

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Marta Elena Machado Alves

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp. E OCORRÊNCIA DOS
PRINCIPAIS PARASITAS GASTROINTESTINAIS EM AMOSTRAS FECAIS DE
CÃES E GATOS NATURALMENTE INFECTADOS**

Santa Maria, RS

2018

Marta Elena Machado Alves

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp. E OCORRÊNCIA DOS PRINCIPAIS PARASITAS GASTROINTESTINAIS EM AMOSTRAS FECAIS DE CÃES E GATOS NATURALMENTE INFECTADOS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Silveira Flores Vogel

Santa Maria, RS

2018

Marta Elena Machado Alves

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp. E OCORRÊNCIA DOS PRINCIPAIS PARASITAS GASTROINTESTINAIS EM AMOSTRAS FECAIS DE CÃES E GATOS NATURALMENTE INFECTADOS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 8 de fevereiro de 2018:

Fernanda Silveira Flores Vogel, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Patrícia Bräuning, Dr^a. (UFSM)

Alfredo Skrebsky Cezar, Dr. (UNIJUÍ)

Santa Maria, RS

2018

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela fé que me faz mais forte para superar as adversidades.

À minha vovó Herminia Machado (*in memoriam*), meu exemplo de vida, ternura, generosidade e simplicidade. Por ter sido (e ainda é) a fortaleza da nossa família, nos mantendo unidos em todos os momentos e pela intensidade que viveu sua vida valorizando o que realmente importa, as pessoas.

Aos meus pais José Ademar e Maria Sueli por todos os valores transmitidos, pelo amor incondicional e por terem me ensinado o valor do conhecimento, da persistência e da dedicação para busca dos meus objetivos.

Aos meus irmãos Eder, Marion, Eloi e Everson pela amizade, carinho e pelo apoio ininterrupto e o incentivo em cada passo dessa jornada.

Ao meu amado namorado, Rodrigo Luiz Ludwig, que apesar da distância frequente dos últimos anos, sempre se fez presente de uma forma ou de outra, me apoiando, incentivando e cuidando com muito amor e carinho. E à sua família que me acolheu tão bem e que considero minha família.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), pelo ensino gratuito e de qualidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFSM, em especial à técnica administrativa Maria Moro da Rosa, por toda dedicação e auxílio prestado.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À minha orientadora Dr^a. Fernanda Silveira Flores Vogel por mais essa oportunidade de crescimento profissional, pelos conhecimentos transmitidos, amizade e paciência.

Ao professor Dr. Luís Antonio Sangioni pela convivência, ensino e amizade.

Ao Hospital Veterinário Universitário da UFSM pela disponibilidade, auxílio e confiança. Dedico um agradecimento especial aos servidores, Patrícia Alvez Velda e Marco Antonio Marques Junior, pela cooperação e amizade desenvolvidos ao longo dos dias de coleta das amostras para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos meus colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR/UFSM), meu sincero agradecimento pelos ensinamentos, apoio e por todos os bons momentos compartilhados, tornando essa jornada muito mais prazerosa.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento, me ajudaram na execução deste trabalho ou simplesmente torceram pelo meu sucesso.

Muito obrigada!

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp. E OCORRÊNCIA DOS PRINCIPAIS PARASITAS GASTROINTESTINAIS EM AMOSTRAS FECAIS DE CÃES E GATOS NATURALMENTE INFECTADOS

AUTOR: Marta Elena Machado Alves

ORIENTADORA: Fernanda Silveira Flores Vogel

Cães e gatos são hospedeiros definitivos de inúmeros parasitas do trato gastrointestinal e propiciam a manutenção do ciclo biológico, uma vez que, eliminam nas fezes ovos de helmintos e cistos e oocistos de protozoário, favorecendo a contaminação do ambiente e a propagação de doenças. O estreitamento no convívio entre os animais de companhia e o homem intensifica a exposição humana a parasitas com potencial zoonótico como, por exemplo, *Ancylostoma* spp., *Toxocara* spp., *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. Considerando o papel dos animais de companhia nas zoonoses parasitárias, o objetivo deste trabalho foi investigar o parasitismo gastrointestinal e caracterizar as espécies de *Cryptosporidium* spp. encontradas em cães e gatos naturalmente infectados. Para isso foram coletadas 177 amostras de fezes, sendo 128 coletadas de cães e 49 de gatos de ambos os sexos e idades variadas. As amostras de fezes foram obtidas de animais atendidos no Hospital Veterinário Universitário (HVU) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, no período de fevereiro a abril de 2017. Nas análises utilizando as técnicas de Sheather e Faust e coloração de Ziehl Neelsen, verificou-se a ocorrência de um ou mais parasitas do trato gastrointestinal em 56,2% das amostras fecais de cães examinadas, e 53,0% amostras de fezes de gatos. Nos cães *Ancylostoma* spp. (36,7 %) foi o parasita mais frequente, seguido por *Cryptosporidium* spp. (22,6%), *Giardia* spp. (4,6%), *Cystoisospora* spp. (3,1%), *Taenia* spp. (3,1%), *Toxocara canis* (3,1%), *Trichuris* spp. (1,5%) e *Dipylidium caninum* (0,7%). Nos gatos, *Cryptosporidium* spp. (22,4%) foi mais frequente, seguido de *Ancylostoma* spp. (18,3%), *Cystoisospora* spp. (16,3%), *Toxocara cati* (12,2%), *Giardia* spp. (4,0%), *Spirometra* spp. (4,0%), *Taenia* spp. (4,0%) e *Toxascaris leonina* (4,0%). A monoinfecção foi identificada em 70,8% dos cães e 46,1% dos gatos. Observou-se a presença de multi-infecção, com ocorrências de 29,2% nos cães e 53,8% nos gatos. Nos cães não houve diferença significativa na faixa etária entre os grupos. Quanto aos gatos, 57,8% dos animais parasitados encontravam-se com idades entre 1 a 4 anos, sendo o fator de risco idade significativo ($p < 0,05$). O gene SSU rRNA de *Cryptosporidium* spp. foi amplificado em 5,6% (10/177) das amostras fecais analisadas utilizando a técnica de Nested PCR, sendo detectado em 4,6% (6/128) das amostras de fezes de cães e 8,2% (4/49) das amostras de gatos. As amostras positivas foram caracterizadas utilizando o sequenciamento de DNA. Nos cães foram encontradas as espécies *C. canis* (66,6% - 4/6) e *C. parvum* (33,3% - 2/6) e nos gatos *C. felis* (75% - 3/4) e *C. parvum* (25% - 1/4). Os parasitas gastrointestinais mais frequentes neste estudo são agentes de importância em saúde pública. Desta forma, deve-se ressaltar a importância do controle e prevenção das parasitoses gastrointestinais através do diagnóstico correto e o uso de drogas eficazes.

Palavras-chave: helmintos, protozoários, Nested PCR, sequenciamento de DNA, zoonoses.

ABSTRACT

MOLECULAR DETECTION OF *Cryptosporidium* spp. AND OCCURRENCE OF GASTROINTESTINAL PARASITES IN FECAL SAMPLES OF NATURALLY INFECTED DOGS AND CATS

AUTHOR: Marta Elena Machado Alves

ADVISER: Fernanda Silveira Flores Vogel

Dogs and cats are definitive hosts of innumerable parasites of the gastrointestinal tract and promote the maintenance of the biological cycle, since they eliminate eggs from helminths and cysts and protozoan oocysts, favoring the contamination of the environment and the spread of diseases. The narrowing of the interaction between pets and humans enhances human exposure to parasites with zoonotic potential, such as *Ancylostoma* spp., *Toxocara* spp., *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. Considering the role of companion animals in parasitic zoonoses, the objective of this work was to investigate the gastrointestinal parasitism and to characterize the species of *Cryptosporidium* spp. found in naturally infected dogs and cats. For this, 177 samples of feces were collected, 128 were collected from dogs and 49 from cats of both sexes and varied ages. Feces samples were obtained from animals attended at the University Veterinary Hospital (HVU) of the Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, from February to April 2017. In the analyzes using the techniques of Sheather and Faust and Ziehl Neelsen staining, one or more parasites of the gastrointestinal tract were found in 56.2% of fecal samples from dogs examined, and 53.0% of cat feces samples. In dogs *Ancylostoma* spp. (36.7%) was the most frequent parasite, followed by *Cryptosporidium* spp. (22.6%), *Giardia* spp. (4.6%), *Cystoisospora* spp. (3.1%), *Taenia* spp. (3.1%), *Toxocara canis* (3.1%), *Trichuris* spp. (1.5%) and *Dipylidium caninum* (0.7%). In cats, *Cryptosporidium* spp. (22.4%) was more frequent, followed by *Ancylostoma* spp. (18.3%), *Cystoisospora* spp. (16.3%), *Toxocara cati* (12.2%), *Giardia* spp. (4.0%), *Spirometra* spp. (4.0%), *Taenia* spp. (4.0%) and *Toxascaris leonine* (4.0%). Monofection was identified in 70.8% of dogs and 46.1% of cats. The presence of multi-infection was observed, with occurrences of 29.2% in dogs and 53.8% in cats. In dogs there was no significant difference in the age group between groups. As for cats, 57.8% of the parasitized animals were aged between 1 and 4 years, and the risk factor was significant ($p < 0.05$). The SSU rRNA gene of *Cryptosporidium* spp. was amplified in 5.6% (10/177) of the fecal samples analyzed using the Nested PCR technique and was detected in 4.6% (6/128) of the feces samples of dogs and 8.2% (4 / 49) of the cat samples. Positive samples were characterized using DNA sequencing. In dogs, *C. canis* (66.6% - 4/6) and *C. parvum* (33.3% - 2/6) and *C. felis* (75% - 3/4) and *C. parvum* (25% - 1/4). The most frequent gastrointestinal parasites in this study are agents of public health importance. In this way, the importance of the control and prevention of gastrointestinal parasitoses should be emphasized through the correct diagnosis and the use of effective drugs.

Keywords: helminths, protozoa, Nested PCR, DNA sequencing, zoonosis.

LISTA DE TABELAS

Table 1 – Detection of monoinfection and multi-infection of gastrointestinal parasites in fecal samples from naturally infected dogs and cats using the techniques of Sheather, Faust and Ziehl Neelsen staining	36
Table 2 – Occurrence of gastrointestinal parasites in fecal samples of naturally infected dogs and cats using the techniques of Sheather, Faust and coloring of Ziehl Neelsen.....	37

LISTA DE FIGURAS

- Figure 1 – Gastrointestinal parasites present in fecal samples. Detected through the macroscopic evaluation (*Dipilidium caninum*) and by the use of the techniques of Sheather and Faust (other parasites).....38
- Figure 2 – Oocyst of *Cryptosporidium* spp. detected by performing the staining of Ziehl Neelsen in feces sample.....38
- Figure 3 – Samples amplified corresponding a region of the SSU rRNA gene of *Cryptosporidium* spp. by Nested PCR. M: molecular marker (100 pb); C-: negative control; C+: positive control; 1, 2, 3 and 4: positive samples for *Cryptosporidium* spp.....39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 NEMATOIDES.....	12
2.1.1 <i>Ancylostoma</i> spp.....	12
2.1.2 <i>Toxocara</i> spp.....	14
2.1.3 <i>Toxascaris leonina</i>	16
2.1.4 <i>Trichuris</i> spp.....	17
2.2 CESTOIDES.....	17
2.2.1 <i>Dipilidium caninum</i>	18
2.2.2 <i>Taenia</i> spp.....	18
2.2.3 <i>Spirometra</i> spp.....	19
2.3 PROTOZOÁRIOS.....	19
2.3.1 <i>Cystoisospora</i> spp.....	20
2.3.2 <i>Cryptosporidium</i> spp.....	21
2.3.3 <i>Giardia</i> spp.....	22
2.4 PRINCIPAIS PARASITAS ZOONÓTICOS.....	24
3 ARTIGO	27
Abstract.....	27
Introduction	27
Materials and Methods.....	28
Results and Discussion.....	30
Conclusions.....	32
References.....	32
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
5 REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

Os parasitas gastrointestinais representam um problema para a saúde e o bem-estar dos animais infectados mesmo sem apresentação de sinais clínicos (NEVES et al., 2014). Os cães (*Canis familiaris*) e gatos (*Felis catus*) são hospedeiros definitivos de inúmeros parasitas, eliminando nas fezes ovos de helmintos e cistos e oocistos de protozoários gastrintestinais, permitindo a manutenção do ciclo biológico (DANTAS-TORRES & OTRANTO, 2014). A persistência do ciclo propicia a contaminação do ambiente e a possibilidade de propagação de doenças (ANDRESIUK et al., 2003).

Animais de companhia oferecem significativos benefícios ao indivíduo e a comunidade (ROBERTSON et al., 2000). Comumente a relação entre as pessoas e seu companheiro animal representa um modo de vida, sendo reconhecido como laço humano-animal (PAUL et al., 2010). Devido a esse estreito convívio é indispensável o controle das parasitoses buscando minimizar a contaminação ambiental pelas formas infectantes e conseqüentemente os riscos de transmissão para homens e animais (ROBERTSON et al., 2000).

Segundo Dantas-Torres & Otranto (2014), a distribuição dos parasitas gastrointestinais é cosmopolita, sendo comum em todas as regiões do Brasil (Norte, Nordeste, Sul, Sudeste e Centro-Oeste). A frequência de parasitas gastrointestinais é elevada, podendo ser encontradas amostras fecais positivas para ovos de helmintos como *Toxocara* spp., *Ancylostoma* spp., *Spirometra mansonioides* e *Dypilidium caninum*, e cistos e oocistos de protozoários como *Giardia* spp., *Cystoisospora* spp., *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba* spp. e *Cryptosporidium* spp. (DALL'AGNOL et al., 2010; FERREIRA et al., 2013).

