

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

**AVALIAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL PARA
DETECÇÃO DE *Cryptosporidium parvum* EM
AMOSTRAS FECAIS DE BEZERROS**

Camila Guariz Homem
Zootecnista

ARAÇATUBA – SP
2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

**AVALIAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL PARA
DETECÇÃO DE *Cryptosporidium parvum* EM
AMOSTRAS FECAIS DE BEZERROS**

Camila Guariz Homem

Orientador: Prof. Adj. Marcelo Vasconcelos Meireles

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária - UNESP, Câmpus de Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

ARAÇATUBA – SP

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

H765a Homem, Camila Guariz.
Avaliação da PCR em tempo real para detecção de *Cryptosporidium parvum* em amostras fecais de bezerros / Camila Guariz Homem. - Araçatuba: [s.n.], 2011
69 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Medicina Veterinária
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles

1. *Cryptosporidium* spp. 2. Bovinos 3. Diagnóstico
4. Detecção molecular

CDD 636.20896



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: PCR em tempo real para detecção de Cryptosporidium parvum em
amostras fecais de bezerros.

AUTOR: CAMILA GUARIZ HOMEM

ORIENTADOR: Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL
(MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.


Dr. FERNANDO DE ALMEIDA BORGES


Dr.ª CARIS MARONI NUNES


Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES

DATA DA REALIZAÇÃO: 08 de junho de 2011.


Presidente da Comissão Examinadora
Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES
- Orientador -

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

CAMILA GUARIZ HOMEM - Jaboticabal – SP, 16 de Novembro de 1985. Graduação em Zootecnia, 2008, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP/FEIS, Campus de Ilha Solteira, São Paulo. Aluna do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal – Faculdade de Medicina Veterinária - UNESP – Campus de Araçatuba, São Paulo.

*“O topo da inteligência é
alcançar a humildade.”*

Salomão Ibn Gabirol

Dedico...

*À Deus,
por mais um sonho alcançado.*

*Aos meus pais, João Renato e Eva Maria,
pela educação, amor e apoio.*

*Aos irmãos Matheus e Vitória,
pelo companheirismo.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais João Renato e Eva, e aos irmãos Matheus e Vitória, por todo amor, apoio e incentivo em minhas decisões.

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FMVA/UNESP, pela viabilidade da realização do Mestrado.

Ao Prof. Adj. Marcelo Vasconcelos Meireles pela orientação, pelos grandes ensinamentos a mim transmitidos, por todo apoio e paciência.

Aos colegas de laboratório Alex Nakamura, Deuvânia Silva, Maria Braz e Milena Sato, pela boa convivência, amizade e colaboração para meu trabalho.

Aos colegas de pós-graduação Augusto Schweigert, Ana Carolina Rosa e Daniela Stockmann, pela amizade e pelos bons momentos vividos.

Aos amigos Beatriz Amaral, Bruno Cardoso, Uriles Chioda, Jussara Yoshida e Túlio Seraguci, pelo apoio, amizade e consideração.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de Mestrado (processo nº 2009/03761-7) e pelo auxílio financeiro para realização deste projeto de pesquisa (processo nº 2009/51595-9).

A todos que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho, minha sincera e gratidão.

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1	O gênero <i>Cryptosporidium</i>	15
1.1	Taxonomia.....	16
1.2	Ciclo biológico.....	18
1.3	Importância em saúde pública.....	20
1.4	Infecção em bovinos.....	22
	1.4.1 Participação dos bovinos na epidemiologia da criptosporidiose humana.....	24
1.5	Diagnóstico.....	26
	1.5.1 Detecção de oocistos.....	26
	1.5.2 Detecção de estágios evolutivos.....	27
	1.5.3 Métodos imunológicos.....	27
	1.5.4 Métodos moleculares.....	28
2	Objetivos.....	30
	Referências	30

CAPÍTULO 2 – Artigo científico..... 51

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 1

Figura 1. Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp.18

CAPÍTULO 2

Figura 1. Padronização da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). A) amplificação em tempo real das diluições contendo 10^9 a 10^3 cópias de fragmento do gene actina de *Cryptosporidium parvum*. B) curva de regressão padrão das diluições.....60

LISTA DE QUADROS

Página

CAPÍTULO 1

Quadro 1 - Espécies de <i>Cryptosporidium</i> atualmente descritas (Adaptado de SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008).....	17
---	----

CAPÍTULO 2

Quadro 1 - Oligonucleotídeos iniciadores e sonda utilizados na reação em cadeia da polimerase em tempo real para detecção de sequência do gene da actina específica para <i>Cryptosporidium parvum</i>	57
--	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Distribuição de amostras fecais de bezerros positivas pela PCR em tempo real (qPCR) e pela *nested* PCR, conforme os escores de ciclos *threshold* (Ct) obtidos pela qPCR.....62

Tabela 2 - Alinhamento dos primers e sonda específicos para o gene da actina de *Cryptosporidium parvum* com sequências de espécies que infectam bovinos com frequência¹ ou raramente², e com sequências de *Cryptosporidium* geneticamente mais relacionadas a *C. parvum*³64

AVALIAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO DE *Cryptosporidium parvum* EM AMOSTRAS FECAIS DE BEZERROS

RESUMO: A infecção por *Cryptosporidium parvum* em bovinos se manifesta como enfermidade subclínica ou com presença de morbidade e mortalidade, particularmente quando há associação com outros agentes infecciosos. *Cryptosporidium parvum* apresenta ainda grande importância em saúde pública. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) para detecção de *C. parvum* em amostras fecais de bezerros e sua comparação com a reação em cadeia da polimerase (*nested* PCR), rotineiramente utilizada para diagnóstico de *Cryptosporidium* spp.. Duzentas e nove amostras fecais de bezerros entre um dia e seis meses de idade foram examinadas pela qPCR para amplificação de fragmentos do gene da actina e pela *nested* PCR para o gene da subunidade 18S do rRNA. A qPCR apresentou positividade para *C. parvum* em 73,21% (153/209) das amostras, enquanto a *nested* PCR apresentou amplificação positiva para *Cryptosporidium* spp. em 56,5% (118/209) das amostras. A sensibilidade analítica da qPCR foi de aproximadamente um oocisto de *C. parvum*. Não se observou amplificação inespecífica de DNA *Cryptosporidium bovis*, *Cryptosporidium andersoni*, *Cryptosporidium ryanae*, *Cryptosporidium canis*, *Cryptosporidium serpentis*, *Cryptosporidium galli*, *Cryptosporidium baileyi* e *Cryptosporidium* genótipo II de aves. Desta forma, conclui-se que a qPCR para o gene da actina é uma técnica sensível e específica para detecção de *C. parvum* em amostras fecais de bezerros.

Palavras-chave: *Cryptosporidium* spp., bovinos, diagnóstico, detecção molecular.

EVALUATION OF REAL-TIME PCR FOR DETECTION OF *Cryptosporidium parvum* IN FECAL SAMPLES FROM CALVES

SUMMARY: The infection with *Cryptosporidium parvum* in cattle results in subclinical disease or in the presence of morbidity and mortality, particularly when associated with other infectious agents. This species is also an important public health problem. The aim of this research was to develop a real time polymerase chain reaction (qPCR) for detection of *C. parvum* DNA in fecal samples of calves, in comparison to a *nested* PCR routinely used for *Cryptosporidium* spp. diagnosis. Two hundred and nine fecal samples from calves aged between one day and six weeks were screened by qPCR specific for the actin gene of *C. parvum* and using *nested* PCR targeting the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* spp.. The qPCR showed positivity for *C. parvum* in 73,21% (153/209) of the samples, and nested PCR was positive for *Cryptosporidium* spp. in 56.5% (118/209) of the samples. The analytical sensitivity of qPCR foi de aproximadamente one oocyst *C. parvum* per reaction tube. Evaluation of analytical specificity did not reveal inespecific amplification for DNA of the following *Cryptosporidium* species and genotypes: *C. bovis*, *C. andersoni*, *C. ryanae*, *C. canis*, *C. serpentis*, *C. galli*, *C. baileyi* and avian genotype II. These results allowed the conclusion that qPCR for actin gene is a sensitive and specific technique for detection of *C. parvum* in fecal samples from calves.

Keywords: *Cryptosporidium* spp., bovines, diagnosis, molecular detection.

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. O gênero *Cryptosporidium*

Cryptosporidium spp. é um coccídio pertencente ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Subclasse Coccidiasina, Ordem Eucoccidiorida, Subordem Eimeriorina e Família Cryptosporidiidae. Protozoários desse gênero podem infectar mamíferos, aves, répteis, peixes e anfíbios (LEVINE, 1984; XIAO; FAYER, 2008).

O primeiro relato de infecção por *Cryptosporidium* foi descrito por Ernest Edward Tyzzer, em 1907, em glândulas gástricas de camundongos, sendo denominado *Cryptosporidium muris*; posteriormente, em 1912, o parasito foi encontrado no intestino dessa mesma espécie, sendo denominado como *Cryptosporidium parvum* (TYZZER, 1912). Porém, somente após um surto acometendo aves domésticas em 1950 (SLAVIN, 1955) e, sobretudo, após os primeiros relatos em humanos (MEISEL et al., 1976; NIME et al., 1976), foi que esse agente passou a ser pesquisado de maneira mais frequente.

Até a década de 80, a infecção por *Cryptosporidium* em animais era considerada rara e, em seres humanos, foi descrita como uma infecção oportunista em indivíduos imunologicamente comprometidos. A partir dessa data, *Cryptosporidium* vem sendo considerado um importante agente etiológico de diarreia em seres humanos imunossuprimidos e também em alguns animais domésticos e selvagens (ASHBOLT, 2004; SRÉTER; VARGA, 2000; XIAO et al., 2004), e a criptosporidiose foi reconhecida como uma grave enfermidade disseminada por veiculação hídrica, com o agravante da dificuldade de prevenção da contaminação ambiental e ausência de terapias eficazes (DILLINGHAMA et al., 2002).

1.1 Taxonomia

A taxonomia desse gênero vem sendo padronizada com o uso de métodos moleculares que, conjuntamente com estudos morfológicos, biológicos ou de especificidade por hospedeiros auxiliam na validação das espécies descritas (XIAO; CAMA, 2006).

Diversos autores identificaram aproximadamente 23 espécies e vários genótipos de *Cryptosporidium* (Quadro 1) que acometem aves, répteis, anfíbios, peixes e mamíferos, incluindo o homem (FAYER et al., 2000; XIAO et al., 2004; SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008; RYAN, 2009; FAYER; SANTÍN, 2009). De acordo com Xiao et al. (2002), alguns genótipos podem apresentar características morfológicas muito semelhantes às de espécies já descritas, porém, diferem em sua composição genética e, pelo fato de não haver informações sobre suas características biológicas, ainda não foram classificados como espécies. Assim, há mais de 33 genótipos descritos em mamíferos (SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008; XIAO; FENG, 2008).

Quadro 1 - Espécies de *Cryptosporidium* atualmente descritas (Adaptado de SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008).

Espécie	Principais Hospedeiros	Autor
<i>C. andersoni</i>	Bovinos (A)	Lindsay et al. (2000)
<i>C. baileyi</i>	Aves (B, C, TR)	Current et al. (1986)
<i>C. bovis</i>	Bovinos (D)	Fayer et al. (2005)
<i>C. canis</i>	Caninos (ID)	Fayer et al. (2001)
<i>C. cuniculus</i>	Coelho (D)	Robinson et al. (2010)
<i>C. fayeri</i>	Canguru vermelho (<i>Macropus rufus</i>) (D)	Ryan et al. (2008)
<i>C. felis</i>	Felinos (ID)	Iseki (1979)
<i>C. fragile</i>	Anfíbios (<i>Duttaphrynus melanostictus</i>) (E)	Jirků et al. (2008)
<i>C. galli</i>	Aves (P)	Pavlassek (1999), Ryan (2003)
<i>C. hominis</i>	Humanos (ID)	Morgan-Ryan et al. (2002)
<i>C. macropodum</i>	Canguru gigante (<i>Macropus giganteus</i>) (D)	Power e Ryan (2008)
<i>C. meleagridis</i>	Aves, homem (ID)	Slavin (1955)
<i>C. molnari</i>	Peixes (E)	Alvarez-Pellitero e Sitja-Bobadilla (2002)
<i>C. muris</i>	Roedores (E)	Tyzzer (1910)
<i>C. parvum</i>	Ruminantes, homem (ID)	Tyzzer (1912)
<i>C. ryanae</i>	Bovinos (D)	Fayer et al. (2008)
<i>C. serpentis</i>	Lagartos, serpentes (E)	Levine (1980) (Brownstein et al., 1977)
<i>C. scophthalmi</i>	Peixes (ID)	Alvarez-Pellitero et al. (2004)
<i>C. suis</i>	Suíños (ID, IG)	Ryan et al. (2004)
<i>C. ubiquitum</i>	Ruminantes, homem (ID)	Fayer et al. (2010)
<i>C. varanii</i>	Lagartos (E)	Pavlassek et al. (1995)
<i>C. wrairi</i>	Cobaio (<i>Cavia porcellus</i>) (ID)	Vetterling et al. (1991)
<i>C. xiaoi</i>	Ovinos (D)	Fayer e Santin (2009)

* Principais sítios de infecção do parasita no hospedeiro: A-abomaso; B-bursa de Fabricius; C-cloaca; E-estômago; ID-intestino delgado; IG-intestino grosso; P-proventrículo; TR-trato respiratório; D-Desconhecido

1.2 Ciclo Biológico

O ciclo de vida de *Cryptosporidium* é monoxeno e possui seis estágios de desenvolvimento no hospedeiro, sendo muito semelhante ao de outros coccídios pertencentes à subordem Eimeriorina. O processo de infecção é composto por: excistância dos oocistos, merogonia, gametogonia, fertilização, formação da parede dos oocistos e esporogonia (SMITH e ROSE, 1998; XIAO e CAMA, 2006) (Figura 1).

