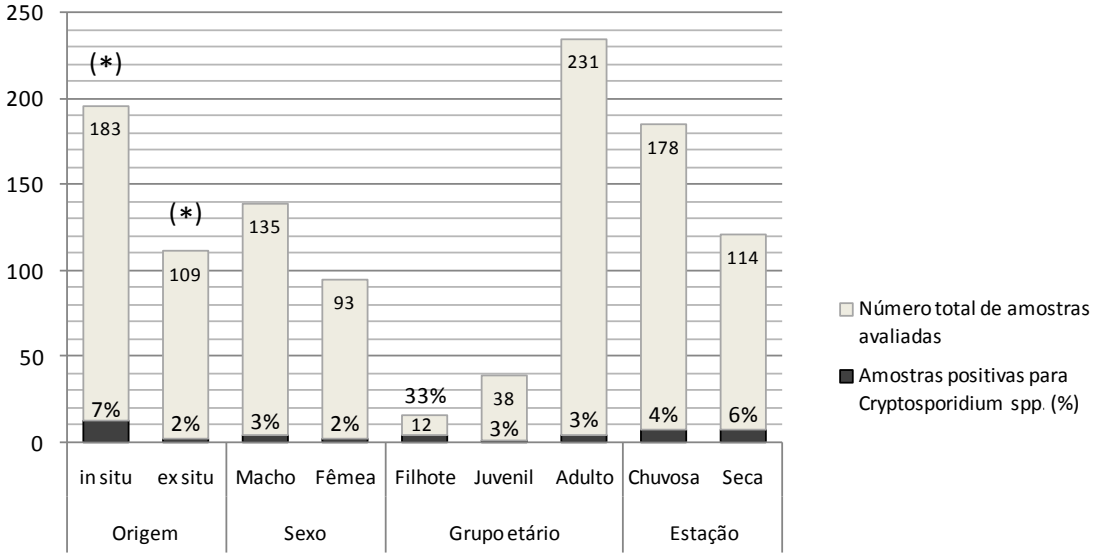
		Cryptosporidium spp.		*Giardia* spp.		Número de amostras
Origem	Natureza (*in situ*)	7%	(*)	4%	(*)	183
	Cativeiro (*ex situ*)	2%		9%		109
Sexo	Macho	3%	ns	6%	ns	135
	Fêmea	2%		9%		93
Grupo etário	Filhote	33%	n/a	0%	n/a	12
	Juvenil	3%	ns	5%	ns	38
	Adulto	3%	ns	6%	ns	231
Estação	Chuvosa	4%	ns	6%	ns	178
	Seca	6%		7%		114
Mês	Janeiro	0%	n/a	0%	n/a	1
	Fevereiro	6%	n/a	18%	ns	17
	Março	8%	ns	4%	ns	26
	Abril	21%	n/a	7%	n/a	14
	Maio	0%	n/a	13%	n/a	8
	Junho	0%	n/a	14%	n/a	7
	Julho	0%	n/a	0%	ns	18
	Agosto	0%	ns	3%	ns	30
	Setembro	14%	n/a	14%	n/a	14
	Outubro	0%	n/a	0%	n/a	1
	Novembro	0%	ns	11%	ns	46
	Dezembro	6%	ns	1%	ns	82
Total		5%		6%		292

"ns" = não significativo, "(*)" = marginalmente significativo, "*" = significativo, "n/a" = teste não aplicável



(*)= Resultado marginalmente significativo

Figura 35 – Ocorrência de *Giardia* spp. segundo origem das amostras, sexo e grupo etário dos espécimes amostrados e estação climática na qual a amostra foi coletada – São Paulo - 2011



(*)= Resultado marginalmente significativo

Figura 36 - Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. segundo origem das amostras, sexo e grupo etário dos espécimes amostrados e estação climática na qual a amostra foi coletada – São Paulo - 2011

Considerando somente as amostras procedentes de animais mantidos em cativeiro (*ex situ*) (n=109), obteve-se 9% de positividade para *Giardia* spp. Em paralelo, 4% das amostras procedentes de populações de vida livre (*in situ*) (n=183) foram positivas para este parasita na microscopia. Por outro lado, foi relatado um

resultado de 2% para a presença do protozoário *Cryptosporidium* spp. em animais *ex situ*, bem como de 7% para as amostras procedentes de populações *in situ*.

Tais resultados foram considerados marginalmente significativos, demonstrando maior prevalência aparente de *Giardia* em animais cativos e de *Cryptosporidium* em espécimes amostrados na natureza.

Embora não tenha sido considerado estatisticamente significativo, há um aparente padrão de maior ocorrência de *Cryptosporidium* em indivíduos filhotes (33%), o que, curiosamente, não corrobora com os resultados para *Giardia*, em que os indivíduos filhotes foram os menos infectados (0%).

As análises segundo estações climáticas e meses do ano demonstraram que não houve um padrão sazonal bem estabelecido para infecções por ambos os parasitas, e que a flutuação observada aparentemente não está relacionada a fatores verdadeiramente sazonais (Figuras 37 e 38).

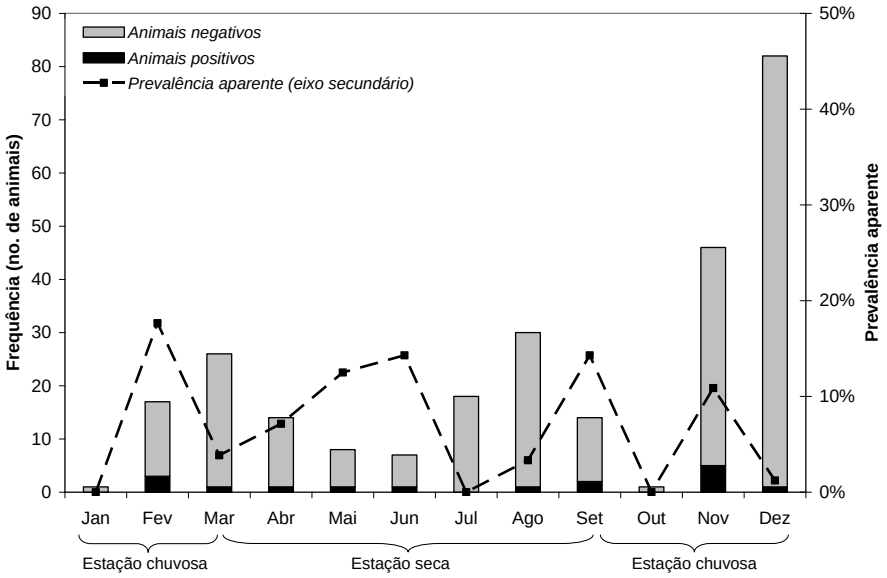


Figura 37 – Prevalência aparente de *Giardia* spp. ao exame coproparasitológico ao longo do ano – São Paulo – 2011

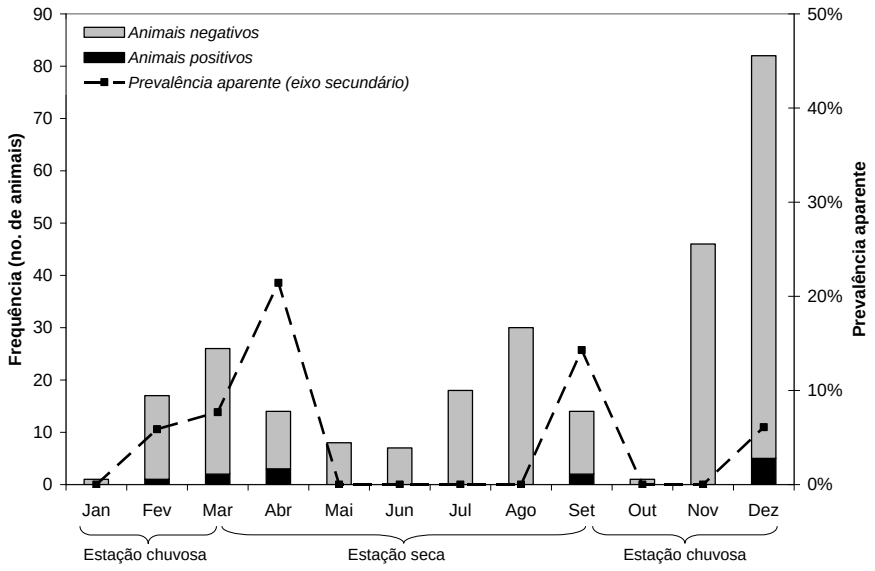


Figura 38 – Prevalência aparente de *Cryptosporidium* spp. ao exame coproparasitológico ao longo do ano – São Paulo – 2011

Do mesmo modo, não foram significativas as variações encontradas para a infecção pelos protozoários segundo o sexo dos espécimes amostrados.

5.2.2.4 Ocorrência segundo táxon, guilda trófica, estratégias de uso do habitat e bioma

Para tornar possíveis as análises estatísticas referentes à classificação taxonômica dos indivíduos avaliados, estes foram agrupados nas suas respectivas ordens dentro da Classe Mammalia. Neste contexto, obteve-se uma maior ocorrência de *Cryptosporidium* em espécies da ordem Rodentia (10%), resultado considerado marginalmente significativo.

Em paralelo, o coccídio foi mais prevalente em mamíferos frugívoros especialistas, para os quais o resultado de 19% foi relatado também como marginalmente significativo; bem como em mamíferos semiaquáticos, para os quais a ocorrência de 12% foi considerada significativa (Tabela 6 e Figura 39).

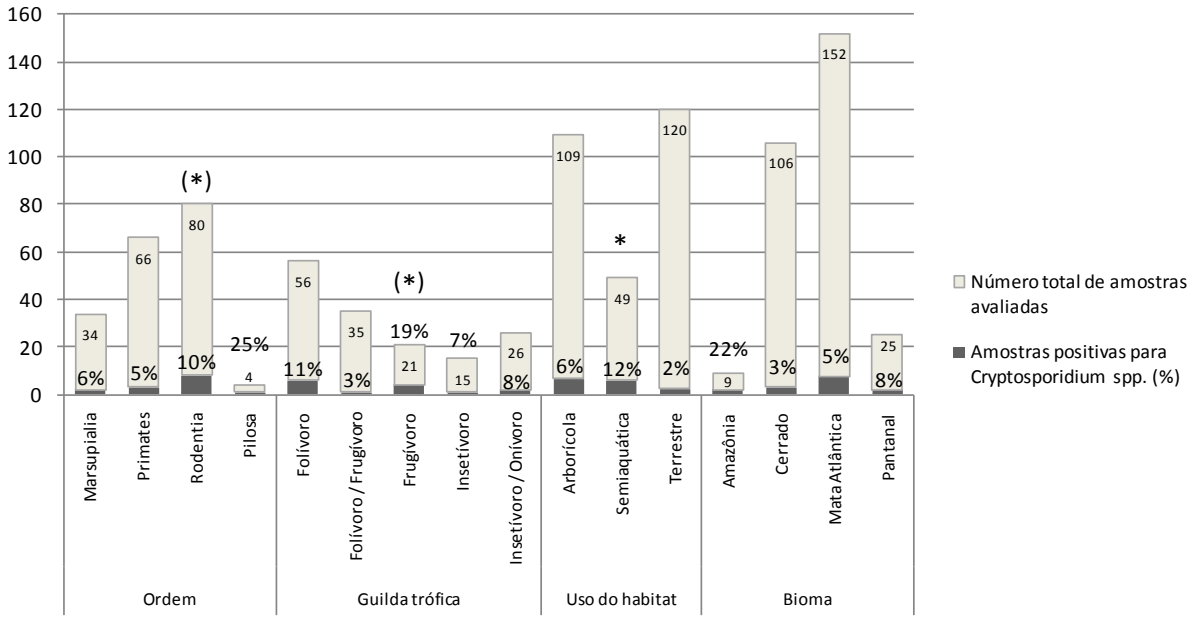
Tabela 6 – Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. ao diagnóstico microscópico em função das categorias de ordem, guilda trófica, uso do habitat e bioma. Note que os valores percentuais foram arredondados para facilitar a avaliação comparativa entre os resultados – São Paulo - 2011

		Cryptosporidium spp.		*Giardia* spp.		Número de amostras
Ordem	Artiodactyla	0%	n/a	0%	ns	18
	Carnivora	0%	ns	3%	ns	72
	Marsupialia	6%	ns	0%	ns	34
	Perissodactyla	0%	n/a	9%	n/a	11
	Primates	5%	ns	8%	ns	66
	Rodentia	10%	(*)	9%	ns	80
	Pilosa	25%	n/a	25%	n/a	4
	Cingulata	0%	n/a	29%	n/a	7
Guilda trófica	Carnívoro	0%	ns	2%	ns	59
	Folívoro	11%	ns	9%	ns	56
	Folívoro / Frugívoro	3%	ns	14%	ns	35
	Frugívoro	19%	(*)	5%	ns	21
	Frugívoro / Insetívoro	0%	n/a	0%	n/a	1
	Frugívoro / Onívoro	0%	n/a	0%	n/a	13
	Granívoro / Insetívoro	0%	n/a	0%	n/a	1
	Insetívoro	7%	n/a	13%	n/a	15
	Insetívoro / Onívoro	8%	ns	0%	ns	26
	Onívoro	0%	ns	6%	ns	65
Uso do habitat	Arborícola	6%	ns	6%	ns	109
	Escansorial	0%	n/a	0%	n/a	6
	Semiaquática	12%	*	10%	ns	49
	Semifossorial	0%	n/a	38%	n/a	8
	Terrestre	2%	ns	3%	ns	120
Bioma	Amazônia	22%	n/a	0%	n/a	9
	Cerrado	3%	ns	4%	ns	106
	Mata Atlântica	5%	ns	7%	ns	152
	Pantanal	8%	ns	12%	ns	25
Total		5%		6%		292

"ns" = não significativo, "(*)" = marginalmente significativo, "*" = significativo, "n/a" = teste não aplicável

Apesar de não significativos, os resultados para *Giardia* demonstraram uma aparente maior ocorrência em mamíferos classificados na guilda folívoro/frugívoros (14%), assim como para espécies semiaquáticas (10%) (Tabela 6 e Figura 40).

Os resultados referentes ao bioma de origem dos espécimes avaliados não foram significativos, todavia, a comparação entre os valores obtidos, considerando o número de amostras analisadas para cada bioma, sugere que *Giardia* poderia ocorrer com maior frequência no Pantanal.



(*)= Resultado marginalmente significativo; * = Resultado significativo

Figura 39 - Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. segundo ordem taxonômica, guilda trófica, estratégia de uso do habitat e bioma de origem dos espécimes amostrados. Foram ocultadas da imagem as variáveis nas quais não houve resultados positivos para o coccídio na microscopia – São Paulo – 2011

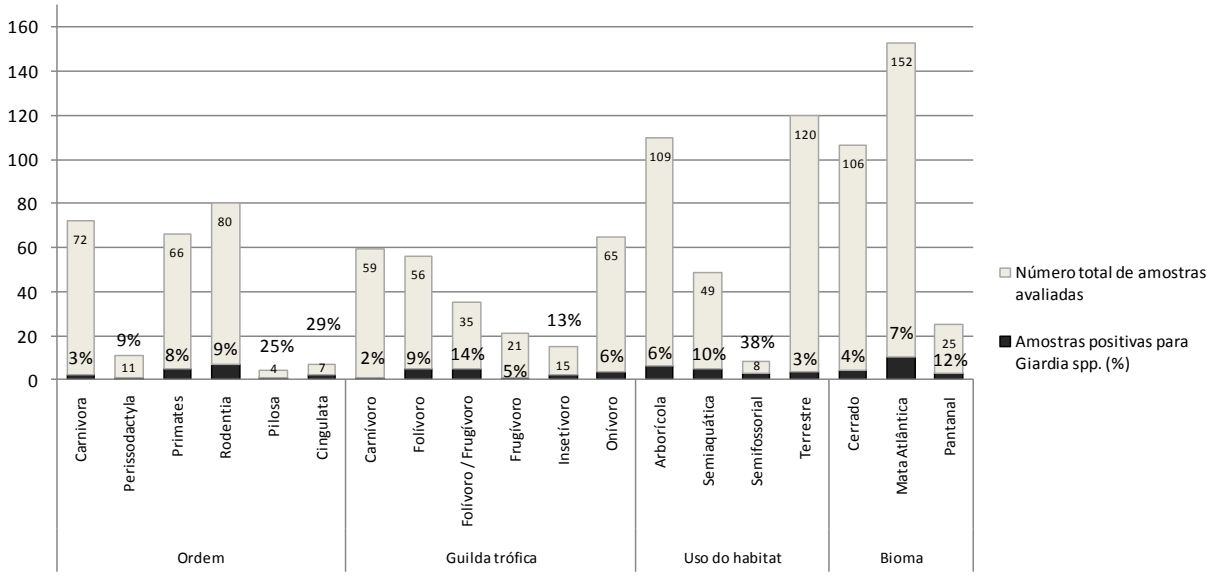


Figura 40 - Ocorrência de *Giardia* spp. segundo ordem taxonômica, guilda trófica, estratégia de uso do habitat e bioma de origem dos espécimes amostrados. Foram ocultadas da imagem as variáveis nas quais não houve resultados positivos para o parasita flagelado na microscopia. Todos os resultados foram não significativos – São Paulo - 2011

5.2.2.5 Caso particular: bugio-preto Alouatta caraya *(amostras #21 e #296)*

Conforme descrito no subitem 4.1.2.2, em decorrência da observação de severos quadros clínicos compatíveis com doença gastroentérica (Figura 41), foram coletadas para o presente estudo amostras procedentes de primatas neotropicais mantidos em cativeiro no Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) provisório, construído e sustentado pela empresa responsável pela instalação e operação da PCH Anhanguera, no município de Guará, SP.

Um destes indivíduos, que veio a óbito depois de 144 dias em cativeiro, foi amostrado tanto em vida livre, durante o monitoramento em natureza e subsequente captura (amostra #21), quanto poucas semanas após tal captura e manutenção em cativeiro (amostra #296). Ambas as amostras foram positivas para o protozoário flagelado *Giardia* spp.

Os achados necroscópicos revelaram hiperemia de mucosa intestinal, presença de múltiplos focos confluentes de coloração enegrecida na serosa do intestino delgado, acúmulo de gases e extensa lesão difusa, granulomatosa e de aspecto erosivo ao longo da mucosa intestinal, além da presença de conteúdo fecal líquido, de odor pútrido e coloração esverdeada. A causa de morte foi classificada como choque septicêmico.

Fonte: Elmer Alexander Genoy-Puerto (2009)

Tal episódio foi considerado especialmente relevante dentre os resultados obtidos nesta pesquisa e será discutido no item 6.

