

Parasitismo por *Cryptosporidium* spp. em canino doméstico no município de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

Parasitism by *Cryptosporidium* spp. in domestic canine in the city of Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

Parasitismo por *Cryptosporidium* spp. en un canino doméstico en el municipio de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

Recebido: 09/09/2021 | Revisado: 17/09/2021 | Aceito: 19/09/2021 | Publicado: 20/09/2021

Alexsander Ferraz

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0424-6249>
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
E-mail: xanderferraz@yahoo.com.br

Camila Moura de Lima

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9306-705X>
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
E-mail: camila.moura.lima@hotmail.com

Eugênia Tavares Barwaldt

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4902-1203>
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
E-mail: tbeugenia@gmail.com

Tanize Angonesi de Castro

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7222-1916>
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
E-mail: taniangonesi@gmail.com

Paola Renata Joanol Dallmann

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8590-066X>
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
E-mail: dallmannpaola@gmail.com

Carolina da Fonseca Sapin

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2757-6355>
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
E-mail: carolinasapin@yahoo.com.br

Márcia de Oliveira Nobre

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3284-9167>
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
E-mail: marcianobre@gmail.com

Leandro Quintana Nizoli

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0767-4097>
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
E-mail: leandro.nizoli@gmail.com

Resumo

Cryptosporidium spp. são protozoários, do filo Apicomplexa, com capacidade de infectar diferentes espécies de vertebrados, como mamíferos, aves, répteis, peixes, anfíbios e também o homem, pois apresenta potencial zoonótico, sendo o agente causador da Criptosporidiose. A infecção ocorre através da ingestão de oocistos esporulados presentes na água ou alimentos contaminados, ou ainda, pelo contato com fezes de animais infectados. Os sinais clínicos, quando presentes, são de gastroenterite, como diarreia, vômito, febre, cólicas abdominais e perda de apetite, tanto em animais como em humanos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi relatar o caso de um cão infectado por *Cryptosporidium* spp., diagnosticado através de exame coproparasitológico. O material analisado foi proveniente de um cão, adulto, macho, SRD, com histórico de diarreia, com sangue e muco, episódios esporádicos de vômito também foram relatados. Foi informado também que o animal estava com o cronograma de vermifugação e vacinação atualizados. Nas técnicas coproparasitológicas de Willis Mollay, Faust e HPJ, não foram observados formas evolutivas de nenhum gênero de enteroparasito. Para pesquisa de *Cryptosporidium* spp., foi realizado primeiramente a técnica de centrifugo sedimentação em formalina-éter para concentração dos oocistos e posteriormente, para identificação, a coloração de Ziehl-Neelsen modificada, onde foi possível visualizar oocistos do protozoário. Como tratamento foi preconizado uso off label de Azitromicina (10 mg/kg), VO, 24x24 hs, durante 7 dias, e probiótico, (5 gr.), 24x24 hs, durante 5 dias. Após o término da terapia, houve melhora clínica do paciente e após nova análise coproparasitológica, não foram observados oocistos de *Cryptosporidium* spp.

Palavras-chave: Criptosporidiose; Cão; Diagnóstico coproparasitológico; Zoonose.

Abstract

Cryptosporidium spp. are protozoa, of the Apicomplexa phylum, capable of infecting different species of vertebrates, such as mammals, birds, reptiles, fish, amphibians and also man, as it has zoonotic potential, being the causative agent of Cryptosporidiosis. Infection occurs through ingestion of sporulated oocysts present in contaminated water or food, or through contact with feces of infected animals. Clinical signs, when present, are gastroenteritis, such as diarrhea, vomiting, fever, abdominal cramps and loss of appetite, both in animals and in humans. Therefore, the aim of this work was to report the case of a dog infected with *Cryptosporidium* spp., diagnosed through coproparasitological examination. The material analyzed came from a dog, adult, male, SRD, with a history of diarrhea, with blood and mucus, sporadic episodes of vomiting were also reported. It was also informed that the animal had its deworming and vaccination schedule updated. In the coproparasitological techniques of Willis Mollay, Faust and HPJ, no evolutionary forms of any genus of enteroparasites were observed. To investigate *Cryptosporidium* spp., the centrifuge sedimentation technique in formalin-ether was performed first to concentrate the oocysts and later, for identification, the modified Ziehl-Neelsen staining, where it was possible to visualize the protozoan oocysts. As a treatment, off label use of Azithromycin (10 mg/kg), VO, 24x24 hours, for 7 days, and probiotic, (5 gr.), 24x24 hours, for 5 days, was recommended. After the end of therapy, there was clinical improvement in the patient and after a new coproparasitological analysis, no oocysts of *Cryptosporidium* spp.