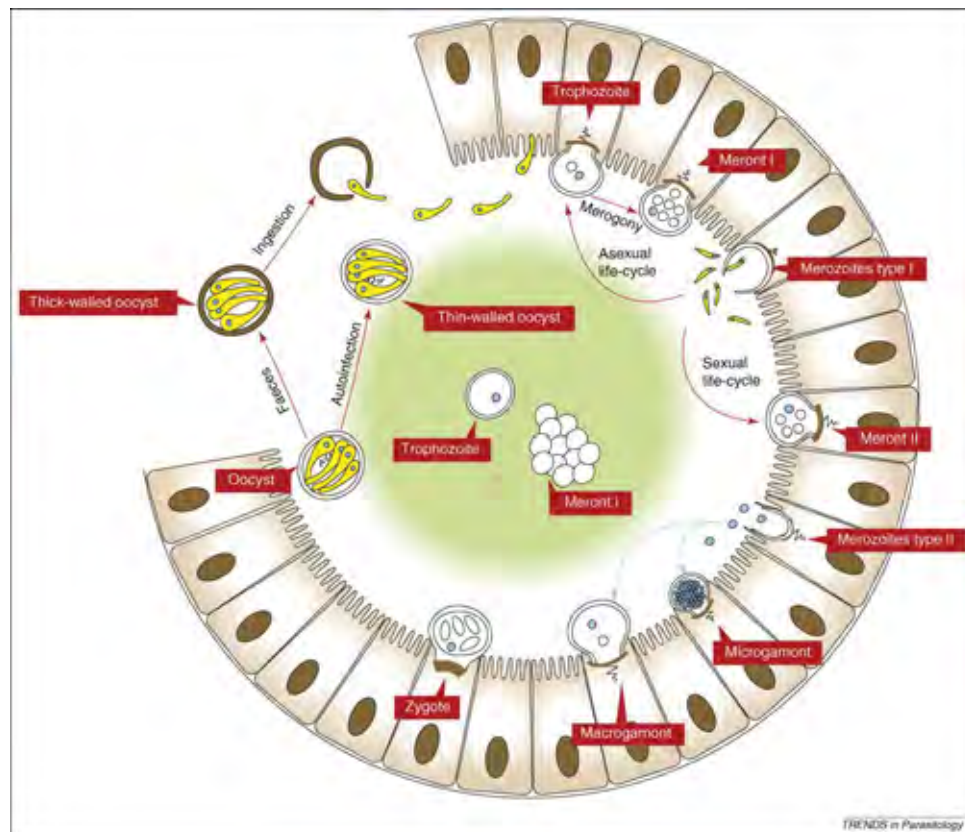


FIGURA 1- Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. (Fonte: Barta e Thompson, 2006)

O ciclo se inicia com eliminação de oocistos já esporulados nas fezes de animais infectados (DUBEY et al., 1990). Após ingestão dos oocistos ocorre a

excistação, fase em que os quatro esporozoítos são liberados e se aderem à superfície das células epiteliais do trato gastrointestinal, onde são envolvidos pelas microvilosidades para formação de um vacúolo parasitóforo (localização intracelular, porém extracitoplasmática). Os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos, iniciando a multiplicação assexuada ou merogonia (SRÉTER; VARGA, 2000; XIAO et al., 2004; SMITH et al., 2007).

Os trofozoítos podem dar origem a dois tipos de merontes: o meronte tipo I, que possui seis a oito merozoítos, e o meronte tipo II, com quatro merozoítos. Os merozoítos do tipo I podem dar origem a novos merozoítos do tipo I ou do tipo II, enquanto que os merozoítos do tipo II iniciam a fase sexual do ciclo ou gametogonia, quando ocorre a diferenciação em estágios masculinos (microgametas) e femininos (macrogametas) (SMITH et al., 2007). Após fertilização, o macrogameta desenvolve-se em oocisto, podendo formar oocistos de parede delgada, responsáveis por auto-infecção (capazes de iniciar um novo ciclo dentro do mesmo hospedeiro), ou então os oocistos de parede espessa, os quais são eliminados nas fezes e são resistentes às condições ambientais. A esporulação dos oocistos ocorre *in situ*, ou seja, logo após sua formação, sendo então eliminados em sua forma infectante, potencializando a possibilidade de infecção de novos hospedeiros (DUBEY et al., 1990).

O potencial de infecção por *Cryptosporidium* está relacionado às características como a grande quantidade de excreção de oocistos pelos hospedeiros infectados no ambiente, baixa especificidade por hospedeiros mamíferos (particularmente apresentada por *C. parvum*), tamanho reduzido e baixa velocidade de sedimentação dos oocistos na água; baixa dose infectante (menos de 10 oocistos) e por serem eliminados em sua forma infectante (DILLINGHAMA et al., 2002; XIAO et al., 2004).

Quando eliminados nas fezes dos hospedeiros infectados, os oocistos podem contaminar águas superficiais ou de reservatórios (MACHADO et al., 2006; MULLER, 1999; SMITH, 1993), que são importantes veiculadores do protozoário, pela possibilidade de atingir um grande contingente de hospedeiros (LABERGE et al., 1996).

Os oocistos eliminados no ambiente são sensíveis à dessecação, ao congelamento e também às temperaturas de 55°C/30 segundos ou 70°C/5 segundos (FUJINO et al., 2002), mas são extremamente resistentes à ação do cloro utilizado no tratamento de água (XIAO et al., 2004), podendo permanecer viáveis no ambiente por até três meses, em temperatura de 25-30°C, seis meses em temperatura de 20° C ou sete meses quando armazenados em água a 15°C (ANDERSON, 1985; FAYER et al., 1998).

1.3 Importância em Saúde Pública

Surtos de criptosporidiose em humanos já foram descritos em mais de 90 países, em seis continentes, principalmente pelo protozoário apresentar alta infectividade aliada à grande resistência em condições ambientais (XIAO et al., 2004).

A importância do parasito em saúde pública foi reconhecida a partir do surto de criptosporidiose ocorrido na cidade de Milwaukee (EUA), em 1993, onde 403.000 pessoas apresentaram diarreia atribuída à contaminação de água de consumo com oocistos (MACKENZIE et al., 1994).

A origem dos surtos de criptosporidiose em humanos pode ser tanto por veiculação hídrica quanto por ingestão de alimentos contaminados. Oocistos de *Cryptosporidium* foram identificados em mariscos (JOHNSON et al., 1995), mexilhões, ostras (GRACZYK et al., 1996), leite (GELLETLIE et al., 1997), legumes e vegetais (MONGE; CHINCHILA, 1996; ORTEGA-MORA et al., 1992) e alimentos industrializados, como bebidas (MILLARD et al., 1994).

As espécies que mais comumente infectam humanos são *C. parvum* e *C. hominis* (SMITH et al., 2006), com dois tipos de transmissão: a antroponótica e a zoonótica. A transmissão antroponótica envolve geralmente *C. hominis*, ocorrendo mais frequentemente em áreas urbanas devido à grande densidade populacional, com transmissão pelo contato pessoa-a-pessoa

(LAKE et al., 2007). A transmissão zoonótica, mais freqüente com *C. parvum*, está associada principalmente aos ruminantes, e ocorre mais frequentemente em áreas rurais (MORGAN et al., 1999a), fato que pode estar relacionado ao maior contato do homem com animais infectados (LEARMONTH et al., 2004).

Em amostras fecais humanas também já foi relatada a presença de oocistos de *C. canis* (CAMA et al., 2003; PEDRAZA-DIAS et al., 2001; PIENIAZEK et al., 1999), de *C. felis* (CAMA et al., 2003; GUYOT et al., 2001; PEDRAZA-DIAS et al., 2001), de *C. meleagridis* (CAMA et al., 2003; GATEI et al., 2003; GUYOT et al., 2001; JONGWUTIWES, 2002; MCLAUCHLIN et al., 2000; MORGAN et al., 2000; PEDRAZA-DIAS et al., 2000; TIANGTIP), de *C. muris* (GATEI et al., 2002; GATEI et al., 2003; GUYOT et al., 2001; TIANGTIP; JONGWUTIWES, 2002) e os genótipos suíno (CAMA et al., 2003) e cervídeo (ONG et al., 2002),

A evolução e a patogenia da criptosporidiose em humanos são influenciadas pelo estado imune do hospedeiro, variando de diarreia autolimitante, em indivíduos imunocompetentes, a diarreia crônica em pacientes imunocomprometidos, podendo resultar em óbito (ABRAHAMSEN et al., 2004). A facilidade de transmissão do parasito para o ser humano, em conjunto com a inexistência de tratamentos efetivos para a criptosporidiose, tornam essa parasitose uma importante causa de morbidade e mortalidade, principalmente em indivíduos imunossuprimidos e crianças em países em desenvolvimento (LEAV et al., 2003; ASHBOLT, 2004).

No Brasil, algumas espécies com potencial zoonótico, como *C. canis*, *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. parvum* e *C. ubiquitum*, foram identificadas em animais; e em humanos, já foi relatada infecção por *C. parvum*, *C. hominis* e por outras espécies adaptadas a hospedeiros animais, como *C. canis*, *C. felis* e *C. meleagridis* (MEIRELES, 2010). A infecção é mais freqüente em crianças e pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (SAUDA et al., 1993; OSHIRO et al., 2000; PEREIRA et al., 2002; BRANTLEY et al., 2003).

1.4 Infecção em bovinos

O primeiro relato de criptosporidiose em bovinos ocorreu em 1971, em uma bezerra de oito meses de vida que apresentava diarreia crônica (PANCIERA et al., 1971). *Cryptosporidium parvum* está envolvido em episódios de diarreia em bezerros neonatos, com quadros de enterite e mortalidade nas primeiras semanas de vida (SANFORD; JOSEPHSON, 1982; HEINE et al., 1984; FEITOSA et al., 2008), quando ainda não apresentam imunidade totalmente desenvolvida (O'HANDLEY et al., 1999; XIAO; HERD, 1994).

Bezerros de aptidão leiteira e de corte, mantidos em confinamento, são mais acometidos por *C. parvum*, sendo rara a ocorrência dessa espécie em bezerros criados extensivamente (MARTINS-VIEIRA et al., 2009).

A mortalidade observada na criptosporidiose bovina pode ser baixa quando a diarreia é unicamente causada por esse protozoário. Quando existe associação com outros agentes infecciosos, ou então com um quadro de má nutrição apresentado pelo hospedeiro, as taxas de mortalidade podem ser mais elevadas (CHERMETTE; BOUFASSA-OUZROUT, 1988). A morbidade é considerada significativa em bovinos neonatos, com presença de enterite severa e perdas econômicas relacionadas ao seu desenvolvimento (XIAO et al., 1998).

Distúrbios gastrintestinais decorrentes da criptosporidiose são mais frequentes em criações de bovinos, e a diarreia é o sinal clínico mais comum nesse tipo de criação (NAVARRE et al., 2000). Os bezerros parecem ser mais suscetíveis à infecção clínica por *Cryptosporidium*, pois grande parte das infecções diagnosticadas em indivíduos adultos é de natureza assintomática ou associada a sintomas clínicos de pouca gravidade (O'DONOGHUE, 1995). Em bezerros recém nascidos, a criptosporidiose é caracterizada por diarreia severa com duração média de duas semanas, o que pode ocasionar desidratação e até morte do animal (FAYER et al., 1990). Os sintomas geralmente têm início

no terceiro ou quarto dia após a ingestão dos oocistos, com pico de eliminação de oocistos entre o quinto e oitavo dia (CURRENT, 1990).