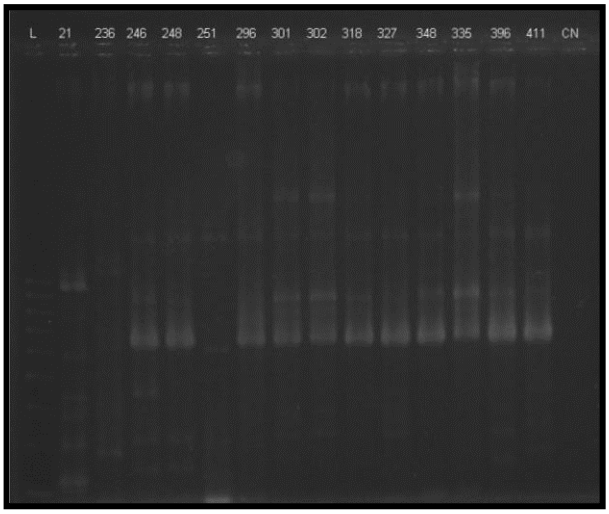
Figura 41 - Bugio-preto *Alouatta caraya* com severo quadro clínico sugestivo de doença gastroentérica. As manifestações clínicas observadas incluem diarréia, desidratação e apatia – São Paulo - 2011

5.2.2.6 Carga parasitária

Nos exames coproparasitológicos, notou-se que a carga parasitária para outros endoparasitas (nematódeos, cestódeos e coccídios da família Eimeridae) é nitidamente maior em espécimes de vida livre quando comparada às amostras de indivíduos mantidos em cativeiro. Já para os protozoários estudados, notou-se uma maior carga parasitária em indivíduos cativos, especialmente para aqueles infectados por *Giardia* spp.

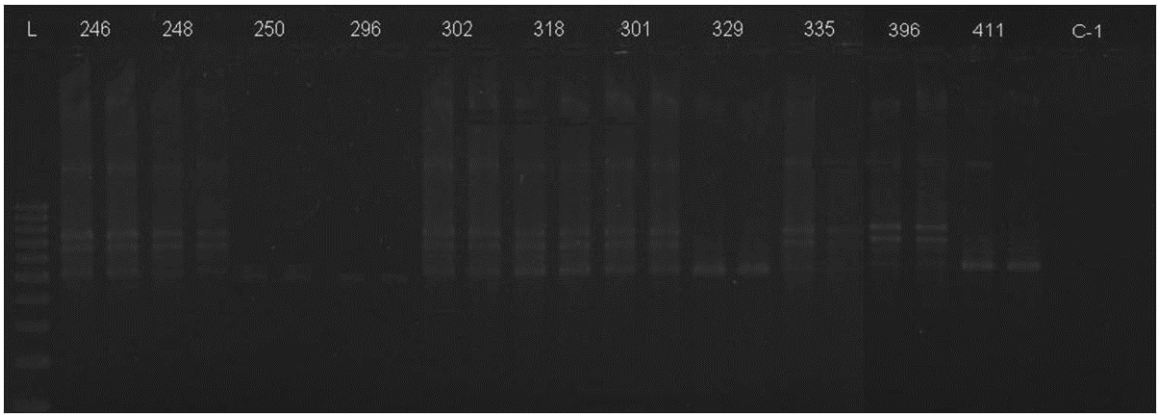
5.2.3 Diagnóstico molecular

Das 22 amostras positivas na microscopia para *Giardia* spp, 15 foram positivas na *Nested* PCR, sendo 14 positivas na amplificação de fragmento do gene GDH (Figura 42), 11 na do gene β-giardina (Figura 43) e 10 para ambos os genes. Obteve-se uma ocorrência de *Giardia* spp. equivalente a 4,1% na população avaliada, considerando a sobreposição dos resultados dos diagnósticos microscópico e molecular.



L= padrão de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases
CN= Controle negativo

Figura 42 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de *Nested* PCR resultantes da amplificação do gene GDH de amostras positivas para *Giardia* spp. na microscopia – São Paulo – 2011

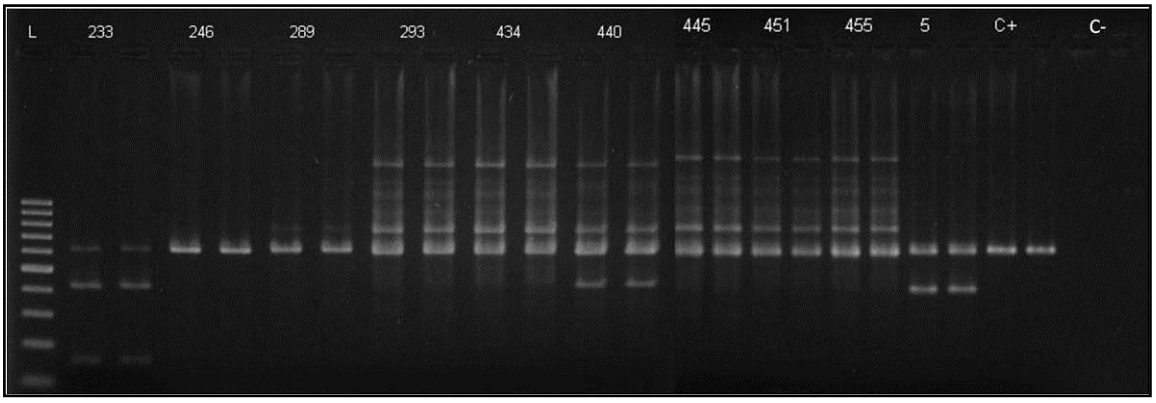


L= padrão de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases
C-1= Controle negativo

Figura 43 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de *Nested* PCR resultantes da amplificação do gene β-giardina de amostras positivas para *Giardia* spp. na microscopia. Note que as amostras estão em duplicata – São Paulo – 2011

Para amplificação das amostras positivas para *Cryptosporidium* spp., foram mais satisfatórios os resultados obtidos com o uso dos *primers* SHP1, SHP2, SHP3 e SSU-R3, aparentemente mais sensíveis do que os descritos por Xiao (1999, 2000c). Sendo assim, os resultados a seguir referem-se a esse grupo de *primers*.

Tiveram resultado positivo na *Nested* PCR 10 das 16 amostras positivas na microscopia (Figura 44), de forma que, por meio da combinação dos resultados do diagnóstico microscópico e molecular, a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. nas amostras fecais do *grupo B* avaliadas no experimento foi de 3,42%.



L= padrão de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases
C+= Controle positivo; C-= Controle negativo

Figura 44 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de *Nested* PCR resultantes da amplificação do gene SSU rDNA de amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. na microscopia. Note que as amostras estão em duplicata – São Paulo – 2011

Com a análise semiquantitativa, adaptada de Huetink et al. (2001), pode-se notar que todas as amostras positivas na microscopia e negativas na *Nested* PCR foram classificadas como "+", indicando uma quantidade máxima de cinco cistos ou oocistos visualizados na lâmina durante a avaliação microscópica.

Para isolados de *Giardia* spp., a *Nested* PCR para o gene GDH foi negativa em 36.4% das amostras positivas à microscopia. Em todos os casos, isto ocorreu em amostras de baixa intensidade de parasitismo (72.7% das amostras com intensidade "+"). Para o gene β-giardina, obteve-se resultado negativo em 50% das amostras positivas à microscopia. Isto ocorreu predominantemente em amostras de baixa intensidade de parasitismo (81.8% das amostras com intensidade "+"), porém também ocorreu em amostras com intenso parasitismo (Tabela 7).

Tabela 7 - Resultados da *Nested* PCR para diagnóstico de *Giardia* spp. em amostras sabidamente positivas à microscopia, para os genes GDH e β-giardina – São Paulo - 2011

Resultado da *Nested* PCR		**Análise semiquantitativa à microscopia**				**Total**
		+	**++**	**+++**	**++++**	
GDH	Amostras positivas	3	3	3	5	14
	Amostras negativas	8	0	0	0	8
β-giardina	Amostras positivas	2	2	3	4	11
	Amostras negativas	9	1	0	1	11
Total		11	3	3	5	22

A *Nested* PCR para isolados de *Cryptosporidium* spp. demonstrou resultados falsamente negativos em 37,5% das amostras. Em todos os casos, isto ocorreu em amostras de baixa intensidade de parasitismo (50% das amostras com intensidade "+" foram negativas à *Nested* PCR), conforme dados na tabela 8.

Tabela 8 - Resultados da *Nested* PCR para diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. em amostras sabidamente positivas à microscopia – São Paulo - 2011

Resultado da *Nested* PCR	**Análise semiquantitativa à microscopia**			**Total**
	+	**++**	**+++**	
Número de amostras positivas	6	1	3	10
Número de amostras negativas	6	0	0	6
Total	12	1	3	16

Detalhes referentes às amostras positivas na microscopia e testadas por métodos moleculares podem ser verificados no quadro 7.

Número da amostra	Espécie	Nome comum	Local de coleta	Origem *in situ / ex situ*	Diagnóstico microscópico		Diagnóstico molecular (*Nested* PCR)		
							Cryptosporidium spp.	Giardia spp.	
					Cryptosporidium spp.	Giardia spp.	SSU rDNA	GDH	β-giardina
#05	*Oecomys* cf. *catherinae*	Rato-do-mato	1	*in situ*	+	Negativo	Positivo	NR	NR
#21	*Alouatta caraya*	Bugio-preto	1	*in situ*	Negativo	++	NR	Positivo	Negativo
#55	*Callithrix penicillata*	Sagui-do-tufo-preto	1	*in situ*	Negativo	+	NR	Negativo	Negativo
#74	*Oecomys* cf. *catherinae*	Rato-do-mato	1	*in situ*	+	Negativo	Negativo	NR	NR
#90	*Gracilinanus agilis*	Cuíca	1	*in situ*	+	Negativo	Negativo	NR	NR
#92	*Alouatta caraya*	Bugio-preto	1	*in situ*	Negativo	+	NR	Negativo	Negativo
#228	*Lagothrix cana*	Macaco-barrigudo	2	*in situ*	+	Negativo	Negativo	NR	NR
#233	*Pithecia* sp.	Macaco-parauacu	2	*in situ*	+++	Negativo	Positivo	NR	NR
#234	*Tamandua tetradactyla*	Tamanduá-mirim	3	*in situ*	+	+	Negativo	Negativo	Negativo
#236	*Cabassous unicinctus*	Tatu-do-rabo-mole	3	*in situ*	Negativo	+	NR	Positivo	Negativo
#246	*Myocastor coypus*	Ratão-do-banhado	4	*ex situ*	+++	+++	Positivo	Positivo	Positivo
#248	*Myocastor coypus*	Ratão-do-banhado	4	*ex situ*	+	+++	Negativo	Positivo	Positivo
#250	*Alouatta caraya*	Bugio-preto	4	*ex situ*	Negativo	+	NR	Negativo	Positivo
#251	*Myocastor coypus*	Ratão-do-banhado	4	*ex situ*	Negativo	+	NR	Positivo	Negativo
#268	*Euphractus sexcinctus*	Tatu-peba	5	*in situ*	Negativo	+	NR	Negativo	Negativo
#273	*Oecomys mamorae*	Rato-do-mato	5	*in situ*	Negativo	+	NR	Negativo	Negativo
#284	*Clyomys laticeps*	Rato-do-espinho	5	*in situ*	Negativo	+	NR	Negativo	Negativo
#288	*Gracilinanus agilis*	Cuíca	5	*in situ*	+	Negativo	Negativo	NR	NR
#289	*Monodelphis domestica*	Cuíca	5	*in situ*	+	Negativo	Positivo	NR	NR
#291	*Oecomys mamorae*	Rato-do-mato	5	*in situ*	Negativo	+	NR	Negativo	Negativo
#293	*Alouatta caraya*	Bugio-preto	1	*ex situ*	+	Negativo	Positivo	NR	NR
#296	*Alouatta caraya*	Bugio-preto	1	*ex situ*	Negativo	++	NR	Positivo	Positivo
#301	*Myocastor coypus*	Ratão-do-banhado	4	*ex situ*	Negativo	++++	NR	Positivo	Positivo
#302	*Myocastor coypus*	Ratão-do-banhado	4	*ex situ*	Negativo	++++	NR	Positivo	Positivo
#318	*Myocastor coypus*	Ratão-do-banhado	4	*ex situ*	Negativo	++++	NR	Positivo	Positivo
#329	*Alouatta caraya*	Bugio-preto	4	*ex situ*	Negativo	+	NR	Positivo	Positivo
#335	*Leopardus pardalis*	Jaguatirica	4	*ex situ*	Negativo	++++	NR	Positivo	Positivo
#348	*Cerdocyon thous*	Cachorro-do-mato	4	*ex situ*	Negativo	++++	NR	Positivo	Negativo
#396	*Myocastor coypus*	Ratão-do-banhado	4	*ex situ*	Negativo	++	NR	Positivo	Positivo
#411	*Tapirus terrestris*	Anta	4	*ex situ*	Negativo	+++	NR	Positivo	Positivo
#434	*Hydrochoerus hydrochaeris*	Capivara	4	*in situ*	+++	Negativo	Positivo	NR	NR
#440	*Hydrochoerus hydrochaeris*	Capivara	4	*in situ*	++	Negativo	Positivo	NR	NR
#445	*Hydrochoerus hydrochaeris*	Capivara	4	*in situ*	+	Negativo	Positivo	NR	NR
#451	*Hydrochoerus hydrochaeris*	Capivara	4	*in situ*	+	Negativo	Positivo	NR	NR
#455	*Hydrochoerus hydrochaeris*	Capivara	4	*in situ*	+	Negativo	Positivo	NR	NR

1= ADA PCH Anhanguera, SP; 2= Margens do Rio Madeira, RO; 3= CRAS PET, SP; 4= RBV ITAIPU Binacional, PR; 5= Fazenda Nhumirim – EMBRAPA Pantanal, MS; NR= não realizado

Quadro 7 – Relação das espécies hospedeiras, procedência das amostras e resultados obtidos com os diagnósticos microscópico (avaliação quantitativa segundo Huetink et al. (2001)) e molecular – São Paulo - 2011

Comparando os resultados obtidos para o diagnóstico molecular de *Giardia* spp. para os genes GDH e β-giardina em amostras sabidamente positivas à microscopia, obteve-se concordância de 77,3%. Todavia, o índice de concordância global (κ) demonstrou valor igual a 0,545, indicando moderada concordância entre os diferentes métodos (Tabela 9).

Tabela 9 - Comparação entre os resultados de *Nested* PCR para os genes GDH e β-giardina para diagnóstico de *Giardia* spp. em amostras sabidamente positivas à microscopia – São Paulo - 2011

Resultado da *Nested* PCR para o gene β-giardina	**Resultado da *Nested* PCR para o gene GDH**		**Total**
	Positivo	Negativo	
Positivo	10	1	11
Negativo	4	7	11
Total	14	8	22

5.2.4 Caracterização molecular

Todas as amostras positivas na *Nested* PCR foram submetidas à sequenciamento molecular. Foram gerados cromatogramas passíveis de leitura e edição para identificação molecular e inferências filogenéticas no sequenciamento das amostras: #05, #233, #246, #289, #293, #434, #440, #445, #451 e #455 para o gene SSU rDNA de *Cryptosporidium* spp.; #246, #248, #301, #302, #318, #329, #335, #396 e #411 para o gene β-giardina de *Giardia* spp. e #246, #248, #301, #302, #318, #329, #335, #348, #396 e #411 para o gene GDH, também de *Giardia* spp.

5.2.4.1 Identificação molecular de isolados de Giardia *spp.*

Dentre os isolados de *Giardia* spp. procedentes de mamíferos silvestres cujo sequenciamento molecular foi satisfatório, obteve-se 100% de identidade entre as sequências resultantes e sequências homólogas disponíveis nas bases de dados (*GenBank*) e amplamente descritas em literatura para outros hospedeiros.

Houve total concordância entre a identificação molecular resultante do sequenciamento de produtos da *Nested* PCR do gene GDH e do gene β-giardina, conforme pode ser visualizado no quadro 8.

Giardia duodenalis						
Número da amostra	Nucleotídeos sequenciados*	Posição no gene**	Identidade (%)	Grupo	Genótipo	Sequência de referência (*GenBank*)
Gene GDH						
#246	193	812 - 1002	100	A	AI	EF507599.1
#248	508	553 - 1056	100	A	AI	EF507599.1
#301	282	780 - 1056	100	A	AI	EF507599.1
#302	267	796 - 1056	100	A	AI	EF507599.1
#318	474	548 - 1021	100	A	AI	EF507599.1
#329	333	730 - 1056	100	A	AI	EF507599.1
#335	231	832 - 1056	100	A	AI	EF507599.1
#348	336	717 - 1052	100	D	-	U60986.2
#396	502	555 - 1056	100	A	AI	EF507599.1
#411	332	732 - 1056	100	A	AI	EF507599.1
Gene β-giardina						
#246	480	84 - 563	100	A	AI	GQ329673.2
#248	478	84 - 561	100	A	AI	GQ329673.2
#301	480	84 - 563	100	A	AI	GQ329673.2
#302	475	84 - 558	100	A	AI	GQ329673.2
#318	478	84 - 561	100	A	AI	GQ329673.2
#329	433	84 - 516	100	A	AI	GQ329673.2
#335	480	84 - 563	100	A	AI	GQ329673.2
#396	472	87 - 558	100	A	AI	GQ329673.2
#411	478	84 - 561	100	A	AI	GQ329673.2

*Número referente à extensão das sequências contíguas obtidas após alinhamento e edição.
**Obtidas a partir de sequências parciais do gene.

Quadro 8 – Detalhes da identificação molecular de isolados de *Giardia duodenalis* provenientes de mamíferos silvestres para os genes GDH e β-giardina – São Paulo - 2011

As sequências encontradas caracterizam a espécie *Giardia duodenalis assemblage* AI, genótipo considerado zoonótico, nas amostras #246, #248, #301, #302, #318, #329, #335, #396 e #411, conforme pode ser visualizado no quadro 8. Tais amostras são procedentes de quatro diferentes espécies de mamíferos

silvestres, sendo elas: ratão-do-banhado *Myocastor coypus*, bugio-preto *Alouatta caraya*, jaguatirica *Leopardus pardalis* e anta *Tapirus terrestris*.

Para a amostra #348, procedente de cachorro-do-mato *Cerdocyon thous*, obteve-se como resultado o genótipo D, comumente isolado de cães domésticos e considerado não zoonótico.

Para o gene GDH, foram utilizadas sequências homólogas parciais como referência, sendo aquela identificada como EF507599.1 correspondente a um total de 1056 nucleotídeos e a identificada como U60986.2 com 1120 nucleotídeos. A sequência de referência para o gene β-giardina é composta por 700 nucleotídeos.

Detalhes sobre a identificação dos espécimes hospedeiros, bem como localidade de procedência, origem (*in situ* ou *ex situ*) e os respectivos resultados frente à caracterização molecular podem ser verificados em seguida, no quadro 10.

