



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO BIOMÉDICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS

DANIELLA SOTHER CARVALO RIBEIRO

**Pesquisa de *Cryptosporidium* sp. em equinos mantidos em propriedades
localizadas em Teresópolis, Rio de Janeiro, Brasil**

Niterói, RJ

2021

DANIELLA SOTHER CARVALO RIBEIRO

Pesquisa de *Cryptosporidium* sp. em equinos mantidos em propriedades localizadas em Teresópolis, Rio de Janeiro, Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense como requisito à obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Parasitologia

Orientadora: Prof. Dra. Alynne da Silva Barbosa (UFF)

Niterói, RJ

2021

Ficha catalográfica automática - SDC/BIB
Gerada com informações fornecidas pelo autor

R484p Ribeiro, Daniella Sother Carvalho
Pesquisa de *Cryptosporidium* sp. em equinos mantidos em propriedades localizadas em Teresópolis, Rio de Janeiro, Brasil : Pesquisa de *Cryptosporidium* sp. em equinos / Daniella Sother Carvalho Ribeiro ; Alynne da Silva Barbosa, orientadora. Niterói, 2021.
95 f. : il.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2021.

DOI: <http://dx.doi.org/10.22409/PPGMPA.2021.m.02612126724>

1. Criptosporidiose. 2. Equinos. 3. Protozoário gastrointestinal. 4. Rio de Janeiro. 5. Produção intelectual. I. Barbosa, Alynne da Silva, orientadora. II. Universidade Federal Fluminense. Instituto Biomédico. III. Título.

CDD -

DANIELLA SOTHER CARVALHO RIBEIRO**Pesquisa de *Cryptosporidium* sp. em equinos mantidos em propriedades localizadas em Teresópolis, Rio de Janeiro, Brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense como requisito à obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Parasitologia

Aprovada em: ____ de _____ de 20__.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Beatriz Brener (UFF)

Prof. Dra. Maria Regina Reis Amendoeira (Fiocruz)

Prof. Dra. Maria Eduarda Monteiro Silva (UNIFESO)

Prof. Dra. Patrícia Ridell Millar Goulart (UFF)

Prof. Dra. Bethânia Ferreira Bastos (UNIFESO)

Niterói, RJ

2021

AGRADECIMENTOS

Finalmente é chegada a hora de agradecer, pois este manuscrito significa a realização de um grande sonho, me tornar mestre. Muitas pessoas foram fundamentais nesses dois anos e meio de mestrado, me dando apoio, carinho e incentivo e fizeram toda a diferença. A elas serei eternamente grata.

Gratidão ao meu universo maravilhoso e infinito que sempre conspirou ao meu favor e me fez entender que tudo que acontece na minha vida é para o meu melhor e que todo desejo ardente se torna realidade. Desistir, jamais.

Sou grata a Dra Alynne da Silva Barbosa, minha orientadora querida, que acreditou em mim, me recebeu de braços abertos e caminhou ao meu lado o tempo todo. Obrigada pelo tempo dedicado a mim e ao nosso projeto, por enfrentar bravamente as dificuldades que surgiram e pela grandiosa paciência com a minha, quase nenhuma, habilidade tecnológica e com meus copiosos choros quando batia aquele desespero. Tudo isso é resultado do seu amor pelo que faz. Você fez toda a diferença. Gratidão por tudo amiga querida.

Gratidão imensurável aos amores da minha vida, meu marido Antônio Luiz Carvalho Ribeiro e as minhas filhas Maria Helena, Maria Victoria, Maria Roberta, Maria Eduarda e Maria Antônia, por tanto carinho, paciência e apoio durante essa caminhada. Vocês entenderam que esse projeto era muito importante para mim e compreenderam meus momentos de ausência, seguindo ao meu lado. Não poderia deixar também de agradecer ao carinho dos meus netos Vittorio, Daniela e Valentim, vovó ama vocês mais que tudo na vida.

Agradeço ao meu pai querido, Roberto Vieira Sother (*in memorian*), de quem herdei essa paixão pelos estudos e que me ilumina em todos os momentos, me mostrando o melhor caminho. Gratidão a minha mãe, Elizabeth Sother por me dado a vida e por acreditar em mim. Gratidão também a minha saudosa avó, minha segunda mãe, Albeíza de Toledo Piza (*in memorian*), que foi uma referência de ser humano para mim e que me ensinou através da sua vida, que o céu é o limite.

Agradeço a minha amiga querida Fernanda Barbosa dos Santos por ter me ajudado a realizar esse sonho ao meu apresentar a Dra Alynne da Silva Barbosa.

Agradeço imensamente aos colegas do grupo de pesquisa pelo apoio e colaboração, o doutorando André Vianna Martins, Lucas Fernandes Lobão, Mariana Santos Ribeiro, João Pedro Siqueira Palmer, Dra. Laís Lisboa Corrêa e Dra Claudia Maria Antunes Uchôa Souto Maior.

Agradeço imensamente ao suporte do Laboratório de Toxoplasmose e Outras Protozooses do Instituto Oswaldo chefiada pela Dra Maria Regina Reis Amendoeira, ao suporte científico do Mestre Sidnei da Silva da Fundação Oswaldo Cruz e ao Dr Marcelo Vasconcelos Meireles da Universidade Estadual Paulista.

Gratidão especial ao Dr. Otilio Machado Pereira Bastos (*in memorian*) que me recebeu com tanto carinho e que me alegrava com seu bom humor sempre que nos encontrávamos.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa concedida, Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro FAPERJ pelo Auxílio Instalação (ARC) concedido (E-26/010.002748/2019) e agradeço a Pró – reitoria de Pesquisa, Pós Graduação e Inovação da Universidade Federal Fluminense pelo fomento concedido no edital Fopesq/2020.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho maravilhoso, minha eterna gratidão.

RESUMO

Equinos são animais que podem se infectar com diferentes parasitos, incluindo *Cryptosporidium* sp. Várias espécies desse gênero foram caracterizadas determinando diarreia e cólicas abdominais nesses animais, além de apresentarem perfil de transmissibilidade zoonótico. Para ampliar as informações sobre esse protozoário esse estudo teve como objetivo analisar a frequência de *Cryptosporidium* spp. em fezes de equinos mantidos em propriedades de Teresópolis, RJ, e as variáveis que podem favorecer esta infecção. Entre agosto de 2019 a março de 2020 foram coletadas 314 amostras fecais de equinos, desses 287 eram da raça Puro Sangue Inglês (PSI) e 27 pôneis, sendo procedentes de cinco propriedades que criavam PSI denominadas pelas letras de A até E e três de pôneis denominadas de F a H. Informações dos equinos e seu manejo foram recuperadas pelo *stud book* e por formulários aplicados aos treinadores. As fezes coletadas foram submetidas a análises macroscópica, a técnicas parasitológicas microscópicas de Sheather, Lutz e coloração com safranina, bem como a pesquisa de coproantígenos de *Cryptosporidium* sp. pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). Todas as amostras positivas em pelo menos uma destas técnicas foram submetidas a análise molecular, com a reação em cadeia da polimerase associada ao sequenciamento para caracterizar quando possível a espécie e o genótipo do protozoário. Ao todo foram detectados *Cryptosporidium* sp. em 35 (11,1%) equinos ao se associar o ELISA e a coloração com safranina. O protozoário foi mais detectado nos equinos das propriedades D, seguida pela A e E, sendo evidenciado principalmente nas fezes dos PSI, pois somente um pônei foi positivo. A partir de um modelo de regressão logística multivariada pode-se verificar que a presença de cães, pequenos ruminantes nas propriedades e o fornecimento de água da nascente foram associados de forma significativa a infecção do equino pelo protozoário ($p < 0,05$). Das 35 amostras positivas, oito amostras de PSI puderam ser caracterizadas para espécie molecularmente a partir da análise parcial do gen 18S RNAr, sendo identificado *Cryptosporidium felis* em uma amostra e *Cryptosporidium parvum* em sete. Destas, cinco também foram positivas na técnica parasitológica microscópica com safranina, na qual, os oocistos visualizados ao microscópio apresentaram a mensuração no diâmetro maior variando entre 4,14 a 4,9 μm e no diâmetro menor 4,03 a 4,63 μm . Pode-se verificar que os oocistos de dois isolados Cry-266 e Cry-285 apresentaram variações significativas ($p < 0,05$) entre as suas mensurações pelo teste de Tuckey, que podem ser normais para *C. parvum* ou até serem decorrentes do procedimento técnico de coloração. Ainda é importante ressaltar, que as sete amostras devidamente identificadas como *C. parvum* foram submetidas a reação em cadeia associada ao sequenciamento para analisar de forma parcial o gen da gp60, a partir da mesma foi possível evidenciar que as sequências pertenciam a família genotípica IIa. Família esta que geralmente é transmitida dos animais para os seres humanos. Além disso, no equino 266 foi identificado de forma completa o genótipo IIaA15G2R1, que é considerado com o maior perfil de transmissibilidade zoonótica. Cabe ressaltar que este é o primeiro estudo no estado do Rio de Janeiro que caracterizou molecularmente *Cryptosporidium* spp. em fezes de equinos, e o primeiro no continente americano que detectou *C. felis* nas fezes desses animais. Mediante o exposto neste estudo, torna-se fundamental incentivar as práticas de monitoramento das parasitoses gastrointestinais nos animais, incluindo o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp., já que os equinos são muito suscetíveis e sensíveis as cólicas que podem ser determinadas por esses agentes, podendo ir a óbito por conta desta síndrome. Além disso, a liberação dos oocistos desse protozoário no ambiente, ressalta a possibilidade dos equinos estarem atuando como reservatórios do protozoário em Teresópolis, RJ uma vez que a cidade é muito famosa por possuir um dos maiores núcleos de criação de equinos do Brasil, principalmente de PSI.

Palavras chave: Criptosporidiose; Equinos; Protozoário gastrointestinal; Rio de Janeiro.

ABSTRACT

Horses are animals that can become infected with different parasites, including the protozoa *Cryptosporidium* sp.. Several species of this genus have been characterized determining diarrhea and abdominal cramps in these animals, in addition to presenting a zoonotic transmissibility profile. To expand the information on this protozoan, this study aimed to analyze the frequency of *Cryptosporidium* spp. in horse feces on properties in Teresópolis, RJ, and the factors that may favor this infection. In total, 314 horses were collected, 287 horses were Thoroughbred and 27 ponies, coming from five Thoroughbred properties' denominated by the letters A to E and three of ponies named F to H. Information of horses and their handling were recovered by the stud book and by questionnaires to the trainers. The feces collected were subjected to macroscopic analysis, microscopic parasitological techniques by Sheather, Lutz and staining with safranin, as well as the search for coproantigens of *Cryptosporidium* sp. by the enzyme immunoassay (ELISA). All positive samples in at least one of these techniques were subjected to molecular analysis, with the polymerase chain reaction associated with sequencing to characterize the protozoan species and genotype when possible. Altogether *Cryptosporidium* sp. in 35 (11.1%) horses when associated with ELISA and staining with safranin. The protozoan was more detected in horses of properties D, followed by A and E, being evidenced mainly in the feces of PSI, because only one pony was positive. From a multivariate logistic regression model, it can be seen that the presence of dogs, small ruminants in the properties and the source of spring water were associated with protozoan infection of the horse ($p < 0.05$). Of the 35 positive samples, eight PSI samples could be characterized for species molecularly from the partial analysis of the 18S RNAr gen, with *Cryptosporidium felis* being identified in one sample and *Cryptosporidium parvum* in seven. Of these, five were also positive in the microscopic parasitological technique with safranin, in which the oocysts viewed under the microscope showed the measurement in the largest diameter ranging from 4.14 to 4.9 μm and in the smallest diameter 4.03 to 4.63 μm . It can be seen that the oocysts of two isolates Cry-266 and Cry-285 showed significant variations ($p < 0.05$) between their measurements by the Tuckey test, which may be normal for *C. parvum* or even be due to the procedure coloring technician. It is also important to note that the seven correct ones identified as *C. parvum* were subjected to a chain reaction associated with the sequencing to analyze the partial form of the gp60 gene, from the same possible evidence that the sequences belonged to the genotype IIa family. This family is usually transmitted from animals to humans. In addition, in equine 266 the genotype IIaA15G2R1 was completely identified, which is considered to have the highest zoonotic transmissibility profile. It is worth mentioning that this is the first study in the state of Rio de Janeiro that molecularly characterized *Cryptosporidium* spp. in horse feces, and the first in the American continent that detected *C. felis* in the feces of these animals. Based on what is exposed in this study, it is essential to encourage the monitoring practices of gastrointestinal parasites in animals, including the diagnosis of *Cryptosporidium* spp., since horses are very susceptible and sensitive as colic that can be determined by these agents, and may go to death due to this syndrome. In addition, the release of the oocysts of this protozoan in the environment, highlights the possibility that the horses are acting as reservoirs of the protozoan in Teresópolis, RJ since the city is very famous for having one of the largest nucleus of horse breeding in Brazil, mainly Thoroughbred.

Keywords: Cryptosporidiosis; Horses; Gastrointestinal protozoan; Rio de Janeiro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema de esporozoíta de <i>Cryptosporidium</i> sp. Fonte: adaptado de Tomazic et al. (2018).....	16
Figura 2 Ciclo biológico de <i>Cryptosporidium</i> sp. Fonte: Adaptado de Tomazic et al. (2018).	19
Figura 3 Fatores de virulência descritos nas caixas em amarelos de acordo com o ciclo biológico de <i>Cryptosporidium</i> sp. Fonte: Bouzid et al. (2013).	21
Figura 4 Localização da cidade de Teresópolis em azul no mapa da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. Fonte: Do autor.....	55
Figura 5 Fluxograma da metodologia empregada no estudo.....	63
Figura 6 Prancha científica da fotomicrografia dos oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp. indicados por setas e asteriscos, corados pela solução de safranina detectados em fezes de equinos da raça Puro Sangue Inglês mantidos em centros de Treinamento em Teresópolis, Rio de Janeiro. A foto A corresponde a equino 197 mantido na propriedade C, as fotos B,C,D e E correspondem aos equinos 271, 266, 285 e 292, respectivamente mantidos na propriedade E. Barra= 4 µm. As fotomicrografias foram realizadas com aumento de 1000 vezes.	68
Figura 7 Relações genéticas entre isolados de <i>Cryptosporidium</i> spp. inferidas pelo algoritmo Neighbor Joining utilizando o modelo Tamura 3-parametro com base nas sequências do gene gp60. Os números associados aos ramos referem-se aos valores de <i>bootstraps</i> para 1000 replicações. <i>Bootstraps</i> acima de 50% estão mostrados na árvore.	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Frequência e análise univariada de <i>Cryptosporidium</i> sp. detectado em fezes de equinos mantidos em diferentes propriedades em Teresópolis, Rio de Janeiro por meio da técnica parasitológica microscópica com solução safranina e pelo ensaio imunoenzimático.	65
Tabela 2 Frequência de <i>Cryptosporidium</i> sp. de acordo com variáveis recuperadas da análise macroscópica do material fecal, do <i>stud book</i> e dos formulários aplicados aos treinadores de equinos mantidos em diferentes propriedades em Teresópolis, Rio de Janeiro.....	66
Tabela 3 Modelo final de análise de regressão múltipla das variáveis estatisticamente associadas com a positividade para <i>Cryptosporidium</i> sp. detectado nas amostras fecais dos equinos mantidos em diferentes propriedade em Teresópolis, Rio de Janeiro.	67
Tabela 4 Informações morfométricas (média e desvio padrão) dos oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp. detectados pela técnica de coloração permanente em fezes de equinos mantidos em propriedade de Teresópolis, Rio de Janeiro.....	69
Tabela 5 Isolados de <i>Cryptosporidium</i> spp. caracterizados molecularmente detectados em fezes de equinos mantidos em propriedades em Teresópolis, Rio de Janeiro.	70

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 CRIPTOSPORIDIOSE.....	10
1.1.1 Histórico e Taxonomia	10
1.1.2 Transmissão, morfologia e ciclo biológico	14
1.1.3 Patogenia e manifestações clínicas	20
1.1.4 Diagnóstico	24
1.1.5 Tratamento e prevenção	29
1.1.6 Epidemiologia	31
2. JUSTIFICATIVA	53
3. OBJETIVO GERAL	54
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
4. MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	55
4.2 LOCAL DO ESTUDO	55
4.3 COLETA DE AMOSTRAS FECAIS, RECUPERAÇÃO DE DADOS E AMOSTRAGEM	57
4.4 PROCESSAMENTO LABORATORIAL	58
4.4.1 Técnica de Sheather (1923) modificada por Huber et al. (2003)	59
4.4.2 Coloração de coccídios pela solução de safranina (BAXBY et al., 1984)	59
4.4.3 Técnica de Lutz (1919)	60
4.4.4 Ensaio imunoenzimático	60
4.4.5 Análise Molecular	60
4.4.6 Análise estatística	62
5. RESULTADOS	64
6. DISCUSSÃO	72
7. CONCLUSÕES	80
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
ANEXO	93

1. INTRODUÇÃO

1.1 CRIPTOSPORIDIOSE

1.1.1 Histórico e Taxonomia

Em 1907, Ernest Edward Tyzzer descreveu pela primeira vez o protozoário intestinal *Cryptosporidium muris* na mucosa gástrica de camundongo em laboratório. Em 1912, o mesmo autor identificou uma outra espécie, denominada de *Cryptosporidium parvum* infectando o intestino delgado também dos camundongos em laboratório. O autor acreditava que se tratavam de espécies diferentes, devido ao menor tamanho do oocisto de *C. parvum*, quando comparado com o de *C. muris* e também devido ao diferente habitat destas espécies descritas (O'DONOGHUE, 1995). No entanto, a importância da infecção de *Cryptosporidium* especificamente, *C. meleagridis*, somente começou a ser reconhecida em 1950 devido a um surto que ocorreu em perus e por *C. parvum* causar diarreia em bovino nos anos de 1970 (BOUZID et al., 2013). Até 1980, o protozoário ainda não tinha recebido a devida importância em determinar infecção em seres humanos. Em 1982, o primeiro caso de criptosporidiose em paciente com a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) foi relatada e desta forma o protozoário foi por muitos anos associado a doença de pacientes aidéticos (BOUZID et al., 2013). Desde então, muitos casos de criptosporidiose, tem sido reportados infectando seres humanos e animais (TOMAZIC et al., 2018; VANATHY et al., 2017). Vários destes casos são relacionados a ingestão de água, desta forma *Cryptosporidium* spp. vem sendo caracterizado como o agente etiológico de vários surtos de transmissão hídrica em diferentes locais do mundo (BOUZID et al., 2013).

Cryptosporidium sp. inicialmente foi classificado como um coccídio, porém por apresentar características que o distingue de outros coccídios como: a possibilidade de autoinfecção endógena, sítio de infecção, transmissibilidade cruzada e relativa especificidade, pelo menos em algumas espécies, foi inserido em uma família específica, Criptosporidiidae (SMITH et al., 2007). Em 2016, mediante informações microscópicas, moleculares, genômicas e bioquímicas, foi observado similaridades entre *Cryptosporidium* e as gregarinas, destacando a identificação de formas evolutivas do parasito em ambiente intracelular e extracelular (RYAN et al., 2016). Gregarinas são um grupo muito diversificado de grandes parasitos apicomplexos unicelulares primitivos, que infectam principalmente os intestinos e outros espaços extracelulares de invertebrados e vertebrados inferiores, incluindo artrópodes, moluscos e anelídeos, que são abundantes em fontes de água (CLODE et al., 2015).

As principais similaridades entre *Cryptosporidium* e parasitos gregarinas foram observadas no ciclo biológico do mesmo, na ausência de um hospedeiro, ou seja, a multiplicação do protozoário em meios de cultivo acelular *in vitro*. Nestes sistemas foi observado as formas de grandes gamontes extracelulares, o processo de sizigia (no qual dois trofozoítos maduros emparelham-se antes da formação de um gametocisto) e a capacidade de adaptação do parasito ao ambiente a partir de mudança na estrutura celular (RYAN et al., 2016). Abaixo seguem algumas características similares observadas entre *Cryptosporidium* sp. e as gregarinas, apontadas de acordo com Ryan et al. (2016).

Quadro 1. Similaridades entre *Cryptosporidium* sp. e espécies de gregarinas adaptado de Ryan et al. (2016).

Propriedades	<i>Cryptosporidium</i>	Gregarinas
Ciclo biológico	Monoxeno	Monoxeno
Localização dentro da célula hospedeira	Ocorre na borda em escova do enterócito	Ocorre na borda em escova do enterócito
Localização epicelular	Sim	Em algumas espécies
Organela alimentar	Epimeríto	Mucron ou epimeríto
Alimentação similar a misocitose	Sim	Sim
Desenvolvimento extracelular	Sim	Sim
Capacidade reprodução assexuada intra ou extracelular (merogonia)	Sim	Sim
Dobras cobrindo a superfície dos estágios extracelulares	Sim	Descrito em algumas espécies
Presença de vacúolo parasitóforo	Sim	Em algumas espécies
Presença de apicoplasto	Ausente	Ausente na maioria das espécies
Sizigia	Sim	Sim
Capacidade dos esporozoítos em se desenvolver diretamente em estágios sexuais sem merogonia	Relatado em <i>C. parvum</i>	Em algumas espécies
Oocistos auto-infectantes	Sim	Em algumas espécies
Número de esporozoítos/oocitos	Quatro	Quatro na maioria das espécies
Presença de organelas do complexo apical como conóides e anéis polares nos esporozoítos	Sim	Em algumas espécies

Mediante a similaridade com o grupo das gregarinas, atualmente o gênero *Cryptosporidium* pertence ao Filo Apicomplexa, Classe Gregarinomorpha, Subclasse Cryptogregaria (RYAN et al., 2016). Até 2018, 38 espécies de *Cryptosporidium* sp. e mais de 40 genótipos já foram descritos com base principalmente na identificação molecular (HOLUBOVÁ et al., 2016; KVÁČ et al., 2016; ZAHEDI et al., 2016). De forma geral, a caracterização molecular tem validado as espécies que infectam anfíbios, répteis, aves, peixes e mamíferos (SLAPETA et al., 2013). Notavelmente, cerca de 150 espécies de mamíferos já foram descritas infectadas por *Cryptosporidium* sp. Algumas das espécies do protozoário descritas tem elevada importância na saúde pública, devido ao seu potencial zoonótico. Essas espécies podem parasitar uma ampla variedade de animais e já foram detectadas várias vezes infectando seres humanos, como *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium hominis*. Além dessas, há espécies que possuem especificidade por

hospedeiros, mas que eventualmente também podem infectar os seres humanos. Dessas destacam-se as que tem impacto moderado na saúde pública como *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium cuniculus* e *Cryptosporidium felis*. Há ainda, outras espécies que possuem importância menor na saúde pública, por terem sido relatadas em infecções pontuais em seres humanos (SLAPETA, 2013; ZAHEDI et al., 2016) (Quadro 2).

Cabe ressaltar que no passado acreditava-se que *Cryptosporidium parvum* possuía dois genótipos, o genótipo H ou 1, que infecta roedores, humanos e outros animais, e o genótipo C ou 2, que infecta principalmente bovinos e várias espécies animais, apresentando potencial zoonótico. Ao longo dos anos, esses genótipos foram realocados para nível taxonômico de espécie. De acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Científica, como o genótipo 1 foi descrito primeiro por Tizzer em 1912 em camundongo, este então deveria ter recebido o nome de *C. parvum*, enquanto que o genótipo tipo 2 descrito posteriormente, deveria ter sido identificado por outro nome, então, proposto por Slapeta em 2013, de *Cryptosporidium pestis* (SLAPETA, 2013). No entanto, *C. parvum* tem sido o nome utilizado nas publicações científicas para o genótipo tipo 2 e o nome *C. tyzzeri* o utilizado para identificar o genótipo tipo 1 (TOMAZIC et al., 2018). Em virtude da última proposta ser a nomenclatura mais utilizada na literatura, esta última então será a abordada neste texto.

Quadro 2. Espécies de *Cryptosporidium* sp., hospedeiros, relatos de infecções em humanos adaptado de Čondlová et al. (2018); Holubová et al. (2016); Horčíčková et al. (2018); Jezkova et al. (2016); Kváč et al. (2016); Kváč et al. (2018); Zahedi et al. (2016); Zahedi et al. (2017).

Nome das espécies de <i>Cryptosporidium</i>	Principais hospedeiros	Relatos de infecção em humanos	Importância em Saúde Pública
<i>Espécies que infectam peixes</i>			
<i>C. scophthalmi</i>	Peixes	Não relatado	Não há
<i>C. mowi</i>	Peixes	Não relatado	Não há
<i>C. molnari</i>	Peixes	Não relatado	Não há
<i>Espécies que infectam aves</i>			
<i>C. meleagridis</i>	Pássaros e humanos	Relatado	Moderada
<i>C. baileyi</i>	Aves, principalmente galinhas	Não relatado	Não há
<i>C. galli</i>	Aves	Não relatado	Não há
<i>C. avium</i>	Periquitos	Não relatado	Não há
<i>Espécies que infectam répteis e anfíbios</i>			
<i>C. fragile</i>	Anfíbios, principalmente Sapos	Não relatado	Não há
<i>C. varani</i>	Répteis, principalmente Lagartos	Não relatado	Não há
<i>C. serpentis</i>	Principalmente serpentes e lagartos porém também foi relatada em bovinos	Não relatado	Não há
<i>C. testudinis</i>	tartaruga	Não relatado	Não há
<i>C. ducismarci</i>	tartaruga	Não relatado	Não há
<i>Espécies que infectam mamíferos</i>			
<i>C. scrofarum</i>	Suínos e Javalis domésticos e silvestres	Relatado	Menor
<i>C. suis</i>	Suínos	Relatado	Menor
<i>C. ryanæ</i>	Bovinos	Não relatado	Não há
<i>C. andersoni</i>	Bovinos (principalmente), Ovinos, Caprinos e Ursos	Relatado	Menor
<i>C. bovis</i>	Principalmente Bovideos mas também em Corça, Gorila	Relatado	Menor
<i>C. agni= C. xiaoi</i>	Ovinos e Caprinos	Não relatado	Não há
<i>C. ubiquitum</i>	Ruminantes principalmente Bovinos, Roedores e Primatas	Relatado	Menor
<i>C. proliferans</i>	Roedor, Esquilos, Equideos, B ovideos	Não relatado	Não há
<i>C. cuniculus</i>	Coelhos	Relatado	Moderada
<i>C. tyzzeri</i>	Roedores (principalmente), Felídeos, Urso Panda, Bovideo, Bisão	Relatado	Menor
<i>C. wrairi</i>	Porquinhos da Índia e outros animais mamíferos	Não relatado	Não há
<i>C. muris</i>	Mamíferos, principalmente Roedores	Relatado	Pequeno
<i>C. rubeyi</i>	Esquilos	Não relatado	Não há
<i>C. erinacei</i>	Ouriços	Relatado	Menor
<i>C. macropodum</i>	Marsupiais	Não relatado	Não há
<i>C. fayeri</i>	Marsupiais	Relatado	Menor
<i>C. viatorum</i>	Humanos	Relatado	Moderado
<i>C. hominis</i>	Humanos (principalmente) e outros animais destacando Mamíferos marinho (<i>dugong</i>), Primatas não humanos, Marsupiais e Bovinos	Espécie mais comum em seres humanos	Maior
<i>C. parvum</i>	Mamíferos, principalmente ruminantes e animais silvestres	Relatado	Maior
<i>C. felis</i>	Gatos	Relatado	Moderada
<i>C. canis</i>	Canídeos	Relatado	Menor
<i>C. homai</i>	Porquinho da Índia	Não relatado	Não há
<i>C. apodemi</i>	Roedor	Não relatado	Não há
<i>C. ditrichi</i>	Roedor	Não relatado	Não há
<i>C. occultus</i>	Roedor	Não relatado	Não há
<i>C. alticolis</i>	Roedor	Não relatado	Não há

1.1.2 Transmissão, morfologia e ciclo biológico

Os protozoários do gênero *Cryptosporidium* são transmitidos para os hospedeiros direta ou indiretamente. A transmissão direta ocorre pela rota fecal – oral a partir do contato com os hospedeiros infectados, incluindo a transmissão animal para animal, animal para ser humano caracterizando o potencial zoonótico do parasito, humano para animal e humano para humano. A transmissão zoonótica geralmente está associada a manipulação e cuidado que os seres humanos realizam com as outras espécies animais. Já a transmissão indireta, envolve a ingestão de água e alimentos contaminados, como frutas e verduras, com material fecal contendo oocistos do protozoário (BOUZID et al., 2013). Além desta, a inalação do oocisto também já foi relatada. No entanto, este mecanismo de transmissão raramente ocorre (O'DONOGUE, 1995).

Oocistos de *Cryptosporidium* sp. são estruturas esféricas, ovoides ou elípticas, e dependendo da espécie variam em tamanho de 3,2 a 8,3 µm de diâmetro. No quadro 3 seguem os tamanhos dos oocistos de acordo com a espécie identificada e hospedeiro. Durante o ciclo biológico do protozoário dois tipos de oocistos podem ser gerados, sendo um oocisto de parede espessa que são excretados e eliminados com as fezes no ambiente e um de parede fina que são caracterizados pela falta de uma zona espessa presente na camada interna da parede do oocisto. Desta forma, estes oocistos podem determinar autoinfecção para o hospedeiro parasitado (O'DONOGUE, 1995; TOMAZIC et al., 2018). Os oocistos de *Cryptosporidium* sp. contêm no seu interior quatro esporozoítas, mas não possuem esporocistos envolvendo estas estruturas. A parede do oocisto é formada por três camadas e por uma linha de sutura de onde emergem os esporozoítas (TOMAZIC et al., 2018).

Quadro 3. Tamanho dos oocistos de acordo a espécie identificada e hospedeiro adaptado de Tomazic et al. (2018).

Hospedeiro	Espécies	Local de infecção	Tamanho do oocisto (µm)
Bovino	<i>C. parvum</i>	Intestino	4,5 x 7,0
	<i>C. ryanae</i>	Intestino	3,2 x 3,7
	<i>C. bovis</i>	Desconhecido	4,9 x 4,6
	<i>C. andersoni</i>	Estômago	7,4 x 5,5
Suíno	<i>C. parvum</i>	Intestino	4,5 x 7,0
	<i>C. suis</i>	Intestino	4,6 x 4,2
	<i>C. muris</i>	Estômago	7,0 x 5,0
Ovino	<i>C. parvum</i>	Intestino	4,5 x 7,0
	<i>C. ubiquitum</i>	Intestino	5,0 x 4,7
	<i>C. xiaoi</i>	Intestino	3,9 x 3,4
Caprino	<i>C. parvum</i>	Intestino	4,5 x 7,0
	<i>C. xiaoi</i>	Intestino	3,9 x 3,4
Equino	<i>C. parvum</i>	Intestino	4,5 x 7,0
	<i>C. hominis</i>	Intestino	5,2 x 4,9
Cães	<i>C. parvum</i>	Intestino	4,5 x 7,0
	<i>C. canis</i>	Intestino	5,0 x 4,7
	<i>C. meleagridis</i>	Intestino	5,2 x 4,6
	<i>C. muris</i>	Estômago	7,0 x 5,0
Gatos	<i>C. felis</i>	Intestino	5,0 x 4,5
	<i>C. muris</i>	Estômago	7,0 x 5,0
	<i>C. galli</i>	Estômago	8,3 x 6,3
Galinha		Intestino, Bursa de Fabricius,	
	<i>C. bailey</i>	trato respiratório e conjuntiva	6,2 x 4,6
	<i>C. meleagridis</i>	Intestino e Bursa de Fabricius	-
Peixe	<i>C. scophthalmi</i>	Intestino	4,4 x 3,9
	<i>C. molnari</i>	Estômago	4,7 x 4,5
Répteis	<i>C. serpentis</i>	Estômago	2,8 x 3,6
	<i>C. varanii</i>	Intestino, estômago	4,8 x 4,7

Os esporozoítas de *Cryptosporidium* sp. possuem o formato alongado, tem cerca de 5 µm de comprimento e 5 µm largura e são circundados por uma película, que contém microtúbulos. A porção anterior desta célula é formada pelo complexo apical, que tem como funções auxiliar no processo de invasão à célula hospedeira (DEL COCO et al., 2009). Este complexo apical consiste nas estruturas de anéis apicais, conóide, organelas secretórias tais como rôptrias, micronemas e grânulos densos (SMITH et al., 2005). Na Figura 1 pode-se observar um esquema do esporozoíta, contendo suas organelas.