Keywords: Cryptosporidiosis; Dog; Coproparasitological diagnosis; Zoonosis.

Resumen

Cryptosporidium spp. son protozoos, del filo Apicomplexa, capaces de infectar diferentes especies de vertebrados, como mamíferos, aves, reptiles, peces, anfibios y también al hombre, ya que tienen potencial zoonótico, siendo el agente causante de la Criptosporidiosis. La infección ocurre por ingestión de ooquistes esporulados presentes en agua o alimentos contaminados, o por contacto con heces de animales infectados. Los signos clínicos, cuando están presentes, son gastroenteritis, como diarrea, vómitos, fiebre, calambres abdominales y pérdida del apetito, tanto en animales como en humanos. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue reportar el caso de un perro infectado por *Cryptosporidium* spp., Diagnosticado mediante examen coproparasitológico. El material analizado procedía de un perro, adulto, macho, SRD, con antecedente de diarrea, con sangre y mucosidad, también se reportaron episodios esporádicos de vómitos. También se informó que el animal tenía actualizado su calendario de desparasitación y vacunación. En las técnicas coproparasitológicas de Willis Mollay, Faust y HPJ no se observaron formas evolutivas de ningún género de enteroparásitos. Para investigar *Cryptosporidium* spp., Se realizó la técnica de sedimentación por centrifugación en formalina-éter para concentrar los ooquistes y luego, para su identificación, la tinción de Ziehl-Neelsen modificada, donde fue posible visualizar los ooquistes protozoarios. Como tratamiento, se recomendó el uso off label de Azitromicina (10 mg / kg), VO, 24x24 horas, durante 7 días, y probiótico, (5 gr.), 24x24 horas, durante 5 días, se recomendó. Tras el final de la terapia, hubo mejoría clínica en el paciente y tras un nuevo análisis coproparasitológico, no se observaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp.

Palabras clave: Criptosporidiosis; Perro; Diagnóstico coproparasitológico; Zoonosis.

1. Introdução

Cryptosporidium spp. são protozoários, do filo Apicomplexa, com capacidade de infectar diferentes espécies de vertebrados, como mamíferos, aves, répteis, peixes, anfíbios e também o homem (Chalmers & Katzer, 2013). São parasitos intracelulares obrigatórios e acometem o epitélio do trato gastrintestinal, sendo capazes de infectar as microvilosidades, resultando em perda da superfície de absorção de nutrientes (Xiao, 2010). Podem ser encontrados também, menos comumente, em locais extra-intestinais, como trato respiratório, vesícula biliar, pâncreas, esôfago, estômago e fígado (Bouzig et al., 2013). A infecção ocorre via fecal oral, através da ingestão de oocistos esporulados, presentes na água ou alimentos contaminados, ou ainda pelo contato com fezes dos hospedeiros infectados (Maikai et al., 2013; Smith et al., 2006).

Das 26 espécies de *Cryptosporidium* existentes, 6 são capazes de causar doenças, sendo *C. parvum* o de maior importância em saúde pública e o principal causador da doença em seres humanos e em mamíferos em geral. Em cães, a espécie predominante é o *C. canis*, mas também podem ser acometidos pelo *C. parvum* e *C. muris* (Lucio-Forster et al., 2010). Tzipori e Campbell em 1981 foram os primeiros a descrever este parasito em cães e o primeiro caso clínico de criptosporidiose canina, foi relatado por Wilson et al. (1983). Nos gatos, a espécie comumente encontrada é o *C. felis*, podendo ser acometidos também pelo *C. parvum* e *C. muris* (Thompson et al., 2008). E o primeiro relato de criptosporidiose nesta espécie foi feito por Iseki em 1979.