A contaminação ambiental propicia a manutenção do ciclo biológico dos parasitas gastrointestinais, estudos demonstram altas taxas de prevalência em praças, sendo encontrados parasitas como *Ancylostoma caninum*, *Trichuris vulpis*, *Toxocara canis* e *Amoeba* spp. (ANDRESIUK et al., 2003). Segundo Chen et al. (2012), na China a toxocaríase ocorre em crianças, cães e humanos e a ancilostomíase está presente em cães e humanos.

Considerando que os animais de companhia têm importância nas zoonoses parasitárias, o objetivo deste trabalho foi investigar os parasitas gastrointestinais e detectar e caracterizar molecularmente as espécies de *Cryptosporidium* spp. encontradas em cães e gatos naturalmente infectados na região de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os parasitas gastrointestinais representam um problema na clínica de cães e gatos pela sua alta prevalência e por algumas delas serem consideradas zoonoses (GENNARI et al., 1999). Além disso, o número crescente de animais de companhia pode aumentar a exposição humana a agentes de zoonoses, devido ao estreito contato entre esses e o homem (CHEN et al., 2012). Os parasitas encontrados neste estudo são classificados como nematoides, cestoides e protozoários e serão revisados a seguir.

2.1 NEMATOIDES

Os nematoides são caracterizados pelo corpo cilíndrico e alongado, possuem pseudoceloma (cavidade corporal) e sua cutícula corporal externa é resistente contendo fibras de colágeno não elástica (BOWMAN, 2010). O sistema digestório é composto pela boca, vestíbulo oral, lábios, esôfago, faringe, intestino e ânus (MONTEIRO, 2010). Apresentam dimorfismo sexual, os machos são menores que as fêmeas e possuem espículos para a cópula (REY, 2001). O ciclo biológico está descrito em quatro estágios (adulto, pré-infectante, infectante e pré-adulto) divididos por quatro fases de transições (contaminação, desenvolvimento, infecção e maturação), sendo relacionado com o estabelecimento do diagnóstico, tratamento e controle (BOWMAN, 2010).

2.1.1 *Ancylostoma* spp.

Os ancilóstomos pertencem ao reino Metazoa, filo Nematoda, classe Chromadorea, ordem Rhabditida, família Ancylostomatidae e gênero *Ancylostoma* (BOWMAN, 2010). Estes parasitas são frequentes em carnívoros domésticos e silvestres, sendo encontrados no intestino delgado e caracterizados por realizarem hematofagia (REY, 2001). As espécies que podem parasitar os cães são o *A. caninum*, *A. ceylanicum* e *Uncinaria stenocephala*. Os gatos podem albergar o *A. tubaeforme*, *A. braziliense*, *A. caninum*, *A. ceylanicum* e *Uncinaria stenocephala* (DANTAS-TORRES & OTRANTO, 2014).

De acordo com The Center for Food Security & Public Health (CFSPH) (2013), a espécie mais difundida é o *A. caninum* podendo ser encontrada nos mais diversos locais do mundo, seguida pelo *A. tubaeforme*, enquanto o *A. braziliense* está restrito a regiões tropicais e subtropicais, incluindo América Central e do Sul, Caribe e partes dos EUA. O *A. ceylanicum*

tem sido descrito em regiões da Ásia, África, Austrália, e Médio Oriente, enquanto *U. stenocephala* ocorre em climas frios, abrangendo o Canadá, norte EUA e Europa (CFSPH, 2013). Do ponto de vista zoonótico tem relevância as larvas infectantes do gênero *Ancylostoma* pois podem penetrar na pele íntegra e causar dermatite serpiginosa ou Larva Migrans Cutânea (LMC) provocando uma reação pruriginosa intensa (KATAGIRI & OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2007, ALIPOUR & GOLDUST 2015).

O ciclo de vida é direto, onde os ovos liberados no ambiente em condições ideais de temperatura e umidade desenvolvem-se até seu estágio infeccioso (L3) em média até 5 dias (REY, 2001). A infecção pode ocorrer pela ingestão das L3 (forma passiva), por penetração cutânea ativa (forma ativa) e transmissão vertical (transmamária ou transplacentária) (MONTEIRO, 2010). O período pré-patente (PPP) na infecção passiva é de 14 a 26 dias e na infecção ativa de 30 dias, podendo variar de acordo com o número de parasitas (BOWMAN, 2010).

Na infecção por via oral as larvas ingeridas completam seu desenvolvimento realizando duas mudas na mucosa do intestino delgado evoluindo para formas adultas e causando espoliação no hospedeiro definitivo (TAYLOR et al., 2010). Na infecção por penetração cutânea o caminho percorrido pelas larvas depende da idade do animal, dessa forma, animais de até 3 meses de idade as L3 penetram através da pele ou mucosa oral alcançando os vasos sanguíneos e linfáticos sendo transportadas até o pulmão e coração, onde mudam de estágio (REY, 2001). A partir dos alvéolos pulmonares as L4 passam pelos bronquíolos, brônquios, traqueia e faringe, onde são deglutidas, chegando finalmente ao intestino delgado transformando-se em adultos (CFSPH, 2013).

Nos animais com mais de 3 meses de idade, o percurso das L3 não segue uma migração pulmonar, ficando presas nos tecidos, no qual irão sobreviver como larvas em hipobiose (MONTEIRO, 2010). Em fêmeas gestantes ou animais estressados, com doença grave ou expostos a doses elevadas de corticoides administradas repetidamente, pode ocorrer a migração somática (URQUHART et al., 1996). Este fato tem especial importância em fêmeas prenhes, pois neste período as larvas são reativadas e eliminadas no leite infectando os filhotes durante as três primeiras semanas de lactação (TAYLOR et al., 2010).

Os sinais clínicos provocados pela forma adulta variam de acordo com a carga parasitária, a idade do animal e a dieta, sendo mais grave principalmente em animais jovens (CFSPH, 2013). O animal acometido pode apresentar apatia, anorexia, diarreia, melena, desidratação, dor abdominal, palidez das mucosas, edema subcutâneo, ascite e anasarca

(BOWMAN, 2010). Durante a necropsia podem ser observadas pequenas hemorragias punctiformes (REY, 2001).

O diagnóstico pode ser realizado baseado nos sinais clínicos e coproparasitológicos por métodos de flutuação (MONTEIRO, 2010). Os ovos do gênero *Ancylostoma* são ovais, elipsoides e de parede fina, contendo uma mórula com 8 a 16 células, quando excretados nas fezes (URQUHART et al, 1996). Ainda o diagnóstico *posmortem* pode ser realizado observando as lesões intestinais e a presença de parasitas adultos (TAYLOR et al., 2010).

No tratamento anti-helmíntico contra infecções causadas por ancilostomas pode-se recomendar a utilização dos princípios ativos como pamoato de pirantel, febantel, fenbendazol, albendazol, milbemicina oxima, administrados por via oral ou *spot-on* (BOWMAN, 2010). As fêmeas prenhes devem ser tratadas com anti-helmínticos (URQUHART et al, 1996).

As medidas profiláticas indicadas são, manter canis com pisos de fácil limpeza, realizar a retirada de fezes e limpeza diária com pelo menos uma desinfecção semanal. Utilizar água potável e tratamento antiparasitário periódico (REY, 2001). Ainda para prevenção da larva migrans cutânea é importante utilizar calçado, evitar que cães e gatos defiquem em áreas públicas, evitar que as pessoas deitem diretamente na areia de praias e ingerir água tratada ou fervida (BOWMAN, 2010).

2.1.2 *Toxocara* spp.

Parasita do intestino delgado de vários mamíferos, pertencentes ao reino Metazoa, filo Nematoda, classe Chromadorea, ordem Ascaridida, família Toxocaridae e gênero *Toxocara* (BOWMAN, 2010). As espécies *Toxocara canis* e o *Toxocara cati* são comumente observadas em cães e gatos, respectivamente (DANTAS-TORRES & OTRANTO, 2014). Principalmente em filhotes durante alguns meses após o nascimento (MONTEIRO, 2010). Os parasitas quando adultos medem de 10 a 15 cm de comprimento e tem uma coloração creme (BOWMAN, 2010).

Os ovos destas espécies são encontrados no solo de todo o mundo, com prevalências de 2-88%, sendo a transmissão favorecida nas temperaturas elevadas e umidade dos trópicos (CFSPH, 2005a). Os ovos possuem casca espessa irregular, de coloração castanho-escuro e formato globular ou subglobular (MONTEIRO, 2010). No ciclo de vida, as fêmeas fazem a postura dos ovos, que saem nas fezes e estes evoluem em L1, L2 e L3 dentro do ovo (URQUHART et al., 1996).

O hospedeiro definitivo pode se infectar pela ingestão do ovo larvado ou hospedeiro paratênico e por via transplacentária e transmamária (REY, 2001). Na infecção por ingestão, o hospedeiro definitivo ingere os ovos com as larvas L2, chegando ao intestino delgado penetram na mucosa, indo para o fígado, coração e alvéolos pulmonares, onde evolui para L4. Nesta fase vão a glote, são deglutidas e migram novamente para o intestino, onde mudam para fase adulta (URQUHART et al., 1996). Os hospedeiros paratênicos podem ser roedores, pássaros, minhocas e baratas (MONTEIRO, 2010).

Por via transmamária os filhotes são infectados através do leite contendo larvas, não ocorrendo migração pulmonar no filhote (MONTEIRO, 2010). Contudo pela via transplacentária as fêmeas gestantes passam as larvas pelo sangue arterial, contaminando os filhotes, em cães é a forma de contaminação mais importante (REY, 2001). Caso a fêmea tenha se infectado antes da gestação e estiver com larvas em hipobiose na musculatura esquelética, estas podem ser reativadas e contaminar os filhotes (BOWMAN, 2010).

As infecções com altas cargas de *Toxocara canis* podem causar severo desconforto abdominal em filhotes lactentes, sendo observado através do choro ou quando adotam uma posição de cavalete (BOWMAN, 2010). Outros sinais clínicos incluem apatia, anorexia, vômito, febre ou hipotermia, ausência de defecação, abaulamento abdominal, tosse, dispneia, sinais neurológicos e constante posicionamento para defecar (REY, 2001).

Após a infecção podem surgir sinais como uma enterite muco-sanguinolenta devido à penetração das larvas na parede intestinal (BOWMAN, 2010). Em casos de infecções graves pode ocorrer obstrução e mesmo ruptura intestinal (MONTEIRO, 2010). Igualmente uma colonização intensa pode fazer com que ascarídeos adultos invadam os ductos biliares, perfurando o parênquima do fígado e entrar na cavidade abdominal através da cápsula do fígado, o que leva a uma peritonite generalizada (URQUHART et al, 1996).

O diagnóstico pode ser realizado por exame parasitológico de fezes direto ou técnicas de flutuação, confirmando a presença do parasita nas fezes (REY, 2001). Nos hospedeiros acidentais reservatórios, como o homem, é possível fazer exames para pesquisa de anticorpos ou reação em cadeia da polimerase (MONTEIRO, 2010). Visto que existem diferentes métodos para o processamento de amostras fecais para o exame microscópico, é primordial observar aspectos como sensibilidade, facilidade de execução e custo (BROUSSARD, 2003). Ainda pode-se identificar o parasita adulto no lúmen intestinal durante a necropsia (BOWMAN, 2010).

Entre os anti-helmínticos de amplo espectro e baixa toxicidade utilizados para combater parasitas gastrointestinais estão os benzimidazóis e pró-benzimidazois, incluindo o

tratamento de larvas hipobióticas (GOKBULUT et al., 2007). Ainda para o tratamento é indicado a utilização de drogas como pamoato de pirantel e milbemixina oxima (SCHENKER et al., 2006). O tratamento antiparasitário deve ser iniciado o mais cedo possível, preferencialmente a partir do 15º dia de vida sendo repetidas duas semanas após (BOWMAN, 2010).

Medidas de controle e profilaxia preveem além do tratamento rotineiro dos animais, a redução da contaminação ambiental (REY, 2001). Nos canis as superfícies devem ser fisicamente limpas (BOWMAN, 2010). Os ovos de *Toxocara* spp. são resistentes aos desinfetantes químicos, no entanto podem ser mortos pela ação do iodo aquoso, luz ultravioleta, altas temperaturas e secagem prolongada (CFSPH, 2005a). Roedores desempenham um papel significativo na epidemiologia da toxocaríase, sendo atraídos pela abundância de alimento disponível, dessa forma o investimento desratização poderá baixar o custo despendido no controle de parasitas de um canil (BOWMMAN, 2010). A contaminação pode ser reduzida nas áreas públicas por restrição dos cães e gatos não controlados, de recolha de fezes por proprietários e prevenção de acesso animal para cães locais públicos, como parques infantis (CFSPH, 2005a).

2.1.3 *Toxascaris leonina*

A espécie *T. leonina* pertence a mesma classificação taxonômica do parasita *Toxocara* spp., sendo os gatos, felídeos selvagens e cães os hospedeiros definitivos e os roedores os hospedeiros intermediários (BOWMAN, 2010). Os ovos de *T. leonina*, assim que liberados nas fezes não são infectantes, podendo se desenvolver a fase infecciosa (L3) dentro de 8 a 9 dias a 27°C (EPE, 2009). Após a ingestão do ovo pelo hospedeiro intermediário após a eclosão a larva invade a parede do intestino, mantendo-se durante aproximadamente uma semana antes de migrar para outros tecidos, onde encista (REY, 2001).