Durante o processo de invasão, a rôptria e os micronemas liberam seu conteúdo na região apical da célula hospedeira. Os micronemas também estão envolvidos na motilidade por deslizamento do protozoário e as rôptrias são importantes para a formação do vacúolo parasitóforo. Já, o conteúdo dos grânulos densos é descarregado na superfície dos zoítas,

como os esporozoítas, trofozoítas ou merozoítas e são responsáveis pela modificação da célula hospedeira após invasão (BOROWSKI et al., 2008).

Organelas e outras estruturas celulares são encontradas na região central do esporozoíta como Complexo de Golgi, núcleo, grânulos de amilopectinas e ribossomos. Corpos cristaloides são observados na porção posterior do núcleo, mas a sua origem e função é desconhecida. Entre o núcleo e os corpos cristaloides, pode-se observar mitossoma, que é uma organela derivada da mitocôndria, porém sem genoma e cristas tubulares (SMITH et al., 2005).

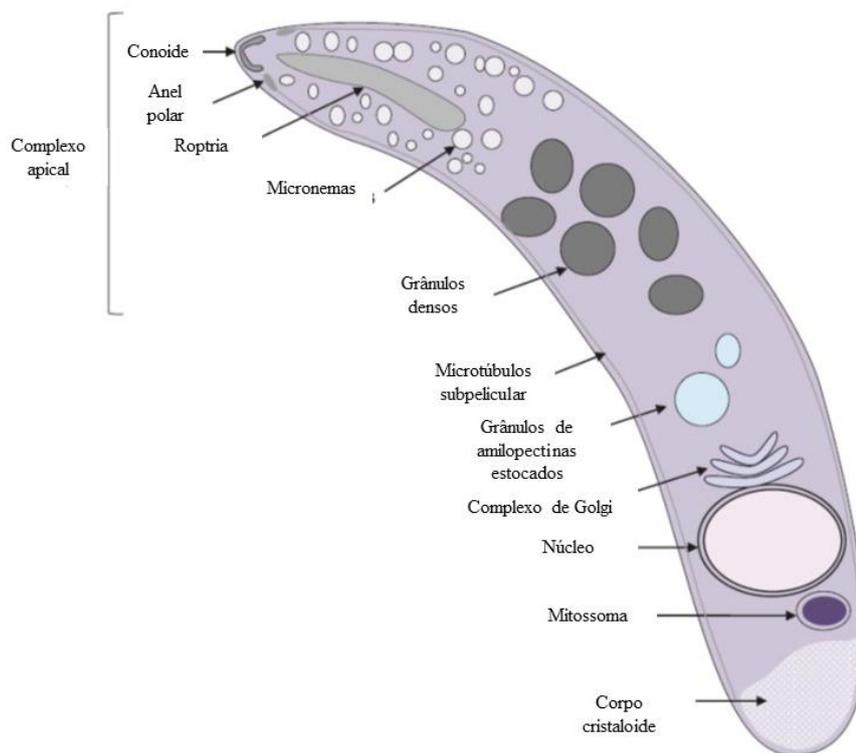


Figura 1 Esquema de esporozoíta de *Cryptosporidium* sp. Fonte: adaptado de Tomazic et al. (2018).

O estágio de trofozoíta dentro do vacúolo parasitóforo adquire diferentes tamanhos dependendo do período de desenvolvimento do ciclo biológico, podendo medir entre 1,0 μm os mais recentes, a 2,5 μm de comprimento os mais tardios, em sistemas de cultivo celular (TOMAZIC et al., 2018). Sabe-se que a membrana desse vacúolo se dobra originando uma organela alimentar chamada de epimerito, que facilita a captura de nutrientes da célula hospedeira (CLODE et al., 2015).

Fazendo parte da etapa de multiplicação assexuada, há as formas evolutivas de meronte também chamado de esquizonte. Esta forma evolutiva tem localização epicelular e na sua forma primária, também chamado de meronte tipo I contém cerca de oito merozoítas. Os merontes variam em tamanho de acordo com o estágio de desenvolvimento, ou seja, os merontes do tipo I mais recentes medem 1,5 μm de comprimento, enquanto que os merontes do tipo I mais tardios medem 2,5 μm de comprimento (TOMAZIC et al., 2018). Já os merontes de segunda geração, ou seja, do tipo II podem medir até 3,5 μm de comprimento, possuindo uma membrana externa mais espessa do que o meronte do tipo I. De forma geral, dentro dos merontes ocorre divisão binária de suas células, originando formas evolutivas denominadas de merozoítas, que apresentam diferentes formatos, indo desde o alongado semelhante ao esporozoíta ou mais arredondados. Merozoítas medem cerca de 1 μm de comprimento por 0,5 μm de largura, e assim como os esporozoítas, também possuem as organelas que compõem o complexo apical (BOROWSKI et al., 2010).

Participando diretamente da reprodução sexuada há os estágios de microgamontes, que considerados os gametas masculinos, são arredondados medindo 2,0 μm de comprimento por 2,0 μm de largura e contém um grande número de microgametas. Dentro desses microgamontes, os microgametas estão densamente empacotados, são esféricos, medem 0,1 μm de comprimento e não são flagelados. Já os estágios de macrogamontes, que correspondem ao gameta feminino, possuem formato ovular e medem cerca de 5,0 a 4,0 μm de diâmetro (BOROWSKI et al., 2010). A forma evolutiva resultante da fertilização do macrogameta pelo microgameta, denominada de zigoto medem cerca de 1,5 a 2,9 μm de diâmetro e possuem grandes quantidades de amilopectinas (PUMIPUNTU; PIRATAE, 2018; TOMAZIC et al., 2018). Somente esta forma evolutiva ainda não foi observada em sistemas de cultivos *in vitro* acelulares (CLODE et al., 2015).

As formas denominadas de gamontes – like gigantes foram exclusivamente observadas em sistemas de cultivo *in vitro* acelulares. Estas formas evolutivas exibem o tamanho 2,3 a 5,3 μm de diâmetro. Em sistema de cultivo mais antigos, estas formas crescem em tamanho podendo exibir de 7,6 a 16,6 μm de comprimento (TOMAZIC et al., 2018)

Em relação ao ciclo biológico, sabe-se que *Cryptosporidium* sp. é um parasito monoxeno, ou seja, só precisa de uma espécie de hospedeiro para completar todo seu ciclo. Após a ingestão do oocisto pelo hospedeiro, o desencistamento ocorre no lúmen do intestino delgado, sendo então, liberados os quatro esporozoítas (TOMAZIC et al., 2018). Entre os estímulos e fatores que favorecem o desencistamento do oocisto destacam-se a temperatura luminal, a presença de sais biliares, condições redutoras, pH e enzimas digestórias

(LENDNER; DAUGSCHES, 2014). Após o desencistamento, moléculas e receptores expressos na superfície dos esporozoítas interagem com a membrana dos enterócitos. Dentre as moléculas bem caracterizadas na superfície dos esporozoítas, destacam-se a proteína de superfície p30 e glicoproteína gp 40/15 originadas da clivagem da gp60 e a gp900. Por meio dessa interação organelas como róprias, micronemas e grânulos densos são estimuladas a secretarem substâncias que facilitam a invasão e a movimentação por deslizamento realizada pelo parasito, uma forma exclusiva de movimentação de protozoários apicomplexos, que é um pré-requisito fundamental para a invasão à célula hospedeira (TOMAZIC et al., 2018).

Quando invadem, os esporozoítas, induzem a formação de vacúolos parasitóforos ficando localizados no seu interior, onde ocorre todo o ciclo biológico do protozoário. Caracteristicamente, estes vacúolos ficam localizados na borda das microvilosidades intestinais, ou seja, em posição intracelular, porém extracitoplasmática, também referida como localização epicelular (O'DONOGHUE, 1995; TOMAZIC et al., 2018). No interior do vacúolo parasitóforo, os esporozoítas subsequentemente, passam por alterações morfológicas, dando origem aos trofozoítas. Dentro deste vacúolo, o trofozoíta passa por duas gerações de merogonia, ou seja, reprodução assexuada, formando o meronte tipo I que possui oito merozoítas arredondados em seu interior. Após a ruptura do meronte tipo I, os merozoítas liberados invadem novas células epiteliais podendo originar mais merontes tipo I ou iniciar a produção de meronte do tipo II que contém em seu interior quatro merozoítas com formato fusiforme, formas evolutivas precursoras da reprodução sexuada (TOMAZIC et al., 2018).

Os merozoítas de segunda geração invadem novamente os enterócitos e se diferenciam em macrogamonte, gameta feminino, e microgamonte, gameta masculino, iniciando a fase de reprodução sexuada. O macrogamonte evolui para um macrogameta imóvel uninucleado que permanece no interior do enterócito. Já os microgamontes, tornam-se multinucleados e cada núcleo origina cerca de 16 microgametas móveis (BOUZID et al., 2013). Subsequentemente, os microgametas são liberados do microgamonte e fecundam o macrogameta, originando, portanto, o zigoto. Finalmente, os zigotos, entram em um processo de meiose resultando na formação dos quatro esporozoítas. Esta fase do ciclo biológico é chamada de esporogonia (TOMAZIC et al., 2018). Em torno desse zigoto forma-se uma parede cística que caracteriza o oocisto. Desta forma, o oocisto de *Cryptosporidium* sp. é liberado com as fezes no ambiente já infectante (TZIPORI; WARD, 2002).

É importante ressaltar que dois tipos de oocistos, os de parede fina que correspondem a 20% dos oocistos e os de parede espessa podem se formar no ciclo biológico de

produto da fecundação ainda não foi identificado nesses ambientes (CLODE et al., 2015). Sabe-se que além dos trofozoítas, os gamontes, tanto, o micro quanto o macrogamontes realizam sизigia (TOMAZIC et al., 2018).

Além destas formas evolutivas, em ambiente extracelular já foi identificado também as formas de gamontes (*gamont – like stage*) e gamontes gigantes (*gigant gamont – like stage*). Estas formas evolutivas provavelmente se formam a partir dos trofozoítas e acredita-se que estas produzam mais merozoítas e trofozoítas, maximizando o potencial reprodutivo do parasito sem a necessidade da fase sexuada. No entanto, a função destes gamontes ainda permanecem desconhecidas (CLODE et al., 2015).

1.1.3 Patogenia e manifestações clínicas

O gênero *Cryptosporidium* possui espécies de parasitos com importância, tanto médica quanto veterinária, pois pode causar gastroenterite em uma variedade de hospedeiros vertebrados. Apesar de ser reconhecido como um protozoário patogênico, que pode causar infecções sintomáticas no hospedeiro parasitado, a patogênese da infecção determinada pelas espécies desse gênero no intestino delgado, ainda não é completamente compreendida. Acredita-se que seja multifatorial, envolvendo fatores do hospedeiro e do parasito (CERTAD et al., 2017).

A interação do patógeno com o hospedeiro resumidamente ocorre mediante o desencistamento do oocisto, adesão e locomoção por deslizamento do esporozoíta na membrana do enterócito, invasão e multiplicação do parasito no interior do vacúolo parasitóforo em ambiente intracelular. A maioria das informações adquiridas em relação ao desencadeamento da infecção intestinal determinada pelas espécies de *Cryptosporidium* sp. foram adquiridas mediante estudos genômicos de *C. parvum* e *C. hominis*, tendo sido identificado 25 fatores de virulência nessas espécies (BOUZID et al., 2013).

Cryptosporidium sp. geralmente não causa uma infecção sistêmica e nem penetra profundamente nos tecidos infectados. Sabe-se que as anormalidades significativas determinadas pelas espécies desse gênero ocorrem no intestino delgado, destacando-se alterações na absorção de nutrientes, bem como em prejuízos na função secretória deste órgão. De forma geral, os danos determinados a mucosa do hospedeiro ocorrem a partir de ações diretas do parasito e pela produção da resposta inflamatória e de citocinas pelo hospedeiro (BOUZID et al., 2013). A presença do parasito no interior do vacúolo parasitóforo intracelular e extracitoplasmático desencadeia ativação de uma cascata de sinalização que culmina na alteração da barreira seletiva da mucosa intestinal, mediante

prejuízos na produção de moléculas de junção celulares e também na ativação da polimerização de filamentos de actina, que determina mudança no citoesqueleto do enterócito. Estas alterações resultam na apoptose do enterócito, sendo esse processo geralmente ativado pelas formas evolutivas de esporozoítas e merozoítas, mas inibida pela forma de trofozoíta (CERTAD et al., 2017). As alterações estruturais no epitélio intestinal conduzem ao encurtamento das microvilosidades e aprofundamento das criptas intestinais, gerando a má absorção de nutrientes. O parasito também estimula a liberação de mediadores inflamatórios, tais como interferon gama, interleucina e fator de necrose tumoral, que estimulam a liberação da secreção de cloro e água e diminuição da absorção de sódio resultando em diarreia osmótica (VANATHY et al., 2017).

A etapa inicial e crucial do estabelecimento da infecção pelas espécies de *Cryptosporidium* sp. ocorre mediante a interação de receptores e moléculas presentes na superfície do mesmo e da célula hospedeira. Duas classes de proteínas, denominadas de glicoproteínas similares a mucina e proteínas adesivas relacionadas com a trombospondina foram caracterizadas na superfície dos esporozoítas apresentando função relacionada com a interação, adesão na membrana do enterócito e também a invasão e multiplicação do parasito (BOUZID et al., 2013) (Figura 3).

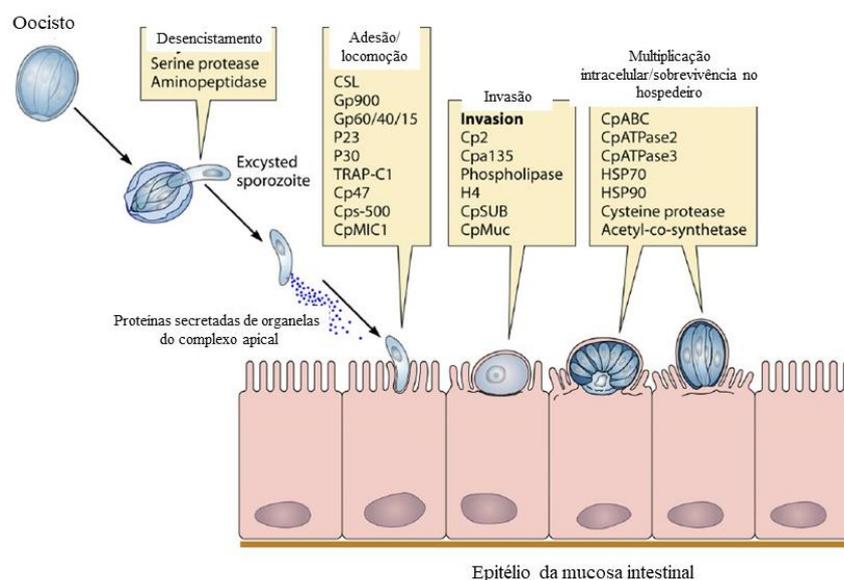


Figura 3 Fatores de virulência descritos nas caixas em amarelos de acordo com o ciclo biológico de *Cryptosporidium* sp. Fonte: Bouzid et al. (2013).

Dentre as moléculas representadas no esquema da figura 3 destacam-se as glicoproteínas, gp15/40, originadas da clivagem de uma glicoproteína de 60 kDa denominada de gp60. Estas moléculas ficam ancoradas na superfície do parasito por meio de uma molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI) e por meio das mesmas o parasito interage com a membrana do enterócito. É importante ressaltar que o gene que codifica para a gp60 é altamente polimórfico, sendo por isso muito utilizado na genotipagem do parasito (TOMAZIC et al., 2018). Além disso, a gp60 é um dos principais alvos dos anticorpos neutralizantes (CUNHA et al., 2019).

A criptosporidiose resulta principalmente em diarreia aquosa que algumas vezes pode ser profusa e prolongada, além da dor abdominal. Outros sintomas evidenciados em seres humanos incluem náusea, vômito e febre baixa. Ocasionalmente nestes hospedeiros, sintomas não específicos também são evidenciados tais como mialgia, fraqueza, mal-estar, dor de cabeça e anorexia. A severidade e a persistência da infecção são dependentes do parasito e também de fatores do hospedeiro (O'DONOGHUE, 1995). Os fatores do parasito incluem-se a espécie e a dose infectante, ou seja, o número de oocistos ingeridos pelo hospedeiro. Já em relação ao hospedeiro destacam-se a espécie de hospedeiro, idade e *status* imunológico (DEL COCO et al., 2009). Desta forma, a severidade da infecção determinada por *Cryptosporidium* sp. pode variar indo desde de quadros leves até quadros severos. Hospedeiros imunocompetentes geralmente apresentam infecção autolimitante que dura cerca de duas a três semanas no máximo, sendo na grande maioria das vezes assintomáticas. Contudo, pacientes humanos imunocomprometidos podem apresentar quadros clínicos graves da infecção com sintomas persistentes que conduzem a desidratação e até ao óbito. Além disso, nestes pacientes também podem ser observados manifestações clínicas atípicas da gastrointestinal, tais como inflamação do trato biliar, respiratório, além de pancreatite (O'DONOGUE, 1995; BOUZID et al., 2013).

Além dos seres humanos, os surtos de criptosporidiose em outras espécies animais geralmente ocorrem nas criações intensivas, que possuem práticas de pastoreio misto, devido a forragem ingerida, água de consumo e recintos contaminados com oocistos. Em animais, os hospedeiros mais jovens parecem ser os mais susceptíveis a desenvolver a infecção com sintomatologia clínica, e casos de óbito já foram relatados em várias espécies, especialmente nos ruminantes (O'DONOGHUE, 1995). A maioria das infecções em hospedeiros adultos são assintomáticas ou apresentam sintomas brandos. Infecções graves, principalmente em hospedeiros imunocomprometidos já foram relatados em cães, gatos, equinos e primatas não humanos (O'DONOGHUE, 1995).

No caso dos equinos, a criptosporidiose geralmente é determinada por *Cryptosporidium parvum* e assim como nos outros animais, o imunocomprometimento e o extremo de idade, destacando os potros e os adultos jovens, foram apontadas como fatores de risco para o desenvolvimento de infecções sintomáticas (MAJEWSKA et al., 2004; XIAO; HERD, 1994). No entanto, infecções sintomáticas em equinos imunocompetentes também já foram relatadas. As infecções assintomáticas geralmente ocorrem em equinos na fase adulta (TOMAZIC et al., 2018; XIAO; HERD, 1994). De forma geral, os sintomas determinados por *Cryptosporidium* sp. em equinos ainda é pobremente relatado (INÁCIO et al., 2018). Nestes animais a sintomatologia mais caracterizada é a diarreia aquosa, sendo o principal habitat do parasito a porção distal do intestino delgado, especialmente o íleo (XIAO; HERD, 1994). A inflamação na mucosa intestinal e a atrofia da microvilosidade intestinal com perda da superfície absorptiva causam desequilíbrio no transporte de nutrientes e prejuízo na produtividade dos equinos (INÁCIO et al., 2018). Em equinos imunocomprometidos outros órgãos também podem ser acometidos como estômago, intestino grosso, pâncreas e ductos biliares (BJORNEBY et al., 1991; XIAO; HERD, 1994). O período pré-patente de *C. parvum* em equinos ocorre entre 2 a 5 dias e o patente entre 5 a 8 dias (BJORNEBY et al., 1991; TOMAZIC et al. 2018).

Os equinos tendem a reagir de forma diferente a infecção por *Cryptosporidium* sp.. Potros infectados geralmente apresentam quadros diarreicos agudos, que ocorrem no primeiro mês de vida, sendo que o quadro clínico pode evoluir para o óbito na primeira ou segunda semana após a infecção. Embora altas taxas de mortalidade já tenham sido relatadas nesse grupo etário, quadros diarreicos também são observados em animais mais velhos (XIAO; HERD, 1994). Em equinos, *Cryptosporidium* sp. também já foi apontado como um parasito oportunista, pois a sintomatologia clínica da infecção geralmente ocorre nos animais coinfectados com rotavírus, adenovírus, coronavírus, *Salmonella*, *Clostridium perfringens* e *Giardia duodenalis* (BURTON et al., 2010; XIAO; HERD, 1994).

De forma geral, a resposta imunológica contra a infecção por *Cryptosporidium* sp. ocorre pelos mecanismos inatos e adaptativos. A imunidade inata ocorre pelas células natural killer, células dendríticas, macrófagos, quimiocinas, receptores Toll – like e óxido sintase. Já a imunidade adaptativa ocorre pelos linfócitos T e B. O interferon gama tem uma importante função na imunidade inata pela ativação dos macrófagos e consequentemente ativação da enzima óxido nítrico sintase que produz óxido nítrico, um radical de oxigênio tóxico para o parasito. Na resposta imunológica adaptativa, os linfócitos Th1 CD4 helper atuam contra o parasito a partir da produção de interferon, interleucinas (IL2 e IL 12) e fator

de necrose tumoral (TNF), e os linfócitos Th2 auxiliam na eliminação dos parasitos. Pacientes com contagem de células CD4 menor que 200 células/mm³ tendem a apresentar uma infecção severa. Cabe ressaltar que a função da imunidade humoral ainda é questionável. Contudo, tem sido identificado um elevado nível de imunoglobulinas do tipo G e A em indivíduos infectados pelo protozoário (VANATHY et al., 2017).

1.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico da criptosporidiose vem sendo considerado um desafio, pois os sintomas clínicos da parasitose são inespecíficos, e os oocistos, que são liberados nas fezes são muito pequenos e possuem liberação intermitente (SANTIN, 2013). As técnicas mais indicadas para o diagnóstico do protozoário são as coproparasitológicas, ou seja, mediante a pesquisa dos oocistos no material fecal do hospedeiro (O'DONOGHUE, 1995).

Na obtenção do material fecal deve-se priorizar a coleta de múltiplas amostras em dias distintos, ou seja, no mínimo três amostras fecais de cada hospedeiro, uma vez que os oocistos têm liberação intermitente. Além disso, o ideal é realizar a pesquisa parasitológica em fezes frescas ou devidamente preservadas com conservantes físico e/ou químicos, que permitam manter o material fecal armazenado por mais tempo no laboratório e o diagnóstico do parasito *a posteriori* (AHMED; KARANIS, 2018; XIAO; HERD, 1994). No entanto, o tipo de conservante escolhido dependerá da técnica laboratorial que será empregada. Os conservantes químicos mais utilizados são a formalina a 10%, acetato de sódio – ácido acético – formaldeído (SAF), álcool polivinílico (PVA) e o etanol absoluto (AHMED; KARANIS, 2018). As soluções de formalina a 10%, SAF e PVA possuem a vantagem de inviabilizar o parasito, tornando as amostras fecais mais seguras de serem manipuladas pelo técnico, mas apresentam como inconveniente inibir as reações moleculares, não permitindo a realização dos diagnósticos espécie específicos do protozoário. A solução de dicromato de potássio a 2,5%, mantém os oocistos viáveis por 6 a 12 meses, porém não é adequada para os testes moleculares, pois também inibem as suas reações (AHMED; KARANIS, 2018; TOMAZIC et al., 2018). Uma alternativa de conservante químico que tem sido muito preconizada é o etanol absoluto, pois a morfologia dos oocistos e a propriedade do DNA pode ser preservada por mais de dois anos. Além deste, o método de congelamento (-20°C), um conservante físico, permite preservar o DNA parasitário, assim como o etanol, sendo também indicado para a caracterização molecular da espécie do parasito (AHMED; KARANIS, 2018).

Em caso de fezes frescas o exame macroscópico deve ser realizado para se observar a consistência do material fecal. Maior número de oocistos são detectados em fezes diarreicas ou com consistência aquosa. Em fezes solidas de pacientes assintomáticos, a quantidade de oocistos parece ser menor (VANATHY et al., 2017). Dentre as técnicas laboratoriais de concentrações de oocistos de *Cryptosporidium* sp. incluem-se as que possuem como fundamento a flutuação e a sedimentação. Estas possuem como vantagens a eliminação dos debrís fecais facilitando a visualização dos oocistos na microscopia óptica e concentração dos oocistos na amostra (CUNHA et al., 2019). Desta forma, as técnicas de concentração são principalmente indicadas em amostras fecais de hospedeiros assintomáticos, que geralmente possuem pequenas quantidades dessas formas evolutivas (AHMED; KARANIS, 2018).

As técnicas de flutuação utilizam soluções densas, afim de permitir a concentração dos oocistos. Além de concentrarem, estas técnicas também permitem a purificação dos oocistos. A mais utilizada é a técnica de flutuação de Sheather que utiliza solução de sacarose, mas também pode ser utilizado as técnicas com soluções de sulfato de zinco e solução de cloreto de sódio (AHMED; KARANIS, 2018). As soluções utilizadas nas técnicas de flutuação por apresentarem elevada densidade, acabam em cerca de 10 minutos colapsando os oocistos, ou seja, tornando-os deformados. Tal fato, ressalta a necessidade de leitura no microscópio das lâminas oriundas destas técnicas o mais rápido possível (O'DONOGHUE, 1995). Na microscopia óptica, os oocistos apresentam-se como corpos esféricos, translúcidos com refringência rosada na parede, contendo grânulos em seu interior. No entanto, para melhor visualização dos oocistos, a microscopia de campo escuro e contraste de fase são recomendadas. Nestes, os oocistos aparecem como estruturas esféricas, brilhantes contendo grânulos escuros em seu interior (CUNHA et al., 2019; XIAO; HERD, 1994).

As técnicas de concentração por sedimentação utilizadas no diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium* sp., são as de sedimentação por centrifugação simples e as de sedimentação em solução de água - éter ou formalina – éter. Estas técnicas geralmente são utilizadas como etapas que precedem as técnicas de coloração permanente e as mesmas geralmente utilizam pelo menos 10 minutos de centrifugação do material fecal para concentrar os oocistos (AHMED; KARANIS, 2018; VANATHY et al., 2017).

Na tentativa de aumentar a concentração dos oocistos dos protozoários nas fezes, também tem sido empregado, a separação imunomagnética-. Este método consiste no uso de *beads* magnéticas cobertas com anticorpos monoclonais anti – parede do oocisto de

Cryptosporidium sp.. Este tipo de concentração também tem sido utilizado em amostras ambientais como a água. Apesar de aumentar a concentração do oocisto na amostra fecal, a separação imunomagnética tem sido pouco utilizada devido ao seu elevado custo (AHMED; KARANIS, 2018; TOMAZIC et al., 2018).

Tradicionalmente o diagnóstico em microscopia óptica dos oocistos de *Cryptosporidium* sp. tem sido feito por meio de técnicas de colorações permanentes, principalmente as denominadas *acid-fast* aquecidas ou não. As mais utilizadas são as que utilizam solução de safranina-azul de metileno a 1%, de Ziehl – Neelsen modificado e a de Kinyoun. Geralmente, nestas técnicas os oocistos apresentam-se como corpos arredondados com 4 a 8 μm de diâmetro, se coram de róseo a vermelho e os debris fecais, bactérias e fungos com a coloração de fundo, que geralmente é azul ou verde. Estas técnicas são simples, rápidas e baratas, mas apresentam baixa sensibilidade em fezes formadas e o limite de detecção requer a presença de 10^3 a 10^5 oocistos por grama de fezes. Em fezes diarreicas este limiar é bem menor, estando em torno de 10^2 ou menos oocistos por grama de fezes (WEBER et al., 1991).

Resultados falso positivos podem ocorrer, pois as bolhas de gordura e fungos podem ser confundidos com os oocistos, se o microscopista não estiver bem treinado (BAXBY et al., 1984). Além disso, esta técnica não permite diagnosticar a espécie do parasito, e necessitam de mensuração do oocisto para confirmar o gênero, pois as mesmas também coram oocistos de outros parasitos como *Cyclospora*, *Isospora* e *Cystoisospora* (AHMED; KARANIS, 2018). Além destas técnicas, também há as de coloração negativa que utilizam soluções de verde malaquita e negrosina. Nestas, os oocistos são observados não corados e o material de fundo encontra-se corado. A grande limitação das mesmas é necessidade de um microscópio de contraste de fase para a leitura da lâmina (VANATHY et al., 2017).

O diagnóstico *post-mortem* da criptosporidiose tem sido utilizado nos animais, incluindo os equídeos. A partir de secções dos tecidos corados com hematoxilina eosina observa-se diferentes formas evolutivas endógenas do parasito como corpos basofílicos no interior dos vacúolos parasitóforos presentes na borda escova da microvilosidade intestinal (XIAO; HERD, 1994). Técnicas de microscopia eletrônica também podem ser utilizadas para identificar e caracterizar morfológicamente as formas evolutivas do parasito, sendo geralmente utilizadas na pesquisa (O'DONOGUE, 1995).

Métodos de detecção mais específicos e sensíveis quando comparado com microscopia óptica têm sido utilizados baseados no imunodiagnóstico e na detecção de antígenos, dentre esses se destacam a reação de imunofluorescência direta (RIFD) e o ensaio

imunoenzimático direto (ELISA) também chamado de coproantígeno. Estes testes estão disponíveis em formato de *kits* comerciais e seu uso é adequado quando um grande número de amostras fecais necessita ser analisadas (GARCIA; SHIMIZU, 1997). A imunofluorescência direta geralmente é utilizada para detectar oocistos de *Cryptosporidium parvum*. Nesta técnica os anticorpos associados a fluoresceína presente nos *kits* comerciais adsorvem aos antígenos da parede do oocisto, demarcando o mesmo por meio da fluorescência. No entanto, esta técnica é cara e necessita de um microscópio de fluorescência para a leitura da lâmina do material fecal. A mesma tem sido muito utilizada em pesquisa de *Cryptosporidium* sp. em água (JEX et al., 2008). Já o ELISA, também chamado de coproantígeno fornece um resultado rápido e fácil de ser interpretado. Esta técnica apresenta maior sensibilidade, pois utiliza anticorpos monoclonais. Desta forma, mesmo que não haja liberação de oocisto no material fecal, antígenos do protozoário ainda podem estar presentes. Contudo, essa sensibilidade é variável, e dessa forma os resultados destes testes devem ser analisados com cautela, pois podem ocorrer resultados falso positivos (AHMED; KARANIS, 2018). Além, do ELISA e RIFD, também há os testes rápidos do tipo imunocromatográficos para a pesquisa de antígenos do parasito em formatos comerciais de cassetes (CUNHA et al., 2019).