A Criptosporidiose é uma doença parasitária com potencial zoonótico, sendo o *C. hominis* e o *C. parvum* os mais

encontrados no homem, mas também podem ser infectados por *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. felis* e *C. muris* (Caccio, et al. 2005)

A gastroenterite é a principal característica desta doença, sendo a diarreia, geralmente aquosa, vômito, febre e cólicas abdominais, os principais sinais clínicos apresentados, tanto nos humanos como em animais (Chalmers & Katzer 2013). A severidade do quadro depende de alguns fatores, como a espécie do parasito, carga parasitária, idade do hospedeiro e estado imunológico, podendo variar de uma forma assintomática até uma sintomática grave (Ungar, 1995). Em animais imunocompetentes, a infecção tende a ser autolimitante, enquanto nos imunossuprimidos, o quadro de diarreia costuma ser mais prolongado e grave (Yoshiuchi et al., 2010).

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado através da observação de oocistos nas fezes em microscopia, combinada com técnicas de coloração, como Ziehl-Neelsen, Auramina, Safranina, Kinyoun e Verde de Malaquita.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi relatar o caso de um cão infectado por *Cryptosporidium* spp., diagnosticado através de exame coproparasitológico.

2. Metodologia

A amostra analisada foi proveniente de um cão, adulto, macho, SRD. Os tutores relataram que o mesmo apresentava há uma semana, diarreia com sangue e muco, alguns episódios de vômito também foram relatados. Os tutores informaram também que o animal estava com o cronograma de vermifugação e vacinação atualizados.

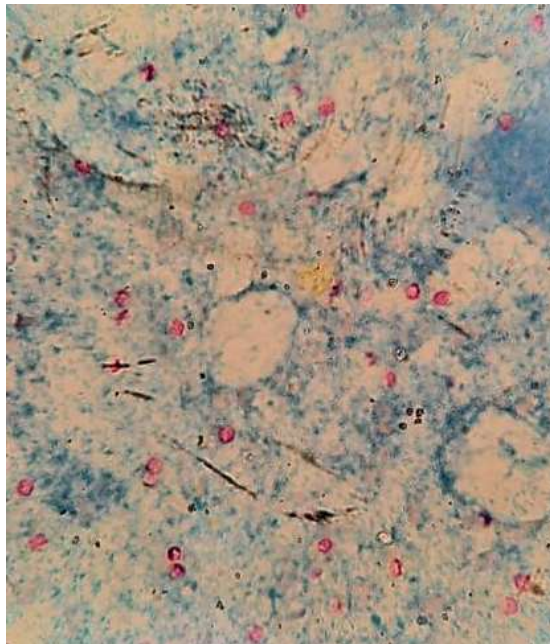
O material foi analisado no Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas. E as técnicas utilizadas para análise do material foram: Willis Mollay (1921), que utiliza o princípio da flutuação de ovos leves de helmintos e oocistos em solução hipersaturada; Faust (1938), técnica de centrifugo flutuação em solução de sulfato de zinco a 33%, utilizada para pesquisa de cistos de *Giardia* spp. e oocistos e técnica de Hoffmann, Pons e Janer (HPJ) (1934), que consiste na sedimentação espontânea de ovos pesados, como dos cestódeos e trematódeos. As análises foram realizadas em microscopia óptica com aumento de 100 e 400x e a identificação dos gêneros de parasitos ocorreu a partir das características morfológicas dos ovos, oocistos e cistos.

Para pesquisa de *Cryptosporidium*, foi realizado primeiramente a técnica de centrifugo sedimentação em formalina-éter (Ritchie, 1948) para concentração dos oocistos e posteriormente, para identificação, foram preparados esfregaços fecais, corados pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada. Para aumentar a sensibilidade do teste, as lâminas foram confeccionadas em duplicata. Além do exame coproparasitológico, foi realizado também coleta de sangue para hemograma e exame bioquímico.