Quando o ovo infectante é ingerido pelo hospedeiro definitivo, ele eclode e a larva liberada invade a mucosa do intestino delgado evoluindo para o estágio L4, cerca de 3 a 5 semanas depois da infecção, atingindo um comprimento de cerca de 8 mm, situando-se no lúmen intestinal e na mucosa. Seis semanas depois da infecção as larvas mudam para o estágio final (L5) (BOWMAN, 2010). As fêmeas adultas podem atingir 10 cm de comprimento. A infecção restringe-se ao intestino delgado ocasionando aumento abdominal e diarreia, sendo que o diagnóstico pode ser realizado avaliando a presença de ovos nas fezes de caninos e felinos (MONTEIRO, 2010). No exame coproparasitológico os ovos apresentam-se

de tamanho regular, com uma cobertura grossa, lisa e incolor e um invólucro granulado que não ocupa totalmente o interior do ovo, não-segmentado e de coloração amarelo acastanhada (REY, 2001).

2.1.4 *Trichuris* spp.

As espécies de *Trichuris* pertencem a classe Enoplea, ordem Trichocephalida, família Trichuridae e gênero *Trichuris*, onde as espécies *Trichuris vulpis* e *Trichuris campanula* tem o cão e o gato como hospedeiros definitivos, respectivamente (BOWMAN, 2010). A infecção provocada por estes parasitas é frequente, encontram-se distribuídos mundialmente, porém pode passar despercebido clinicamente, sendo que, em geral, apenas infecções maciças causam diarreia (EPE, 2009). Este parasita é reconhecido por apresentar a porção anterior do corpo muito fina e longa, semelhante a um chicote, localizam-se no ceco e menos frequentemente no colón (MONTEIRO, 2010).

O parasita adulto tem 4-6 cm de comprimento, os ovos são característicos possuindo um opérculo saliente em cada um dos polos, casca lisa, coloração amarela ou castanha (URQUHART et al., 1996). O ciclo de vida é direto, sendo o hospedeiro infectado quando ingere ovos embrionados do ambiente. No intestino delgado os ovos eclodem desenvolvendo-se nas vilosidades e terminam sua maturação no intestino grosso (CFSPH, 2005b).

As medidas sanitárias e o tratamento antiparasitário dos animais periodicamente podem eliminar a carga parasitária, sendo indicado tratar os animais a cada dois ou três meses (BOWMAN, 2010). Como medidas profiláticas para diminuir a contaminação ambiental, cuidados com o saneamento básico e a redução de áreas úmidas, uma vez que os ovos deste parasita sobrevivem melhor em locais úmidos e sombrios (CFSPH, 2005b). Pisos cimentados, higienização dos canis e locais abrigados pelos animais, retirar as fezes com maior frequência também são medidas importante de prevenção (CFSPH, 2005b).

2.2 CESTOIDES

Os cestóides possuem o corpo segmentado em forma de fita, sendo formado por três regiões morfológicamente distintas, o escólex, o colo e o estróbilo (MONTEIRO, 2010). Os ovos dos cestóides possui uma oncosfera com o embrião hexacanto (6 ganchos) que quando ingerido pelo hospedeiro intermediário susceptível, desenvolve-se até a fase larvar (BOWMAN, 2010). Os parasitas adultos habitam o intestino delgado de mamíferos e aves e

na sua forma larval localizam-se em diversos tecidos e órgãos e sistema nervoso de mamíferos, aves, peixes e na cavidade geral de artrópodes (URQUHART et al., 1996). Estas formas larvais podem formar cistos únicos ou múltiplos, podendo apresentar-se como hidátide, cenuro, cisticerco, estrobilocerco ou cisticercoide (BOWMAN, 2010). São hermafroditas e heteroxenos, podendo ou não se reproduzir assexuadamente (MONTEIRO, 2010).

2.2.1 *Dipylidium caninum*

Parasita pertencente ao reino Metazoa, filo Platyhelminthes, classe Cestoda, ordem Cyclophyllidea, família Dipylidiidae e gênero *Dipylidium* (BOWMAN, 2010). O hospedeiro definitivo é o cão, podendo acometer humanos e os hospedeiros intermediários são as pulgas (*Pulex irritans*, *Ctenocephalides canis*, *C. felis*) e o piolho mastigador (*Trichodectes canis*) (MONTEIRO, 2010). Os animais adquirem a infecção através do cisticercoide presente nas pulgas e piolhos, sendo que o ciclo evolutivo se completa quando as larvas das pulgas e piolhos se infectam quando se alimentam dos segmentos eliminados nas fezes de cães infectados (REY, 2001).

A forma adulta de *D. caninum* não é patogênica e pode ser tolerada uma alta carga parasitária sem efeito clínico, porém pelo fato dos segmentos passarem ativamente através do ânus causando prurido, leva o animal a esfregar excessivamente o períneo, sendo este um sinal útil para suspeita de dipilidiose (URQUHART et al., 1996). A proglotíde gravídica é morfológicamente oval parecendo com sementes de pepino, no ambiente elas tendem a desidratar ficando com a aparência de um grão de arroz (REY, 2001). No tratamento dos animais pode ser utilizado praziquantel 5mg/kg via oral, sendo necessário o controle de pulgas e piolhos (CONBOY, 2009).

2.2.2 *Taenia* spp.

A classificação taxonômica do gênero *Taenia* e semelhante à do gênero *Echinococcus*, são encontradas nos cães as espécies *Taenia multiceps*, *Taenia hydatigena*, *Taenia ovis*, *Taenia serialis*, *Taenia krabbei* e *Taenia pisiformis* e os gatos podem albergar as espécies *Taenia pisiformis* e *Taenia taeniaeformis* (BOWMAN, 2010). O tamanho varia de acordo com a espécie e o grau de maturidade (REY, 2001).

O hospedeiro definitivo adquire a infecção através da ingestão de cisticercos nas vísceras ou carne contaminada de coelhos e roedores (*T. pisiformis*), ruminantes, equinos e suínos (*T. hydatigena*), ou na musculatura de ovelhas (*T. ovis*). Assim como, pela ingestão de cenuros no cérebro ou medula espinhal de ovelhas (*T. multiceps*) ou no tecido muscular e subcutâneo de coelhos e roedores (*T. serialis*) (CONBOY, 2009). Da mesma forma o gato pode se infectar pela ingestão do estrobilocerco (*T. taeniaeformis*) em presas contaminadas (BOWMAN, 2010).

O diagnóstico baseia-se observação e identificação das proglótides ou na detecção dos ovos em exame coproparasitológico direto ou de flutuação. A infecção em cães e gatos pode ser controlada através da administração de anti-helmínticos como o praziquantel, 5mg/kg uso oral, sendo eficaz no tratamento de *T. hydatigena*, *T. pisiformis*, *T. ovis* e *T. taeniaeformis* em gatos ou febendazol, 50mg/kg uso oral, durante três dias (CONBOY, 2009).

2.2.3 Spirometra spp.

O gênero *Spirometra* pertence ao reino Metazoa, filo Platyhelminthes, classe Cestoda, ordem Cyclophyllidea e a família Diphyllbothriidae, identificados por apresentar duas ranhuras em formas de fendas no escólex e os segmentos maduros mais largos que compridos (BOWMAN, 2010). Esta espécie utiliza artrópodes copépodes, anfíbios, reptéis pássaros e mamíferos como hospedeiro intermediário (REY, 2001). O cão, o gato e o guaxinim podem ser hospedeiros definitivos, iniciando a eliminação de ovos nas fezes 10 dias após a ingestão do estágio larval plerocercóide. Em regiões como Nova York, a cobra d'água *Natrix* encontra-se comumente infectada por plerocercóides de *S. mansonioides* (BOWMAN, 2010).

2.3 PROTOZOÁRIOS

Parasitas intracelulares obrigatórios pertencentes ao filo Apicomplexa, sendo os coccídias mais importantes por causar enterite devido ao seu desenvolvimento em células epiteliais do trato digestivo (XIAO, 2010). A transmissão é principalmente por contaminação fecal-oral (BOWMAN, 2010). Formados por células em forma de banana ou charuto que se apresenta arredondada em uma das extremidades e afilada na outra (apical) (REY, 2001).

2.3.1 *Cystoisospora* spp.

Protozoário inicialmente conhecido como *Isospora* spp., recentemente classificado como *Cystoisospora* spp, sendo considerada a coccidiose mais comum de cães (BOWMAN, 2010). As espécies *Cystoisospora canis* e *Cystoisospora felis* tem, respectivamente, o cão e o gato como hospedeiros definitivos (DUBEY, 2009). Outras espécies podem acometer cães como *C. burrowsi*, *C. neorivolta* e *C. ohioensis* e, também, gatos podem ser infectados pela espécie *C. rivolta* (LAPPIN, 2010). A infecção ocorre através da ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos esporulados (MONTEIRO, 2010).

No desenvolvimento do ciclo biológico do *C. canis*, o cão se infecta ao ingerir oocistos esporulados do ambiente e, também, pela ingestão de hospedeiros paratênicos ou intermediários (LAPPIN, 2010). Os oocistos esporulados contêm dois esporocistos e cada um destes contém quatro esporozoítos, após a ingestão destes, ocorre à ativação pela ação da bile e da temperatura intestinal, permitindo sua liberação e penetração na parede do intestino delgado, onde se arredondam e passam a ser chamados de trofozoítos (BOWMAN, 2010). Sucessivas gerações assexuadas são produzidas durante a esporogonia, formando os merontes (ou esquizontes) que contêm os merozoítos. Estas estruturas penetram novas células ou iniciam a fase sexuada originando macro ou micro gametócitos. Os microgametas saem da célula e fecundam os macrogametas formando os zigotos ou oocistos imaturos. Estes são eliminados nas fezes e no ambiente são esporulados (MONTEIRO, 2010).

A cistoisosporose é autolimitante, ou seja, a população de coccídeos cresce até o momento que o hospedeiro desenvolve imunidade e a partir desse ponto começa a reduzir ou até mesmo eliminar a infecção (BOWMAN, 2010). Contudo, se o animal estiver exposto continuamente a oocistos esporulados, existe o risco de desenvolver a doença, visto que a imunidade limita a infecção, mas não a exclui (REY, 2001). Os animais, geralmente não apresentam sinais clínicos, dependendo de fatores como a idade do animal, carga parasitária e do status imunológico. Os sinais clínicos apresentados podem ser vômitos, desconforto abdominal, inapetência e diarreia aquosa que, por vezes, contém sangue (LAPPIN, 2010).

O diagnóstico é realizado através de exames coproparasitológicos de flutuação e observação de oocistos em amostras de fezes, sendo que após a esporulação é possível identificar a espécie, contanto que se conheça o hospedeiro. Ainda, através do exame histopatológico das lesões intestinais, identificando-se as fases de merontes e gamontes e uma forma de diagnóstico em animais necropsiados (MONTEIRO, 2010). Nos animais com doença clínica devem-se administrar drogas anticoccidianas (trimetropim-sulfonamida,

amprólio, furazolidone, ponazurilo) e realizar o tratamento de suporte com fluidoterapia para correção da desidratação (DUBEY, 2009; LAPPIN, 2010). Segundo Litster (2014), o ponazurilo administrado por via oral, 50 mg/kg, durante 3 dias consecutivos foi eficaz no controle da coccidiose em cães e gatos.

O controle deve ser baseado na higiene e desinfecção dos utensílios, pisos, paredes e do ambiente em geral, além disso, fornecer boa alimentação e lotação animal adequada por área (MONTEIRO, 2010). A remoção precoce das fezes é importante para evitar a esporulação no ambiente (DUBEY, 2009). O tratamento das fêmeas gestantes antes do parto pode diminuir a ocorrência da coccidiose nos filhotes (LAPPIN, 2010).

2.3.2 *Cryptosporidium* spp.

O *Cryptosporidium* spp. é um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, intracelular obrigatório com capacidade de desenvolver-se nas microvilosidades intestinais de hospedeiros vertebrados (XIAO et al., 2004). O convívio das espécies deste protozoário com o hospedeiro, durante sua evolução tornou-os gradualmente adaptados a um determinado grupo de animais, desenvolvendo especificidade ao hospedeiro (BOWMAN, 2010). São descritas 26 espécies de *Cryptosporidium* spp., onde seis delas possuem importância na saúde pública, são descritos o *C. hominis*, *C. parvum*, *C. Meleagridis* e, ocasionalmente, *C. cuniculus*, *C. felis* e *C. canis*. Destes o *C. parvum* é o mais comumente relatado acometendo humanos (BOWMAN, 2010; CHALMERS & KATZER, 2013).

Os cães podem estar infectados com as espécies *C. parvum* e *C. canis* e os gatos com as espécies *C. parvum* e *C. felis* (REY, 2001). A transmissão ocorre por via fecal-oral, quando o animal tem hábitos de coprofagia, durante a limpeza do pelo, ainda por predação de espécies infectadas ou ingestão de água e alimento contaminado (SCORZA & TANGTRONGSUP, 2010). Os oocistos liberados nas fezes são esporulados e, portanto, infecciosos, sendo a excreção de oocistos mais comum em animais jovens ou sob situações de estresse (BOWMAN, 2010).

A maior parte dos animais infectados não apresenta sinais clínicos, podendo ser observados geralmente em animais menores de 6 meses e em animais imunocomprometidos, sendo os sinais clínicos mais comuns a diarreia aquosa, anorexia e perda de peso (SCORZA & TANGTRONGSUP, 2010). A infecção está associada com atrofia das vilosidades e inflamação, o que resulta na perda de área com superfície absorptiva e defeitos no transporte de nutrientes (XIAO, 2004).