5.2.4.2 Identificação molecular de isolados de Cryptosporidium *spp.*

As sequências avaliadas revelaram elevada similaridade com sequências homólogas de genótipos já descritos na literatura, conforme se pode observar no quadro 9.

Obteve-se 98% de identidade com a espécie *Cryptosporidium wrairi*, descrita em literatura primeiramente em porquinhos-da-Índia (ou cobaias) *Cavia porcellus*, para as amostras #05, #246, #289, #434, #440, #445, #451 e #455. Tais amostras são provenientes dos mamíferos: rato-do-mato *Oecomys* cf. *catherinae*, ratão-do-banhado *Myocastor coypus*, cuíca *Monodelphis domestica* e capivara *Hydrochoerus hydrochaeris*.

A referência utilizada para estas amostras no quadro 9 foi a sequência completa do gene SSU rDNA de *C. wrairi* com a qual observou-se maior identidade (AF115378.1), cuja extensão é de 1746 nucleotídeos. Para estas amostras, notou-se a ocorrência de uma transição (substituição A por G) na posição do nucleotídeo 649,

uma deleção de dois nucleotídeos (AT) no sítio 688-689 e uma transição (substituição T por C) na posição do nucleotídeo 744 do gene avaliado na direção 5'-3' (Figura 45).

Gene SSU rDNA - *Cryptosporidium* spp.					
Número da amostra	Nucleotídeos sequenciados*	Posição no gene	Identidade (%)***	Genótipo	Sequência de referência (*GenBank*)
#05	354	584 - 939	98 [99% (352/356) – 1% (2 *GAPS*)]	*Cryptosporidium wrairi*	AF115378.1
#233	437	258 - 690**	98 [99% (432/437) – 1% (4 *GAPS*)]	*Cryptosporidium* sp. *rat genotype* III	GQ121026.1
#246	386	520 -907	98 [99% (384/388) – 1% (2 *GAPS*)]	*Cryptosporidium wrairi*	AF115378.1
#289	331	542 - 874	98 [99% (329/333) – 1% (2 *GAPS*)]	*Cryptosporidium wrairi*	AF115378.1
#293	414	296 - 714**	98 [99% (413/419) – 1% (5 *GAPS*)]	*Cryptosporidium* sp. *deer mouse genotype* IV	EF641019.1
#434	352	586 - 939	98 [99% (350/354) – 1% (2 *GAPS*)]	*Cryptosporidium wrairi*	AF115378.1
#440	320	586 - 907	98 [99% (318/322) – 1% (2 *GAPS*)]	*Cryptosporidium wrairi*	AF115378.1
#445	418	518 - 937	98 [99% (416/420) – 1% (2 *GAPS*)]	*Cryptosporidium wrairi*	AF115378.1
#451	385	521 - 907	98 [99% (383/387) – 1% (2 *GAPS*)]	*Cryptosporidium wrairi*	AF115378.1
#455	386	520 - 907	98 [99% (384/388) – 1% (2 *GAPS*)]	*Cryptosporidium wrairi*	AF115378.1

*Número referente à extensão das sequências contíguas obtidas após alinhamento e edição
**Obtidas a partir de sequências parciais do gene
***Valores arredondados obtidos por meio da ferramenta *BLAST*® (*National Center for Biotechnology Information* - NCBI), considerando porcentagens referentes ao número de lacunas de inserções ou deleções (*GAPS*) (BLAST, 2011)

Quadro 9 – Detalhes da identificação molecular de isolados de *Cryptosporidium* spp. provenientes de mamíferos silvestres para o gene ribossomal SSU rDNA – São Paulo - 2011

A amostra #233, procedente de macaco-parauacu *Pithecia* sp., apresentou elevada identidade com o genótipo *Cryptosporidium* sp. *rat genotype* III, cuja sequência utilizada como referência (GQ121026.1) é parcial e possui 710 nucleotídeos. Observou-se uma transição (substituição C por T) no sítio 389, uma inserção TT entre os nucleotídeos 389 e 390 e uma inserção TT entre os nucleotídeos 533 e 532 da sequência de referência, avaliada na direção 5'-3' (Figura 45).

A amostra #293, de bugio-preto *Alouatta caraya*, revelou alta identidade com o genótipo *Cryptosporidium* sp. *deer mouse genotype* IV, cuja sequência de referência (EF641019.1) é parcial e constituída por 800 nucleotídeos. A avaliação da similaridade entre as sequências, cuja direção foi 3'-5', demonstrou uma deleção de

dois nucleotídeos (AT) nas posições 470 e 469 e de três nucleotídeos (TAA) no sítio 430-432, assim como uma transição (substituição T por C) no nucleotídeo 429 da sequência padrão (Figura 45).

```
         10         20         30         40         50         60         70         80         90
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
AGGACCTTTA ATGGTTTTGT AATTGGAATG AGTTAAGTAT AAACCCCTTT ACAAGTATCA ATTGGAGGGC AAGTCTGGTG CCAGCAGCCG 233
.......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... rat genotype III GQ121026
.....T..A. ..A....... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 293
.....T..A. ..A....... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... deer mouse genotype IV EF64101
.....T...- -......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 289
.....T...- -......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... wrairi strain CWR AF115378

         100        110        120        130        140        150        160        170        180
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
CGGTAATTCC AGCTCCAATA GCGTATATTA AAGTTGTTGC AGTTAAAAAG CTCGTAGTTG GATTTCTGTT AATTACTT-T ATATAATTTT 233
.......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .........- .......... rat genotype III GQ121026
.......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ...A.T..A. .......A.- 293
.......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ...A.T..A. .......A.- deer mouse genotype IV EF64101
.......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ...A.T..A. .......A.- 289
.......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ...A.T..A. .......A.- wrairi strain CWR AF115378

         190        200        210        220        230        240        250        260        270
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
ACACTTTTTT GTGTAGTTAT -ATAGTATTA ACATAATTCA TATTACTAT- ---TTTT-AG TATAT--GAA ATTTTACTTT GAGAAAATTA 233
.......C-- .......... -......... .......... .........- ---....-.. .....--... .......... .......... rat genotype III GQ121026
----...G- --A..T.... -...A..... .......... ........A- -TT..A.T.. .....--... .......... .......... 293
----...A. TAA..T.... -...A..... .......... ........AA TTT..A.T.. .....--... .......... .......... deer mouse genotype IV EF64101
----...-GA AGA..T.... -...A..... .......... .........A T--....-.. .....--... .......... .......... 289
----...-GA AAA..T.... -...A..... .......... .........A TAT....-.. .....--... .......... .......... wrairi strain CWR AF115378

         280        290        300        310        320        330        340        350        360
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
GAGTGCTTAA AGCAGGCTTT TGCCTTGAAT ACTTCAGCAT GGAATAATAA TTAAAGATTT TTATCTTTCT TTTATTGGTT CTAAGATAAA 233
.......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .--....... .......... rat genotype III GQ121026
.......... .......A.. .......... ...C...... .........- .A........ ........T. .--....... .......... 293
.......... .......A.. .......... ...C...... .........- .A........ ........T. .--....... .......... deer mouse genotype IV EF64101
.......... .......A.A C......... ...C...... .........- .......... .......... .--....... .........G 289
.......... .......A.A .......... ...C...... .........- .......... .......... .--....... .........G wrairi strain CWR AF115378

         370        380        390        400        410        420        430        440        450
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
AATAATGATT AATAGGGACA GTTGGGGGCA TTTGTATTTA ACAGTTAGAG GTGAAATTCT TAGATTTGTT AAAGACAAAC TAGTGCGAAA 233
.......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... rat genotype III GQ121026
.......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 293
.......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... deer mouse genotype IV EF64101
.......... .......... .......... .......... .....C.... .......... .......... .......... .......... 289
.......... .......... .......... .......... .....C.... .......... .......... .......... .......... wrairi strain CWR AF115378

         460        470        480        490        500        510
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ...
GCATTTGCCA AGGATGTTTT CATTAATCAA GAACGAAAGT TAGGGGATCG AAGACGATCA GAT                              233
.......... .......... .......... .......... .......... .......... ...                              rat genotype III GQ121026
.......... .......... .......... .......... .......... .......... ...                              293
.......... .......... .......... .......... .......... .......... ...                              deer mouse genotype IV EF64101
.......... .......... .......... .......... .......... .......... ...                              289
.......... .......... .......... .......... .......... .......... ...                              wrairi strain CWR AF115378
```

Figura 45 – Alinhamento das sequências referentes às amostras #233, #293 e #289 com sequências homólogas com as quais houve maior identidade; obtido com o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*. Observar transições, inserções e deleções de nucleotídeos. (A régua é meramente ilustrativa e não corresponde ao posicionamento real dos nucleotídeos no gene) – São Paulo - 2011

Detalhes da identificação dos espécimes hospedeiros, bem como localidade de procedência, origem (*in situ* ou *ex situ*) e os respectivos resultados frente à caracterização molecular podem ser verificados a seguir, no quadro 10.

Identificação das espécies hospedeiras					Identificação molecular dos isolados de *Cryptosporidium* spp. e/ou *Giardia duodenalis*
Número da amostra	Espécie	Nome comum	Local de coleta	Origem *in situ/ex situ*	
#05	*Oecomys* cf. *catherinae*	Rato-do-mato	1	*in situ*	*Cryptosporidium wrairi*
#233	*Pithecia* sp.	Macaco-parauacu	2	*in situ*	*Cryptosporidium* sp. *rat genotype* III
#246	*Myocastor coypus*	Ratão-do-banhado	4	*ex situ*	*Cryptosporidium wrairi* / *Giardia duodenalis* AI
#248	*Myocastor coypus*	Ratão-do-banhado	4	*ex situ*	*Giardia duodenalis* AI
#289	*Monodelphis domestica*	Cuíca	5	*in situ*	*Cryptosporidium wrairi*
#293	*Alouatta caraya*	Bugio-preto	1	*ex situ*	*Cryptosporidium* sp. *deer mouse genotype* IV
#301	*Myocastor coypus*	Ratão-do-banhado	4	*ex situ*	*Giardia duodenalis* AI
#302	*Myocastor coypus*	Ratão-do-banhado	4	*ex situ*	*Giardia duodenalis* AI
#318	*Myocastor coypus*	Ratão-do-banhado	4	*ex situ*	*Giardia duodenalis* AI
#329	*Alouatta caraya*	Bugio-preto	4	*ex situ*	*Giardia duodenalis* AI
#335	*Leopardus pardalis*	Jaguatirica	4	*ex situ*	*Giardia duodenalis* AI
#348	*Cerdocyon thous*	Cachorro-do-mato	4	*ex situ*	*Giardia duodenalis* D
#396	*Myocastor coypus*	Ratão-do-banhado	4	*ex situ*	*Giardia duodenalis* AI
#411	*Tapirus terrestris*	Anta	4	*ex situ*	*Giardia duodenalis* AI
#434	*Hydrochoerus hydrochaeris*	Capivara	4	*in situ*	*Cryptosporidium wrairi*
#440	*Hydrochoerus hydrochaeris*	Capivara	4	*in situ*	*Cryptosporidium wrairi*
#445	*Hydrochoerus hydrochaeris*	Capivara	4	*in situ*	*Cryptosporidium wrairi*
#451	*Hydrochoerus hydrochaeris*	Capivara	4	*in situ*	*Cryptosporidium wrairi*
#455	*Hydrochoerus hydrochaeris*	Capivara	4	*in situ*	*Cryptosporidium wrairi*

1= ADA PCH Anhanguera, SP; 2= Margens do Rio Madeira, RO; 3= CRAS PET, SP; 4= RBV ITAIPU Binacional, PR; 5= Fazenda Nhumirim – EMBRAPA Pantanal, MS

Quadro 10 – Detalhes da identificação dos espécimes hospedeiros, locais de coleta e origem das amostras e identificação molecular dos respectivos isolados de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. – São Paulo - 2011

5.2.4.3 Inferências Filogenéticas

Devido aos isolados de *Giardia duodenalis* obtidos no presente estudo terem demonstrado 100% de identidade com genótipos descritos em literatura e serem significativamente similares entre si, a reconstrução filogenética foi considerada desnecessária para este táxon.

Para os isolados de *Cryptosporidium* spp., as inferências filogenéticas foram atribuídas conforme descrições a seguir.

As sequências de nucleotídeos referentes às amostras #05, #246, #289, #434, #440, #445, #451 e #455 foram consideradas idênticas entre si. Desta forma, uma única sequência (#289) foi selecionada para representar as demais nas análises filogenéticas.

Sendo assim, as inferências filogenéticas foram baseadas na comparação das sequências das amostras #289, #233 e #293 (sendo as duas últimas diferentes de todas as demais e entre si) com sequências homólogas disponíveis no *GenBank*. Uma sequência de *Cryptosporidium muris* disponível nesta mesma base de dados foi utilizada como *outgroup*. A árvore gerada se encontra a seguir (Figura 46).

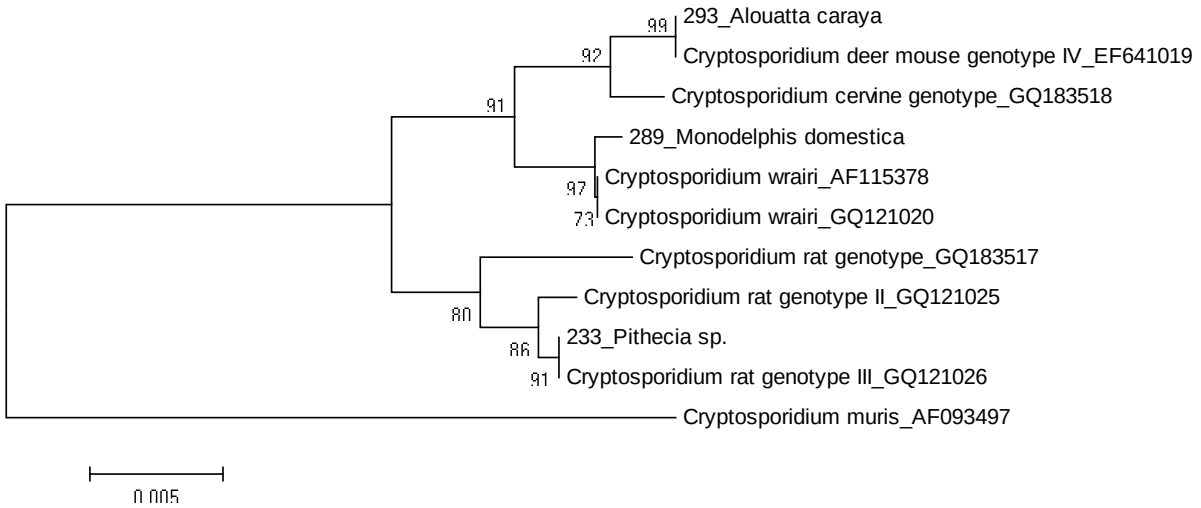


Figura 46 - Árvore filogenética enraizada gerada a partir de sequências do gene SSU rDNA de isolados de *Cryptosporidium* spp., inferida por método de distância com o algoritmo *Neighbor-Joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *Maximum Composite Likelihood*, construída com auxílio do programa MEGA 5.0.

As amostras utilizadas na topologia da árvore filogenética formaram um grupo monofilético com evidente hierarquia cladística sustentada por consistentes valores de *bootstrap*. Deste modo, foram evidenciados dois clados principais (valores de *bootstrap* iguais a 91 e 80), nos quais nota-se a formação de dicotomias.

As amostras #293 e #289 foram agrupadas no mesmo clado, todavia separadas por altos valores de *bootstrap* (92 e 97) em dois grupamentos distintos. A

amostra #293, de bugio-preto *Alouatta caraya*, permaneceu agrupada com o genótipo *Cryptosporidium* sp. *deer mouse genotype* IV, com consistente suporte estatístico (valor de *bootstrap* 99); assim como a amostra #289, de cuíca *Monodelphis domestica*, foi agrupada com *Cryptosporidium wrairi*, com valor de *bootstrap* de 97. Tais resultados revelam elevada convergência evolutiva entre as sequências analisadas.

No segundo clado, nota-se ramificações indicativas de possíveis divergências evolutivas entre sequências aparentemente similares. Todavia, a amostra #233, procedente de macaco-parauacu *Pithecia* sp., apresenta-se no mesmo grupamento que o genótipo *Cryptosporidium* sp. *rat genotype* III, com elevado valor de *bootstrap* (91).

5.2.4.4 Subgenotipagem de isolados de Giardia duodenalis

De acordo com Cacciò et al. (2008), uma avaliação molecular direcionada a determinados sítios de certos genes (GDH, β-giardina e tpi) utilizados na amplificação de isolados de *Giardia duodenalis* permitiria notar variações genéticas capazes de indicar níveis intra-*assemblage* nos genótipos A e B do protozoário, considerados zoonóticos. Esta subgenotipagem multilocus funcionaria como mais um parâmetro para as especulações acerca da espécie-especificidade do parasita.

Com base neste princípio, as amostras avaliadas no presente estudo cujos isolados de *Giardia* foram caracterizados como *Giardia duodenalis* genótipo AI (amostras #246, #248, #301, #302, #318, #329, #335, #396 e #411) foram submetidas à subgenotipagem.

Por meio da avaliação das sequências obtidas com a amplificação do gene GDH, as amostras #248, #318, #329, #396 e #411 foram caracterizadas como do subgenótipo A5, diferenciando-se do A1 somente devido à presença da base nitrogenada G no nucleotídeo da posição 946. Segundo Cacciò et al. (2008), a classificação A5 para o gene GDH identifica estas amostras como *Giardia duodenalis* AI-2.

Para as amostras cujas sequências foram derivadas da amplificação do gene β-giardina, os sítios variáveis foram semelhantes aos descritos para os subgenótipos A1, A2 e A4 entre os nucleotídeos 162 e 429, entretanto, devido à presença da base nitrogenada C na posição 444, estas amostras não foram correspondentes a nenhuma das descritas em literatura, inviabilizando a subgenotipagem.

DISCUSSÃO

Tapirus terrestris
RBV, Itaipu Binacional
Imagem: Renata C. F. Santos

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foram avaliadas 452 amostras fecais procedentes de mamíferos neotropicais de sete localidades distintas. A amostragem compreendeu 52 diferentes espécies de animais da mastofauna brasileira, classificadas em 22 famílias de oito ordens da classe Mammalia. As coletas foram realizadas *in situ* e *ex situ*, em quatro diferentes biomas terrestres (Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal e Amazônia).

Tais amostras foram submetidas a diagnóstico microscópico para detecção dos protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. Em caso de positividade, foi realizado diagnóstico molecular e subsequente sequenciamento dos produtos amplificados para caracterização genotípica e inferências filogenéticas.