3. Resultados e Discussão

Após realização das técnicas de Willis Mollay, Faust e HPJ, não foram observadas nenhuma forma evolutiva de parasito gastrointestinal. A partir do resultado negativo e dos sinais clínicos apresentados pelo animal, foi realizado a técnica de Ziehl-Neelsen modificada para pesquisa de *Cryptosporidium* spp., onde foi possível observar, através desta, oocistos do protozoário (Figura 1). No hemograma e exame bioquímico, os valores observados encontravam-se dentro dos valores de referência para a espécie.

Figura 1. Oocistos de *Cryptosporidium* spp. (corados de rosa) observados em fezes de cão, pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada, em aumento de 1000x.



Fonte: Autores.

Como tratamento, foi preconizado uso off-label de Azitromicina (10 mg/kg), VO, 24x24 hs, durante 7 dias, e probiótico, (5 gr.), 24x24 hs, durante 5 dias. Após o termino da terapia, foi relatado melhora clínica do paciente, e após nova análise coproparasitológica, não foram mais observados oocistos do parasito. Nasir (2013) realizou um estudo testando diferentes tratamentos para controle da Criptosporidiose em bezerros, e dentre os tratamentos utilizados, Azitromicina foi o mais efetivo, com 88,2% de eficácia na redução de oocistos. Outras alternativas terapêuticas, incluem a Paromomicina (Rossignol, 2010) e a Nitazoxanida (Ramirez et al., 2004).

Assim como no presente trabalho, onde o diagnóstico foi realizado a partir da técnica de centrifugo sedimentação em formalina-éter e coloração de Ziehl Neelsen modificada, outros autores também realizaram diagnóstico de *Cryptosporidium* spp em cães, utilizando as mesmas técnicas, como Silva et al. (2016), Moreira et al. (2019) e Almeida et al. (2008). A confecção e leitura de mais de uma lâmina da mesma amostra aumenta a sensibilidade da técnica, diminuindo a chance de resultados falso-negativos. Neta et al. (2010), comparando a técnica de Ziehl-Neelsen Modificada com análise de três lâminas por amostra, observou que das 156 amostras fecais analisadas, 57,1% foram positivas com apenas uma lâmina, 75% com duas e 83,3% com a leitura de três lâminas.

Cryptosporidium spp. é capaz de infectar diferentes espécies de vertebrados. Alguns estudos relatam sua ocorrência em cães, como Lallo e Bondan (2006), que analisando a prevalência deste parasito em amostras fecais de cães na cidade de São Paulo, encontraram 8,8% de positividade e Silva et al. (2016), que avaliando 97 cães domiciliados em Recife, PE, obtiveram 31,9% de amostras positivas (31/97). Almeida et al. (2015), investigando a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em fezes de cães e gatos domiciliados na cidade de Bom Jesus, PI, encontrou positividade em 56,8% dos cães.

Nos felinos, Silva et al. (2015), pesquisando *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de 32 gatos domiciliados em Recife (PE), observou que 18,8% (6/32) dos animais estavam infectados e Coelho et al. (2009), que detectaram 3,9% de amostras positivas, analisando amostras fecais de felinos do município de Andradina –SP. Num estudo realizado por Pereira e Ferreira (2012), analisando amostras fecais de 102 idosos e seus respectivos gatos de estimação, em Teresópolis (RJ), foi

identificada presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. através da coloração de Ziehl-Neelsen modificada em 16,7% dos idosos e 12,7% dos gatos.

Em humanos, num estudo realizado por Cama et al. (2003), analisando amostras fecais de 299 pacientes HIV positivos, infectados por *Cryptosporidium* em Lima, no Peru, foi encontrado *C. hominis* em 204 (67,5%), *C. meleagridis* em 38 (12,6%), *C. parvum* em 34 (11,3%), *C. canis* em 12 (4,0%), *C. felis* em 10 (3,3%) e *C. pig* em um (0,3%). Isso evidencia o potencial zoonótico deste parasito, principalmente em pacientes imunossuprimidos.

