



Deteção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em crianças atendidas no Laboratório do Hospital Infantil da cidade de Lages, SC

Detection of Cryptosporidium spp. in children seen at the Children's Hospital Laboratory in the city of Lages, SC

Alisson Andrade Arruda¹; Rosiléia Marinho de Quadros²; Rafael de Lima Miguel²; Luiz Claudio Miletti³; Carlos José Raupp Ramos⁴

Resumo: *Cryptosporidium* spp. acomete a borda das microvilosidades intestinais levando a um quadro clínico caracterizado por diarreia, desidratação, dores abdominais, vômito e febre principalmente em indivíduos imunocomprometidos como pacientes HIV e crianças. A criptosporidiose é uma doença emergente, sendo *Cryptosporidium* spp. transmitido pelo contato direto entre pessoa-pessoa, animal-pessoa ou ainda de forma indireta pelo consumo de água e alimentos contaminados. O objetivo do trabalho foi detectar a presença de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de crianças atendidas pelo Laboratório do Hospital Infantil da cidade de Lages, Santa Catarina. Das 76 amostras analisadas pela técnica de Ziehl Neelsen, 18,42% (14/76) foram positivas. A positividade para oocistos de *Cryptosporidium* spp. em relação ao sexo, 14,28% (6/42) foram diagnosticados em meninos e 23,52% (8/34) em meninas; já para faixa etária a idade de 7 anos foi a mais prevalente. Das 14 amostras diagnosticadas pelo Ziehl Neelsen, 64,29% (9/14) foram positivas para *Cryptosporidium* spp. pelo diagnóstico molecular através da técnica da PCR. Em virtude da criptosporidiose ocorrer principalmente em crianças, é necessário fazer o diagnóstico seguro e eficaz.

Palavras-Chave: criptosporidiose; diagnóstico; Ziehl Neelsen; enteroparasitose.

Abstract: The *Cryptosporidium* spp. affects the edge of the intestinal microvilli leading to a clinical condition characterized by diarrhea, dehydration, abdominal pain, vomiting and fever, mainly in immunocompromised individuals such as HIV patients and children. Cryptosporidiosis is an emerging disease and *Cryptosporidium* spp. transmitted by direct contact between people-person, animal-person, or indirectly by consuming contaminated water and food. The objective was to detect *Cryptosporidium* spp. in stool samples from children in the Children's Hospital Laboratory of Lages, Santa Catarina. Of the 76 samples analyzed by the Ziehl Neelsen technique, 18.42% (14/76) were positive. The positivity for *Cryptosporidium* spp. was 14.28% (6/42) in boys and 23.52% (8/34) in girls; being that, seven years old (three samples) was more prevalent. Of the 14 samples diagnosed by Ziehl Neelsen, 64.29% (9/14) were positive for *Cryptosporidium* spp. using the PCR technique. As the disease occurs mainly in children, it is necessary to guarantee an accurate diagnosis.

Key words: cryptosporidiosis; diagnosis; Ziehl Neelsen; enteroparasitosis.

<http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20200045>

*Author for correspondence: E-mail: carlos.ramos@uffs.edu.br

Received for publication 10.01.2020; approved on 30.012.2020

1. Biomédico
2. Prof. Laboratório de Parasitologia do curso de Biomedicina – UNIPLAC (Universidade do Planalto Catarinense)
3. Prof. LABHEV - CAV-UDESC – (Laboratório de Hemoparasitos e Vetores - Centro de Ciências Agro Veterinárias-Universidade do Estado de Santa Catarina)

4. Prof. LAMIP - UFFS – (Laboratório de Microbiologia, Ictioparasitologia, Parasitologia e Patologia de Organismos Aquáticos Cultiváveis - Universidade Federal da Fronteira Sul - carlos.ramos@uffs.edu.br)

Introdução

Cryptosporidium spp. é um parasito intracelular obrigatório, que produz através de reprodução sexuada oocistos que são eliminados pelas fezes de seus hospedeiros, desenvolvendo quadros de diarreia, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (FAYER et al., 2000). Em pacientes normais as manifestações são pouco perceptíveis, porém em crianças e pacientes HIV, o parasito se prolifera intensamente levando a característica clínica da criptosporidiose (LIMA, 2005).