As amostras designadas como *grupo A* (n=109), sabidamente positivas na microscopia, apresentaram resultados insatisfatórios no diagnóstico molecular. As demais 343 amostras (*grupo B*) apresentaram resultados compatíveis com relatos de literatura, bem como resultados inéditos, sendo avaliadas perante aspectos epidemiológicos e ecológicos possivelmente envolvidos na infecção de mamíferos silvestres.

Esta abordagem demonstrou-se relevante para sugerir hipóteses referentes à infecção de mamíferos neotropicais de diferentes nichos ecológicos e em habitats distintos, bem como para promover informações a respeito da participação destes animais no ciclo epidemiológico das protozooses em questão e, consequentemente, da sua importância para a saúde pública, animal e ambiental.

6.1 DIAGNÓSTICO DE *Giardia* E/OU *Cryptosporidium* EM AMOSTRAS FECAIS

O material fecal é o substrato biológico mais amplamente utilizado no diagnóstico de enteroparasitas, de modo que métodos apropriados de coleta e armazenamento de amostras fecais devem ser requeridos no intuito de se obter confiabilidade nos resultados de diversas técnicas diagnósticas.

As amostras fecais podem ser preservadas com e sem conservantes, dadas circunstâncias particulares, nas quais a presença de determinadas substâncias pode prejudicar a detecção do agente (FAYER; XIAO, 2008). Os conservantes mais comumente utilizados são formalina tamponada a 10%, solução de mertiolate, iodo e formaldeído (MIF), solução de acetato de sódio, ácido acético e formaldeído (SAF), álcool polivinílico (PVA) ou solução de dicromato de potássio a 2,5% ($K_2Cr_2O_7$) (SRETER; VARGA, 2000; SAMUEL; PYBUS; KOCAN, 2001; FAYER; XIAO, 2008; LINDSAY; BLAGBURN, 2008).

As amostras preservadas em solução de dicromato de potássio a 2,5% devem ser mantidas refrigeradas a 4°C até a data de processamento. Este protocolo permite a conservação da viabilidade de oocistos de *Cryptosporidium* por seis a nove meses, alguns podendo manter a infectividade por até um ano (SRETER; VARGA, 2000; FAYER; XIAO, 2008). Em estudo referente às propriedades físico-químicas de oocistos de *Cryptosporidium* frente a diferentes métodos de preservação, o tratamento com solução de dicromato de potássio a 2,5% a 4°C foi o menos danoso à morfologia, permeabilidade e viabilidade dos oocistos, sendo também considerado o mais apropriado quando se pretende realizar subsequente PCR (método no qual conservantes com formaldeído atuam como inibidores) (INOUE et al., 2006; FAYER; XIAO, 2008). Wilke e Robertson (2009) descreveram este mesmo método como o que apresentou melhores resultados na preservação de cistos de *Giardia* sp.

Por outro lado, o dicromato de potássio, assim como o acetato de sódio, podem alterar a antigenicidade da parede externa dos oocistos, afetando a ligação com determinados anticorpos e inviabilizando a realização de certas técnicas imunológicas, devendo ser evitado nestes casos (SAMUEL; PYBUS; KOCAN, 2001).

Da mesma forma, a maioria das técnicas de coloração de oocistos de *Cryptosporidium* não podem ser realizadas em amostras preservadas em PVA (FAYER; XIAO, 2008).

O congelamento *in natura* de amostras fecais para posterior avaliação é uma prática utilizada por diversos pesquisadores (BROOK et al., 2008). Todavia, estudos relatam que o congelamento pode fragilizar as paredes dos cistos e oocistos e alterar sua densidade específica, além de favorecer a aderência destes aos debris fecais, o que inviabilizaria o processamento da amostra pelas principais técnicas diagnósticas utilizadas (INOUE et al., 2006). Uma possível ruptura do cisto ou oocisto poderia acarretar, ainda, na liberação de seu DNA e consequente desnaturação deste devido a ação de DNAses, ricamente presentes no material fecal, assim como outros importantes inibidores. Isto impossibilitaria a realização de técnicas moleculares de diagnóstico e posterior sequenciamento (BINGHAM; JARROLL JR; MEYER, 1979; INOUE et al., 2006; ORTEGA-PIERRES et al., 2009b).

A julgar pelo número de diferentes protocolos de extração de ácido nucléico e de amplificação utilizados no presente estudo para as amostras mantidas congeladas previamente ao diagnóstico molecular (*grupo A*), faz-se importante ponderar a possibilidade de o congelamento *in natura* ter danificado as formas infectantes dos protozoários (cistos e oocistos).

Estudos desenvolvidos com o intuito de demonstrar a viabilidade de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* submetidos a diferentes protocolos comprovam que, apesar da expressiva resistência ambiental, existem fatores capazes de influenciar negativamente a manutenção da integridade dos micro-organismos, sendo os principais as baixas e altas temperaturas e o longo período de exposição a estas (RHEE; PARK, 1996; KIM; HEALEY, 2001; EL MANSOURY et al., 2004; NEUMAYEROVÁ; KOUDELA, 2008; REINOSO; BECARES; SMITH, 2008).

Fayer e Nerad (1996), procurando avaliar o efeito de baixas temperaturas na viabilidade de oocistos de *Cryptosporidium*, submeteram oocistos de *C. parvum* a diferentes protocolos de armazenamento, realizando, em seguida, inoculação experimental em filhotes de camundongos imunossuprimidos. Foram considerados viáveis os oocistos capazes de se multiplicar no tecido dos camundongos, atributo

constatado por meio da visualização microscópica de estágios de desenvolvimento do coccídio em cortes histológicos. Os oocistos foram considerados inviáveis após armazenamento a -15°C por 168 horas, a -20°C por 24 horas, bem como a -70°C por uma hora. Os oocistos foram purificados previamente ao armazenamento.

Kim e Healey (2001) avaliaram a viabilidade de *C. parvum* submetido a temperaturas de -20°C e -80°C por diferentes períodos (dois, sete e 30 dias) em oocistos purificados e não purificados (sendo estes armazenados na presença de fezes), suspensos em água destilada, glicerina a 10% ou dicromato de potássio a 2,5%. Os melhores resultados de viabilidade e infetividade foram obtidos com os oocistos armazenados a -20°C no material fecal, sendo que 11,7 a 34% dos oocistos permaneceram viáveis após o período máximo de armazenamento testado (30 dias). Sob temperatura de -80°C, constatou-se que os oocistos se tornaram inviáveis já no período de dois dias, perante qualquer um dos métodos e conservantes utilizados na pesquisa.

Morimoto et al. (2001) sugeriram, ainda, que o tempo de estocagem, mesmo que em temperaturas não tão extremas, pode ser um fator crucial na conservação dos micro-organismos. Segundo Dickerson et al. (1991), cistos de *Giardia* suspensos em solução salina tornam-se inviáveis após poucos dias de criopreservação.

Tais estudos poderiam justificar os resultados insatisfatórios obtidos com as amostras do *grupo A*, armazenadas a -80°C por períodos de até três anos antes da realização do diagnóstico molecular.

Ainda assim, considerando a possibilidade de os cistos e os oocistos permanecerem íntegros (mesmo que com o potencial de infectividade reduzido ou anulado) após a estocagem e sabendo que a carga parasitária de mamíferos silvestres infectados por *Giardia* e/ou *Cryptosporidium* é significativamente menor quando comparada a de mamíferos domésticos (SAMUEL; PYBUS; KOCAN, 2001; FAYER; XIAO, 2008), técnicas diagnósticas de superior sensibilidade analítica foram utilizadas no presente estudo. Neste contexto, optou-se pela *Nested* PCR, que além de mais sensível, contribui para a diluição de potenciais inibidores existentes no

material fecal por incluir uma segunda etapa de amplificação (MCORIST; JACKSON; BIRD, 2002).

Estudos relatam que a *Nested* PCR é o método mais adequado para a amplificação de amostras com reduzidas quantidades de cistos de *Giardia* ou oocistos de *Cryptosporidium* e, consequentemente, de material genético (GIBBONS; AWAD-EL-KARIEM, 1999; MILLER; STERLING, 2007).

Miller e Sterling (2007) demonstraram alta sensibilidade da técnica na amplificação de DNA de *Giardia duodenalis* em amostras cujos cistos foram quantificados microscopicamente. Os resultados revelaram taxas de amplificação de 100% para amostras com 10, 7, 5 e 4 cistos, 94% para 3 cistos, 90% para 2 e 80% para amostras com um único cisto, sendo estes acondicionados em solução tampão e submetidos a cinco sessões de congelamento e descongelamento previamente às etapas de amplificação.

Entretanto, não foi o que se observou no presente estudo, no qual amostras com até cinco cistos (amostras #55, #92, #234, #268, #273, #284 e #291) ou oocistos (amostras #74, #90, #228, #234, #248 e #288) não tiveram resultados satisfatórios com a *Nested* PCR. Cabe ressaltar que as condições ótimas de manipulação de cistos no estudo de Miller e Sterling (2007) não condizem com as situações reais de diagnóstico, nas quais pode haver perda de cistos/oocistos em várias etapas do processamento da amostra, desde o diagnóstico microscópico até o término dos protocolos de extração de DNA.

A obtenção de resultados negativos na *Nested* PCR de amostras com reduzida quantidade de oocistos de *Cryptosporidium* ou cistos de *Giardia* foi também relatada por Huetink et al. (2001) e Silva (2010), estudos que corroboram com os resultados descritos na pesquisa em tela. Deste modo, a combinação de resultados positivos na microscopia e negativos na *Nested* PCR foi atribuída ao reduzido número de cistos e/ou oocistos presentes nas amostras avaliadas, para ambos os protozoários estudados.

Vale notar que, previamente à realização do diagnóstico molecular nas amostras do *grupo B*, o diagnóstico microscópico foi realizado por meio da técnica de centrífugo-flutuação em solução hipersaturada de sacarose, que possibilita a

concentração e purificação dos cistos e/ou oocistos dos protozoários, separando-os dos debris fecais e, consequentemente, favorecendo a sensibilidade diagnóstica de técnicas moleculares aplicadas em seguida (DRYDEN; PAYNE; SMITH, 2006; EL-NAGGAR et al., 2006; NAKAMURA et al., 2009).

A escolha dos genes alvo e iniciadores (*primers*) envolvidos nas reações de amplificação são também de importância fundamental para a sensibilidade e especificidade de determinadas técnicas moleculares e, consequentemente, para o sucesso das reações (WIELINGA; THOMPSON, 2007).

A amplificação do gene GDH para isolados de *Giardia* spp. permite a diferenciação entre as sete linhagens genéticas principais (agrupamentos A a G) e os subgrupos (AI, AII, BIII e BIV) que compõe a espécie designada como *Giardia duodenalis* (WIELINGA; THOMPSON, 2007). Os *primers* utilizados no presente estudo para amplificação deste gene, desenvolvidos por Souza et al. (2007) demonstraram, ainda, superior desempenho quando comparados aos relatados por Monis (1996), sendo este amplamente utilizado na caracterização molecular do agente em estudos anteriores (SOUZA, 2007).

Já a amplificação do gene β-giardina é especialmente indicada para a distinção entre os agrupamentos responsáveis pela infecção em humanos (A e B), também detectados em amostras de animais, sendo os mais relevantes no contexto zoonótico da transmissão do protozoário (CACCIÒ; DE GIACOMO; POZIO, 2002; LALLE et al., 2005). Deste modo, infecções causadas pelos demais genótipos do parasita flagelado seriam pobremente identificadas por técnicas moleculares baseadas na amplificação deste gene (BAQUE et al., 2011), o que corrobora com o resultado negativo da *Nested* PCR com o gene β-giardina para o isolado de cachorro-do-mato *Cerdocyon thous*, caracterizado como *Giardia duodenalis* genótipo D no presente estudo, e cuja avaliação microscópica semiquantitativa revelou um número de cistos superior a 50 (“++++”).

Em paralelo, cabe ressaltar que ambos os genes utilizados (GDH e β-giardina) são menos conservados e abrangem regiões polimórficas capazes de identificar e amplificar o DNA de isolados de *Giardia duodenalis*, mas são pouco eficientes para distinguir outras espécies do gênero *Giardia* (WIELINGA;

THOMPSON, 2007; BAQUE et al., 2011), como *Giardia muris* e *Giardia microti,* ambas descritas em roedores e possivelmente responsáveis pela infecção nas amostras #273 e #291, de rato-do-mato *Oecomys mamorae*, e #284 de rato-do-espinho *Clyomys laticeps*, positivas na microscopia com "+" na avaliação semiquantitativa e negativas na *Nested* PCR para ambos os genes.

Para tanto, seria necessária a aplicação do gene SSU rDNA, mais conservado e, consequentemente, menos específico. Entretanto, devido a sua natureza altamente conservada, seu uso não permite a distinção entre os diferentes genótipos de *G. duodenalis*, espécie mais esperada em infecções de mamíferos, bem como apresenta difícil aplicação. Por estes motivos, seu uso foi gradativamente substituído pelo do gene GDH, que demonstra expressivo sucesso na caracterização molecular de isolados de *Giardia* provenientes de amostras humanas e de ampla variedade de mamíferos domésticos e silvestres (READ; MONIS; THOMPSON, 2004).

No presente estudo, houve três diferentes tentativas de amplificação do gene SSU rDNA nas amostras positivas para *Giardia* spp. na microscopia e negativas nas *Nested* PCR baseadas na amplificação dos genes GDH e β-giardina. Contudo, os dados não foram incluídos nesta dissertação devido aos inconsistentes resultados obtidos.

Por outro lado, para isolados de *Cryptosporidium* spp. o uso do gene SSU rDNA demonstrou resultados expressivamente satisfatórios, proporcionando, inclusive, o sequenciamento molecular e diferenciação interespecífica do protozoário para todas as amostras positivas na *Nested* PCR.

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, nos quais a comparação entre GDH e β-giardina demonstrou distintas propriedades e moderada concordância, sugere-se, para a amplificação de isolados de *Giardia* spp., uma abordagem multilocus, sustentada pela combinação de resultados de ao menos dois diferentes genes.

6.2 OCORRÊNCIA DOS PROTOZOÁRIOS EM MAMÍFEROS NEOTROPICAIS

A dificuldade de controlar as variáveis de espécie, sexo, grupo etário, dentre outras quando se lida com animais silvestres, especialmente de vida livre, é uma limitante comum e, na maioria dos casos, inevitável aos estudos desta natureza, devendo ser ponderada desde o início (PAULA; FERREIRA, 2007). Geralmente, tem-se uma amostragem desbalanceada, um problema inerente à estratégia de coleta de amostras conforme viabilidade e conveniência (KAPS; LAMBERSON, 2004). Este estudo não foi uma exceção e a estratégia de amostragem por conveniência foi a única abordagem viável para maximizar o número de amostras analisado. Em razão disto, todas as comparações de prevalência aparente devem ser consideradas levando-se em conta tal desbalanceamento amostral, e quaisquer conclusões devem ser ponderadas como preliminares e sugestivas, e não como conclusões definitivas.

Pode-se notar, por exemplo, que os animais de cativeiro foram, em sua maioria, procedentes do bioma Mata Atlântica, enquanto as amostras coletadas *in situ* compreenderam também animais da Amazônia, Cerrado e Pantanal. Assim sendo, comparações de ocorrência entre cativeiro e natureza poderiam levar a falsa interpretação de que a frequência dos parasitas decorre de diferenças no ambiente cativo/natural, quando na verdade seria resultante de diferenças de suscetibilidade entre espécimes de biomas distintos. A recíproca é também verdadeira, assim como as demais explanações acerca das comparações entre quaisquer categorias, que devem ser cautelosas.

Do ponto de vista ecológico, é importante ressaltar que a amostragem obtida é bastante expressiva quando se considera o número de espécies de mamíferos ao qual se teve acesso (52 diferentes espécies), o que representa em torno de 8% das aproximadamente 680 espécies conhecidas para o Brasil (REIS et al., 2006; REIS; PERACCHI; SANTOS, 2008; REIS et al., 2011). Além disso, cabe observar que as espécies amostradas são representantes de oito diferentes ordens da Classe Mammalia, que possui 12 ordens de ocorrência natural do país, e em quatro dos

seis biomas terrestres brasileiros (REIS; PERACCHI; SANTOS, 2008; BRASIL, 2010), o que faz do presente estudo bastante abrangente.

Considerando os fatores sobrecitados, os resultados obtidos para as frequências de ocorrência dos parasitas *Giardia* e *Cryptosporidium* no *grupo B* de amostras foram considerados baixos e corroboram com um série de relatos da literatura (BURTON et al., 2010; SHI et al., 2010; ABU SAMRA et al., 2011). Todavia, conforme descrito anteriormente, os números encontrados na bibliografia disponível são bastante variáveis e não está claro quais são os aspectos responsáveis por esta expressiva variação (espécies hospedeiras, localização geográfica, preferências alimentares, sazonalidade ou se seria um artefato decorrente das técnicas de amostragem e diagnóstico utilizadas) (APPELBEE; THOMPSON; OLSON, 2005).

Esta diferença é evidente inclusive ao comparar a ocorrência encontrada para *Cryptosporidium* no *grupo A* de amostras fecais (34,90%), todas procedentes de uma única localidade (RBV, Itaipu Binacional, Foz do Iguaçu, PR), e no *grupo B* (4,22%), considerando somente as amostras desta mesma localidade (n=185). Neste caso, os fatores “espécies hospedeiras”, “localização geográfica” e as demais variáveis que derivem destes fatores principais (como guildas tróficas e biomas) poderiam ser descartados. A variação de ocorrência encontrada para o coccídio ficaria a critério de outros aspectos, como sazonalidade ou técnicas de amostragem e de diagnóstico aplicadas.

Cabe ressaltar que por se tratarem de amostras procedentes de animais cativos na sua maioria, fatores como monitoramento parasitário do plantel e suspeitas clínicas podem ter guiado a amostragem ao longo do período de três anos para as amostras do *grupo A*, cedidas para o presente estudo. Isto não ocorreu nas amostras do *grupo B*, para as quais a amostragem foi pontual e envolveu 100% do plantel de mamíferos silvestres mantidos na instituição (plantel do criadouro, zoológico e complexo hospital veterinário – quarentenário), bem como abrangeu a coleta de amostras provenientes de animais de vida livre, que coabitam a região.

Por outro lado, ao considerar todas as amostras do *grupo B* (n=343), evidenciou-se que fatores como espécies hospedeiras, localização geográfica, preferências alimentares e estratégias de uso do habitat podem ser caracteres

significantes na epidemiologia dos protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium*. Além disso, notou-se que apesar de frequentemente pesquisados em paralelo em decorrência de uma série de características similares, os referidos parasitas podem ocorrer de maneiras divergentes em populações de mamíferos silvestres.