Dentre as formas de infecção, a água é uma importante fonte de disseminação, pois os oocistos sobrevivem por longos períodos em ambientes úmidos e frios, sendo resistentes a cloração e a ozonização (Andrade Neto e Assef, 1996). Devido a esta característica, a Organização Mundial da Saúde (OMS) o classifica como um dos patógenos de referência na análise de água potável, sendo um indicativo da qualidade da água em âmbito mundial. Alguns surtos relacionados a ingestão hídrica são relatados no mundo, como em Milwaukee (EUA), onde 403.000 pessoas foram infectadas, e dessas, 4.400 foram hospitalizadas, ocorrendo 100 óbitos, sendo 69 óbitos de indivíduos HIV positivos (Costa et al., 2006) e em Östersund (Suécia), onde em 2010, aproximadamente 27.000 habitantes foram afetados por um surto de criptosporidiose na água (Adler et al., 2017)

4. Conclusão

A partir deste relato e de outros estudos que citam a presença de *Cryptosporidium* spp. em amostras de fezes de cães e gatos, conclui-se que este protozoário pode ter sua prevalência subestimada nestas espécies. Desta forma, é de suma importância a realização periódica de exames coproparasitológicos e da utilização de técnicas apropriadas para pesquisa de oocistos deste parasito, que possui potencial zoonótico, representando um risco a saúde pública. Portanto, o diagnóstico parasitológico desta infecção deveria ser adotado como um exame laboratorial de rotina na clínica de pequenos animais.

Referências

- Adler, S., Widerström, M., Lindh, J., & Lilja, M. (2017). Symptoms and risk factors of *Cryptosporidium hominis* infection in children: data from a large waterborne outbreak in Sweden. *Parasitology research*, 116(10): 2613-2618.
- Almeida, A. J., Monteiro, M. I., Braga, R. S., Mariano, F. A., & Caldeira, M. S. (2008). Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em animais errantes apreendidos em Campos dos Goytacazes, RJ. *Jornal Brasileiro de Ciência Animal*, 1(2): 66-75.
- Andrade Neto, J. L., & Assef, M. C. V. (1996). Criptosporidiose e microsporidiose. In: Veronesi R. Tratado de infectologia. Ateneu, p.1170-1172.
- Bouzig, M., Hunter, P. R., Chalmers, R. M., & Tyler, K. M. (2013). *Cryptosporidium* Pathogenicity and Virulence. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(1):115-134.
- Caccio, S. M., Thompson, R. C. A., Mclauchlin, J., & Smith, H. V. (2005). Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends in Parasitology*, 21(9):430-437.
- Cama, V. A., Bern, C., Sulaiman, I. M., Gilman, R. H., Ticona, E., Vivar, A., Kawai, V., Vargas, D., Zhou, L., & Xiao, L. (2003). *Cryptosporidium* species and genotypes in HIV-positive patients in Lima, Peru. *Journal Eukaryotic Microbiological*, 50:531-533.
- Chalmers, R. M., & Katzer, F. (2013). Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends in Parasitology*, 29(5): 237-251.
- Coelho, W. M. D., Amarante, A. F. T., Soutello, R. V. G., Meireles, M. V., & Bresciani, K. D. S. (2009). Ocorrência de parasitos gastrintestinais em amostras fecais de felinos do município de Andradina, São Paulo. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 18(2): 46-49.
- Costa, F., Lacir, F., Silva, T. J. P. B., & Kenneth, S. 2006. *Cryptosporidium* spp. in food. *Higiene Alimentar*, 20(142): 58-63.
- Faust, E. C., D'antoni, J. S., & Odom, V. (1938) A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces I. Preliminary communication. *American Journal of Tropical Medicine*, 18(2):169-183.
- Hoffman, W. A., Pons, J. A., & Janer, J. L. (1934). Sedimentation concentration method in Schistosomiasis mansoni. *The Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine*, 9: 283-298.
- Iseki, M. (1979). *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. *Japanese journal of parasitology*, 28:285-307.