Um bezerro infectado pode eliminar mais de 10^{10} oocistos por dia, em períodos que variam de quatro a 14 dias de eliminação, confirmando seu importante papel na contaminação ambiental (ANGUS, 1987). Em estudo realizado por Martins-Vieira et al. (2009), durante o pico de eliminação de oocistos, no quinto dia pós inoculação, o bezerro apresentou eliminação de $9,0 \times 10^5$ oocistos/mL de fezes.

Um estudo epidemiológico realizado nos Estados Unidos, em 1103 fazendas, revelou a presença de oocistos de *Cryptosporidium* sp. em 22,4% (1642/7369) das amostras analisadas, e em 59,1% (652/1103) das propriedades estudadas, demonstrando a grande disseminação desse parasito naquela região (GARBER et al., 1994). No Brasil, Feitosa et al. (2004) descreveram prevalência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 12,4% (57/459) das amostras fecais, em bezerros com até duas semanas de vida, provenientes de 33 propriedades leiteiras da região noroeste do estado de São Paulo, na cidade de Araçatuba.

Há quatro espécies do gênero *Cryptosporidium* que acometem os bovinos. Animais adultos e os bezerros já desmamados são acometidos principalmente por *C. andersoni*, *C. bovis* e *C. ryanae*, enquanto que bezerros em lactação são infectados em sua grande maioria por *C. parvum*, sendo considerados como os maiores reservatórios dessa espécie, que apresenta alto potencial zoonótico (XIAO e FENG, 2008).

Cryptosporidium parvum é considerada como a espécie zoonótica predominante entre os animais, sendo responsável por cerca de 85% das infecções por *Cryptosporidium* em bezerros antes da desmama, e apenas 1% em bezerros após a desmama (SANTIN et al., 2004; FAYER et al., 2006).

Cryptosporidium andersoni coloniza as glândulas gástricas do abomaso, (SANTIN et al., 2004), principalmente de bezerros com idade superior a quatro semanas de vida, e também de animais imunodeprimidos no período pós-desmame e bovinos leiteiros adultos. Geralmente, a infecção por *C. andersoni*

não produz diarreia ou sinais clínicos visíveis. Há desenvolvimento de infecção crônica (podendo persistir por mais de um ano) e a produção de oocistos é inferior àquela encontrada em infecções por *C. parvum* (KVÁC et al., 2008).

Cryptosporidium bovis é mais frequente em animais de três meses a dois anos de idade (FAYER et al., 2006). Porém, a prevalência dessa espécie diminui logo que o animal completa dois anos de idade, e ocorre aumento da prevalência de *C. andersoni* (FAYER et al., 2007).

Cryptosporidium ryanae é morfologicamente muito semelhante a *C. parvum* e *C. bovis*, diferenciando-se somente no tamanho dos oocistos (FAYER, 2008), e já foi identificado em bezerros nos EUA, na China (FENG et al., 2007), no Kenia (SZONYI et al., 2008) e na Malásia (HALIM et al., 2008).

Outras espécies e genótipos encontrados com menor frequência em bovinos são *C. hominis* (FENG et al., 2007; PARK et al., 2006; SMITH et al., 2005), *C. suis* (FAYER et al., 2006; GEURDEN et al., 2006), *Cryptosporidium* genótipo II de suínos (LANGKJAER et al., 2007) e *C. felis* (BORNAY-LLINARES et al., 1999).

1.4.1 Participação dos bovinos na epidemiologia da criptosporidiose humana

O manejo inadequado do rebanho influencia no aumento da incidência da criptosporidiose em bezerros. Este fator pode potencializar o risco da infecção em humanos que estejam em contato direto com o rebanho infectado (HUNTER et al., 2004).

Alguns estudos relatam que pessoas que lidam frequentemente com bovinos infectados, como trabalhadores de granjas leiteiras, apresentam maior taxa de infecção por *C. parvum* do que aqueles que não têm contato com esses animais (LENGERICH et al., 1993; SIWILA et al., 2007).

Em todo o mundo já foi relatada a ocorrência de criptosporidiose em humanos devido à ingestão de água contaminada com oocistos. Em estudo realizado na América do Norte, *C. hominis* foi responsável por surtos de criptosporidiose em humanos, não sendo encontrado *C. parvum* nas amostras analisadas (FAYER et al., 2000). Esse sugere que os bovinos podem ser, em algumas ocasiões, injustamente envolvidos em surtos de criptosporidiose em seres humanos.

Cryptosporidium hominis (específica para seres humanos) e *C. parvum* (infecta diversas espécies animais, incluindo bovinos) são as principais espécies responsáveis pela infecção em humanos. Quanto à morfologia, não existe diferença entre essas espécies, que só podem ser identificadas por técnicas moleculares. O uso da biologia molecular veio desmistificar, em muitas ocasiões, que os bovinos seriam os responsáveis pela infecção em humanos. Um exemplo seria o surto de criptosporidiose em humanos ocorrido em Milwaukee, onde bovinos foram considerados como fonte potencial de infecção (MACKENZIE et al., 1994), e, no entanto, análises das amostras provindas do surto com o uso de técnicas de biologia molecular, revelaram que *C. hominis* foi o agente infeccioso responsável pela infecção, descartando assim a participação dos bovinos (ZHOU et al., 2003).

Os seres humanos, quando infectados, podem ser uma potencial fonte de infecção para outras pessoas. Portanto, a criptosporidiose pode ter uma gama de fontes potenciais de infecção desde bovinos até outros animais domésticos ou selvagens infectados com o parasito (O'HANDLEY, 2007).

Bezerros confinados em criações leiteiras podem ser fonte de disseminação de oocistos de *C. parvum* no ambiente (O'HANDLEY, 2007), embora Sischo et al. (2000) tenham comprovado que explorações leiteiras não apresentaram um papel importante na contaminação de águas para o consumo. No entanto, bezerros leiteiros ou de corte, quando criados em altas taxas de lotação, podem aumentar o risco de surtos de criptosporidiose no rebanho e a contaminação ambiental (O'HANDLEY, 2007).

1.5 Diagnóstico

Para identificação de *Cryptosporidium* é necessária uma abordagem polifásica, utilizando-se técnicas moleculares, análise morfológica dos oocistos e características biológicas, como a especificidade por hospedeiro, patogenicidade, períodos pré-patente e patente e intensidade de excreção de oocistos (EGYED et al., 2002).

A experiência é um fator fundamental para o diagnóstico de criptosporidiose já que, dentre o filo Apicomplexa, os oocistos e outros estágios de desenvolvimento do gênero *Cryptosporidium* estão entre os menores dentre os coccídios, e também pelo fato de que os oocistos são muito similares às leveduras, em tamanho e forma, o que pode resultar em diagnóstico falso-positivo (FAYER et al., 2001; SRÉTER; VARGA, 2000; XIAO et al., 2004).

1.5.1 Detecção de oocistos

Um dos métodos mais comumente usados na detecção de oocistos a partir de amostras fecais é o método de centrífugo-flutuação em solução de Sheather (CURRENT, 1990). As amostras devem ser examinadas rapidamente, pois quando expostos por muito tempo em soluções de alta densidade os oocistos podem sofrer distorções ou rompimento da parede, levando a resultados errôneos. Para visualização dos oocistos, utiliza-se microscopia óptica de campo claro ou de contraste de fase (XIAO; FENG, 2008). Os oocistos são visualizados como corpos brilhantes contendo grânulos negros, quando visualizados em contraste de fase; em microscópio de campo claro, os oocistos aparecem translúcidos, muitas vezes como estruturas levemente róseas, contendo grânulos em seu interior (SRÉTER; VARGA, 2000).

Outras técnicas utilizadas para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* são a coloração negativa com verde malaquita, em que os oocistos são visualizados como corpos brilhantes envoltos por um fundo verde (ELLIOT et al., 1999), e a técnica de Kinyoun (álcool ácido resistente), em que os oocistos apresentam coloração rósea a vermelha, contra um fundo verde.

Não é possível a definição da espécie somente pela análise morfológica ou morfométrica. Os oocistos são muito pequenos (4-8 μm), com uma pequena variação morfológica ou mesmo idênticos entre as diferentes espécies, sem esporocistos e de difícil visualização (FALL et al., 2003; FAYER et al., 2000). Além disso, os antígenos presentes na parede de oocistos são conservados para todo o gênero, não sendo possível a diferenciação entre espécies, por testes imunológicos (FAYER et al., 2000).

1.5.2 Detecção de Estágios Evolutivos

Técnicas de coloração podem ser empregadas na visualização de *Cryptosporidium* em tecidos. A técnica mais utilizada para coloração de cortes histológicos é a hematoxilina-eosina (HE), onde os estágios evolutivos são visualizados como corpos esféricos basófilos, de 2,0 - 7,5 μm , localizados na superfície das células epiteliais (dependendo do estágio do ciclo biológico). Outras técnicas que podem ser utilizadas são colorações à base de prata e ácido periódico de Schiff. A microscopia eletrônica de transmissão pode ser utilizada para visualização de morfologia ultra-estrutural do parasito (SRÉTER; VARGA, 2000).

1.5.3 Métodos Imunológicos

Os testes imunológicos têm substituído a análise microscópica em fezes, para pesquisa de oocistos ou de antígenos solúveis (KHEL et al., 1995). Essas técnicas apresentam melhor sensibilidade e especificidade quando comparadas às técnicas tradicionais de coloração, reduzindo tempo e trabalho despendidos na detecção dos oocistos (ARROWOOD; STERLING, 1989; JOHNSTON et al., 2003).

Entre os métodos imunológicos destacam-se o ensaio imunoenzimático (FAYER et al., 2000; JEX et al., 2008; SILVA et al., 2003) e a reação de imunofluorescência direta (BIALEK et al., 2002; FAYER et al., 2000; JEX et al., 2008).

1.5.4 Métodos Moleculares

Levando em consideração a impossibilidade de diferenciação entre espécies pelos métodos imunológicos, as técnicas baseadas em biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), e a técnica de polimorfismo no comprimento de fragmentos de ácido desoxirribonucleico gerados por enzimas de restrição (RFLP) e/ou sequenciamento automático de ácidos nucleicos são os únicos métodos de diferenciação confiáveis entre as espécies de *Cryptosporidium* (JEX et al., 2008; MORGAN et al., 1999a; SARGENT et al., 1998; SRÉTER; VARGA, 2000).

A PCR se caracteriza por alta sensibilidade e especificidade (BALATBAT et al., 1996; JEX et al., 2008; MORGAN; THOMPSON, 1998), porém, seu custo elevado quando comparado ao custo de outros métodos de detecção de *Cryptosporidium*, em amostras fecais, faz com que a detecção e caracterização molecular não sejam utilizadas rotineiramente em laboratórios de diagnóstico.

A caracterização molecular de *Cryptosporidium* geralmente é realizada por meio da PCR e suas variantes, seguida da RFLP ou de sequenciamento dos fragmentos amplificados. O *locus* mais utilizado é o gene da subunidade

18S do RNA ribossômico (18S rRNA). Esse *locus* apresenta cinco cópias por genoma e, pelo fato de apresentar evolução mais lenta e menor polimorfismo, é também o *locus* de escolha para amostras de animais que possam estar infectados por espécies ou genótipos ainda não classificados (MORGAN et al., 2000a; SPANO et al., 1998; XIAO et al., 1999a; 1999b; 2000b; 2004).

Existem outros *loci* que podem ser utilizados, como os genes da actina (SULAIMAN et al., 2002), da proteína do choque térmico - HSP-70 (MORGAN et al., 1999b), da proteína da parede de oocistos - COWP (XIAO et al., 2000a) e da glicoproteína GP-60 (PENG et al., 2001; 2003). Esses *loci* apresentam alto polimorfismo interespecíes e, portanto, são muito importantes na análise genética de espécies ou genótipos similares (XIAO et al., 2004).

Entre os métodos moleculares, destaca-se ainda a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), que possui alta sensibilidade, permitindo o diagnóstico de criptosporidiose clínica, bem como, a detecção de indivíduos portadores, sendo uma valiosa ferramenta para estudos epidemiológicos em hospedeiros humanos e animais (TANRIVERD et al., 2002; FONTAINE; GUILLOT, 2003; MINAROVICOVÁ et al., 2009; HADFIELD et al. 2011; DE WAELE et al., 2011).

A q-PCR agiliza o diagnóstico por meio de amplificação e detecção simultânea dos fragmentos de DNA, com redução do tempo de análise e dos riscos de contaminação, pois não requer a visualização dos produtos de PCR por meio de eletroforese, que é necessária em outras variantes da PCR. A q-PCR também oferece a vantagem de alta especificidade, quando é utilizada uma sonda fluorescente, que se ligará de forma específica à sequência alvo, juntamente com oligonucleotídeos iniciadores (DE WAELE et al., 2011; JOTHIKUMAR et al., 2008).