O diagnóstico de anticorpos no soro dos pacientes infectados com *Cryptosporidium* sp. pode ser detectado realizado pelos métodos sorológicos. No entanto, a presença dos anticorpos não permite diferenciar se a infecção é atual ou antiga, e as técnicas sorológicas, então, acabam não sendo muito utilizadas nos inquéritos epidemiológicos (CUNHA et al., 2019).

É importante ressaltar que as técnicas laboratoriais para diagnóstico de *Cryptosporidium* sp. possuem limites de detecção e sensibilidade diferentes, que também podem variar de acordo com o tipo de material fecal do hospedeiro. Com a finalidade de avaliar este panorama, nos Estados Unidos, amostras fecais de três equinos sabidamente negativas foram experimentalmente inoculadas com oocistos de *Cryptosporidium parvum* em diferentes concentrações. Estas foram submetidas as técnicas de coloração permanente ácido – rápida, a fluorescência direta e a citometria de fluxo, sendo este experimento repetido três vezes em diferentes momentos. A partir das análises foi possível verificar que o citômetro de fluxo foi a técnica mais sensível, pois detectou uma concentração mínima de 5×10^4 oocistos em todas as três amostras fecais analisadas. Já o diagnóstico pela imunofluorescência direta e a técnica parasitológica microscópica com coloração

permanente, mostrou-se segura, ou seja, em 100% das amostras, quando estas estavam contaminadas com 5×10^5 oocistos por grama de fezes (COLE et al., 1999).

A detecção do DNA de *Cryptosporidium* sp. por meio das técnicas moleculares possui elevada importância, pois permite identificar a espécie do parasito e também o seu genótipo (JEX et al., 2008). Além disso, as técnicas de biologia molecular têm sido utilizadas para se tentar entender a epidemiologia do parasito mediante a identificação das várias espécies de *Cryptosporidium* sp. e os seus possíveis hospedeiros (CUNHA et al., 2019). As técnicas moleculares atualmente utilizadas para caracterizar *Cryptosporidium* spp. são baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR), incluindo as suas variações como a *nested*-PCR, *single-stranded conformation polymorphism* PCR (PCR – SSCP), hibridização de DNA por sonda, polimorfismo do comprimento do fragmento (PCR – RFLP), multiplex PCR e PCR em tempo real. A *nested* PCR geralmente é utilizada associada ao sequenciamento genético para gerar o fragmento nucleotídico do produto de DNA amplificado. Estas reações em cadeia da polimerase podem utilizar diferentes alvos gênicos, entre eles se destacam, a pequena subunidade do RNAr 18S, que estão presentes em cinco cópias no genoma e são os menos polimórficos devido à baixa taxa de evolução; o gene COWP que codifica a proteína da parede do oocisto; gene hsp 70 que codifica proteínas de choque térmico; as regiões hipervariáveis ITS – 1 e ITS 2 que correspondem às regiões de espaçadores do RNAr; gene trap que codifica a trombospondina relacionada à proteína adesiva de *Cryptosporidium* spp. e o gene que codifica as glicoproteínas gp60 ou gp15/40 (CUNHA et al., 2019).

A identificação da espécie de *Cryptosporidium* sp. tem sido principalmente realizada a partir da amplificação do fragmento de gene RNAr, devido à existência de sequências nucleotídicas conservadas específicas. Além da caracterização de espécie, as ferramentas de genotipagem molecular vem sendo utilizadas para avaliar a diversidade genética existentes em *C. parvum*, *C. hominis* e em outras espécies do parasito que podem eventualmente infectar os seres humanos, mas infectam principalmente outras espécies animais como *C. meleagridis*. De forma geral, a genotipagem molecular tem permitido avaliar a origem da infecção e a importância do parasito para saúde pública, verificando o potencial zoonótico do mesmo (XIAO; FENG, 2017). A ferramenta mais utilizada na genotipagem molecular de *Cryptosporidium* sp. tem sido baseada na análise das sequências do gene codificante da glicoproteína gp60, que está envolvida no processo de invasão do protozoário na célula hospedeira. O gene da gp60 é altamente polimórfico permitindo caracterizar a espécie do parasito dentro de múltiplas famílias a partir de diferenças nas

sequências de nucleotídeos (XIAO; FENG, 2017). O nome das famílias inicia-se com algarismos romanos e letras minúsculas, por exemplo para *C. hominis* utiliza-se a denominação Ia, Ib, Id, Ie, If e etc. e para *C. parvum* IIa, IIb, IIc, IID e assim por diante. Dentro de cada família, os subtipos diferem no número de repetições de trinucleotídeos (TCA, TCG ou TCT) a partir do peptídeo sinal (XIAO; FENG, 2017).

Sabe-se que cada espécie tem diferentes famílias de subtipos também chamados de genótipos, que variam de acordo com a espécie do hospedeiro, virulência e transmissibilidade. Estas famílias de subtipos são tradicionalmente denominadas para *C. hominis* pelas letras Ia, Ib, Ic, Id, Ie, If seguindo as demais letras do alfabeto; IIa, IIb, IIc, IID e assim por diante para *C. parvum* e IIIa, IIIb, IIIc, IIId para *C. meleagridis*. Os subtipos se diferenciam principalmente na repetição dos trinucleotídeos (TCA, TCG ou TCT). A denominação de cada subtipo dá-se pelo número de repetições de TCA que é representado pela letra A; pelas repetições de TCG, representado pela letra G ou pela repetição de TCT representado pela letra T. Em alguns subtipos podem ocorrer outras repetições de nucleotídeos que são representadas pela letra R, tais como ACATCA na família de subtipo IIa, AAGACGGTGGTAAGG ou suas variações no subtipo Ia e AAGAAGGCAAAGAAG ou suas variações no subtipo If (FENG et al., 2018).

1.1.5 Tratamento e prevenção

A prevenção da criptosporidiose em seres humanos e animais é um desafio, pois as medidas de controle não garantem a eliminação de 100% dos oocistos no ambiente. Além disso, não há fármacos disponíveis que eliminem totalmente o parasito do hospedeiro (PUMIPUNTU; PIRATAE, 2018).

Em animais, vários fármacos têm sido analisados, mas somente a halofuginona está licenciada para o tratamento e controle da criptosporidiose em animais, principalmente em bovinos. Contudo, esses fármacos somente estão disponíveis no Canadá e são indicados em casos de emergência. Todos os fármacos testados até o momento apresentaram eficácia parcial na profilaxia e terapia, reduzindo a excreção dos oocistos, bem como a severidade da doença. De forma geral, os fármacos mais promissores no controle da criptosporidiose são os coccidiostáticos como a halofuginona e decoquinate, a nitazoxanida aprovada para uso em seres humanos e os antibióticos como paramomicina, azitromicina, enrofloxacin, lasalocida, bem como alfa e beta ciclodextrina (TOMAZIC et al., 2018). O tratamento realizado na criptosporidiose sintomática, tanto nos seres humanos quanto nos animais,

geralmente é de suporte, com hidratação oral ou parenteral para repor fluidos e eletrólitos, suporte nutricional e aplicação de fármacos antidiarreicos (XIAO; HERD, 1994).

Até o momento, não há vacinas disponíveis para o controle da criptosporidiose. Antígenos presentes na superfície dos esporozoítas e merozoítas de *Cryptosporidium* sp. foram identificados como possíveis alvos para comporem os constituintes de futuras vacinas, se destacando a gp60 e a p23 (TOMAZIC et al., 2018).

Em relação a imunidade passiva materna, é importante ressaltar, que os bovinos que são considerados os principais hospedeiros de *Cryptosporidium* sp., principalmente de *C. parvum*, possuem a placenta sinepitélio - corial, e assim as imunoglobulinas não passam pela placenta da vaca gestante para o feto. Desta forma, os anticorpos anti – *Cryptosporidium* só são recebidos quando o bezerro recebe o colostro da mãe parasitada. Bezerros que recebem o colostro de fêmeas infectadas apresentam significativamente redução na ocorrência de diarreia e redução na liberação dos oocistos (FAYER et al., 1990).

As medidas de higiene mais indicadas para o controle da criptosporidiose tem por objetivo minimizar a eliminação de oocistos no ambiente e reduzir a contaminação ambiental. No caso de grandes animais, isso torna-se um desafio, pois a produção de volume fecal por indivíduo é grande, e desta forma a quantidade de oocistos liberados no ambiente com as fezes também (MAJEWSKA et al., 2004). A limpeza dos recintos, incluindo comedouros e bebedouro dos animais devem ser realizados de forma rotineira, mas nem sempre é suficiente, pois os oocistos de *Cryptosporidium* sp. são muito resistentes e nem todos os produtos químicos e físicos irão inviabilizar os oocistos (XIAO; HERD, 1994). Na rotina de manejo profilático dos animais recomenda-se também utilizar piso de concretos nas baias afim de facilitar a higienização das mesmas, aumentar a altura da cama de palha e trocá-la com frequência evitando o acúmulo das fezes (TOMAZIC et al., 2018).

Embora os oocistos sejam resistentes aos desinfetantes comumente utilizados para higienizar o ambiente, a redução da viabilidade destas formas evolutivas pode ser obtida utilizando produtos químicos como formol a 10%, amônia e peróxido de hidrogênio. Além destas, o aquecimento do ambiente acima de 50°C por cinco minutos, congelamento a - 70°C por uma hora, luz ultravioleta, radiação gama, irradiação solar e laser podem inviabilizar os oocistos (PUMIPUNTU; PIRATAE, 2018).

A associação da adoção das medidas de higiene ao manejo dos animais para reduzir a ocorrência dos fatores predisponentes no plantel, também ajuda a minimizar a casuística das infecções. No caso dos equinos, fatores que reduzam a sua imunidade como o estresse por superpopulação, desmame precoce e má nutrição devem ser evitados. Já que

Cryptosporidium sp. pode ser considerado um patógeno oportunista, deve-se também reduzir a frequência de infecção dos animais por outros patógenos gastrointestinais (XIAO; HERD, 1994).

No caso da prevenção humana, a melhor estratégia é a adoção de boas práticas de higiene, incluindo a lavagem das mãos antes de preparar os alimentos, depois de utilizar o banheiro e após o contato com pacientes diarreicos, crianças, animais incluindo os de produção. Alimentos consumidos crus como legumes e verduras devem ser lavados cuidadosamente, aquecidos, cozidos e fervidos antes do consumo. Pacientes com histórico de diarreia devem evitar nadar em recintos de água compartilhado com outras pessoas, como piscina de clubes (PUMIPUNTU; PIRATAE, 2018).

1.1.6 Epidemiologia

1.1.6.1 Dados epidemiológicos gerais

Embora o número de casos de infecções humanas no mundo relatados de criptosporidiose nos últimos anos tenha aumentado, com cerca de três casos para cada 100.000 pessoas, alguns indicadores, como a sintomatologia por exemplo, apontaram que a frequência da infecção em seres humanos provavelmente é 100 vezes mais alta do que o número de casos relatados. A prevalência da infecção por *Cryptosporidium* sp. é significativamente mais baixa em países desenvolvidos quando comparados aos países em desenvolvimento, onde há falta de saneamento básico. Nestes países, *Cryptosporidium* sp. corresponde a cerca de 10 a 15% dos casos diarreicos que ocorrem em crianças com menos de cinco anos de idade. Este protozoário tem distribuição mundial e parece ser transmitido principalmente pela água, pois já foi isolado em vários surtos de transmissão hídrica, incluindo a água potável, bem como água recreacional (DILLINGHAM et al., 2002; GERACE et al., 2019). Dentre as outras fontes de infecção já relatadas incluem-se a bebida cidra, leite pasteurizado, salada de frango, além de verduras e vegetais. Além disso, baratas, moscas, besouros e rotíferos já foram considerados potenciais vetores dos oocistos (DILLINGHAM et al., 2002)

Cryptosporidium sp. pode parasitar uma ampla variedade de espécies animais, incluindo animais de produção, como bovinos, ovinos, caprinos, suínos, galinhas e peixes, bem como animais de companhia, destacando-se cães, gatos e equinos. Entre as espécies de *Cryptosporidium* sp. que já foram relatadas em animais de produção, destacam-se *C. parvum* e *C. hominis*. Estas são as que apresentam a maior importância em saúde pública, pois podem

infectar com frequência os seres humanos. Sabe-se que bezerros com menos de dois meses de idade seguidos por cabritos são considerados os principais hospedeiros de *C. parvum*, sendo apontados como reservatórios (SANTÍN, 2013).

A transmissão do estágio infectante de oocisto de *C. parvum* ocorre por meio do ciclo biológico antroponótico, ou seja, transmissão direta pessoa a pessoa, ou zoonótico, a partir do contato entre animais e os seres humanos. Enquanto que, a transmissão de *C. hominis*, ocorre principalmente de forma indireta, a partir da ingestão de alimentos contaminados com oocistos, mas principalmente a partir da ingestão de água contaminada, incluindo água para consumo, bem como águas recreacionais, como piscinas, rios e lagos (DENG et al., 2017). Médicos veterinários e demais profissionais que trabalham com animais devem ficar atentos às medidas básicas de higiene, destacando-se os animais produção que são considerados os principais reservatórios de *C. parvum*. Cabe ressaltar que fômites contaminados com oocistos, incluindo vestimentas e calçados, principalmente de tratadores de animais podem carrear mecanicamente os oocistos, disseminando estas formas evolutivas no ambiente e entre diferentes hospedeiros (PUMIPUNTU; PIRATAE, 2018).

O oocisto de *Cryptosporidium* sp. é altamente resistente as substâncias a base de cloro amplamente utilizadas pelas empresas de abastecimento de água em seu tratamento. Além disso, o oocisto também é resistente ao etanol a 70% e outras preparações comerciais de etanol, comumente utilizadas no manejo sanitário de animais (KARANIS et al., 2007). O oocisto de *Cryptosporidium* sp. pode manter-se viável no ambiente por mais de seis meses mesmo sob condições variáveis de temperatura, ou seja, entre 5 a 40°C, ao congelamento e dessecação (O'DONOGHUE, 1995). Além disso, tem sido proposto, que o parasito poderia se multiplicar e se disseminar em meio ambiente, incluindo biofilmes de ducto de água (CLODE et al., 2015). Devido à ampla distribuição em natureza, *Cryptosporidium* sp., tem sido considerado um protozoário ubíquo. Baixas doses de oocisto, ou seja, 10 a 100 são capazes de causar a infecção. Além disso, sabe-se que estas formas evolutivas podem ser transportadas por longas distâncias no ar, ou serem carregados rapidamente na água devido ao seu pequeno tamanho (VANATHY et al., 2017).

Surtos de criptosporidiose em seres humanos transmitidos por água já foram notificados em diferentes países, denotando a importância do monitoramento desse agente biológico. O maior surto que se tem documentado em literatura ocorreu em 1993, em Milwaukee nos EUA, onde se estima que 403 mil pessoas contraíram criptosporidiose, das quais 4.400 foram hospitalizadas. A parasitose foi confirmada por meio de análises laboratoriais em mais de 600 pessoas, e não foi diagnosticado nenhum outro microrganismo

patogênico ao qual pudesse ser atribuído o surto. A água proveniente do lago Michigan que abastecia a cidade, era filtrada e clorada, fatores como o degelo, chuvas (contaminação de origem animal, principalmente pecuária) e problemas no processo de tratamento de água (coagulação e filtração) podem ter permitido a permanência e passagem de oocistos na água de abastecimento domiciliar (SOLO – GABRIELE; NEUMEITER, 1996).

As espécies de *Cryptosporidium* sp. diferem em uma variedade de hospedeiros. A coevolução do hospedeiro-parasito, adaptação do hospedeiro, segregação geográfica, a recombinação gênica e a pressão seletiva tem ocasionado a formação de famílias de subtipos desses protozoários que parecem apresentar peculiaridades fenotípicas. Estas diferenças nos subtipos são principalmente identificadas nas espécies de *C. parvum* e *C. hominis*. De forma geral, a identificação das espécies e dos subtipos/genótipos dos parasitos são essenciais para avaliar a origem da infecção em seres humanos e a importância do mesmo na saúde pública (FENG et al., 2018).

Cryptosporidium hominis e *C. parvum* são frequentemente subtipados a partir da análise do gene gp60. Os subtipos mais prevalentes são IbA10G2 e IIaA15G2R1 para *C. hominis* e *C. parvum*, respectivamente (FENG et al., 2018). Em *C. parvum*, aproximadamente 20 famílias de subtipos já foram descritas, algumas destas famílias como a IIc são mais identificadas infectando seres humanos, enquanto que outras como IIa e IId parecem estar mais adaptadas a outras espécies animais, destacando os bovinos no caso do subtipo IIa e ovinos e caprinos no caso de IId. A distribuição das famílias de subtipos em seres humanos varia de acordo com as condições econômicas do local, refletindo aos diferentes padrões de transmissão da criptosporidiose. De forma geral, as infecções zoonóticas de *C. parvum* são causadas principalmente pelos subtipos IIa, existindo uma predominância do subtipo IIaA15G2R1 (FENG et al., 2018). No caso de *C. hominis* já foram reconhecidas mais de 10 famílias de subtipos. Entre os subtipos mais comuns destacam-se as famílias Ia, Ib, Id, Ie, If e Ig. Os subtipos Ii e Ik são predominantemente detectados em primatas não humanos e equinos. No caso de *C. hominis* os subtipos predominantes, tanto em países desenvolvidos, quanto nos em desenvolvimento é o subtipo IbA10G2, sendo este o mais detectado em surtos na Europa, Austrália e nos Estados Unidos. Este tem sido proposto como o subtipo mais virulento de *C. hominis* e em causar sintomas que duram longos períodos (FENG et al., 2018). Outras famílias genotípicas foram descritas em *C. fayeri*, *C. cuniculus*, *C. horse genotype*, *C. wrairi*, *Ferret genotype*, *C. tyzzeri*, *Mink genotype*, *Opossum genotype I*, *C. ubiquitum*, *C. erinaci*, *Chipmunk genotype I*, *C. viatorum* e *Skunk genotype* (XIAO; FENG, 2017).

Além de *C. parvum* e *C. hominis*, infectando os equinos já foi descrito um genótipo específico para os mesmos denominado como *Cryptosporidium horse genotype*. Este foi descrito pela primeira vez na República Checa por Ryan e colaboradores em 2003. No entanto, em 2007 este mesmo genótipo foi descrito em bovino na Irlanda por Thompson, em seres humanos com episódios de diarreia na Inglaterra e no Novo México (XIAO e et al., 2009). Desta forma foi sugerido que este genótipo não era estritamente específico de equinos, apresentando, portanto, potencial de transmissão zoonótico. Dentro desse genótipo, há duas famílias: VIa que ocorre em potros e bovinos e VIb em seres humanos. Ainda não se sabe o potencial patogênico desse genótipo nos equinos e nem nos seres humanos, ainda assim parece que os equinos são considerados os principais reservatórios desse genótipo para os seres humanos e outras espécies animais (CAFFARA et al., 2013; XIAO et al., 2009).

1.1.6.2 Criptosporidiose em equinos

A criptosporidiose equina foi relatada pela primeira vez por Snider em 1978 acometendo potros árabes imunocomprometidos com diarreia, sugerindo que a infecção nos equinos estava relacionada ao imunocomprometimento. Contudo, *Cryptosporidium* sp. já foi relatado infectando equinos imunocompetentes em vários países, sendo a criptosporidiose equina considerada de distribuição mundial (DENG et al., 2017; SANTÍN et al., 2013). *Cryptosporidium parvum* e *C. hominis* são as principais espécies que infectam os equinos (DENG et al., 2017). No entanto, informações sobre a caracterização molecular dos isolados de *Cryptosporidium* spp. recuperados em fezes de equinos são muito limitadas (SANTÍN et al., 2013). Os principais fatores de risco associados a infecção em equinos é a idade, sendo os mais jovens os mais susceptíveis, incluindo os potros e os animais adultos jovens (SANTÍN et al., 2013; XIAO; HERD, 1994). Além disso, paredes e assoalhos de unidades perinatais de potros e o hábito do equino em pastar em locais comuns com ruminantes, bem como manter potro por longos períodos junto à égua são considerados fatores de risco para os animais se infectarem por este parasito (XIAO; HERD, 1994).

O primeiro relato de *Cryptosporidium andersoni* em equinos ocorreu em animais mantidos na Província de Heilongjiang, China. Amostras fecais de 29 equinos adultos com diarreia foram coletadas após a defecação de cada animal. Estas foram submetidas a técnica de centrífugo flutuação com solução de sacarose, para concentrar os oocistos. Posteriormente, o material foi lavado sob centrifugação para retirar a solução de sacarose e mantido em solução de dicromato de potássio a 2,5%. Previamente a extração do DNA, o

material fecal foi submetido a várias etapas de centrifugação para retirar a solução de dicromato de potássio. A caracterização da espécie do protozoário foi realizada com amplificação do fragmento do RNAr e a genotipagem com amplificação das regiões MS1, MS2, MS3, MS4, que são genes responsáveis na expressão de diferentes proteínas. Duas amostras foram identificadas como *C. andersoni* genótipo A4,A4,A4,A1, que é normalmente encontrado infectando ruminantes, especialmente bovinos (LIU et al., 2015).

Ainda na China, um total de 262 amostras fecais foram coletadas de equinos assintomáticos de diferentes idades e sexo, que pastavam em cinco propriedades. Estas amostras foram submetidas reação em cadeia da polimerase associada ao sequenciamento com os alvos gênicos 18S RNAr e gp60. *Cryptosporidium* sp. foi detectado infectando 7 (2,7%) animais. Dessas amostras positivas, todas pertenciam a potros e apresentavam sequências similares a *Cryptosporidium horse genotype*. Ao analisar as sequências por meio da amplificação da gp60 foi evidenciado o subtipo VIaA15G4. Este foi o primeiro isolado de *C. horse genotype* em equinos que pastavam na China (QI et al., 2015).

Afim de entender a diversidade genética de *Cryptosporidium* spp. em equinos e asininos, foram caracterizados molecularmente cinco amostras fecais de equinos e 82 de asininos já sabidamente positivas por técnicas parasitológicas microscópicas. O parasito foi caracterizado por meio da PCR RFLP com alvo gênico 18S RNAr, bem como pela PCR associado ao sequenciamento dos alvos gênicos hsp 70, actina e gp60. A caracterização molecular foi realizada em quatro amostras de equinos, sendo um animal identificado como *Cryptosporidium hominis* genótipo IkA16G1 e três animais com *Cryptosporidium parvum* IIdA19G1. Já em 61 asininos foi identificado a espécie *C. hominis*, e os seguintes genótipos IkA16G1 em 58 indivíduos, IkA16 em dois, *C. parvum* IIdA19G1 em 18 e *C. horse genotype* em quatro equinos, sendo dois VIaA15G4 e dois VIaA15G3 (JIAN et al., 2016).

No sudoeste da China, *Cryptosporidium* spp. foi caracterizado molecularmente em seis (1,8%) amostras fecais de equinos, de raças não relatadas, dentre as 333 amostras coletadas de diferentes fazendas. A positividade para o protozoário foi pesquisada diretamente por meio da PCR, primeiramente utilizando o gene que amplifica para o pequeno fragmento do RNAr. A idade dos equinos positivos para *Cryptosporidium* sp. variou entre 2 e 3 anos. Além do RNAr, a identificação de *C. hominis* foi confirmada utilizando o gene COWP e hsp 70. A identificação do genótipo foi realizada a partir dos pares de *primers* que amplificam o gene da gp60. Duas amostras foram caracterizadas como *C. hominis* genótipo IdA15, sendo o subtipo Id pela primeira vez identificado em equinos, e as outras quatro

amostras pertenciam a *C. andersoni*, espécie amplamente detectada em bovinos (DENG et al., 2017).

Em Taiwan, fezes de 436 equinos foram coletadas de 19 propriedades, sendo posteriormente analisadas por meio de técnicas coproparasitológicas de coloração permanente com solução de Ziel Neelsen. Das fezes coletadas, 161 (37%) foram positivas para *Cryptosporidium* sp.. A partir dessas análises, 33 amostras fecais positivas foram selecionadas para caracterização molecular, pois apresentaram mais de 100 oocistos a cada cinco campos de leitura no microscópio. Ao fim, na análise molecular das amostras com a PCR associada ao sequenciamento do alvo gênico 18S RNA, foi possível evidenciar que 31 amostras apresentavam sequências nucleotídicas compatíveis com *Cryptosporidium parvum* e duas com *Cryptosporidium felis* (GUO et al., 2014).

Várias espécies de hospedeiros foram submetidas a diagnóstico de *Cryptosporidium* sp. na Jordânia afim de identificar frequência do parasito, bem como caracterizá-lo molecularmente. Dentre as amostras fecais, seis pertenciam a equinos que foram submetidos a coleta diretamente da ampola retal ou logo após a defecação. O diagnóstico do parasito foi realizado com a PCR em tempo real com o alvo gênico 18S RNAr, bem como por meio da PCR convencional associado ao sequenciamento com 18S RNAr e gp60. Em uma amostra fecal foi verificado a presença de sequências nucleotídicas compatíveis com *C. parvum*. Já em outras duas amostras fecais foram identificadas sequências novas que não foram 100% compatíveis com nenhuma previamente depositada no Genbank. No entanto, não foi evidenciado sucesso com a PCR utilizando como alvo gênico gp60 (HIJJAWI et al., 2016).

Na Polônia, fezes de 106 equinos de diferentes raças foram submetidas à pesquisa de *Cryptosporidium* sp., por meio da técnica de coloração permanente de Ziehl Neelsen e 43 foram escolhidas aleatoriamente e submetidas ao o ensaio imunoenzimático para pesquisar antígeno do protozoário no material fecal. Das amostras coletadas, a positividade para o parasito pela técnica de Ziehl Neelsen foi de 9,4%. A espécie *Cryptosporidium parvum* foi diagnosticada mediante a mensuração dos oocistos recuperados e corados na técnica de Ziehl Neelsen presente nas amostras, estes apresentavam mensuração média de 4,4 µm de largura por 4,4 µm de comprimento. Dentre as 43 amostras submetidas ao ensaio imunoenzimático, sete apresentaram coproantígenos do protozoário (MAJEWSKA et al., 1999).

No oeste da Polônia, amostras fecais de 318 equinos de raças não relatadas destinados a corridas, recreação e equoterapia para crianças foram testadas para *Cryptosporidium* sp. por meio da técnica de coloração permanente com Ziehl Neelsen, e confirmação para *Cryptosporidium parvum* com o ensaio imunoenzimático, imunofluorescência direta e

hibridização imunofluorescente *in situ*. A partir da coloração permanente foi detectado onze (3,5%) equinos positivos com oocisto de *Cryptosporidium* sp., sendo que todos foram confirmados como *C. parvum*. Os equinos positivos apresentaram faixas etárias que variaram entre 1 a 11 anos de idade e o tamanho médio dos oocistos foi de 4,74 ($\pm 0,52$) por 4,64 ($\pm 0,31$) (MAJEWSKA et al., 2004).

Na Argélia, 138 amostras fecais de equinos foram coletadas de duas fazendas, sendo 16 amostras coletadas da fazenda A e 122 da fazenda B. O diagnóstico molecular de *Cryptosporidium* sp. foi realizado em todas as amostras fecais coletadas por meio da reação em cadeia da polimerase seguida do sequenciamento utilizando *primers* que amplificam o fragmento gênico 18S RNAr e a glicoproteína gp60. *Cryptosporidium* sp. foi somente detectado em quatro amostras (3%) fecais oriundas da fazenda B. Todas as sequências foram caracterizadas como *Cryptosporidium hedgehog genotype XIIIa*, sendo todos os equinos positivos de idade adulta (LAATAMNA et al., 2013).

Em 2015, também na Argélia, amostras fecais de 219 equinos e 124 de asininos foram coletadas diretamente da ampola retal ou logo após a defecação. Estas foram submetidas à pesquisa de *Cryptosporidium* sp., bem como a caracterização de espécie e genótipo por meio da reação em cadeia da polimerase utilizando como alvo gênico RNAr 18S, gp60, trap-C1, COWP e hsp70. Ao todo foram detectadas sete amostras fecais positivas, destas, quatro foram caracterizadas como *C. parvum* genótipo IIaA16G1R1, um *C. hominis* genótipo Ika15G1 e dois *C. muris* um genótipo TS03 e o outro RN66. De forma geral, não foi evidenciado associação entre a idade, o sexo dos animais com a infecção e nem foi verificado sintomas de diarreia entre os animais positivos. O genótipo do *C. parvum* identificado é amplamente detectado, sendo este o primeiro estudo que identificou tal genótipo em equinos (LAATAMNA et al., 2015).

Na Itália a prevalência e os fatores de risco associados à infecção para *Cryptosporidium* sp. foram analisados em 120 potros e 30 éguas mantidos em diferentes propriedades. Três amostras fecais foram coletadas de cada animal e analisadas por meio da reação de imunofluorescência direta, coloração permanente de Ziehl - Neelsen modificada e centrífugo flutuação com solução de sacarose. Uma vez positiva em algumas dessas técnicas, as amostras eram submetidas a reação em cadeia da polimerase associada ao sequenciamento tendo como alvo o gen COWP. *Cryptosporidium* sp. foi detectado em 12 (8%) amostras por meio da Imunofluorescência, em 7 (4,66%) pela centrífugo flutuação e em 4 (2,66%) com a coloração permanente. Na análise das sequências nucleotídicas obtidas

dos 12 isolados foi possível identificar perfil compatível com *Cryptosporidium parvum* (VERONESI et al., 2010).

Cryptosporidium sp. foi detectado em fezes de éguas e de seus potros que apresentavam histórico de diarreia. Ao todo foram incluídas no estudo 37 pares (éguas e seus potros), sendo coletadas duas amostras fecais de cada égua e três de cada potro. As fezes foram submetidas ao ensaio imunoenzimático para pesquisa de antígeno de *Cryptosporidium* sp. As amostras positivas no ELISA foram submetidas a reação em cadeia polimerase associada ao sequenciamento com tendo como alvo o gen COWP. Quatro amostras fecais do par (potro/égua) foram positivas para *Cryptosporidium* sp. pelo ELISA, destas todas foram caracterizadas molecularmente como *Cryptosporidium parvum*. Dos 37 potros incluídos no estudo, somente um apresentava diarreia intensa no momento do estudo e foi positivo para *C. parvum* (PERRUCCI et al., 2011).

Na Itália, 37 amostras fecais de potros hospitalizados foram submetidas a diagnóstico molecular de *Cryptosporidium* sp. Estas foram submetidas a extração de DNA, e a análise molecular por meio da amplificação do fragmento gênico do RNAr 18S, bem como do gen gp60. A partir das mesmas foi possível verificar que três amostras apresentaram sequências nucleotídicas compatíveis com *C. parvum* e 11 apresentaram amostras com *Cryptosporidium horse genotype*, destas sete foram classificadas genotipicamente como VIaA15G4. Este genótipo já foi detectado em outros animais incluindo seres humanos, sendo os equinos considerados os principais reservatórios. Dos potros positivos, cinco tinham diarreia, sendo dois positivos para *C. parvum* e três para *Cryptosporidium horse genotype* (CAFFARA et al., 2013).

