
ESTADO ATUAL
DO CONHECIMENTO DE
Cryptosporidium E *Giardia*

*Therezinha Travassos Ribeiro de Carvalho*¹

RESUMO

Os protozoários parasitos intestinais *Cryptosporidium* e *Giardia* têm merecido grande atenção dos pesquisadores, em virtude de sua associação com doenças diarreicas agudas e crônicas, tanto em pacientes imunocomprometidos quanto em indivíduos imunocompetentes. A ocorrência de surtos pela ingestão de água ou de alimentos contaminados aumenta sua importância em saúde pública. Em maio de 2007, foi realizada a II Conferência Internacional sobre *Giardia* e *Cryptosporidium* para discutir o estado atual do conhecimento e formular questões com os objetivos de identificar estratégias efetivas de controle, discutir e transmitir informações pertinentes e tecnologia, além de encorajar jovens cientistas. Este artigo tem como finalidade divulgar essas informações entre a comunidade científica brasileira. Durante o evento, foram discutidos numerosos aspectos da biologia desses parasitos, os avanços das novas tecnologias de detecção e caracterização molecular, fundamentais para o conhecimento da epidemiologia, e também estudos proteômicos que possam indicar novos métodos para o controle de *Giardia* e de *Cryptosporidium*.

DESCRITORES: *Giardia*. *Cryptosporidium*. Epidemiologia Molecular. Doenças diarreicas.

INTRODUÇÃO

Os protozoários intestinais estão sendo cada vez mais objeto de estudo em virtude de sua associação com doenças diarreicas agudas e crônicas, tanto em pacientes imunocomprometidos quanto em indivíduos imunocompetentes, principalmente crianças e idosos. As infecções intestinais causadas por protozoários são comuns no mundo inteiro. A ocorrência de surtos pela ingestão de água (Karanis et al., 2007, Bouzid et al., 2008) ou de alimentos contaminados com protozoários intestinais aumenta sua importância em saúde pública, mas, até o presente, os relatos da literatura referem-se, quase sempre, a casos ocorridos em países desenvolvidos.

1 Instituto Adolfo Lutz, Serviço de Parasitologia, Seção de Enteroparasitoses, Avenida Doutor Arnaldo, 351, 8º andar, Cerqueira César, CEP 01246-902 São Paulo, Brasil. E-mail: ttravassos@ial.sp.gov.br

Recebido para publicação em: 7/3/2008. Revisto em: 15/10/2008. Aceito em: 11/2/2009

Giardia e *Cryptosporidium* são protozoários entéricos ubíquos que infectam humanos, animais domésticos e silvestres em todo o mundo (Xiao & Fayer, 2008). Nos países em desenvolvimento, *Giardia* e *Cryptosporidium*, juntamente com bactérias e vírus, constituem parte de um complexo grupo de doenças diarreicas que causam grande absenteísmo no trabalho e podem representar uma das causas que impedem o desenvolvimento socioeconômico desses países. *Giardia* e *Cryptosporidium* estão incluídos na Iniciativa das Doenças Negligenciadas da Organização Mundial de Saúde (*World Health Organisation Neglected Diseases Initiative*) por causa de sua estreita relação com a pobreza, com a falta de saneamento básico e com a qualidade da água de consumo (Savioli et al., 2006).

No período de 13 a 18 de maio de 2007, foi realizada a *II International Giardia and Cryptosporidium Conference* em Morelia, no México. De acordo com os organizadores, o evento teve três objetivos principais: 1) reunir cientistas aclamados internacionalmente para discutir o estado atual do conhecimento e fazer perguntas que ajudassem a identificar estratégias efetivas de controle; 2) discutir informações pertinentes e transmiti-las, assim como as novas tecnologias; 3) encorajar jovens cientistas a apresentar seus dados e a interagir com os cientistas de renome mundial, expandindo suas redes científicas.

Durante o evento, foram discutidos: aspectos da biologia e do controle desses parasitos, avanços proporcionados pelas novas tecnologias de detecção e caracterização molecular que têm importância fundamental no conhecimento da epidemiologia, estudos proteômicos que podem indicar novos métodos para o controle de *Giardia* e *Cryptosporidium*.

Porém, no Brasil, a identificação molecular, que é uma metodologia já disponível para diagnóstico da doença e rastreamento da fonte de infecção e de contaminação ambiental, particularmente em água e em alimentos, ainda está dando seus primeiros passos, contando com alguns trabalhos acadêmicos e poucos artigos publicados (Araujo et al., 2005; Araujo et al., 2007, 2008; Carvalho-Almeida et al., 2005, Gonçalves et al., 2006, 2008; Huber et al., 2007; Meireles et al., 2006; Souza et al., 2007; Thomaz et al., 2007; Volotão et al., 2007).

Em razão da ausência de pesquisadores brasileiros no evento, este artigo pretende divulgar notícias, discussões, questionamentos, experiências e avanços mais recentes nos estudos sobre *Giardia* e *Cryptosporidium* em diversos países industrializados, como Grã-Bretanha, Estados Unidos, Austrália, Canadá, Holanda, Bélgica, Itália e França.

A CONFERÊNCIA

O evento teve início com uma reflexão sobre o impacto de *Giardia* na ciência e na sociedade, ressaltando-se que, apesar de ter sido descoberta há mais de 400 anos nas fezes de seu próprio descobridor, Leeuwenhoek, por muitos anos foi vista apenas como uma curiosidade e não como um patógeno. O potencial

patogênico de *Giardia* em humanos não mais representa dúvida e, em 2006, ela foi incluída na lista das doenças negligenciadas nas regiões em desenvolvimento do mundo (Savioli et al., 2006). No entanto, nosso conhecimento sobre a significância do potencial patogênico de *Giardia* nos animais domésticos e silvestres ainda é pequeno, porém estudos recentes sugerem que a infecção por *Giardia* pode afetar a produção do gado que se traduz em prejuízo econômico. Várias pesquisas biomoleculares evidenciam a transmissão zoonótica e demonstram a necessidade de se reavaliar sua taxonomia.

Como exemplo da importância do homem no processo de transmissão, uma pesquisa sobre *Giardia* realizada em Banks Island, no Ártico Canadense, mostrou elevada prevalência e intensidade de *Giardia duodenalis* Assemblage A em *muskoxen* (um raro bovino peludo nativo do Ártico) (Kutz et al., 2008). Suzan Kutz ratificou os achados de outros pesquisadores, segundo os quais os humanos são os componentes mais importantes na epidemiologia de giardíase e o fluxo do parasito dentro e entre as espécies ainda não está claro. A pesquisadora destacou que os surtos de veiculação hídrica geralmente identificam a contaminação por esgotos como a fonte de infecção.