2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento da qPCR, por meio de ensaio com sonda *TaqMan*® específico para o gene actina, para detecção de DNA de *C. parvum* em amostras fecais de bezerros, e sua comparação com a *nested* PCR para amplificação de fragmentos de DNA do gene da subunidade 18S do rRNA de *Cryptosporidium* spp..

REFERÊNCIAS

ABRAHAMSEN, M.S.; TEMPLETON, T.J.; ENOMOTO, S.; ABRAHANTE, J.E.; ZHU, G. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. **Science**, v.304, p.441- 445, 2004.

ALVAREZ-PELLITERO, P.; SITJÀ-BOBADILLA, A. *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 1007-1021, 2002.

ALVAREZ-PELLITERO, P.; QUIROGA, M. I.; SITJÀ-BOBADILLA, A.; REDONDO, M. J.; PALENZUELA, O.; PADRÓS, F.; VÁSQUEZ, S.; NIETO, J. M. *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 62, p. 133-145, 2004.

ANDERSON, B.C. Moist heat inactivation of *Cryptosporidium* sp. **American Journal of Public Health**, v.75, p.133-1434, 1985.

ANGUS, K.W. Cryptosporidiosis in domestic animals and humans. **In Practice**, v.9, p.47-49, 1987.

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, p.1490-1495, 1989.

ASHBOLT, N.J. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. **Toxicology**, v. 198, 229-238, 2004.

BALATBAT, A.B.; JORDAN, G.W.; TANG, Y.J.; SILVA JÚNIOR, J. Detection of *Cryptosporidium parvum* DNA in human feces by nested PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, p.1769-1772, 1996.

BARTA, J. R.; THOMPSON, A.R.C. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. **Trends in Parasitology**. v. 22, p. 463-468, 2006.

BIALEK, R.; BINDER, N.; DIETZ, K. Comparison of fluorescence, antigen and PCR assays to detect *Cryptosporidium parvum* in fecal specimens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v.43, p.283-288, 2002.

BORNAY-LLINARES, F.J.; DA SILVA, A.J.; MOURA, I.N.S.; MYJAK, P.; PIETKIEWICZ, H.; KRUMINIS-LOZOWSKA, W.; GRACZYK, T.K.; PIENIAZEK, N.J. Identification of *Cryptosporidium felis* in a cow by morphologic and molecular methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.1455–1458, 1999.

BRANTLEY, R.K.; WILLIAMS K.R.; SILVA T.M.; SISTROM M.; THIELMAN, N.M.; WARD, H.; LIMA, A.A.; GUERRANT, R.L. AIDS-Associated diarrhea and wasting in Northeast Brazil is associated with subtherapeutic plasma levels of antiretroviral medications and with both bovine and human subtypes of *Cryptosporidium parvum*. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.7, p.16-22, 2003.

BROWNSTEIN, D. G.; STRANDBERG, J.D.; MONTALI, R.J.; BUSH, M.; FORTNER, J. *Cryptosporidium* in snakes with hypertrophic gastritis. **Veterinary Pathology**, v. 14, p. 606-617, 1977.

CAMA, V.A.; BERN, C.; SULAIMAN, I.M.; GILMAN, R.H.; RICONA, E.; VIVAR, A.; KAWAI, V.; VARGAS, D.; ZHOU, L.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species and genotypes in HIV-positive patients in Lima, Peru. **Journal of Eukariotic Microbiology**, v.50, p.531-533, 2003.

CARVALHO-ALMEIDA, T.T.; PINTO, P.L.S.; QUADROS, C.M.S.; TORRES, D.M.A.G.V.; KANAMURA, H.Y.; CASIMIRO, A.M. Detection of *Cryptosporidium* sp. in non diarrheal faeces from children, in a day care center in the city of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.48, p.27-32, 2006.

CHERMETTE, R.; BOUFASSA-OUZROUT, S. *Cryptosporidiosis: a cosmopolitan disease in animals and in man*. 2.ed. Paris: **OIE**, 1998. p.122.

CURRENT, W.L. Techniques and laboratory maintenance of *Cryptosporidium*. In: DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; FAYER, R. (Eds). **Cryptosporidiosis of man and animals**. Boca Raton: CRS, 1990. p.31-49.

CURRENT, W. L.; UPTON, S. J.; HAYNES, T. B. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. s. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. **Journal of Protozoology**, v. 33, p.289-296, 1986.

DE WAELE, V.; BERZANO, M.; BERKVEN, D.; SPEYBROECK, N.; LOWERY, C.; MULCAHY, G.M.; MURPHY, T.M. Age-stratified Bayesian analysis to estimate sensitivity and specificity of four diagnostic tests for detection of *Cryptosporidium* oocysts in neonatal calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, p.76-89, 2011.

DILLINGHAM, R.A.; LIMAB, A.A.; GUERRANT, R.L. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. **Microbes and Infection**, v.4, p.1059-1066, 2002.

DUBEY, J.P.; SPEER, C.A.; FAYER, R. **Cryptosporidiosis of man and animals**. Boca Raton: CRC Press, 1990.

EGYED, Z.; SRÉTER, T.; SZELL, Z.; BESZTERI, B.; DOBOS-KOVACS, M.; MARIALIGETI, K.; CORNELISSEN, W.C.A.; VARGA, I. Polyphasic typing of *Cryptosporidium baileyi*: a suggested model for characterization of cryptosporidia. **Journal of Parasitology**, v.88, p.237-243, 2002.

ELLIOT, A.; MORGAN, U.M.; THOMPSON, R.C.A. Improved staining method for detecting *Cryptosporidium* oocysts in stools using malachite green. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.45, p.139-142, 1999.

FALL, A.; THOMPSON, R.C.A.; HOBBS, R.P.; MORGAN-RYAN, U. Morphology is not a reliable tool for delineating species within *Cryptosporidium*. **Journal of Parasitology**, v.59, p.399-402, 2003.

FAYER, R.; SANTIN, M. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 192-200, 2009.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S.J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.1305-1322, 2000.

FAYER, R.; SANTIN, M.; TROUT, J.M. Prevalence of *Cryptosporidium* species and genotypes in mature dairy cattle on farms in eastern United States compared with younger cattle from the same locations. **Veterinary Parasitology**, v.145, p.260–266, 2007.

FAYER, R.; SANTIN, M.; XIAO, L. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). **Journal of Parasitology**, v. 91, p. 624-629, 2005.

FAYER, R.; SPEER, C.A.; DUBEY, J.P. General biology of *Cryptosporidium*. In: DUBEY, J.P.; SPEER, C.A.; FAYER, R. (Ed.) **Cryptosporidiosis of man and animals**. Boca Raton: CRS Press, 1990. p. 1-29.

FAYER, R.; TROUT, J.M.; JENKINS, M.C. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. **Journal of Parasitology**, v.84, p.1165-1169, 1998.

FAYER, R.; SANTIN, M.; TROUT, J.M.; GREINER, E. Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1–2-year-old dairy cattle in the eastern United States. **Veterinary Parasitology**, v.135, p.105–112, 2006.

FAYER, R.; TROUT, J.M.; XIAO, L.; MORGAN, U.M.; LAL, A.A.; DUBEY, J.P. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. **Journal of Parasitology**, v.87, p.1415–1422, 2001.

FAYER, R.; SANTÍN, M.; TROUT, J.M. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). **Veterinary Parasitology**, v.156, p.191-198, 2008.

FEITOSA, F.L.F.; SHIMAMURA, G.M.; ROBERTO, T.; MEIRELES, M.V.; NUNES, C.M.; CIARLINI, P.C.; BORGES, A.S. Prevalência da criptosporidiose em bezerros na região de Araçatuba, Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v.34, p.189-193, 2004.

FEITOSA, F.L.F.; SHIMAMURA, G.M.; MENDES, L.C.N.; PEIRÓ, J.R.; FÉRES, F.C.; BOVINO, F.; PERRI, S.H.V.; MEIRELES, M.V. Importância de *Cryptosporidium* spp. como causa de diarreia em bezerros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, p.452-456, 2008.

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. **Veterinary Parasitology**, v.144, p.1–9, 2007.

FONTAINE, M.; GUILLOT, E. An immunomagnetic separation–real-time PCR method for quantification of *Cryptosporidium parvum* in water samples. **Journal of Microbiological Methods**, v.54, p.29– 36, 2003.

FUJINO, T.; MATSUI, T.; KOBAYASHI, F.; HARUKI, K.; YOSHINO, Y.; KAJIMA, J.; TSUJI, M. The effect of heating against *Cryptosporidium* oocysts. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.64, p.199-200, 2002.

GARBER, L.P.; SALMAN, M.D.; HURD, H.S.; KEEFE, T.; SCHLATER, J.L. Potential risk factor for *Cryptosporidium* infections in dairy calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.205, p.86-91, 1994.

GATEI, W.; ASHFORD, R.W.; BEECHING, N.J.; KAMWATI, S.K.; GREENSILL, J.; HART, C.A. *Cryptosporidium muris* infection in an HIV-infected adult, Kenya. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, p.204-206, 2002.

GATEI, W.; GREENSILL, J.; ASHFORD, R.W.; CUEVAS, L.E.; PARRY, C.M.; CUNLIFFE, N.A.; BEECHING, N.J.; HART, C.A. Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.1458-1462, 2003.

GELLETLIE, R.; STUART, J.; SOLTANPOOR, N.; ARMSTRONG, R.; NICHOLS, G. Cryptosporidiosis associated with school milk. **Lancet**, v.350, p.1005-1006, 1997.

GEURDEN, T.; BERKVEN, D.; GELDHOF, P.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOU, E. A. Bayesian approach for the evaluation of six diagnostic assays and the estimation of *Cryptosporidium* prevalence in dairy calves. **Veterinary Research**, v.37, p.671–682, 2006.

GRACZYK, T.K.; CRANFIELD, M.R.; FAYER, R. Evaluation of commercial enzyme immunoassay (EIA) and immunofluorescent antibody (IFA) test kits for detection of *Cryptosporidium* oocysts of species other than *Cryptosporidium parvum*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.54, p.274-279, 1996.

GUYOT, K.; FOLLET-DUMOULIN, A.; LELIEVRE, E.; SARFATI, C.; RABODONIRINA, M.; NEVEZ, G.; CAILLIEZ, J.C.; CAMUS, D.; DEI-CAS, E. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.3472-3480, 2001.

HADFIELD, S.J.; ROBINSON, G.; ELWIN, K.; CHALMERS, R.M. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp. in 1 human clinical samples using real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 918-924, 2011.

HALIM, N.A.; PLUTZER, J.; BAKHEIT, M.A.; KARANIS, P. First report of *Cryptosporidium* deer-like genotype in Malaysian cattle. **Veterinary Parasitology**, v.152, p.325–329, 2008.

HEINE, J.; POHLENZ, J.F.L.; MOON, H.W. Enteric Lesions and Diarrhea in Gnotobiotic Calves Monoinfected with *Cryptosporidium* Species. **Journal of Infectious Diseases**, v.150, p.768-775, 1984.

HUNTER, P.R.; HUGHES, S.; WOODHOUSE, S.; SYED, Q.; VERLANDER, N.Q.; CHALMERS, R.M.; MORGAN, K.; NICHOLS, G.; BEECHING, N.; OSBORN, K. Sporadic cryptosporidiosis case-control study with genotyping. **Emerging Infectious Diseases**, v.10, p.1241–1249, 2004.

ISEKI, M. *Cryptosporidium felis* sp from the domestic cat. **Japanese Journal of Parasitology**, v. 28, p. 13-35, 1979.

JEX, A.R.; SMITH, H.V.; MONIS, P.T.; CAMPBELL, B.E.; GASSER, R.B. *Cryptosporidium*: biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. **Biotechnology Advances**, v.26, p.304-317, 2008.

JOHNSON, D.C.; REYNOLDS, K.A.; BERBA, C.P.; PEPPER, I.L.; ROSE, J.B. Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in marine waters. **Water Science Technology**, v.31, p.439-442, 1995.

JOHNSTON, S.P.; BALLARD, M.M.; BEACH, M.J.; CAUSER, L.; WILKINS, P.P. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.623-626, 2003.

KHEL, K.S.C.; CICIRELLO, H.; HAVENS, P.L. Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.416-418, 1995.

JIRKŮ, M.; VALIGUROVÁ, A.; KOUDELA, B.; KŘÍŽEK, J.; MODRÝ, D.; ŠLAPETA, J. New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. **Folia Parasitologica**, v. 55, p. 81-94, 2008.

KOUDELA, B.; MODRÝ, D. New species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) from lizards. **Folia Parasitologica**, v. 45, p. 93-100, 1998.