Na Itália, a pesquisa de *Cryptosporidium* sp. foi realizada de 37 potros e de 36 éguas hospitalizadas em Unidade Perinatal. Múltiplas amostras de dias distintos foram coletadas dos animais, a partir da ampola retal. Além disso, 111 amostras ambientais foram coletadas do assoalho e da parede da Unidade Perinatal por meio de gaze. Todas as amostras, incluindo as fezes e as ambientais que foram submetidas à análise molecular por meio da reação em cadeia da polimerase e enzima de restrição tendo como alvo o gen 18 S RNAr, e as amostras positivas na PCR com 18S foram submetidas a PCR e sequenciamento com o alvo gp60. Além disso, as amostras fecais foram submetidas a coloração permanente com Ziehl Neelsen. Todas as éguas foram negativas para *Cryptosporidium* sp. e dos 37 potros, 14 foram positivos, sendo estes somente detectados na técnica de coloração permanente. Quatro potros foram positivos para *C. parvum*, enquanto 10 foram positivos para *C. horse genotype*. Desses animais, quatro apresentaram sequências mistas de *C. parvum* e *C. horse genotype*. Os

genótipos identificados foram para *C. parvum* IIdA21G1, IIdA22G1 em um animal cada e IIdA23R1 em dois. Já o genótipo de *C. horse genotype* foi VIaA15G4, que foi detectado em cinco potros (GALUPPI et al., 2015).

Ainda na Itália, a contaminação ambiental com oocistos de *Cryptosporidium* sp. em Unidade Perinatal de equinos foi analisada. Amostras ambientais recuperadas com gaze estéril foram coletadas, tanto dos assoalhos, quanto das paredes dos boxes da Unidade. Estas foram coletadas em três momentos distintos, após o final da estação de gestação, após os procedimentos de lavagem e após lavagem e desinfecção. Todas as amostras foram submetidas a PCR convencional do tipo *nested* e a PCR em tempo real com o alvo gênico 18S RNAr. *Cryptosporidium* sp. foi detectado em 14 amostras dentre as 175 coletadas, sendo 11 das paredes e três do assoalho. Uma menor quantidade de oocistos foi detectada por meio da PCR em tempo real nas amostras que foram coletadas após o procedimento de desinfecção. Ao se comparar o resultado das técnicas moleculares, os autores relataram que sete amostras foram detectadas por ambas as PCRs, seis somente pela PCR em tempo real e uma somente pela PCR convencional. Além disso, a partir da genotipagem com o alvo gênico da gp60 foi identificada a positividade para *C. parvum* IIdA15G2R1 e IIdA23G1 em duas amostras cada e *Cryptosporidium horse genotype* VIaA15G4 em quatro amostras (PIVA et al., 2016).

No Reino Unido, entre 1991 e 1994, foi realizado um estudo para detectar agentes infecciosos que poderiam estar associados com a diarreia em potros, incluindo a pesquisa de *Cryptosporidium* sp. O material incluído no estudo foi encaminhado por médicos veterinários locais e o diagnóstico deste protozoário ocorreu a partir da pesquisa de oocistos utilizando a técnica de coloração permanente como a auramina fenol e a confirmação desta técnica foi realizada com a imunofluorescência. Dentre as 588 amostras fecais coletadas e analisadas, 17% estavam positivas para *Cryptosporidium* sp., sendo esta positividade diretamente associada a infecção (NETHERWOOD et al., 1996).

Ainda no Reino Unido, um estudo de prevalência de *Cryptosporidium* sp. que durou cerca de seis anos foi realizado em fazendas no estado de Warwickshire, Reino Unido. Neste estudo amostras fecais de várias espécies animais foram coletadas, incluindo ruminantes, equinos e roedores. *Cryptosporidium* sp. foi detectado por meio da técnica de coloração permanente de Ziehl-Neelsen. Dentre os 416 equinos incluídos no estudo, 37 (8,9%) foram positivos para *Cryptosporidium* sp., sendo o maior número de amostras fecais positivas detectadas durante o outono (STURDEE et al., 2003).

Também no Reino Unido, Chalmers et al. (2005) analisaram 52 amostras fecais de equinos de diferentes faixas etárias, incluindo potros e adultos. As amostras fecais foram submetidas à reação de imunofluorescência direta, sendo as positivas nesta técnica posteriormente submetidas à reação em cadeia da polimerase para amplificar fragmentos de proteínas de parede do oocisto e do RNAr e posteriormente a caracterização molecular realizada por meio de enzimas de restrição. *Cryptosporidium* sp. foi detectado em duas amostras de potros, sendo estes caracterizados como *Cryptosporidium parvum* genótipo 2.

Na Inglaterra e em Wales foi realizado um estudo que tinha como objetivo investigar fazendas suspeitas, pois já tiveram casos de criptosporidiose humana. Amostras fecais de várias espécies animais foram coletadas, dentre os equinos, 12 amostras foram individualmente coletadas de cada animal. As amostras foram submetidas a imunofluorescência direta, bem como a reações em cadeia da polimerase por meio de PCR multiplex, a PCR e enzimas de restrição tendo como alvo o 18S RNAr e a PCR com sequenciamento para o alvo gênico gp60 para caracterização genotípica. Pela imunofluorescência direta foram evidenciadas três (25%) amostras positivas para *Cryptosporidium* sp. Dessas, somente em uma foi possível caracterizar a espécie como *Cryptosporidium parvum* (SMITH et al., 2010).

Fezes de 79 pôneis em vida livre do Norte da Península Ibérica foram coletadas logo após a defecação. A pesquisa de *Cryptosporidium* spp. foi detectada pela imunofluorescência direta, bem como pela reação em cadeia da polimerase seguida do sequenciamento com os alvos gênicos 18S RNAr e hsp 70. Ao todo, 10 (12,6%) amostras fecais foram positivas para *Cryptosporidium parvum*, sendo que três foram detectadas pela imunofluorescência e sete pela PCR associada ao sequenciamento. Dessas, somente três amostras amplificaram na PCR com o alvo gp60. A partir do sequenciamento foi evidenciado o genótipo IIaA15G2R1 em duas amostras e o genótipo IIaA16G3R1 em uma (COUSO-PÉREZ et al., 2020).

Na República Tcheca, isolados de *Cryptosporidium* spp. foram caracterizados de uma variedade de espécies de hospedeiros utilizando a reação em cadeia da polimerase associada ao sequenciamento com o gen RNAr18S e hsp70. Ao todo foram incluídos no estudo amostras fecais de dois potros que pertenciam ao Zoológico de Praga, sabidamente positivas para o protozoário por meio de técnica de microscopia. Uma amostra foi positiva pelo RNAr sendo classificada como *Cryptosporidium horse genotype*, e a outra para *Cryptosporidium parvum* no gen que codifica para a proteína *heat shock protei* hsp70 (RYAN et al., 2003).

Na República Tcheca, a diversidade das espécies de *Cryptosporidium* sp. foi caracterizada em amostras fecais de diferentes espécies de hospedeiros já sabidamente positivas para o protozoário por meio de técnica microscópica. Foram incluídas três amostras fecais de equinos, já sabidamente positivos. Estas foram analisadas por meio da reação em cadeia da polimerase com o gen do 18S RNAr e o gen COWP. As três amostras foram positivas para *Cryptosporidium parvum* pela análise das sequências do 18S RNAr e somente uma para *Cryptosporidium parvum* pelo gen COWP (HAJDUSEK et al., 2004).

A frequência de *Cryptosporidium* sp. e *Giardia duodenalis* também foi pesquisada em amostras fecais de potros com uma semana a seis meses de idade mantidos em diferentes propriedades na Bélgica, Holanda, Alemanha e Grécia. Após a coleta diretamente da ampola retal os parasitos foram pesquisados por meio da reação de Imunofluorescência direta (RIFD). Das 398 amostras fecais coletadas, oito (2%) foram positivas para *Cryptosporidium* sp. e 49 (12,3%) para *Giardia duodenalis* por meio da RIFD. Somente duas amostras foram caracterizadas genotipicamente para *Cryptosporidium* como *horse genotype* por meio da amplificação do alvo 18S RNAr e do gen hsp. Nenhum oocisto de *Cryptosporidium* sp. foi detectado em potros em propriedades na Alemanha e Holanda, tendo sido detectado somente em equinos da Bélgica e Grécia (KOSTOPOLOU et al., 2015).

Amostras fecais foram coletadas de 352 equinos de diferentes faixas etárias em 23 propriedades localizadas na República Tcheca e Polônia, sendo todas analisadas por meio de técnicas microscópicas de coloração de anilina – carboximetil – violeta e por meio da reação em cadeia da polimerase com *primers* que amplificam as regiões do gen 18S RNAr e o gen da gp60. Amostras fecais positivas para *C. muris* foram adicionalmente genotipadas por meio de quatro marcadores minissatélites. *Cryptosporidium* sp. foi detectado por meio da reação em cadeia da polimerase em 12/352 (3,4%) amostras, sendo evidenciado em quatro propriedades. Nenhuma das amostras testadas na microscopia foi positiva. Além disso, não foi evidenciado associação significativa entre a idade, sexo, a presença de diarreia nos animais e nem entre o sistema de manejo utilizado. Contudo, *Cryptosporidium* sp. foi somente detectado em propriedades onde os equinos pastavam durante o dia e permaneciam estabulados durante a noite. A partir das análises das sequências foi detectado em nove amostras com *C. muris* genótipos (MS1-M1, MS2-M4, MS2-M7 e MS16-M1), um com *C. parvum* IIaA15G2R1, um com *C. tyzzeri* IXbA22R9 e um com *Cryptosporidium horse genotype* (WAGNEROVÁ et al., 2015).

Um estudo de criptosporidiose neonatal em potros com diarreia foi conduzido na Nova Zelândia. As amostras fecais destes animais foram testadas por meio das técnicas de

coloração permanente de Ziehl Neelsen. Além disso, as amostras positivas para *Cryptosporidium* sp. foram caracterizadas molecularmente a nível de espécie por meio do alvo 18S RNAr. Doze amostras fecais de potros com diarreia foram analisadas, sendo três positivas para *Cryptosporidium parvum*. Também, foi realizada uma investigação epidemiológica na propriedade de origem dos equinos, onde evidenciou-se históricos de diarreia nos potros, bem como a presença de bovinos e caprinos, que compartilhavam o pasto com os potros e suas mães (GRINBERG et al., 2009).

Em 1978 nos Estados Unidos foi relatado pela primeira vez em cinco potros árabes imunocomprometidos que foram a óbito a infecção por *Cryptosporidium* sp.. Eles começaram a apresentar diarreia, receberam terapia de suporte mas acabaram indo a óbito. Após a necropsia, foram recuperados fragmentos de tecidos que foram corados por hematoxilina eosina e Giemsa, bem como por microscopia eletrônica. Diferentes formas evolutivas de *Cryptosporidium* sp. foram evidenciadas na mucosa intestinal dos potros. Além do imunocomprometimento, a permanência desses animais em locais previamente ocupados por bovinos e ovinos foram considerados os principais fatores que favoreceram a infecção dos animais (SNYDER et al., 1978).

Também nos Estados Unidos, fezes de 14 potros Quarto de Milha, três fêmeas e onze machos, bem como de suas mães foram coletadas em quatro momentos distintos, afim de pesquisar a frequência de *Cryptosporidium* sp.. Todas as amostras foram submetidas a centrifugo flutuação. No entanto, em nenhuma amostra fecal foi detectada forma evolutiva de *Cryptosporidium* sp.. (REINEMEYER et al., 1984).

Oocistos de *Cryptosporidium* sp. foram detectados por meio da centrífugo flutuação associada a microscopia de contraste de fase em dois potros imunocompetentes com diarreia no Canadá. Em ambos os relatos de casos clínicos *Cryptosporidium* sp. foi considerado o agente etiológico das infecções. Um dos potros era macho e possuía somente dois dias de vida e apesar de recebido tratamento de suporte, foi a óbito. A partir do da microscopia dos tecidos do potro que foi a óbito foi possível observar vários estágios do parasito infectando os enterócitos. Já o segundo potro era uma fêmea de seis semanas de idade que apresentou uma cura espontânea do quadro diarreico. Estes foram considerados os primeiros relatos de casos clínicos de criptosporidiose infectando potros imunocompetentes (GAJADHAR et al., 1985).

No estado da Carolina, Estados Unidos nenhuma das amostras fecais de equino dentre as 91 analisadas foram positivas para *Cryptosporidium* sp. e *Giardia duodenalis*, utilizando técnicas de imunofluorescência direta, bem como por meio de técnica de

centrífugo flutuação. Os autores ressaltaram que o resultado negativo, pode estar diretamente associado a baixa amostragem, pois a prevalência do parasito nos equinos desta região estava abaixo de 3,2% (JOHNSON et al., 1997).

No Alabama, Estados Unidos, oocistos de *Cryptosporidium* sp. foram detectados em um garanhão da raça Quarto de Milha que tinha dois anos e meio de idade. Este equino apresentou diarreia durante três dias e flatulências. No Hospital Veterinário, o equino foi colocado em isolamento e recebeu tratamento de suporte por meio de solução hidroeletrólítica e flunexin meglumine via intravenosa, pois o animal já apresentava sinais de desidratação. Vários testes laboratoriais foram realizados, incluindo exame hematológico, bioquímico, avaliação do fluído peritoneal e exames coproparasitológicos de sedimentação e flutuação. No diagnóstico coproparasitológico cinco amostras fecais foram coletadas e submetidas a culturas bacterianas e a imunofluorescência para pesquisa de *Cryptosporidium* sp.. Todas as cinco amostras foram positivas para o protozoário, e o mesmo foi considerado o agente biológico causador da enterite. Três dias após admissão no hospital o equino começou a apresentar melhora no quadro clínico, e logo após sete dias as fezes já apresentavam a consistência firme. O controle de cura, ou seja, mais amostras fecais foram coletadas duas semanas após o tratamento, não sendo mais detectado oocisto no material fecal do animal (MCKENZIE; DIFFAY, 2000).

A partir de um estudo retrospectivo de análise de 233 casos clínicos de diarreia em potros com idade menor ou igual a 10 meses de idade foi realizado na Florida, EUA. Os relatos de casos foram recuperados de animais que haviam sido internados no Centro Médico Veterinário da Universidade da Flórida. A partir desse levantamento vários agentes infecciosos foram incriminados como causadores de diarreia em potros, incluindo *Cryptosporidium* sp.. Por meio da realização da técnica parasitológica microscópica de coloração permanente foi evidenciado 3 (1,3%) potros positivos para *Cryptosporidium* sp. (FREDERICK et al., 2009).

Um estudo seccional para analisar a prevalência de *Cryptosporidium* sp. em 14 fazendas que treinavam equinos destinados ao turfe em Nova York, Estados Unidos foi realizado. Fezes de 175 potros entre 4 a 67 dias de vida e de 174 éguas foram coletadas a partir da ampola retal ou logo após a defecação. Estas foram submetidas a reação de imunofluorescência direta. Nas amostras dos potros a prevalência evidenciada foi de 7,4% (13/175), enquanto que nas éguas foi evidenciado 1,7% (3/174) de positividade. Todas as amostras dos potros foram submetidas a caracterização molecular por meio da PCR RFLP para da análise do gene 18S RNAr, sendo evidenciado 5,1% (9/175) das amostras com perfil

compatível com *Cryptosporidium* sp.. O subtipo de *Cryptosporidium* sp. destas amostras foi caracterizado a partir da análise do gene da gp60, tendo sido verificado a presença do subtipo *Cryptosporidium* horse genotype (VIaA14G2). De forma geral, os potros mais velhos foram os que apresentaram positividade para o protozoário. No entanto, não foi verificada associação significativa da positividade parasitária com a consistência fecal da amostra (BURTON et al., 2010).

A partir de um ensaio de biologia molecular de PCR multiplex em tempo real foi possível detectar vários agentes infecciosos em fezes de potros em Kentucky, EUA. Ao todo foram incluídos neste estudo em painel, fezes de 88 potros da raça Puro Sangue Inglês com ou sem diarreia nascidos em diferentes propriedades. Ao todo *Cryptosporidium* sp. foi detectado em 4 (11%) potros saudáveis e em 14 (27%) doentes, ou seja, como agente etiológico, possível causador do quadro diarreico (SLOVIS et al., 2014).

Ainda nos EUA, *Cryptosporidium* sp. foi pesquisado em fezes de 34 equinos da raça Mustangue americano de Oregon e pôneis Chincoteague em vida livre da Virginia. O material fecal de cada animal foi coletado logo após a defecação e posteriormente foram submetidos a pesquisa do protozoário por meio da reação em cadeia da polimerase associada ao sequenciamento dos genes 18SRNAr e gp60. *Cryptosporidium* sp. foi detectado em 28/84 (33,3%) amostras fecais. Em 20 amostras fecais foram identificadas sequências nucleotídicas compatíveis com *Cryptosporidium parvum*, sendo as amostras pertencentes a três equinos mustangues e 17 pôneis. Os genótipos de *C. parvum* identificados foram IIaA17G2R1 em três mustangues, IIaA13G2R1 em dois pôneis e IIaA15G2R1 em oito pôneis (WAGNEROVÁ et al., 2016).

Em 1997, várias espécies de animais mantidas em diferentes fazendas foram submetidas a pesquisa de *Cryptosporidium* sp.. Nesta amostragem foram incluídas 35 amostras fecais de equinos coletadas individualmente. Previamente, para recuperar os oocistos do protozoário, as fezes foram submetidas a centrifugação com solução de sacarose. Esta solução de sacarose foi removida por centrifugação em água, sendo o material posteriormente submetido a imunofluorescência direta. Ao todo, três (17%) equinos estavam positivos para *Cryptosporidium* sp. (OLSON et al., 1997).

No Brasil, a prevalência de *Cryptosporidium* sp. e *Giardia duodenalis* foi pesquisada em equinos estabulados no Jockey Clube de Santa Maria, Rio Grande do Sul. As amostras fecais foram coletadas diretamente da ampola retal de 64 animais e foi analisada por meio da técnica de centrifugação com solução de sulfato de zinco. Nestas amostras não foram detectados cistos de *Giardia duodenalis*, mas foi diagnosticado oocistos de *Cryptosporidium* sp. em

75% das mesmas. De forma geral, não foi verificado diferença estatística significativa na prevalência do parasito entre os potros, os equinos jovens e os equinos adultos e nem entre o sexo dos animais (GOMES et al., 2008).

No Rio de Janeiro, protozoários gastrointestinais foram pesquisados em três tipos de criatórios de equinos com diferentes manejos. Ao todo foram coletadas amostras fecais de 396 equinos, sendo que 212 eram da raça Mangalarga Machador mantidos em criatórios do tipo A localizados em diferentes municípios do interior do estado. Os criatórios denominados do tipo B, na verdade, correspondiam a Corporações Militares que mantinham 154 equinos. Já o grupo C, compreendia ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), que mantinha 30 equinos capturados de estradas e rodovias. Amostras fecais coletadas diretamente da ampola retal desses animais foram submetidas a técnicas coproparasitológicas de coloração permanente com solução de safranina e a técnica de flutuação com solução de sacarose. Oocistos de *Cryptosporidium* sp. foram identificadas em três amostras (0,75%), cistos de *Giardia* sp. em duas amostras (0,5%), e oocistos de *Eimeria leuckarti* em duas amostras (0,5%). Os diâmetros maiores dos oocistos de *Cryptosporidium* sp. detectados variaram entre 3,88 µm a 6,22 µm, enquanto que o tamanho do pequeno diâmetro variou entre 3,16 a 4,38 µm. Equinos mantidos no CCZ foram os que apresentaram a maior frequência de positivities para os três protozoários, não tendo sido observado associação significativa da idade com as infecções (SOUZA et al., 2009).

Em Santa Maria, também Rio Grande do Sul, *Cryptosporidium* sp. foi detectado em 20 equinos, representando 38,5% dentre os 52 incluídos no inquérito. Estes equinos eram utilizados para tração, viviam na comunidade e estavam em contato direto com esgoto. As fezes destes animais foram coletadas diretamente da ampola retal e foram submetidas a técnica de centrífugo flutuação com solução de sulfato de zinco. Não foi verificado diferença estatística significativa entre potros (até dois anos de idade) e os equinos adultos jovens (dois a oito anos) e os potros e equinos adultos (oito a 20 anos de idade), também não foi verificado diferença significativa entre machos e fêmeas em relação a frequência de positividade para *Cryptosporidium* sp.. Além disso, nenhum equino positivo apresentou diarreia (TOSCAN et al., 2010).

Em 2014, Fuji e colaboradores ao pesquisarem a frequência de *Cryptosporidium* sp. em 108 equinos de dois centros de treinamento (CT) em Curitiba, Paraná utilizando a técnica de coloração de permanente de Ziehl-Neelsen modificada evidenciaram positividade para o protozoário em 18,52% (20/108). Desses, a frequência do parasito foi de 4,16% (2/48) no CT1 e de 30% (18/60) no CT2. No CT1 35 equinos eram machos e 13 eram fêmeas dos quais

41 eram de raça pura e sete eram sem raça definida (SRD) e no CT2 48 eram machos e 12 eram fêmeas, sendo 15 de raça pura e 45 SRD. As variáveis idade e sexo não foram significativas na frequência do protozoário. No entanto, quando se comparou os dois centros de treinamento foi observada uma baixa ocorrência de animais positivos para *Cryptosporidium* sp. no CT1 quando comparado com o CT2. No CT1 os animais passavam menos tempo confinados, saindo de suas baias para treinamento e competições, o que difere do CT2 onde os equinos ficavam a maior parte do tempo confinados. A limpeza diária das baias era efetuada duas vezes no CT1 e uma vez no CT2, o que poderia explicar a maior proporção de animais positivos encontrados no CT2, pois o tipo de manejo adotado favorecia o acúmulo de fezes no ambiente.

Em fazendas localizadas em diferentes municípios do estado de São Paulo foram analisadas fezes de 196 equinos, sendo 98 fêmeas e 98 potros de várias raças. A idade dos potros variou de três a 330 dias e dentre eles 59 eram machos e 39 eram fêmeas. As fezes foram coletadas da ampola retal e a técnica laboratorial utilizada foi a coloração permanente de Kinyoun modificada. Dentre esses animais, 50 eram da raça Quarto de Milha, 42 eram Mangalarga Machador, 5 eram *Paint Horse* e um era da raça Crioula. Os potros foram divididos em dois grupos, animais com mais de 60 dias de idade e com menos de 60 dias. As amostras foram classificadas de acordo com sua consistência e coloração. A frequência geral de *Cryptosporidium* sp. foi de 21,4% (21/98) nos potros e 18,4% (18/98) nas éguas. A positividade para *Cryptosporidium* sp. apresentou associação significativa com a raça do animal e com a idade, pois foi mais detectado proporcionalmente nos animais das raças Crioula, *Paint Horse*, Quarto de Milha e pouco detectado nos Mangalargas. Além disso, os potros com menos de 60 dias de idade foram os que apresentaram a maior frequência (INÁCIO et al., 2012).

Também no estado de São Paulo 92 amostras de equinos de diferentes raças de 11 fazendas localizadas nos municípios de Araçatuba, Birigui, Guararapes e Santo Antônio de Aracanguá foram examinadas por meio de técnicas moleculares para pesquisa de *Cryptosporidium* sp.. As amostras fecais foram submetidas a extração de DNA e a reação em cadeia da polimerase do fragmento gênico 18S RNAr. Além disso, na confirmação da espécie do protozoário foram amplificados fragmentos dos genes que codificam para actina e para a proteína hsp70. Para a pesquisa do genótipo foram utilizados *primers* que amplificam o fragmento gênico da gp60. De acordo com a análise molecular do fragmento gênico 18s RNAr, 21,7% (20/92) das amostras foram positivas para *Cryptosporidium* sp.. No entanto, a caracterização molecular para espécie só foi possível em cinco amostras.

Destas, três pertenciam a *C. parvum* genótipo IIaA18G3RI e duas a *C. hominis*, genótipo IkA20G1. De forma geral, não foi evidenciada associação significativa entre a infecção a idade e o sexo do animal, e nem entre a consistência fecal das amostras coletadas (INÁCIO et al., 2017).

Abaixo segue um quadro resumindo os artigos que detectaram *Cryptosporidium* sp. em equinos criados em diferentes países (Quadro 4).

Quadro 4. Informações sobre local de estudo, amostragem, diagnóstico laboratorial, resultados, genótipo identificado, bem como fatores de risco evidenciados em estudos epidemiológicos sobre criptosporidiose equina realizados em diferentes países.

Autores	Local do estudo	Tipo de população	Amostras	Técnicas laboratoriais	Frequência de <i>Cryptosporidium</i> sp.	Genótipo	Fatores de risco
Liu et al. (2015)	China	Equinos adultos diarreicos (2,5 a 7 anos de idade)	29 fezes diarreicas coletadas individualmente do chão logo após a defecação	Centrífugo flutuação com sacarose, PCR 18S e tipagem de sequências multilocus (MLST) MS1, MS2, MS3 e MS16	2 (6,9%) <i>Cryptosporidium andersoni</i>	<i>C. andersoni</i> A4, A4, A4 e A1 (2 amostras) Primeiro isolado de <i>C. andersoni</i> em equinos	NR
Qi et al. (2015)	China	Equinos assintomáticos que pastavam de diferentes idades e sexo	262 amostras fecais coletadas do chão logo após a defecação	PCR e sequenciamento 18S RNAr e gp60	7 (2,7%) <i>Cryptosporidium</i> sp.	<i>C. horse genotype</i> VIaA15G4	A idade foi totalmente associada a infecção Os equinos positivos eram todos potros. Primeiro isolado de <i>C. horse genotype</i> em equinos que pastavam na China
Jian et al. (2016)	China	Equinos e asininos já sabidamente positivos para <i>Cryptosporidium</i> sp.	87 fezes de equídeos positivas na microscopia para <i>Cryptosporidium</i> sp. (5 equinos e 82 asininos)	PCR RFLP 18S RNAr PCR e sequenciamento 18S RNAr, hsp70 e actina e gp60	87 amostras também positivas na PCR. Equino - <i>Cryptosporidium hominis</i> (1), <i>Cryptosporidium parvum</i> (4)	Equino - <i>C. hominis</i> (1): IkA16G1; <i>C. parvum</i> IIdA19G1 (3) Asinino - <i>C. hominis</i> (61): IkA16G1 (58), IkA16 (2); <i>C. parvum</i> (18): IIdA19G1; <i>C. horse genotype</i> (4): VIaA15G4 (2), VIaA15G3 (2)	NR
Deng et al. (2017)	China	Equinos (3 meses a 16 anos) de cinco propriedades distintas	333 fezes coletadas do chão logo após a defecação	PCR e sequenciamento 18S, COWP, hsp70 e genotipagem com GP60 e tipagem de sequências multilocus (MLST) MS1, MS2, MS3 e MS16	6 (1,8%) <i>Cryptosporidium</i> sp. , sendo 2 <i>C. hominis</i> e 4 <i>C. andersoni</i>	<i>C. hominis</i> IdA15 <i>C. andersoni</i> A6, A5, A2 e A1	NR
Guo et al. (2014)	Taiwan	436 equinos de diferentes propriedades	NR	Coloração permanente de Ziehl-Neelsen modificada PCR e sequenciamento do gen 18SRNA nas amostras com mais de 100 oocistos por campo 33 amostras	161 (37%) dos equinos com <i>Cryptosporidium</i> sp. pela coloração permanente PCR e sequenciamento: 31 amostras <i>Cryptosporidium parvum</i> e 2 amostras <i>Cryptosporidium felis</i>	NR	Não foi evidenciado associação entre a consistência fecal e a positividade parasitária
Hijawi et al. (2016)	Jordania	Vários espécies de hospedeiros, incluindo equinos	6 amostras fecais de equinos coletadas diretamente da ampola retal ou logo após a defecação	PCR em tempo real com o alvo gênico 18S RNAr PCR e sequenciamento 18S RNAr e gp60	6 positivas na PCR para <i>Cryptosporidium</i> sp. pelo gen 18S RNAr Somente 3 apresentaram sequências aptas para interpretar espécie <i>Cryptosporidium parvum</i> (1)	Não amplificou com o alvo gênico de gp60	NR
Majewska et al. (1999)	Polônia	Equinos das raças Wielkopolska, Malopolska bem como ponei	106 amostras fecais coletadas individualmente Raça Wielkopolska 103 Malopolska 2 Ponei 1	Técnica de coloração permanente de Ziehl-Neelsen (106). Ensaio imunoenzimático para pesquisa de antígeno de <i>Cryptosporidium</i> sp. (43).	10 (9,4%) <i>Cryptosporidium parvum</i> por Ziehl-Neelsen Ensaio imunoenzimático 43 (16,2%) <i>Cryptosporidium</i> sp.	NR	NR
Majewska et al. (2004)	Polônia	Equinos adultos e potros com idade variando (5 meses a 11 anos)	564 amostras fecais (315 equinos adultos e 3 potros) mais de uma amostra por animal	Técnica de coloração permanente de Ziehl-Neelsen, Ensaio imunoenzimático para pesquisa de antígeno de <i>Cryptosporidium</i> sp.	<i>Cryptosporidium</i> sp. 11 (3,5%) Técnica de Ziehl-Neelsen 11 (3,5%) Ensaio imunoenzimático (?) Fluorescência direta associada a hibridização <i>in situ</i>	NR	Todos os equinos positivos eram adultos e a infecção não foi associada a sinais clínicos

NR: Não relatado.

Quadro 4. Informações sobre local de estudo, amostragem, diagnóstico laboratorial, resultados, genótipo identificado, bem como fatores de risco evidenciados em estudos epidemiológicos sobre criptosporidiose equina realizados em diferentes países.