Um estudo na Bélgica revelou que as infecções humanas foram causadas por *G. enterica* (Assemblage A) em 36% dos casos, *G. duodenalis* em 23% e infecção mista em 41% dos casos. De acordo com Thomas Geurden, esse resultado ratifica o fato de que a contribuição do gado como fonte de infecção de giardíase humana é mínima, uma vez que a maioria das giardíases bovinas é causada por *G. duodenalis* Assemblage E (Geurden et al., 2008).

A classificação corrente de *Cryptosporidium* e *Giardia* é baseada em uma variedade de parâmetros, incluindo preferência de hospedeiro e transmissão cruzada, diferenças morfológicas, sítios de infecção e diferenças genéticas. Com base na morfologia dos trofozoítos, existem seis espécies de *Giardia*, a saber: *G. muris* em roedores, *G. agilis* em anfíbios, *G. psittaci* e *G. ardea* em aves, *G. microti* em coiote e *G. duodenalis* (com sete assemblages ou grupos genéticos) em mamíferos (Smith et al., 2007).

Foi apresentado um breve histórico sobre os avanços nas pesquisas de *Cryptosporidium*, um dos 300 gêneros do filo Apicomplexa, já registrado em 106 países. Os estudos dos genótipos acrescidos de informações sobre morfologia e biologia têm servido para denominar novas espécies. Exemplo disso é que, durante o evento em maio de 2007, pesquisadores como Ronald Fayer, Una Ryan e Lihua Xiao, entre outros, reconheciam como válidas apenas 16 espécies e atualmente já reconhecem mais três novas espécies, *C. fayeri* e *C. macropodum* em cangurus (Ryan et al., 2008; Power & Ryan, 2008) e *C. ryanae* em gado (Fayer et al., 2008). As espécies nomeadas são: *C. parvum* (genótipo bovino) em humanos e mamíferos ungulados, *C. hominis* em humanos, *C. meleagridis* em aves e humanos, *C. bovis* em bovino e ovino, *C. suis* em porcos, *C. wrairi* em porquinho da índia, *C. felis em gato*, *C. canis* em cães, *C. saurophilum* em lagartos, *C. serpentis* em cobras, *C. muris*

em roedores, *C. andersoni* em bovino, *C. galli* e *C. baileyi* em aves, *C. molnari* e *C. scophthalmi* em peixes. Além dessas espécies, existem, aproximadamente, outros 40 criptosporídios sem nome, denominados genótipos, que são distintos e, em sua maioria, pertencem provavelmente a espécies crípticas (Smith et al., 2007). Há ainda 10 genótipos de aves (Ng et al., 2006). Sobre as espécies de aves, Una Ryan referiu-se à hipótese de que *C. meleagridis* seja originalmente parasito de mamíferos e que *C. galli* é muito patogênico para pássaros. Recentemente foi descrito um novo genótipo de *Cryptosporidium* (Wang et al., 2008).

Por outro lado, gerou grande discussão a proposição de uma nova espécie, *C. pestis*, para o parasito causador da transmissão de animal para humano. A proposição foi feita com base, principalmente, no fato de que *C. parvum* foi descrita em camundongo e também porque existe uma diferença genética muito clara entre *Cryptosporidium* bovine genotype e o mouse genotype (Slapeta 2006). Diferentemente dos outros pesquisadores acima citados, Joan Slapeta e Paul Monis já consideravam como válidas 21 espécies de *Cryptosporidium*.

Uma consulta à literatura revelou que já há registro de *C. pestis* diagnosticado como o agente causal de diarreia em tartarugas (Traversaa et al., 2008).

No histórico das espécies endêmicas de *Cryptosporidium* que infectam humanos em várias partes do mundo, Lihua Xiao citou que as cinco espécies responsáveis pela maioria das infecções, tanto em indivíduos imunocompetentes quanto em imunocomprometidos, são: *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis* e *C. canis*. Ocasionalmente, outras poucas espécies e genótipos de *Cryptosporidium* são encontrados em humanos, como *C. muris*, *C. suis*, *C. andersoni*, e *Cryptosporidium* genótipos do cervo e do macaco (Xiao & Feng, 2008). Estudos de epidemiologia molecular em países em desenvolvimento revelam que a complexidade na transmissão de *C. hominis* depende do país. Nesses países, geralmente há uma alta endemicidade de *Cryptosporidium* e baixa ocorrência de surtos, sendo as crianças e os indivíduos imunocomprometidos os mais afetados. É importante ressaltar que a baixa prevalência de infecções mistas reportadas em crianças se deve ao fato de ser detectado apenas o genótipo dominante. Os resultados de estudos de subtipagem de *C. hominis* (alelos Ia, Ib, Id, Ie) revelam a diversidade da transmissão em áreas endêmicas e enfatizam a necessidade de extensivos estudos de epidemiologia da criptosporidiose (Cama et al., 2007, 2008; Chalmers et al. 2008).

Muitos estudos de biologia, morfologia, bioquímica, preferência de hospedeiros, imunologia, patogenicidade, fisiologia e prevalência de *C. parvum* têm sido realizados. Os relatos sobre os novos estágios extracelulares do ciclo de vida em culturas de células e meios acelulares têm estimulado muita controvérsia. Talvez os genomas de *C. parvum* e *C. hominis* difiram em importantes etapas metabólicas de outros organismos Apicomplexa, explicando as razões por que as drogas usadas em outras doenças falham no tratamento da criptosporidiose. Por exemplo, a localização intracelular, mas extracitoplasmática é biologicamente

única, o que poderia explicar algumas características, até mesmo sua resistência aos agentes antimicrobianos.

Ainda que a aquisição de novas informações sobre este gênero tenha sido fenomenal em menos de uma década, ainda há alguns mistérios como, por exemplo, o motivo por que alguns isolados são mais patogênicos do que outros.