Nos últimos anos houve um aumento nas pesquisas acerca do gênero *Cryptosporidium* e para isso os métodos de diagnóstico são de extrema importância. A técnica considerada referência para o diagnóstico de criptosporidiose é a coloração de Ziehl Neelsen, onde é observada a presença de esferas com coloração rosa ou avermelhada, com aproximadamente 5µm de diâmetro (BOWMAN, 2010). Os estudos moleculares propiciam a descrição de diversas espécies e genótipos do parasita, uma vez que utiliza a caracterização molecular de protozoários de origem humana, animal e ambiental. O material genético do protozoário pode ser amplificado a partir de amostras de fezes, sendo submetida a técnica de PCR (SCORZA & TANGTRONGSUP, 2010). No controle da criptosporidiose, medidas de higiene devem ser redobradas, principalmente no local onde o animal vive. Para evitar a transmissão é necessário isolar e tratar os animais infectados (MONTEIRO, 2010).

2.3.3 *Giardia* spp.

Protozoário flagelado pertencente ao filo Metamonada, subfilo Trichozoa, superclasse eophanryngia, classe Trepomonadea, subclasse Diplozoa, ordem Giardiida e família Giardiidae (PLUTZER et al., 2010). A espécie mais relatada é *Giardia duodenalis* podendo acometer vários mamíferos domésticos e selvagens, incluindo o homem. São descritas também *G. agilis*, *G. muris* e *G. microtti* sendo os hospedeiros definitivos, respectivamente, anfíbios, roedores e munhagos. Ainda as aves podem se parasitadas por *G. ardeae* e *G. psittaci* (THOMPSON, 2004; XIAO & FAYER, 2008).

A infecção por *Giardia* spp. tem distribuição cosmopolita, sendo que a prevalência varia de acordo com a localização geográfica, com diferenças na definição da população em estudo, nos diferentes métodos utilizados para determinar a prevalência e diagnóstico, na dificuldade na identificação dos oocistos e na eliminação intermitente do parasita (THOMPSON, 2000). Podem ser encontrados no trato gastrointestinal de humanos, animais domésticos e animais silvestres, incluindo aves e anfíbios. (TANGTRONGSUP & SCORZA, 2010).

No ciclo de vida existem os estádios de trofozoíta caracterizando a forma ativa e móvel encontrada no trato gastrointestinal. E o oocisto que representa o estágio resistente no ambiente, o qual vai ser o responsável pela transmissão da doença (TANGTRONGSUP & SCORZA, 2010). Os oocistos ambientalmente resistentes são veiculados nas fezes e podem ser transmitidos para outros hospedeiros diretamente ou através da comida e água (THOMPSON, 2000).

Os animais acometidos na maioria dos casos mantêm-se assintomáticos. A apresentação da doença clínica geralmente está associada a outros fatores estressantes como a superpopulação, o desmame, deficiências nutricionais e outras enfermidades (THOMPSON et al., 2000). Os sinais clínicos podem estar associados ou não a presença de diarreia, esta quando ocorre pode variar de pastosa a líquida, com presença de muco, odor forte e esteatorreia. A diarreia é geralmente auto-limitante em animais imunocompetentes (TANGTRONGSUP & SCORZA, 2010).

No diagnóstico é importante fazer uma triagem com técnicas de rotina, uma vez que maioria dos animais parasitados não manifesta sinais clínicos da doença e, além disso, geralmente existe uma infecção associada (THOMPSON et al., 2000). Apenas um resultado negativo não pode excluir definitivamente a infecção, pois os picos de excreção de oocistos não ocorrem ciclicamente, mas sim de um modo esporádico, sendo que a duração entre dois picos é de geralmente 2-7 dias (TANGTRONGSUP & SCORZA, 2010), assim deve-se analisar várias amostras durante 4-5 dias (THOMPSON et al., 2000).

A avaliação da presença de trofozoitos de *Giardia* spp. na clínica pode ser realizada utilizando o esfregaço fecal direto, para isso deverá ser utilizada a camada superficial das fezes ou o muco se presente, pois os trofozoitos encontram-se geralmente nesta área. A aplicação no esfregaço de solução de lugol ou azul-de-metileno ajuda a visualizar as estruturas internas dos trofozoítos (TANGTRONGSUP & SCORZA, 2010). A microscopia óptica mantém-se como a abordagem mais prática para o diagnóstico, sendo utilizada depois de métodos de flutuação com sulfato de zinco ou solução hipersaturada de açúcar. Estes métodos são mais sensíveis para a detecção de oocistos quando comparados com métodos de flutuação passiva (THOMPSON et al., 2000).

Um método indireto é o ELISA que detecta coproantígenos, porém são relativamente caros (THOMPSON et al., 2000). Neste teste podem ocorrer resultados falso-positivos, possivelmente devido a ligação não específica de outros coproantígenos aos reagente, enquanto que a ocorrência dos falso negativos seja o limite de sensibilidade do teste (TANGTRONGSUP & SCORZA, 2010).

Comparado a microscopia convencional os testes comerciais de imunofluorescência direta (IFD) aumentaram a sensibilidade na detecção de *Giardia* spp. permitindo uma maior determinação de taxas de prevalência (THOMPSON, 2004). Este método utiliza anticorpos monoclonais com marcador fluorescente que reage com os oocistos, tornando possível sua visualização no microscópio de fluorescência (TANGTRONGSUP & SCORZA, 2010).

Os métodos moleculares, como a PCR convencional e suas variações, podem ser utilizados para amplificar DNA de *Giardia* spp. presente nas fezes. A *assemblage* pode ser determinada através da avaliação da sequência de DNA a partir do produto de PCR. Os resultados para a determinação da *assemblage* poderão variar de acordo com o gene escolhido (TANGTRONGSUP & SCORZA, 2010).

O tratamento deve ser instituído sempre que for encontrado oocistos nas fezes, mesmo sem a apresentação de sinais clínicos. Isso é necessário devido ao potencial zoonótico de *Giardia* spp. (THOMPSON et al., 2000). A giardíase pode ser tratada utilizando febendazol (BOWMANN, 2010; THOMPSON et al., 2000), sendo eficaz na dosagem de 50 mg/kg, por via oral, uma vez por dia, durante três dias. Adicionalmente pode-se utilizar fibra na dieta para ajudar a controlar os sinais clínicos da doença, através da diminuição do crescimento bacteriano e da inibição da adesão dos agentes às microvilosidades intestinais (TANGTRONGSUP & SCORZA, 2010).

2.4 PRINCIPAIS PARASITAS ZOONÓTICOS

As zoonoses parasitárias geralmente não são fatais para o homem, entretanto, podem causar diarreias, anemias, alergias, além de gastos com diagnóstico e tratamento. Os hábitos e costumes inadequados dos seres humanos podem facilitar a transmissão (ROBERTSON et al., 2000; NEVES et al., 2014).

A larva de terceiro estágio (L3) de *Ancylostoma braziliense* é o principal agente etiológico da Larva Migrans Cutânea (LMC). Outros ancylostomatídeos como *A. caninum*, *Uncinaria stenocephala* e *Bunostomum phlebotomum* raramente podem causar a LMC. O homem é o hospedeiro acidental, sendo que a transmissão ocorre pelo contato direto da L3 com a pele por penetração ativa (ALIPOUR & GOLDUST, 2015). As larvas fazem migração intracutânea produzindo prurido intenso que pode resultar em escoriações ou infecções bacterianas secundárias agravando o quadro (ROBERTSON & THOMPSON, 2002). Os locais mais comuns de lesões por LMC em crianças são os pés, nádegas e mãos por serem áreas de contato direto como o solo durante as atividades recreativas. Também podem ser afetados locais como escroto, vulva e pernas (KATAGIRI & OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2007; CFSPH, 2013).

A toxocaríase é um problema de saúde pública e pode-se apresentar nas formas de larva migrans visceral, larva migrans ocular, larva migrans neural (neurotoxocaríase) ou larva migrans oculta (HOLLAND & HAMILTON, 2013). As fontes de infecção são o solo,

alimentos contaminados e o contato com ovos embrionado contendo a larva, podendo estar presentes no pelo do animal (LEE et al., 2010). Quando a forma infectante é ingerida pelo homem (hospedeiro acidental), evolui para o estágio infeccioso L3, mas não se desenvolve para fase adulta e migra pelo tecido somático, podendo causar reações inflamatórias graves e, conseqüentemente, diferentes manifestações patológicas e clínicas dependendo da região afetada (STRUBE et al., 2013). Os órgãos mais afetados são olhos, cérebro, fígado e pulmão, contudo, outros como coração e músculos também podem ser afetados (CFSPH, 2005a).

Toxocara canis e *Toxocara cati* são identificados como causadores de doença no homem. *T. canis*, ascarídeo comum do cão, é reconhecido como principal agente causador da Larva Migrans Visceral em crianças. O ascarídeo de gatos, *T. cati*, também pode causar doenças em humanos, porém devido ao hábito de defecação de gatos é causa menos frequente (BOWMANN, 2010). Filhotes de cães são mais frequentemente infectados por *T. canis* que adultos e por isso de maior importância na epidemiologia da transmissão a humanos. Contudo, cães adultos nem sempre estão imunes a infecções por *T. canis* e podem contribuir significativamente para a contaminação ambiental (LEE et al., 2010).

O gênero *Trichuris* está mundialmente distribuído, sendo estimado cerca de um bilhão de pessoas infectadas no mundo, destas, aproximadamente 350 milhões apresentam idade inferior a 15 anos e geralmente, estão expostas a infecções com alta carga parasitária (NEVES, 2005). Apesar do agente da trichuríase humana ser *Trichuris trichura*, *T. vulpis* parasito de cães, pode eventualmente, ser zoonótico, sendo que os seres humanos se infectam através da ingestão de solo ou água contaminada (EPE, 2009). No homem pode ocasionar distensões abdominais e diarreia, além de suas lesões poderem levar a infecções secundárias por bactérias (ROBERTSON et al., 2000).

A dipidilíose é uma doença causada por um cestóide extremamente comum em cães e em menor frequência em gatos. Seres humanos e animais podem tornar-se parasitados pela forma adulta do parasita através da ingestão de hospedeiros intermediários, são eles: as pulgas (*Pulex irritans*, *Ctenocephalides canis*, *Ctenocephalides felis*) e o piolho mastigador (*Trichodectes canis*) (MONTEIRO, 2010). Normalmente a infestação nos indivíduos exibe sintomas clínicos, ocorrendo com maior frequência em crianças jovens (NEVES, 2005).

Giardia duodenalis é um parasita intestinal frequentemente encontrado no homem, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que ocorram mais de 200 milhões de casos anuais de giardíase na África, Ásia e América Latina, com elevada morbidade mundial, acometendo cerca de 280 milhões de pessoas a cada ano (THOMPSON et al., 2000;

FRASSON et al., 2010). As manifestações clínicas variam desde uma enterite autolimitada, até diarreias crônicas e debilitantes, com esteatorreia e perda de peso (REY, 2002).

As formas evolutivas são o trofozoíto e o cisto. A primeira é a forma vegetativa que causa a giardíase e habita o intestino delgado do hospedeiro e o cisto é a forma de resistência no ambiente externo e transmissível aos hospedeiros susceptíveis. O cisto é intermitentemente liberado pelas fezes, tornando-se imediatamente infeccioso, permanecendo assim por meses em condições adequadas de temperatura e umidade relativa do ar (FENG & XIAO, 2011). A transmissão se dá pela ingestão de cistos quer seja por contato direto, via fecal-oral, como por ingestão de água e alimentos contaminados (SOUSA et al., 2006).

Cryptosporidium spp. infecta o intestino de uma grande variabilidade de hospedeiros, incluindo cães e gatos (MEIRELES, 2010). Estes animais podem servir de reservatórios deste protozoário e por consequência, fonte de infecção para humanos (XIAO et al., 2004; RYAN et al., 2014). O potencial zoonótico de *Cryptosporidium* spp. isolados de cães e gatos pode ser limitado (PALMER et al., 2008) ou esporádico (XIAO et al., 2007; BESER et al., 2015). Além disso, trabalhos envolvendo a caracterização molecular tem demonstrado a possibilidade de infecção em humanos e animais (CAMA et al., 2008; XIAO, 2010).

São descritas 29 espécies de *Cryptosporidium* spp., destas seis possuem importância na saúde pública (CHALMERS & KATZER, 2013), sendo considerados agentes zoonótico *Cryptosporidium hominis* (MORGAN-RYAN et al., 2002), *C. parvum* (SULAIMAN et al., 1998), *Cryptosporidium Meleagridis* e, ocasionalmente, *Cryptosporidium cuniculus*, *Cryptosporidium felis* e *Cryptosporidium canis* (XIAO, 2010), sendo *C. parvum* mais comumente relatado acometendo humanos (MEDEMA, 2009). A transmissão ocorre pela rota fecal-oral de oocistos por contato direto com pessoas ou animais infectados e ou indireto pela ingestão de alimento e água contaminados. Pode também ocorrer transmissão pelo ar (O'DONOGHUE, 1995; XIAO, 2010).

