

Diagnóstico de criptosporidiose em amostras fecais de bezerros por imunofluorescência direta e microscopia de contraste de fase

Diagnosis of cryptosporidiosis in fecal samples of calves using direct immunofluorescence and phase contrast microscopy

Weslen Fabricio Pires Teixeira^I William Marinho Dourado Coelho^{II}
Ricardo Velludo Gomes de Soutello^{III} Fernando Paes de Oliveira^{III} Camila Guariz Homem^I
Cáris Maroni Nunes^I Marcelo Vasconcelos Meireles^{*}

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo comparar as técnicas de imunofluorescência direta (IFD) e a microscopia de contraste de fase em solução de Sheather (MCF), para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bezerros. A determinação dos limiares de detecção da IFD e da MCF foi realizada utilizando cinco alíquotas de uma amostra fecal de bezerro, comprovadamente negativa para *Cryptosporidium* spp., adicionadas com diferentes quantidades de oocistos de *Cryptosporidium parvum*. Ao exame das 5 alíquotas, a IFD e a MCF apresentaram, respectivamente, limiares de detecção de $3,3 \times 10^4$ (duas alíquotas positivas) e $3,3 \times 10^5$ oocistos (1 alíquota positiva) por grama de fezes. Foram também realizadas a comparação entre a positividade obtida e uma análise semiquantitativa do número de oocistos observados por campo de microscopia, em ambos os métodos, em 300 amostras fecais de bezerros. Entre as 300 amostras, 19,7% (59/300) foram positivas pela IFD, com diferença estatisticamente significativa ($P=0,0098$) quando comparada com a positividade obtida pela MCF, que foi de 11,7% (35/300). As amostras positivas foram submetidas à reação em cadeia da polimerase para amplificação de fragmentos da subunidade 18S do rRNA, com posterior sequenciamento dos fragmentos amplificados, o que permitiu a identificação de *Cryptosporidium andersoni* em 11,9% (7/59) e de *C. parvum* em 88,1% (52/59) das amostras. Os resultados observados comprovam que a IFD foi mais eficiente que a MCF para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bezerros.

Palavras-chave: *Cryptosporidium* spp., oocistos, fezes, Sheather.

ABSTRACT

This study aimed to compare the direct immunofluorescence assay (DIF) and the phase contrast

microscopy in Sheather solution (PCM) for detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal samples from calves. The determination of the thresholds of detection of DIF and PCM was performed using five aliquots of a fecal sample from a calf negative for *Cryptosporidium* spp. oocysts, spiked with different amounts of *Cryptosporidium parvum* oocysts. The screening of the five aliquots revealed that the DIF and MCF showed respectively, detection thresholds of 3.3×10^4 (2 positive aliquots) and 3.3×10^5 (1 positive aliquot) oocysts per gram of fecal sample. Further analyses were accomplished in order to compare the positivity results and to determine semi-quantitatively the number of oocysts per field of microscopy, in both methods, in 300 fecal samples from calves. Among the 300 samples, 19.7% (59/300) were positive by DIF, result that was statistically significant ($P=0.0098$) when compared with the positivity obtained by the PCM, which was 11.7% (35/300). The positive samples were submitted to the nested-PCR assay for amplification of fragments of the 18S subunit of rRNA, following sequencing of amplified fragments, allowing the identification of *Cryptosporidium andersoni* in 11.9% (7/59) and *C. parvum* in 88.1% (52/59) of the samples. The present results indicate that the DIF was more effective than PCM in the detection of *Cryptosporidium* in fecal samples from calves.

Key words: *Cryptosporidium* spp., oocysts, feces, Sheather.

INTRODUÇÃO

Parasitas do gênero *Cryptosporidium* são coccídios reconhecidos como importantes patógenos causadores de diarreia em vertebrados, incluindo bovinos e o homem (FAYER et al., 2000). Em bovinos, os bezerros neonatos são mais suscetíveis à infecção clínica, sendo os animais adultos acometidos por infecções de

^IFaculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rua Clóvis Pestana, 793, 16050-680, Bairro Dona Amélia, Araçatuba, SP, Brasil. E-mail: marcelo@fmva.unesp.br. *Autor para correspondência.