Em meio à confusa nomenclatura desses coccídeos, teve curso uma oportuna palestra sobre noções de nomenclatura. Taxonomia não é simplesmente uma preocupação dos biólogos, é uma ciência (Bowman 2005). O táxon pode ser determinado pelo pesquisador (i.e., família, gênero, espécie) de acordo com sua necessidade. Mas o pesquisador tem obrigação de sempre seguir as normas estabelecidas pelo International Code of Zoological Nomenclature (ICZN) para evitar a grande confusão que hoje existe quanto à nomenclatura de novas espécies, principalmente de *Cryptosporidium*. Genótipo, termo não reconhecido pelo ICZN, é um descritor temporário e não um táxon. Um ponto controverso em relação aos nomes científicos após 1999 refere-se aos trabalhos publicados, uma vez que os autores consideram um nome como válido após sua publicação. Muitas vezes os autores se esquecem de observar alguns itens do código do ICZN, como o artigo 23 – Princípio da Prioridade – e o artigo 52 - Princípio da Homonímia. Foi enfatizada ainda a importância de que o espécime tipo da definição original da espécie permaneça guardado, geralmente em coleções de museus, para exames posteriores por outros pesquisadores.

Um assunto muito polêmico é a proximidade do gênero *Cryptosporidium* com a subclasse Gregarina (parasitos de invertebrados), baseada em algumas características morfológicas, biológicas e bioquímicas. Foram expostas evidências de que *Cryptosporidium* spp. não são “coccidia” *sensu stricto*. Um trabalho de reação sorológica cruzada de *Cryptosporidium* com *Monocystis* sp (Gregarina) e de métodos moleculares mostra evidências de que eles possuem um ancestral comum (Carreno et al., 1999; Barta & Thompson, 2006). John Barta concluiu dizendo que “*Cryptosporidium* não são estranhos coccidia, eles devem ser pequenas gregarinas!”.

A inabilidade de passagens contínuas de *Cryptosporidium* em culturas de células e a inabilidade de criopreservar os oocistos ou os estágios intracelulares são limitações, por exemplo, para desenvolver técnicas padronizadas de identificação. As proteínas de interesse do parasito só podem ser expressas em hospedeiros substitutos, como *Toxoplasma gondii*, bactérias ou leveduras (Tzipori & Widmer, 2008). Recentes desenvolvimentos no cultivo *in vitro* têm revelado que *Cryptosporidium* pode completar seu ciclo de vida fora das células do hospedeiro. As similaridades entre *Cryptosporidium* e Gregarina incluem o ciclo de vida monoxênico, oocistos com quatro esporozoítas e parede dupla, gamontes extracelulares e localização no trato gastrointestinal do hospedeiro (Hijawi et al., 2004).

Uma Ryan definiu dois conceitos que ainda suscitam dúvidas: genotipagem, como a identificação de diferentes espécies, e *fingerprint*, como a diferenciação dentro da espécie. Atualmente os *loci* utilizados para a identificação genotípica

de *Cryptosporidium* são: a) 18S RNA; b) actin (*acetil-CoA sintetase*); c) HSP-70 (*heat shock protein* de 70kDa); d) COWP (proteína de parede do oocisto); e) TRAP (*thrombospondin-related adhesive proteins*); f) DHFR (*dihydrofolate reductase*). Para a subtipagem de *C. hominis* e *C. parvum*, deve ser usado o gene GP60 (60-KDa glicoproteína) por ser um gene hipervariável, biologicamente relevante, amplamente utilizado em pesquisas e o gene mais polimórfico e o microssatélite ML1.

Em um estudo realizado na Holanda, no qual foram empregados os *loci* dos genes 18S rDNA, COWP, HSP70, microssatélite ML1 e GP60, foram encontrados 70% de *C. hominis*, 19% de *C. parvum*, 10% de infecção mista (*C. hominis* + *C. parvum*) e 1% de *C. felis*. Nas infecções mistas, as crianças apresentaram principalmente *C. hominis*; nos adultos, a predominância foi de *C. parvum*. Nas fezes de bovinos, foi encontrado apenas *C. parvum*. A subtipagem revelou dois ciclos de transmissão: transmissão homem-homem e transmissão zoonótica (Wielinga et al., 2008).

Andrew Thompson considera que, para o estudo de *Giardia*, o gene TPI (triose phosphate isomerase) seja o mais variável, ideal para identificação de cepas. O gene GDH (glutamase desidrogenase), com moderada variabilidade, é o mais versátil. O gene β -giardin, como locus único e conservado, tem grande potencial para definir os grupos dentro dos Assemblages. O gene SSU rDNA é útil para tipagem de Assemblage e subassemblage (Traub et al., 2005).

Por causa da morfologia de *Giardia*, as investigações da especificidade de hospedeiros e os padrões de transmissibilidade requerem a caracterização genética dos cistos nas amostras dos hospedeiros. Para isso, foram realizados PCR e o sequenciamento direto de quatro genes diferentes (18S rRNA, β -giardin, GDH, e TPI) que foram combinados para identificar os multilocus (MLG) dos genótipos de cada Assemblage em 61 amostras humanas e 29 animais. Nos isolados de Assemblage A, foram identificados 10 MLG, tendo sido raramente idênticos os MLG humanos e os animais. Não ficou evidenciada transmissão zoonótica (Cacció & Ryan 2008; Cacció et al., 2008). Simone Cacció, ao contrário de Andrew Thompson, considera que o gene 18S rRNA não é muito informativo.

No *workshop* sobre os métodos atuais (Jex et al., 2008) e futuros para genotipagem de *Cryptosporidium* e *Giardia*, foi reiterada a grande utilidade da genotipagem desses protozoários, embora tenha ficado evidente a falta de padronização das várias etapas dos procedimentos para a genotipagem, tais como: coleta de amostra ambiental (água), preservação de amostra fecal, processamento das amostras de água, extração do DNA e região do gene alvo para amplificação pela PCR.

É consenso que os estudos de *Cryptosporidium* e *Giardia* ainda carecem de padronização internacionalmente aceita, o que aumentaria a confiança nos resultados, estabeleceria padrões de performances para os analistas e os laboratórios similares, aumentaria o conhecimento e a base educacional dos pesquisadores e dos gerentes de laboratórios e possibilitaria a validação dos métodos entre a comunidade científica. Ainda permanece a dúvida sobre qual tipo de amostra é necessário:

oocistos, cistos, lisados ou DNA? Como devem ser concentrados os (oo)cistos para serem conservados e enviados? Como será extraído o DNA dos oocistos? Quanta informação é necessária? Quais *loci* utilizar? Devem ser testados pelo menos dois *loci* e um desses deve ser o 18S rDNA para *Cryptosporidium* ou o pesquisador deve ter liberdade para escolher? Essas questões ainda permanecem sem resposta.