Em relação às espécies de *Cryptosporidium* spp. que infectam humanos, sete espécies do protozoário são descritas: *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. suis* e *C. muris* (PEREIRA et al., 2009). *Cryptosporidium hominis* é mais comum na América do Norte, América do Sul, Austrália e África, enquanto *C. parvum* é mais prevalente na Europa (SAVIOLI et al., 2006).

A criptosporidiose é considerada mundialmente uma zoonose que pode afetar o homem e um grande número de animais domésticos e silvestres. Entretanto, a infecção em humanos ocorre

por caráter antroponótico (entre humanos) ou zoonótico (animal para o homem ou vice-versa) (BORGES et al., 2007). Em relação à transmissão zoonótica, normalmente é associada a baixas práticas de higiene quando em contato com fezes, leite *in natura*, água ou contato com animais infectados, considerados importantes reservatórios de contaminação humana e ambiental (FAYER et al., 2000). Ainda a protozoose pode ser transmitida por forma indireta pelo consumo de água e alimentos contaminados (DUPONT et al., 1995).

Para Fayer (1997), a transmissão do *Cryptosporidium* spp. através do meio ambiente é importante, especialmente, após a ocorrência de numerosos surtos associados ao consumo ou contato com águas contaminadas. Alguns fatores biológicos e características próprias do *Cryptosporidium* spp. facilitam a transmissão da doença através da água onde uma das principais características biológicas deste protozoário é a acentuada resistência dos oocistos à desinfecção principalmente por cloro e outros desinfetantes químicos empregados nos processos de tratamento da água (QUINTERO-BETANCOURT & ROSE,

2004).

Como a diarreia é a principal manifestação clínica, o diagnóstico clínico não permite uma diferenciação específica do agente causal. Nesse caso, a confirmação laboratorial constitui uma ferramenta imprescindível para estabelecer o diagnóstico diferencial, na qual requer o uso de técnicas específicas de concentração e coloração (GRIFFITHS, 1998).

Para Chiuchetta (2010), várias técnicas de diagnóstico são descritas, como técnicas de concentração, coloração e análise microscópicas, ainda métodos imunológicos e técnicas moleculares. A análise por PCR (*polymerase chain reaction*) possui alta especificidade e pode detectar pequenas quantidades de parasitos em fezes ou em biópsias de tecidos fixados em parafina. Dentre as colorações, para análises microscópicas, as mais recomendadas são o método de Ziehl-Neelsen modificado (ZNm) e o método do tricômico álcool-ácido-resistente (AFT-*acid-fast-trichromic*). Segundo De Carli (2000), na rotina laboratorial as colorações ácidas resistentes são os mais recomendados para a demonstração dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas fezes. A resistência ácida pelo protozoário está relacionada à presença de lipídios, ligados fortemente a parede celular, que resistem a extração sucessiva com álcool-

éter e clorofórmio (GARCIA et al., 2000).

A aplicação do diagnóstico pela coloração do Ziehl-Neelsen apresenta desvantagem visto que não permite uma distinção entre as possíveis espécies e genótipos que o parasito apresenta, principalmente em relação a características epidemiológicas para a transmissão do parasito. As técnicas biomoleculares representam uma alternativa ao diagnóstico convencional, tanto em amostras clínicas quanto ambientais, exigindo quantidades muito menores de oocistos para identificação do parasito. A determinação das diferentes espécies e genótipos é indispensável para avaliar a importância em saúde pública com finalidade de compreender melhor as rotas de transmissão e fontes de contaminação (SMITS & HARTSKEERL, 1995).

O objetivo do trabalho foi detectar a presença de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de crianças atendidas pelo Laboratório do Hospital Infantil da cidade de Lages, Santa Catarina.