^{II}Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

^{III}Curso de Medicina Veterinária, Fundação Educacional de Andradina, Andradina, SP, Brasil.

natureza assintomática ou associadas a sintomas clínicos de pouca gravidade (O'DONOGHUE, 1995). Os bovinos podem ainda atuar como reservatórios de *Cryptosporidium parvum*, espécie que apresenta potencial zoonótico (FAYER et al., 2000).

Em pesquisas realizadas no Brasil, utilizando amostras fecais de bovinos de até 90 dias de idade, foi constatada ocorrência de *Cryptosporidium* sp. de 0,6 a 72,1%, em muitos casos com presença de diarreia, associada ou não a outros agentes etiológicos (GARCIA & LIMA, 1994; SOUZA & LOPES, 1995; FEITOSA et al., 2004; LANGONI et al., 2004; OLIVEIRA-FILHO et al., 2007; CARDOSO et al., 2008; FEITOSA et al., 2008).

Inúmeros métodos foram desenvolvidos para diagnóstico de criptosporidiose, sendo as técnicas que envolvem a detecção direta do parasito, por observação microscópica, as mais comumente utilizadas na rotina laboratorial (JEX et al., 2008). No entanto, essas técnicas podem apresentar resultados falso-positivos e baixa sensibilidade (ARROWOOD & STERLING, 1989; CASEMORE, 1991), além de promoverem alterações na morfologia e morfometria dos oocistos (MEIRELES & FIGUEIREDO, 1992).

O objetivo deste experimento foi comparar a técnica de imunofluorescência direta (IFD), realizada com conjugado contendo anticorpos policlonais anti-*C. parvum*, e a microscopia com contraste de fase em solução de Sheather (MCF), para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* sp. em amostras fecais de bezerras com faixa etária entre uma semana e quatro meses de idade.

MATERIAL E MÉTODOS

Os limiares de detecção da IFD e da MCF foram determinados a partir de uma amostra fecal não diarreica de um bezerro com quatro meses de idade, comprovadamente negativa para *Cryptosporidium* spp., por meio de MCF e da reação em cadeia da polimerase (*nested* PCR) para amplificação de fragmentos da subunidade 18S do rRNA (XIAO et al., 2000). Foram preparadas cinco alíquotas de 3g, adicionadas de 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 oocistos de *C. parvum* e posteriormente submetidas à centrifugo-sedimentação em água éter (MELONI & THOMPSON, 1996). A partir de cada alíquota, foram feitas dez lâminas: cinco para exame por IFD e cinco para MCF. Em cada lâmina, foram visualizados 80 campos de microscopia (aumento de 400x), totalizando 400 campos por alíquota.

Em outro momento, foi realizada a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp., por IFD e MCF, em 300 amostras fecais de bezerras, com faixa etária de 1 semana a 4 meses de idade, provindas de 37

propriedades leiteiras de municípios da região noroeste do Estado de São Paulo. As amostras fecais foram submetidas à centrifugo-sedimentação em água/éter e divididas em duas alíquotas, sendo que uma foi diluída em formol tamponado 10% (proporção de 1:3), para utilização em IFD, e a outra em bicromato de potássio 5% (proporção de 1:3), posteriormente utilizada em MCF. As alíquotas diluídas foram armazenadas a 4°C, até o momento da análise.

As lâminas utilizadas para IFD foram previamente tratadas com polilisina diluída na proporção de 1:20 em água deionizada (ARROWOOD et al., 1991). Sobre a lâmina, foram adicionados 25µL da amostra diluída em formol, deixando secar totalmente em temperatura ambiente. Após, foram adicionados 25µL do conjugado composto por IgG policlonal de coelho anti-*C. parvum* marcada com isotiocianato de fluoresceína (produzido no laboratório de Ornitopatologia da UNESP, campus de Araçatuba, SP) diluído na proporção de 1:80 em PBS 0,01M, pH 7,2 e 4,6-diamidino-2-phenilindole - DAPI, (50µL de DAPI a 2mg mL⁻¹ para 50mL de PBS 0,01M, pH 7,2), com incubação da lâmina a 37°C, por 30min, em câmara úmida. Ao término da incubação, foi realizada uma lavagem com PBS 0,01M, pH 7,2, finalizando a montagem com uma laminula sobre 25µL do tampão de montagem (glicerol 90% em PBS 0,01M, pH 7,2; p-phenylenediamine a 0,1mg mL⁻¹). A visualização dos oocistos foi feita em um microscópio Olympus BX-50, com lâmpada de mercúrio de 100 W, filtros U-MWU2 (DAPI) e U-MWU2-B (fluoresceína), em aumento de 400x. A reação foi considerada positiva quando foi observada fluorescência de cor verde brilhante, emitida principalmente da parede de estruturas com morfologia e morfometria compatíveis com oocistos de *Cryptosporidium* spp., eventualmente com evidênciação de sutura.