KVÁC, M.; SAK, B.; KVETONOVÁ, D.; DITRICH, O.; HOFMANNOVÁ, L.; MODRY, D.; VITOVEC, J.; XIAO, L. Infectivity, pathogenicity, and genetic characteristics of mammalian gastric *Cryptosporidium* spp. in domestic ruminants. **Veterinary Parasitology**, v.153, p.363–367, 2008.

LABERGE, I.; GRIFFITHS, M.W.; GRIFFITHS, M.W. Prevalence, detection and control of *Cryptosporidium parvum* in food. **International Journal of Food Microbiology**, v.31, p.1-26, 1996.

LAKE, I.R.; NICHOLS, G.; BENTHAM, G.; HARRISON, F.C.D.; HUNTER, P.R.; KOVATS, R.S. Cryptosporidiosis decline after regulation, England and Wales, 1989–2005. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, p.623-625, 2007.

LANGKJAER, R.B.; VIGRE, H.; ENEMARK, H.L.; MADDOX-HYTTEL, C. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. **Parasitology**, v.134, p.339–350, 2007.

LEARMONTH, J.J.; IONAS, G.; EBBETT, K.A.; KWAN, E. S. Genetic characterization and transmission cycles of *Cryptosporidium* species isolated from humans in New Zealand. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.3973, 2004.

LEAV, B.A.; MACKAY, M.; WARD, H.D. *Cryptosporidium* species: new insights and old challenges. **Clinical Infectious Diseases**, v.36, p.906-913, 2003.

LENGERICH, E.J.; ADDISS, D.G.; MARX, J.M.; UNGAR, L.P.B.; JURANEK, D.D. Increased exposure to cryptosporidia among dairy farmers in Wisconsin. **Journal of Infectious Diseases**. v.167, p.1252–1255, 1993.

LEVINE, N.D. Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (Protozoa, Apicomplexa). **Journal of Protozoology**, v.31, p.94-98, 1984.

LINDSAY, D.S.; UPTON, S.J.; OWENS, D.S.; MORGAN, M.; MEAD, J.R.; BLAGBURN, B.L. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from Cattle, *Bos Taurus*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 47, p. 91-95, 2000.

MACHADO, E.C.L.; STAMFORD, T.L.M.; ALVES, L.C.; MELO, R.G.; SHINOHARA, N.K.S. Effectiveness of *Cryptosporidium* spp. oocysts detection and enumeration methods in water and milk samples. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.432-439, 2006.

MACKENZIE, W.R.; HOXIE, N.J.; PROCTOR, M.E.; GRADUS, M.S.; BLAIR, K.A.; PETERSON, D.E.; KAZMIERCZAK, J.J.; ADDISS, D.G.; FOX, K.R.; ROSE, J.B.; DAVIS, J.P. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. **New England Journal of Medicine**, v.331, p.161-167, 1994.

MARTINS-VIEIRA, M.B.C.; BRITO, L.A.L.; HELLER, L. Oocistos de *Cryptosporidium parvum* em fezes de bezerro infectado experimentalmente. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p.1454-1458, 2009.

MCLAUCHLIN, J.; AMAR, C.; PEDRAZA-DIAZ, S.; NICHOLS, G.L. Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.3984-3990, 2000.

MEIRELES, M.V. *Cryptosporidium* infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.19, p.197-204, 2010.

MEISEL, J.L.; PERERA, D.R.; MELIGRO, B.S.; RUBIN, C.E. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. **Gastroenterology**. v.70, p.1156-1160, 1976.

MILLARD, P.S.; GENSHEIMER, K.F.; ADDISS, D.G.; SOSON, D.M.; BECKETT, G.A.; HOUCK-JANKOSKI, A.; HUDSON, A. An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider. **Journal of the American Medical Association**, v.272, p.1592-1196, 1994.

MINAROVICOVÁ, J.; KACLÍKOVÁ, E., KRASCSENICSOVÁ, K.; SIEKEL, P.; KUČHTA, T. A single-tube nested real-time polymerase chain reaction for sensitive contained detection of *Cryptosporidium parvum*. **Letters in Applied Microbiology**, v.49, p. 568–572, 2009.

MONGE, R.; CHINCHILLA, M. Presence of *Cryptosporidium* oocysts in fresh vegetables. **Journal of Food Protection**, v.59, p.202-203, 1996.

MORGAN, U.M.; THOMPSON, R.C.A. PCR detection of *Cryptosporidium*: the way forward? **Parasitology Today**, v.14, p.241-245, 1998.

MORGAN, U.M.; MONIS, P.T.; FAYER, R.; DEPLAZES, P.; THOMPSON, R.C. A. Phylogenetic relationships among isolates of *Cryptosporidium*: evidence for several new species. **Journal of Parasitology**, v.85, p.1126-1133, 1999b.

MORGAN, U.M.; XIAO, L.; FAYER, R.; LAL, A.A.; THOMPSON, R.C.A. Variation in *Cryptosporidium*: Towards a taxonomic revision of the genus. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1733-1751, 1999a.

MORGAN, U.; WEBER, R.; XIAO, L.; SULAIMAN, I.; THOMPSON, R.C.; NDIRITU, W.; LAL, A.; MOORE, A.; DEPLAZES, P. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.1180-1183, 2000b.

MORGAN, U.M.; XIAO, L.; LIMOR, J.; GELIS, S.; RAIDAL, S.R.; FAYER, R.; LAL, A.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R.C. *Cryptosporidium meleagridis* in an Indian ring-neck parrot (*Psittacula krameri*). **Australian Veterinary Journal**, v.78, p.182-183, 2000a.

MORGAN-RYAN, U. M.; FALL, A.; WARD, L. A.; HIJJAWI, N.; SULAIMAN, I.; FAYER, R.; THOMPSON, R. C. A.; OLSON, M.; LAL, A.; XIAO, L. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. **Journal Eukaryotic Microbiology**, v. 49, p. 433-440, 2002.

MULLER, A.N.B. **Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana de São Paulo**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

NAVARRE, C.B.; BELKNAP, E.B.; ROWE, S.E. Differentiation of gastrointestinal diseases of calves. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.16, p.37-57, 2000.

NIME, F.A.; BUREK, J.D.; PAGE, D.L.; HOLSCHEER, M.A.; YARDLEY, J.H. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. **Gastroenterology**, v. 70, p. 592-598, 1976.

O'DONOGHUE, P.J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. **Internacional Journal for Parasitology**, v.25, p.139-95, 1995.

O'HANDLEY, R.M. *Cryptosporidium parvum* infection in cattle: are current perceptions accurate? **Trends in Parasitology**, v.23, p.477-480, 2007.

O'HANDLEY, R.M.; COCKWILL, C.; MCALLISTER T.A.; JELINSKI, M.; MORCK D.W.; OLSON M.E. Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.214, p.391–396, 1999.

ONG, C.S.L.; EISLER, D.L.; ALIKHANI, A.; FUNG, V.W.K.; TOMBLIN J.; BOWIE, W.R.; ISSAC-RENTON, J.L. Novel *Cryptosporidium* genotypes specific in sporadic cryptosporidiosis cases: first report of human infections with a cervine genotype. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, p.263-268, 2002.

ORTEGA-MORA, L.M.; TRONCOSO, J.M.; ROJO-VÁSQUES, F.A.; GÓMEZ-BAUTISTA, M. Cross-reactivity of polyclonal serum antibodies generated against *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Infection and Immunity**, v.60, p.3442-3445, 1992.

OSHIRO, E.T.; DORVAL, M.E.C.; NUNES, V.L.B.; SILVA, M.A.A.; SAID, L.A.M. Prevalência de *Cryptosporidium parvum* em crianças abaixo de 5 anos, residentes na zona urbana de Campo Grande, MS, Brasil, 1996. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.22, p.277-280, 2000.

PANCIERA, R.J.; THOMASSEN, R.W.; GARNER, F.M. Cryptosporidial infection in a calf. **Veterinary Pathology**, v.8, p.479-484, 1971.

PARK, J.H.; GUK, S.M.; HAN, E.T.; SHIN, E.H.; KIM, J.L.; CHAI, J.Y. Genotype analysis of *Cryptosporidium* spp. prevalent in a rural village in Hwasun-gun, Republic of Korea. **Korean Journal of Parasitology**, v. 44, p. 27-33, 2006.

PAVLÁSEK, I. Cryptosporidia: Biology, diagnosis, host spectrum, specificity, and the environment. **Remedia - Klinická Mikrobiologie**, v. 3, p. 290-301, 1999.

PAVLÁSEK, I.; LÁVICKOVÁ, M.; HORÁK, P.; KRÁL, J.; KRÁL, B. *Cryptosporidium varanii* n.sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Emerald monitor (*Varanus prasinus* Schlegel, 1893) in captivity in Prague zoo. **Gazella**, v. 22, p. 99-108, 1995.

PEDRAZA-DIAS, S.; AMAR, C.; McLAUCHLIN, J. The identification and characterisation of an unusual genotype of *Cryptosporidium* from human faeces as *Cryptosporidium meleagridis*. **FEMS Microbiology Letters**, v.189, p.189-194, 2000.

PEDRAZA-DIAS, S.; AMAR, C.; IVERSEN, A.M.; STANLEY, P.J.; McLAUCHLIN, J. Unusual *Cryptosporidium* species recovered from human faeces: first description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium* dog type from patients in England. **Journal of Medical Microbiology**, v.50, p.293-296, 2001.

PENG, M.M.; MESHNICK, S.R.; CUNLIFFE, N.A.; THINDWA, B.D.; HART, C.A.; BROADHEAD, R.L.; XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis in children in Malawi. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**. v.50, p.557–559, 2003.

PENG, M.M.; MATOS, O.; GATEI, W.; DAS, P.; STANTIC-PAVLINIC, M.; BERN, C.; SULAIMAN, I.M.; GLABERMAN, S.; LAL, A.A.; XIAO, L. A comparison of *Cryptosporidium* subgenotypes from several geographic regions. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**. v.48, p.28–31, 2001.

PEREIRA, M.D.; ATWILL, E.R.; BARBOSA, A.P.; SILVA, S.A.; GARCIA-ZAPATA, M.T. Intra-familial and extra-familial risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiânia, Goiás, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.66, p.787-793, 2002.

PIENIAZEK, N.J.; BORNAY-LLINARES, F.J.; SLEMENDA, S.B.; DA SILVA, A.J.; MOURA, I.N.; ARROWOOD, M.J.; DITRICH, O.; ADDISS, D.G. New *Cryptosporidium* genotypes in HIV-infected persons. **Emerging Infectious Diseases**, v.5, p.444-449, 1999.

POWER, M.; RYAN, U. *Cryptosporidium macropodum* n.sp (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern gray kangaroos (*Macropus giganteus*). **Journal of Parasitology**, v. 94, p. 1114-1717, 2008.

RYAN, U.M.; POWER, M.; XIAO, L. *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, p. 22–26, 2008.

RYAN, U. M.; XIAO, L.; READ, C.; SULAIMAN, M.; MONIS, P.; LAL, A. A.; FAYER, R.; PAVLASEK, I. A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. **Journal of Parasitology**, v. 89, p. 809-813, 2003.

RYAN, U. M.; MONIS, P.; ENEMARK, H. L.; SULAIMAN, I.; SAMARASINGHE, B.; READ, C.; BUDLE, R.; RBERTSON, I.; ZHOU, L.; THOMPSON, R. C. A.; XIAO, L. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). **Journal of Parasitology**, v. 4, p. 769-773, 2004.

SANTIN, M.; TROUT, J.M.; XIAO, L.; ZHOU, L.; GREINER, E.; FAYER, R. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. **Veterinary Parasitology**, v.122, p.103–117, 2004.

SANFORD, S.A.; JOSEPHSON, G. K. A. Bovine cryptosporidiosis : clinical and pathological findings in forty-two scouring neonatal calves. **Canadian Veterinary Journal**, v.23, p.243-247, 1982.

SARGENT, K.D.; MORGAN, U.M.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R.C.A. Morphological and genetic characterization of *Cryptosporidium* oocysts from domestic cats. **Veterinary Parasitology**, v.77, p.221-227, 1998.

SAUDA, F.C.; ZAMARIOLI, L.A.; EBNER FILHO, W.; MELLO, L.B. Prevalence of *Cryptosporidium* sp. and *Isospora belli* among AIDS patients attending Santos Reference Center for AIDS, Sao Paulo, Brazil. **Journal of Parasitology**, v.79, p.454-456, 1993.

SILVA, C.V.; FERREIRA, M.S.; GONÇALVES-PIRES, M.R.F.; COSTA-CRUZ, J.M. Detection of *Cryptosporidium*-specific coproantigen in human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome patients by using a commercially available immunoenzymatic assay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, p.1097-1099, 2003.