No estudo da relação entre guildas tróficas e a ocorrência de dados protozoários, o hábito especialista de frugivorismo foi considerado como marginalmente significativo para a ocorrência de *Cryptosporidium*. Esperava-se que o carnivorismo tivesse maior relevância na transmissão dos protozoários, visto que a veiculação mecânica, por meio da ingestão de presas infectadas, poderia ser um fator indulgente (SAMUEL; PYBUS; KOCAN, 2001).

A relação entre a ingestão de certos itens na dieta alimentar e a ocorrência de determinados parasitas em espécies da fauna silvestre foi proposta por Bush et al. (2001b). Os relatos de infecção por *Cryptosporidium* por meio da ingestão de alimentos contaminados com oocistos são comuns, sendo especialmente relacionados a frutas e vegetais. No entanto, a maioria de tais descrições decorre da contaminação ambiental de sitemas de agricultura por meio da irrigação com água contaminada com oocistos do coccídio (DUFFY; MORIARTY, 2003; BAJER, 2008; FAYER; XIAO, 2008). Deste modo, a utilização de água contaminada para a higienização de alimentos poderia justificar os casos de infecção por *Cryptosporidium* em espécimes frugívoros mantidos em cativeiro no estudo em tela. Já a contaminação de elementos utilizados na dieta de mamíferos frugívoros na natureza poderia estar relacionada à dispersão do micro-organismo por meio de fômites, como invertebrados e aves (FAYER; XIAO, 2008), o que precisaria ser avaliado com cautela.

De qualquer forma, a contaminação ambiental é predominantemente atribuída a espécies zoonóticas do coccídio, sendo dificilmente relacionada às espécies hospedeiro-específicas do agente (ORTEGA-PIERRES et al., 2009b), e foram estas as isoladas em todos os casos relatados no presente estudo. Sendo assim, se faz necessário cruzar informações referentes às amostras positivas, de modo que seja viável demonstrar quais variáveis seriam mais relevantes para a ocorrência do protozoário, bem como aprofundar futuras pesquisas com este perfil.

Segundo Wunderle Jr. (1997) os animais frugívoros são significativamente importantes na regeneração de áreas florestais degradadas, bem como na manutenção de determinados ecossistemas por atuarem como dispersores de sementes. Deste modo, determinados impactos nas populações de animais frugívoros podem implicar diretamente na conservação de toda a biodiversidade local (GALETTI; PIZO; MORELLATO, 2004). Considerando a relevância do papel de animais frugívoros na manutenção de paisagens e ecossistemas, vê-se como extremamente apropriada a estratégia de adaptação de determinados parasitas a este grupo de animais.

Quanto às espécies hospedeiras, o coccídio *Cryptosporidium* foi mais prevalente em indivíduos da ordem Rodentia (resultado também avaliado como marginalmente significativo). Estudos acerca da ocorrência de *Cryptosporidium* em populações de roedores, ordem de mamíferos mais abundante e ubíqua, relatam que estes poderiam representar importantes dispersores do coccídio, sendo frequentemente descritos como reservatórios para a criptosporidiose humana e animal (BAJER; BEDNARSKA; SINSKI, 1997, 2001). Mais de 40 espécies da ordem Rodentia das famílias Cricetidae, Erethizontidae, Myocastoridae, Caviidae, Sciuridae, Muridae, Castoridae, Geomyidae, Hystricidae, Chinchilidae, dentre outras já foram relatadas como hospedeiras de *Cryptosporidium* spp. (FAYER; XIAO, 2008; FENG et al., 2011), podendo ser infectadas tanto por espécies zoonóticas (como *C. parvum*), quanto por espécies (*C. muris*) e genótipos (*Cryptosporidium mouse genotype* I, etc) específicos do agente (FENG et al., 2011). Segundo Torres et al. (2000), o protozoário ocorre em roedores mesmo em áreas não coabitadas por humanos ou animais domésticos.

No presente estudo, foi significativamente maior a ocorrência deste mesmo protozoário em animais de hábito semiaquático (12%), o que poderia ser facilmente justificado pela importância da contaminação ambiental e relevância da veiculação hídrica na disseminação do micro-organismo (SAMUEL; PYBUS; KOCAN, 2001; ORTEGA-PIERRES et al., 2009b). Assim sendo, a coexistência e estreita relação entre parasita e hospedeiro no mesmo ambiente poderiam favorecer o processo de adaptação.

O número de espécimes de hábito semiaquático positivos para *Giardia* foi também elevado (10%), todavia considerado não significativo. As principais espécies envolvidas nesse contexto foram capivara *Hydrochoerus hydrochaeris* (5/41), positivas para *Cryptosporidium*, e ratão-do-banhado *Myocastor coypus* (7/12), positivas para *Giardia*.

Quanto à espécie *Myocastor coypus*, compete acrescentar a informação de que relatos recentes sugerem a possibilidade desta ter sido introduzida no estado de São Paulo (REIS et al., 2011), não correspondendo à mastofauna natural desta localidade. Isto desclassificaria as duas amostras procedentes de indivíduos desta espécie como de origem *in situ* quando coletadas no referido estado, conforme os critérios adotados para categorização das amostras (subitem 4.1.1). Contudo, tal informação é considerada inconsistente e é baseada na falta de registros anteriores da espécie no estado (REIS et al., 2011). Sendo assim, devido ao significativo número de amostras procedentes de indivíduos da espécie ratão-do-banhado *Myocastor coypus* positivos para os parasitas estudados, especialmente para *Giardia* spp., em outras localidades, as duas amostras obtidas por meio de exame necroscópico de *Myocastor coypus* oriundos da Serra do Mar do estado de São Paulo (bioma Mata Atlântica) foram mantidas no presente estudo como amostras *in situ*. Ambas foram negativas para os protozoários sob diagnóstico microscópico.

Assim como no estudo de Torres et al. (2000), fatores intrínsecos relacionados aos espécimes amostrados, como sexo e grupo etário, não foram significativos para a ocorrência dos parasitas. Contudo, os resultados obtidos sugerem que indivíduos filhotes são aparentemente mais suscetíveis à infecção por *Cryptosporidium* (33%), o que não se observou nos casos positivos para *Giardia* (0%).

A evidência de que *Giardia* ocorre com maior assiduidade em animais cativos, enquanto *Cryptosporidium* foi mais prevalente em espécimes amostrados na natureza (resultados estes considerados marginalmente significativos) está em desacordo com os relatos encontrados em literatura, para os quais o ambiente cativo seria favorável para a disseminação de ambos os parasitas (APPELBEE; THOMPSON; OLSON, 2005; FENG, 2010). Tal evento poderia decorrer do desequilíbrio amostral, em contrapartida, fatores como localização geográfica,

espécies hospedeiras e interface com humanos e mamíferos domésticos devem ser conjuntamente considerados, e serão abordados a seguir, nos subitens 6.4 e 6.5.

A ocorrência segundo os locais de coleta foi bastante equilibrada para as áreas cuja amostragem foi superior a cem amostras (3 e 4,22% para *Cryptosporidium* spp. e 4 e 6,33% para *Giardia* spp. na PCH Anhanguera e Refúgio da Itaipu Binacional, respectivamente). Já os resultados obtidos para a Fazenda Nhumirim, Pantanal, MS, foram evidentemente superiores (8% para *Cryptosporidium* spp. e 12% para *Giardia* spp.), sugerindo uma aparente maior ocorrência para ambos os protozoários. Tal evento poderia ser um artefato da amostragem, bem como estar relacionado a aspectos ecológicos e ambientais da localidade, sendo atribuído, por exemplo, ao fato de a coleta de amostras ter ocorrido em período de seca, no qual o acesso à água pelos animais se restringe a pequenas baías naturais e piletas artificiais oferecidas pelos produtores ao gado, o que poderia refletir no adensamento de cistos/oocistos nas fontes de água e consequente maior risco de infecção.

Quanto aos achados referentes à carga parasitária, o fato de esta ser mais elevada em animais cativos não foi surpreendente, visto que tal ambiente e a cronicidade da exposição aos agentes parasitários propiciam a manutenção destes no plantel. Deve-se lembrar que a excreção de cistos/oocistos nas fezes dos indivíduos infectados ocorre de maneira intermitente, de modo que uma amostragem periódica do plantel ilustraria mais fielmente o perfil da eliminação de parasitas pelos hospedeiros.

6.3 CASO PARTICULAR: BUGIO-PRETO *Alouatta caraya* (AMOSTRAS #21 E #296)

Alguns primatas não humanos, especialmente os do gênero *Alouatta*, são aparentemente mais sensíveis às infecções por *Giardia* do que animais de outras ordens. Os casos de infecção assintomática são bastante comuns, entretanto, em situações de estresse e imunossupressão, estes animais podem apresentar severos

quadros clínicos. Sinais clínicos já observados envolvem marcante diarréia, apatia, letargia, fraqueza, desidratação intensa, perda gradativa de peso e anorexia (SAMUEL; PYBUS; KOCAN, 2001; GENOY-PUERTO et al., 2010).

Casos de óbito em bugio-preto *Alouatta caraya* decorrentes de infecção por protozoários gastrointestinais (*Giardia* sp. e *Entamoeba* sp.) foram descritos em animais mantidos em observação durante três a cinco meses após captura, sendo esta decorrente de programa de resgate de fauna (GENOY-PUERTO et al., 2010).

As amostras identificadas com os números #21 e #296 no presente estudo foram provenientes de um mesmo indivíduo de bugio-preto *Alouatta caraya*, uma fêmea jovem procedente da ADA da PCH Anhanguera, localizada nos municípios de São Joaquim da Barra e Guará, SP. A amostra de número #21 foi coletada *in situ*, durante o monitoramento e captura do indivíduo em natureza. Já a amostra de número #296 foi coletada *ex situ*, semanas após a captura do indivíduo, mantido sob observação no Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) provisório, sustentado pela instituição responsável pela construção da pequena central hidrelétrica.

Segundo os resultados obtidos com o diagnóstico microscópico realizado por meio da técnica de centrífugo-flutuação em solução hipersaturada de sacarose, compatíveis com os resultados do diagnóstico molecular (Quadro 7, subitem 5.2.3), o animal apresentava o protozoário *Giardia* spp. nas fezes no momento da captura (amostra #21), quando foi considerado assintomático. Da mesma forma, o protozoário flagelado foi novamente detectado na amostra *ex situ,* de número #296. O animal veio a óbito depois de 144 dias de cativeiro, após observação de severo quadro clínico compatível com doença gastroentérica.

Tal relato é sugestivo de que, em natureza, a relação entre parasita e hospedeiro ocorra de forma equilibrada, sendo a origem da doença provavelmente derivada do estresse e consequente imunossupressão provocados pela manutenção do animal em cativeiro.

Por se tratar de uma doença diretamente relacionada à imunocompetência do hospedeiro, cabe destacar a importância das condições de manejo em cativeiro e da estrutura física de recintos, pois tais fatores podem favorecer não somente a

disseminação e manutenção do protozoário no ambiente, como são capazes de induzir processos imunossupressores cujas consequências poderiam envolver o aparecimento de manifestações clínicas da giardiose e consequente óbito (APPELBEE; THOMPSON; OLSON, 2005; THOMPSON; LYMBERY; SMITH, 2010).

6.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E INFERÊNCIAS FILOGENÉTICAS

Os relatos de infecções por *Giardia* e/ou *Cryptosporidium* em mamíferos silvestres abrangem um amplo número de espécies por todo o mundo, incluindo uma série de descrições em animais da mastofauna brasileira, como gato-maracajá *Leopardus wiedii* (OLIVEIRA et al., 2008), ouriço-cacheiro *Coendou villosus*, rato-do-mato *Akodon sp.* (LALLO et al., 2009), preá *Cavia aperea aperea* (GRESSLER et al., 2010), veado-catingueiro *Mazama gouazoubira* (REGINATTO et al., 2010), gambá-de-orelha-branca *Didelphis albiventris* (ZANETTE et al., 2008), lobo-guará *Chrysocyon brachyurus* (GILIOLI; SILVA, 2000), macaco-prego *Cebus apella*, sagui-do-tufo-branco *Callithrix jacchus*, sagui-do-tufo-preto *Callithrix penicillata* (DA SILVA et al., 2008), dentre outros. Contudo, tais relatos não abrangem a caracterização molecular e identificação de espécies e genótipos dos agentes, o que restringe as especulações a respeito do ciclo epidemiológico e importância de espécies silvestres na transmissão zoonótica dos protozoários.

Estudos envolvendo a genotipagem de isolados de *Giardia* e/ou *Cryptosporidium* em espécies silvestres brasileiras são bastante recentes e escassos e, em sua maioria, relatam a maior ocorrência de genótipos zoonóticos dos parasitas (MEIRELES et al., 2007; SOUZA, 2007; VOLOTÃO et al., 2008; SOARES et al., 2011).

No presente trabalho, os isolados de *Giardia* spp. foram compatíveis com genótipos amplamente descritos na literatura, sendo predominante o genótipo AI, considerado zoonótico. Este foi isolado de quatro diferentes espécies de mamíferos silvestres: ratão-do-banhado *Myocastor coypus*, bugio-preto *Alouatta caraya*, jaguatirica *Leopardus pardalis* e anta *Tapirus terrestris*. O isolado de cachorro-do-

mato *Cerdocyon thous* demonstrou 100% de identidade com o genótipo D, não zoonótico e amplamente relatado na infecção de cães domésticos (SILVA, 2010). Todos os indivíduos a que se referem estes resultados foram de origem *ex situ* e procedentes do Refúgio Biológico Bela Vista, Itaipu Binacional, Foz do Iguaçu, PR.

A identificação de *Giardia duodenalis* genótipo D na amostra de cachorro-do-mato *Cerdocyon thous* sugere que esta espécie é suscetível ao mesmo grupo genético específico do cão doméstico. Deste modo, certos genótipos do protozoário poderiam apresentar especificidade direcionada a determinados grupos de hospedeiros (como por exemplo, por canídeos), enquanto outros aparentemente são mais generalistas (genótipo AI).

As amostras provenientes de animais de vida livre e positivas para *Giardia* spp. tanto na microscopia quanto na *Nested* PCR não apresentaram resultados satisfatórios no sequenciamento molecular, o que restringe as especulações sobre o potencial zoonótico destes isolados.

Os isolados de *Cryptosporidium* demonstraram elevada identidade com genótipos não zoonóticos e espécimes provenientes de localidades semelhantes apresentaram genótipos diferentes do coccídio. Foi o caso de rato-do-mato *Oecomys* cf. *catherinae*, positivo para *Cryptosporidium wrairi*, e bugio-preto *Alouatta caraya*, positivo para *Cryptosporidium* sp. *deer mouse genotype* IV, ambos procedentes da ADA da PCH Anhanguera, São Joaquim da Barra e Guará, SP. Tal resultado poderia sugerir que, no caso deste protozoário, a espécie hospedeira pode ser mais relevante para a infecção do que a procedência do animal.

Cryptosporidium sp. *rat genotype* III foi descrito por Lv et al. (2009) em roedores silvestres das espécies *Rattus norvegicus* e *Rattus tanezumi* na China. Segundo estes mesmos autores, *Cryptosporidium* sp. *rat genotype* II e III apresentam respectivamente 97,1% e 96,6% de similaridade genética com o *rat genotype* I, o genótipo de *Cryptosporidium* cujo parentesco com esses é mais próximo. Entre si, *rat genotype* II e III são 98,8% similares. Inferências filogenéticas com os três genótipos previamente citados sustentam seu agrupamento em um clado claramente separado de outras espécies e genótipos de *Cryptosporidium* (LV et al., 2009). Na pesquisa em tela, o isolado de macaco-parauacu *Pithecia* sp.,

espécie arborícola e frugívora da Amazônia, apresentou 98% de identidade com *Cryptosporidium* sp. *rat genotype* III.

Cryptosporidium sp. *deer mouse genotype* IV foi descrito por Xiao et al. (2002) e, embora isolado de roedores, apresenta parentesco mais próximo aos genótipos *Cryptosporidium pig genotype* e *Cryptosporidium cervine genotype*, este já isolado de amostras humanas (XIAO et al., 2002; WONG; ONG, 2006). O coccídio presente na amostra #293, de bugio-preto *Alouatta caraya*, espécie arborícola e folívora/frugívora, procedente de área de Cerrado e mantido provisoriamente em cativeiro, apresentou 98% de identidade com o genótipo *Cryptosporidium* sp. *deer mouse genotype* IV.

Cryptosporidium wrairi foi descrito pela primeira vez em 1966, no hospedeiro porquinho-da-Índia *Cavia porcellus* (JERVIS; MERRILL; SPRINZ, 1966), recebendo tal designação anos depois, em 1971 (VETTERLING et al., 1971; VETTERLING; TAKEUCHI; MADDEN, 1971). Um estudo desenvolvido na China com isolados de *Cryptosporidium* procedentes de oito espécies de roedores silvestres, três de laboratório e nove de mascotes domésticos evidenciou a ocorrência de *Cryptosporidium wrairi* somente nesse mesmo hospedeiro (porquinho-da-Índia *Cavia porcellus*), descrevendo uma prevalência de 85%. Os demais roedores apresentaram, em sua maioria, genótipos específicos do agente (LV et al., 2009). Pesquisas similares descrevem a ocorrência da espécie em outros hospedeiros, todavia, por meio da técnica molecular de RFLP-PCR. É o caso do relato em ouriço-cacheiro da família Erinaceidae, espécie *Erinaceus europaeus,* mantido em centro de reabilitação na Alemanha (DYACHENKO et al., 2009), e em amostras de bovinos e humanos no Irã (AZAMI et al., 2007). Entretanto, a técnica de RFLP-PCR pode agrupar genótipos distintos de *Cryptosporidium* de maneira mais generalista, levando a interpretações equivocadas a respeito dos vínculos epidemiológicos entre parasitas e hospedeiros (ATWILL et al., 2004). Estudos de renomados autores relatam que o isolamento de *Cryptosporidium wrairi* somente foi reconhecido em porquinho-da-Índia *Cavia porcellus* até o presente momento, caracterizando a espécie como hospedeiro-específica (FAYER; XIAO, 2008; FAYER, 2010).

No presente estudo, as sequências gênicas de isolados de *Cryptosporidium* procedentes das espécies rato-do-mato *Oecomys* cf. *catherinae* (#05)*,* ratão-do-

banhado *Myocastor coypus* (#246), cuíca *Monodelphis domestica* (#289) e capivara *Hydrochoerus hydrochaeris* (#434, #440, #445, #451, #455) demonstraram 98% de identidade com a espécie *Cryptosporidium wrairi*. O único relato semelhante foi de Atwill et al. (2004), que referiram a ocorrência de um genótipo do coccídio em esquilo-terrestre *Spermophilus beecheyi*, família Sciuridae, na Califórnia, cuja identidade com *Cryptosporidium wrairi* foi de 96%.