Para preparação das lâminas utilizadas para MCF, os sedimentos fecais foram lavados por centrifugação com água deionizada para retirada do bicromato de potássio e, posteriormente, diluídos nesse mesmo tipo de água, na proporção de 1:3. Sobre cada lâmina, foram adicionados 25µL da amostra e 25µL de solução de Sheather, homogeneizando e finalizando a montagem com uma laminula. As lâminas foram consideradas positivas quando estruturas com morfologia e morfometria compatíveis com oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram visualizadas como estruturas com brilho característico, contra um fundo escuro, eventualmente com pontos escuros em seu interior. A visualização dos oocistos foi realizada em um microscópio Olympus BX-50, com objetiva de contraste de fase, em aumento de 400x.

Ambas as técnicas (IFD e MCF) foram realizadas em duplicata, com observação de 400 campos de microscopia por lâmina. A positividade das amostras fecais foi confirmada de acordo com SMITH et al. (2002), por meio de visualização das estruturas internas dos oocistos em microscopia com contraste diferencial de fase (Nomarsky) ou por visualização do núcleo dos esporozoítos corados com DAPI. Em todas as amostras positivas na IFD e/ou MCF, foram realizadas análises semiquantitativas do número de oocistos observados por campo de microscopia (aumento de 400x), segundo protocolo descrito por FÉRES et al. (2009), com algumas modificações: escore 1 (1 a 10 oocistos por lâmina); escore 2 (1 a 5 oocistos por campo); escore 3 (5 a 20 oocistos por campo) e escore 4 (acima de 21 oocistos por campo).

Para identificação das espécies de *Cryptosporidium* presentes nas amostras fecais dos bezerros, todas as amostras positivas pela microscopia foram submetidas à extração de DNA (MEIRELES et al., 2007) para realização da *nested* PCR. Para isso, foram utilizados *primers* específicos para amplificação de sequência do gene da subunidade 18S do rRNA (XIAO et al., 2000) e sequenciamento dos fragmentos amplificados no Centro de Sequenciamento e Genômica Funcional da UNESP, Campus de Jaboticabal, utilizando o “ABI Prism® Dye Terminator 3.1”, em sequenciador automático ABI 3730XL. Água ultrapura foi utilizada em lugar de DNA-molde, em reações-controle negativas, e DNA de *Cryptosporidium galli* foi utilizado como molde em reações-controle positivas.

Foi calculado o intervalo de confiança do número de oocistos de *C. parvum* encontrados nas lâminas de IFD e MCF, preparadas a partir das cinco alíquotas adicionadas de oocistos. Para determinação da significância estatística dos resultados de positividade e do número de oocistos observados nas diferentes alíquotas, quando submetidas às duas técnicas de diagnóstico, foram utilizados, respectivamente, o teste exato de Fisher e o teste t de Student. O teste de Qui-Quadrado (χ^2) foi aplicado para verificar a significância estatística entre a positividade obtida pela IFD e MCF em amostras fecais de bezerros e o índice Kappa (K) foi determinado para verificar a concordância entre os dois testes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A MCF é pouco utilizada para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais, apesar de ser considerada um método rápido e eficiente e de não promover alterações na morfologia e morfometria dos oocistos, o que pode ser observado em técnicas de coloração (WILSON & ACRES, 1982;

MEIRELES & FIGUEIREDO, 1992). Essas técnicas ainda apresentam as desvantagens de baixa sensibilidade e de eventuais resultados falso-positivos (CASEMORE, 1991; WEBER et al., 1991). Devido a essas características, foi realizada a comparação com a IFD, que apresenta melhor sensibilidade e especificidade que as técnicas convencionais de coloração utilizadas para visualização microscópica de oocistos (STIBBS & ONGERTH, 1986; ARROWOOD & STERLING, 1989; WEBER et al., 1991; ALLES et al., 1995).