Autores	Local do estudo	Tipo de população	Amostras	Técnicas laboratoriais	Frequência de <i>Cryptosporidium</i> sp.	Genótipo	Fatores de risco
Laatamna et al. (2013)	Argélia	Equinos Arábés, Puro Sangue e Berbere (adultos e potros)	138 fezes coletadas individualmente da ampola retal ou logo após a defecação Pequena propriedade (A) 16 e Grande propriedade (B) 122	PCR e sequenciamento gens 18S RNAr e gp60	4 (3%) <i>Cryptosporidium</i> hedgehog XIIIa Propriedade B	(4) <i>Cryptosporidium</i> hedgehog XIIIa	Não houve associação significativa da infecção com a idade (apesar que todos animais eram adultos), sexo e manejo dos animais
Laatamna et al. (2015)	Argélia	Equinos e asininos de fazendas e de pequenas propriedades onde também havia outros animais como ruminantes e aves	343 amostras fecais (219 equinos e 124 asininos) coletadas individualmente diretamente da ampola ou logo após a defecação	PCR 18S RNAr, gp60, trap-C1, COWP e hsp70	<i>Cryptosporidium</i> sp. 5 (2,3%) em equinos e 2 (1,6%) em asininos 4 <i>Cryptosporidium parvum</i> , 1 <i>Cryptosporidium hominis</i> e 2 <i>Cryptosporidium muris</i>	(4) <i>C. parvum</i> IIaA16G1R1 - 3 amostras fecais de equinos e 1 de asinino (1) <i>C. hominis</i> genótipo IkA15G1 - fezes de equino (1) <i>C. muris</i> TS03 - fezes de asinino (1) <i>C. muris</i> RN66 - fezes de equino	Não houve associação significativa da infecção com a idade, sexo e manejo dos animais
Veronesi et al. (2010)	Itália	Éguas e potros de diferentes idades mantidos em cinco propriedades	120 potros e 30 éguas (450 amostras fecais: três amostras coletadas em diferentes dias de cada animal)	Microscopia de Imunofluorescência para <i>Cryptosporidium</i> sp., coloração permanente de Ziehl - Neelsen modificada e Centrifugo flutuação com solução de sacarose As amostras positivas foram submetidas a PCR e sequenciamento com gen COWP	12 (8%) de <i>Cryptosporidium</i> sp. na microscopia de Imunofluorescência Centrifugo flutuação 7 (4,66%) <i>Cryptosporidium</i> sp. Coloração permanente de Ziehl Neelsen 4 (2,66%) <i>Cryptosporidium</i> sp. 12 (8%) PCR e Sequenciamento - <i>C. parvum</i>	NR	Positividade de <i>Cryptosporidium</i> sp. foi estatisticamente relacionada com a propriedade, idade dos animais (foi detectado nos potros mais velhos, ou seja, animais com mais de 8 semanas de vida), mas não esteve relacionada com a presença de diarreia
Perrucci et al. (2011)	Itália	Éguas e seus potros (histórico de diarreia)	Unidade amostral: 37 éguas e seus potros Duas amostras fecais de cada égua: 74 amostras fecais Três amostras fecais de cada potro: 111 amostras fecais	ELISA As amostras positivas no ELISA foram submetidas a PCR e sequenciamento gen COWP	4 (10,8%) <i>Cryptosporidium</i> sp. - ELISA 4 amostras fecais positivas dos potros e suas éguas para <i>Cryptosporidium parvum</i> - PCR e sequenciamento	NR	Éguas positivas assintomáticas foram apontadas como fonte da infecção para os seus potros
Caffara et al. (2013)	Itália	Potros hospitalizados na Unidade Perinatal Equina	37 fezes	PCR e RFLP gen 18SRNAr PCR e sequenciamento gen gp60	14 (37,8%) <i>Cryptosporidium</i> sp. 3 <i>Cryptosporidium parvum</i> 11 <i>Cryptosporidium horse genotype</i>	<i>C. horse genotype</i> VIaA15G4 não consegui tipar GP60	Dos potros positivos, cinco tinham diarreia, sendo que dois foram positivos para <i>C. parvum</i> e três para <i>Cryptosporidium horse genotype</i>
Galuppi et al. (2015)	Itália	Potros e éguas hospitalizados na Unidade Perinatal do Hospital Universitário, bem como amostras ambientais coletadas com gaze do assoalho e paredes do Hospital	36 éguas e 37 potros coletadas diretamente da ampola retal (161 amostras fecais dos potros e 144 das éguas) 111 amostras ambientais	Coloração permanente Ziehl-Neelsen das amostras fecais PCR e RFLP 18S RNAr PCR e Sequenciamento gp60	Todas as éguas foram negativas 14 potros (37,8%) totalizando 35 amostras foram positivas para <i>Cryptosporidium</i> sp. na PCR 18S RNAr 8 positivos (21,6%) em Ziehl-Neelsen 4 potros <i>C. parvum</i> pela PCR 18S RNAr 10 <i>C. horse genotype</i> pela PCR 18S RNAr 4 animais apresentaram sequências mistas (<i>C. parvum</i> e <i>C. horse genotype</i>) 5 amostras ambientais positivas na PCR 18S RNAr 1 <i>C. parvum</i> e 4 <i>C. horse genotype</i>	28 amostras foram genotipadas com sucesso totalizando 9 potros <i>C. parvum</i> IIaA21G1 (1), IIaA22G1 (1) e IIaA23R1 (2) <i>C. horse genotype</i> VIaA15G4 (5)	NR
Piva et al. (2016)	Itália	Amostras ambientais coletadas das paredes e do assoalho de Unidade Perinatal Equina	175 amostras ambientais coletadas com gaze	PCR e tipagem PCR RFLP para o alvo 18S RNAr e PCR para gp60 PCR em tempo real com alvo 18S RNAr	14 (8%) <i>Cryptosporidium</i> sp. 7 positivas na PCR convencional e PCR em tempo real 6 positivas somente pela PCR em tempo real e uma pela PCR convencional	<i>C. parvum</i> (2) IIaA15G2R1 e (2) IIaA23G1 <i>Cryptosporidium horse genotype</i> (4) VIaA15G4	NR
Netherwood et al. (1996)	Reino Unido	Potros da raça Puro Sangue Inglês e de outras raças	588 amostras fecais coletadas individualmente	Coloração auramina fenol Confirmação por imunofluorescência	100 (17%) <i>Cryptosporidium</i> sp.	NR	<i>Cryptosporidium</i> sp. foi diretamente associado a diarreia nos potros

NR: Não relatado.

Quadro 4. Informações sobre local de estudo, amostragem, diagnóstico laboratorial, resultados, genótipo identificado, bem como fatores de risco evidenciados em estudos epidemiológicos sobre criptosporidiose equina realizados em diferentes países.

Autores	Local do estudo	Tipo de população	Amostras	Técnicas laboratoriais	Frequência de <i>Cryptosporidium</i> sp.	Genótipo	Fatores de risco
Sturdee et al. (2003)	Reino Unido	Equinos da propriedade de Faculdade e que participavam de eventos equestres	416 amostras fecais coletadas individualmente da ampola retal ou logo após a defecação	Microscopia de Imunofluorescência para <i>Cryptosporidium</i> sp. e coloração permanente de Ziehl - Neelsen modificada para mensurar os oocistos e determinar as espécies	37 (8,9%) <i>C. parvum</i>	NR	O outono foi a estação do ano de forma significativa maior número de animais positivos
Chalmers et al. (2005)	Reino Unido	Equinos de idades variadas	52 amostras fecais coletadas individualmente de cada equino 7 amostras fecais foram obtidas de 5 pessoas que tinham contato com os equinos	Imunofluorescência direta e microscopia de fluorescência, PCR - RFLP de gens 18SRNAr e proteínas de parede do oocisto	2 (3,8%) <i>Cryptosporidium parvum</i> PCR RFLP	Genótipo 2	Foi evidenciada associação significativa entre a idade e a infecção Ambos os animais positivos eram potros Além disso, um tinha diarreia
Smith et al. (2010)	Inglaterra e País de Gales	Equinos e outras espécies de animais de diferentes fazendas que tiveram relatos de trabalhadores previamente infectados com <i>Cryptosporidium</i>	12 equinos coletadas individualmente	Separação imunomagnética e Imunofluorescência direta As amostras positivas na imunofluorescência foram submetidas a PCR Multiplex e RFLP 18S RNAr	Imunofluorescência direta 3 (25%) <i>Cryptosporidium</i> sp. Somente uma amostra foi positiva na PCR 1 (8,3%) <i>C. parvum</i>	Genótipo 2	A presença de ruminantes jovens, como bezerros e cordeiros foram considerados os principais fatores de risco para infecção pelo protozoário
Couso - Pérez et al. (2020)	Norte da Península Ibérica	Pôneis em vida livre	79 fezes não diarreicas coletadas do chão logo após a defecação individualmente de cada pônei	RIFD, PCR e sequenciamento gens 18SRNAr, hsp70 e gp60	10 (12,6%) <i>Cryptosporidium parvum</i> RIFD 3 amostras; PCR e sequenciamento 7 amostras	Três amostras amplificaram na gp60 IIaA15G2R1 (2), IIaA16G3R1 (1)	NR
Ryan et al. (2003)	República Tcheca	Equinos do Zoológico de Praga sabidamente positivos para <i>Cryptosporidium</i> sp. por microscopia	Amostras fecais de 2 potros sabidamente positivos para <i>Cryptosporidium</i> sp. coletadas individualmente	PCR e sequenciamento gens 18SRNAr e hsp70	Uma amostra foi positiva pelo RNAr e a outra na hsp70 1 (50%) <i>Cryptosporidium horse genotype</i> gen RNAr 1 (50%) <i>Cryptosporidium parvum</i> gen hsp70	NR	NR
Hajdusek et al. (2004)	República Tcheca	Equinos (não especificado a origem do animal) sabidamente positivos para <i>Cryptosporidium</i> sp. por microscopia	3 amostras fecais de equinos sabidamente positivos para <i>Cryptosporidium</i> sp.	PCR e sequenciamento gens 18SRNAr e COWP	3 (100%) <i>Cryptosporidium parvum</i> gen RNAr 1 (33,3%) <i>Cryptosporidium parvum</i> gen COWP	NR	NR
Kostopoulou et al. (2015)	Bélgica, Holanda, Alemanha e Grécia	Potros (1 semana a 6 meses de idade)	398 amostras fecais coletadas individualmente (134 da Bélgica, 44 da Holanda, 30 da Alemanha e 190 da Grécia)	Imunofluorescência direta, PCR e sequenciamento dos gens 18SRNAr e hsp 70	8 (2%) <i>Cryptosporidium</i> sp. <i>C. horse genotype</i> Detectado em 6 amostras na Bélgica e 2 na Grécia	NR	Não houve associação significativa da infecção com a idade do potro e presença ou ausência de diarreia
Wagnerová et al. (2015)	República Tcheca e Polónia	Equinos (5 dias a 32 anos de idade) em diferentes propriedades	352 fezes	Técnica microscópica de coloração permante anilina-carbol-metil-violeta PCR e sequenciamento gens 18SRNAr e gp60 Análise multilocus MLST MS1, MS2, MS3 e MS16	12 (3,4%) positivo no PCR 0 na microscopia	<i>C. parvum</i> (1) IIaA15G2R1 <i>C. tyzzeri</i> (1) IXbA22R9 <i>C. horse genotype</i> (1) VIaA15G4 <i>C. muris</i> (9) MS1-M1, MS2-M4, MS2-M7 e MS16-M1	Não foi encontrada associação significativa entre a idade, o sexo do animal e presença de diarreia nos animais Positivos equinos que pastavam durante o dia

NR: Não relatado.

Quadro 4. Informações sobre local de estudo, amostragem, diagnóstico laboratorial, resultados, genótipo identificado, bem como fatores de risco evidenciados em estudos epidemiológicos sobre criptosporidiose equina realizados em diferentes países.

Autores	Local do estudo	Tipo de população	Amostras	Técnicas laboratoriais	Frequência de <i>Cryptosporidium</i> sp.	Genótipo	Fatores de risco
Grinberg et al. (2009)	Nova Zelândia	Potros diarreicos	67 fezes encaminhadas ao laboratório veterinário e 4 quatro fezes de potro uma potros de uma propriedade	Coloração permanente de Ziehl-Neelsen modificada nas fezes encaminhadas ao laboratório e PCR nas fezes dos potros da propriedade	12 (18%) <i>Cryptosporidium</i> sp. - PCR: <i>C. parvum</i> (4)	NR	NR
Snyder et al. (1978)	EUA	Potros árabes imunocomprometidos diarreicos	Fragmentsos de tecidos de 5 potros que foram a óbito	Necrópisa, Tecido corado com hematoxilina eosina e Wolbach-Giems, bem a análise dos tecidos por microscopia eletrônica	5 potros com <i>Cryptosporidium</i> sp.	NR	Imunocomprometimento e permanecer em ambiente previamente habitado por bovinos e ovinos
Reinemeyer et al. (1984)	EUA	Potros Quarto de Milha	Amostras fecais de 14 potros e suas mães	Centrífugo flutuação com solução de sacarose	0 (todas as amostras foram negativas)	NR	NR
Johnson et al. (1997)	Califórnia - EUA	91 equinos utilizados para recreação	91 amostras fecais	Centrífugo flutuação e imunofluorescência direta	0 <i>Cryptosporidium</i> sp.	NR	NR
McKenzie e Diffay (2000)	Alabama - EUA	Um equino adulto 2,5 anos de idade Quarto de Milha com diarreia	5 amostras fecais diarreicas em dias distintos	Imunofluorescência direta e microscopia de fluorescência	<i>Cryptosporidium</i> sp. em um equino - relato de caso	NR	NR
Frederick et al. (2009)	Flórida - EUA	Potros com idade menor ou igual a 10 meses de idade com diarreia internados em Centro Médico Veterinário	233 fezes de potros	Coloração permanente ácido - rápida modificada	3 (1,3%) <i>Cryptosporidium</i> sp.	NR	NR
Burton et al. (2010)	Nova Iorque - EUA	14 propriedades Éguas e seus potros Puro Sangue Inglês de propriedades de corrida de arreios e de criadores de cavalos de Nova Iorque	349 fezes coletadas individualmente da ampola retal de potros (175) e logo após a defecação das éguas (174)	Imunofluorescência direta PCR RFLP 18SRNAr PCR e sequenciamento para gp60	<i>Cryptosporidium</i> sp. (5,1%) Potros 13 (7,42%) Imunofluorescência direta 9 (5,14%) PCR 18S RNAr Éguas 3 (1,72%) Imunofluorescência direta 0 PCR 18S RNAr	<i>Cryptosporidium</i> horse genotype VIaA14G2	Potros mais velhos foram os que apresentaram positividade para o protozoário No entanto, não foi verificada associação significativa da positividade parasitária com a consistência fecal da amostra
Slovic et al. (2014)	Kentucky - EUA	88 potros Puro Sangue Inglês (2 dias a 17 semanas de idade). Desses 51 doentes (diarreia e outras alterações) e 37 saudáveis mantidos em diferente propriedades	88 fezes de potros	PCR em tempo real em painel para várias agentes infecciosos	<i>Cryptosporidium</i> sp. 4 (11%) potros saudáveis e 14 (27%) doentes	NR	NR

NR: Não relatado.

Quadro 4. Informações sobre local de estudo, amostragem, diagnóstico laboratorial, resultados, genótipo identificado, bem como fatores de risco evidenciados em estudos epidemiológicos sobre criptosporidiose equina realizados em diferentes países.

Autores	Local do estudo	Tipo de população	Amostras	Técnicas laboratoriais	Frequência de <i>Cryptosporidium</i> sp.	Genótipo	Fatores de risco
Wagnerová et al. (2016)	EUA	Mustangues americanos de Oregon e pôneis Chincoteague em vida livre da Virgínia	84 fezes coletadas do chão logo após a defecação (34 mustangues e 50 pôneis)	PCR e sequenciamento gens 18SRNAr e gp60	28 (33,3%) <i>Cryptosporidium</i> sp. Dessas 20 <i>Cryptosporidium parvum</i> , sendo 3 mustangues e 17 pôneis	<i>Cryptosporidium parvum</i> Mustangues IIAA17G2R1 (3) Pôneis - IIAA13G2R1 (2) e 8 - IIAA15G2R1 (8)	Foi apontado pelos autores que nenhum dos animais apresentava fezes diarreicas
Osion et al. (1997)	Canadá	35 equinos de diferentes faixas etárias	35 fezes coletadas individualmente da ampola retal ou logo após a defecação	Centrífugo flutuação com sacarose associada imunofluorescência direta	3 (17%) dos equinos com <i>Cryptosporidium</i> sp.	NR	Não foi evidenciado associação entre a consistência fecal e a positividade parasitária. O parasito foi mais detectado nos animais adultos (21%) do que nos jovens (10%)
Gajadhar et al., (1985)	Canadá	Relato de caso clínico de 2 potros com diarreia. Um potro macho de dois 2 de vida e uma fêmea de 6 semanas	2 amostras fecais de cada potro	Centrífugo flutuação com solução de sacarose Microscopia eletrônica de transmissão	2 <i>Cryptosporidium</i> sp.	NR	NR
Toscan et al. (2010)	Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil	52 de equinos (31 machos e 21 de fêmeas)	52 fezes coletadas individualmente da ampola retal	Centrífugo flutuação com sulfato de zinco	20 (38,5%) das amostras fecais	NR	NR
Gomes et al. (2008)	Rio Grande do Sul - Brasil	Equinos do Jockey Clube de Santa Maria Maioria da Raça Puro Sangue Inglês entre 2 e 12 anos de idade	66 amostras fezes coletadas individualmente a partir da ampola retal de equinos que não tinham diarreia ou qualquer alteração clínica	Centrífugo flutuação com solução de sulfato de zinco	<i>Cryptosporidium</i> sp. 48 (75%)	NR	Não foi evidenciado associação significativa entre a infecção e a idade do animal e também entre a infecção e o sexo
Souza et al. (2009)	Rio de Janeiro - Brasil	Três criações Grupo A Mangalarga Machador Grupo B equinos de Corporação Militar Grupo C equinos de Centro de Controle de Zoonoses	396 fezes coletadas individualmente da ampola retal em três criações: Grupo A (212) 182 fêmeas adultas e 30 potros Grupo B (154) 117 machos e 37 fêmeas com 3 a 25 anos de idade Grupo C (30) 16 machos e 14 fêmeas de raças mistas com idade ≥ 4 anos de idade.	Centrífugo flutuação com sacarose e coloração com solução de safranina - azul de metileno	3 (0,75%) oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp. Grupo B (1) Puro Sangue Inglês macho adulto sem sintomas Grupo C (2) machos, um tinha diarreia 2 (0,5%) cistos de <i>Giardia duodenali</i> 2 (0,5%) oocistos de <i>Eimeria leuckarti</i>	NR	Não encontrou diferença significativa para idade (0 a 3 anos - 4 a mais), mas encontrou para o sexo. Além disso, observou diferença significativa entre A (formado por fêmeas) e C.
Fujii et al. (2014)	Paraná - Brasil	Equinos de dois Centros de Treinamento (CT), de raças puras e mistas, de ambos os sexos entre 3 e 21 anos de idade	108 fezes de equinos do CT1 e 60 fezes de equinos do CT2. O material fecal foi coletado imediatamente após a defecação	Coloração permanente de Ziehl-Neelsen modificado	<i>Cryptosporidium</i> sp. 20 (18,52%) CT1 - 2 (4,16%) e CT2 - 18 (30%)	NR	CT1 - 35 eram machos e 13 eram fêmeas, sendo 41 de Raça Pura (RP) e 7 Sem Raça Definida (SRD). CT2 - 48 eram machos e 12 fêmeas, sendo 45 SRD e 15 RP. Foi evidenciada diferença significativa entre os CTs. Não foi evidenciada associação significativa da infecção com a idade e o sexo dos animais
Inácio et al. (2012)	Araçatuba, Birigui, Guararapes e Santo Antônio São Paulo - Brasil	Éguas e seus potros (3 a 330 dias) Quarto de Milha, Mangalarga Machador, Paint Horse e Crioula de 11 propriedades	98 fezes de éguas e 98 fezes de potros (59 machos e 39 fêmeas)	Centrífugo sedimentação em água - éter e Coloração por Kinyoun	<i>Cryptosporidium</i> sp. 21 (21,4%) para potros e 18 (18,4%) para éguas	NR	Houve associação significativa da infecção com raça e idade do animal (potros com menos de 60 dias de idade foram os que apresentaram a maior frequência). Não foi evidenciada associação significativa com a consistência fecal e nem com a fonte de água fornecida para os animais
Inácio et al. (2017)	Araçatuba, Birigui, Guararapes e Santo Antônio São Paulo - Brasil	Potros (3 a 330 dias de idade) de diferentes raças de 11 propriedades	92 fezes coletadas individualmente da ampola retal de potros (56 machos e 36 fêmeas)	PCR e sequenciamento gens 18SRNAr, actina, hsp70 e gp60	20 (21,7%) <i>Cryptosporidium</i> sp.. <i>Cryptosporidium parvum</i> (3) e com <i>Cryptosporidium hominis</i> (2)	<i>Cryptosporidium hominis</i> IKA2061 (2 amostras) <i>Cryptosporidium parvum</i> IIAA18G3R1 (1 amostra) <i>Cryptosporidium parvum</i> IIAA15G2R1 (2 amostras)	Não foi evidenciada associação entre a infecção com o sexo e idade do equino e nem com a consistência fecal do material coletado. A água foi apontada como um fator potencialmente associado a infecção

NR: Não relatado.

2. JUSTIFICATIVA

A pesquisa de *Cryptosporidium* sp. em equinos é de extrema importância uma vez que se trata de espécies de parasitos gastrointestinais que podem determinar nos animais sintomáticos cólicas intestinais. É importante ressaltar que equinos, principalmente os animais de raça pura são extremamente sensíveis a cólicas podendo ir a óbito devido a esse sintoma. Para os proprietários de equinos, principalmente para aqueles que criam animais de alta performance e de elevado valor comercial como os equinos de raça incluindo o Puro Sangue Inglês (PSI), a vigilância de agentes infecciosos que podem determinar cólicas deveria ser uma prática constante. Ainda é importante destacar que poucos são estudos com *Cryptosporidium* sp. em equinos no mundo, principalmente no Brasil. Quando se reporta a equinos PSI e pôneis criados no Brasil, a temática fica ainda mais escassa, o que demonstra a necessidade de se estudar o protozoário nestes animais em território nacional. Além disso, as espécies de *Cryptosporidium* sp. com perfil de transmissibilidade zoonótica, ou seja, que podem infectar os seres humanos já foram relatadas em equinos, como *Cryptosporidium parvum*, ressaltando também a importância dessa pesquisa no âmbito da saúde pública.

3. OBJETIVO GERAL

Analisar a frequência de *Cryptosporidium* spp. em fezes de equinos mantidos em propriedades de Teresópolis, Rio de Janeiro utilizando diferentes técnicas laboratoriais, bem como os fatores de risco que podem favorecer a infecção.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar a frequência geral de *Cryptosporidium* sp. em diferentes propriedades de equinos que possuem Puro Sangue Inglês e pôneis;
- Detectar a frequência de *Cryptosporidium* sp. em amostras fecais de equinos por técnicas parasitológicas microscópicas e pelo ensaio imunoenzimático;
- Caracterizar a espécie e o genótipo de *Cryptosporidium* spp. por técnicas moleculares;
- Determinar os fatores de risco associados a infecção por *Cryptosporidium* sp. nos equinos mantidos em propriedades em Teresópolis.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo faz parte de um projeto maior que foi aprovado pela Comissão de Ética Animal da Universidade Federal Fluminense (CEUA – UFF) em agosto de 2019 sob número nº 6742290519 (Anexo 1).

4.2 LOCAL DO ESTUDO

As coletas das amostras fecais dos equinos foram realizadas entre agosto de 2019 a março de 2020 em haras e centros de treinamentos de equinos localizados na cidade Teresópolis, Rio de Janeiro (Figura 4). Esta cidade fica situada na região serrana do estado do Rio de Janeiro, Brasil, ocupando uma área de 773,338 m². É a cidade mais alta do estado do Rio de Janeiro, estando a 871 metros de altitude, possuindo as seguintes coordenadas geográficas: latitude: 22° 24' 44" Sul, longitude: 42° 57' 59" Oeste. A cidade é formada por três distritos e 49 bairros oficiais e outras localidades mais afastadas do centro urbano, tem sua identidade ligada diretamente ao turismo natural, abrigoando a sede do Parque Nacional da Serra dos Órgãos e Estadual dos Três Picos (IBGE, 2017; CIDADE BRASIL, 2020). Além disso, é famosa pela agropecuária, onde se inclui a equinocultura, possuindo vários haras e centros de treinamentos de equinos.

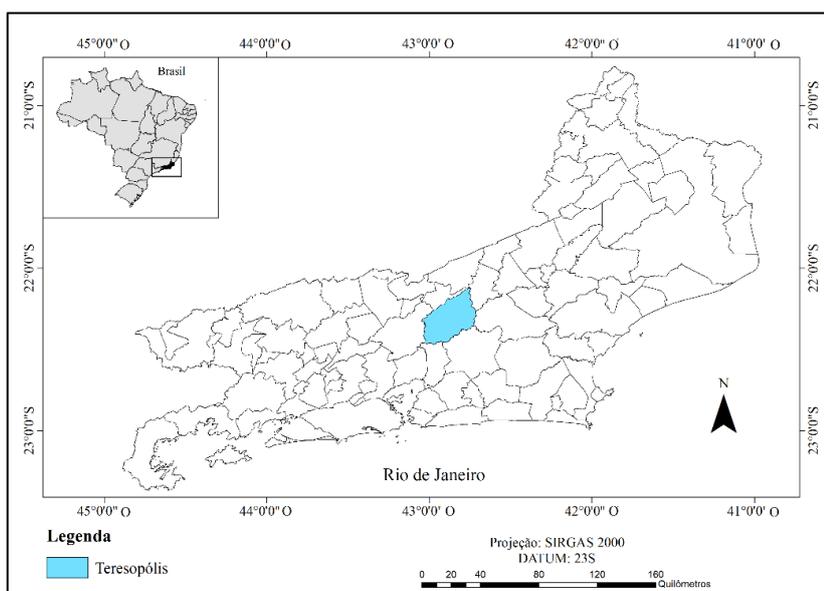


Figura 4 Localização da cidade de Teresópolis em azul no mapa da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. Fonte: Do autor.

Ao todo foram incluídas no estudo oito propriedades que mantêm equinos, sendo que cinco eram centros de treinamento de equinos da raça Puro Sangue Inglês (PSI) e três haras de pôneis. Todos ficam localizados no município de Teresópolis no estado do Rio de Janeiro em bairros distintos. É importante ressaltar que cada propriedade onde as coletas das amostras fecais foram realizadas foram denominadas neste estudo por letras A,B,C,D,E,F,G,H, afim de preservar a identidade da mesma e dos produtores.

Os equinos PSI dos Centros de Treinamento ficavam alojados em galpões que contém baias individuais de alvenaria com cerca de 12 m², com assoalho cimentado coberto com cama de serragem ou maravalha, que contém bebedouro e comedouro também de alvenaria fixados ao recinto e elevados do chão. Todos os dias nas primeiras horas da manhã, seguindo as recomendações e mediante a inspeção do treinador e do gerente, cada equino é retirado da baia pelo tratador e escovado. Além disso, as fezes presentes nas camas das baias são retiradas. Os equinos (PSI) que estavam em treinamento eram paramentados e encaminhados para a pista de corrida pelo redeador. Logo após o treinamento na pista de corrida, o animal recebia banho com água e shampoo, e tinha seu pelo escovado. Após a higienização, o equino era encaminhado para a baia e recebia a alimentação, que geralmente era composta por um fardo de feno e ração acrescida de aveia. Além de sal mineral e água à vontade. Na parte da tarde a baia era novamente aberta a fim de se verificar o animal. Este passava novamente pela escovação, sendo a cama das baias mais uma vez higienizadas com a retirada das fezes. Ao final, o equino voltava para a baia recebendo a segunda parte da alimentação, similar à primeira.

Uma vez por semana, os equinos PSI eram encaminhados para disputar as provas de turfe no Jockey Clube Brasileiro, que fica localizado na cidade do Rio de Janeiro. A principal finalidade desses equinos é o esporte. De forma geral, os equinos da raça PSI começam a ser treinados para a corrida por volta de um ano e meio a dois anos de idade, e permanece no esporte até cerca de cinco anos, dependendo do seu desempenho. Passado esse período, os equinos são encaminhados para Unidades de reprodução que estão localizadas principalmente nos estados da região Sul do Brasil, onde eles entram na função de reprodução do tipo monta natural, única forma de reprodução oficialmente aceita nesta raça.

Quanto ao manejo sanitário nos Centros de Treinamento, os equinos PSI recebiam anualmente vacina antirábica, a vacina dupla anti – influenza e anti – encefalomielite equina com doses trimestrais, além da vacina tríplice anti - influenza, anti – encefalomielite e antitetânica de intervalo anual. Todos os equinos PSI recebiam medicamentos antiparasitários, contendo diferentes princípios ativos, se destacando o uso da ivermectina que são administrados aos animais todo ano em intervalos que variavam de dois em dois meses ou até de quatro em quatro meses.

Já os pôneis criados nos haras de forma geral ficavam alojados em baias individuais, baias coletivas ou em piquetes. As baias dos animais em geral eram de alvenaria, possuíam o assoalho de cimento coberto com serragem além de bebedouros e comedouros fixados em seu assoalho. Os piquetes tinham assoalho desnudo coberto com gramínea, bem como comedouros e bebedouros do tipo tambor. Os animais eram alimentados com volumoso, preferencialmente capim picado e/ou feno e concentrado durante a manhã e à tarde, sendo a alimentação ofertada ao animal de forma fracionada. Além disso, os pôneis recebiam sal mineral e água à vontade.

Cabe ressaltar que os pôneis tinham como principal função o lazer, servindo de entretenimento, principalmente para crianças. Nas propriedades, geralmente havia um pônei garanhão, que realizava a monta natural das éguas em períodos específicos. Os pôneis recebiam vacinas antirábica em intervalo anual, anti – influenza em intervalo semestral e medicamentos antiparasitários todo ano em intervalos variáveis, sendo principalmente utilizado a ivermectina.

4.3 COLETA DE AMOSTRAS FECAIS, RECUPERAÇÃO DE DADOS E AMOSTRAGEM

As amostras fecais dos equinos foram coletadas diretamente da ampola retal com luva de palpação, estando estes contidos individualmente em baias ou imediatamente após a defecação. Após cada coleta realizada, o nome do animal era anotado, a luva com o material fecal era lacrada e a amostra armazenada em caixas isotérmicas específicas para transporte da amostra biológica. Esta era encaminhada imediatamente para os laboratórios da disciplina de Parasitologia do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense.

É importante ressaltar que este projeto faz parte de um projeto maior e desta forma esperava-se coletar amostras fecais de cerca de 600 equinos da raça Puro Sangue Inglês, além de equinos de outras raças. Desta forma, foi solicitado a Comissão de Ética Animal da UFF a coleta de 800 amostras fecais, sendo incluído no estudo equinos de todas as faixas etárias, tanto machos quanto fêmeas. No entanto, em março de 2020, as coletas foram interrompidas mediante a pandemia do Coronavírus e foi decidido, portanto, trabalhar com as amostras que já haviam sido coletadas.

Ao todo foram coletadas amostras fecais de 314 equinos, desses 287 eram PSI e 27 eram pôneis. Em relação aos PSI, 42 animais pertenciam ao centro de treinamento denominado de propriedade A, 74 pertenciam a propriedade B, 49 a C, 40 a D, 82 a E. Já em relação aos pôneis, 22 pertenciam a propriedade F, 2 a G e 3 a H. Além das amostras fecais, as informações sobre o sexo e idade dos equinos foram recuperadas oralmente de cada treinador ou do *stud book*, ou seja, arquivo oficial que contém as informações dos equinos. Já os dados sobre o manejo dos animais, incluindo a presença de

outros animais e tipo de água fornecida aos equinos e seu tratamento foram recuperados por meio do preenchimento de formulários, ou seja, perguntas realizadas aos treinadores dos animais.