SISCHO, W.M.; ATWILL, E.R.; LANYON, L.E.; GEORGE, J. Cryptosporidia on dairy farms and the role these farms may have in contaminating surface water supplies in the northeastern United States. **Preventive Veterinary Medicine**, v.43, p.253–267, 2000.

SIWILA, J.; PHIRI, I.G.K.; VERCROYSE, J.; GOMA, F.; GABRIEL, S.; CLAEREBOU, E.; GEURDEN, T. Asymptomatic cryptosporidiosis in Zambian dairy farm workers and their household members. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.101, p.733–734, 2007.

SLAVIN, D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). **Journal of Comparative Pathology**, v.65, p.262-266, 1955.

SMITH, H.V.; ROSE, J.B. Waterborne Cryptosporidiosis: current status. **Parasitology Today**, v.14, p.14-22, 1998.

SMITH, H.V.; CACCIÒ, S.M.; COOK, N.; NICHOLS, R.A.; TAIT, A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. **Veterinary Parasitology**, v.149, p.29-40, 2007.

SMITH, H.V.; CACCIÒ, S.M.; TAIT, A.; MCLAUCHLIN, J.; THOMPSON, R. C. A. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. **Trends in Parasitology**, v.22, p.161-167, 2006.

SMITH, J.L. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* as agents of food borne disease. **Journal of Food Protection**, v.56, p.451-461, 1993.

SMITH, H.V.; NICHOLS, R.A.; MALLON, M.; MACLEOD, A.; TAIT, A.; REILLY, W.J.; BROWNING, L.M.; GRAY, D.; REID, S.W.; WASTLING, J.M. Natural *Cryptosporidium hominis* infections in Scottish cattle. **Veterinary Record**, v.156, p.710–711, 2005.

SPANO, F.; PUTIGNANI, L.; CRISANTI, A.; SALLICANDRO, P.; MORGAN, U. M.; LE BLANCO S. M.; TCHACK, L.; TZIPORI, S.; WIDMER, G. Multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from different hosts and geographical origins. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.3255-3259, 1998.

SRÉTER, T.; VARGA, I. Cryptosporidiosis in birds: a review. **Veterinary Parasitology**, v.87, p.261-279, 2000.

SULAIMAN, I.M.; LAL, A.A.; XIAO, L. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. **Journal of Parasitology**, v.88, p.388-394, 2002.

SZONYI, B.; KANG'ETHE, E.K.; MBAE, C.K.; KAKUNDI, E.M.; KAMWATI, S.K.; MOHAMMED, H.O. First report of *Cryptosporidium* deer-like genotype in Kenyan cattle. **Veterinary Parasitology**, v.153, p.172–175, 2008.

TANRIVERD, S.; TANYELI, A.; BASLAMISLI, F.; KÖKSAL, F.; YURDANUR, K.; XIAOCHUAN, F.; BATZER, G.; TZIPORI, S.; WIDMER, G. Detection and genotyping of oocysts of *Cryptosporidium parvum* by real-time PCR and melting curve analysis **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p. 3237–3244, 2002.

TIANGTIP, R., JONGWUTIWES, S. Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV-infected patients in Thailand. **Tropical Medicine and International Health**, v.7, p.357-364, 2002.

TYZZER, E.E. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. **Archives fur Protistenkunde**, v.26, p.394-412, 1912.

TYZZER, E.E. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. **Journal of Medical Research**, v. 23, p. 487-509, 1910.

VETTERLING, J.M.; JERVIS, H.R.; MERRILL, T.G.; SPRINZ, H. *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the Guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. **Journal of Protozoology**, v. 18, p. 243-247, 1971.

XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. **International Journal for Parasitology**, v.38, p.1239-1255, 2008.

XIAO, L.; HERD, R. P. Infection pattern of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. **Veterinary Parasitology**, v.55, p.257–262, 1994.

XIAO, L.; FENG, Y. Zoonotic cryptosporidiosis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.52, p.309-323, 2008.

XIAO, L.; RYAN, U.M. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.17, p.483–490, 2004.

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S. J. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, p.72-97, 2004.

XIAO, L.; SULAIMAN, I.; FAYER, R.; LAL, A. Species and strain-specific typing of *Cryptosporidium* parasites in clinical and environmental samples. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, p.687-692, 1998.

XIAO, L.; ALDERISIO, K.; LIMOR, J.; ROYER, M.; LAL, A.A. 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, p.5492-5498, 2000.

XIAO, L.; ESCALANTE, L.; YANG, C.; SULAIMAN, I.; ESCALANTE, A.A.; MONTALI, R.J.; FAYER, R.; LAL, A.A. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small- subunit rRNA gene locus. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.1578-1583, 1999a.

XIAO, L.; MORGAN, U.M.; LIMOR, J.; ESCALANTE, A.; ARROWOOD, M.; SHULAW, W.; THOMPSON, R.C.A.; FAYER, R.; LAL, A.A. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.3386-3391, 1999b.

XIAO, L.; SULAIMAN, I.M.; RYAN, U.M.; ZHOU, L.; ATWILL, E.R.; TISCHLER, M.L.; ZHANG, X.; FAYER, R.; LAL, A.A. Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. **International Journal for Parasitology**, v.32, p.1773-1785, 2002.

XIAO, L.; CAMA, V. ***Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis**. In: ORTEGA, Y. R. **Foodborne Parasites**. New York: Springer verlag, 2006.

ZHOU, L.; SINGH, A.; JIANG, J.; XIAO, L. Molecular surveillance of *Cryptosporidium* spp. in raw wastewater in Milwaukee: implications for understanding outbreak occurrence and transmission dynamics. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.5254–5257, 2003.

CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO DE *Cryptosporidium parvum* EM AMOSTRAS FECAIS DE BEZERROS

Camila G. Homem ¹, Alex A. Nakamura ², Deuvânia C. Silva ¹, Weslen F. P. Teixeira ³, Willian M. D. Coelho ³, Marcelo V. Meireles ¹.

¹ Faculdade de Medicina Veterinária – FMVA/UNESP - Araçatuba, SP - Rua Clóvis Pestana, nº 793, CEP:16050-680 - Araçatuba, SP; ² Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ/USP – São Paulo, SP; ³ Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP – Jaboticabal, SP.

RESUMO: A infecção por *Cryptosporidium parvum* em bovinos se manifesta como enfermidade subclínica ou com presença de morbidade e mortalidade, particularmente quando há associação com outros agentes infecciosos. *Cryptosporidium parvum* apresenta ainda grande importância em saúde pública. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) para detecção de *C. parvum* em amostras fecais de bezerros e sua comparação com a reação em cadeia da polimerase (*nested* PCR), rotineiramente utilizada para diagnóstico de *Cryptosporidium* spp.. Duzentas e nove amostras fecais de bezerros entre um dia e seis meses de idade foram examinadas pela qPCR para amplificação de fragmentos do gene da actina e pela *nested* PCR para o gene da subunidade 18S do rRNA. A qPCR apresentou positividade para *C. parvum* em 73,21% (153/209) das amostras, enquanto a *nested* PCR apresentou amplificação positiva para *Cryptosporidium* spp. em 56,5% (118/209) das amostras. A sensibilidade analítica da qPCR foi de aproximadamente um oocisto de *C. parvum*. Não se observou amplificação inespecífica de DNA *Cryptosporidium bovis*, *Cryptosporidium andersoni*, *Cryptosporidium ryanae*, *Cryptosporidium*

canis, *Cryptosporidium serpentis*, *Cryptosporidium galli*, *Cryptosporidium baileyi* e *Cryptosporidium* genótipo II de aves. Desta forma, conclui-se que a qPCR para o gene da actina é uma técnica sensível e específica para detecção de *C. parvum* em amostras fecais de bezerros.

Palavras-chave: *Cryptosporidium* spp., bovinos, diagnóstico, detecção molecular.

ABSTRACT: The infection with *Cryptosporidium parvum* in cattle results in subclinical disease or in the presence of morbidity and mortality, particularly when associated with other infectious agents. This species is also an important public health problem. The aim of this research was to develop a real time polymerase chain reaction (qPCR) for detection of *C. parvum* DNA in fecal samples of calves, in comparison to a *nested* PCR routinely used for *Cryptosporidium* spp. diagnosis. Two hundred and nine fecal samples from calves aged between one day and six weeks were screened by qPCR specific for the actin gene of *C. parvum* and using *nested* PCR targeting the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* spp.. The qPCR showed positivity for *C. parvum* in 73,21% (153/209) of the samples, and nested PCR was positive for *Cryptosporidium* spp. in 56.5% (118/209) of the samples. The analytical sensitivity of qPCR foi de aproximadamente one oocyst *C. parvum* per reaction tube. Evaluation of analytical specificity did not reveal inespecific amplification for DNA of the following *Cryptosporidium* species and genotypes: *C. bovis*, *C. andersoni*, *C. ryanae*, *C. canis*, *C. serpentis*, *C. galli*, *C. baileyi* and avian genotype II. These results allowed the conclusion that qPCR for actin gene is a sensitive and specific technique for detection of *C. parvum* in fecal samples from calves.

Keywords: *Cryptosporidium* spp., bovine, diagnosis, molecular detection.

Introdução

A infecção por *Cryptosporidium parvum* apresenta grande importância em saúde pública (XIAO; FENG, 2008) e para os bovinos, nos quais se manifesta como enfermidade subclínica ou com presença de morbidade e mortalidade, particularmente quando há associação com outros agentes infecciosos (OLSON et al., 2004).

As espécies de *Cryptosporidium* encontradas com mais frequência em bovinos são *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. parvum* e *C. ryanae* (FAYER, 2010). Embora *C. parvum* seja a espécie predominante em casos de infecção em bovinos e no homem, e os bovinos tenham participação relevante na cadeia epidemiológica da criptosporidiose humana, a proporção da transmissão zoonótica de *C. parvum* ainda não está totalmente esclarecida (XIAO; FENG, 2008).

A aplicação de métodos moleculares possibilita a estimativa do potencial zoonótico de *Cryptosporidium* spp. e a determinação das fontes de infecção para o ser humano (SKOTARCZAKANN, 2010). Entre esses métodos, destaca-se a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), que apresenta alta sensibilidade e permite o diagnóstico de criptosporidiose clínica, bem como a detecção de indivíduos portadores, sendo uma valiosa ferramenta para estudos epidemiológicos em humanos e animais (DE WAELE et al., 2011; FONTAINE; GUILLOT, 2003; HADFIELD et al. 2011; MINAROVICOVÁ et al., 2009; TANRIVERD et al., 2002).

O diagnóstico da criptosporidiose por qPCR pode ser direcionado para *Cryptosporidium* spp. (HADFIELD et al., 2011; JOTHIKUMAR et al., 2008), para somente uma espécie do parasito (HADFIELD et al., 2011; JOTHIKUMAR et al., 2008; YANG et al., 2009) ou ainda para um grupo de espécies geneticamente relacionadas (GUY et al., 2003). Os genes alvo utilizados em protocolos de qPCR para *Cryptosporidium* são os que codificam a subunidade 18S do rRNA (18SrRNA) (HADFIELD et al., 2011; JOTHIKUMAR et al., 2008;

SUNNOTEL et al., 2006), a proteína da parede dos oocistos (COWP) (GUY et al., 2003) e a proteína de choque térmico (hsp70) (DI GIOVANNI et al., 2005).

O gene da actina de *Cryptosporidium* spp. apresenta alto polimorfismo entre espécies, é muito utilizado para detecção e classificação de espécies e genótipos do parasito por *nested* PCR (SULAIMAN et al., 2002) e apresenta um grande número de sequências publicadas no *GenBank*, o que permite a comparação das sequências da maioria das espécies e genótipos do parasito. No entanto, não há nenhum trabalho com utilização desse gene para diagnóstico de *Cryptosporidium* por qPCR.

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento da qPCR, por meio de ensaio com sonda *TaqMan*® específica para o gene da actina, para detecção de DNA de *C. parvum* em amostras fecais de bezerros e sua comparação com a *nested* PCR para o gene da 18SrRNA.

Material e métodos

Amostras fecais

Foram utilizadas 209 amostras fecais colhidas diretamente da ampola retal de bezerros, com idade entre um dia e seis meses de vida, em propriedades leiteiras do estado de São Paulo.

As amostras foram armazenadas a 4°C, em recipientes de plástico de 50 ml, em solução de bicromato de potássio a 2,5% (concentração final), e submetidas à purificação pela técnica de centrífugo-sedimentação em água/éter (MELONI; THOMPSON, 1996).