As alíquotas fecais inoculadas com oocistos de *C. parvum* e as amostras de bezerros infectados, quando analisadas pela IFD, apresentaram, respectivamente, limiar de detecção mais baixo e maior positividade que a MCF. Com a utilização dessas técnicas, foi possível obter positividade, respectivamente, em 40% (2/5) das lâminas contendo 10^4 e em 20% (1/5) das lâminas contendo 10^5 oocistos de *C. parvum*, em 3g de fezes. Os valores de porcentagem de lâminas positivas, o número de oocistos encontrados e o intervalo de confiança, obtidos pela IFD e MCF nas alíquotas fecais inoculadas com oocistos de *C. parvum*, estão descritos na tabela 1.

As técnicas mais utilizadas para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais são as de Kinyoun e Ziehl Neelsen modificada, porém apresentam baixa sensibilidade, conforme demonstrado por WEBER et al. (1991), que relataram 100% de detecção de oocistos de *C. parvum* na presença de 5×10^5 e 5×10^4 oocistos por grama de fezes humanas não diarréicas, respectivamente, com utilização das técnicas de Kinyoun e imunofluorescência indireta. Na presente pesquisa, a IFD e a MCF apresentaram 100% de detecção em amostras contendo respectivamente 10^5 e 10^6 oocistos presentes em três gramas de fezes não diarréicas, ou seja, $3,3 \times 10^4$ e $3,3 \times 10^5$ oocistos por grama de fezes, respectivamente para IFD e MCF (Tabela 1).

Em amostras de fezes de 300 bezerros, foi observada positividade em 19,7% (59/300) das amostras, sendo 11,7% (35/300) positivas em ambas as técnicas e 8% (24/300) positivas apenas pela IFD, com diferença estatisticamente significativa pelo teste de Qui-Quadrado ($P < 0,05$). Esse resultado demonstra que a imunofluorescência de fato apresenta maior sensibilidade que técnicas não imunológicas de visualização microscópica (ALLES et al., 1995; JOHNSTON et al., 2003).

O grau de concordância entre os resultados da IFD e MCF foi de 92% ($K=0,7$, nível de confiança=95%), considerado como bom (CONRATHS & SCHARES, 2006). O cálculo da especificidade e sensibilidade dos dois métodos não foi realizado devido

Tabela 1 - Porcentagem de positividade, média, total de oocistos observados e intervalo de confiança calculado para as cinco repetições de cada alíquota de amostras fecais adicionadas de oocistos, em lâminas examinadas por imunofluorescência direta (IFD) e microscopia de contraste de fase (MCF).

	-----MCF-----				Total	
	escore 1	escore 2	escore 3	escore 4		
escore 1	8,6 (3)**	-	-	2,9 (1)	11,4 (4)	
escore 2	11,4 (4)	11,4 (4)	-	-	22,9 (8)	
IFD	escore 3	8,6 (3)	20 (7)	2,9 (1)	-	31,4 (11)
	escore 4	-	17,1 (6)	11,4 (4)	5,7 (2)	34,3 (12)
	Total	28,6 (10)	48,6 (17)	14,3 (5)	8,6 (3)	100 (35)

^a Apresenta diferença estatisticamente significativa entre o número de oocistos encontrados na IFD e na MCF ($P < 0,0001$), pelo teste t.

^b Apresenta diferença estatisticamente significativa entre a positividade obtida na IFD e na MCF ($P < 0,05$), pelo teste de Fisher. IC: Intervalo de Confiança com nível de significância de 95%.

à não utilização, neste experimento, de um teste considerado como padrão ouro. No entanto, em comparação com a IFD, verificou-se que a MCF apresentou sensibilidade mais baixa, porém, especificidade de 100%, evidenciando a sua confiabilidade para utilização em diagnóstico de criptosporidiose, quando não é necessário um teste que tenha a característica de alta sensibilidade, particularmente em amostras com grande quantidade de oocistos.

Por meio da *nested* PCR e sequenciamento dos fragmentos amplificados, foi constatada a presença de *C. parvum* em 88,1% (52/59) e de *Cryptosporidium andersoni* em 11,9% (7/59) das amostras positivas. Diversos autores também relataram que *C. parvum* é a espécie mais frequentemente encontrada em bezerros nos primeiros meses de vida (GEURDEN et al., 2006; COKLIN et al., 2009; KESHAVARZ et al., 2009). Apesar de *C. andersoni* não ser encontrado com mais frequência em bezerros nas primeiras semanas de vida, SANTÍN et al. (2004), KVÁC et al. (2006) e SEVÁ et al.