Sobre o emprego das diferentes metodologias de diagnóstico de *Cryptosporidium* e *Giardia*, Rachel Chalmers citou como exemplo a situação na Grã-Bretanha, onde o exame microscópico continua sendo o padrão para o diagnóstico clínico de rotina dos pacientes com diarreia que procuram assistência médica. Lá a estimativa é de que apenas um quarto dos pacientes forneça amostra de fezes para exame. Entre os laboratórios, 70% usam como rotina a coloração com Auramina, 26% empregam a coloração modificada de Ziehl Neelsen, métodos que, embora sejam menos sensíveis, são os de menor custo. Atualmente os testes imunoenzimáticos vêm sendo introduzidos no diagnóstico de rotina nos laboratórios que processam grande número de amostras, seguidos de teste de confirmação gênero-específico. Nos Estados Unidos, o emprego desses métodos em conjunto com a microscopia de imunofluorescência aumenta a sensibilidade e a especificidade sobre as colorações convencionais, mas o custo é elevado para muitos países, como é nosso caso no Brasil. Foi enfatizado que, para a escolha do método diagnóstico, devem ser considerados vários fatores como: a finalidade do trabalho, a simplicidade de execução da técnica, a facilidade de interpretação dos resultados, os equipamentos necessários, os técnicos e seu nível de treinamento e de experiência, a quantidade de testes demandada, a rapidez da resposta, a sensibilidade e especificidade, a reprodutibilidade, as metodologias combinadas, PCR multiplex e os custos. A modernização dos serviços deve aumentar o uso de PCR para o diagnóstico e, mais logicamente, o emprego de PCR multiplex para patógenos gastrointestinais.

Com base em sua experiência, Vitaliano Cama recomendou o exame microscópico de 50µl de amostra de fezes concentradas pela técnica de Ritchie para detecção de *G. duodenalis* em estudos epidemiológicos. Os espécimes positivos pela microscopia óptica devem ser confirmados pela reação de imunofluorescência direta, utilizando-se o *kit* Merifluor (Meridian Biosciences, Cincinnati, Ohio) (o que no Brasil eleva muito o custo do exame) ou pela amplificação por PCR e sequenciamento do gene TPI, que o pesquisador considera ser método de baixa sensibilidade, mas de alta especificidade (Feng et al., 2008).

Quanto à utilização da separação imunomagnética (IMS) de oocistos em amostras de água e de alimentos, várias dificuldades ainda precisam ser superadas, pois a turbidez, a alta concentração de cátions divalentes, as substâncias orgânicas e os polissacarídeos afetam a eficiência na recuperação dos oocistos. A afinidade do anticorpo e a expressão dos epítomos dos oocistos também influenciam na performance dos *kits*. A extração de DNA dos oocistos aderidos às pérolas imunomagnéticas tem como desvantagem carregar os inibidores de PCR aderidos às pérolas e, como vantagem, a pouca manipulação da amostra (Nichols et al., 2006).

A literatura revela que a eficiência na recuperação de (oo)cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras de água varia de 10% a 100%. Isso ocorre em consequência da variação entre os técnico-analistas, da grande variação entre as amostras mesmo dentro de uma amostragem que pode ser muito grande, necessitando da inclusão de um controle interno positivo no teste. Uma vez que existe a real necessidade de um novo sistema de concentração e eluição, foi desenvolvido um método de recuperação automatizado, o *Filta-Max foam filters* já aprovado pela USEPA (Lee et al., 2004).

Muitas são as publicações que tentam definir a epidemiologia da criptosporidiose e da giardiase. Embora muitos desses estudos tenham contribuído para o entendimento desses importantes patógenos, a compreensão de que todas as cepas do patógeno têm a mesma epidemiologia é incorreta. Porém, a habilidade de investigar a epidemiologia dos diferentes subtipos desses patógenos teve de esperar o desenvolvimento de testes (a maioria métodos moleculares) capazes de identificar de modo confiável as diferenças entre cepas.

As fontes de infecção de *Cryptosporidium* e *Giardia* podem ser: a) pessoa-pessoa; b) hídrica: descarga de esgoto, runoff, águas recreacionais; c) alimentos: por contaminação ambiental; d) zoonótica.

Um estudo realizado em Ontario, Canadá, demonstrou pela primeira vez a predominância de *G. duodenalis* Assemblage B (zoonótica) no gado, e foi o primeiro relato de *Giardia* e *Cryptosporidium* em carne crua comprada no varejo (Coklin et al., 2007).

Na literatura, há artigos que chamam a atenção para os mamíferos domésticos e silvestres como fonte de infecção humana e de contaminação da água (Feng et al., 2007). Por outro lado, há trabalhos que enfatizam a falta de evidências de que animais domésticos, silvestres e de criação sejam as fontes de infecção humana de criptosporidiose e giardiase. A questão é que a contaminação direta é a defecação na água, mas a maioria dos animais silvestres evita defecar na água e outros mamíferos não têm acesso aos sistemas de distribuição de água. A contaminação indireta é a distribuição do gado, do esterco (adubo) e as chuvas fortes.

Na Bélgica, um estudo para detectar a ocorrência de *Cryptosporidium* e *Giardia* na infecção de primatas não humanos revelou alta prevalência de *G. enterica* e nenhuma ocorrência de *Cryptosporidium* (Leveck et al., 2007).

Na Austrália, um estudo revelou que, dos isolados humanos, *C. hominis* (75,2%) foi predominante tanto na área urbana como na rural; *C. parvum* (22,9%) foi mais presente nos casos urbanos e *C. meleagridis* representou 1,9% dos casos. A principal rota de transmissão parece ser a direta de pessoa a pessoa (Ng et al., 2008).

Um fato que merece atenção é o risco biológico representado por *Giardia* e *Cryptosporidium* em alimentos congelados, pois atualmente apenas as bactérias são consideradas como potenciais riscos de contaminação. A Tailândia é um dos maiores exportadores de frutos do mar para várias regiões do mundo, por isso estava sendo considerada a inclusão de *Giardia* e *Cryptosporidium* na lista da

HACCP (*Hazard Analysis Critical Control Point*) para as indústrias de alimentos congelados. Em amostras de 200g de comida crua foram registrados de 6,6% a 35% de *Giardia* Assemblage A e 3,33% de *Cryptosporidium* e, em alimentos processados, 10% de *Giardia* Assemblage B e de 0% a 3,33% de *Cryptosporidium* (Sutthikornchai et al., 2006).