Extração de DNA genômico

O DNA genômico dos oocistos foi extraído por meio de técnica descrita por Boom et al. (1990), com adaptações: o sedimento resultante do processo de purificação foi diluído em 300 μ L de tampão de lise [(12,5% Chelex 100® Bio-Rad, 1% polivinilpirrolidona K-90 (USB), 10 mM Tris-HCl, 10 mM ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)] e 5 μ L de 10% dodecil sulfato de sódio (SDS) com agitação vigorosa em aparelho de *vortex*. Os microtubos foram submetidos a congelamento em nitrogênio líquido, por um minuto, e descongelamento a 65°C, por três minutos, por cinco vezes. Em seguida, foram adicionados 20 μ L de proteinase K (25 mg/ml), com incubação a 65°C, por duas horas, a 400 rpm.

Para remoção de proteínas e lipídeos, 1.000 μ L de tampão L6 [0,1 M Tris-Cl pH 6,4, 6 M isotiocianato de guanidina (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA), 10 mM EDTA (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA), 1% triton X-100)] foram adicionados à suspensão, que foi incubada a 60°C, a 900 rpm, e em seguida centrifugada a 16.100 g, por cinco minutos, para remoção do Chelex e debris. O sobrenadante foi recolhido e transferido para outro microtubo, ao qual foram adicionados 100 μ L de sílica (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), seguindo-se incubação, em temperatura ambiente, por 10 minutos, com homogeneização periódica, por inversão. Após esse período, os microtubos foram centrifugados a 16.100 g, por três minutos, e o sobrenadante foi descartado e a sílica presente no sedimento foi lavada duas vezes, por centrifugação, a 12.000 g, com 500 μ L de tampão L2 (0,1 M Tris-Cl pH 6,4, 6 M isotiocianato de guanidina), duas vezes com 500 μ L de etanol 80% e uma vez com 500 μ L de acetona 100%. O microtubo foi invertido para descarte da acetona e colocado em banho seco, a 58°C, por 10 minutos, com a tampa aberta, para evaporação da acetona restante no sedimento.

O DNA foi recuperado com a adição de 150 μ L de TE (10mM Tris, 1 mM EDTA) adicionados à sílica, com incubação por 10 minutos, a 58°C, sob

agitação a 900 rpm, em banho seco da marca Eppendorf®. Após esse processo, as amostras foram centrifugadas a 16.100 *g*, por três minutos, e o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para outro microtubo e armazenado a –20°C.

Nested PCR e sequenciamento dos fragmentos amplificados

Para amplificação de fragmentos do gene da 18SrRNA foi utilizada a *nested* PCR (XIAO et al., 2000), com oligonucleotídeos iniciadores 5' TTCTAGAGCTAATACATGCG 3' e 5' CCCATTTCCTTCGAAACAGGA 3' para a reação primária (~1325 bp) e 5' GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG 3' e 5' AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA 3' para a reação secundária (826-840 pb), nas seguintes condições de reação: 25µL de solução contendo 2,5 µL de tampão para PCR 1 x, MgCl₂ a 2,5 mM, 1 U de Taq DNA polimerase, 200 µM de cada desoxiribonucleotídeo, 100 nM de cada oligonucleotídeo iniciador e 2,5 µL de DNA alvo nas duas reações. As amostras foram submetidas à desnaturação inicial do DNA a 94°C por 3 minutos, seguida de 34 ciclos, cada um consistindo em desnaturação a 94°C por 45 segundos, 45 segundos de anelamento a 50°C e 60 segundos de extensão a 72°C, com extensão final a 72°C por 7 minutos.

Amostras que se apresentaram positivas pela qPCR e negativas pela *nested* PCR foram testadas novamente, pela *nested* PCR com adição de DNA genômico de *C. parvum*, para verificar a possível presença de inibidores da *nested* PCR.

Amostras que apresentaram amplificação intensa do fragmento de DNA, visualizadas por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5%, foram purificadas utilizando-se o kit QIAquick® Gel Extraction (Qiagen), e sequenciadas com utilização do ABI Prism® Dye Terminator 3.1, em sequenciador automático ABI 3730XL (Applied Biosystems). As reações de sequenciamento foram realizadas nas duas direções, com os oligonucleotídeos iniciadores da *nested* PCR.

Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

Os oligonucleotídeos iniciadores e a sonda utilizados na qPCR foram elaborados com auxílio do programa Primer Express® versão 3.0 (Applied Biosystems). Para tanto, sequências parciais do gene da actina de *C. parvum* foram alinhadas com sequências pertencentes a todas as outras espécies e genótipos de *Cryptosporidium* disponíveis no *GenBank*, com o intuito de determinar as sequências específicas para *C. parvum*. Após a determinação das seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores e da sonda (Quadro 1), estas foram submetidas à análise no *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) para verificação de sua especificidade para *C. parvum*.

As reações constituíram-se de 12,5 µL de JumpStart Taq ReadyMix® (Sigma-Aldrich), 6,5nM de MgCl₂, 250nM de sonda e 600nM de cada oligonucleotídeo iniciador. O ciclo utilizado para amplificação consistiu em dois minutos a 94°C, seguidos por 46 ciclos de 30 segundos a 94°C e um minuto a 58°C, no aparelho de amplificação em tempo real CFX96® (Bio Rad). Cada amostra foi analisada em duplicata.

Quadro 1 – Oligonucleotídeos iniciadores e sonda utilizados na reação em cadeia da polimerase em tempo real para amplificação de fragmento de DNA do gene da actina específica para *Cryptosporidium parvum*.

Oligonucleotídeos iniciadores/Sonda	Posição*	Sequência 5' - 3'	Produto amplificado (pb)
CryActF	257-279	AATTACGTGTTGCTCCTGAGGAA	73
CryActR	308-329	TCACGATTACCTTTGGGTTCA	
		FAM ACCCAGTATTATTGACTGAAG	
CryActS	281-301	MGB	

*Posição de anelamento no gene da actina de *C. parvum* (*GenBank* número AF382338).

A reação foi padronizada por meio de curva de regressão padrão, com utilização de um fragmento de DNA, de 1.118 pb, referente a uma sequência parcial do gene da actina específica para *C. parvum* (GenBank número AF382338) foi amplificado por meio de *nested* PCR (SULAIMAN et al., 2002) utilizando-se DNA genômico de *C. parvum* isolado de um bovino na cidade de Araçatuba/SP e previamente identificado. Esse fragmento foi submetido à clonagem utilizando-se o CloneJET® PCR Cloning Kit (Fermentas), linearizado com a enzima de restrição HindIII (Fermentas) e purificado com o kit QIAquick® Gel Extraction (Qiagen). A partir do plasmídeo foram feitas diluições seriadas, na base 10 (10^9 a 10^3 moléculas de DNA), de modo que se obtivessem sete pontos na curva de regressão. Cada diluição foi testada em triplicata.

Amostras de DNA genômico de diferentes espécies e genótipos de *Cryptosporidium*, previamente identificadas e armazenadas no laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP, Campus de Araçatuba, foram testadas pela qPCR para verificação de sua especificidade analítica. Foram utilizadas amostras de DNA de *C. bovis*, *C. andersoni*, *C. ryanae*, *C. canis*, *C. serpentis*, *C. galli*, *C. baileyi* e *Cryptosporidium* genótipo II de aves. Cada amostra foi testada em triplicata.

A sensibilidade analítica da qPCR foi determinada com utilização de diluições seriadas na base 10 (10^3 a 10^0) de oocistos de *C. parvum*, contados em câmara de Neubauer (BENNET et al., 1999). O DNA genômico dos oocistos foi extraído utilizando-se congelamento e descongelamento em Chelex 100® (Bio-Rad) (DI GIOVANI; LE CHEVALLIER, 2005). Cada amostra foi testada em quintuplicata.

Análise estatística

Para avaliação da concordância entre os dois ensaios determinou-se o coeficiente Kappa.

Resultados e Discussão

Neste trabalho foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores e sonda para amplificação de fragmento de DNA de um gene que apresenta uma cópia por genoma e alto polimorfismo inter-espécies de *Cryptosporidium* (SULAIMAN et al., 2002) e que, devido a essa característica, têm alta especificidade para *C. parvum*.

A curva de regressão padrão feita para padronização da qPCR apresentou eficiência de 99,7% e slope de -3,328 (Figura 1). De acordo com Pfaffl (2001), a eficiência da qPCR deve ser de $100 \pm 20\%$, correspondente a $-3,6 < \text{inclinação} < -3,1$.

Não se observou amplificação de DNA de outras espécies e genótipos de *Cryptosporidium* testadas. Embora não houvesse disponibilidade de DNA de espécies geneticamente mais próximas de *C. parvum*, como *Cryptosporidium cuniculus*, *C. hominis*, *C. meleagridis* e *C. wrairi*, em amostras fecais de bovinos há raros relatos da presença de *C. hominis* (PARK et al., 2006) e não há descrição de *C. cuniculus*, *C. meleagridis* e *C. wrairi*.

A presença de substituições na sonda e nos oligonucleotídeos iniciadores utilizados (Tabela 2), associada à utilização de uma sonda MGB, diminui a possibilidade de resultados falso-positivos para *C. parvum* (YAO et al., 2006). No entanto, para diagnóstico em amostras de fezes de outras espécies animais e de humanos é recomendável a verificação da especificidade deste método para essas espécies de *Cryptosporidium*.

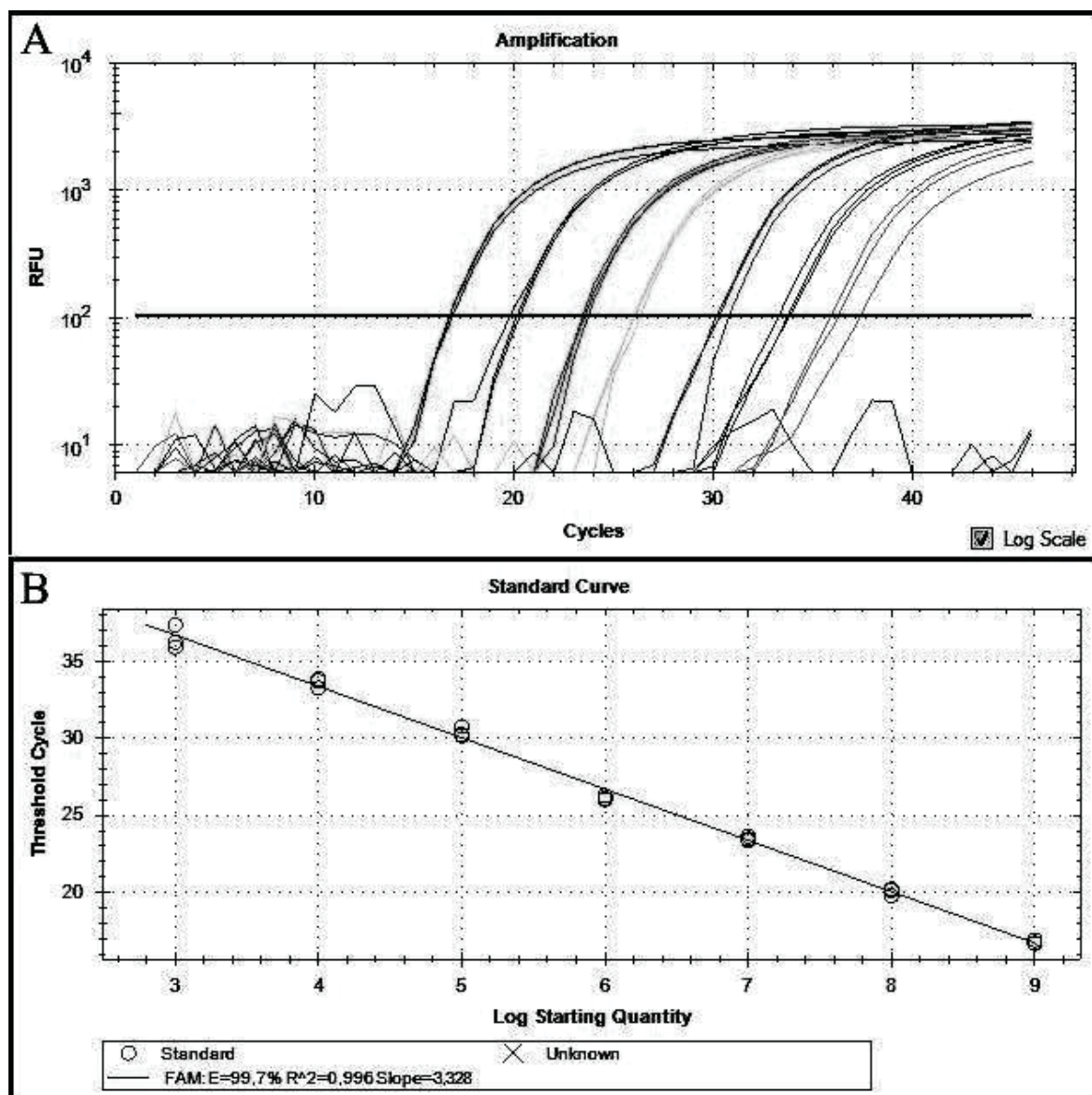


FIGURA 1 – Padronização da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). A) amplificação em tempo real das diluições contendo 10⁹ a 10³ cópias de fragmento de DNA do gene actina de *Cryptosporidium parvum*. B) curva de regressão padrão das diluições.