As taxas de prevalência em indivíduos assintomáticos variaram de 0 a 2% em países desenvolvidos e em países em desenvolvimento de 0 a 9,8%. A alta prevalência de infecção em países menos desenvolvidos pode ser devido à falta de saneamento, fontes de água contaminadas, superpopulação ou contato com animais domésticos (O'DONOGHUE, 1995). A dose infectante em seres humanos não é conhecida, mas acredita-se que deve ser muito pequena, provavelmente de 10-100 oocistos. Porém, a dose infectante deve variar dependendo da fonte, subtipo ou cepa do parasito, umidade, viabilidade dos oocistos, exposição dos oocistos ao estresse ambiental, e outros fatores pobremente compreendidos tais como virulência (MEINHARDT et al., 1996).

3 ARTIGO

Artigo a ser submetido para a revista *Parasitology Research*

Molecular detection of *Cryptosporidium* spp. and occurrence of gastrointestinal parasites in fecal samples of naturally infected dogs and cats

Marta Elena Machado Alves^{1*}, Felipe Danyel Cardoso Martins², Patrícia Bräunig¹, Felipe Lamberti Pivoto¹, Luís Antonio Sangioni¹, Fernanda Silveira Flores Vogel¹

Abstract Cats and dogs are hosts of a large number of gastrointestinal parasites, eliminating helminths eggs and protozoan cysts and oocysts in feces. The close relationship between companion animals and humans intensifies human exposure to zoonosis. In this study, 177 feces samples were collected, 128 from dogs and 49 from cats of both sexes and varied ages. DNA was extracted from all samples and *Cryptosporidium* SSU rRNA gene was amplified in 5.6% (10/177) of the fecal samples using Nested-PCR. Amplification was observed in 4.6% (6/128) from dogs samples and 8.2% (4/49) from cats samples. Genetic sequencing from Nested PCR positive samples identified *C. canis* (66.6% - 4/6) and *C. parvum* (33.3% - 2/6) in dogs feces and *C. felis* (75% - 3/4) and *C. parvum* (25% - 1/4) in cats feces. Frequency detection rate of *Cryptosporidium* spp. was 5.6% (10/177) using molecular method and 22.6% (40/177) by Ziehl Neelsen. One or more gastrointestinal parasites were observed in 56.2% (72/128) from dog fecal samples and in 53.0% (26/49) from cat fecal samples using Sheather, Faust and Ziehl Neelsen methods. In dogs, *Ancylostoma* spp. (36.7%) was the most frequent parasite observed and *Cryptosporidium* spp. (22.4%) in cats. Parasitic monoinfection was present in 70.8% (51/72) of dogs samples and 46.1% (12/26) of cats samples, multi-infection was observed in 29.2% (21/72) and 53.8% (14/26) of dogs and cats f samples, respectively. The present study demonstrated significant frequencies of gastrointestinal parasites infection in companion animals and highlight the presence of zoonosis agents.

Key-words helminths, protozoa, Nested PCR, DNA sequencing, zoonosis.

Introduction

Parasitic diseases caused by helminths and protozoa of the gastrointestinal tract are common among animals and humans and worldwide distributed (Ferreira et al. 2011; Chen et al. 2012). Dogs (*Canis familiaris*) and cats (*Felis catus*) are definitive hosts of a large number of parasites, excreting eggs of helminths and / or cysts and oocysts of gastrointestinal protozoa in feces, allowing biological cycle maintenance, environmental

* Corresponding author at: Marta Elena Machado Alves marta.elenamachado@gmail.com.

¹Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Av. Roraima, nº 1000, Prédio 44, Sala 5149, Bairro Camobi. CEP: 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

²Laboratório de Protozoologia, Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Estadual de Londrina (UEL). Rodovia Celso Garcia Cid, PR445, KM388. CEP: 86057-970, Londrina, PR, Brasil.

contamination and the possibility of parasitic diseases spread (Bowman et al. 2010). The major parasites involved in gastrointestinal diseases include larval forms of *Ancylostoma* spp., *Toxocara* spp., *Echinococcus granulosus*, *Dipylidium caninum* e *Strongyloides stercoralis* and protozoan as *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. (Gennari et al. 2001).

Relation between people and companion animals are becoming increasingly close (Robertson et al. 2000; Paul et al. 2010), therefore human exposure to agents that cause zoonosis is a risk factor, requiring maintenance of healthy animals to reduce the transmission of zoonotic parasites (Robertson et al. 2000). Furthermore, it is essential to appropriately determine the infectious agents with zoonotic potential in order to establish measures to control zoonosis, to minimize environmental contamination by infective forms and consequently reduce the risks of transmission to humans and animals (Ferreira et al. 2013).

Although the zoonotic potential of *Cryptosporidium* is highly questioned, results of molecular epidemiological studies strongly suggest the zoonotic transmission of some species and the most prevalent zoonotic species is *Cryptosporidium parvum* (Cama et al. 2008; Xiao and Fayer 2008; Xiao 2010). *Cryptosporidium* spp. infects a wide range of hosts, including dogs and cats which can serve as reservoirs of this protozoan and therefore a source of infection for humans due to the close relationship between pets and humans (Xiao et al. 2004; Meireles 2010; Ryan et al. 2014).

Laboratorial diagnostic of Cryptosporidiosis usually occurs through the identification of the parasite in the feces, by oocyst concentration methods (Huber et al. 2003) associated with staining techniques as Ziehl Neelsen, Kinyoun and Giemsa (Garcia et al. 1983). Furthermore, immunofluorescence (IF) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) are also frequently used as diagnostic methods (Rimhanen-Finne et al. 2007). However, molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* is essential for accurately identifying organisms and assessing zoonotic transmission (Xiao and Fayer 2008). PCR, genetic sequencing and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) are the most frequently methods used for molecular identification and characterization and small subunit (SSU) rRNA gene is generally used in genotyping *Cryptosporidium* in humans, animals and water samples (Xiao and Fayer 2008; Xiao 2010).

Therefore, due to the crucial role of companion animals in parasitic zoonosis epidemiology the objectives of this study were I) to determine the occurrence of gastrointestinal parasites and II) molecular detection and characterization of *Cryptosporidium* in fecal samples of dogs and cats naturally infected.

Materials and methods

Samples From February to April 2017, a total of 177 fecal samples were collected, 128 from dogs and 49 from cats of both sex and different age. Feces samples were obtained from animals under veterinary attention at the University Veterinary Hospital (HVU) of Santa Maria Federal University (UFMS), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. Animal's choice was randomly made according availability; fecal samples were collected in collectors, identified and stored at 4 °C until analysis, which occurred until 48 hours after collection. Collection procedure was performed at the moment of defecation, directly into a sterile receptacle.

Coproparasitological examinations Initially, the 177 samples were analyzed macroscopically, in order to observe the presence of mucus, blood, tissue, larvae and proglotides. After macroscopic analysis,

coproparasitological exams were performed in duplicate by the techniques of modified Sheather (1923), using saturated sugar solution with density of 1.27 g/mL, and Faust et al. (1938), using zinc sulfate solution of density 1.18 g/mL, to evaluate the presence or absence of helminth eggs, cysts and protozoan oocysts.

Ziehl Neelsen Stain 177 fecal samples, in duplicate, from dogs and cats were investigated for the presence of *Cryptosporidium* spp. using Ziehl Neelsen staining, according to Henriksen & Pohlenz (1981). The oocysts color and characteristics were observed by optical microscopy under 1000X immersion objective and oocysts number was counted, examination covered all slide.

DNA extraction Total DNA was extracted from approximately 200mg of each fecal sample using the Purelink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions. Purified DNA samples were stored at -20 °C for further downstream molecular analysis.

Molecular detection Detection of *Cryptosporidium* spp. DNA was achieved using a Nested PCR method targeting a region of the small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) gene of the parasite (Xiao et al. 2004). For the primary PCR (expected amplicon size: 1325bp), primers used were: Forward (F1): 5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3' and Reverse (R1): 5'-CCCATTTCTTCGAAACAGGA-3'. For the secondary PCR (expected amplicon size: 819–825bp, depending on the species), the following primers were used: Forward (F2): 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3' and Reverse (R2): 5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3'.

The primary polymerase chain reaction (PCR) contained: 0.2 µM of each primer, 1X Taq buffer, 0.28 mM of desoxyribonucleotide, 1U of Taq DNA polymerase GoTaq® (Hot Start Polymerase, Promega, USA), 1.5mM MgCl₂, 30ng/µl approximately of DNA sample and milliQ water up to a total volume of 25µl. The conditions for the secondary PCR were the same as for the primary PCR, except the use of a different pair of primers and 5µl of the first PCR amplification as template in a 50µl final reaction volume. Genomic DNA from *Cryptosporidium parvum* was used as positive control and MilliQ water was used as negative control.

PCR was performed on a thermocycler (T100™ Thermalcycler, Bio-Rad, Singapore), with initial denaturation at 94 °C for 3 min; followed by 40 cycles of 94 °C for 45s, 55 °C for 45s and 72 °C for 1 min, and final extension of 72 °C for 7 min. Conditions were the same for first and second reactions, except 35 cycles in the second reaction. PCR products were analyzed on 1% agarose gel stained with SYBR® safe DNA stain (Invitrogen™, USA) and visualized by UV illumination.

Gene sequencing Positive PCR products from the second amplification were purified using QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen™, Germany) according to manufacturer's instructions and final purified DNA was analyzed using spectrophotometer NanoDrop 1000 (ThermoScientific, USA) for concentration determination. After PCR purification, the sequencing reactions were performed using 5pmol of internal primers (F2 or R2) separately, 30-60ng of purified PCR product and MilliQ water in a final volume of 6µl. Followed by dehydration at 60 °C for 2 hours and finally submitted to sequencing (ACTGENE - Serviço de Sequenciamento, Brazil). The results obtained were analyzed using StandenPackage software and the generated nucleotides sequences evaluated in Genbank NCBI database blast search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Statistical Analysis Sample size was determined by finite population formula as described by Thursfield (2004). The results were compared by Chi-Square test and Odds Ratio (OR) using the GraphPad Prism program. A confidence level of 95% was considered for statistical significance.

Ethics Committee for Animal All experimental practices involving animals were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation at Santa Maria Federal University (CEUA/UFSM) (approval number 6213201016).

Results and Discussion

A total of 177 samples from dogs and cats were analyzed by Sheather and Faust methods and Ziehl Neelsen staining and the results are demonstrated in Tables 1 and 2. One or more gastrointestinal parasites were observed in 72 (56.2%) from 128 dog fecal samples and in 26 (53.0%) from 49 cat fecal samples (Figura 1). Parasites species distribution in dog samples were: *Ancylostoma* spp., *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., *Cystoisospora* spp., *Taenia* spp., *Toxocara canis*, *Trichuris* spp. and *Dipylidium caninum* (Table 2). *Ancylostoma* spp. was the most frequent detected 36.7% (47/128) in the analyzed dogs samples and this result is in accordance to The Center for Food Security & Public Health (CFSPH) (2013) which reported that the genus *Ancylostoma* is widespread, and can be found in many different places in the world. *Ancylostoma* has an important zoonotic role, the infective larvae of this genus are very important in public health since they can penetrate the human skin and cause serpiginous dermatitis or Larva Migrans Cutane (Katagiri & Oliveira-Sequeira 2007; Bowman et al. 2010). Therefore, the frequency of infection of the dogs by *Ancylostoma* found in the present study highlights the relevant human risk of infection by companion animals.

In cats samples, *Cryptosporidium* spp. was the most frequent observed (22.4%), followed by *Ancylostoma* spp., *Cystoisospora* spp., *Toxocara cati*, *Giardia* spp., *Spirometra* spp., *Taenia* spp. and *Toxascaris leonina* (Table 2). *Cryptosporidium* spp. oocysts excreted in the feces are already sporulated and, consequently, infectious (Smith et al., 2005) therefore, an appropriately identification of the *Cryptosporidium* species that infect humans and animals are necessary to better characterize the infection sources in humans and to a better understanding of *Cryptosporidium* epidemiology (Fayer 2010). Results of molecular epidemiologic studies strongly support the public health importance of *Cryptosporidium* species in various animals and also suggesting the importance of zoonotic transmission (Huber et al. 2007; Ryan et al. 2014).

Despite the low frequency detection of *Toxocara* spp. (Tables 1 and 2), the detection of this zoonotic helminth in the present study is very relevant due the zoonosis that they cause. Toxocariasis is frequently described (Despommier 2003), may present clinically forms of visceral larva migrans, larva migrans ocular, larva migrans neural (neurotoxocariasis) or hidden larva migrans and consequently a significant impact on human health (Holland & Hamilton 2013). Thus, although less frequent, *Toxocara* spp. is very important from the point of view of public health.

Cryptosporidium spp. detection was performed through the staining of Ziehl Neelsen and by Nested PCR. From the 177 analyzed feces samples 22.6% and 22.4% were positive for Ziehl Neelsen in dogs and cats, respectively (Table 2). Oocyst was visualized in pink color, spherical or oval format with smooth wall and

measuring approximately 4 to 7 μm (O'Donoghue 1995) (Figure 2). These infections rate was interesting since several studies carried out in Brazil indicated that oocysts of this protozoan have low detection rates in feces (Gennari et al. 2007; Katagiri & Oliveira-Sequeira 2008). Samples positive in Ziehl Neelsen method were also positive in Nested PCR, there was a 100% correlation of the results. DNA was extracted from all 177 fecal samples and 5.6% (10/177) samples amplified a 819–825bp product, corresponding a region of the SSU rRNA gene that was amplified in 4.7% (6/128) and 8.2% (4/49) samples from dogs and cats respectively (Figure 3).