Em Palermo, Itália, apesar de um estudo de 40 amostras de saladas prontas para consumo não ter detectado a presença de *Cryptosporidium* e apenas uma amostra ter apresentado cistos de *Giardia*, também estava sendo sugerido que esses parasitos fossem incluídos na HACCP de indústrias ou setores que usam produtos vegetais frescos prontos para o consumo (Di Benedetto et al., 2007).

Apesar da mudança na legislação dos padrões de potabilidade da água de consumo na Grã-Bretanha e no País de Gales e da diminuição de casos de criptosporidiose, a veiculação hídrica de *Cryptosporidium* ainda representa fator de risco para humanos (Lake et al., 2007b). O estudo de 3.368 casos e igual número de controles revelou que *C. parvum* e *C. hominis* diferem em sua epidemiologia. *C. hominis* foi altamente associado a áreas com indivíduos de alto status socioeconômico, a áreas com crianças menores de 4 anos de idade e áreas urbanas; ao passo que os fatores de risco para *C. parvum* foram áreas rurais e a combinação de *Cryptosporidium* em água de reservatórios, bacia hidrográfica e fontes de águas subterrâneas (Lake et al., 2007a).

Vários estudos de inativação de *Cryptosporidium* por exposição aos raios UV têm sido realizados em laboratório, mas apenas um trabalho testou a inativação dos oocistos de *Cryptosporidium* por insolação. A exposição à irradiação solar pode representar um importante fator na inativação dos oocistos de *Cryptosporidium* presentes em diferentes tipos de coleções hídricas (King et al., 2008). Este fator poderia ter efeito positivo no Brasil, principalmente onde há muitas horas de insolação solar, como nas regiões Nordeste e Norte.

O banco eletrônico de dados com acesso gratuito, CryptoDB (<http://cryptodb.org/cryptodb/>), contém anotações, dados experimentais e metodologias múltiplas de bioinformática para análise dos dados disponíveis. CryptoDB tem um novo dispositivo desenhado para receber as EST (*expressed sequence tags*), usadas para identificação de cepas. CryptoDB é parte de uma grande base de dados do filo Apicomplexa, ApiDB (<http://ApiDB.org>) que representa o ponto de entrada unificada para o NIH/NIAID *Apicomplexan Bioinformatics Resource Center* (Aurrecochea et al., 2007; Heiges et al., 2006; Puiu et al., 2004).

No evento foi apresentado o banco de dados que está sendo organizado para *Cryptosporidium* e *Giardia*, constituído por uma rede de cientistas de 12 institutos europeus. O objetivo principal da ZOOPNET (*Zoonotic Protozoa network for Cryptosporidium and Giardia*) é implementar a *expertise* na detecção e controle de *Cryptosporidium* e *Giardia*, coletando informações atualizadas sobre giardiase e criptosporidiose na Europa. O banco de dados (<http://hypocrates.rivm.nl>) está dividido em dois módulos: um banco de dados de sequências de DNA (hypocrates.

rivm.nl/bnwww/MedVetNet) e um banco de dados epidemiológicos (www.hpa-bioinfodatabases.org.uk/zoopnet/epi_home), ambos acessíveis via internet pelo portal da ZOOPNET: www.hpa-bioinfodatabases.org.uk/zoopnet/.

Maior quantidade de dados permitirá mais comparações, por exemplo, de genótipo/clima, países/viagens/genótipos ou tipo de trabalho (ocupação) e risco. A combinação da epidemiologia clássica com as modernas tecnologias de bioinformática pode auxiliar no estudo de uma única amostra e nos dados de sequenciamento do DNA ligados à epidemiologia do parasito. Os pontos a serem abordados são: a seleção de marcadores, os métodos de genotipagem, as informações epidemiológicas necessárias, a organização do banco de dados e do *website* com acesso aberto, dedicado a esses parasitos e próximo ao pesquisador.

Os projetos genômicos aumentam as vastas bases de dados, de genoma às EST, de RNA a perfis de expressão de proteínas, via caminhos metabólicos, de polimorfismo genético e dados epidemiológicos de resultados genômicos comparativos, compilados da análise de espécies cruzadas. Embora essas informações sejam muito valiosas, elas levantam um problema importante: como captar efetivamente, manter, atualizar, anotar e integrar essas fontes para avançar na pesquisa biomédica? A informática genômica e o desenvolvimento do banco de dados é um desafio para qualquer organismo, principalmente os patógenos. Para David Roos, o pesquisador ainda tem as seguintes questões: Como as drogas são metabolizadas? Quais antígenos estão presentes e acessíveis na superfície do parasito? Quais genes modificam a virulência e a resposta no hospedeiro? (Roos, 2005; Aurrecochea et al., 2007).

O conhecimento do genoma inteiro de *C. parvum* e *C. hominis* (Xu et al., 2004), tem aumentado muito nosso conhecimento da biologia desses parasitos. Entretanto, há ausência geral de métodos de detecção (biomarcadores espécie/específicos) que sejam rápidos e sensíveis para distinguir entre as duas espécies. A descoberta da plataforma proteômica mostra simultaneamente grande número de proteínas sintetizadas por um organismo, em adição a muitas modificações pós-translacionais observadas nessas proteínas. Os biomarcadores de proteínas podem servir como indicadores da presença *Cryptosporidium* e até mesmo de suas espécies, permitindo a determinação do risco que possam causar nos sistemas de água e na produção e processamento da carne (Truong et al., 2006).

O sequenciamento do genoma de *C. muris* estava quase completo (http://msc.tigr.org/c_muris/index.shtml). Embora *C. muris* não seja um patógeno importante para o homem e os animais domésticos e de criação, é relevante sequenciar seu genoma para possibilitar a comparação com o genoma das duas espécies que mais afetam o homem e para a elucidação de aspectos relativos às suas diferenças de especificidade e virulência.

Foi apresentado um estudo no qual foram descobertas oito proteínas que induzem o excistamento de *Cryptosporidium*, que incluem proteínas ribossomais, enzimas metabólicas e proteínas *heat shock*. Essas proteínas representam alvos

promissores para o desenvolvimento de novas vacinas ou quimioterapias que possam bloquear a entrada do parasito nas células do hospedeiro (Snelling et al., 2007).