4.4 PROCESSAMENTO LABORATORIAL

No laboratório de Parasitologia do Instituto Biomédico as amostras fecais foram primeiramente inspecionadas macroscopicamente, sendo verificadas a consistência fecal e a coloração da mesma, sendo todas as informações anotadas em caderno técnico. Logo após, uma porção de cada amostra fecal foi filtrada em tamiz com gaze dobrada quatro vezes, e transferida para cálice de fundo cônico. O filtrado foi aliquotado conforme segue abaixo:

- 15 mL em tubo de centrífuga de fundo cônico para realização da técnica de centrífugo-flutuação de Sheather (1923) modificada;
- 15 mL em tubo de centrífuga de fundo cônico para a realização da técnica de coloração permanente com solução de safranina conforme Baxby et al. (1984);
- 15 mL em tubo de centrífuga de fundo cônico para a realização da técnica de biologia molecular;
- 1,0 mL em microtubo devidamente identificado, congelados (-18°C) em *freezer* para realização de ensaio imunoenzimático;
- 1,0 mL em microtubo devidamente identificado, congelados (-18°C) em *freezer* para estoque;
- Uma parte do filtrado foi deixado sedimentar em cálice de fundo cônico por 24 horas para realização da técnica de Lutz (1919).

A leitura das lâminas de microscopia obtidas de cada técnica foi realizada no microscópio óptico binocular Olympus® BX 41, inicialmente, em aumento de 100 vezes e, para confirmação, se necessário, em 400 vezes, acoplado a câmera digital Samsung® SDC415 com *software* de captura Honestech® PVR. Para a leitura das lâminas coradas pela solução de safranina foi utilizado o aumento de 400 vezes e para confirmação 1000 vezes. Para morfometria e fotomicrografia dos oocistos de *Cryptosporidium* sp. foi realizada o aumento de 1000 vezes utilizando a ocular micrométrica Olympus® SWH.

4.4.1 Técnica de Sheather (1923) modificada por Huber et al. (2003)

Essa técnica apresenta como fundamento a centrifugo flutuação em solução de sacarose com densidade de 1,30 g/mL. No laboratório foi transferido 15 mL do filtrado da amostra para tubos plásticos de centrífuga de fundo cônico, que foi submetido à centrifugação por 10 minutos a 1500 RPM. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi suspenso em solução saturada de sacarose até o volume de 15 mL, sendo submetido à centrifugação por cinco minutos a 1500 RPM. Após esse procedimento, os tubos foram dispostos em estantes e foi adicionado solução de sacarose até a formação de um menisco positivo, sobre o quais foram colocadas lamínulas (22 x 22 mm), que foram deixadas em repouso por três minutos. Em seguida, as lamínulas foram retiradas, cuidadosamente, e depositadas sobre lâminas de microscopia, procedendo-se imediatamente à leitura do material no microscópio.

4.4.2 Coloração de coccídios pela solução de safranina (BAXBY et al., 1984)

Esta técnica tem como fundamento a coloração de oocistos de coccídios pela solução de safranina a quente. Antes da realização da técnica os tubos contendo o filtrado fecal foram submetidos a centrifugação a 2000 RPM por 10 minutos. A coloração iniciou-se por meio da preparação de um esfregaço fecal fino produzido com 5 µL de sedimento fecal. A alíquota foi inicialmente depositada em lâmina de microscopia utilizando uma micropipeta, e o esfregaço foi conduzido utilizando a própria ponteira acoplada. Logo após a realização do esfregaço, o mesmo foi deixado em repouso na bancada a temperatura ambiente até a sua secagem completa. O esfregaço foi coberto com uma solução de metanol-ácido clorídrico a 3% que foi deixado sobre a lâmina por 5 minutos para realizar a fixação do material. Em seguida, o esfregaço foi lavado com um filete de água corrente sem deixar atingir diretamente o material fecal, sendo a lâmina com o esfregaço deixada novamente em repouso na bancada para a sua secagem em temperatura ambiente. O esfregaço fixado foi coberto com solução aquosa contendo o corante de safranina a 1%, sendo a face inversa, da que continha o esfregaço, submetida a aquecimento do corante por meio da passagem dessa face na chama do Bico de Bunsen. Tal procedimento foi realizado até se observar a emissão de vapores na solução de safranina que cobria o esfregaço fecal. O material foi lavado em um filete de água corrente e deixado secar a temperatura ambiente na bancada. Após a secagem o esfregaço foi coberto com solução de azul de metileno a 1% que foi deixado sobre a lâmina por cinco minutos. Ao final, o esfregaço foi novamente lavado com um filete de água e deixado secar em temperatura ambiente sobre a bancada. Quando seca, a lâmina de microscopia foi encaminhada para leitura em microscópio óptico.

4.4.3 Técnica de Lutz (1919)

Essa técnica fundamenta-se na sedimentação espontânea das formas evolutivas dos parasitos. Parte do material obtido após a filtração foi depositado em um cálice de fundo cônico com capacidade de 250 mL. Adicionou-se água destilada até completar o volume do mesmo, que foi coberta com filme de PVC transparente e mantido em repouso para sedimentação por 24 horas. Após esse período, com uma pipeta descartável do tipo Pasteur primoutilizada, foi coletado uma alíquota do sedimento e transferida uma gota da mesma para uma lâmina de microscopia. Essa foi coberta com lamínula (24 x 32 mm) e, então, o material foi encaminhado para leitura.

4.4.4 Ensaio imunoenzimático

As amostras congeladas em microtubos foram encaminhadas para a realização do ensaio imunoenzimático (ELISA – *Enzyme linked immunosorbent assay*), objetivando aumentar a sensibilidade de detecção do protozoário *Cryptosporidium* sp.. Os kits adquiridos comercialmente detectam de forma qualitativa o antígeno da parede do oocisto de *Cryptosporidium* sp.. em amostras fecais. O kit utiliza anticorpos monoclonais e policlonais contra o antígeno de superfície do organismo. Os kits utilizados pertenciam a marca IVD Research® (Lote 1387), com ponto de corte $\geq 0,08$ e com comprimento de onda 450 nm, diferencial de 620 nm. Cabe ressaltar que o ensaio imunoenzimático foi realizado conforme com as normas técnicas do fabricante do kit.

4.4.5 Análise Molecular

As amostras fecais que foram positivas na técnica microscópica e/ou no ensaio imunoenzimático foram submetidas à análise molecular para caracterizar a espécie de *Cryptosporidium* sp. e também o genótipo.

4.4.5.1 Extração de DNA e Reação em cadeia da polimerase

A extração de DNA foi realizada a partir de 0,2 g do material fecal estocados refrigerado nos tubos de centrífuga. Para a extração de DNA a partir da amostra fecal foram utilizados kit de extração Purelink Microbiome DNA purification Invitrogen®. As amostras com DNA extraído foram armazenadas em *freezer* até a realização da reação em cadeia da polimerase.

A caracterização da espécie de *Cryptosporidium* sp. foi realizada com a reação em cadeia da polimerase (PCR) em formato de *nested* PCR, que amplifica o fragmento do gene 18S RNAr conforme as condições descritas por Xiao et al. (2000). A reação da PCR primária foi realizada com volume final de 25 μ L, utilizando Buffer Tris-KCl 1x (Tris-HCl 20 mM pH 8.4 e KCl 50mM), MgCl₂ a 6 mM (Invitrogen™); dNTPs com 200 μ M de cada dntp, 0,2 pmol de *primer forward* 18S RNAr, 0,2 pmol de

primer reverse 18 RNAr, 2,5 U de Taq polimerase (Invitrogen™ – Platinum® Taq DNA Polimerase), 2 µL do DNA extraído sendo completado o volume com água ultrapura. A PCR foi realizada em um termociclador da Applied Biosystems (Life Technologies®) com temperatura de desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, temperatura de anelamento a 55°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

A segunda reação de PCR foi realizada com volume final de 25 µL, utilizando Buffer Tris-KCl 1x (Tris-HCl 20 mM pH 8.4 e KCl 50mM), MgCl₂ (3 mM) (Invitrogen™); dNTPs (200 µM de cada dntp), 0,1 pmol do *primer forward* 18S RNAr, 0,1 pmol do *primer reverse* 18 RNAr, 2,5 U de Taq polimerase (1 unidade, Invitrogen™ – Platinum® Taq DNA Polimerase), 1 µL do DNA amplificado da PCR primária e o restante do volume foi completado com água ultrapura. A reação foi realizada em um termociclador da Applied Biosystems (Life Technologies®) com temperatura de desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, temperatura de anelamento a 55°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 7 minutos. O produto amplificado foi verificado na eletroforese em gel de agarose a 1,5% com adição da solução de Gel Red (Biotum®) e azul de bromofenol (LGC®). O produto final da nested PCR gerado é de 800 bp.

A caracterização do genótipo do parasito foi realizada seguindo o protocolo de Chalmers et al. (2005), também em modelo de *nested* PCR. Estas reações tem como objetivo amplificar o fragmento do gen da glicoproteína de superfície do esporozoíta (gp60). Ambas as reações, tanto a primária, quanto a secundária foram realizadas com volume final de 25 µL, utilizando Buffer Tris-KCl 1x (Tris-HCl 20 mM pH 8.4 e KCl 50mM), MgCl₂ a 3 mM (Invitrogen™); dNTPs com 200 µM de cada dntp, 0,2 pmol de *primer forward* gp60, 0,2 pmol de *primer reverse* gp60, 5 U de Taq polimerase (Invitrogen™ – Platinum® Taq DNA Polimerase), 5 µL do DNA sendo completado o volume com água ultrapura. A PCR foi realizada em um termociclador da Applied Biosystems (Life Technologies®) com temperatura de desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, temperatura de anelamento a 50°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. O produto amplificado foi verificado na eletroforese em gel de agarose a 1,5% com adição da solução de Gel Red (Biotum®) e azul de bromofenol (LGC®). O produto final da nested PCR gerado é 800 pb.

4.4.5.2 Purificação, sequenciamento do DNA e análise das sequências nucleotídicas

Os produtos de PCR obtidos nas reações foram purificados com a enzima Exosap – it seguindo as recomendações do fabricante. Todas as amostras foram sequenciadas com os mesmos os *primers*

empregados na reação de *nested* PCR em um sequenciador automático 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems® Carlsbad, EUA) na plataforma de Sequenciamento de Jaboticabal, São Paulo para a determinação das sequências de ambas as direções. As sequências nucleotídicas resultantes da amplificação dos gen 18SRNAr foram editadas usando o *software* SeqMan (DNASTAR, Larsegene, versão 7.0) e avaliadas com sequências de referências que estão depositadas no *Genbank* por meio da ferramenta *nucleotide Blast* (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) para confirmar a espécie do parasito.

Após a verificação da espécie, as sequências identificadas como *Cryptosporidium parvum* foram confirmadas a nível de espécie por meio do sequenciamento do alvo gênico gp60 utilizando a mesma metodologia previamente descrita para o DNA que codifica o 18S RNAr.

Adicionalmente, estas mesmas sequências foram alinhadas com sequências de referências depositadas no *Genbank* e representativas dos diferentes genótipos de *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium horse genotype*, *Cryptosporidium hedgehog*, *Cryptosporidium tizzeri* e *Cryptosporidium cuniculus* que já foram identificados em outros estudos em amostras biológicas de equinos e outras espécies de hospedeiros. A partir desse alinhamento foi gerada uma árvore filogenética utilizando a análise Neighbor Joining, por meio do software Seaview® com *bootstraps* de 1.000 replicações e modelo Kimura-2 parâmetro (GOUY et al., 2010).

4.4.6 Análise estatística

Todos os dados recuperados dos treinadores, do *stud book*, como sexo e idade dos animais, informações da consistência e coloração do material fecal, e as recuperadas dos formulários foram armazenados em bancos de dados do Excel Microsoft Office 2007. Análises estatísticas foram realizadas para verificar a significância da frequência de *Cryptosporidium* sp. entre as propriedades dos equinos e também para verificar se havia alguma associação significativa das informações obtidas do *stud book*, da análise macroscópica do material fecal e das recuperadas dos formulários com a positividade para o protozoário. Para tal verificação, inicialmente, foi realizada uma análise exploratória univariada dos dados para a seleção das variáveis com $p \leq 0,2$ por meio dos testes qui-quadrado ou exato de Fischer. Posteriormente, as variáveis significativas passaram para análise multivariada por meio da regressão logística com nível de significância de 5%. A existência de fatores associados a infecção pelo protozoário foi estimada por Odds Ratio (OR) e seus respectivos intervalos de confiança de 95%.

Além disso, uma análise estatística foi aplicada para comparar as mensurações dos diâmetros dos oocistos e verificar se havia variação estatisticamente significativa nas mensurações obtidas entre as amostras fecais positivas pelas técnicas coproparasitológicas microscópicas. Cabe ressaltar que ao

todo foram mensurados no mínimo 30 oocistos, quando essa quantidade era detectada. Análise estatística das medidas foi realizada por meio do Teste de análise de Variância (Anova) e o teste de Tuckey como pós-teste, considerando diferenças significativas os valores de $p < 0,05$ tendo sido utilizado o *software* Past.

Abaixo segue o fluxograma resumido da metodologia empregada no estudo (Figura 5).

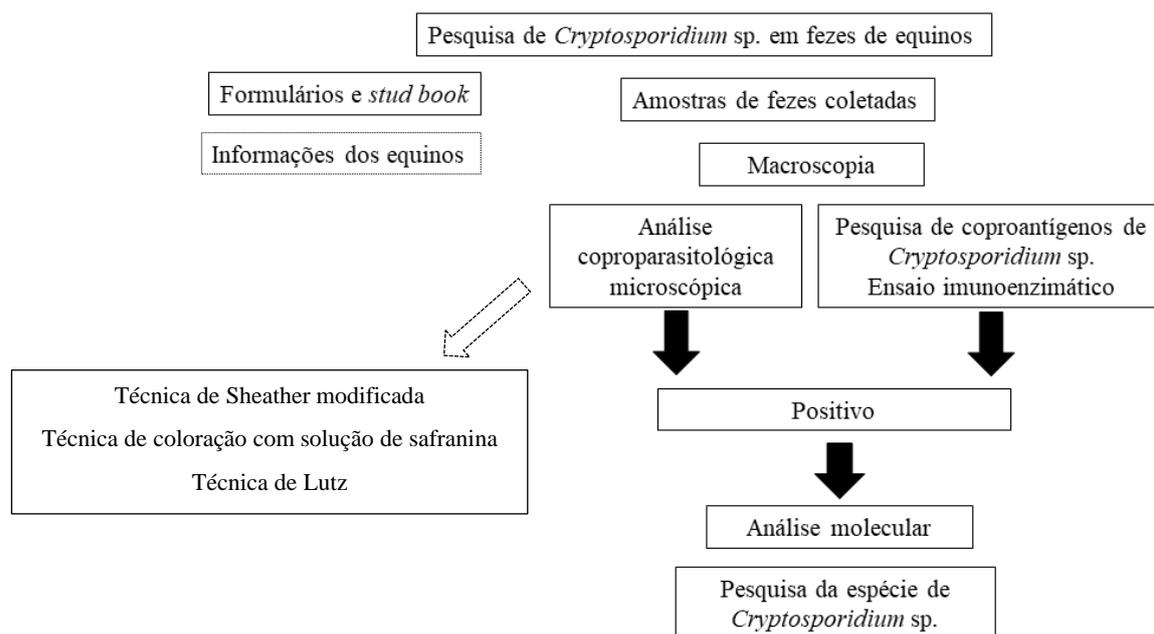


Figura 5 Fluxograma da metodologia empregada no estudo.

5. RESULTADOS

Em amostras fecais de 35 (11,1%) equinos mantidos em diferentes propriedades de Teresópolis, Rio de Janeiro, foram detectados estruturas de *Cryptosporidium* sp., ao se associar as técnicas parasitológicas de diferentes fundamentos. O parasito foi detectado pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) e pela técnica parasitológica microscópica com coloração permanente por solução de safranina, não sendo identificado pelas técnicas coproparasitológicas de centrífugo flutuação e nem mesmo pela sedimentação. O ELISA apresentou maior frequência na detecção do parasito, sendo identificado por meio desse ensaio 9,5% das amostras positivas, do que a coloração permanente, no qual foi detectado 1,6% das amostras fecais positivas para o protozoário. De forma geral, ao se comparar por meio de uma análise prévia univariada exploratória a positividade detectada entre as propriedades que mantém equinos em Teresópolis, verificou-se diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,2$). As propriedades D, A e E foram as que apresentaram as maiores frequências de equinos positivos, sendo a propriedade E, aquela que apresentou maior número de amostras fecais com oocistos de *Cryptosporidium* sp. detectados pela técnica de coloração permanente com solução de safranina (Tabela 1).

A partir das análises macroscópicas, pode-se verificar que a maioria das amostras fecais analisadas apresentavam a consistência sólida e possuíam colorações com tonalidades amarronzadas. Em relação às amostras positivas para *Cryptosporidium* sp., observou-se que todas as amostras fecais positivas, 35, apresentavam consistência fecal sólida, ou seja, estavam firmes e moldadas com colorações do tipo amarronzadas, que variaram do marrom intenso, marrom esverdeado ao marrom avermelhado. A partir das informações recuperadas de cada equino no *stud book* e/ou por informações pessoais dos treinadores, observou-se que tanto o sexo, quanto as faixas etárias apresentaram diferenças significativas de positividade para *Cryptosporidium* sp. na análise univariada exploratória ($p \leq 0,20$) (Tabela 2).

Tabela 1 Frequência e análise univariada de *Cryptosporidium* sp. detectado em fezes de equinos mantidos em diferentes propriedades em Teresópolis, Rio de Janeiro por meio da técnica parasitológica microscópica com solução safranina e pelo ensaio imunoenzimático.

Propriedades de equinos/ Quantidade de amostras	<i>Cryptosporidium</i> sp. Safranina	<i>Cryptosporidium</i> sp. ELISA	Positivo	valor de p
A (n=42)	0	8 (19%)	8 (19%)	
B (n= 74)	0	1 (1,4%)	1 (1,4%)	
C (n=49)	1 (2%)	1 (2%)	2 (4%)	
D (n=40)	0	18 (45%)	18 (45%)	0,0000 ^{a*}
E (n=82)	4 (4,9%)	1(1,2%)	5 (6,1%)	
F (n=22)	0	1 (4,5%)	1 (4,5%)	
G (n=2)	0	0	0	
H (n=3)	0	0	0	
Total (n= 314)	5 (1,6%)	30 (9,5%)	35 (11,1%)	

Propriedades A,B,C,D,E: Centro de Treinamento de Puro Sangue Inglês; Propriedades F,G,H: Haras de pôneis; * $p \leq 0,2$. n: número de amostras fecais coletadas.

A maioria dos equinos incluídos neste estudo eram da raça Puro Sangue Inglês, sendo portanto, mantidos em centros de treinamento em Teresópolis. Nesse grupo de equinos, se concentrou a maior frequência evidenciada para o protozoário, sendo somente detectado em haras, ou seja, criatório de pôneis um animal positivo por meio do coproantígeno. Ao se analisar a casuística deste estudo com informações recuperadas dos formulários que pudessem estar associadas com a infecção pelo protozoário, verificou-se que todas as propriedades possuíam outras espécies de animais, que diferiam entre galináceos, cães, gatos e ruminantes. No entanto, somente a presença de cães e dos pequenos ruminantes, como ovino e caprino, demonstrou associação estatisticamente significativa na análise univariada (Tabela 2).

Diferenças estatisticamente significativas também foram observadas em relação ao tipo de água fornecida para o equino ($p \leq 0,20$). Maior frequência de *Cryptosporidium* sp. ocorreu entre os equinos que consumiam água da nascente (18,1%), seguido por aqueles que consumiam água da nascente e poço artesiano (7,7%) e por último, aqueles que só consumiam água de poço de artesiano (6,1%). Quanto ao tratamento da água, poucas foram as propriedades de equino que realizavam esse procedimento, desta forma, esta variável acabou não sendo associada de forma diferenciada para determinar ou não a infecção por este protozoário (Tabela 2).

Tabela 2 Frequência de *Cryptosporidium* sp. de acordo com variáveis recuperadas da análise macroscópica do material fecal, do stud book e dos formulários aplicados aos treinadores de equinos mantidos em diferentes propriedades em Teresópolis, Rio de Janeiro.

Variáveis	Microscopia Safranina	ELISA Positivo	Total de positivo	Valor de p
Consistência fecal				
Sólida (n=306)	5 (1,6%)	30 (9,8%)	35 (11,4%)	0,6557 ^a
Semi-sólida (n=5)	0	0	0	
Pastosa (n=2)	0	0	0	
Diarreica (n=1)	0	0	0	
Coloração				
Verde (n=6)	0	0	0	0,690 ^b
Marrom esverdeado (n=77)	0	11 (14,3%)	11 (14,3%)	
Marrom avermelhado (n=16)	1 (6,3%)	1 (6,3%)	2 (12,5%)	
Marrom (n=215)	4 (1,9%)	18	22 (10,2%)	
Sexo				
Macho (n=167)	3 (1,8%)	9 (5,4%)	12 (7,2%)	0,027 ^{a*}
Fêmea (n=147)	2 (1,4%)	21 (14,3%)	23 (15,6%)	
Idade				
≤ 2 anos (n=55)	0	12 (21,8%)	12 (21,8%)	0,031 ^{b*}
> 2 ≤ 5 anos (n=209)	4 (1,9%)	15 (7,2%)	19 (9,1%)	
> 5 anos (n=50)	1 (2%)	3 (6%)	4 (8%)	
Tipo de estabelecimento				
Centro de Treinamento (n=287)	5 (1,7%)	29 (10,1%)	34 (11,8%)	0,33 ^a
Haras de pôneis (n=27)	0	1 (3,7%)	1 (3,7%)	
Presença de outros animais na propriedade				
Galináceos (n=178)	5 (2,8%)	10 (5,6%)	15 (8,4%)	0,11 ^a
Cão (n=178)	0	28 (15,7%)	28 (15,7%)	
Gato (n=166)	1 (0,6%)	20 (12%)	21 (12,6%)	0,4 ^a
Ovino e caprino (n=87)	4 (4,6%)	1 (1,1%)	5 (5,8%)	
Bovino (n=5)	0	0	0	0,93 ^a
Água fornecida para os animais				
Nascente (n=116)	1 (0,9%)	20 (17,2%)	21 (18,1%)	0,013 ^{b*}
Nascente e poço artesiano (n=116)	0	9 (7,7%)	9 (7,7%)	
Poço artesiano (n=82)	4 (4,9%)	1 (1,2%)	5 (6,1%)	
Tratamento da água				
Sim (n=5)	0	0	0	0,93 ^a
Não (n=309)	5 (1,6%)	30 (9,7%)	35 (11,3%)	

* $p \leq 0,20$; a: teste de qui-quadrado; b: teste exato de Fisher.

Para compor um modelo regressão logística, foram selecionadas as variáveis que na análise univariada exploratória apresentaram $p \leq 0,20$, ou seja, o sexo, idade, presença de cães, presença de ovino de caprino e tipo de água fornecida aos animais. Estas variáveis foram então submetidas a uma análise multivariada, no qual foi possível observar associação significativa somente entre a positividade de *Cryptosporidium* sp. e a presença de cães, ovino e caprino, bem como ao tipo de água fornecida aos animais. Equinos que estavam em propriedades onde circulavam cães e ovinos e caprinos tiveram cerca de seis e nove vezes mais chance, respectivamente de estarem parasitados pelo

protozoário em comparação com os equinos que eram mantidos em propriedade no qual não haviam cães e pequenos ruminantes. O tipo de água também foi uma variável significativamente associada à infecção parasitária nos equinos ($p = 0,0035$). Os animais que recebiam água da nascente apresentaram mais chance de estarem parasitados do que os que recebiam somente água de poço ou água de poço e da nascente ($OR = 2,7860$; $IC\ 95\% = 1,4019-5,5360$) (Tabela 3).

Tabela 3 Modelo final de análise de regressão múltipla das variáveis estatisticamente associadas com a positividade para *Cryptosporidium* sp. detectado nas amostras fecais dos equinos mantidos em diferentes propriedade em Teresópolis, Rio de Janeiro.

Variáveis	Regressão logística múltipla	
	p valor	OR ajustado (IC 95%)
Sexo	0,2849	1,5469 (0,6954 - 3,4411)
Idade	0,3753	0,7419 (0,3834 - 1,4355)
Presença de cães	0,0167*	6,5431 (1,4046 - 30,4807)
Presença de ovino e caprino	0,0291*	9,3549 (1,2553 - 69,7138)
Água fornecida para os animais	0,0035*	2,7860 (1,4019 - 5,5360)

* $p < 0,05$.

Os oocistos detectados pela técnica de coloração permanente com solução de safranina nas amostras fecais dos equinos PSI apresentaram colorações variadas, com diferentes graus de intensidade, nos quais os tons variaram do rosa, passando pelo vermelho, até o púrpura intenso. O fundo das preparações submetido ao azul de metileno destacou os oocistos, além de corar, em outros tons, alguns organismos como estruturas leveduriformes, facilitando assim o diagnóstico diferenciado. Na maioria dos isolados do protozoário não se conseguiu observar uma morfologia interna bem definida como a presença dos quatro esporozoítas (Figura 6). Pode-se observar também que algumas preparações tinham um halo mais claro em torno do oocisto, oocistos mais corados com tonalidades em azul, bem como áreas arredondadas onde não existia mais o oocisto.

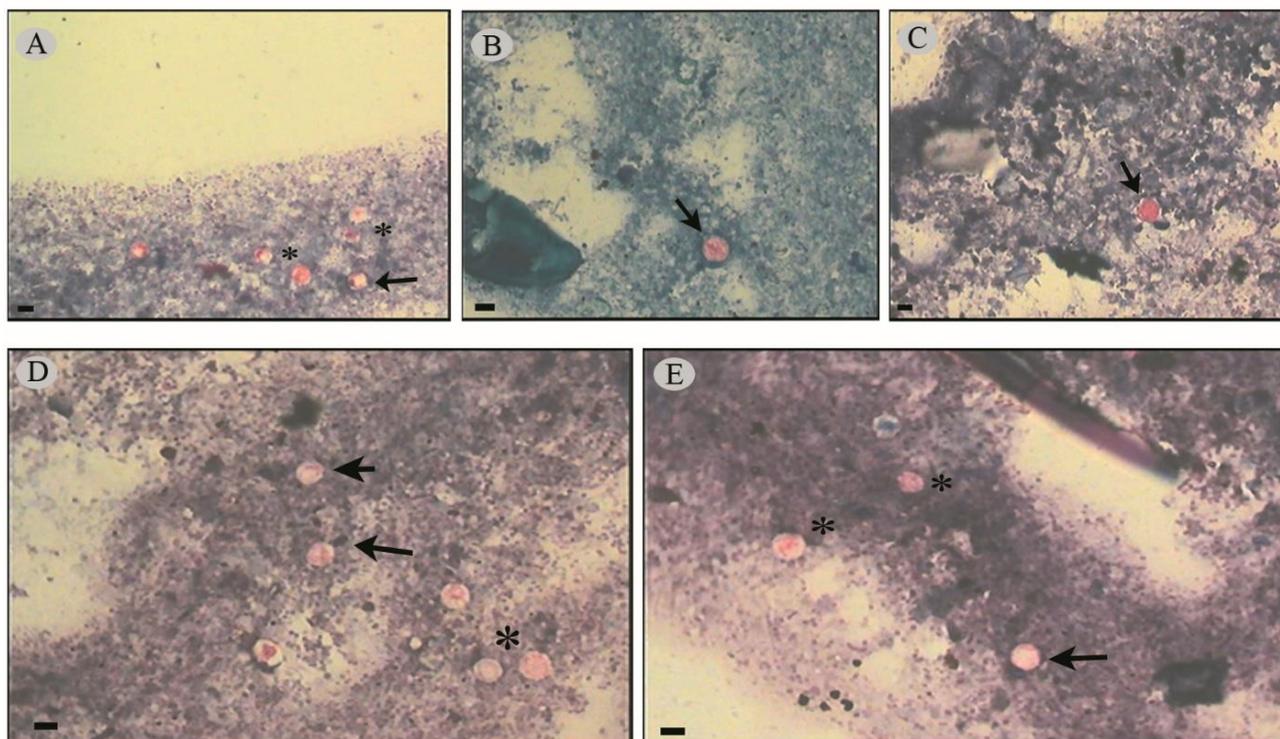


Figura 6 Prancha científica da fotomicrografia dos oocistos de *Cryptosporidium* sp. indicados por setas e asteriscos, corados pela solução de safranina detectados em fezes de equinos da raça Puro Sangue Inglês mantidos em centros de Treinamento em Teresópolis, Rio de Janeiro. A foto A corresponde a equino 197 mantido na propriedade C, as fotos B,C,D e E correspondem aos equinos 271, 266, 285 e 292, respectivamente mantidos na propriedade E. Barra= 4 μ m. As fotomicrografias foram realizadas com aumento de 1000 vezes.

A morfometria das formas compatíveis com oocistos detectados em lâmina de microscopia corada com solução de safranina foi realizada, sendo recuperadas informações dos diâmetros dos oocistos que apresentavam morfologia compatível com *Cryptosporidium* sp.. As mensurações médias dos diâmetros maior e menor, bem como o desvio padrão seguem descritos na tabela 4. O menor valor médio detectado no diâmetro maior foi de 4,14 e o maior foi de 4,9, enquanto que o menor valor médio detectado no diâmetro menor foi de 4,03 e o maior 4,63. De forma geral, foi evidenciada variação estatisticamente significativa (ANOVA; $p < 0,05$) na morfometria dos oocistos entre as cinco amostras fecais positivas na técnica parasitológica microscópica. Quando estes parâmetros foram avaliados pelo teste estatístico de Tuckey, esta variação significativa esteve presente entre as amostras Cry – 266 e Cry 285, tanto no maior diâmetro ($p = 0,038$) quanto no menor diâmetro ($p = 0,044$).

Tabela 4 Informações morfométricas (média e desvio padrão) dos oocistos de *Cryptosporidium* sp. detectados pela técnica de coloração permanente em fezes de equinos mantidos em propriedade de Teresópolis, Rio de Janeiro.

Caracteres	Maior diâmetro	Menor diâmetro
Cry - 198 (n=39)	4,35 ± 0,66	4,25 ± 0,69
Cry - 266 (n=11)	4,9 ± 0,66	4,63 ± 0,50
Cry - 271 (n=30)	4,6 ± 0,66	4,53 ± 0,62
Cry - 285 (n=28)	4,14± 0,66	4,03± 0,50
Cry - 292 (n=33)	4,75± 1,27	4,30± 1,13
ANOVA (valor de p)	0,031	0,039

As 35 amostras fecais positivas para *Cryptosporidium* sp., foram submetidas a análise molecular utilizando *primers* que amplificam o gen 18S RNAr e a glicoproteína de superfície gp60. Destas, oito amostras apresentaram bandas no gel de eletroforese com cerca de 800 bp, compatível com o protozoário. Na análise das sequências nucleotídicas geradas do 18S RNAr, pode-verificar que ao todo, sete amostras apresentaram fragmentos de sequências que foram identificadas como *Cryptosporidium parvum*, e somente uma amostra com sequência nucleotídicas compatível com *Cryptosporidium felis*. As sequências oriundas do gen 18S RNAr apresentaram valores de identidade variando ente 99,6% a 100% em comparação com sequências depositadas no Genbank (Tabela 5). Dessas, sete sequências foram depositadas no *Genbank* com os números de acesso MZ161164 a MZ161169, pois apresentavam tamanhos que variaram de 293 a 691 pb. Somente a sequência nucleotídica oriunda da amostra 285 não foi depositada, pois apresentou uma sequência com 153 bp, ou seja, tamanho menor do que o valor limite do *Genbank* que é 200 bp (Tabela 5).