Os resultados obtidos por meio das inferências filogenéticas para os isolados de *Cryptosporidium* e genótipos similares descritos em literatura demonstraram estreitas relações de parentesco sustentadas por consistentes valores de *bootstrap*. Estudos semelhantes relatam que as sutis diferenças encontradas nas sequências gênicas, como inserções e substituições, poderiam ser suficientes para propor novos genótipos do protozoário (ATWILL et al., 2004; ORTEGA-PIERRES et al., 2009b).

Xiao et al. (2002) sustentam a hipótese de que, devido às relações filogenéticas encontradas dentre as diferentes espécies e genótipos de *Cryptosporidium*, o protozoário apresenta uma adaptação a diferentes espécies decorrente da coevolução entre parasita e hospedeiros. Segundo os mesmos autores, determinadas espécies do coccídio, como *Cryptosporidium parvum*, eram originalmente parasitas de roedores, expandindo evolutivamente seu leque de hospedeiros para bovinos e, posteriormente, para humanos.

Com base nestas hipóteses, o estudo da coevolução entre parasitas e hospedeiros se faz importante não somente para determinar a taxonomia dos protozoários, mas para esclarecer relações capazes de elucidar os possíveis riscos à saúde pública, animal e ambiental decorrente da tênue interface observada atualmente entre homens, animais domésticos e animais silvestres (BUSH et al., 2001b; GRACZYK, 2002; XIAO et al., 2002).

Tanriverdi et al. (2008) defendem, ainda, a hipótese de que a ocorrência de populações geneticamente distintas do protozoário pode derivar de um tipo de especiação alopátrica nas populações do coccídio *Cryptosporidium*, sendo favorecida por barreiras geográficas, o que deve ser levado em consideração na avaliação dos resultados obtidos no estudo em tela.

O diagnóstico e a caracterização molecular dos isolados de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. procedentes de mamíferos neotropicais compreendidos no presente estudo revelaram que este se trata do primeiro relato de:

- ✓ *Giardia duodenalis* genótipo AI em ratão-do-banhado *Myocastor coypus*, bugio-preto *Alouatta caraya*, jaguatirica *Leopardus pardalis* e anta *Tapirus terrestris;*
- ✓ *Cryptosporidium* spp*.* em rato-do-mato *Oecomys* cf. *catherinae,* ratão-do-banhado *Myocastor coypus*, cuíca *Monodelphis domestica* e macaco-parauacu *Pithecia* sp.;
- ✓ Genótipos similares à *Cryptosporidium wrairi*, *Cryptosporidium* sp. *rat genotype* III e *Cryptosporidium* sp. *deer mouse genotype* IV no Brasil.

6.5 IMPLICAÇÕES PARA A SAÚDE PÚBLICA, ANIMAL E AMBIENTAL

Os achados obtidos com a caracterização molecular de isolados de *Giardia duodenalis* procedentes de mamíferos neotropicais cativos revelaram a predominante ocorrência do genótipo AI, frequentemente relatado em amostras de procedência humana e, consequentemente, considerado de elevado potencial zoonótico. Tal resultado poderia sustentar as seguintes hipóteses:

a) A infecção em mamíferos silvestres mantidos em cativeiro poderia estar intimamente relacionada ao estreito contato com o homem, o que precisaria ser averiguado por meio da avaliação de amostras humanas na mesma localidade, especialmente de tratadores e técnicos responsáveis pelo manejo do plantel;

b) A infecção em mamíferos silvestres cativos pode estar intimamente relacionada à contaminação ambiental, especialmente atribuída à presença de cistos do protozoário na água oferecida como bebida e utilizada na

higienização de recintos, o que precisaria ser investigado por meio da avaliação de amostras ambientais;

c) A infecção em mamíferos silvestres mantidos em cativeiro poderia estar relacionada tanto à influência antrópica quanto à contaminação ambiental, todavia, devido à relativamente baixa ocorrência encontrada para o protozoário no plantel (6,33%), outros fatores, como espécies hospedeiras e estado imunológico de cada indivíduo, podem estar envolvidos.

Tais suposições sugerem que a influência antrópica pode representar um relevante papel na transmissão de parasitas para animais silvestres, o que corrobora com uma série de relatos de literatura para outros agentes (DASZAK; CUNNINGHAM, 2002; MANGINI; SILVA, 2007). Entretanto, a via inversa de transmissão do protozoário flagelado *Giardia* spp. (de animais silvestres para humanos) também deve ser ponderada, pois representa um potencial risco à saúde pública.

Por outro lado, fatores relacionados à adaptação entre parasitas e hospedeiros em vida livre, bem como os diferentes mecanismos de especiação podem estar envolvidos no processo de infecção de diversas espécies silvestres.

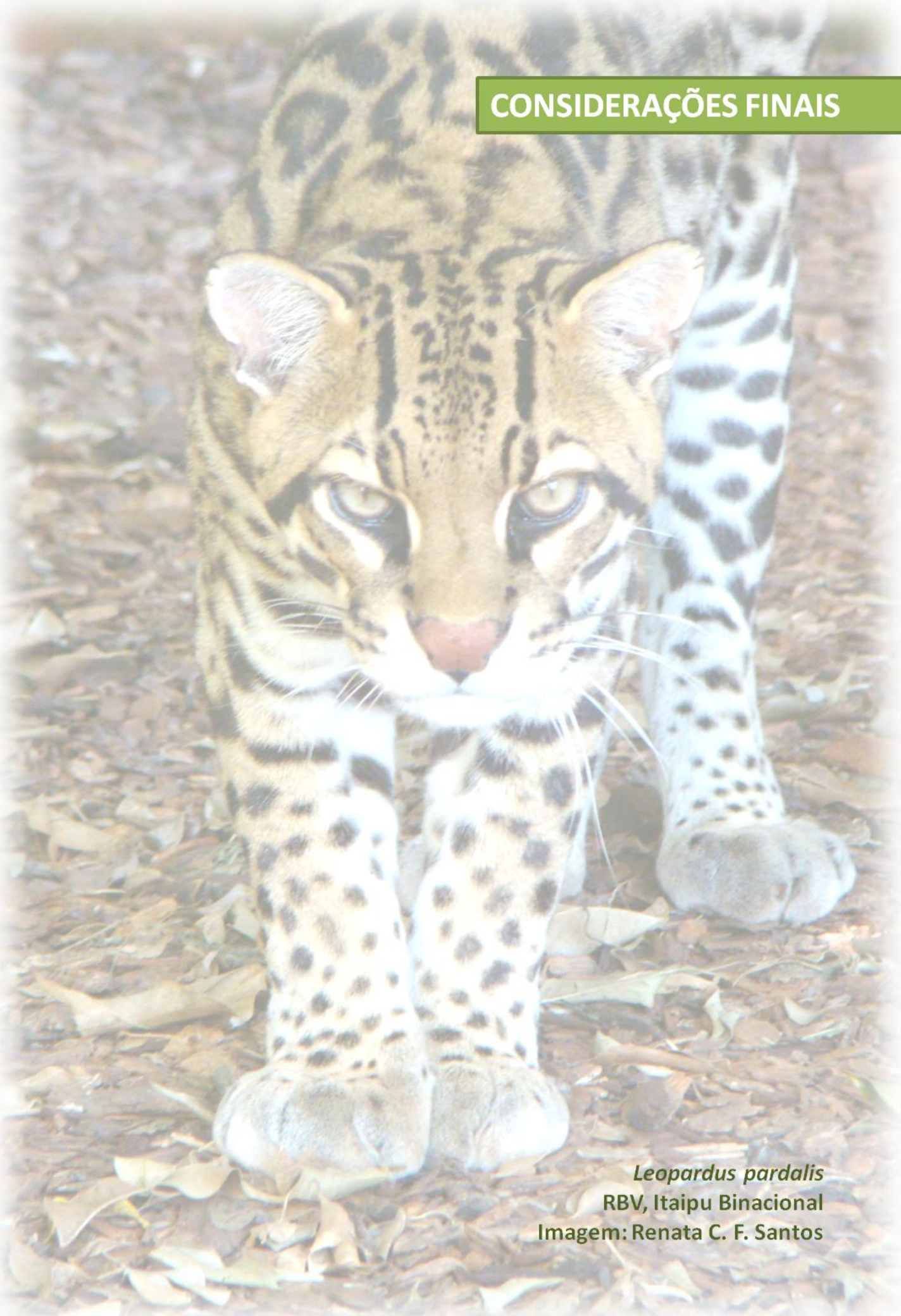
No presente estudo, por exemplo, foram mais prevalentes os genótipos hospedeiro-específicos de *Cryptosporidium* sp. em animais de vida livre, evidenciados mesmo em áreas de reduzida influência antrópica (amostra #233, procedente de primata neotropical da Amazônia).

Deste modo, a importância de mamíferos neotropicais na epidemiologia de tais protozooses e os consequentes riscos inerentes à saúde humana, animal e ambiental não devem ser negligenciados.

O desenvolvimento de estudos de epidemiologia molecular dos referidos protozoários em mamíferos silvestres são essenciais para definir a gama de hospedeiros, o potencial zoonótico e a ecologia de espécies já conhecidas e de novas espécies e genótipos de tais parasitas nestes hospedeiros (FENG, 2010).

A concretização de pesquisas nesta área é particularmente importante em locais nos quais as interações entre animais silvestres, domésticos e humanos são bem compreendidas e o ecossistema é bem definido, devendo envolver amostras de seres humanos, animais silvestres, animais domésticos, bem como amostras de origem ambiental.

CONSIDERAÇÕES FINAIS



Leopardus pardalis
RBV, Itaipu Binacional
Imagem: Renata C. F. Santos

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo permitiu avaliar a ocorrência de dois importantes protozoários oportunistas, *Giardia* e *Cryptosporidium*, em diferentes populações de mamíferos neotropicais e frente a diversas variáveis.

Foi possível evidenciar que a preservação de amostras pode representar um importante fator para a confiabilidade dos resultados de técnicas moleculares. A solução de dicromato de potássio a 2,5% a 4°C aparentemente demonstrou melhores atributos como conservante das formas infectantes dos parasitas no material fecal do que o congelamento *in natura* a -80°C. Todavia, outros fatores, como métodos de diagnóstico microscópico, tempo de conservação e concentração de cistos/oocistos nas amostras avaliadas, podem estar envolvidos.

Este quesito, em particular, demonstrou ser relevante ao sucesso de métodos moleculares de diagnóstico, mesmo quando por técnicas de elevada sensibilidade analítica, como a *Nested* PCR. Tal método evidenciou resultados falsamente negativos em amostras classificadas semiquantitativamente como "+", ou seja, amostras nas quais o número de cistos/oocistos observados na avaliação microscópica foi igual ou inferior a cinco.

Do mesmo modo, a escolha de genes e iniciadores para as reações de amplificação molecular é de categórica importância. O emprego do gene SSU rDNA para amplificação de isolados de *Cryptosporidium* spp. foi considerado satisfatório. Para isolados de *Giardia* spp., a combinação dos resultados obtidos com o uso dos genes GDH e β-giardina revelou moderada concordância. Sugere-se que o diagnóstico de tais micro-organismos por técnicas moleculares seja baseado em uma abordagem multilocus, especialmente para isolados de *Giardia* spp.

Os resultados obtidos para a prevalência aparente dos protozoários em diferentes populações de mamíferos neotropicais evidenciaram que aspectos

ecológicos (como habitat, guilda trófica e estratégias de uso do ambiente), bem como a classificação taxonômica do hospedeiro, podem favorecer os mecanismos pelos quais ocorre a infecção nestes animais. De acordo com as informações obtidas, tais fatores poderiam ser mais relevantes para a ocorrência da infecção em mamíferos silvestres do que atributos como sexo, grupo etário e sazonalidade, o que precisaria ser averiguado por meio de futuras pesquisas dessa natureza e com grupos amostrais previamente uniformizados.

Cryptosporidium spp. foi mais prevalente em mamíferos de vida livre (7%), frugívoros especialistas (19%) e em espécies da ordem Rodentia (10%), resultados considerados marginalmente significativos de acordo com os critérios padronizados para a análise estatística dos dados. Foi considerada significativa a predominante ocorrência deste coccídio em mamíferos silvestres de hábito semiaquático (12%).

Para isolados de *Giardia* spp., os maiores índices de positividade foram encontrados em animais cativos (9%), resultado considerado marginalmente significativo. Considerando a amostragem total para cada variável, o protozoário flagelado foi mais prevalente no bioma Pantanal (12%), bem como em animais semiaquáticos (10%), entretanto, tais resultados não foram significativos estatisticamente.

Estudos envolvendo a caracterização molecular de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em diferentes espécies hospedeiras são essenciais para se compreender o ciclo epidemiológico dos agentes, bem como para sugerir as possíveis vias de transmissão entre diferentes hospedeiros e o potencial zoonótico de determinadas espécies e genótipos.

A caracterização molecular de isolados de *Giardia* spp. no estudo em tela revelou a presença de *Giardia duodenalis* genótipo AI em ratão-do-banhado *Myocastor coypus*, bugio-preto *Alouatta caraya*, jaguatirica *Leopardus pardalis* e anta *Tapirus terrestris*; e de *Giardia duodenalis* genótipo D em cachorro-do-mato *Cerdocyon thous*; todos animais cativos mantidos na mesma instituição.

A identificação molecular e as inferências filogenéticas de isolados de *Cryptosporidium* spp. evidenciaram a ocorrência de genótipos de elevada identidade (98%) e íntimo parentesco com isolados homólogos relatados em literatura, sendo:

Cryptosporidium sp. *rat genotype* III isolado em macaco-parauacu *Pithecia* sp., espécie arborícola e frugívora da Amazônia; *Cryptosporidium* sp. *deer mouse genotype* IV em bugio-preto *Alouatta caraya*, espécie arborícola e folívora/frugívora procedente de área de Cerrado e mantido provisoriamente em cativeiro; e *Cryptosporidium wrairi* em roedores rato-do-mato *Oecomys* cf. *catherinae,* ratão-do-banhado *Myocastor coypus* e capivara *Hydrochoerus hydrochaeris* e no marsupial cuíca *Monodelphis domestica*, predominantemente em vida livre e em três diferentes biomas (Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal).

Os achados referentes ao protozoário *Cryptosporidium* spp. revelaram que os genótipos identificados são semelhantes, porém não idênticos aos descritos em literatura, o que sugere que a infecção nas espécies de mamíferos neotropicais positivas no presente estudo possa decorrer de genótipos específicos, ainda não descritos em outros hospedeiros ou em outras localidades.

De uma forma geral, notou-se que a influência antrópica pode representar um relevante papel na transmissão dos referidos parasitas para animais silvestres, que, por outro lado, podem albergar genótipos hospedeiro-específicos dos agentes mesmo em áreas de baixa interferência humana.

Ponderando o fato de que mamíferos neotropicais podem ser hospedeiros de genótipos zoonóticos de *Giardia duodenalis*, sugere-se que esses sejam considerados potenciais transmissores para outras espécies hospedeiras e, consequentemente, representantes de risco à saúde pública, animal e ambiental.

Todavia, mecanismos de adaptação entre parasitas e hospedeiros e diferentes formas de especiação devem ser considerados em futuros estudos. Sugere-se que estes sejam realizados em áreas nas quais as relações entre humanos, espécies domésticas e espécies silvestres sejam bem conhecidas, envolvendo amostras de diferentes hospedeiros, bem como amostras ambientais.

REFERÊNCIAS

ABD EL-WAHED, M. M.; SALEM, G. H.; EL-ASSALY, T. M. The role of wild rats as a reservoir of some internal parasites in Qalyobia governorate. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 29, n. 2, p. 495-503, 1999.

ABE, N.; MATSUBAYASHI, M.; KIMATA, I.; ISEKI, M. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from humans and animals in Japan using the 60-kDa glycoprotein gene sequences. **Parasitology Research**, v. 99, n. 3, p. 303-305, 2006.

ABU SAMRA, N.; JORI, F.; SAMIE, A.; THOMPSON, P. The prevalence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in wild mammals in the Kruger National Park, South Africa. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 1-2, p. 155-159, 2011.

ADAM, R. D. The biology of *Giardia* spp. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 4, p. 706-732, 1991.

ALHO, C. J. R.; LACHER JR., T. E.; CAMPOS, Z. M. S.; GONÇALVES, H. C. Mamíferos da Fazenda Nhumirim, Sub-região de Nhecolândia, Pantanal do Mato Grosso do Sul: Levantamento preliminar de espécies. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 4, n. 2, p. 151-164, 1987.

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.

ATWILL, E. R.; SWEITZER, R. A.; PEREIRA, M. D. G. C.; GARDNER, I. A.; VAN VUREN, D.; BOYCE, W. M. Prevalence of and associated risk factors for shedding *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia* cysts within feral pig populations in California. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 10, p. 3946-3949, 1997.

ATWILL, E. R.; PHILLIPS, R.; PEREIRA, M. D. G. C.; LI, X.; MCCOWAN, B. Seasonal shedding of multiple *Cryptosporidium* genotypes in California ground squirrels (*Spermophilus beecheyi*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 6748-6752, 2004.

AZAMI, M.; MOGHADDAM, D. D.; SALEHI, R.; SALEHI, M. The identification of *Cryptosporidium* species in Isfahan, Iran by PCR-RFLP analysis of the 18S rRNA gene. **Molecular Biology**, v. 41, n. 5, p. 851-856, 2007.

BADPARVA, E.; FALLAHI, S.; SEPAHVAND, A.; POURNIA, Y.; MOLLAEI RASHNOO, S. The comparison of the efficacy of various fixatives on diverse staining methods of *Giardia lamblia* cyst. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 12, n. 17, p. 1212-1216, 2009.

BAJER, A.; BEDNARSKA, M.; SINSKI, E. Wildlife rodents from different habitats as a reservoir for *Cryptosporidium parvum*. **Acta Parasitologica**, v. 42, n. 4, p. 192-194, 1997.

BAJER, A.; BEDNARSKA, M.; SINSKI, E. The ecology of *Cryptosporidium parvum* infection in small rodent populations. **Wiadomości parazytologiczne**, v. 47, n. 4, p. 747-753, 2001.

BAJER, A. *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. infections in humans, animals and the environment in Poland. **Parasitology Research**, v. 104, n. 1, p. 1-17, 2008.

BAKER, D. G.; STROMBECK, D. R.; GERSHWIN, L. J. Laboratory diagnosis of *Giardia duodenalis* infection in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 190, n. 1, p. 53-56, 1987.

BAQUE, R. H.; GILLIAM, A. O.; ROBLES, L. D.; JAKUBOWSKI, W.; SLIFKO, T. R. A real-time RT-PCR method to detect viable *Giardia lamblia* cysts in environmental waters. **Water Research**, v. 45, n. 10, p. 3175-3184, 2011.