Materiais e Métodos

A pesquisa foi realizada no período de junho a dezembro de 2014, através da análise de amostras fecais de crianças entre zero a 12 anos de idade atendidas pelo Laboratório do Hospital Infantil da cidade de Lages, Santa Catarina. O trabalho teve aprovação segundo o Comitê de Ética em

Seres Humanos da Universidade do Planalto Catarinense (UNIPLAC), parecer nº 631 de 2014.

As amostras fecais foram encaminhadas e analisadas no Laboratório de Parasitologia da UNIPLAC. Inicialmente as fezes foram submetidas aos métodos de sedimentação espontânea de Hoffman et al. (1934) e centrífugo-sedimentação em formol-éter (Ritchie) (DE CARLI, 2000). Os precipitados resultantes da sedimentação espontânea foram analisados para verificação de ovos de parasitos; já os precipitados da técnica de Ritchie foram preparados esfregaços finos em lâmina para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. pela coloração ácido-resistente (Método de Ziehl-Neelsen modificado). O método de Ritchie (1948) foi modificado por Ridley & Hawgood (1956), para a concentração de cistos e ovos de parasitos, sendo adaptado para concentração de oocistos de *Cryptosporidium* spp. O diagnóstico do protozoário foi através da coloração com visualização em microscopia óptica (Nikon) no aumento de 1000 x para confirmação da estrutura parasitária.

Para certificar o diagnóstico pela técnica de coloração do protozoário, as amostras foram submetidas à técnica de PCR para o diagnóstico molecular, esta segunda parte da pesquisa foi realizada no Laboratório de Hemoparasitas e Vetores da

Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC).

O processo de extração de DNA dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. por ultra-som foi descrito por Becker (1999) e Deng & Cliver (1999). Ao precipitado contendo oocistos foi adicionado 1,5 mL de tampão TEN (Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0) e suspenso precipitado usando agitador mecânico com baixa velocidade sendo após a amostra submetida ao ultra-som Sonoplus 2200 Bandelin por 4 ciclos de 30 segundos (50 Hertz) e intervalo de 1 min., sob temperatura de 4°C. Após este procedimento as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido (-196°C) por 5 min. e descongeladas por 5 min. a 95°C, este processo de congelamento e descongelamento foi realizado três vezes. Posteriormente foi adicionado as amostras 15 µL de proteinase K e foram mantidas a 42°C *over night*.

A remoção dos restos celulares e proteicos obtidos pela digestão da proteinase K foi feita com a utilização fenol/clorofórmio. Para este processo foi adicionado às amostras o dobro do volume de fenol, foram realizadas a homogeneização por inversões por 10 min. e então centrifugadas a 14.000 x g por 10min. a 4°C. A parte líquida foi transferida para um novo microtubo, sendo adicionado então igual volume de

fenol/clorofórmio (500µL / 500µL), foi novamente homogeneizado por inversão por 10 min. e centrifugado a 14.000 x g por 10 min. a 4°C. O líquido foi transferido para um novo microtubo e a este foi adicionado o igual volume de clorofórmio puro, o tubo foi invertido para homogeneização durante 10 min. e novamente centrifugado a 14.000 x g por 10 min. a 4°C. O DNA foi precipitado com 10% de acetato de sódio (3M, pH 5.2) e lavado com dois e meio volumes de etanol absoluto, deixando em repouso por 12 horas. Após este período a amostra foi centrifugada a 20.000 x g por 30 min. a 4°C. O precipitado foi duas vezes lavado com 300µL de etanol a 70% e centrifugado a 20.000 x g por 10 min. a 4°C, O precipitado foi seco em concentrador

(*eppendorff*) por 20 min. a 45°C, precipitado e eluído em 50µL de água Milli Q por 12 horas a 4°C. O material foi armazenado a -20°C para posterior análise.

Para a detecção molecular o DNA do parasito foi realizado a reação em cadeia de polimerase (PCR). Estes métodos moleculares são rápidos, sensíveis e específicos, permitindo ampliar e identificar sequências de DNA do parasito (GARCIA & MARCONDES, 2007; LIMA 2005).