A partir da análise das sequências geradas com os *primers* que amplificam o fragmento nucleotídico do gen da gp60 foi possível confirmar a espécie *Cryptosporidium parvum* nas sete amostras que haviam sido classificadas também como desta espécie pela análise do 18S RNAr. Todas as sequências de *C. parvum* obtidas dos fragmentos da gp60 foram publicadas no *Genbank* e o número de acesso segue na tabela 5. De forma geral, ao se agrupar os fragmentos das sequências de *C. parvum* do gen gp60 com sequências de referência pode-se verificar uma predominância da família IIa e tal característica foi confirmada a partir do alinhamento, uma vez que foi identificado 100% de similaridade entre a sequência deste estudo levando em consideração a região da menor sequência nucleotídica obtida, que foi do isolado 171, que tinha 423pb. Além disso, foi possível identificar em *C. parvum* de forma completa o genótipo IIaA15G2R1 na amostra fecal do equino 266. As sequências de *C. parvum* identificadas a partir da gp60 também apresentaram valores de identidade 99,86% a

100% quando foram comparadas com as sequências de referência do *Genbank*, tendo sido interpretado tamanho de fragmentos que variaram de 423 a 720 pb (Tabela 5, Figura 7).

Tabela 5 Isolados de *Cryptosporidium* spp. caracterizados molecularmente detectados em fezes de equinos mantidos em propriedades em Teresópolis, Rio de Janeiro.

Isolado/Nº acesso Genbank	Propriedade	Idade do equino	Sexo do equino	Consistência e cor das fezes	Microscópica Safranina	ELISA (faixa de leitura)	PCR, sequenciamento e tamanho da sequência 18S RNAr	Sequência do Genbank Identidade (%) 18S RNAr	PCR, sequenciamento e tamanho da sequência gp60	Sequência do Genbank Identidade (%) gp60
80 RNAr18S: MZ161164	A	5 anos	F	Sólida, marrom	Negativo	Positivo	<i>Cryptosporidium felis</i> 539 pb	99,63% MK982512.1 MK886594.1 MH115431.1 MF589920.1 KM977642.1	Negativo	NA
85 RNAr18S: MZ161165 gp60: MZ230731	A	1 ano e 5 meses	F	Sólida, marrom esverdeada	Negativo	Positivo	<i>Cryptosporidium parvum</i> 453 pb	100% MF327254.1 KU198182.1	<i>Cryptosporidium parvum</i> 719 pb	99,86% MT010359.1 MT010358.1 MT010357.1 MN815775.1 MN037870.1
171 RNAr18S: MZ161166 gp60: MZ230732	B	2 anos	M	Sólida, marrom esverdeada	Negativo	Positivo	<i>Cryptosporidium parvum</i> 523 pb	100% MT648442.1 MT648441.1 MT648440.1 MT002720.3 MT374186.1	<i>Cryptosporidium parvum</i> 423 pb	99,63% MT265776.1 MT265775.1 MT265774.1 MT265771.1 MT265768.1
197 RNAr18S: MZ161167 gp60: MZ230733	C	4 anos e 5 meses	M	Sólida, marrom	Oocistos de <i>Cryptosporidium</i>	Negativo	<i>Cryptosporidium parvum</i> 536 pb	100% MT648442.1 MT648441.1 MT002720.3 MT374186.1 MT002719.2	<i>Cryptosporidium parvum</i> 685 pb	100% MT265776.1 MT265775.1 MT265774.1 MT265771.1 MT265768.1
266 RNAr18S: MZ161168 gp60: MZ230734	E	4 anos	F	Sólida, marrom	Oocistos de <i>Cryptosporidium</i>	Negativo	<i>Cryptosporidium parvum</i> 340 pb	100% MW769926.1 MW769925.1 MW769924.1 MW769923.1 MW769922.1	<i>Cryptosporidium parvum</i> IIaA15G2R1 763 pb	100% MT265779.1 MT265776.1 MT265775.1 MT265774.1 MT265772.1
271 RNAr18S: MZ161169 gp60: MZ230735	E	5 anos	M	Sólida, marrom avermelhada	Oocistos de <i>Cryptosporidium</i>	Negativo	<i>Cryptosporidium parvum</i> 691 pb	100% MN540783.1 MN540758.1	<i>Cryptosporidium parvum</i> 720 pb	99,58% MT265776.1 MT265775.1 MT265774.1 MT265771.1 MT265768.1
285 gp60: MZ230736	E	8 anos	M	Sólida, marrom	Oocistos de <i>Cryptosporidium</i>	Negativo	<i>Cryptosporidium parvum</i> 153 pb	100% MW769926.1 MW769925.1 MW769924.1 MW769923.1 MW769922.1	<i>Cryptosporidium parvum</i> 642 pb	100% MT265776.1 MT265775.1 MT265774.1 MT265771.1 MT265768.1
292 RNAr18S: MZ161170 gp60: MZ230737	E	5 anos	F	Sólida, marrom	Oocistos de <i>Cryptosporidium</i>	Negativo	<i>Cryptosporidium parvum</i> 293 pb	100% MN918244.1 MN918240.1 MN918212.1 MN918206.1 MN918168.1	<i>Cryptosporidium parvum</i> 647 pb	100% MT265776.1 MT265775.1 MT265774.1 MT265771.1 MT265768.1

M: Macho; F: Fêmea

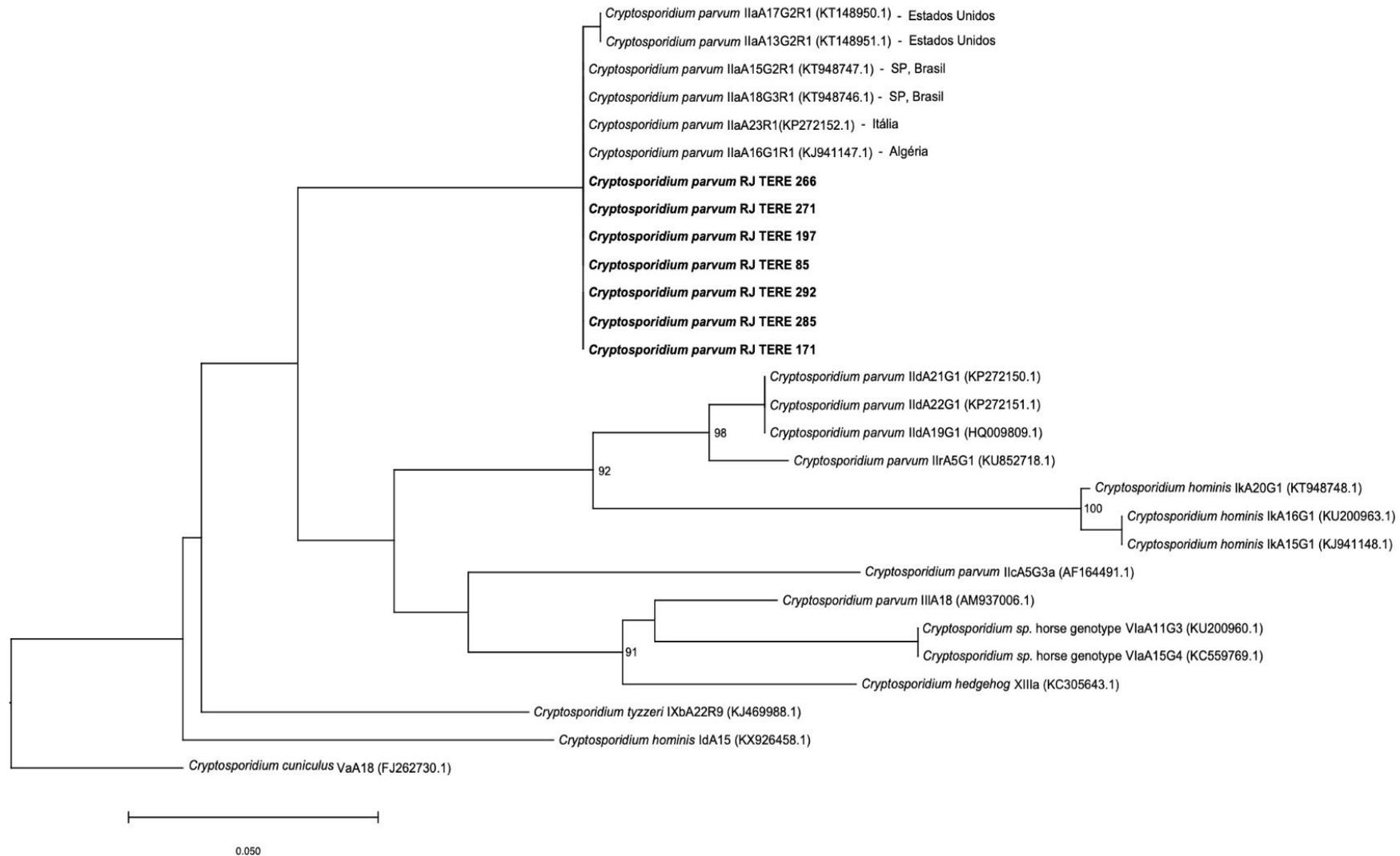


Figura 7 Relações genéticas entre isolados de *Cryptosporidium* spp. inferidas pelo algoritmo Neighbor Joining utilizando o modelo Tamura 3-parametro com base nas sequências do gene gp60. Os números associados aos ramos referem-se aos valores de *bootstraps* para 1000 replicações. *Bootstraps* acima de 50% estão mostrados na árvore.

6. DISCUSSÃO

A frequência geral de *Cryptosporidium* sp. detectada nos equinos mantidos em diferentes propriedades de Teresópolis, Rio de Janeiro, foi de 11,1% ao se associar os resultados obtidos pelas técnicas coproparasitológicas microscópicas de coloração com solução de safranina e a pesquisa de coproantígenos com ensaio imunoenzimático (ELISA). Frequências inferiores ao do presente estudo foram relatadas em plantéis de equinos nos Estados Unidos (0 a 5,1%), República Tcheca e Polônia (3,4%); e Itália (8% a 10,8%) por meio das técnicas coproparasitológicas microscópicas de flutuação, coloração permanente, imunofluorescência direta e técnicas moleculares, na Polônia (3,5%) pelas técnicas parasitológicas microscópicas com coloração permanente e ensaio imunoenzimático, Reino Unido (3,8% a 8,9%), Bélgica e Grécia (2%) pela imunofluorescência direta e biologia molecular, bem como em propriedades de criação de equinos na China (1,8 a 6,9%) e Argélia (2,3% a 3%) utilizando somente técnicas de biologia molecular (BURTON et al., 2010; CHALMERS et al., 2005; DENG et al., 2017; FREDERICK et al., 2009; JOHNSON et al., 1997; KOSTOPOULOU et al., 2015; LAATAMNA et al. 2013; LAATAMNA et al. 2015; LIU et al., 2015; MAJEWSKA et al. 2004; PERUCCI et al., 2011; QI et al., 2015; REINEMEYER et al., 1984; STURDEE et al., 2003; VERONESI et al., 2010; WAGNEROVÁ et al. 2015).

Positividades superiores à evidenciada nos equinos de Teresópolis, RJ foram relatadas em diferentes estados do Brasil, como nas cidades de São Paulo, utilizando técnicas de centrífugo sedimentação em éter e coloração permanente de Kinyoun (18,4% a 21,4%) e pelas técnicas de biologia molecular (21,7%), no Rio Grande do Sul utilizando a centrífugo flutuação com solução de sulfato de zinco (38,5% a 75%) e no Paraná com a coloração permanente de Ziehl Neelsen (18,52%) (FUJI et al., 2014; GOMES et al., 2008; INÁCIO et al., 2012; INÁCIO et al., 2017; TOSCAN et al., 2010). Frequências superiores também foram relatadas em equinos criados em propriedades localizadas em outros países por meio de técnica parasitológica microscópica e imunodiagnóstico no Reino Unido (17%), pela microscopia e biologia molecular em Taiwan (37%) e Nova Zelândia (18%), pelo imunodiagnóstico e biologia molecular na Inglaterra e País de Gales (25%) e por meio somente das técnicas de biologia molecular como nas propriedades de criação de equinos nos Estados Unidos (33,3%), Itália (37,8%) e Península Ibérica (12,6%) (CAFFARA et al. 2013; COUSO-PÉREZ et al., 2020; GALUPPI et al., 2015; GRINBERG et al., 2009; GUO et al., 2014; NETHERWOOD et al., 1996; SMITH et al., 2010; WAGNEROVÁ et al., 2016). No entanto, casuística de positividade muito abaixo da evidenciada do presente estudo foi relatada por Souza et al. (2009) em equinos mantidos em Corporações militares e no Centro de Controle de Zoonoses, localizados também no estado do Rio de Janeiro, 0,75%, ao serem utilizadas técnicas parasitológicas microscópicas de centrífugo flutuação com solução de sacarose e coloração permanente com solução de safranina.

A frequência de cerca de 11% de equinos positivos para *Cryptosporidium* sp. evidenciada neste estudo, pode indicar uma baixa taxa de infecção para este protozoário entre os equinos da raça Puro Sangue Inglês mantidos em centros de treinamento e também nos pôneis mantidos nos haras em Teresópolis, Rio de Janeiro. No entanto, essa casuística pode não estar correspondendo a real quantidade de equinos parasitados, pois no presente estudo pleiteou-se a realização de uma amostragem pontual, ou seja, uma única amostra fecal foi obtida de cada animal. Sabe-se que o diagnóstico da criptosporidiose é considerado um desafio, pois os sintomas clínicos da parasitose são inespecíficos e nem sempre estão presentes. Além disso, os oocistos são muito pequenos, portanto, difíceis de serem visualizados ao microscópio, sendo liberados nas fezes de forma intermitente (MCKENZIE; DIFFAY, 2000; SANTÍN, 2013). Desta forma, esta parasitose, vem sendo considerada como subdiagnosticada, principalmente entre os animais, se destacando os equinos, que diferentemente de bovinos e pequenos ruminantes não são considerados os principais reservatórios do protozoário, não sendo, portanto, os hospedeiros mais estudados nos inquéritos epidemiológicos (TOMAZIC et al., 2018).

As diferentes frequências supracitadas entre os estudos epidemiológicos podem estar diretamente relacionadas aos variados testes laboratoriais empregados, a localização geográfica da propriedade do equino e ao manejo realizado com os animais. De forma geral, não há uma padronização dos testes laboratoriais utilizados para detectar *Cryptosporidium* sp., sendo muitas das vezes, os mesmos escolhidos de acordo com o fomento financeiro disponível e a expertise do pesquisador com a técnica aplicada. Além disso, ainda não há um método padrão ouro para diagnóstico de *Cryptosporidium* sp., existindo diferenças de sensibilidade e especificidade entre as técnicas laboratoriais empregadas, que também podem variar de acordo com a amostra fecal da espécie do hospedeiro (COLE et al., 1999). Tal fato, acaba prejudicando as comparações dos índices epidemiológicos relatados entre os diferentes estudos e o realizado com os equinos mantidos nas propriedades de Teresópolis, Rio de Janeiro.

Nas amostras fecais dos equinos do presente estudo, o gênero *Cryptosporidium* foi principalmente detectado por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA). Esta técnica diagnóstica coproantígenos do parasito, não necessitando que o mesmo esteja com sua forma evolutiva íntegra e/ou se multiplicando, além de ser mais sensível por detectar protozoários mesmo em baixas cargas parasitárias (BARBOSA et al., 2020). No entanto, esse resultado deve ser analisado com cautela, pois o ELISA não concordou com os resultados obtidos pela técnica parasitológica de coloração permanente, na qual foi possível visualizar oocistos morfometricamente compatíveis com *Cryptosporidium* sp.. Esse resultado ressalta a possibilidade do ELISA ter apresentado resultados falso positivos, ou seja, reações imunologicamente cruzadas com outros microrganismos incluindo os patogênicos, os que compõem a microbiota, helmintos e/ou com componentes da dieta do equino. A falta de concordância entre o ELISA e a técnica parasitológica microscópica também pode estar

relacionada a ausência de antígeno do parasito na aliquota fecal testada no momento da realização do ensaio.

Contudo, sabe-se que as técnicas parasitológicas microscópicas de coloração permanente apresentam baixa sensibilidade. Cole et al. (1999) ao analisarem a eficiência do diagnóstico de *Cryptosporidium* sp. por meio de diferentes técnicas em amostras fecais de equinos, demonstraram que oocistos do protozoário só foram detectados por meio da técnica parasitológica microscópica de coloração permanente de Kinyoun, quando havia pelo menos 5×10^5 oocistos por grama de fezes na amostra. Ainda que tenha sido baixo o diagnóstico parasitológico microscópico nas fezes dos equinos de Teresópolis, a detecção da forma evolutiva do oocisto, indica possivelmente que o protozoário poderia estar se multiplicando e o equino verdadeiramente infectado. Fato que nem sempre pode ser cogitado quando se detecta o parasito somente pelo coproantígeno e/ou por técnicas moleculares.

Em relação ao manejo, é importante ressaltar que a maioria dos equinos incluídos neste estudo era da raça Puro Sangue Inglês (PSI), mantidos em centros de treinamento destinados a atividades esportivas de turfe, ou seja, atletas de elevado valor econômico. Estes permaneciam em sistema de confinamento em baias individuais em grande parte do seu dia. Já os pôneis, por serem animais destinados principalmente ao lazer, recebiam manejo diferenciado, passando parte do dia confinado em baias e também pastando em piquetes. No entanto, o manejo realizado, tanto dos pôneis, quanto de equino da raça PSI era altamente cuidadoso, incluindo a aplicação de vacinas, administração de anti-helmínticos a cada dois ou três meses, fornecimento de alimentação com elevado teor nutricional e realização de rotinas diárias de higiene das baias e demais instalações. Além disso, estes animais eram inspecionados e assistidos em vários momentos do dia por diferentes profissionais. Esse manejo sanitário rebuscado pode também ter contribuído para minimizar as infecções por *Cryptosporidium* sp., ainda que não sejam 100% eficazes para eliminar a infecção do equino e a contaminação do protozoário do ambiente, determinando assim a baixa frequência evidenciada nesse estudo. No entanto, como os equinos PSI ficam mantidos em baias de forma individual, os mesmos acabam se tornando mais suscetíveis ao estresse pelo confinamento (SCHMIDEK, 2018). Sabe-se que o estresse em equinos pode determinar alterações na mucosa do seu trato gastrointestinal e conseqüentemente o desenvolvimento de cólicas e úlceras (SCHAEFER et al., 2006). Estas alterações podem favorecer as infecções pelos parasitos, se destacando os oportunistas como *Cryptosporidium* sp.

É importante ressaltar que a maioria das amostras fecais dos equinos coletadas e positivas para *Cryptosporidium* sp. foram classificadas como sólidas com tonalidades amarronzadas, não sendo, portanto, verificado associação entre a infecção pelo protozoário e as características de consistência e coloração do material fecal. Resultados similares ao do presente estudo em relação a consistência fecal foram relatados em fezes de equinos mantidos em propriedades em Taiwan, Estados Unidos, Canadá,

Itália, Bélgica, Holanda, Alemanha, Grécia, República Tcheca, Polônia e no Brasil, especificamente em São Paulo (BURTON et al., 2010; GUO et al., 2014; KOSTOPOULOU et al. 2015, INÁCIO et al., 2012; INÁCIO et al., 2017; OSLON et al., 1997; VERONESI et al., 2010; WAGNEROVÁ et al., 2015). Mediante as características observadas no material fecal dos equinos de Teresópolis, Rio Janeiro, pode-se ressaltar que possivelmente os mesmos estavam assintomáticos, incluindo aqueles em que foram detectados oocistos de *Cryptosporidium* sp. por meio das técnicas coproparasitológicas microscópicas de coloração permanente. Tal fato ressalta a importância dos equinos como possíveis reservatórios do protozoário na cidade de Teresópolis, que é considerada um dos principais núcleos de criação de equinos do Brasil que desempenham funções diferenciadas, destacando os de turfe mantidos em centros de treinamento e aqueles voltados para recreação como é o caso dos pôneis.

De forma geral, neste estudo os equinos mais jovens com até dois anos de idade foram os que apresentaram proporcionalmente a maior taxa de positividade para *Cryptosporidium* sp., e esta, foi diminuindo com o avançar das categorias etárias dos animais. Em relação ao sexo, as fêmeas foram as que apresentaram maior casuística de indivíduos potencialmente infectados pelo protozoário. Além disso, pode-se verificar que mais 40% das fêmeas positivas pertenciam justamente à categoria de equinos mais jovens, ou seja, animais recém-chegados aos plantéis. A partir de uma análise univariada exploratória a frequência geral de *Cryptosporidium* sp. mostrou-se possivelmente associada com a idade e o sexo dos animais. No entanto, quando as mesmas fizeram parte do modelo de regressão logística multivariado, tanto a idade, quanto o sexo não foram associados a infecção pelo protozoário. Panorama similar ao evidenciado neste estudo, ou seja, a não associação destas variáveis com a infecção por *Cryptosporidium* sp. também foram relatadas em outras propriedades de criação de equinos localizadas na Argélia, Bélgica, Holanda, Alemanha, Grécia, República Tcheca, Polônia e em outros estados do Brasil (FUJI et al., 2014; GOMES et al., 2008; INÁCIO et al., 2017; KOSTOPOULOU et al., 2015; LAATAMNA et al., 2013; LAATAMNA et al., 2015; WAGNEROVÁ et al., 2015). Sabe-se que os extremos idade são considerados um dos principais fatores de risco para a infecção por esse protozoário, devido a imaturidade do sistema imunológico, que acaba favorecendo as infecções (XIAO; HERD, 1994). No entanto, os animais incluídos nas três categorias etárias definidas no presente estudo mostraram-se igualmente suscetíveis à infecção quando se analisou todas as variáveis potencialmente relacionadas à parasitose de forma conjunta.

A positividade para *Cryptosporidium* sp. foi principalmente evidenciada nos equinos PSI dos centros de Treinamento D, seguido pelo A e pelo E. Cabe ressaltar, que a propriedade D é uma das que possuíam no momento do estudo maior número de animais jovens. Este pode ter sido um fator que influenciou em sua casuística apesar desta variável não ter sido diretamente associada à infecção. Já, a propriedade A, apesar de não possuir muitos equinos de reposição jovem tem como histórico, ter sido

um dos maiores núcleos de reprodução de equinos PSI da cidade, possuindo ainda, uma pequena parcela de animais nesta condição. Sabe-se que as éguas com potros ao pé são um dos fatores de risco que favorecem a transmissão e manutenção do protozoário em plantel de equinos, pois as fêmeas acabam atuando como fonte de infecção para os potros que são altamente suscetíveis a infecção (XIAO; HERD, 1994). Além disso, ao conversar com os treinadores no momento da aplicação dos formulários, os mesmos relataram que a água fornecida aos animais na propriedade A se origina de uma nascente onde há criação de ruminantes, e tal fato pode ter contribuído com a contaminação ambiental, pois os ruminantes são considerados os principais reservatórios do protozoário como já foi apontado por Tomazic et al. (2018).

No caso da propriedade E, na qual foram detectados equinos positivos pelo ELISA e pela técnica parasitológica microscópica, no momento da coleta da amostra fecal, havia um plantel de cerca de 22 pequenos ruminantes, compostos por ovinos e caprinos, que eram criados próximos aos galpões dos equinos. Ainda que não tenha sido realizado exames coproparasitológicos desses pequenos ruminantes, assim como descrito para a propriedade A, estes já foram apontados sendo o segundo maior reservatório de *Cryptosporidium* sp., perdendo somente para os bovinos (TOMAZIC et al., 2018). A proximidade de ruminantes como fator de risco para equinos se infectarem por *Cryptosporidium* sp. também foi apontada por Snyder et al. (1978) em potros árabes em propriedade nos Estados Unidos e por Smith et al. (2010) em equinos de diferentes fazendas na Inglaterra e País de Gales. Além disso, Teresópolis, por ser uma cidade da região serrana, possui terrenos bem íngremes, que favorecem a lixiviação e, conseqüentemente a dispersão de parasitos no ambiente, que podem ter contaminado a pista de corrida dos equinos, bem como os seus galpões. Apesar destas condições peculiares em cada propriedade, não pode ser descartado o fato do equino ter sido infectado em seu plantel de origem, quando ainda era um potro, chegando então já parasitado no centro de treinamento. Desta forma, mesmo que recebam anti – helmínticos, os equinos continuarão parasitados com o protozoário, pois estes fármacos não são eficazes para eliminar a infecção por *Cryptosporidium* sp.

Neste estudo a presença de cães e de pequenos ruminantes, como ovinos e caprinos, assim como o tipo de água fornecida aos animais foram associados à infecção quando analisados de forma conjunta na análise multivariada. A presença de outras espécies animais nas propriedades que mantém os equinos parece realmente ter favorecido a infecção dos mesmos na propriedade E, respaldando a discussão previamente descrita, bem como nas outras propriedades incluídas neste estudo nas quais outras espécies animais também foram observadas.

Cabe ressaltar, que na maioria das propriedades incluídas neste estudo era fornecida, para os equinos, água de nascente, que não recebiam nenhum tratamento. Aliás, a cidade de Teresópolis é famosa por sua hidrografia, e por isso a população possui o hábito de consumir água direto de fontes e

nascentes, que muitas das vezes não passam por tratamento. Apesar da água ser considerada de elevada qualidade na cidade pela população local, a mesma não pode ser garantida, e dessa forma, o consumo da água *in natura*, pode ser considerado uma fonte de infecção do parasito, tanto para os equinos, como também dos equinos para outros animais, incluindo os seres humanos. Assim como neste estudo, o consumo de água *in natura* já foi considerado uma variável possivelmente associada à infecção por *Cryptosporidium* sp. para equinos mantidos em propriedades no noroeste de São Paulo (INÁCIO et al., 2017).

No presente estudo, dentre as 35 amostras positivas, somente em oito foi possível caracterizar a espécie de *Cryptosporidium* sp. por meio das técnicas de biologia molecular. Dessas, cinco amostras, também foram detectadas e caracterizadas morfometricamente pela coloração permanente com a solução de safranina. A impregnação da coloração rósea no oocisto pela solução de safranina e a contra-marcação das outras estruturas em tonalidades azuladas a arroxeadas facilitaram a visualização da estrutura morfológicamente compatível com a do oocisto de *Cryptosporidium* sp.. Além disso, esses oocistos foram mensurados a fim de ratificar tais estruturas como pertencente a este gênero mediante a comparação com as medidas previamente relatadas em outros estudos que também pesquisaram o parasito em fezes de equinos. Comparações com a literatura em relação a mensuração ficaram comprometidas, pois, dentre os artigos recuperados que realizaram técnicas coproparasitológicas microscópicas em fezes de equinos poucos relataram mensurações do parasito. De forma geral, os valores mínimo e máximo obtidos dos diâmetros maior (4,14 μm - 4,9 μm) e menor (4,03 μm - 4,63 μm) dos oocistos do presente estudo foram compatíveis com os intervalos (diâmetro menor 3,16 μm - 4,38 μm ; diâmetro maior 3,88 μm - 6,22 μm) relatados em fezes de equinos mantidos em Corporação Militar e CCZ no Rio de Janeiro, e também compatíveis com oocistos (diâmetros 4 μm - 6 μm) corados por Ziehl-Neelsen detectados em fezes de potros na Nova Zelândia (GRINBERG et al., 2009; SOUZA et al., 2009).

Cabe ressaltar, que dentre as oito amostras caracterizadas molecularmente, ao se associar a reação em cadeia da polimerase com o sequenciamento, sete foram identificadas como *Cryptosporidium parvum* incluindo as cinco amostras fecais que também foram diagnosticadas com oocistos do protozoário por meio da coloração permanente com solução safranina. Tal fato, ressaltou que a diferença significativa evidenciada na morfometria dos oocistos das amostras Cry - 266 e Cry - 285, ambas caracterizadas como *C. parvum*, podem-se tratar de diferenças normais no tamanho dos oocistos de *Cryptosporidium* sp. ou até a variações decorrentes do procedimento técnico de coloração.

Pode-se verificar que todos os isolados caracterizados molecularmente foram obtidos de fezes de equinos PSI, pois somente uma amostra fecal de pônei mantido na propriedade F foi positiva no ELISA para *Cryptosporidium* sp., e a mesma não apresentou bandas na eletroforese. É importante

ressaltar, que a baixa positividade dos pôneis em comparação com os equinos PSI incluídos no estudo pode estar relacionado à pequena quantidade de amostras desse grupo de animais. De forma geral, na literatura ainda há uma escassez de estudo com esse grupo de animais. A partir do levantamento da literatura, pode-se recuperar somente três estudos que incluiu esse grupo de equinos sendo os mesmos realizados na Polônia, Península Ibérica e Estados Unidos (COUSO - PÉREZ et al. 2020; MAJEWSKA et al. 1999; WAGNEROVÁ et al. 2016). Esse panorama ressalta a necessidade de se realizar mais estudos com pôneis, para se conhecer a real sensibilidade dos mesmos ao parasito, verificando também se os pôneis podem atuar como reservatório do protozoário, uma vez que esses animais são muito utilizados para recreação e equoterapia de crianças.

Como pode ser observado, no presente estudo somente em oito amostras fecais foi possível caracterizar a espécie de *Cryptosporidium* sp. apesar de inúmeras tentativas, tanto de extração de DNA, quanto da realização da reação em cadeia da polimerase. O baixo sucesso nos resultados das técnicas de biologia molecular geralmente ocorre quando se trabalha com amostras fecais, pois nestas há uma grande quantidade de inibidores, destacando no caso das fezes de equinos as fibras vegetais, associada à baixa quantidade de DNA do parasito. No caso de *Cryptosporidium* sp., este panorama torna-se ainda mais difícil, mediante a rigidez da parede do oocisto, que acaba dificultando a saída dos esporozoítas, com conseqüente liberação do DNA genômico (SILVA, 2004). Ainda assim, a técnica laboratorial de biologia molecular é a única pertinente para caracterizar a espécie do parasito, fato que denotou a importância de sua realização neste estudo.

A predominância de *C. parvum*, espécie com potencial de transmissão zoonótico, nas amostras fecais dos equinos positivas e caracterizadas molecularmente já era esperada, uma vez que esta tem sido uma das principais espécies identificadas em fezes de equinos pela análise parcial do DNA do gen 18S RNAr (TOMAZIC et al., 2018). Essa caracterização ainda foi confirmada pela análise parcial do DNA do gen da gp60. A partir da análise filogenética e do alinhamento das sequências nucleotídicas obtidas desse último gen foi possível verificar que todas as sequências obtidas se agruparam dentro do mesmo *cluster* de sequências nucleotídicas de *C. parvum* de equinos mantidos em São Paulo, bem como de equinos mantidos em propriedades nos Estados Unidos, Itália e Argélia, sendo todas classificadas como *Cryptosporidium parvum* IIa. A classificação da família foi possível uma vez que em todas as sequências foi possível identificar a região conservada utilizada para genotipar o protozoário (GALUPPI et al., 2015; INÁCIO et al., 2017; LAATAMNA et al., 2015; WAGNEROVÁ et al., 2016). Sabe-se que a família IIa, tem como característica ser bastante adaptada aos animais, principalmente aos ruminantes, sendo que as rotas de transmissão zoonótica dos isolados desta família geralmente ocorrem dos animais para os seres humanos (FENG et al., 2018). Dentro desse contexto foi possível caracterizar genotipicamente, de forma completa, o isolado 266 como sendo IIaA15G2R1. As

demais sequências não puderam ser completamente genotipadas, pois não apresentaram a região que corresponde em cerca de 50 há 150 nucleotídeos após o peptídeo sinal apta a interpretação.