CONSIDERAÇÕES

A taxonomia de ambos os coccídeos ainda causa controvérsias. No decorrer da conferência, ficou clara a falta de uniformidade na nomenclatura usada pelos pesquisadores para *Cryptosporidium*. Ora foi empregado *C. parvum* genótipo animal, ou *C. parvum* genótipo I, ou apenas *C. parvum* para a espécie zoonótica, *C. bovis* para espécie de bovino ou ainda *C. pestis* para a espécie de bovino que causa infecção humana. Para a espécie humana, foi usada *C. hominis*, *C. parvum* genótipo humano e *C. parvum* genótipo II. Há ainda discordância quanto às espécies válidas. Alguns autores consideravam 21 espécies válidas de *Cryptosporidium*, enquanto a maioria considerava apenas 16 espécies e 40 genótipos ainda não nomeados. Em relação às espécies que infectam humanos, Xiao acrescenta *C. andersoni* como parasito eventual.

A nomenclatura de *Giardia* ainda é mais confusa, uma vez que cada pesquisador emprega uma denominação. Um rápido levantamento entre as palestras proferidas e os trabalhos apresentados no evento revelou que 21 trabalhos adotaram o nome *G. lamblia*, 21 nomearam *G. duodenalis*, 16 referiram-se à *G. intestinalis*, 2 referiram-se apenas a *Giardia* Assemblages sem empregar o nome específico e 1 grupo já denomina de *G. enterica* a Assemblage A de origem humana.

Em várias palestras foi ressaltada a necessidade de uniformizar a nomenclatura e de denominar corretamente a espécie com base no Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN).

Outro ponto sobre o qual ainda não há consenso é a padronização das técnicas diagnósticas, desde o modo de composição das amostras líquidas, das técnicas de concentração e purificação das amostras até mesmo o exame de fezes. Enquanto Huw Smith considera que a concentração de (oo)cistos por IMS faz com que as pérolas retenham os inibidores de PCR, Guy Robinson relata que a separação imunomagnética aumenta a sensibilidade de detecção de oocistos em água e remove a maioria dos inibidores. No entanto, o grupo de pesquisadores que fez o encerramento do evento considerou que os dados de epidemiologia molecular dos parasitos, das doenças e de rastreamentos das fontes de infecção revelaram padronização suficiente dos métodos de genotipagem e subgenotipagem. Embora as avançadas metodologias de biologia molecular nos laboratórios de países desenvolvidos sejam factíveis, a microscopia óptica realizada por técnicos bem treinados nos países em desenvolvimento ainda é a realidade, como é o caso do Brasil.

O desenvolvimento de análises de protozoários em amostras ambientais vem sendo impulsionado. Durante o evento, vimos que diferentes métodos de diagnóstico têm sido desenvolvidos para detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras de água, cada qual apresentando vantagens e desvantagens. No entanto,

ainda não há um método que seja universalmente aceito. O método proposto pela agência ambiental americana (“Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water /IMS/FA” USEPA 1999), adotado em alguns países industrializados, é inviável para os países em desenvolvimento ou para os subdesenvolvidos, por tratar-se de metodologia de alto custo.

O grande número de trabalhos apresentados sobre genotipagem de *Cryptosporidium*, principalmente em amostras ambientais, denota que esta é uma preocupação geral. É importante determinar o papel da água, principalmente, a água de consumo, como rota de transmissão de *Giardia* e *Cryptosporidium*. Por essa razão, vários trabalhos estudaram a viabilidade dos (oo)cistos e sua infectividade. Isso porque é necessário conhecer as espécies e os genótipos presentes no ambiente para saber se são espécies de importância para a saúde pública. Porém, para avaliar o risco real de contaminação destes (oo)cistos para o homem, é necessário saber se eles são de espécies que infectam a população humana, ou ainda, se estão viáveis nestes corpos de água.

A compreensão da maneira como esses parasitos interagem com seus hospedeiros (biologia básica, bioquímica, fisiologia, imunologia) é fundamental para identificar seu sucesso como parasito intestinal. Com o sequenciamento dos genomas de *Giardia* e *Cryptosporidium*, muitas informações sobre as similaridades e diferenças entre os parasitos e os hospedeiros foram acrescentadas. No evento, também houve várias apresentações sobre as novas tecnologias genômicas, proteômicas, glicômicas e transcriptômicas. O perfil proteômico é uma abordagem útil para se obter uma visão global das proteínas presentes num sistema sob diferentes condições. Ele também pode auxiliar no entendimento dos determinantes moleculares envolvidos na patogênese e no desenvolvimento de vacinas.

A preocupação com o conhecimento das rotas de transmissão de *Giardia* ficou evidenciada em duas sessões. Uma na qual foi reiterada a importância do homem como a principal fonte de infecção na giardíase e outra que discutiu os fatos e mitos do papel dos animais domésticos e silvestres nas infecções humanas de *Giardia* e *Cryptosporidium*.

Com a recente publicação do genoma de *Cryptosporidium*, a investigação das proteínas expressas por *C. parvum* poderá fornecer informação complementar sobre a biologia desse complexo organismo.

Foram apresentados alguns estudos para a identificação da expressão das proteínas nas diferentes fases de desenvolvimento dos parasitos, com o objetivo de desenvolver medicamentos eficazes e entender a biologia básica de cada patógeno.

Apesar dos esforços que vêm sendo empreendidos por mais de 20 anos, ainda não há um tratamento efetivo para criptosporidiose. Um ponto de concordância foi que há urgência em desenvolver e avaliar novos medicamentos e tratamentos com menos efeitos colaterais.

Em pesquisa com crianças de Fortaleza foram diagnosticados *C. hominis* e *C. parvum*; os testes moleculares, a exemplo de trabalhos anteriores (Gonçalves

et al, 2006; Gatei et al., 2003), foram realizados no exterior (Bushen et al., 2007). Todavia, uma pesquisa existente no Banco de Teses do portal da CAPES revela um crescente número de trabalhos acadêmicos principalmente sobre *Cryptosporidium*. Podemos traduzir esse fato como a busca dos pesquisadores brasileiros em padronizar metodologias de detecção e técnicas moleculares de baixo custo para viabilizar o estudo das desconhecidas epidemiologias de criptosporidiose e giardíase no Brasil.

AGRADECIMENTOS

Minha participação no evento foi financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo N°. 07/00487-6).