(2010) também descreveram sua presença em amostras fecais de bezerros dessa faixa etária. As amostras que continham oocistos de *C. andersoni* foram positivas somente pela IFD, o que sugere que a visualização de oocistos de *C. andersoni* em solução de Sheather é menos eficiente para diagnóstico dessa espécie do que para o diagnóstico de *C. parvum*, conforme demonstrado por KVÁC et al. (2003).

Os resultados da análise semiquantitativa dos oocistos de *C. parvum*, presentes nas lâminas simultaneamente positivas na IFD e MCF estão relacionados na tabela 2. Na comparação dos escores de oocistos, observou-se que a IFD possibilitou a detecção de um maior número de oocistos por campo que a MCF. A análise semiquantitativa dos oocistos de *C. andersoni* e *C. parvum*, presentes nas lâminas que foram positivas somente pela IFD, está descrita na tabela 3. Nas amostras de bezerros, foi obtida, pela MCF, maior positividade naquelas que continham maiores escores de oocistos (Tabela 2), fato que não se repetiu nas lâminas com menores escores, nas quais a IFD apresentou maior positividade (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 - Análise semiquantitativa* de oocistos de *C. parvum* presentes nas 35 amostras simultaneamente positivas pela imunofluorescência direta (IFD) e microscopia de contraste de fase em solução de Sheather (MCF).

	-----MCF-----				Total	
	escore 1	escore 2	escore 3	escore 4		
escore 1	8,6 (3)**	-	-	2,9 (1)	11,4 (4)	
escore 2	11,4 (4)	11,4 (4)	-	-	22,9 (8)	
IFD	escore 3	8,6 (3)	20 (7)	2,9 (1)	-	31,4 (11)
	escore 4	-	17,1 (6)	11,4 (4)	5,7 (2)	34,3 (12)
	Total	28,6 (10)	48,6 (17)	14,3 (5)	8,6 (3)	100 (35)

*Escore 1: 1 a 10 oocistos por lâmina; escore 2: 1 a 5 oocistos por campo em aumento de 400x; escore 3: 5 a 20 oocistos por campo em aumento de 400x e escore 4: acima de 21 oocistos por campo em aumento de 400x.

** % (número de amostras positivas).

Tabela 3 - Análise semiquantitativa* de oocistos de *C. parvum* e *C. andersoni* presentes nas 24 amostras positivas somente pela imunofluorescência direta (IFD).

Espécies	-----IFD-----				Total
	escore 1	escore 2	escore 3	escore 4	
<i>C. andersoni</i>	8,6 (4/7)**	-	28,6 (2/7)	14,3 (1/7)	100 (7/7)
<i>C. parvum</i>	88,2 (15/17)	5,9 (1/17)	5,9 (1/17)	-	100 (17/17)
Total	79,2 (19/24)	4,2 (1/24)	12,5 (3/24)	4,2 (1/24)	100 (24/24)

*Escore 1: 1 a 10 oocistos por lâmina; escore 2: 1 a 5 oocistos por campo em aumento de 400x; escore 3: 5 a 20 oocistos por campo em aumento de 400x e escore 4: acima de 21 oocistos por campo em objetiva de 400x.

** % (número de amostras positivas/número amostras positivas para *C. andersoni* ou *C. parvum*).

CONCLUSÃO

A IFD apresentou limiar de detecção mais baixo que a MCF, tanto em amostras inoculadas com oocistos como em amostras de bezerros. A MCF pode ser utilizada para diagnóstico de criptosporidiose em amostras com grande quantidade de oocistos, por ser de baixo custo, rápida e de fácil visualização do parasito. No entanto, em amostras com pequena quantidade de oocistos é recomendada a utilização da IFD, por apresentar limiar de detecção mais baixo, evitando, assim, a ocorrência de diagnóstico falso-negativo.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro (processo n. 2008/57380-1).

FONTES DE AQUISIÇÃO

Polilisina, Sigma, Saint Louis, Estados Unidos da América.
4,6-diamidino-2-phenilindole – DAPI, Sigma, Saint Louis, Estados Unidos da América.

p-phenylenediamine, Sigma, Saint Louis, Estados Unidos da América, Estados Unidos da América.

ABI Prism® Dye Terminator 3.1, Applied Biosystems, Califórnia, Estados Unidos da América.