A PCR foi realizada utilizando-se um par de iniciadores genérico para *Cryptosporidium* spp. (Xiao et al., 2001) da região hiper-variada do gene 18SSU rDNA. Este conjunto de iniciadores amplifica uma região de 1350 pares de base, segundo a **Tabela 1**.

Tabela 1- Iniciadores usados na técnica de PCR para identificação da presença de DNA de *Cryptosporidium* spp. nas amostras de fezes

| INICIADORE S | REGIÃO GÊNICA | SEQUÊNCIA 5'-3' | FRAGMENTO AMPLIFICADO |
|--------------|---------------|------------------------------|-----------------------|
| INICIADOR | 18SSU rDNA | 5'TTCTAGAGCTAATACATCCG 3' | 1350 PB |
| REVERSO | 18SSU rDNA | 5'CCATTCCTTCGAAACAGG A3' | 1350 PB |

Para controle negativo, foram usados, amostras fecais negativas no exame de coloração de Ziehl Neelsen, já o

controle positivo foi através de uma amostra cedida gentilmente pelo Laboratório de Parasitologia da

UNICAMP. Para a concentração das dNTP foram utilizadas 0,2 mM com 0,5 μ L de volume por reação, com *primer* iniciador na concentração de uso de 20 pmol no volume de 0,2 μ L por reação e para o segundo *primer* com a mesma concentração e volume.

Para a primeira reação da PCR, foram utilizados os iniciadores citados na tabela acima com 3 μ L de DNA genômico, para a segunda reação foram utilizados 3 μ L da primeira reação e os iniciadores com os mesmos fatores de reação e condições de amplificação: um ciclo de 94°C por 3 minutos; 35 ciclos a 94°C por 45 segundos; 55°C por 45 segundos; 72°C por 1 minuto e uma extensão final outro ciclo a 72°C por 5 minutos.

A amplificação foi realizada no termociclador (LifePro[®]) e os produtos da amplificação foram armazenados a 4°C até a realização da eletroforese em gel de agarose a 1,6%. Os produtos amplificados

da PCR foram detectados por meio de eletroforese em gel de agarose preparado a 1,5% em tampão TAE 1X. 15 μ L dos produtos da amplificação foram aplicados no gel, acrescido de 2 μ L de tampão de amostra, e submetidos a corrente elétrica de 100V numa cuba de eletroforese, onde realizava-se a corrida eletroforética para a separação das bandas.

Após a separação dos produtos da PCR por eletroforese, o DNA foi visualizado em fonte ultravioleta, em seguida o gel foi foto documentado. Para avaliar os tamanhos dos fragmentos foi usado marcador de massa molecular de DNA de 100 pb (Kasvi[™]).

Resultados e Discussão

O diagnóstico das amostras através da técnica de Ziehl Neelsen revelou a presença de estruturas compatíveis para oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 18,42% (14/76) amostras segundo as características morfotintoriais, na **Figura 1**.



Figura 1 - Oocistos de *Cryptosporidium* spp. (setas vermelhas) corados pela técnica de Ziehl Neelsen (Vis. 1000x).

Das 76 amostras fecais analisadas, 42 (55,26%) foram do sexo masculino e 34 (44,74%) do sexo feminino. Em relação à faixa etária, 31,58% (24/76) foram de crianças entre zero a dois anos; 26,31% (20/76) entre três a cinco; 18,42% (14/76) entre seis a oito e 23,68% (18/76) de nove a 12 anos. Para a consistência fecal das amostras, 21,05% (16/72) apresentavam-se diarreicas, destas 68,75% (11/16) foram de meninos e 31,25% (5/16) de meninas.

Das 14 amostras diagnosticadas pelo Ziehl Neelsen, 64,29% (9/14) foram positivas para *Cryptosporidium* spp. pelo diagnóstico molecular, conforme mostra a **Figura 2**.