A qPCR específica para *C. parvum* apresentou maior sensibilidade que a *nested* PCR para detecção de DNA de *C. parvum* em amostras de campo, com positividade em 153 (73,21%) amostras, enquanto que a *nested* PCR resultou

em 56,5% (118/209) de amostras positivas para *Cryptosporidium* spp.. Alguns autores observaram maior sensibilidade da qPCR para diagnóstico de *Cryptosporidium* spp., quando comparada à *nested* PCR (DE WAELE et al., 2011; YANG et al., 2009), enquanto que Hadfield et al. (2011) relatam que a sensibilidade das duas técnicas foi semelhante. O teste de sensibilidade analítica mostrou que a qPCR foi capaz de detectar DNA de até 1 oocisto por reação.

A utilização de DNA de *C. parvum* nas amostras negativas pela *nested* PCR e positivas pela qPCR resultou em amplificação em 32 de 35 amostras, evidenciando que havia inibidores da *nested* PCR em apenas 3 amostras que, mesmo assim, foram positivas pela qPCR. A diferença na susceptibilidade dos dois ensaios, à presença de inibidores da reação, pode ser atribuída a diversos fatores, incluindo o tamanho do fragmento amplificado (OPEL et al., 2010).

Na qPCR, a média de ciclos *threshold* (Ct) foi de 36,16 ($\pm$ 5,13), sendo o Ct mínimo 18,62 e o máximo 43,75. Assim, foi elaborada uma classificação utilizando-se escores de Ct variando de 1 a 6 (Tabela 1). O escore 5, referente aos Ct entre 30 e 35, foi o mais freqüente, compreendendo 100 amostras positivas pela qPCR e 69 amostras positivas pela *nested* PCR. Amostras positivas em ambas as reações tiveram amplificação a partir de 15 Ct (escores entre 1 a 5), enquanto as amostras negativas na *nested* PCR e positivas na qPCR tiveram amplificação a partir de 30 Ct (escores 4, 5 e 6). Provavelmente, amostras fecais com poucos oocistos não foram detectadas pela *nested* PCR, conforme observado por Yang et al. (2009), e foram diagnosticadas pela qPCR somente com amplificação em altos valores de Ct. Essa mesma correlação entre altos valores de Ct e menor quantidade do agente etiológico presente na amostra foi observada por Fillaux et al. (2008) ao utilizarem a qPCR para diagnóstico de *Pneumocystis jirovecii* em humanos.

A análise da concordância entre a qPCR padronizada neste experimento e a *nested* PCR resultou em concordância substancial entre ambos os ensaios (LANDIS; KOCH, 1977), demonstrada pelo coeficiente Kappa de 0,624 ao nível de 5% de significância.

O sequenciamento de fragmentos provindos da amplificação de 22 amostras, pela *nested* PCR, permitiu a identificação de *C. parvum* (18), *C. bovis* (2), *C. andersoni* (1) e *C. ryanae* (1). Todas as amostras seqüenciadas foram positivas pela qPCR específica para *C. parvum*, o que sugere a presença de infecção concomitante com *C. parvum*, nas amostras positivas para *C. bovis*, *C. andersoni* e *C. ryanae* (FENG et al., 2007; NG et al., 2011; SANTIN et al., 2004; YANG et al., 2009).

Observou-se ainda que duas amostras que se apresentaram como positivas para *Cryptosporidium* spp. pela *nested* PCR, e que não foram identificadas por sequenciamento, apresentaram resultado negativo pela qPCR, o que também sugere infecção por outra espécie de *Cryptosporidium*, já que a sonda e os oligonucleotídeos iniciadores da qPCR possibilitam a detecção apenas de DNA de *C. parvum*.

Tabela 1 - Distribuição de amostras fecais de bezerros positivas pela PCR em tempo real (qPCR) e pela *nested* PCR, conforme os escores de ciclos *threshold* (Ct) obtidos pela qPCR.

q-PCR			<i>nested</i> PCR	
Escore	Nº de amostras	%	Nº de amostras	%
Escore 1 (15-20 Ct)	3	1,96	3	1,44
Escore 2 (20-25 Ct)	5	3,27	5	2,39
Escore 3 (25-30 Ct)	16	10,46	16	7,66
Escore 4 (30-35 Ct)	11	7,19	10	4,78
Escore 5 (35-40 Ct)	100	65,36	69	33,01
Escore 6 (40-45 Ct)	18	11,76	15	7,18
Total	153	73,21	118	56,46

A qPCR para detecção específica de *C. parvum* em amostras fecais, desenvolvida neste trabalho, apresenta potencial para ser utilizada em amostras fecais de outras espécies animais, além de amostras de água, alimentos e em cultivo celular para o teste de drogas anti-*C. parvum*, podendo

ainda favorecer a detecção de indivíduos assintomáticos, devido à sua alta sensibilidade.

Tabela 2. Alinhamento dos primers e sonda específicos para o gene da actina de *Cryptosporidium parvum* com seqüências de espécies que infectam bovinos com frequência¹ ou raramente², e com seqüências de *Cryptosporidium* geneticamente mais relacionadas a *C. parvum*³.

<i>Cryptosporidium</i>		Sequence alignment				
species or genotype	Sequence annotation	255	280	305	330	
<i>C. parvum</i>	AF382338					
<i>C. andersoni</i> ¹	AF382352	ATAATGAATTACGTTGCTCCTCGAGGACACCCAGTATTATTGACTGAAGCACCACCAATGAACCCAAAGGTAAATCGTGAAAGAAAT				
<i>C. bovis</i> ¹	AY741307	.C.....G.....A..C.....A.....T.....T.....A..A.....T.....T.....A.C.....C.....				
<i>C. ryanae</i> ¹	FJ463206	.C.....G.....C.....G..A..G..T.....G.....A..G..C.....T.....				
<i>C. felis</i> ²	AF382347	.C.....G..G.....G..T..T..T.....A.....C.....T.....A.....G..G..				
Pig genotype	EF012374	.C.....C..T.....G..A.....T.....TC..C..T.....T.....T..C.....G.....				
IT ²		.C.....G.....C.....A.....G.....G..A.....G.....T.....A.....G.....				
<i>C. suis</i> ²	AF382344		A.....T.....	A.....T.....	A..T.....	
<i>C. ubiquitum</i> ²	EF030518	G.....	A..A.....C.....C.....A.....	G.A..T.....		
<i>C. hominis</i> ^{2,3}	GQ983378		A.....G.....C.....			
<i>C. cuniculus</i> ³	GU327783		A.....G.....C.....			
<i>C. meleagridis</i> ³	AF382351		A.....T.....G.....	A.....		
<i>C. wrairi</i> ³	AF382348		A..A.....		A..G.....	

Conclusões

Neste experimento foi desenvolvido um método de detecção sensível e específico para *C. parvum*, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores e sondas espécie-específicos. A qPCR para o gene da actina demonstrou bons resultados quando utilizada em amostras fecais de bezerros e apresentou sensibilidade analítica de até 1 oocisto por reação.

REFERÊNCIAS

BENNETT, J.W.; GAUCI, M.R.; LE MOENIC, S.; SCHAEFER 3rd, F.W.; LINDQUISTT, H.D. A comparison of enumeration techniques for *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Journal of Parasitology**, v. 85, p. 1165-1168, 1999.

BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, p.495-503,1990.

DE WAELE, V.; BERZANO, M.; BERKVEN, D.; SPEYBROECK, N.; LOWERY, C.; MULCAHY, G.M.; MURPHY, T.M. Age-stratified Bayesian analysis to estimate sensitivity and specificity of four diagnostic tests for detection of *Cryptosporidium* oocysts in neonatal calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, p.76-89, 2011.

DI GIOVANNI, G.D.; LECHEVALLIER, M.W. Quantitative-PCR assessment of *Cryptosporidium parvum* cell culture infection. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.1495- 1500, 2005.

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. **Veterinary Parasitology**, v. 144, p. 1-9, 2007.

FILLAUX, J.; MALVY, S.; ALVAREZ, M.; FABRE, R.; CASSAING, S.; MARCHOU, B.; LINAS, M.D.; BERRY, A. Accuracy of a routine real-time PCR assay for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. **Journal of Microbiological Methods**, v.75, p.258–261, 2008.

FONTAINE, M.; GUILLOT, E. An immunomagnetic separation–real-time PCR method for quantification of *Cryptosporidium parvum* in water samples. **Journal of Microbiological Methods**, v.54, p.29– 36, 2003.

GUY, R.A.; PAYMENT, P.; KRULL, U.J.; HORGAN, P.A. Real-Time PCR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in environmental water samples and sewage. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.5178-5185, 2003.

HADFIELD, S.J.; ROBINSON, G.; ELWIN, K.; CHALMERS, R.M. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp. in 1 human clinical samples using real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 918-924, 2011.

JOTHIKUMAR, N.; DA SILVA, A.J.; MOURA, I.; QVARNSTROM, Y.; HILL, V.R. Detection and differentiation of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* by dual TaqMan assays. **Journal of Medical Microbiology**, v.57, p.1099–1105, 2008.

LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, p. 159-174, 1977.

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, p. 757-762, 1996.

MINAROVICOVÁ, J.; KACLÍKOVÁ, E., KRASCSENICSOVÁ, K.; SIEKEL, P.; KUČHTA, T. A single-tube nested real-time polymerase chain reaction for sensitive contained detection of *Cryptosporidium parvum*. **Letters in Applied Microbiology**, v.49, p. 568–572, 2009.

NG, J.; YANG, R.; MCCARTHY, S.; GORDON, C.; HIJJAWI, N.; RYAN, U. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in pre-weaned calves in Western Australia and New South Wales, **Veterinary Parasitology**, v. 176, p. 145-150, 2011.

OLSON, M. E.; O'HANDLEY, R. M.; RALSTON, B. J.; MCALLISTER, T. A.; THOMPSON, R. C. A. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. **Trends in Parasitology**, v. 20, p. 185-191, 2004.

OPEL, K.L.; CHUNG, D.; McCORD, B.R. A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. **Journal of Forensic Sciences**, v.55, p.25-33, 2010.

PARK, J.H.; GUK, S.M.; HAN, E.T.; SHIN, E.H.; KIM, J.L.; CHAI, J.Y. Genotype analysis of *Cryptosporidium* spp. prevalent in a rural village in Hwasun-gun, Republic of Korea. **Korean Journal of Parasitology**, v. 44, p. 27-33, 2006.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 2002-2007, 2001.

SANTÍN, M.; TROUT, J.M.; XIAO, L.; ZHOU, L.; GREINER, E.; FAYER, R. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. **Veterinary Parasitology**, v. 122, p. 103-117, 2004.

SKOTARCZAKANN, B. Progress in the molecular methods for the detection and genetic characterization of *Cryptosporidium* in water samples. **Agricultural and Environmental Medicine**, v.17, p.1–8, 2010.

SULAIMAN, I. M.; LAL, A. A.; XIAO, L. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. **Journal of Parasitology**, v. 88, p. 388-394, 2002.

SUNNOTEL, O.; SNELLING, W.J.; XIAO, L.; MOULE, K.; MOORE, J.E.; MILLAR, C.; DOOLEY, J.S.G.; LOWERY, C.J. Rapid and sensitive detection of single *Cryptosporidium* oocysts from archived glass slides. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 3285-3291, 2006.

TANRIVERD, S.; TANYELI, A.; BASLAMISLI, F.; KÖKSAL, F.; YURDANUR, K.; XIAOCHUAN, F.; BATZER, G.; TZIPORI, S.; WIDMER, G. Detection and genotyping of oocysts of *Cryptosporidium parvum* by real-time PCR and melting curve analysis **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.9, p. 3237–3244, 2002.

XIAO, L.; FENG, Y. Zoonotic cryptosporidiosis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, p. 309-323, 2008.

XIAO, L.; ALDERISIO, K.; LIMOR, J.; ROYER, M.; LAL, A.A. 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, p. 5492-5498, 2000.

YANG, R.; JACOBSON, C.; GORDON, C.; RYAN, U. Prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* species in pre-weaned sheep in Australia. **Veterinary Parasitology**, v.161, p.19–24, 2009.

YAO, Y.; NELLÅKER, C.; KARLSSON, H. Evaluation of minor groove binding probe and Taqman probe PCR assays: Influence of mismatches and template complexity on quantification. **Molecular and Cellular Probes**, v. 20, p. 311-316, 2006.