Assim como no presente estudo, o genótipo IIaA15G2R1 também já foi identificado em fezes de equinos na Itália, Península Ibérica, República Tcheca e Polônia, Estados Unidos, bem como em potros em São Paulo (COUSO-PÉREZ et al. 2020; INÁCIO et al., 2017; PIVA et al., 2016; WAGNEROVÁ et al., 2015; WAGNEROVÁ et al., 2016). A detecção do genótipo IIaA15G2R1 na amostra fecal do equino de Teresópolis, Rio de Janeiro, ressalta a importância desse estudo no âmbito da saúde única, pois esse genótipo vem sendo considerado como o de maior potencial zoonótico em relação aos demais genótipos de *C. parvum*, pois já foi identificado em vários animais em diferentes países (FENG et al., 2018).

Além das sequências compatíveis com *C. parvum*, em uma amostra positiva somente no ELISA, bem como na biologia molecular foi identificada sequência nucleotídica compatível com *Cryptosporidium felis*. Cabe ressaltar que *C. felis* foi identificado em uma amostra coletada na propriedade A, onde gatos domésticos eram vistos vagando livremente. De forma geral, dentre os artigos recuperados na literatura, até hoje *C. felis* só havia sido relatado em duas amostras fecais de equinos em Taiwan por Guo et al. (2014), sendo este o primeiro isolado de *C. felis* em amostras fecais de equinos no Brasil. Sabe-se que *C. felis* infecta principalmente os gatos, mas assim como *Cryptosporidium meleagridis* que infecta as aves, *C. felis* também vem sendo relatada infectando os seres humanos, ressaltando a sua relevância em saúde pública (CACCIÒ et al., 2002).

Desta forma é fundamental, controlar e evitar a presença de outras espécies animais nos recintos dos equinos a fim de evitar a transmissão de parasitos zoonóticos, bem como incentivar que as pessoas que manipulam esses animais incluindo profissionais e as crianças que utilizam os pôneis como lazer, adotem sempre as práticas de higiene pessoal, destacando a lavagem das mãos após o manuseio dos mesmos. Também é fundamental incentivar as práticas de monitoramento das parasitoses gastrointestinais nos equinos, incluindo o diagnóstico de *Cryptosporidium* sp., já que esses animais são anatomicamente mais suscetíveis e sensíveis as cólicas gastrointestinais, podendo ir a óbito por conta desta síndrome. Além disso, a liberação de oocistos em fezes de equinos potencialmente assintomáticos, ressalta a possibilidade dos mesmos estarem atuando também como reservatórios do protozoário, pois eliminam um grande volume fecal associado ao fato de Teresópolis, RJ ser uma cidade muito famosa por possuir um dos maiores núcleos de criação de equinos do Brasil, principalmente de Centros de Treinamento de Puro Sangue Inglês.

7. CONCLUSÕES

- A frequência geral de *Cryptosporidium* sp. detectada nos equinos mantidos em diferentes propriedades de Teresópolis, Rio de Janeiro, foi de 11,1% ao se associar diferentes técnicas laboratoriais, sendo evidenciada uma maior positividade nas fezes dos equinos da raça Puro Sangue Inglês do que dos pôneis;
- O ELISA apresentou maior frequência no diagnóstico do parasito, sendo identificado 9,5% das amostras positivas, do que a coloração permanente, no qual foi detectado 1,6% das amostras fecais positivas para o protozoário;
- Dentre as amostras caracterizadas molecularmente, uma foi identificada como *Cryptosporidium felis*, e sete como *Cryptosporidium parvum*, sendo caracterizado o genótipo IIaA15G2R1 completamente em um isolado de equino Puro Sangue Inglês;
- Pode-se verificar que a presença de cães e pequenos ruminantes nas propriedades que criavam equinos em Teresópolis, e o fornecimento de água da nascente foram fatores de risco diretamente associados à infecção por *Cryptosporidium* sp. nos equinos dessas propriedades.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S.A.; KARANIS, P. An overview of methods/techniques for the detection of *Cryptosporidium* in food samples. *Parasitology Research*, v. 117, p. 629–653, 2018.

BARBOSA, A.D.S.; PINHEIRO, J.L.; DOS SANTOS, C.R.; DE LIMA, C.S.C.C.; DIB, L.V.; ECHARTE, G.V.; AUGUSTO, A.M.; BASTOS, A.C.M.P.; ANTUNES UCHÔA, C.M.; BASTOS, O.M.P.; SANTOS, F.N.; FONSECA, A.B.M.; AMENDOEIRA, M.R.R. Gastrointestinal Parasites in Captive Animals at the Rio de Janeiro Zoo. *Acta Parasitologica*, v. 65, n. 1, p. 237-249, 2020.

BAXBY, D.; BLUNDELL, N.; HART, C.A. The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. *Journal Hygiene*, v. 93, n. 2, p. 317-323, 1984.

BJORNEBY, J.M.; LEACH, D.R.; PERRYMAN, L.E. Persistent cryptosporidiosis in horses with severe combined immunodeficiency. *Infection and Immunity*, v. 59, n.10, p. 3823-3826, 1991.

BOROWSKI, H.; CLODE, P.L.; THOMPSON, R.C. Active invasion and/or encapsulation? A reappraisal of host-cell parasitism by *Cryptosporidium*. *Trends Parasitology*, v. 24, n. 11, p. 509-16, 2008.

BOROWSKI, H.; THOMPSON, R.; ARMSTRONG, T.; CLODE, P. Morphological characterization of *Cryptosporidium parvum* life-cycle stages in an in vitro model system. *Parasitology*, v. 137, n. 1, p. 13-26, 2010.

BOUZID, M.; HUNTER, P. R.; CHALMERS, R. M.; TYLER, K. M. *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 26, n. 1, p. 115-134, 2013.

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. 24, n. 174(1-2), p.139-44, 2010.

CAFFARA, M.; PIVA, S.; PALLAVER, F.; IACONO, E.; GALUPPI, R. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from foals in Italy. *Veterinary Journal*, v.198, n.2, p.531-533, 2013.

CACCIÒ, S.; PINTER, E.; FANTINI R.; MEZZAROMA, I.; POZIO, E. Human infection with *Cryptosporidium felis*: case report and literature review. *Emerging Infectious Disease*, v.8, n. 1, p. 85-6, 2002.

CHALMERS, R.M.; THOMAS, A.L.; BUTLER, B.A.; MOREL, M.C. Identification of *Cryptosporidium parvum* genotype 2 in domestic horses. *Veterinary Record*, v.156, n.2, p. 49-50, 2005.

ČONDLOVÁ, Š.; HORČIČKOVÁ, M.; SAK, B.; KVĚTOŇOVÁ, D.; HLÁSKOVÁ, L.; KONEČNÝ, R.; STANKO, M.; MCEVOY, J.; KVÁČ, M. *Cryptosporidium apodemi* sp. n. and *Cryptosporidium ditrichi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in *Apodemus* spp. *European Journal of Protistology*, v. 63, p. 1-12, 2018.

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

CIDADE-BRASIL. Município de Teresópolis, 2020. Disponível em: <https://www.cidade-brasil.com.br/municipio-teresopolis.html>. Acessado em: 04 de outubro de 2020.

CLODE, P. L.; KOH, W. H.; ANDREW THOMPSON, R.C. Life without a Host Cell: What is *Cryptosporidium*? *Trends in Parasitology*, v.31, n.12, p.614 - 624, 2015.

COLE, D.J.; SNOWDEN, K.; COHEN, N.D.; SMITH, R. Detection of *Cryptosporidium parvum* in horses: thresholds of acid-fast stain, immunofluorescence assay, and flow cytometry. *Journal Clinical Microbiology*, v.37, n.2, p. 457-460, 1999.

COUSO-PÉREZ, S.; DE LIMIA, F.B.; ARES-MAZÁS, E.; GÓMEZ-COUSO, H. First report of zoonotic *Cryptosporidium parvum* GP60 subtypes IIAA15G2R1 and IIAA16G3R1 in wild ponies from the northern Iberian Peninsula. *Parasitology Research*. v.119, n.1, p.249-254, 2020.

CUNHA, F S.; PERALTA, J.M.; PERALTA, R.H.S. New insights into the detection and molecular characterization of *Cryptosporidium* with emphasis in Brazilian studies: a review. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.61, 2019.

DEL COCO, V. F.; CORDOBA, M. A.; BASUALDO, J. A. Cryptosporidiosis: na emerging zoonosis. *Revista Argentina de Microbiología*, v.41, n.3, p.185-196, 2009.

DENG, L.; LI, W.; ZHONG, Z.; GONG, C.; CAO, X.; SONG, Y.; WANG, W.; HUANG, X.; LIU, X.; HU, Y.; FU, H.; HE, M.; WANG, Y.; ZHANG, Y.; WU, K.; PENG, G. Occurrence and Genetic Characteristics of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium andersoni* in Horses from Southwestern China. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v.64, n. 5, p. 716-720, 2017.

DILLINGHAM, R.A.; LIMA, A.A.; GUERRANT, R.L. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes Infection*, v.4; n.10, p. 1059-66, 2002.

FAYER, R.; GUIDRY, A.; BLAGBURN, B.L. Immunotherapeutic efficacy of bovine colostral immunoglobulins from a hyperimmunized cow against cryptosporidiosis in neonatal mice. *Infection and Immunity*, v.58, n. 9, p. 2962-2965, 1990.

FENG, Y.; RYAN, U.M.; XIAO, L. Genetic Diversity and Population Structure of *Cryptosporidium*. *Trends in Parasitology*, v.34, n. 11, p. 997-1011, 2018.

FREDERICK, J.; GIGUÈRE, S.; SANCHEZ, L.C. Infectious agents detected in the feces of diarrheic foals: a retrospective study of 233 cases (2003-2008). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.23, p. 1254-60, 2009.

FUJI, K.Y.; DITTRICHI, J.R.; CASTRO, E.A.; ALMEIDA, J.C. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em dois centros de treinamento de equinos de Curitiba, Paraná. *Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science*, v.51, n.2, p. 118 – 121, 2014.

GALUPPI, R.; PIVA, S.; CASTAGNETTI, C.; IACONO, E.; TANEL, S.; PALLAVER, F.; FIORAVANTI, M.L.; ZANONI, R.G.; TAMPIERI, M.P.; CAFFARA, M. Epidemiological survey on *Cryptosporidium* in an Equine Perinatology Unit. *Veterinary Parasitology*, v.30, n.210 (1-2), p.10-8, 2015.

GAJADHAR, A.A.; CARON, J.P.; ALLEN, J.R. Cryptosporidiosis in two foals. *Canadian Veterinary Journal*, v.26, 26(4):132-134, 1985.

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.

GERACE, E.; LO PRESTI, V.D.M.; BIONDO, C. “*Cryptosporidium* Infection: Epidemiology, Pathogenesis, and Differential Diagnosis.” *European journal of microbiology & immunology*, v. 9, n. 4, p. 119-123, 2019.

GRINBERG, A.; POMROY, W.E.; CARSLAKE, H.B.; SHI, Y.; GIBSON, I.R.; DRAYTON B.M. A study of neonatal cryptosporidiosis of foals in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, v.57, n.5, p.284-9, 2009.

GOMES, A.D.; BARRETA, C.; ZIEGLER, D.P.; SAUSEN, L.; STOEVEER, N.; SANGIONI, L.A.; VOGEL, F.S.F.; MONTEIRO, S.G.; ZANELLA, A. Prevalência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. em equinos estabulados no Jockey Club de Santa Maria – RS, Brasil. *Ciência Rural*, v.38, n.9, p.2662-2665, 2008.

GOUY, M.; GUINDON, S.; GASCUEL, O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution*, v.27, n.2, p.221-4, 2010.

GUO, P.F.; CHEN, T.T.; TSAIHONG, J.C.; HO, G.D.; CHENG, P.C.; TSENG, Y.C.; PENG S.Y. Prevalence and species identification of *Cryptosporidium* from fecal samples of horses in Taiwan. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, v.45, n.1, p.6-12, 2014.

HAJDUSEK, O.; DITRICH, O.; SLAPETA, J. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, v.122, n. 3, p.183-92, 2004

HIJAWI, N.; MUKBEL, R.; YANG, R.; RYAN, U. Genetic characterization of *Cryptosporidium* in animal and human isolates from Jordan. *Veterinary Parasitology*, v.15; n.228, p.116-120, 2016.

HOLUBOVÁ, N.; SAK, B.; HORCICKOVÁ, M.; HLÁSKOVÁ, L.; KVETONOVÁ, D.; MENCHACA, S.; MCEVOY, J.; KVÁC, M. *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. *Parasitology Research*, v. 115, n. 6, p. 2243-2251, 2016.

HORČIČKOVÁ, M.; ČONDLOVÁ, Š.; HOLUBOVÁ, N.; SAK, B.; KVĚTOŇOVÁ, D.; HLÁSKOVÁ, L.; KONEČNÝ, R.; SEDLÁČEK, F.; CLARK, M.; GIDDINGS, C.; MCEVOY, J.; KVÁČ, M. Diversity of *Cryptosporidium* in common voles and description of *Cryptosporidium alticolis* sp. n. and *Cryptosporidium microti* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). *Parasitology*, v.146, n. 2, p. 220-233, 2019.

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

HUBER, F.; BONFIM, T.C.; GOMES, R.S.; Comparação da eficiência da técnica de sedimentação pelo formaldeído-éter e da técnica de centrífug-flutuação modificada na detecção de cistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* sp. em amostras fecais de bezerros. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 12, p 135-137, 2003.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Teresópolis, 2017. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rj/teresopolis/panorama>. Acessado em: 04 de outubro de 2020.

INÁCIO, S.V.; BRITO, R.L.L.; ZUCATTO, A.S.; COELHO, W.M.D.; AQUINO, M.C.C.; AGUIRRE, A.A.R.; PERRI, S.H.V.; MEIRELES, M.V.; BRESCIANI, K.D.S. *Cryptosporidium* spp. infection in mares and foals of the northwest region of São Paulo State, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 21, n. 4, p. 355-358, 2012.

INÁCIO, S.V.; WIDMER, G.; LEMOS, R.L.L.; ZUCATTO, A.S.; AQUINO, M.C.C.; OLIVEIRA, B.C.; NAKAMURA, A.A.; NETO, L.S.; CARVALHO, J.G.; GOMES, J.F.; MEIRELES, M.V.; BRESCIANI, K.D.S. First description of *Cryptosporidium hominis* GP60 genotype Ika2061 and *Cryptosporidium parvum* GP60 genotypes IIaA18G3R1 and IIaA1562R1 in foals in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.233, p.48-51, 2017.

INÁCIO, S.V.; WIDMER, G.; OLIVEIRA, B.C.M.; GOMES, J.F.; FERRARI, E.D.; CORBUCCI, F.S.; NAGATA, W.B.; BRESCIANI, KDS. (2018) Review: Equine cryptosporidiosis – cosmopolitan occurrence? *Animal Husbandry, Dairy and Veterinary Science*, v.2, n.4, p.1-7, 2018.

JEX, A.R.; SMITH, H.V.; MONIS, P.T.; CAMPBELL, B.E.; GASSER, R.B. *Cryptosporidium*-biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotechnology Advances*, v. 26, n. 4, p. 304-17, 2008.

JEZKOVA, J.; HORCICKOVA, M.; HLASKOVA, L.; SAK, B.; KVETONOVA, D.; NOVAK, J.; HOFMANNOVA, L.; MCEVOY, J.; KVAC, M. *Cryptosporidium testudinis* sp. n., *Cryptosporidium ducismarci* Traversa, 2010 and *Cryptosporidium tortoise genotype III* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in tortoises. *Folia Parasitologica*, v.14; n. 63, p. 2 – 10, 2016.

JIAN, F.; LIU, A.; WANG, R.; ZHANG, S.; QI, M.; ZHAO, W.; SHI, Y.; WANG, J.; WEI, J.; ZHANG, L.; XIAO, L. Common occurrence of *Cryptosporidium hominis* in horses and donkeys. *Infection, Genetics, Evolution*, v. 43, p. 261-266, 2016.

JOHNSON, E.; ATWILL, E.R.; FILKINS, M.E.; KALUSH, J. The prevalence of shedding of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. based on a single fecal sample collection from each of 91 horses used for backcountry recreation. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 9, n.1, p. 56-60, 1997.

KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *Journal of Water and Health*, v. 5, n. 1, p. 1-38, 2007.

KOSTOPOULOU, D.; CASAERT, S.; TZANIDAKIS, N.; DOORN, D.; VAN DEMELER, J., VON SAMSON-HIMMELSTJERMA, G.; SARATSI, A.; VOUTZOURAKIS, N.; EHSAN, A.; DOORNAET, T.; LOOIJEN, M.; WILDE, N.D.; SOTIRAKI, S.; CLAEREBOU, E.; GEURDEN T. The occurrence and genetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species in foals in Belgium, The Netherlands, Germany and Greece. *Veterinary Parasitology*, v. 211, p. 170-174, 2015.

KVÁČ, M.; HAVRDOVÁ, N.; HLÁSKOVÁ, L.; DANKOVÁ, T.; KANDERA, J.; JEZKOVÁ, J.; VÍTOVEC, J.; SAK, B.; ORTEGA, Y.; XIAO, L.; MODRÝ, D.; CHELLADURA, J. J. R. J.; PRANTLOVÁ, V.; MCEVOY, J. *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): molecular and biological evidence of cryptic species within gastric *Cryptosporidium* of mammals. *Journal Pone*, v. 11, n. 1, p. 1-24, 2016.

KVÁČ, M.; VLNATÁ, G.; JEŽKOVÁ, J.; HORČIČKOVÁ, M.; KONEČNÝ, R.; HLÁSKOVÁ, L.; MCEVOY, J.; SAK, B. *Cryptosporidium occultus* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in rats. *European Journal of Protistology*, v. 63, p. 96-104, 2018.

LAATAMNA, A.E.; WAGNEROVÁ, P.; SAK, B.; KVĚTOŇOVÁ, D.; AISSI, M.; ROST, M.; KVÁČ, M. Equine cryptosporidial infection associated with *Cryptosporidium hedgehog* genotype in Algeria. *Veterinary Parasitology*, v. 197, n. 350-353, 2013.

LAATAMNA, A.E.; WAGNEROVÁ, P.; SAK, B.; KVĚTOŇOVÁ, D.; XIAO, L.; ROST, M.; MCEVOY, J.; SAADI, A.R.; AISSI, M.; KVÁČ, M. *Microsporidia* and *Cryptosporidium* in horses and donkeys in Algeria: detection of a novel *Cryptosporidium hominis* subtype family (Ik) in a horse. *Veterinary Parasitology*, v. 15, n. 208(3-4), p.135-42, 2015.

LENDNER, M.; DAUGSCHIES, A. *Cryptosporidium* infections: molecular advances. *Parasitology*, v.141, p. 1511–32, 2014.

LIU, A.; ZHANG, J.; ZHAO, J.; ZHAO, W.; WANG, R.; ZHANG, L. The first report of *Cryptosporidium andersoni* in horses with diarrhea and multilocus subtype analysis. *Parasites & Vectors*, v. 8, n. 483, p. 1 – 4, 2015.

LUTZ, A. O. *Schistosomum mansoni* e a shistosomatose segundo observações feitas no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.11, n. 1, p. 121-155, 1919.

MAJEWSKA, A.C.; WERNER, A.; SULIMA, P.; LUTY, T. Survey on equine cryptosporidiosis in Poland and the possibility of zoonotic transmission. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, v.6, n. 2, p. 161-5, 1999.

MAJEWSKA, A.C.; SOLARCZYK, P.; TAMANG, L.; GRACZYK, T.K. Equine *Cryptosporidium parvum* infections in western Poland. *Parasitology Research*, v. 93, n. 4, p. 274-8, 2004.

MCKENZIE, D.M.; DIFFAY, B.C. Diarrhoea associated with cryptosporidial oocyst shedding in a quarterhorse stallion. *Australian Veterinary Journal*, v.78, n.1, p.27-8, 2000.

NETHERWOOD, T.; WOOD, J.L.; TOWNSEND, H.G.; MUMFORD, J.A.; CHANTER, N. Foal diarrhoea between 1991 and 1994 in the United Kingdom associated with *Clostridium perfringens*, rotavirus, *Strongyloides westeri* and *Cryptosporidium* spp. *Epidemiology and Infection*, v.117, n.2, p.375-383, 1996.

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

OLSON, M.E.; THORLAKSON, C.L.; DESELLIERS, L.; MORCK, D.W.; MCALLISTER, T.A. *Giardia* and *Cryptosporidium* in Canadian farm animals. *Veterinary Parasitology*, v.68, n.4, p.375 – 381, 1997.

PERRUCCI, S.; BUGGIANI, C.; SGORBINI, M.; CERCHIAI, I.; OTRANTO, D.; TRAVERSA, D. *Cryptosporidium parvum* infection in a mare and her foal with foal heat diarrhoea. *Veterinary Parasitology*, v. 15, n.182 (2-4), p. 333-6, 2011.

PIVA, S.; CAFFARA, M.; PASQUALI, F.; CASTAGNETTI, C.; IACONO, E.; MASSELLA, E.; ZANONI, R.G.; GALUPPI, R. Detection and quantification of *Cryptosporidium* oocysts in environmental surfaces of an Equine Perinatology Unit. *Preventive Veterinary Medicine*, v.131, p. 67-74, 2016.

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

QI, M; ZHOU, H; WANG, H; WANG, R; XIAO, L; ARROWOOD, MJ; LI, J; ZHANG, L. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in grazing horses from Xinjiang, China. *Veterinary Parasitology*, v.30, n. 209(3-4), p.169-72, 2015.

REINEMEYER, C.R.; KLINE, R.C.; STAUFFER, G.D. Absence of *Cryptosporidium* oocysts in faeces of neonatal foals. *Equine Veterinary Journal*, v.16, n. 3, p. 217-8, 1984.

RYAN, U.; XIAO, L.; READ, C.; ZHOU, L.; LAL, A. A.; PAVLASEK, I. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Applied and environmental microbiology*, v. 69, n.7, p. 4302–4307, 2003.

RYAN, U.; PAPANINI, A.; MONIS, P.; HIJJAWI, N. Its official-*Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry? *Water Research*, v. 105, p. 305-313, 2016.

SANTÍN, M. Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals. *New Zealand Veterinary Journal*, v. 61, n. 1, p. 1-10, 2013.

SCHMIDEK, A. Otimizando o desempenho e o bem-estar de equinos usados em atividades esportivas *Revista Brasileira de Zootecias - Etologia Aplicada e Bem-estar Animal*, v. 19, n. 2, p. 227 – 247, 2018.

SCHAEFER, R.; CRUZ, L.; CASSOU, F.; CAMPOS, D.M. Incidência de lesões gástricas em cavalos PSI de corrida em treinamento comparadas a cavalos de haras. *Revista Acadêmica Ciência Animal*, v.4, n.4, p. 65-70, 2006.

SILVA, S. Caracterização morfométrica e avaliação da heterogeneidade molecular em isolados clínicos de *Cryptosporidium* sp. de grupos populacionais no município do Rio de Janeiro. 69 f. Dissertação (Biologia Parasitária), Fundação Oswaldo Cruz, 2004.

SHEATHER, A. L. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technic. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, v. 36, p. 266-275, 1923.

SLAPETA, J. Criptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: A thirty colour rainbow? *International Journal for Parasitology*, v. 43, n. 12-13, p. 1-14, 2013.

SLOVIS, N.M.; ELAM, J.; ESTRADA, M.; LEUTENEGGER, C.M. Infectious agents associated with diarrhea in neonatal foals in central Kentucky: A comprehensive molecular study. *Equine Veterinary Journal*, v.46, p. 311-316, 2014.

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

SMITH, H.V.; CACCIÒ, S.M.; COOK N.; NICHOLS R.A.; TAIT A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Veterinary Parasitology*, v. 149, n. 1-2, p. 29-40, 2007.

SMITH, R.P.; CHALMERS, R.M.; MUELLER-DOBLIES, D.; CLIFTON-HADLEY, F.A.; ELWIN, K.; WATKINS, J.; PAIBA, G.A.; HADFIELD, S.J.; GILES, M. Investigation of farms linked to human patients with cryptosporidiosis in England and Wales. *Preventive Veterinary Medicine*, v.94(1-2), p.9-17, 2010.

SNYDER, S.P.; ENGLAND, J.J.; MCCHESENEY, A.E. Cryptosporidiosis in immunodeficient Arabian foals. *Veterinary Pathology*, v.15, n.1, p.12-7, 1978.

STURDEE, A.P.; BODLEY-TICKELL, A.T.; ARCHER, A.; CHALMERS, RM. Long-term study of *Cryptosporidium* prevalence on a lowland farm in the United Kingdom. *Veterinary Parasitology*, v.116, n.2, p. 97-113, 2003.

SOLO-GABRIELE, H.; NEUMEISTER, S. US outbreaks of criptosporidiosis. *Journal of the American Water Works Association*, v.88, 1996.

SOUZA, P.N.B.; BOMFIM, T.C.; ABBOUD, L.C.; GOMES, R.S. Natural infection by *Cryptosporidium* sp., *Giardia* sp. and *Eimeria leuckarti* in three groups of equines with different handlings in Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 160, n. 3-4, p. 327-333, 2009.

TZIPORI, S.; WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection*, v. 4, n.10, p.1047-58, 2002.

TOMAZIC, ML.; GARRO, C.; SCHNITTGER L. *Cryptosporidium*. In: FLORIN - CHRISTENSEN M; SCHNITTGER L. Parasitic Protozoa of farm animals and pets. Ed. Springer International Publishing, 2018, p. 11 – 54.

TOSCAN, G.; PEREIRA, R.C.F.; VOGEL, F.S.F; SAGIONI, L.A. *Cryptosporidium* spp. in traction horses in Santa Maria, RS, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 62, n.1, p. 211- 213, 2010.

VANATHY, K.; PARIJA, S.C.; MANDAL, J.; HAMIDE, A.; KRISHNAMURTHY, S. Cryptosporidiosis: A mini review. *Tropical Parasitology*, v. 7, n.2, p. 72 – 80, 2017.

VERONESI, F.; PASSAMONTI, F.; CACCIÒ, S.; DIAFERIA, M.; PIERGILI FIORETTI, D. Epidemiological survey on equine *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in Italy and molecular characterization of isolates. *Zoonoses Public Health*, v. 57(7-8), p. 510-7, 2010

WAGNEROVÁ, P.; SAK, B.; MCEVOY, J.; ROST, M.; MATYSIAK, A.P.; JEŽKOVÁ, J.; KVÁČ, M. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. including novel identification of the *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium tyzzeri* in horses in the Czech Republic and Poland. *Parasitology Research*, v.114, n.4, p.1619-24, 2015.

WAGNEROVÁ, P.; SAK, B.; MCEVOY, J.; ROST, M.; SHERWOOD, D.; HOLCOMB, K.; KVÁČ, M. *Cryptosporidium parvum* and *Enterocytozoon bieneusi* in American Mustangs and Chincoteague ponies. *Experimental Parasitology*, v.162, p.24-27, 2016.

WEBER, R.; BRYAN, R.T.; BISHOP, H.S.; WAHLQUIST, S.P.; SULLIVAN, J.J.; JURANEK, D.D. Threshold of detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool specimens: evidence for low sensitivity of current diagnostic methods. *Journal Clinical Microbiology*, v.29, n.7, p. 1323-7, 1991.

XIAO, L.; HERD, R.P. Review of equine *Cryptosporidium* infection. *Equine Veterinary Journal*, v. 26, n.1, p. 9-13, 1994.

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, 2000.

XIAO, L.; FENG, Y. Molecular epidemiologic tools for waterborne pathogens *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. *Food and waterborne Parasitology*, v. 8-9, p. 14 – 32, 2017.

XIAO, L.; HLAVSA, M. C.; YODER, J.; EWERS, C.; DEAREN, T.; YANG, W.; NETT, R.; HARRIS, S.; BREND, S. M.; HARRIS, M.; ONISCHUK, L.; VALDERRAMA, A. L.; COSGROVE, S.; XAVIER, K.; HALL, N.; ROMERO, S.; YOUNG, S.; JOHNSTON, S. P.; ARROWOOD, M.; ROY, S.; BEACH, M. J. Subtype analysis of *Cryptosporidium* specimens from sporadic cases in Colorado, Idaho, New Mexico, and Iowa in 2007: widespread occurrence of one *Cryptosporidium hominis* subtype and case history of an infection with the *Cryptosporidium horse* genotype. *Journal of clinical microbiology*, v. 47, n. 9, p. 3017–3020, 2009.

ZAHEDI, A.; PAPANINI, A.; JIAN, F.; ROBERTSON, I.; RYAN, U. Public health significance of zoonotic *Cryptosporidium* species in wildlife: Critical insights into better drinking water management. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, v. 5, n. 1, p. 88-109, 2016.

ZAHEDI, A.; DURMIC, Z.; GOFTON, A.W.; KUEH, S.; AUSTEN, J.; LAWSON, M.; CALLAHAN, L.; JARDINE, J.; RYAN, U. *Cryptosporidium homai* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporididae) from the guinea pig (*Cavia porcellus*). *Veterinary Parasitology*, v. 15; p. 245:92-101, 2017.

ANEXO



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Pesquisa de parasitos gastrointestinais em equinos com enfoque na Raça Puro Sangue Inglês mantidos em propriedades em Teresópolis, Rio de Janeiro, Brasil", protocolada sob o CEUA nº 6742290519 (ID 000505), sob a responsabilidade de **Alyne da Silva Barbosa** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Fluminense (CEUA/UFF) na reunião de 27/06/2019.

We certify that the proposal "Research on gastrointestinal parasites in horses with focus on Thoroughbred Breed kept at properties in Teresópolis, Rio de Janeiro, Brazil", utilizing 800 Equines (males and females), protocol number CEUA 6742290519 (ID 000505), under the responsibility of **Alyne da Silva Barbosa** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University Fluminense (CEUA/UFF) in the meeting of 06/27/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **08/2019** a **03/2022** Área: **Parasitologia**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Equídeos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **01 a 9 anos**

N: **800**

Linhagem: **Puro sangue e outras raças**

Peso: **50 a 900 kg**

Local do experimento: O experimento será realizado nos Centros de Treinamento localizado no município de Teresópolis, onde os animais já são rotineiramente mantidos. A coleta da amostra fecal será realizada nos próprios Centros, com os animais mantidos em bretes de contenção.

Niterói, 11 de outubro de 2020

Profª Carla Eponina
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Fluminense

Profª Caroline de Souza Barros
Vice-Coodenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Fluminense