A positividade para oocistos de *Cryptosporidium* spp. em relação ao sexo, 14,28% (6/42) foram diagnosticados em meninos e 23,52% (8/34) em meninas; já para faixa etária a idade de 7 anos foi a mais prevalente.

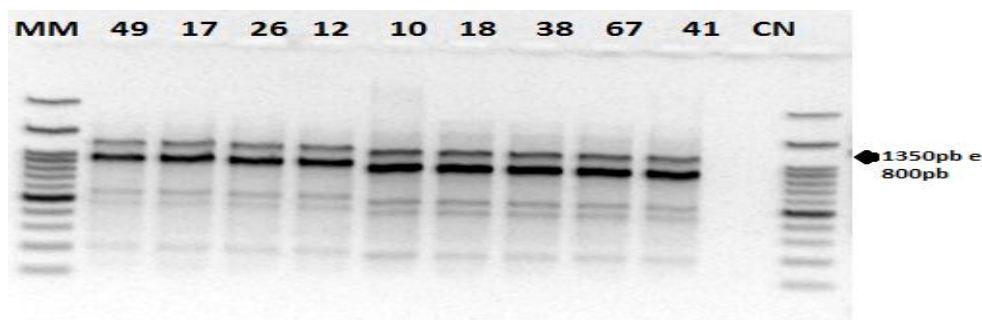


Figura 2 - Resultado da amplificação de gene 18SSU *rDNA* de *Cryptosporidium* spp. em amostras clinicamente positivas (números); MM - Marcador de massa molecular. CN – Controle negativo.

Para Macedo et al. (1999), a maior vulnerabilidade das crianças à criptosporidiose pode ocorrer devido a alguns fatores, como: permanência em tempo integral ou semi-integral em creches, pouca capacidade de deslocamento e maior contato pessoa-pessoa, o que pode facilitar a manutenção do ciclo do parasito visto que é monoxênico.

Em diferentes estados do Brasil,

Cryptosporidium spp. tem sido diagnosticado em diferentes prevalências em crianças (0 a 12 anos de idade) de 4,2%, 3,3% e 1,8% em Uberlândia (MG) (GENNARI-CARDOSO et al., 1996), Rio de Janeiro (RJ) (SILVA et al., 2003) e Ribeirão Preto (SP) (MEDEIROS et al., 2001). Ainda sobre a idade dos pacientes acometidos pelo protozoário, Gatei et al. (2003) e Oshiro et al. (2000) reportam que no Brasil, o protozoário causa maior

número de casos de morbidade e mortalidade em crianças de zero a cinco anos de idade.

Carvalho-Costa et al. (2007), ao avaliarem crianças hospitalizadas por gastroenterite, na cidade do Rio de Janeiro (RJ), demonstraram que o *Cryptosporidium* spp. foi detectado principalmente em crianças internadas por diarreia aguda, na qual esta característica não foi observada neste trabalho em Lages. No Recife, amostras fecais analisadas pelas técnicas de Ziehl-Neelsen modificada e coloração com fucsina-carbólica (método Kinyoun) em crianças provenientes de uma creche pública, a positividade de oocistos de *Cryptosporidium* spp. foi 32,4% (59/182), sendo a faixa etária mais acometida estava entre três a cinco anos de idade (54,2%), ainda destas amostras 44% (26/59) eram diarreicas (NASCIMENTO et al., 2009).

Segundo Pérez-Cordón et al. (2005), a identificação de espécies de *Cryptosporidium* spp. baseada em técnicas morfométricas são pouco confiáveis, por isso, faz-se necessário o diagnóstico por outras metodologias, e a técnica de PCR mostra ser altamente sensível e específica e capaz de fazer o diagnóstico em amostras contendo apenas um oocisto. Para Chiuchetta (2010), o método de Ziehl Neelsen, ainda continua sendo o método de diagnóstico mais indicado, apresentando

alta sensibilidade e especificidade, porém, para Magi et al. (2006), também sobre as técnicas de diagnóstico em uma pesquisa na Itália envolvendo as técnicas de microscopia e de PCR, os autores obtiveram diferença significativa entre ambas as técnicas. Esta diferença encontrada na pesquisa na Itália entre as técnicas não pode ser comparada nesta pesquisa, uma vez que somente foram diagnosticadas na PCR amostras positivas no diagnóstico de coloração.