ABSTRACT

Current state of the knowledge on *Cryptosporidium* and *Giardia*

The intestinal protozoan parasites *Cryptosporidium* and *Giardia* have deserved much attention by the researchers, due to its association with acute and chronic diarrheic diseases, both in immunocompromised and immunocompetent individuals. The occurrence of waterborne and foodborne outbreaks enhance their importance to Public Health. In May 2007, the II International *Giardia* and *Cryptosporidium* Conference was held to discuss the current state of knowledge and to identify effective control strategies, to discuss and transmit pertinent information and technologies, and to encourage young scientists. The purpose of this paper is to spread this information among the Brazilian scientific community. During the event, numerous aspects of the biology of these parasites were discussed, as well as advances in new detection and molecular characterization methodologies, fundamental to the knowledge of the epidemiology of each species, and proteomics studies that could point out new methods to control *Giardia* and *Cryptosporidium*.

KEY WORDS: *Giardia*. *Cryptosporidium*. Molecular Epidemiology. Diarrheic Diseases.

REFERÊNCIAS

1. Araujo RS, Carvalho-Almeida TT, Matté GR, Rojas MVR, Pereira A, Matté MH. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água salobra. *Bol Inst Adolfo Lutz* 15: 31-32, 2005.
2. Araújo AJUS, Gomes AHS, Almeida ME, Kanamura HY. Detecção de *Cryptosporidium meleagridis* em amostras fecais de pacientes HIV positivos no Brasil. *Rev Panam Infectol* 9: 38-40, 2007.
3. Araújo AJUS, Kanamura HY, de Almeida ME, Gomes AH, Pinto TH, Da Silva AJ. Genotypic identification of *Cryptosporidium* spp. isolated from HIV-infected patients and immunocompetent children of São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 50: 139-143, 2008.

4. Aurrecochea C, Heiges M, Wang H, Wang Z, Fischer S, Rhodes P, Miller J, Kraeme E. API DB: Integrated resources for the apicomplexan bioinformatics resource center. *Nucleic Acids Research* 35: Database issue D427-D430, 2007.
5. Barta JR, Thompson RCA. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. *Trends Parasitol* 22: 463-468, 2006.
6. Bouzid M, Steverding D, Tyler KM. Detection and surveillance of waterborne protozoan parasites. *Current Opinion Biotechnol* 19: 302-306, 2008.
7. Bowman DD. What's in a name?. *Trends Parasitol* 21: 267-269, 2005.
8. Bushen OY, Kohl A, Pinkerton RC, Dupnik K, Newman RD, Sears CL, Fayer R, Lima AML, Guerrant RL. Heavy cryptosporidial infections in children in northeast Brazil: comparison of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum*. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 101: 378-384, 2007.
9. Caccio S M., Ryan U. Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol Bioch Parasitol* 160: 75-80, 2008.
10. Cacciò SM, Beck R, Lalle M, Marinculic A, Pozio E. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *Int J Parasitol* 38: 1523-1531, 2008.
11. Cama VA, Ross JM, Crawford S, Kawai V, Chavez-Valdez R, Vargas D, Vivar A, Ticona E, Navincopa M, Williamson J, Ortega Y, Gilman RH, Bern C, Xiao L. Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. *J Infect Dis* 196: 684-691, 2007.
12. Cama VA, Bern C, Roberts J, Cabrera L, Sterling CR, Ortega Y, Gilman RH, Xiao L. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. *Emerg Infect Dis* 14: 1567-1574, 2008.
13. Carvalho-Almeida TT, Casimiro AM, Matte GR, Matte MH. Na improved method for extracting *Cryptosporidium* sp DNA from preserved faeces and potential application for cryptosporidiosis surveillance. *Rev Bras Vig Sanit I*: 208-231, 2005.
14. Carreno RA, Martin DS, Barta JR. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol Res* 85: 899-904, 1999.
15. Chalmers RM, Hadfield SJ, Jackson CJ, Elwin K, Xiao L, Hunter P. Geographic linkage and variation in *Cryptosporidium hominis*. *Emerg Infect Dis* 14: 496-498, 2008.
16. Coklin T, Farber J, Parrington L, Dixon B. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Ontario, Canada. *Vet Parasitol* 150: 297-305, 2007.
17. Di Benedetto MA, Cannova L, Di Piazza F, Amodio E, Bono F, Cerame G, Romano N. Hygienic-sanitary quality of ready-to-eat salad vegetables on sale in the city of Palermo (Sicily). *Ig Sanita Pubbl* 63: 659-670, 2007.
18. Fayer R, Santin M, Trout JM. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Vet Parasitol* 156: 191-198, 2008.
19. Feng Y, Ortega Y, He G, Das P, Xu M, Zhang X, Fayer R, Gatei W, Cama V, Xiao L. Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Vet Parasitol* 144: 1-9, 2007.
20. Feng Y, Ortega Y, Cama V, Terrell J, Xiao L. High intragenotypic diversity of *Giardia duodenalis* in dairy cattle on three farms. *Parasitol Res* 103: 87-92, 2008.
21. Gatei W, Greensill J, Ashford RW, Cuevas LE, Parry CM, Cunliffe NA, Beeching NJ, Hart CA. Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. *J Clin Microbiol* 41: 1458-1462, 2003.
22. Geurden T, Geldhof P, Levecke B, Martens C, Berkvens D, Casaert S, Vercruyse J, Claerebout E. Mixed *Giardia duodenalis* assemblage A and E infections in calves. *Int J Parasitol* 38: 259-264, 2008.
23. Gonçalves EM, da Silva AJ, Eduardo MB, Uemura IH, Moura IN, Castilho VL, Corbett CE. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium hominis* associated with diarrhea outbreak in a day care unit in São Paulo. *Clinics* 61: 119-126, 2006.