Sequences of the SSU rRNA gene have been used because of their universal distribution and use of generic primers (Xiao 2004). The Nested PCR method used in the present study showed a 5.6% (10/177) frequency detection rate compared with 22.6% (40/177) of the traditional Ziehl Neelsen staining. Notably, it is important to highlight that the nature of the sample is a key factor for *Cryptosporidium* DNA extraction and amplification. Oocysts number and presence of inhibitors in fecal sample greatly influence PCR detection of *Cryptosporidium* DNA (Wilson 1997; Caccio` et al. 2005). Distribution of oocysts in fecal samples may result in insufficient amounts used in laboratorial diagnosis (Scorza et al. 2003). Oocyst excretion may vary depending on a number of factors as: host susceptibility, life cycle phase and intermittent excretion resulting in variable amounts of oocysts elimination (Tzipori 1988; Xiao 2010). Therefore, the inconstant number of oocyst in feces greatly affect both traditional and molecular diagnosis methods.

Cryptosporidiosis epidemiological studies using molecular methods have been widely used in animal, human, and environmental samples (Meireles 2010; Xiao 2010). The zoonotic potential of *Cryptosporidium* spp. isolated from dogs and cats are believed to be limited (Palmer et al. 2008) or sporadic (Xiao et al. 2007; Beser et al. 2015). However, molecular studies strongly suggested *Cryptosporidium* transmission between humans and animals (Cama et al. 2008; Xiao 2010). There are described 29 species of *Cryptosporidium* and six species have importance in public health (Chalmers & Katzer 2013; Zahedi 2016). *C. hominis* (Morgan-Ryan et al. 2002), *C. parvum* (Sulaiman et al., 2002), *C. Meleagridis*, *C. cuniculus*, *C. felis* and *C. canis* (Xiao 2010) are considered zoonotic. *C. parvum* and *C. hominis* are the most commonly reported affecting humans (Medema 2009).

Dogs and cats are frequently infected by *C. canis* (Fayer et al. 2001) and *C. felis* (Iseki 1979; Smith et al. 2007), respectively. *Cryptosporidium* species identified by Nested PCR followed by genetic sequencing were *C. canis* (66.6% - 4/6) and *C. parvum* (33.3% - 2/6) in dogs and *C. felis* (75% - 3/4) and *C. parvum* (25% - 1/4) in cats. Nucleotides alignment between sequences obtained in genetic sequencing and Genbank deposited sequences showed identity of 99% for *C. parvum*; 99-100% for *C. canis* and 99% for *C. felis* (accession numbers: KU679364.1, KX259139.1, MG516774.1, KY483980.1, KM977642.1, AF112575.1). Infected companion animals excrete *Cryptosporidium* oocysts in feces contaminating the environment and serving as source of infection for other animals and humans (Gałęcki & Sokół 2015).

Parasitic monoinfection was present in 70.8% (51/72) of the dogs samples and 46.1% (12/26) of the cats samples. On the other hand, multi-infection was observed in 29.1% (21/72) of the dogs and 53.8% (14/26) of the cats. The association of parasites found in dogs and cats samples is described in Table 1. Infection by one gastrointestinal parasite was more frequent observed than parasite associations in the feces analyzed in the present study, mainly in dogs, and monoinfection rates have been found more frequently in relation to multi-infection rates (Savilla et al. 2011). However, results of gastrointestinal infection, in companion animals, vary depending on several factors: environmental contamination by infective forms, geographic characteristics

(temperature, humidity and solar incidence) and sensitivity of laboratorial techniques employed in diagnosis (Palmer et al. 2008; Savilla et al. 2011).

There was no significant difference ($p>0.05$) for age and sex in dogs. However 57.8% (15/49) of the parasite infected cats were in the age ranging from 1 to 4 years and the correlation of the risk factor was significant ($p<0.05$). There was not difference related to sex of the infected animals evaluated and only in cats the age demonstrated to be relevant for infection rate. Parasitic infection in animals occurs due several factors and several studies have demonstrated that it is most frequent in young or immunosuppressed animals (Scorza & Tangtrongsup 2010; Riggio et al. 2013; Jian et al. 2014).

Therefore, taking in account the results obtained in the present study, mainly due to the zoonotic potential of some species, the correct diagnosis and parasite identification are fundamental for effective drugs treatments and prevention and control of gastrointestinal parasites in companion animals and humans.

Conclusions

Microscopic diagnosis methods demonstrated high infection frequencies of gastrointestinal parasites in dogs and cats feces from veterinary attention at the University Veterinary Hospital, including significant presence of parasites with relevance in public health. Molecular methods identified the species of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium canis* present in feces from dogs and *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium felis* feces from cats. Gastrointestinal parasites infection revealed to be common in dogs and cats.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Beser J, Toresson L, Eitrem R, Troell K, Krusnell JW, Lebbad M (2015) Possible zoonotic transmission of *Cryptosporidium felis* in a household. *Infect. Ecol. Epidemiol* 5:1. doi: 10.3402/iee.v5.28463
- Bowman DD, Montgomery SP, Zajac AM, Eberhard ML, Kazacos KR (2010) Hookworms of dogs and cats as agents of cutaneous larva migrans. *Trends Parasitol* 26(4): 162-167. doi: 10.1016/j.pt.2010.01.005
- Caccio` SM, Thompson RCA, McLauchlin J, Smith HV (2005) Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol* 21(9): 430–437. doi: 10.1016/j.pt.2005.06.013
- Cama VA, Bern C, Roberts J, Cabrera L, Sterling CR, Ortega Y, Gilman RH, Xiao L (2008) *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. *Emerg Infect Dis.* 14:1567-1574. doi: 10.3201/eid1410.071273
- Chalmers RM, Katzer F (2013) Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends Parasitol* 29(5): 237-251. doi: 10.1016/j.pt.2013.03.001
- Chen J, Xu MJ, Zhou DH, Song HQ, Wang CR, Zhu XQ (2012) Canine and feline parasitic zoonoses in China. *Parasit Vectors* 5:152. doi: 10.1186/1756-3305-5-152
- Dantas-Torres F, Otranto D (2014) Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: opening the black box. *Parasit Vectors* 7: 22. doi: 10.1186/1756-3305-7-22

- Despommier D (2003) Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology and molecular aspects. *Clin. Microbiol. Rev* 16(2): 265–272. doi: 10.1128/CMR.16.2.265-272.2003
- Faust EC, D’Antoni JS, Odon V, Miller MJ, Perez C, Sawitz W, Thomen LF, Tobie J, Walker JH (1938) A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. I. Preliminary communication. *Am. J. Trop. Med* 18(2): 169-183. doi: doi.org/10.4269/ajtmh.1938.s1-18.169
- Fayer R (2010) Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp. Parasitol* 124: 90–97. doi: 10.1016/j.exppara.2009.03.005
- Fayer R, Trout JM, Xiao L, Morgan UM, Lai AA, Dubey JP (2001) *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J. Parasitol* 87:1415–1422. doi: 10.1645/0022-3395(2001)087[1415:CCNSFD]2.0.CO;2
- Ferreira FP, Dias RCF, Martins TA, Constantino C, Pasquali AKS, Vidotto O, Freire RL, Navarro IT (2013) Frequência de parasitas gastrointestinais em cães e gatos do município de Londrina, PR, com enfoque em saúde pública. *Semin: Cien. Agrar* 34(6): 3851-3858. doi: 10.5433/1679-0359.2013v34n6Supl2p3851
- Ferreira FS, Pereira-Baltasar P, Parreira R, Padre L, Vilhena M, Távora LT, Atouguia J, Centeno-Lima S (2011) Intestinal parasites in dogs and cats from the district of Évora, Portugal. *Vet. Parasitol* 179: 242–245. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.02.003
- Gałęcki R, Sokół R (2015) *Cryptosporidium canis* and *C. felis* as a potential risk to humans. *Pol. J. Natur. Sc* 30(2): 203–212.
- Garcia LS, Brewer TC, Bruckner DA, Shimizu RY (1983) Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. *J. Clin. Microbiol* 18(1): 185-190.
- Gennari SM, Pena HFJ, Blasques LS (2001) Frequência de ocorrência de parasitos gastrintestinais em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. *Vet. News* 8(52): 10-12.
- Gil H, Cano L, De Lucio A, Bailo B, De Mingo MH, Cardona GA, Fernández-Basterra JA, Aramburu-Aguirre J, López-Molina N, Carmena D (2017) Detection and molecular diversity of *Giardia duodenalis* and spp. in sheltered dogs and cats in Northern Spain. *Infect. Genet. Evol* 50: 62–69. doi: 10.1016/j.meegid.2017.02.013
- Henriksen SA, Pohlenz JFL (1981) Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta. Vet. Scand* 22(2-3): 594-596.
- Holland CV, Hamilton CM (2013) The significance of cerebral toxocariasis: a model system for exploring the link between brain involvement, behaviour and the immune response. *J. Exp. Biol* 216: 78-83. doi: 10.1242/jeb.074120
- Huber F, Bomfim TC, Gomes RS (2003) Comparação da eficiência da técnica de sedimentação pelo formaldeído-éter e da técnica de centrífugo-flutuação modificada na detecção de cistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* sp. em amostras fecais de bezerros. *Ver. Bras. Parasitol. Vet* 12(2): 135-137.
- Huber F, Silva S da, Bomfim TCB, Teixeira KRS, Bello AR (2007) Genotypic characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil. *Vet. Parasitol* 150: 65–74. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.08.018
- Iseki M (1979) *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. *Jpn. J. Parasitol* 28:285–307.
- Jian F, Qi M, He X, Wang R, Zhang S, Dong H, Zhang L (2014) Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* in dogs in Henan Province, China. *Vet. Res* 10(1): 26. doi: 10.1186/1746-6148-10-26

- Katagiri S, Oliveira-Sequeira TCG (2007) Zoonoses causadas por parasitas intestinais de cães e o problema do diagnóstico. *Arq. Inst. Biol* 74(2): 175-184.
- Katagiri S, Oliveira-Sequeira TCG (2008) Prevalence of dog intestinal parasites and risk perception of zoonotic infection by dog owners in São Paulo State, Brazil. *Zoonoses Public Health* 55: 406–413. doi: 10.1111/j.1863-2378.2008.01163.x
- Medema G (2009) Risk assessment of *Cryptosporidium* in drinking water. World Health Organization. Disponível em: < http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70117/1/WHO_HSE_WSH_09.04_eng.pdf>. Acesso em 21 de mar. 2017.
- Meiros MV (2010) *Cryptosporidium* infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. *Rev. Bras. Parasitol. Vet* 19:197-204. doi: 10.1590/S1984-29612010000400002
- Morgan-Ryan UM, Fall A, Ward LA, Hijjawi N, Sulaiman I, Fayer R, Thompson RC, Olson M, Lal A, Xiao L (2002) *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from Homo sapiens. *J. Eukaryotic Microbiol* 49: 433-440. doi: 10.1111/j.1550-7408.2002.tb00224.x
- Palmer CS, Traub RJ, Robertson ID, Devlin G, Rees R, Thompson RC (2008) Determining the zoonotic significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Australian dogs and cats. *Vet. Parasitol* 154: 142–147. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.02.031
- Paul M, King L, Carlin EP (2010) Zoonoses of people and their pets: a US perspective on significant pet-associated parasitic diseases. *Trends Parasitol* 26(4): 153-154. doi: 10.1016/j.pt.2010.01.008
- Riggio F, Mannella R, Ariti G, Perrucci S (2013) Intestinal and lung parasites in owned dogs and cats from central Italy. *Vet. Parasitol* 193:78–84. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.11.026
- Rimhanen-Finnea R, Enemark HL, Kolehmainena J, Toropainen P, Hänninen ML (2007) Evaluation of immunofluorescence microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay in detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in asymptomatic dogs. *Vet. Parasitol* 145: 345–348. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.01.008
- Robertson ID, Irwin PJ, Lymbery AJ, Thompson RC (2000) The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. *Int J Parasitol* 30: 1369-1377. doi: 10.1016/S0020-7519(00)00134-X
- Ryan U, Fayer R, Xiao L (2014) *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitol* 141: 1667–1685. doi: 10.1017/S0031182014001085
- Savilla TM (2011) Prevalence of dog intestinal nematode parasites in south central West Virginia, USA. *Vet. Parasitol* 178: 115–120. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.12.034.
- Scorza AV, Brewer MM, Lappin MR (2003) Polymerase chain reaction for the detection of *Cryptosporidium* sp. in cat feces. *J. Parasitol* 89(2): 423–426. doi: 10.1645/0022-3395(2003)089[0423:PCRFTD]2.0.CO;2
- Scorza V, Tangtrongsup S (2010) Update on the diagnosis and management of *Cryptosporidium* spp infections in dogs and cats. *Top. Companion. Anim. Med* 25(39): 163-169. doi: 10.1053/j.tcam.2010.07.007
- Sheather AL (1928) The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technic. *J. Comp. Ther* 36: 266-275. doi: 10.1016/S0368-1742(23)80052-2
- Smith HV, Caccio` SM, Cook N, Nichols RAB, Tait A (2007) *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Vet. Parasitol* 149: 29–40. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.07.015
- Smith HV, Nichols RA, Grimason AM (2005) *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends Parasitol* 21(3): 133-142. doi: 10.1016/j.pt.2005.01.007

- Sulaiman IM, Xiao L, Yang C, Escalante L, Moore A, Beard CB, Arrowood MJ, Lal AA (1998) Differentiating human from animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. *Emerg. Infect. Dis.* 4: 681-685. doi: 10.3201/eid0404.980424
- The Center for Food Security & Public Health [CFSPH] (2013) Animal disease factsheet: zoonotic hookworms. Ames, USA: Iowa State University. Disponível em: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/hookworms.pdf>. Acesso em 05 abr. de 2017.
- Thursfield MV (2004) *Epidemiologia veterinária*. 2.ed. São Paulo: Roca. 556p.
- Tzipori S (1988) Cryptosporidiosis in perspective. *Adv. Parasitol.* 27: 63-129.
- Wilson IG (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* 63(10): 3741–3751.
- Xiao L, Fayer R (2008) Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int. J. Parasitol* 38: 1239–1255. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.03.006
- Xiao L (2010) Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Exp. Parasitol* 124: 80–89. doi: 10.1016/j.exppara.2009.03.018
- Xiao L, Cama VA, Cabrera L, Ortega Y, Pearson J, Gilman RH (2007) Possible transmission of *Cryptosporidium canis* among children and a dog in a household. *J. Clin. Microbiol* 45(6): 2014-2016. doi: 0.1128/JCM.00503-07
- Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ (2004) *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. *Clin. Microbiol. Rev* 17:72–97. doi: 10.1128/CMR.17.1.72–97.2004
- Zahed A, Paparini A, Jian F, Roberstson I, Ryan U (2016) Public health significance of zoonotic *Cryptosporidium* species in wildlife: Critical insights into better drinking water management. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 5(1): 88-109. doi: 10.1016/j.ijppaw.2015.12.001

Table 1 – Detection of monoinfection and multi-infection of gastrointestinal parasites in fecal samples from naturally infected dogs and cats using the techniques of Sheather, Faust and Ziehl Neelsen staining.