Em relação às demais técnicas coproparasitológicas utilizadas na pesquisa, à técnica de sedimentação espontânea foram encontradas apenas cistos de *Entamoeba coli* em duas amostras, porém este protozoário é um comensal da microbiota intestinal não apresentando nenhuma interferência no resultado laboratorial para *Cryptosporidium* spp.

Ainda sobre o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. por meio da microscopia, este não é um diagnóstico simples, pois depende de um microscopista bem treinado, é um método trabalhoso, cansativo e relativamente demorado. O profissional pode às vezes diagnosticar infecções equivocadamente ou não a diagnosticar, pois a morfologia do oocisto é incerta. Ainda Jex et al. (2008) citam que métodos de coloração com produtos químicos tais como negrosina, verde

brilhante, mebromide e verde malaquita que coram o material de fundo nas lâminas e deixamos oocistos sem corar o que pode interferir em diagnósticos falso-negativos; além do que também não é útil para avaliar amostras submetidas a condições desfavoráveis, como as amostras ambientais, que podem modificar a morfologia do parasito (ALMEIDA, 2004)

Diante de todas estas dificuldades e deficiências para um diagnóstico seguro para o protozoário, a biologia molecular vem permitindo esclarecer a identificação específica de *Cryptosporidium* spp. bem como o conhecimento da população intraespecífica. Graças a esta ferramenta foi possível verificar que em seres humanos, tanto em surtos quanto em casos esporádicos de infecção, *C. hominis*, é quase que exclusivamente o agente etiológico, e *C. parvum*, uma espécie zoonótica com numerosos hospedeiros. Por fim, as técnicas de biologia molecular e a análise filogenética do gene codificador do RNA ribossômico 18S (18S rRNA) têm permitido diferenciar 40 genótipos diferentes (humano, macaco, bovino, canino, camundongo, suíno, equino, cervídeo, leporino, entre outros, na qual permitem identificar a epidemiologia da rota de transmissão (CHALMERS & DAVIES, 2010; SMITH et al., 2009).

Conclusão

O diagnóstico de parasitos intestinais na população infantil é de suma importância, visto que as parasitoses intestinais é uma das causas mais comum de diarreia. Em virtude de a criptosporidiose ocorrer principalmente em crianças, é necessário fazer o diagnóstico seguro e eficaz, uma vez que as técnicas de coloração embora sejam as mais comumente empregadas nos laboratórios apresentam limitações não somente pela dificuldade do diagnóstico, bem como também não permite fazer um estudo da forma de infecção uma vez que não tem capacidade de determinar as características genóticas das espécies do parasito. Desta forma faz-se necessário difundir o emprego do diagnóstico molecular em laboratórios que prestam serviços principalmente em hospitais infantis e desta forma melhorar a saúde da população infantil.

Agradecimento:

Em especial agradecimento ao Biomédico Paulo Henrique Extterchotter *Weiss in memorian*.

Referências

ALMEIDA, T.T.C. Padronização e avaliação de métodos moleculares para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) em amostras fecais: extração de DNA genômico e PCR (reação em cadeia pela polimerase). 130 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública), Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2004.