BECK, R.; SPRONG, H.; BATA, I.; LUCINGER, S.; POZIO, E.; CACCIÒ, S. M. Prevalence and molecular typing of *Giardia* spp. in captive mammals at the zoo of Zagreb, Croatia. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 1-2, p. 40-46, 2011.

BEIER, T. V.; SIDORENKO, N. V.; GRIGOR'EV, M. V. *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa: Sporozoa, Coccidia): the optimization of a technic for isolating a large number of oocysts. **Parazitologiia**, v. 29, n. 3, p. 198-207, 1995.

BINGHAM, A. K.; JARROLL JR, E. L.; MEYER, E. A. *Giardia* sp.: Physical factors of excystation *in vitro*, and excystation vs eosin exclusion as determinants of viability. **Experimental Parasitology**, v. 47, n. 2, p. 284-291, 1979.

BLAST. Basic Local Alignment Search Tool. In: NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Base de Dados**. 2011. Disponível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 2011.

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M. E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

BOWMAN, D. D.; LIOTTA, J. L.; ULRICH, M.; CHARLES, S. D.; HEINE, J.; SCHAPER, R. Treatment of naturally occurring, asymptomatic *Giardia* sp. in dogs with drontal® plus flavour tablets. **Parasitology Research**, v. 105, n. 1, p. 125-134, 2009.

BOWMAN, D. D. Diagnóstico parasitológico. In: BOWMAN, D. D. (Ed.). **Georgis - Parasitologia veterinária**. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2010. p. 279-351.

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

BURTON, A. J.; NYDAM, D. V.; DEAREN, T. K.; MITCHELL, K.; BOWMAN, D. D.; XIAO, L. The prevalence of *Cryptosporidium*, and identification of the *Cryptosporidium* horse genotype in foals in New York State. **Veterinary Parasitology**, v. 174, n. 1-2, p. 139-144, 2010.

BUSH, A. O.; FERNÁNDEZ, J. C.; ESCH, G. W.; SEED, J. R. Ecology and the host-parasite relationship. In: BUSH, A. O.; FERNÁNDEZ, J. C.; ESCH, G. W.; SEED, J. R. (Ed.). **Parasitism:** the diversity and ecology of animal parasites. Cambridge: Cambridge University Press, 2001a. p. 9.

BUSH, A. O.; FERNÁNDEZ, J. C.; ESCH, G. W.; SEED, J. R. Population concepts. In: BUSH, A. O.; FERNÁNDEZ, J. C.; ESCH, G. W.; SEED, J. R. (Ed.). **Parasitism:** the diversity and ecology of animal parasites. Cambridge: Cambridge University Press, 2001b. p. 312-330.

CACCIÒ, S. M.; DE GIACOMO, M.; POZIO, E. Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 8, p. 1023-1030, 2002.

CACCIÒ, S. M.; THOMPSON, R. C. A.; MCLAUCHLIN, J.; SMITH, H. V. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 9, p. 430-437, 2005.

CACCIÒ, S. M.; BECK, R.; LALLE, M.; MARINCULIC, A.; POZIO, E. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 13, p. 1523-1531, 2008.

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

CERTAD, G.; NGOUANESAVANH, T.; GUYOT, K.; GANTOIS, N.; CHASSAT, T.; MOURAY, A.; FLEURISSE, L.; PINON, A.; CAILLIEZ, J. C.; DEI-CAS, E.; CREUSY, C. *Cryptosporidium parvum*, a potential cause of colic adenocarcinoma. **Infectious Agents and Cancer**, v. 2, n. 1, p., 2007.

CHALMERS, R. M.; DAVIES, A. P. Minireview: Clinical cryptosporidiosis. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 138-146, 2010.

COKLIN, T.; FARBER, J. M.; PARRINGTON, L. J.; BIN KINGOMBE, C. I.; ROSS, W. H.; DIXON, B. R. Immunomagnetic separation significantly improves the sensitivity of polymerase chain reaction in detecting *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. In dairy cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 2, p. 260-267, 2011.

DA SILVA, A. S.; CORADINI, G. P.; GRESSLER, L. T.; SOARES, J. F.; LARA, V. M.; CARREGARO, A. B.; MONTEIRO, S. G. Occurrence of gastrointestinal protozoa in primates kept in captivity in the Southern region of Brazil. **Ciência Rural**, v. 38, n. 9, p. 2658-2661, 2008.

DALLACORT, R.; MARTINS, J. A.; INOUE, M. H.; DE FREITAS, P. S. L.; COLETTI, A. Rain distribution in Tangará da Serra, mid-northern Mato Grosso state, Brazil. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 33, n. 2, p. 193-200, 2011.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A. Emerging Infectious Diseases: A key role for Conservation Medicine. In: AGUIRRE, A. A.; OSTFELD, R. S.; TABOR, G. M.; HOUSE, C.; PEARL, M. C. (Ed.). **Conservation medicine:** ecological health in practice. New York: Oxford University Press, 2002. p. 40-61.

DESBIEZ, A. L. J.; SANTOS, S. A.; ALVAREZ, J. M.; TOMAS, W. M. Forage use in domestic cattle (*Bos indicus*), capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) and pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) in a seasonal Neotropical wetland. **Mammalian Biology**, v. 76, n. 3, p. 351-357, 2011.

DICKERSON, J. W.; VISVESVARA, G. S.; WALKER, E. M.; FEELY, D. E. Infectivity of cryopreserved *Giardia* cysts for Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). **Journal of Parasitology**, v. 77, n. 5, p. 688-691, 1991.

DPDx. Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. In: CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Base de Dados.** 2010. Disponível em: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>. Acesso em: 2010.

DRYDEN, M. W.; PAYNE, P. A.; SMITH, V. Accurate diagnosis of *Giardia* spp. and proper fecal examination procedures. **Veterinary Therapeutics**, v. 7, n. 1, p. 4-14, 2006.

DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; FAYER, R. **Cryptosporidiosis of man and animals**. Boston: CRC Press, 1990. 199 p.

DUFFY, G.; MORIARTY, E. M. *Cryptosporidium* and its potential as a food-borne pathogen. **Animal health research reviews**, v. 4, n. 2, p. 95-107, 2003.

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

DYACHENKO, V.; KUHNERT, Y.; SCHMAESCHKE, R.; ETZOLD, M.; PANTCHEV, N.; DAUGSCHIES, A. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. genotypes in European hedgehogs (*Erinaceus europaeus* L.) in Germany. **Parasitology**, v. 137, n. 2, p. 205-216, 2009.

EL MANSOURY, S. T.; ABOU EL NAGA, I. F.; NEGM, A. Y.; AMER, E. E. Influence of temperature and salinity on the viability and infectivity of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidia parvum*. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 34, n. 1, p. 161-172, 2004.

EL NAGGAR, H. H.; HANDOUSA, A. E.; EL HAMSHARY, E. M.; EL SHAZLY, A. M. Evaluation of five stains in diagnosing human intestinal coccidiosis. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 29, n. 3, p. 883-891, 1999.

EL-NAGGAR, S. M.; EL-BAHY, M. M.; ABD ELAZIZ, J.; EL-DARDIRY, M. A. Detection of protozoal parasites in the stools of diarrhoeic patients using different techniques. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 36, n. 1, p. 7-22, 2006.

EPSTEIN, P. R. Biodiversity, Climate Change and Emerging Infectious Diseases. In: AGUIRRE, A. A.; OSTFELD, R. S.; TABOR, G. M.; HOUSE, C.; PEARL, M. C. (Ed.). **Conservation medicine:** ecological health in practice. New York: Oxford Ubiversity Press, 2002. p. 27-39.

ERLANDSEN, S. L.; BEMRICK, W. J. SEM evidence for a new species, *Giardia psittaci*. **Journal of Parasitology**, v. 73, n. 3, p. 623-629, 1987.

ERLANDSEN, S. L.; BEMRICK, W. J.; WELLS, C. L.; FEELY, D. E.; KNUDSON, L.; CAMPBELL, S. R.; VAN KEULEN, H.; JARROLL, E. L. Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*). **Journal of Parasitology**, v. 76, n. 5, p. 717-724, 1990.

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

FAYER, R.; NERAD, T. Effects of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1431-1433, 1996.

FAYER, R.; SANTÍN, M.; MACARISIN, D. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. **Veterinary Parasitology**, v. 172, n. 1-2, p. 23-32, 2010.

FAYER, R.; SANTÍN, M.; TROUT, J. M. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). **Veterinary Parasitology**, v. 156, n. 3-4, p. 191-198, 2008.

FAYER, R.; XIAO, L. ***Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis**. Boca Raton: IWA Publishing, CRC Press, 2008. 576 p.

FEELY, D. E.; ERLANDSEN, S. L. Morphology of *Giardia agilis*: Observation by scanning electron microscopy and interference reflexion microscopy. **Journal of Protozoology**, v. 32, n. 4, p. 691-693, 1985.

FEELY, D. E. Morphology of the cyst of *Giardia microti* by light and electron microscopy. **Journal of Protozoology**, v. 35, n. 1, p. 52-54, 1988.

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

FENG, Y.; LAL, A. A.; LI, N.; XIAO, L. Subtypes of *Cryptosporidium* spp. in mice and other small mammals. **Experimental Parasitology**, v.127, n.1, p. 238-242, 2011.

FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 110-140, 2011.

FISCHER, P.; TARASCHEWSKI, H.; RINGELMANN, R.; EING, B. Detection of *Cryptosporidium parvum* in human feces by PCR. **Journal of Experimental and Clinical Medicine**, v. 23, n. 6, p. 309-311, 1998.

FUNADA, M. R. **Avaliação de métodos de extração de DNA de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais e comparação de nested PCR com o médodo coproparasitológico de centrífugo-flutuação em sacarose.** 2009. 76 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

GALETTI, M.; PIZO, M. A.; MORELLATO, P. C. Fenologia, frugivoria e dispersão de sementes. In: CULLEN JR., L.; RUDRAN, R.; VALLADARES-PADUA, C. (Org.). **Métodos de Estudos em Biologia da Conservação e Manejo da Vida Silvestre**. Curitiba, PR: Editora da UFPR, 2004. p. 395-422.

GARCIA, L. S.; BRUCKNER, D. A.; BREWER, T. C.; SHIMIZU, R. Y. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 185-190, 1983.

GARCIA, L. S.; SHIMIZU, R. Y. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 1526-1529, 1997.

GARDINER, C. H.; FAYER, R.; DUBEY, J. P. **An atlas of protozoan parasites in animal tissues.** Washington, DC: Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 1988. 83 p. (Agriculture Handbook, n. 651).

GENOY-PUERTO, A.; CALVI, T. S.; DEL RIO DO VALLE, R.; CATÃO-DIAS, J. L.; MATUSHIMA, E. R. Intestinal protozoan infection in wild Black Howler monkeys (*Alouatta caraya*) rescued during the construction of a hydroelectric dam, and its impacts on wildlife rescue programs. In: 59TH ANNUAL INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE WILDLIFE DISEASE ASSOCIATION, 59., 2010, Iguazú, Argentina. **Abstracts…** 2010. p. 28.

GIBBONS, C. L.; AWAD-EL-KARIEM, F. M. Nested PCR for the detection of *Cryptosporidium parvum*. **Parasitology Today**, v. 15, n. 8, p. 345, 1999.

GILIOLI, R.; SILVA, F. A. Frequency of parasites and *Salmonella* infection in captive maned-wolf, *Chrysocyon brachyurus*, kept in Zoos at the State of São Paulo, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 52, n. 4, p. 337-341, 2000.

GRACENEA, M.; GÓMEZ, M. S.; TORRES, J.; CARNÉ, E.; FERNÁNDEZ-MORÁN, J. Transmission dynamics of *Cryptosporidium* in primates and herbivores at the Barcelona zoo: A long-term study. **Veterinary Parasitology**, v. 104, n. 1, p. 19-26, 2002.

GRACZYK, T. K. Zoonotic infections and conservation. In: AGUIRRE, A. A.; OSTFELD, R. S.; TABOR, G. M.; HOUSE, C.; PEARL, M. C. (Ed.). **Conservation medicine:** ecological health in practice. New York: Oxford University Press, 2002. p. 220-228.

GRENFELL, B. T.; GULLAND, M. D. Introduction: Ecological impact of parasitism on wildlife host populations. In: GRENFELL, B. T.; CHAPPELL, L. H. (Ed.). **Parasitology:** ecology of wildlife host-parasite interactions. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. v. 111, p. 3-14.

GRESSLER, L. T.; DA SILVA, A. S.; DA SILVA, M. K.; TONIN, A. A.; MONTEIRO, S. G. Gastrointestinal parasites of cavy (*Cavia aperea aperea*) in southern Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 89, n. 2, p. 206-208, 2010.

HALL, T. A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HEITMAN, T. L.; FREDERICK, L. M.; VISTE, J. R.; GUSELLE, N. J.; MORGAN, U. M.; THOMPSON, R. C. A.; OLSON, M. E. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* and characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from wildlife, human, and agricultural sources in the North Saskatchewan River Basin in Alberta, Canada. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 530-541, 2002.

HIJJAWI, N. S.; ESTCOURT, A.; YANG, R.; MONIS, P.; RYAN, U. Complete development and multiplication of *Cryptosporidium hominis* in cell-free culture. **Veterinary Parasitology**, v. 169, n. 1-2, p. 29-36, 2010.

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

HIJJAWI, N. S.; MELONI, B. P.; RYAN, U. M.; OLSON, M. E.; THOMPSON, R. C. A. 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*. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 14, p. 1719-1726, 2002.

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

HUETINK, R. E. C.; VAN DER GIESSEN, J. W. B.; NOORDHUIZEN, J. P. T. M.; PLOEGER, H. W. Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. **Veterinary Parasitology**, v. 102, n. 1-2, p. 53-67, 2001.

INOUE, M.; UGA, S.; ODA, T.; RAI, S. K.; VESEY, G.; HOTTA, H. Changes of physical and biochemical properties of *Cryptosporidium* oocysts with various storage conditions. **Water Research**, v. 40, n. 5, p. 881-886, 2006.

JERVIS, H. R.; MERRILL, T. G.; SPRINZ, H. Coccidiosis in the guinea pig small intestine due to a *Cryptosporidium*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 27, n. 117, p. 408-414, 1966.

JOHNSON, A. M.; FIELKE, R.; LUMB, R.; BAVERSTOCK, P. R. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* determined by ribosomal RNA sequence comparison. **International Journal for Parasitology**, v. 20, n. 2, p. 141-147, 1990.

KAPS, M.; LAMBERSON, W. R. **Biostatistics for Animal Science**. Oxfordshire, UK: CABI Publishing, 2004. 464 p.

KASPRZAK, W.; PAWLOWSKI, Z. Zoonotic aspects of giardiasis: A review. **Veterinary Parasitology**, v. 32, n. 2-3, p. 101-108, 1989.

KAUSHIK, K.; KHURANA, S.; WANCHU, A.; MALLA, N. Evaluation of staining techniques, antigen detection and nested PCR for the diagnosis of cryptosporidiosis in HIV seropositive and seronegative patients. **Acta Tropica**, v. 107, n. 1, p. 1-7, 2008.

KHRAMTSOV, N. V.; TILLEY, M.; BLUNT, D. S.; MONTELONE, B. A.; UPTON, S. J. Cloning and analysis of a *Cryptosporidium parvum* gene encoding a protein with homology to cytoplasmic form Hsp70. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 416-422, 1995.

KIM, H. C.; HEALEY, M. C. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts following cryopreservation. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 5, p. 1191-1194, 2001.

KINDLOVITS, A.; KINDLOVITS, L. M. Enfermidades parasitárias. In: KINDLOVITS, A.; KINDLOVITS, L. M. (Ed.). **Clínica e terapêutica em primatas neotropicais.** Rio de Janeiro, RJ: L.F. Livros de Veterinária Ltda, 2009. p. 211-244.

KLINGENBERG, B. Simultaneous confidence bounds for relative risks in multiple comparisons to control. **Statistics in Medicine**, v. 29, n. 30, p. 3232-3244, 2010.

KOSKI, M. A. Dermatologic diseases in psittacine birds: An investigational approach. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 11, n. 3, p. 105-124, 2002.

KOWALEWSKI, M. M.; SALZER, J. S.; DEUTSCH, J. C.; RAÑO, M.; KUHLENSCHMIDT, M. S.; GILLESPIE, T. R. Black and gold howler monkeys (*Alouatta caraya*) as sentinels of ecosystem health: Patterns of zoonotic protozoa infection relative to degree of human-primate contact. **American Journal of Primatology**, v. 73, n. 1, p. 75-83, 2011.

LALLE, M.; JIMENEZ-CARDOSA, E.; CACCIÒ, S. M.; POZIO, E. Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using a beta-giardin nested polymerase chain reaction assay. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 1, p. 203-205, 2005.

LALLO, M. A.; PEREIRA, A.; ARAÚJO, R.; FAVORITO, S. E.; BERTOLLA, P.; BONDAN, E. F. Occurrence of *Giardia, Cryptosporidium* and microsporidia in wild animals from a deforestation area in the state of São Paulo, Brazil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 5, p. 1465-1470, 2009.

LINDERGARD, G.; NYDAM, D. V.; WADE, S. E.; SCHAAF, S. L.; MOHAMMED, H. O. A novel multiplex polymerase chain reaction approach for detection of four human infective *Cryptosporidium* isolates: *Cryptosporidium parvum*, types H and C, *Cryptosporidium canis*, and *Cryptosporidium felis* in fecal and soil samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, n. 3, p. 262-267, 2003.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L. *Cryptosporidium*. In: ATKINSON, C. T.; THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B. (Ed.). **Parasitic diseases of wild birds**. Ames, Iowa: Blackwell Publishing, 2008. p. 195-203.

LIU, A.; JI, H.; WANG, E.; LIU, J.; XIAO, L.; SHEN, Y.; LI, Y.; ZHANG, W.; LING, H. Molecular identification and distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* duodenalis in raw urban wastewater in Harbin, China. **Parasitology Research**, v. 109, n. 1, p. 1-6, 2011.

LV, C.; ZHANG, L.; WANG, R.; JIAN, F.; ZHANG, S.; NING, C.; WANG, H.; FENG, C.; WANG, X.; REN, X.; QI, M.; XIAO, L. *Cryptosporidium* spp. in wild, laboratory, and pet rodents in China: Prevalence and molecular characterization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 24, p. 7692-7699, 2009.

MA, P.; SOAVE, R. Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. **Journal of Infectious Diseases**, v. 147, n. 5, p. 824-828, 1983.

MAC KENZIE, W. R.; HOXIE, N. J.; PROCTOR, M. E.; GRADUS, M. S.; BLAIR, K. A.; PETERSON, D. E.; KAZMIERCZAK, J. J.; ADDISS, D. G.; FOX, K. R.; ROSE, J. B.; DAVIS, J. P. 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.