Gastrointestinal parasites	Dogs (n = 128)		Cats (n = 49)	
	Positive number	(%)	Positive number	(%)
Monoinfecção	51	70,8	12	46,1
<i>Ancylostoma</i> spp.	26	20,3	4	8,2
<i>Cryptosporidium</i> spp.	13	10,1	3	6,1
<i>Dipylidium caninum</i>	2	1,6	-	-
<i>Giardia</i> spp.	5	3,9	1	2,0
<i>Cystoisospora</i> spp.	2	1,6	1	2,0
<i>Spirometra</i> spp.	-	-	1	2,0
<i>Toxascaris leonina</i>	-	-	1	2,0
<i>Toxocara canis</i>	1	0,8	-	-
<i>Toxocara cati</i>	-	-	1	2,0
<i>Trichuris</i> spp.	2	1,6	-	-
Multi-infecção	21	29,1	14	53,8
<i>Ancylostoma</i> spp. e <i>Cryptosporidium</i> spp.	9	7,0	1	2,0
<i>Ancylostoma</i> spp. e <i>Cystoisospora</i> spp.	2	1,6	2	4,1
<i>Ancylostoma</i> spp. e <i>Spirometra</i> spp.	-	-	1	2,0
<i>Ancylostoma</i> spp. e <i>Taenia</i> spp.	2	1,6	-	-
<i>Ancylostoma</i> spp. e <i>Toxocara canis</i>	3	2,3	-	-
<i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Cystoisospora</i> spp.	-	-	1	2,0
<i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Toxascaris leonina</i>	-	-	1	2,0
<i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Toxocara cati</i>	-	-	2	4,1
<i>Cystoisospora</i> spp. e <i>Taenia</i> spp.	-	-	1	2,0
<i>Cystoisospora</i> spp. e <i>Toxocara cati</i>	-	-	2	4,1
<i>Ancylostoma</i> spp., <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Toxocara cati</i>	-	-	1	2,0
<i>Ancylostoma</i> spp., <i>Giardia</i> spp. e <i>Cryptosporidium</i> spp.	1	0,8	-	-
<i>Ancylostoma</i> spp., <i>Taenia</i> spp. e <i>Cryptosporidium</i> spp.	2	1,6	-	-
<i>Ancylostoma</i> spp., <i>Toxocara canis</i> e <i>Cryptosporidium</i> spp.	2	1,6	-	-
<i>Cryptosporidium</i> spp., <i>Giardia</i> spp. e <i>Cystoisospora</i> spp.	-	-	1	2,0
<i>Cryptosporidium</i> spp., <i>Taenia</i> spp. e <i>Dipylidium caninum</i>	-	-	1	2,0
Total	72	56,2	26	53,0

Table 2 – Occurrence of gastrointestinal parasites in fecal samples of naturally infected dogs and cats using the techniques of Sheather, Faust and coloring of Ziehl Neelsen.

Dogs (n = 128)		Cats (n = 49)	
Parasite	Occurrence (n)	Parasite	Occurrence (n)
<i>Ancylostoma</i> spp.	36,7 % (47)	<i>Cryptosporidium</i> spp.	22,4% (11)
<i>Cryptosporidium</i> spp.	22,6% (29)	<i>Ancylostoma</i> spp.	18,3% (9)
<i>Giardia</i> spp.	4,6% (6)	<i>Cystoisospora</i> spp.	16,3% (8)
<i>Cystoisospora</i> spp.	3,1% (4)	<i>Toxocara cati</i>	12,2% (6)
<i>Taenia</i> spp.	3,1% (4)	<i>Giardia</i> spp.	4,0% (2)
<i>Toxocara canis</i>	3,1% (4)	<i>Spirometra</i> spp.	4,0% (2)
<i>Trichuris</i> spp.	1,5% (2)	<i>Taenia</i> spp.	4,0% (2)
<i>Dipylidium caninum</i>	0,7% (1)	<i>Toxascaris leonina</i>	4,0% (2)

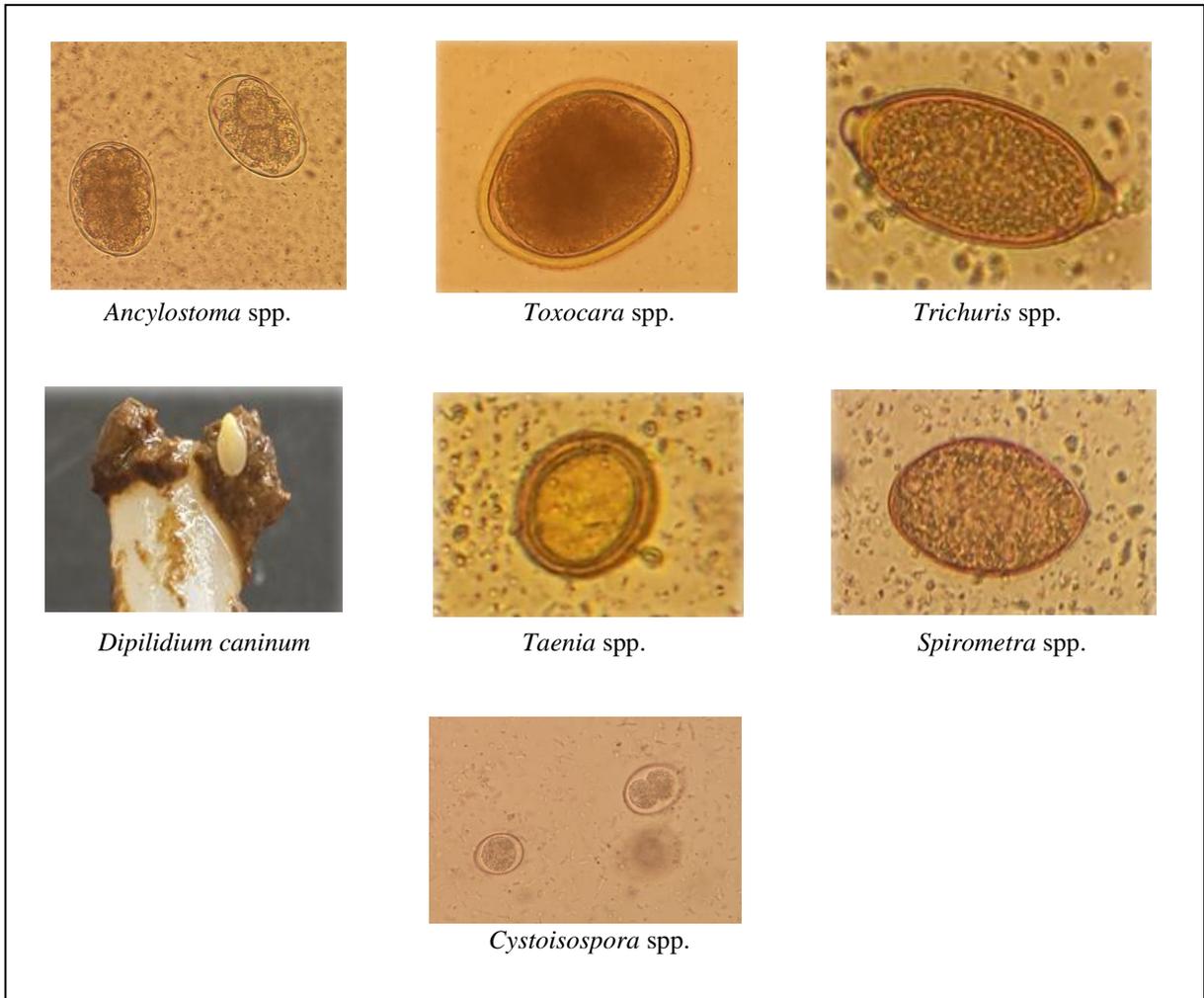


Figure 1 – Gastrointestinal parasites present in fecal samples. Detected through the macroscopic evaluation (*Dipilidium caninum*) and by the use of the techniques of Sheather and Faust (other parasites).

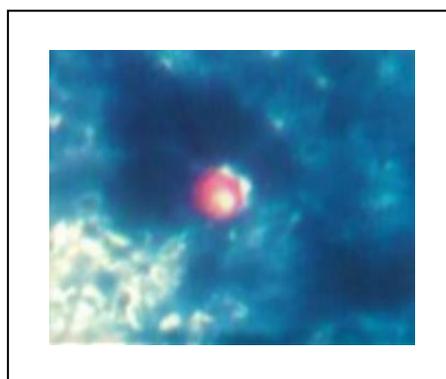


Figure 2 – Oocyst of *Cryptosporidium* spp. detected by performing the staining of Ziehl Neelsen in feces sample.

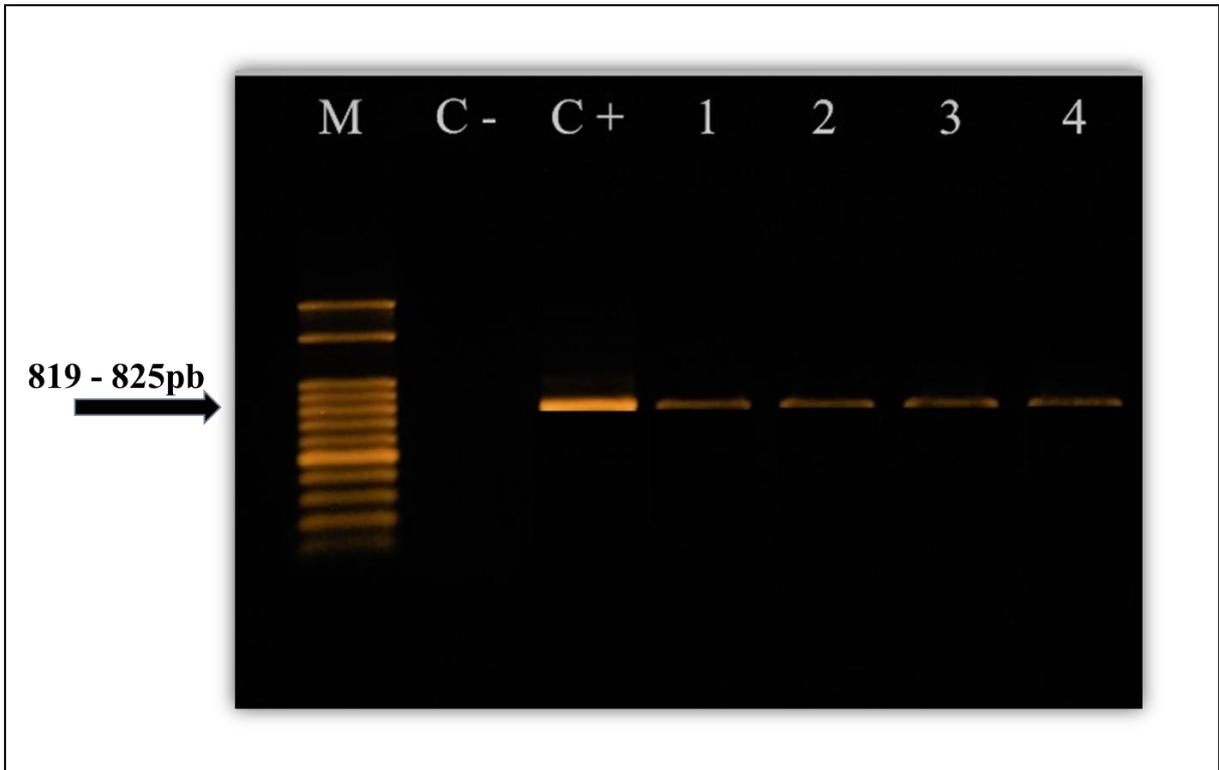


Figure 3 – Samples amplified corresponding a region of the SSU rRNA gene of *Cryptosporidium* spp. by Nested PCR. M: molecular marker (100pb); C-: negative control; C+: positive control; 1, 2, 3 and 4: positive samples for *Cryptosporidium* spp.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente estudo utilizando as técnicas de Sheather, Faust e coloração de Ziehl Neelsen demonstraram altas frequências de infecção de parasitas gastrointestinais em amostras fecais de cães e gatos, incluindo a presença de parasitas com relevância na saúde pública.