- BECKER, P. B. *Methods in Molecular Biology*. v. 119. Totowa: Humana Press, 1999.
- BORGES, J.C.G.; ALVES, L.C.; FAUSTINO, M.A.G.; LIMA, A.M.A. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em peixes-boi marinhos (*Trichechus manatus*) e funcionários envolvidos no manejo da espécie. *Estud. Biol.*, v. 29, n. 66, p. 33-41, 2007.
- CARVALHO-COSTA F.A.; GONÇALVES A. Q.I.; LASSANCE S.L.; ALBUQUERQUE C.P.; LEITE J.P.G.; BÓIA M.N. Detection of *Cryptosporidium* spp and other intestinal parasites in children with acute diarrhea and severe dehydration in Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n. 3, p. 346-348, 2007.
- CHIUCHETTA, F.A. *Criptosporidiose* em paciente com espondilite anquilosante usando adalimumabe. *Rev. Bras. Reumatol.*, v.50, n. 3, p. 328-332, 2010.
- CHALMERS, R.M.; DAVIES, A.P. Minireview: Clinical cryptosporidiosis. *Experimental Parasitology*, v.124, p. 138-146, 2010.
- D'ANTONIO, R.G.; WINN, M.D.; TAYLOR, J.; GUSTAFSON, T.L.; CURRENT, W.L.; RHODES, M.M.; GARY, G.W.; ZAJAC, R.A. A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. *Ann. Inter. Med.*, v.103, p. 886-888, 1985.
- DE CARLI, G.A. *Parasitologia Clínica: Diagnóstico de Laboratório dos Coccídios e Microsporídios Intestinais*. Cadernos Edipucrs; série Farmácia, Porto Alegre: p. 102-107, 2000.
- DENG, M.Q.; CLIVER, D.O. Improved immunofluorescence assay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* from asymptomatic adult cervine animals. *Parasitology Research*, v. 85, n. 8, p. 733-736, 1999.
- DUPONT, H.L.; CHAPPEL, C.L.; STERLING, C.R.; OKHUYSEN, P.C.; ROSE, J.B.; JAKUBOWSKI, W. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N. Engl. J. Med.*, v.332, p. 855-859, 1995.
- FAYER R.; MORGAN, U.; UPTON, S.J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int. J. Parasito.*, v.30, p. 1305-1322, 2000.
- FAYER, R. *Cryptosporidium* and criptosporidiosis. Boca Raton, CRC Press, 1997. 215p.
- FRANCO, R.M.B.; SANTOS, L.U. Criptosporidiose. In: NETO, V.A. et al. *Parasitologia: uma abordagem clínica*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- GARCIA, L.S.; SHIMIZU, R.Y.; BERNARD, C.N. Detection of *Giardia Lamblia*, *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the triage parasite panel enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.*, v.38, p. 3337-3340, 2000.
- GARCIA, F.A.I.; MARCONDES, M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. *Clínica Veterinária*, n. 71, p. 36, 2007.
- GATEI, W.; GREENSILL, J.; ASHFORD, R.W.; CUEVAS, L.E.; PARRY, C.M.; CUNLIFFE, N.A.; BEECHING, N.J.; HART, C.A. Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United kingdom, and Vietnam. *J. Clin. Microbiol.*, v. 41, p.1458-1462, 2003.
- GENNARI-CARDOSO, M.L.; COSTA-CRUZ, J.M.; CASTRO, E.; LIMA, L.M.F.S.; PRUDENTE, D.V. *Cryptosporidium sp* in children suffering from acute diarrhea at Uberlândia city, State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 91, p. 551-554, 1996.
- GRIFFITHS, J.K. Human Cryptosporidiosis: Epidemiology, Transmission, Clinical Disease, Treatment and Diagnosis. *Advances in Parasitology*, v.40, p. 38-73, 1998.
- HOFFMAN, W. A.; PONS, J.A.; JANER, J. L. The Sedimentation Concentration Method in *Schistosomiasis mansoni*. *Puerto Rico J. Publ. Health*, v. 9, p. 283-298, 1934.

JEX, A.; PANGASA, A.; CAMPBELL, B. E.; WHIPP, M.; HOGG, G.; SINCLAIR, M. I.; STEVENS, M.; GASSER, R.B. Classification of *Cryptosporidium* species from patients with sporadic cryptosporidiosis by use of sequence-based multilocus analysis following mutation scanning. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, n. 7, p. 2252-2262, 2008.