- Lallo, M. A., & Bondan, E. F. (2006). Prevalência de *Cryptosporidium* sp. em cães de instituições da cidade de São Paulo. *Revista de Saúde Pública*, 40(1):120-125.
- Lucio-Forster A., Griffiths, J. K., Cama, V. A., Xiao, L., & Bowman, D. D. (2010). Minimal zoonotic risk of cryptosporidiosis from pet dogs and cats. *Trends in Parasitology*, 26(4):174-179.
- Maikai, B. V., Baba-Onoja, E. B. T., & Elisha, I. A. (2013). Contamination of raw vegetables with *Cryptosporidium* oocysts in markets within Zaria metropolis, Kaduna State, Nigeria. *Food Control*, 31(1):45-48.
- Moreira, A. S., Baptista, C. T., Brasil, C. T., Valente, J. S., Bruhn, F. R. P., & Pereira, D. I. B. (2019). Comparação de técnicas de concentração por sedimentação e coloração para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de cães e gatos. *Science and Animal Health*, 7(1):2-11.
- Nasir, A., Avais, M., Khan, M. S., Khan, J. A., Hameed, S., & Reichel, M. P. (2013). Treating *Cryptosporidium parvum* infection in calves. *Journal of Parasitology*, 99(4):715-7.
- Neta, E. S. M., Sampaio, D. C., Galvão, G. S., & Munhoz, A. D. (2010). Comparação das técnicas de Ziehl-Neelsen modificada e contraste de fase na detecção de oocistos do gênero *Cryptosporidium* tyzzer, 1907 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em bovinos assintomáticos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 32(4):201-204.
- Pereira, C. R. A., & Ferreira, A. P. (2012). Ocorrência e fatores de risco da criptosporidiose em felinos de companhia de idosos. *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia*, 15(4):681-691.
- Ramirez, N. E., Ward, L. A., & Sreevatsan, S. (2004). A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbiology Infection*, 6(8):773-785.
- Ritchie, L. S. (1948). An ether sedimentation technique for routine stool examinations. U.S. Army Medical Department journal, 8(4):326.
- Rosignol, J. F. (2010). *Cryptosporidium* and *Giardia*: Treatment Options and Prospects for New Drugs. *Experimental Parasitology*, 124(1):45-43.
- Silva, G., Alves, L., Borges, J. C. G., & Faustino, M. A. G. (2016). Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em felinos de Recife, PE, Brasil. *Veterinária e Zootecnia*, 22(3):408-417.
- Silva, G. L., Santana, I. M., Ferreira, A. C. M. S., Borges, J. C. G., Alves, L. C., & Faustino, M. A. G. (2016). Avaliação de fatores epidemiológicos e sanitários associados à infecção por *Cryptosporidium* spp. em cães domiciliados. *Ciência Animal Brasileira*, 17(3):435-441.
- Smith, H. V., Cacció, S. M., Tait, A., Mclauchlin, J., & Thompson, A. R. C. (2006). Tools for investigating the environment transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. *Trends in Parasitology*, 22(4):160-167.
- Thompson, R. C. A., Palmer, C. S., & O'handley, R. (2008). The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *The Journal Veterinary*, 177(1):18-25.
- Tzipori, S., & Campbell, I. (1981). Prevalence of *Cryptosporidium* antibodies in 10 animal species. *Journal of Clinical Microbiology*, 14(4):455-456.
- Ungar, B. C. P. (1995). *Cryptosporidium*. In: Principles and practice of infectious diseases. 4ed Mandell GL, Bennet JE, Dohn R. Churchill Livingstone, 2500-2510.
- Willis, I. I. (1921). A simple levitation method for the detection of hookworm ova. *Medical Journal of Austrália*, 2(18):375-376.
- Wilson, R. B., Holscher, M. A., & Lyle, S. J. (1983). Cryptosporidiosis in a pup. *Journal of American Veterinarian Medical Association*, 183(9):1005-1006.
- Xiao, L. (2010). Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Experimental Parasitology*, 124(1):80-89.
- Yoshiuchi, R., Matsubayashi, M., Kimata, I., Furuya, M., Tani, H., & Sasai, K. (2010). Survey and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in owned companion animal, dogs and cats, in Japan. *Veterinary Parasitology*, 174(3-4):313-316.