MANGINI, P. R.; NICOLA, P. A. Captura e marcação de animais silvestres. In: CULLEN JR., L.; RUDRAN, R.*;* VALLADARES-PADUA, C. (Ed.). **Métodos de estudos em biologia da conservação e manejo da vida silvestre**. Curitiba, PR: Editora da UFPR, 2004. p. 91-124.

MANGINI, P. R.; SILVA, J. C. R. Medicina da conservação: aspectos gerais. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Ed.). **Tratado de animais selvagens**: medicina veterinária. São Paulo, SP: Roca, 2007. p. 1258-1268.

MARVULO, M. F. V. Zoonoses. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Ed.). **Tratado de animais selvagens**: medicina veterinária. São Paulo, SP: Roca, 2007. p. 1250-1256.

MCNABB, S. J. N.; HENSEL, D. M.; WELCH, D. F. Comparison of sedimentation and flotation techniques for identification of *Cryptosporidium* sp. oocysts in a large outbreak of human diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 587-589, 1985.

MCORIST, A. L.; JACKSON, M.; BIRD, A. R. A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 50, n. 2, p. 131-139, 2002.

MEIRELES, M. V.; SOARES, R. M.; BONELLO, F.; GENNARI, S. M. Natural infection with zoonotic subtype of *Cryptosporidium parvum* in Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 1-2, p. 166-170, 2007.

MILLER, K. M.; STERLING, C. R. Sensitivity of nested PCR in the detection of low numbers of *Giardia lamblia* cysts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 18, p. 5949-5950, 2007.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Florestas do Brasil em resumo - 2010**. Brasília - DF: Serviço Florestal Brasileiro, 2010. 152 p.

MONIS, P. T. Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. **Parasitology**, v. 112, n. 1, p. 1-12, 1996.

MONIS, P. T.; ANDREWS, R. H.; MAYRHOFER, G.; EY, P. L. Molecular systematics of the parasitic protozoan Giardia intestinalis. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 9, p. 1135-1144, 1999.

MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. A. *Cryptosporidium* and *Giardia:* zoonoses: Fact or fiction? **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, n. 4, p. 233-244, 2003.

MORIMOTO, N.; KOMATSU, C.; NISHIDA, M.; SUGIURA, T. Detection of *Giardia lamblia* cysts in non-fixed long-term stored human feces by direct immunofluorescence assay. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 54, n. 2, p. 72-74, 2001.

NAKAMURA, A. A. N.; SIMÕES, D. C.; ANTUNES, R. G.; DA SILVA, D. C.; MEIRELES, M. V. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of birds kept in captivity in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 166, n. 1-2, p. 47-51, 2009.

NEUMAYEROVÁ, H.; KOUDELA, B. Effects of low and high temperatures on infectivity of *Cryptosporidium muris* oocysts suspended in water. **Veterinary Parasitology**, v. 153, n. 3-4, p. 197-202, 2008.

NG, J.; YANG, R.; WHIFFIN, V.; COX, P.; RYAN, U. Identification of zoonotic *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes infecting animals in Sydney's water catchments. **Experimental Parasitology**, v. 128, n. 2, p. 138-144, 2011.

OLIVEIRA, C. B.; SOARES, J. F.; DA SILVA, A. S.; DA SILVA, M. K.; SALOMÃO, E. L.; MONTEIRO, S. G. Occurrence of *Giardia* sp. and *Cryptosporidium* sp. in *Leopardus weidii* of wild life. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 546-547, 2008.

OLSON, B. E.; OLSON, M. E.; WALLIS, P. M. ***Giardia*: the cosmopolitan parasite**. Wallingford, UK: CABI, 2002. 329 p.

ORTEGA-PIERRES, G.; SMITH, H. V.; CACCIÒ, S. M.; THOMPSON, R. C. A. New tools provide further insights into *Giardia* and *Cryptosporidium* biology. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 9, p. 410-416, 2009a.

ORTEGA-PIERRES, G.; CACCIÒ, S. M.; FAYER, R.; MANK, T. G.; SMITH, H. V.; THOMPSON, R. C. A. ***Giardia* and *Cryptosporidium*: From molecules to disease**. Oxfordshire, UK: CABI, 2009b. 502 p.

PAPINI, R.; CARDINI, G. Evaluation of a rapid *Cryptosporidium/Giardia* immunochromatographic test for diagnosis of giardiasis in dogs. **Revue de Medecine Veterinaire**, v. 157, n. 10, p. 490-493, 2006.

PAULA, C. D.; FERREIRA, P. M. Técnicas de estudo de campo. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Ed.). **Tratado de animais selvagens**: medicina veterinária. São Paulo, SP: Roca, 2007. p. 1269-1279.

PAVLOVSKY, E. N. **Natural nidality of transmissible diseases, with special reference to the landscape epidemiology of zooanthroponoses**. Urbana, Illinois: University of Illinois Press, 1966. 261 p.

POWER, M. L.; RYAN, U. M. A new species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey Kangaroos (*Macropus giganteus*). **Journal of Parasitology**, v. 94, n. 5, p. 1114-1117, 2008.

RAZZOLINI, M. T.; SANTOS, T. F. S.; BASTOS, V. K. Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* cysts/oocysts in watersheds and drinking water sources in Brazil urban areas. **Journal of Water and Health**, v. 8, n. 2, p. 399-404, 2010.

READ, C. M.; MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. A. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 4, n. 2, p. 125-130, 2004.

REGINATTO, A. R.; FARRET, M. H.; FANFA, V. R.; DA SILVA, A. S.; ZANETTE, R. A.; TONIN, A. A.; MONTEIRO, S. G. Report of cryptosporidiosis in gray brocket deer (*Mazama gouazoupira*) in southern Brazil. **Comparative Clinical Pathology**, v. 19, n. 5, p. 523-525, 2010.

REINOSO, R.; BECARES, E.; SMITH, H. V. Effect of various environmental factors on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 4, p. 980-986, 2008.

REIS, N. R. D.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. D. **Mamíferos do Brasil**. Londrina, PR: Nelio R. dos Reis, 2011. 439 p.

REIS, N. R. D.; PERACCHI, A. L.; SANTOS, G. A. S. D. D. **Ecologia de mamíferos**. Londrina, PR: Technical Books Editora, 2008. 167 p.

RHEE, J. K.; PARK, B. K. Survival of *Cryptosporidium muris* (strain MCR) oocysts under cryopreservation. **The Korean journal of parasitology**, v. 34, n. 2, p. 155-157, 1996.

RHEINGANTZ, M. L.; WALDEMARIN, H. F.; RODRIGUES, L.; MOULTON, T. P. Seasonal and spatial differences in feeding habits of the Neotropical otter *Lontra longicaudis* (Carnivora: Mustelidae) in a coastal catchment of southeastern Brazil. **Zoologia**, v. 28, n. 1, p. 37-44, 2011.

RIMHANEN-FINNE, R.; ENEMARK, H. L.; KOLEHMAINEN, J.; TOROPAINEN, P.; HANNINEN, M. L. Evaluation of immunofluorescence microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay in detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 3-4, p. 345-348, 2007.

ROBINSON, G.; WRIGHT, S.; ELWIN, K.; HADFIELD, S. J.; KATZER, F.; BARTLEY, P. M.; HUNTER, P. R.; NATH, M.; INNES, E. A.; CHALMERS, R. M. Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Morphology, biology and phylogeny. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 13, p. 1539-1548, 2010.

RODRIGUES, F. H. G.; MEDRI, Í. M.; TOMAS, W. M.; MOURÃO, G. D. M. **Revisão do conhecimento sobre ocorrência e distribuição de Mamíferos do Pantanal**: secondary title. Corumbá, MS: Embrapa Pantanal, 2002. 38**,** 41 p.

ROSENBLATT, J. E.; SLOAN, L. M. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Cryptosporidium* spp. in stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 6, p. 1468-1471, 1993.

RYAN, U.; POWER, M.; XIAO, L. *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the red kangaroo (*Macropus rufus*). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 22-26, 2008.

RYAN, U. *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 113-120, 2010.

SAMUEL, W. M.; PYBUS, M. J.; KOCAN, A. A. **Parasitic diseases of wild mammals**. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 2001. 559 p.

SANTOS, L. C. Parasitologia. In: SANTOS, L. C. (Ed.). **Laboratório ambiental**. Cascavel, PR: Editora Universitária - EDUNIOESTE, 1999. v. 1, p. 184.

SANTOS, L. C.; MORAES, W.; CUBAS, Z. S.; CUROTTO, S. M. R.; SANTOS, R. C. F.; BARROS-FILHO, I. R.; BIONDO, A. W. Occurrence of *Giardia* sp. (Mastigophora: Hexamitidae) in neotropical wild animals at the Bela Vista Sanctuary Itaipu Binational, Foz do Iguassu, Paraná: A retrospective study. In: XV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 2008, Curitiba. **Resumos**... 2008. p. 186.

SANTOS, L. C.; SANTOS, R. C. F.; CUBAS, Z. S.; MORAES, W. D.; SOARES, R. M.; MATUSHIMA, E. R. Frequency of occurrence of zoonotic protozoan parasites *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa:Cryptosporidiidae) and *Giardia* spp. (Sarcomastigophora: Hexamitidae) in wild animals kept in captivity in the *Bela Vista Biological Sanctuary, Itaipu Binacional,* Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil In: 59th ANNUAL INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE WILDLIFE DISEASE ASSOCIATION, 59., 2010, Iguazú, Argentina. **Abstracts…** 2010. p. 145.

SAUNBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning:** a laboratory manual. Cold Spring, Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHUURMAN, T.; LANKAMP, P.; VAN BELKUM, A.; KOOISTRA-SMID, M.; VAN ZWET, A. Comparison of microscopy, real-time PCR and a rapid immunoassay for the detection of *Giardia lamblia* in human stool specimens. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 12, p. 1187-1191, 2007.

SEVÁ, A. D. P.; FUNADA, M. R.; RICHTZENHAIN, L.; GUIMARÃES, M. B.; SOUZA, S. D. O.; ALLEGRETTI, L.; SINHORINI, J. A.; DUARTE, V. V.; SOARES, R. M. Genotyping of *Cryptosporidium* spp. from free-living wild birds from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 1-2, p. 27-32, 2011.

SHETTY, N.; PRABHU, T. Evaluation of faecal preservation and staining methods in the diagnosis of acute amoebiasis and giardiasis. **Journal of Clinical Pathology**, v. 41, n. 6, p. 694-699, 1988.

SHI, K.; JIAN, F.; LV, C.; NING, C.; ZHANG, L.; REN, X.; DEAREN, T. K.; LI, N.; QI, M.; XIAO, L. Prevalence, genetic characteristics, and zoonotic potential of *Cryptosporidium* species causing infections in farm rabbits in China. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 9, p. 3263-3266, 2010.

SILVA, F. M. P. **Caracterização molecular de *Giardia duodenalis* em cães na cidade de Botucatu-SP**. 2010. 71 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

SLAPETA, J. Naming of *Cryptosporidium pestis* is in accordance with the ICZN Code and the name is available for this taxon previously recognized as *C. parvum* 'bovine genotype'. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 1-2, p. 1-5, 2011.

SOARES, R. M.; DE SOUZA, S. L. P.; SILVEIRA, L. H.; FUNADA, M. R.; RICHTZENHAIN, L. J.; GENNARI, S. M. Genotyping of potentially zoonotic *Giardia duodenalis* from exotic and wild animals kept in captivity in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 1-2, 2011.

SOUZA, S. L. P. **Caracterização genética de isolados de *Giardia* spp. provenientes de amostras fecais de origem humana e animal.** 2007. 91 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SOUZA, S. L. P.; GENNARI, S. M.; RICHTZENHAIN, L. J.; PENA, H. F. J.; FUNADA, M. R.; CORTEZ, A.; GREGORI, F.; SOARES, R. M. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of São Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (gdh) coding gene. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3-4, p. 258-264, 2007.

SRETER, T.; VARGA, I. Cryptosporidiosis in birds: a review. **Veterinary Parasitology**, v. 87, n. 4, p. 261-279, 2000.

SULAIMAN, I. M.; LAL, A. A.; XIAO, L. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 2, p. 388-394, 2002.

TABOR, G. M. Defining conservation medicine. In: AGUIRRE, A. A.; OSTFELD, R. S.; TABOR, G. M.; HOUSE, C.; PEARL, M. C. (Ed.). **Conservation medicine:** ecological health in practice. New York: Oxford University Press, 2002. p. 8-16.

TANRIVERDI, S.; GRINBERG, A.; CHALMERS, R. M.; HUNTER, P. R.; PETROVIC, Z.; AKIYOSHI, D. E.; LONDON, E.; ZHANG, L.; TZIPORI, S.; TUMWINE, J. K.; WIDMER, G. Inferences about the global population structures of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 23, p. 7227-7234, 2008.

THOMAZ, A. **Caracterização genotípica de *Cryptosporidium* spp. isolados de amostras fecais de felinos, caninos e bovinos no Estado de São Paulo.** 2006. 55 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997.

THOMPSON, R. C. A.; LYMBERY, A. J.; SMITH, A. Parasites, emerging disease and wildlife conservation. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 10, p. 1163-1170, 2010.

THOMPSON, S. C. *Giardia lamblia* in children and the child care setting: a review of the literature. **Journal of Paediatrics and Child Health**, v. 30, n. 3, p. 202-209, 1994.

TORRES, J.; GRACENEA, M.; GÓMEZ, M. S.; ARRIZABALAGA, A.; GONZÁLEZ-MORENO, O. The occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in wild rodents and insectivores in Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 92, n. 4, p. 253-260, 2000.

TULI, L.; SINGH, D. K.; GULATI, A. K.; SUNDAR, S.; MOHAPATRA, T. M. A multiattribute utility evaluation of different methods for the detection of enteric protozoa causing diarrhea in AIDS patients. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 11, 2010.

TYZZER, E. E. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (GEN. ET SP. NOV.), of the gastric glands of the common mouse. **Journal of Medical Research**, v. 23, n. 1, p. 487-511, 1910.

TZANETOU, K.; DOLAPSAKI, E.; KAKARI, C.; SIDERI, A.; BLACHAKI, A.; MICHAELIDOU, E.; TSOUKNIDA, A.; POLITAKI, S.; TSANTES, A.; PAPAIOANOU, V.; MITSAKOU, G.; MALAMOU-LADA, E. Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assays and one immunochromatographic rapid assay for the detection of *Giardia lamblia*-specific antigens in fecal specimens of patients with giardiasis. **Archives of Hellenic Medicine**, v. 20, n. 3, p. 299-304, 2003.

VETTERLING, J. M.; JERVIS, H. R.; MERRILL, T. G.; SPRINZ, H. *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. **Journal of Protozoology**, v. 18, n. 2, p. 243-247, 1971.

VETTERLING, J. M.; TAKEUCHI, A.; MADDEN, P. A. Ultrastructure of *Cryptosporidium wrairi* from the guinea pig. **Journal of Protozoology**, v. 18, n. 2, p. 248-260, 1971.

VOLOTÃO, A. C. C.; JÚNIOR, J. C. S.; GRASSINI, C.; PERALTA, J. M.; FERNANDES, O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from Southern Brown Howler Monkeys (*Alouatta clamitans*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 1-2, p. 133-137, 2008.

WEITZEL, T.; DITTRICH, S.; MOHL, I.; ADUSU, E.; JELINEK, T. Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 7, p. 656-659, 2006.

WIELINGA, C. M.; THOMPSON, R. C. A. Comparative evaluation of *Giardia duodenalis* sequence data. **Parasitology**, v. 134, n. 12, p. 1795-1821, 2007.

WILKE, H.; ROBERTSON, L. J. Preservation of *Giardia* cysts in stool samples for subsequent PCR analysis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 78, n. 3, p. 292-296, 2009.

WONG, P. H. P.; ONG, C. S. L. Molecular characterization of the *Cryptosporidium* cervine genotype. **Parasitology**, v. 133, n. 6, p. 693-700, 2006.

WUNDERLE JR, J. M. The role of animal seed dispersal in accelerating native forest regeneration on degraded tropical lands. **Forest Ecology and Management**, v. 99, n. 1-2, p. 223-235, 1997.

XIAO, L.; ALDERISIO, K.; LIMOR, J.; ROYER, M.; LAL, A. A. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5492-5498, 2000c.

XIAO, L.; ESCALANTE, L.; YANG, C.; SULAIMAN, I.; ESCALANTE, A. A.; MONTALI, R. J.; FAYER, R.; LAL, A. A. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small- subunit rRNA gene locus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 1578-1583, 1999.

XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1239-1255, 2008.

XIAO, L.; LIMOR, J.; MORGAN, U. M.; SULAIMAN, I. M.; THOMPSON, R. C. A.; LAL, A. A. Sequence differences in the diagnostic target region of the oocyst wall protein gene of *Cryptosporidium* parasites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5499-5502, 2000a.

XIAO, L.; MORGAN, U. M.; FAYER, R.; THOMPSON, R. C. A.; LAL, A. A. *Cryptosporidium* systematics and implications for public health. **Parasitology Today**, v. 16, n. 7, p. 287-292, 2000b.

XIAO, L.; SINGH, A.; LIMOR, J.; GRACZYK, T. K.; GRADUS, S.; LAL, A. Molecular characterization of cryptosporidium oocysts in samples of raw surface water and wastewater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 1097-1101, 2001.

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

ZANETTE, R. A.; DA SILVA, A. S.; LUNARDI, F.; SANTURIO, J. M.; MONTEIRO, S. G. Occurrence of gastrointestinal protozoa in *Didelphis albiventris* (opossum) in the central region of Rio Grande do Sul state. **Parasitology International**, v. 57, n. 2, p. 217-218, 2008.

ZHOU, L.; FAYER, R.; TROUT, J. M.; RYAN, U. M.; SCHAEFER III, F. W.; XIAO, L. Genotypes of *Cryptosporidium* species infecting fur-bearing mammals differ from those of species infecting humans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 12, p. 7574-7577, 2004.

ZIEGLER, P. E.; SANTUCCI, F.; LINDERGARD, G.; NYDAM, D. V.; WADE, S. E.; SCHAAF, S. L.; CHANG, Y. F.; MOHAMMED, H. O. Evaluation of polymerase chain reaction diagnosis of *Cryptosporidium* spp in dairy cattle and wildlife. **Veterinary Therapy**, v. 8, n. 2, p. 148-159, 2007a.

ZIEGLER, P. E.; WADE, S. E.; SCHAAF, S. L.; STERN, D. A.; NADARESKI, C. A.; MOHAMMED, H. O. Prevalence of *Cryptosporidium* species in wildlife populations within a watershed landscape in southeastern New York State. **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 1-2, p. 176-184, 2007b.