Os parasitas detectados nestas amostras foram *Cystoisospora* spp., *Taenia* spp., *Spirometra* spp., *Toxascaris leonina*, incluindo parasitas que acometem o homem com menor (*Trichuris* spp., *Toxocara cati*, *Dipylidium caninum* e *Cryptosporidium* spp.) e maior (*Ancylostoma* spp., *Toxocara canis* e *Giardia* spp.) frequência.

A Nested-PCR e o sequenciamento de DNA detectaram e caracterizaram as espécies de *Cryptosporidium* presentes em fezes de cães e gatos.

As amostras positivas de fezes de cães foram caracterizadas como *Cryptosporidium canis* e *Cryptosporidium parvum* e de gatos, *Cryptosporidium felis* e *Cryptosporidium parvum*. O *C. parvum* é comumente descrito acometendo os seres humanos, sendo pouco relatado em cães e gatos. *C. canis* e *C. felis* são raramente descritos acometendo o homem.

A infecção por parasitas gastrointestinais revelou-se comum em cães e gatos. Portanto, com o objetivo de reduzir e prevenir a infecção por parasitas em animais de companhia e reduzir os riscos de infecção humana por parasitas zoonóticos é essencial o diagnóstico adequado para aplicação de tratamento e medidas preventivas.

5 REFERÊNCIAS

ALIPOUR, H.; GOLDUST, M. Apparent contact dermatitis caused by *Ancylostoma caninum*: a case report. **Ann Parasitol.** v.61, p.125-7, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26342510>>. Acesso em: 24 ago. 2017.

ANDRESIUK, M.V. et al. Encuesta coproparasitológico canina realizado enplazas publicas de la ciudad de Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. **Parasitol Latinoam.** v.58, p.17-22, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.cl/pdf/parasitol/v58n1-2/art03.pdf>>. Acesso em: 7 ago. 2016. doi: 10.4067/S0717-77122003000100003.

BESER, J. et al. Possible zoonotic transmission of *Cryptosporidium felis* in a household. **Infect. Ecol. Epidemiol.** v.5, p.1, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4596888/>>. Acesso em: 12 ago. 2016. doi: 0.3402/iee.v5.28463.

BOWMAN, D.D. Georgis – **Parasitologia Veterinária.** 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010, 432p.

BROUSSARD, J.D. Optimal Fecal Assessment. **Clin Tech Small An P.** v.18, n.4, p.218-230, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096286703000768>>. Acesso em: 12 ago. 2016. doi: 1096286703000768.

CAMA, V.A. et al. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. **Emerg Infect Dis.** v.14, p.1567-1574, 2008. Disponível em: <https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/14/10/07-1273_article>. Acesso em: 07 ago. 2016.

CHALMERS, R. M.; KATZER, F. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. **Trends Parasitol.** v.29, n.5, p.237-251, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492213000354>>. Acesso em: 10 ago. 2016. doi: 10.1016/j.pt.2013.03.001.

CHEN, J. et al. Canine and feline parasitic zoonoses in China. **Parasit Vectors.** v.5, p.152, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3431282/>>. Acesso em: 1 ago. 2016. doi: 10.1186/1756-3305-5-152.

CONBOY, G. Cestodes of dogs and cats in North America. **Vet Clin Small Anim.** v.39, p.1075-1090, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195561609000977>>. Acesso em: 15 ago. 2016. doi: 10.1016/j.cvsm.2009.06.005.

DALL'AGNOL, L.P. et al. Parasitos gastrintestinais em gatos naturalmente infectados no município de Santa Maria no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Vet Brasilica.** v.4, n.3, p.181-184, 2010. Disponível em: <<http://periodicos.ufersa.edu.br/revistas/index.php/acta/article/view/1781>>. Acesso em: 20 ago. 2016. doi: 10.21708/avb.2010.4.3.1781.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: opening the black box. **Parasit Vectors.** v.7, p.22, 2014. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3914713/>>. Acesso em: 26 jul. 2016. doi: 10.1186/1756-3305-7-22.

DUBEY, J.P. The evolution of the knowledge of cat and dog coccidian. **Parasitology**. v.136, p.1469-1475, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19366482>>. Acesso em: 10 jul. 2016. doi: 10.1017/S003118200900585X.

EPE C. Intestinal Nematodes: Biology and Control. **Vet Clin N Am-Small**. v.39, p.1091-1107, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195561609001193>>. Acesso em: 13 ago. 2016. doi: 10.1016/j.cvsm.2009.07.002.

FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of Giardia species and giardiases. **Rev Clin Microbiol**. v.24, p.110-140, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21233509>>. Acesso em: 11 ago. 2016. doi: 10.1128/CMR.00033-10.

FERREIRA, F.P. et al. Frequência de parasitas gastrointestinais em cães e gatos do município de Londrina, PR, com enfoque em saúde pública. **Semin: Cien. Agrar**. v.34, n.6, supl.2, p.3851-3858, 2013. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/15438/13952>>. Acesso em: 5 jul. 2016. doi: 10.5433/1679-0359.2013v34n6Supl2p3851.

FRASSON, A.P. et al. *Giardia lamblia*: distribuição de microtúbulos no citoesqueleto de trofozoítos e cistos utilizando taxóide fluorescente. **Rev Patolog Trop**. v.39, p.21-32, 2010. Disponível em: <<https://www.revistas.ufg.br/iptsp/article/view/9495>>. Acesso em: 11 ago. 2016. doi: 0.5216/rpt.v39i1.9495.

GENNARI, S.M. et al. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. **Braz. J. Vet. Res. An. Sci**. v.36, n.2, 1999. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/5767>>. Acesso em: 24 ago. 2017. doi: 10.1590/S1413-95961999000200006.

GOKBULUT, G. et al. Comparative plasma disposition of fenbendazole, oxfendazole and albendazole in dogs. **Vet Parasitol**. v.148, p.279-287, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17673370>>. Acesso em: 28 jun. 2016. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.06.028.

HOLLAND, C.V.; HAMILTON, C.M. The significance of cerebral toxocariasis: a model system for exploring the link between brain involvement, behaviour and the immune response. **J Exp Biol**. v.216, p.78-83, 2013. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23225870>>. Acesso em: 10 ago. 2016. doi: 10.1242/jeb.074120

KATAGIRI, S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G. Zoonoses causadas por parasitas intestinais de cães e o problema do diagnóstico. **Arq. Inst. Biol**. v.74, n.2, p.175-184, 2007. Disponível em <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v74_2/katagiri.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2016.

LAPPIN, M.R. Update on the diagnosis and management of *Isospora* spp infections in dogs and cats. **Top Companion Anim Med**. v.25, issue3, p.133-135, 2010. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1938973610000358>>. Acesso em: 26 ago. 2016. doi: 10.1053/j.tcam.2010.07.001.

LEE, A.C.Y. et al. Epidemiologic and zoonotic aspects of ascarid infections in dogs and cats. **Trends Parasitol.** v.26, n.4, p.155-161, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492210000140>>. Acesso em: 20 jun. 2016. doi: 10.1016/j.pt.2010.01.002.

LITSTER, A.L. et al. Use of ponazuril paste to treat coccidiosis in shelter-housed cats and dogs. **Vet Parasitol.** v.202, p.319-325, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401714001502>>. Acesso em: 12 ago. 2016. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.03.003.

MEDEMA, G. et al. Risk assessment of *Cryptosporidium* in drinking water. **World Health Organization.** 2009. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70117/1/WHO_HSE_WSH_09.04_eng.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2017.

MEINHARDT, P.L.; CASEMORE, D.P.; MILLER, K.B. Epidemiologic aspects of human Cryptosporidiosis and the role of waterborne transmission. **Epidemiologic Reviews.** v.18, p.118-136, 1996. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9021307>>. Acesso em: 11 ago. 2016.

MEIRELES, M.V. *Cryptosporidium* infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v.19, p.197-204, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612010000400002>. Acesso em: 11 ago. 2016. doi: 10.1590/S1984-29612010000400002.

MORGAN-RYAN, U.M. et al. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from Homo sapiens. **J. Eukaryotic Microbiol.** v.49, p.433-440, 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12503676>>. Acesso em: 12 ago. 2016.

MONTEIRO, S.G. **Parasitologia na medicina veterinária.** São Paulo: Roca, 2010, 356p.

NEVES, D.P. **Parasitologia Humana.** São Paulo: Atheneu, 2005, 494p.

NEVES, D. et al. Frequency of intestinal parasites in pet dogs from an urban area (Greater Oporto, northern Portugal). **Vet Parasitol.** v.200, p.295-298, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401713005967>>. Acesso em: 20 ago. 2016. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.11.005.

O'DONOGHUE, P.J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. **Int. J. Parasitol.** v.25, p.139-195, 1995. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7622324>>. Acesso em: 09 ago. 2016.

PALMER, C.S. et al. Determining the zoonotic significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Australian dogs and cats. **Vet. Parasitol.** v.154, p.142-147, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18395349>>. Acesso em: 16 jun. 2016. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.02.031.

PAUL, M.; KING, L.; CARLIN E.P. Zoonoses of people and their pets: a US perspective on significant pet-associated parasitic diseases. **Trends Parasitol.** v.26, n.4, 2010. Disponível em: <[http://www.cell.com/trends/parasitology/pdf/S1471-4922\(10\)00020-6.pdf](http://www.cell.com/trends/parasitology/pdf/S1471-4922(10)00020-6.pdf)>. Acesso em: 15 jun. 2016. doi: 10.1016/j.pt.2010.01.008.

PLUTZER, J.; ONGERTH, J.; KARANIS, P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: facts and open questions. **Int J Hyg Environ Health.** v.213, p.321-333, 2010. doi: 10.1016/j.ijheh.2010.06.005.

REY, L. **Parasitologia.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, 856p.

RYAN, U.; FAYER, R.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. **Parasitol.** v.141, p.1667–1685, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25111501>>. Acesso em: 09 ago. 2016. doi: 10.1017/S0031182014001085.

ROBERTSON, I.D. et al. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. **Int J Parasitol.** v.30, p.1369-1377, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002075190000134X>>. Acesso em: 10 ago. 2016. doi: 10.1016/S0020-7519(00)00134-X.

ROBERTSON, I.D.; AMISSAH-REYNOLDS, R.C. Enteric parasitic zoonoses of domesticated dogs and cats. **Microbes Infect.** v.4, p.867-873, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457902016076>>. Acesso em: 28 jun. 2016. doi: 10.1016/S1286-4579(02)01607-6.

SCHENKER, R. et al. Comparative effects of milbemycin oxime-based and febantel–pyrantel embonate-based anthelmintic tablets on *Toxocara canis* egg shedding in naturally infected pups. **Vet Parasitol.** v.137, p.369-373, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S03044401706000410>>. Acesso em: 10 ago. 2016. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.01.023.

SCORZA, V.; TANGTRONGSUP, S. Update on the diagnosis and management of *Cryptosporidium* spp infections in dogs and cats. **Top Companion Anim Med.** v.25, n.39, p.163-169, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1938973610000413>>. Acesso em: 26 jul. 2016. doi: 10.1053/j.tcam.2010.07.007.

SOUSA, M.C. et al. Genotyping of *Giardia lamblia* human isolates from Portugal by PCR-RFLP and sequencing. **J Eukaryot Microbiol.** v.53, p.S174-S176, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17169050>>. Acesso em: 11 ago. 2016. doi: 10.1111/j.1550-7408.2006.00221.x.

STRUBE, C.; HEUER, L.; JANECEK, E. *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. **Vet Parasitol.** v.193, p.375-389, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S03044401712006814>>. Acesso em: 03 ago. 2016. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.12.033.

TAYLOR, M.A.; COOP, R.L.; WALL, R.L. **Parasitologia Veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010, 768p.

The Center for Food Security & Public Health |CFSPH| (2005a). **Animal Disease Factsheet: Toxocariasis**. Ames, USA: Iowa State University. Disponível em: <<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/toxocariasis.pdf>>. Acesso em: 08 jun. 2016.

The Center for Food Security & Public Health |CFSPH| (2005b). **Animal Disease Factsheet: Trichuriasis**. Ames, USA: Iowa State University. Disponível em: <<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/trichuriasis.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2016.

The Center for Food Security & Public Health |CFSPH| (2013). **Animal Disease Factsheet: Zoonotic Hookworms**. Ames, USA: Iowa State University. Disponível em: <<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/hookworms.pdf>>. Acesso em: 07 jun. 2016.

THOMPSON, R.C. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Vet. Parasitol.** v.126, p.15-35, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401704004005?via%3Dihub>>. Acesso em: 11 ago. 2016. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.09.008.

THOMPSON, R.C.; HOPKINS, R.M.; HOMAN, W.L. Nomenclature and genetic groupings of giardia infecting mammals. **Parasitol Today**. v.16, p.210-217, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10782081>>. Acesso em: 24 ago. 2017.

URQUHART, G.M. et al. **Parasitologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, 273p.

XIAO, L. et al. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clin Microbiol Vet.** v.17, n.1, p.72-97, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC321466/>>. Acesso em: 13 jun. 2016. doi: 10.1128/CMR.17.1.72-97.2004.

XIAO, L. et al. Possible transmission of *Cryptosporidium canis* among children and a dog in a household. **J. Clin. Microbiol.** v.45, p.2014-2016, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17442794>>. Acesso em: 09 ago. 2016. doi: 10.1128/JCM.00503-07.

XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. **Int. J. Parasitol.** v.38, p.1239-1255, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18479685>>. Acesso em: 12 ago. 2016. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.03.006.

Xiao, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. **Exp. Parasitol.** v.124, p.80-89, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19358845>>. Acesso em: 07 ago. 2016. doi: 10.1016/j.exppara.2009.03.018.