Seqüenciador automático ABI 3730XL, Applied Biosystems, Califórnia, Estados Unidos da América.

REFERÊNCIAS

ALLES, A.J. et al. Prospective comparison of direct immunofluorescence and conventional staining methods for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in human fecal specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.6, p.1632-1634, 1995. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/reprint/33/6/1632>>. Acesso em 18 jan. 2011.

ARROWOOD, M.J.; STERLING, C.R. Comparison of conventional staining methods and monoclonal antibody-based methods for *Cryptosporidium* oocyst detection. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, n.7, p.1490-1495, 1989. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/reprint/27/7/1490>>. Acesso em 18 jan. 2011.

ARROWOOD, M.J. et al. Immunofluorescent microscopical visualization of trails left by gliding *Cryptosporidium parvum* sporozoites. **Journal of Parasitology**, v.77, n.2, p.315-317, 1991. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/pdfplus/3283104.pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2011.

CARDOSO, J.M.S. et al. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em um rebanho bovino leiteiro no município de Caçapava, estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, supl.1, p.239-242, 2008. Disponível em: <<http://www.cbpv.com.br/rbpv/documentos/17supl.12008/Protozool011.pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2011.

CASEMORE, D.P. Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. **Journal of Clinical Pathology**, v.44, n.6, p.445-451, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC496821/pdf/jclinpath00408-0005.pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2011.

COKLIN, T. et al. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves from 11 farms in Prince Edward Island, Canada. **Veterinary Parasitology**, v.160, n.3-4, p.323-326, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19070965>>. Acesso em: 18 jan. 2011. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.10.096.

CONRATHS, F.J.; SCHARES, G. Validation of molecular-diagnostic techniques in the parasitological laboratory. **Veterinary Parasitology**, v.136, p.91-98, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16414191>>. Acesso em: 25 fev. 2011. doi:10.1016/j.vetpar.2005.12.004.

FAYER, R. et al. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, v.30, n.12-13, p.1305-1322, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11113257>>. Acesso em: 18 jan. 2011. doi: 10.1016/S0020-7519(00)00135-1.

FEITOSA, F.L.F. et al. Prevalência da criptosporidiose em bezerros na região de Araçatuba, Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.189-193, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v34n1/a29v34n1.pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2011.

FEITOSA, F.L.F. et al. Importância de *Cryptosporidium* spp. como causa de diarreia em bezerros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.10, p.452-456, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v28n10/v28n10a02.pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2011.

FÊRES, F.C. et al. Ocorrência e caracterização molecular de *Cryptosporidium* em cordeiros. **Arquivo Brasileiro de**

- Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.4, p.1002-1005, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v61n4/v61n4a33.pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2011.
- GARCIA, A.M.; LIMA, J.D. Prevalência de *Cryptosporidium* spp. em rebanhos leiteiros de Pará de Minas (MG) e sua relação com práticas de manejo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.3, n.1, p.23-28, 1994. Disponível em: <http://www.cbpv.com.br/rbpv/documentos/311994/c3123_28.pdf>. Acesso em: 18 jan. 2011.
- GEURDEN, T. et al. Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium* in three cattle husbandry systems in Zambia. **Veterinary Parasitology**, v.138, n.3-4, p.217-222, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16546321>>. Acesso em: 18 jan. 2011. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.02.009.
- JEX, R. et al. *Cryptosporidium* - Biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. **Biotechnology Advances**, v.26, n.4, p.304-317, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18430539>>. Acesso em: 18 jan. 2011. doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.02.003.
- JOHNSTON, S.P. et al. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.2, p. 623-626, 2003. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/reprint/41/2/623>>. Acesso em: 18 jan. 2011. doi: 10.1128/JCM.41.2.623-626.2003.
- KESHAVARZ, A. et al. Prevalence and molecular characterization of bovine *Cryptosporidium* in Qazvin province, Iran. **Veterinary Parasitology**, v.160, n.3-4, p.316-318, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19091477>>. Acesso em: 18 jan. 2011. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.11.008.
- KVÁC, M. et al. Age-related and housing-dependence of *Cryptosporidium* infection of calves from dairy and beef herds in South Bohemia, Czech Republic. **Veterinary Parasitology**, v.137, n.3-4, p.202-209, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16488542>>. Acesso em: 26 fev. 2011.
- KVÁC, M. et al. Comparison of selected diagnostic methods for identification of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium andersoni* in routine examination of faeces. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v.50, n.8, p.405-411, 2003. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1439-0450.2003.00694.x/pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2011. doi: 10.1046/j.1439-0450.2003.00694.x.
- LANGONI, H. et al. Contribuição ao estudo da etiologia das diarreias em bezerros de aptidão leiteira no Estado de São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.41, n.5, p.313-319, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjvras/v41n5/25255.pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2011.
- MEIRELES, M.V.; FIGUEIREDO, P.C. Isolamento e identificação do *Cryptosporidium baileyi* Current et al., 1986 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em frangos de corte. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.1, n.2, p.125-130, 1992. Disponível em: <http://www.cbpv.com.br/rbpv/documentos/121992/c12125_130.pdf>. Acesso em: 18 jan. 2011.
- MEIRELES, M.V. et al. Natural infection with zoonotic subtype of *Cryptosporidium parvum* in capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.147, n.1-2, p.166-170, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17467175>>. Acesso em: 18 jan. 2011. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.03.034.
- MELONI, B.P.; THOMPSON, R.C.A. Simplified methods for obtaining purified oocysts from mice and for growing *Cryptosporidium parvum* in vitro. **Journal of Parasitology**, v.82, n.5, p.757-762, 1996. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/pdfplus/3283888.pdf?acceptTC=true>>. Acesso em: 18 jan. 2011.
- O'DONOGHUE, P.J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. **International Journal for Parasitology**, v.25, n.2, p.139-95, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7622324>>. Acesso em: 18 jan. 2011. doi: 10.1016/0020-7519(94)E0059-V.
- OLIVEIRA-FILHO, J.P. et al. Diarréia em bezerros da raça nelore criados extensivamente: estudo clínico e etiológico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.10, p.419-424, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v27n10/a06v2710.pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2011.
- SANTÍN, M. et al. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. **Veterinary Parasitology**, v.122, n.2, p.103-117, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15177715>>. Acesso em: 26 fev. 2011. doi:10.1016/j.vetpar.2004.03.020.
- SEVÁ, A.P. et al. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from domestic animals in a rural area surrounding Atlantic dry forest fragments in Teodoro Sampaio municipality, State of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, n.4, p.249-253, 2010. Disponível em: <http://www.cbpv.com.br/rbpv/documentos/1942010/rbpv_v19n4_a11.pdf>. Acesso em: 16 mar. 2011.
- SMITH, H.V. et al. Significance of enhanced morphological detection of *Cryptosporidium* sp. oocysts in water concentrates determined by using 4,6-Diamidino-2-Phenylindole and immunofluorescence microscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.10, p.5198-5201, 2002. Disponível em: <<http://aem.asm.org/cgi/reprint/68/10/5198>>. Acesso em: 18 jan. 2011. doi: 10.1128/AEM.68.10.5198-5201.2002.
- SOUZA, J.C.P.; LOPES, C.W.G. Criptosporidiose em bezerros de rebanhos da bacia leiteira Sul-Fluminense, Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.4, n.1, p.33-36, 1995. Disponível em: <http://www.cbpv.com.br/rbpv/documentos/411995/c4133_36.pdf>. Acesso em: 18 jan. 2011.
- STIBBS, H.H.; ONGERTH, J.E. Immunofluorescence detection of *Cryptosporidium oocysts* in fecal smears. **Journal of Clinical Microbiology**, v.24, n.4, p.517-521, 1986. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/reprint/24/4/517.pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2011.
- WEBER R. et al. Threshold of detection of *Cryptosporidium oocysts* in human stool specimens: evidence for low sensitivity of current diagnostic methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, n.7, p.1323-1327, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC270109/pdf/jcm00043-0059.pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2011.
- WILSON, D.W.; ACRES, S.D. A comparison of dichromate solution flotation and fecal smears for diagnosis of cryptosporidiosis in calves. **Canadian Veterinary Journal**, v.23, n.8, p.240-246, 1982. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1790179/pdf/canvetj00285-0018.pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2011.
- XIAO, L. et al. Identification of species and sources of *Cryptosporidium oocysts* in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.12, p.5492-5498, 2000. Disponível em: <<http://aem.asm.org/cgi/reprint/66/12/5492>>. Acesso em: 18 jan. 2011.