LIMA, J.D. *Sarcocystis*, *Isospora* e *Cryptosporidium*. In: NEVES, D. P. Parasitologia humana. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 176-179.

MACEDO, L.M.C.; COSTA, M.C.E.; ALMEIDA, LM. Parasitismo por *Ascaris lumbricoides* em crianças menores de dois anos: estudo populacional em comunidade do Estado do Rio de Janeiro. *Caderno de Saúde Pública*, v.15, p. 173-178, 1999.

MAGI, B., CANOCCHI, V., TORDINI, G. *Cryptosporidium* infection: diagnostic techniques. *Parasitology Research*, v. 98, p. 150-152, 2006.

MEDEIROS, M.I.C.; NEME, S.N.; SILVA, P.; CAPUANO, D.M.; ERRERA, M.C.; FERNANDES, A.S.; VALLE, G.R.; AVILA, F.A. Etiology of acute diarrhea among children in Ribeirão Preto, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 43, p.21-24, 2001.

NASCIMENTO, W.R.C.; CAVALCANTI, I.M.F.; IRMÃO, J.I.; ROCHA, F.J.S. Presença de *Cryptosporidium* spp em crianças com diarreia aguda em uma creche pública de Recife, Estado de Pernambuco. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 42, n. 2, p. 175-178, 2009.

OSHIRO, E.T.; DORVAL, M.E.C.; NUNES, V.L.B.; SILVA, M.A.A.; SAID, L.A.M. Prevalência do *Cryptosporidium parvum* em crianças abaixo de 5 anos, residentes na zona urbana de Campo Grande, MS, Brasil, 1996. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 33, p. 277-280, 2000.

PEREIRA, J.T.; SOCCOL, V.T.; COSTA, A.O.; CASTRO, E.A.; OSAKI, S.C.; PAULINO, R.C. *Cryptosporidium* spp.: para controlar é necessário conhecer. *Revista Saúde e Ambiente*, v. 10, n. 2, p.14-25, 2009.

PÉREZ-CORDÓN, G.; ROSALES, M.J.; SÁNCHEZ-MORENO, M. Processing of fecal samples for study of *Cryptosporidium* sp. by PCR. *Rev. Peru Biol.*, v.12, p. 158-160, 2005.

QUINTERO-BETANCOURT, W.; ROSE, J.B. Drinking water treatment process for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Vet. Parasitol.*, v.126, p. 219-234, 2004.

RIDLEY, D.S.; HAWGOOD, B.C. The value of formol-ether concentration of faecal cysts and ova. *J. Clin. Pathol.*, v. 9, n. 1, p. 74-76, 1956.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the “neglected diseases initiative”. *Trends in Parasitology*, v. 22, n. 5, p. 203-208, 2006.

SILVA, S.; SILVA, S.P.; GOUVEIA, Y.S.; SILVA, N.O.; MELO, M.E.R.M.; MOURA H.; NEVES, R.H.; BELLO, A.R.; MACHADO-SILVA, J.R. Ocorrência de *Cryptosporidium* sp em amostras fecais de crianças, menores de 10 anos de idade, com indicação clínica de Rotavírus. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.36, p.421-423, 2003

SMITH, R.P.; CHALMERS, R.M.; ELWIN, K.; CLIFTON-HADLEY, F.A.; MUELLER-DOBLIES, D.; WATKINS, J.; PAIBA, G.A.; GILES, M. Investigation of the Role of Companion Animals in the Zoonotic Transmission of Cryptosporidiosis. *Zoonoses Public Health*, v. 56, p. 24-33, 2009.

SMITS, H.L.; HARTSKEERL, R.A. PCR amplification reactions in parasitology. *J. Microbiol. Method.* 23, p. 41-54, 1995.

XIAO, L.; ESCALANTE, L.; YANG, C.; SULAIMAN, I.; ESCALANTE, A.A.; MONTALI, R.J. et al. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl Environ Microbiol*, v. 65, p. 1578-1583, 2001.