24. Gonçalves EM, Araújo RS, Orban M, Matté GR, Matté MH, Corbett CE. Protocol for DNA extraction of *Cryptosporidium* spp. oocysts in fecal samples. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 50: 165-167, 2008.
25. Heiges M, Wang H, Robinson E, Aurrecochea C, Gao X, Kaluskar N, Rhodes P, Wang S, He C-Z, Su Y, Miller J, Kraemer E, Kissinger JC. CryptoDB: a *Cryptosporidium* bioinformatics resource update. *Nucleic Acids Research* 34: Database issue D419-D422, 2006.
26. Hijjawi NS, Meloni BP, Ng'anzo M, Ryan UM, Olson ME, Cox PT, Monis PT, Thompson RC. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *Int J Parasitol* 34: 769-777, 2004.
27. Huber F, da Silva S, Bomfim TC, Teixeira KR, Bello AR. Genotypic characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil. *Vet Parasitol* 150: 65-74, 2007.
28. Jex AR, Smith HV, Monis PT, Campbell BE, Gasser RB. *Cryptosporidium*-biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotechnol Adv* 26: 304-317, 2008.
29. Karanis P, Kourenti C, Smith H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J Water Health* 5: 1-38, 2007.
30. King BJ, Hoefel D, Daminato DP, Fanok S, Monis PT. Solar UV reduces *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in environmental waters. *J Appl Microbiol* 104: 1311-1323, 2008.
31. Kutz SJ, Thompson RA, Polley L, Kandola K, Nagy J, Wielinga CM, Elkin BT. *Giardia* assemblage A: human genotype in muskoxen in the Canadian Arctic. *Parasit Vectors* 1: 32, 2008 [ahead of print].
32. Lake IR, Harrison FCD, Chalmers R M, Bentham G, Nichols G, Hunter PR, Kovats RS, Grundy C. Case-control study of environmental and social factors influencing cryptosporidiosis. *Eur J Epidemiol* 22: 805-811, 2007a.
33. Lake IR, Nichols G, Bentham G, Harrison FC, Hunter PR, Kovats SR. Cryptosporidiosis decline after regulation, England and Wales, 1989-2005. *Emerg Infect Dis* 13: 623-625, 2007b.
34. Lee Y, Gomez LL, McAuliffe IT, Tsang VC. Evaluation of *Cryptosporidium parvum* oocyst recovery efficiencies from various filtration cartridges by electrochemiluminescence assays. *Let Appl Microbiol* 39: 156-162, 2004.
35. Levecke B, Dorny P, Geurden T, Vercammen F, Vercautysse J. Gastrointestinal protozoa in non-human primates of four zoological gardens in Belgium. *Vet Parasitol* 148: 236-246, 2007.
36. Meireles MV, Soares RM, dos Santos MM, Gennari SM. Biological studies and molecular characterization of a *Cryptosporidium* isolate from ostriches (*Struthio camelus*). *J Parasitol* 92: 623-626, 2006.
37. Nichols RA, Moore JE, Smith HV. A rapid method for extracting oocyst DNA from *Cryptosporidium*-positive human faeces for outbreak investigations. *J Microbiol Methods* 65: 512-524, 2006.
38. Ng J, Pavlasek I, Ryan U. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. *Appl Environ Microbiol* 72: 7548-7553, 2006.
39. Ng J, Eastwood K, Durrheim D, Massey P, Walker B, Armson A, Ryan U. Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* in rural New South Wales. *Exp Parasitol* 119: 192-195, 2008.
40. Power M, Ryan U. *Cryptosporidium macropodum* n.sp (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos *Macropus giganteus* *J Parasitol* 11: 1, 2008. [Epub ahead of print].
41. Puiui D, Enomoto S, Buck GA, Abrahamsen MS, Kissinger JC. CryptoDB: the *Cryptosporidium* genome resource. *Nucleic Acids Res* 32: Database issue D329-331, 2004.
42. Ryan UM, Power M, Xiao L. *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). *J Eukaryot Microbiol* 55: 22-26, 2008.
43. Roos DS. Genetics. Themes and variations in apicomplexan parasite biology. *Science* 309: 72-73, 2005.
44. Savioli L, Smith H, Thompson A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends Parasitol* 22: 203-208, 2006.
45. Slapeta J. *Cryptosporidium* species found in cattle: a proposal for a new species. *Trends Parasitol* 22: 469-474, 2006.

46. Smith H.V., Cacció S.M., Cook N, Nichols R.A.B., Tait A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Vet Parasitol* 149: 29-40, 2007.
47. Snelling WJ, Lin Q, Moore JE, Cherie Millar B, Tosin F, Pozio E, Dooley JSG, Lowery CJ. Proteomics Analysis and Protein Expression during Sporozoite Excystation of *Cryptosporidium parvum* (Coccidia, Apicomplexa). *Mol Cell Proteomics* 6: 346-355, 2007.
48. Souza SL, Gennari SM, Richtzenhain LJ, Pena HF, Funada MR, Cortez A, Gregori F, Soares RM. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of São Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (gdh) coding gene. *Vet Parasitol* 149: 258-264, 2007.
49. Sutthikornchai C, Jantanavivat C, Thongrungrat S, Harnroongroj T, Sukthana Y. Protozoal contamination of water used in Thai frozen food industry. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 36: 41-45, 2006.
50. Thomaz A, Meireles MV, Soares RM, Pena HF, Gennari SM. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of felines, canines and bovines in the state of São Paulo, Brazil. *Vet Parasitol* 150: 291-296, 2007.
51. Traub R, Wade S, Read C, Thompson A, Mohammed H. Molecular characterization of potentially zoonotic isolates of *Giardia duodenalis* in horses. *Vet Parasitol* 130: 317-321, 2005.
52. Traversaa D, Iorioa R, Otranto D, Modry, S, lapeta J. *Cryptosporidium* from tortoises: Genetic characterisation, phylogeny and zoonotic implication. *Mol Cel Probes* 22: 122-128, 2008.
53. Truong Q, Ferrari BC. Quantitative and qualitative comparisons of *Cryptosporidium* faecal purification procedures for the isolation of oocysts suitable for proteomic analysis. *Int J Parasitol* 36: 811-819, 2006. Epub 2006 Mar 31.
54. Tzipori S, Widmer G. A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. *Trends Parasitol* 24: 184-189, 2008.
55. Volotão AC, Costa-Macedo LM, Haddad FS, Brandão A, Peralta JM, Fernandes O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using beta-giardin gene: a phylogenetic analysis. *Acta Trop* 102: 10-19, 2007.
56. Wang R, Zhang L, Feng Y, Ning C, Jian F, Xiao L, Zhao J, Wang Y. Molecular characterization of a new genotype of *Cryptosporidium* from American minks (*Mustela vison*) in China. *Vet Parasitol* 154: 162-166, 2008.
57. Wielinga PR, de Vries A, van der Goot TH, Mank T, Mars MH, Kortbeek LM, van der Giessen JWB. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in The Netherlands. *Int J Parasitol* 38: 809-817, 2008.
58. Xiao L, Fayer R. Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int J Parasitol* 38: 1239-1255, 2008.
59. Xiao L, Feng Y. Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52: 309-323, 2008.
60. Xu P, Widmer G, Wang Y, Ozaki LS., Alves JM., Serrano MG., Puiu D, Manque P, Akiyoshi D, Mackey AJ., Pearson WR., Dear PH., Bankier AT., Peterson DL., Abrahamsen MS, Kapur V, Tzipori S, Buck GA. The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature* 431: 1107-1112, 2004.