

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**DETECÇÃO DE *Cryptosporidium serpentis* EM
AMOSTRAS FECAIS DE SERPENTES UTILIZANDO A
PCR EM TEMPO REAL**

Deuvânia Carvalho da Silva

Bióloga

ARAÇATUBA – SP

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

DETECÇÃO DE *Cryptosporidium serpentis* EM
AMOSTRAS FECAIS DE SERPENTES UTILIZANDO A
PCR EM TEMPO REAL

Aluna: Deuvânia Carvalho da Silva

Orientador: Professor Adjunto Marcelo Vasconcelos Meireles

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, *Campus* de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

ARAÇATUBA – SP

2013

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

	Silva, Deuvânia Carvalho da
S586d	Detecção de <i>Cryptosporidium serpentis</i> em amostras fecais de serpentes utilizando a PCR em tempo real / Deuvânia Carvalho de Silva. -- Araçatuba: [s.n], 2013. 78 f. il.; + CD-ROM Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2013. Orientador: Prof. Adj. Marcelo Vasconcelos Meireles 1. <i>Cryptosporidium</i>. 2. Diagnóstico molecular. 3. Epidemiologia. 4. Répteis. I. T. CDD 636.20896



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Deteção de Cryptosporidium serpentis em amostras fecais de serpentes
utilizando a PCR em tempo real.

AUTORA: DEUVÂNIA CARVALHO DA SILVA

ORIENTADOR: Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTORA em CIÊNCIA ANIMAL (MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA) pela Comissão Examinadora.


Dr. ALEX AKIRA NAKAMURA


Dra. VALÉRIA DE SÁ JAYME


Dr. CARLOS NORIYUKI KANETO


Dra. ROBERTA LEMOS FREIRE


Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES

DATA DA REALIZAÇÃO: 27 de novembro de 2013.


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

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

DEUVÂNIA CARVALHO DA SILVA - nascida em 27 de junho de 1968, no município de Magda, SP. É formada em Ciências Biológicas pela Faculdade Educacional de Votuporanga em dezembro de 1993. Trabalha na rede Pública estadual, na área da Educação na Escola Estadual Manoel Bento da Cruz, onde ocupa o cargo de Professora de Educação Básica II, Titular de Cargo Efetivo da disciplina de Biologia e, na mesma área e disciplina, na rede particular no Colégio Salesiano Dom Luiz Lasagna, Município de Araçatuba-SP.

“Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo e pensar uma coisa diferente”.

(Roger Von Oech)

Dedico.....

Primeiramente a Deus....

ao meu orientador Prof. Marcelo,

meu Pai (in memoriam) e à minha Mãe,

pelas suas orações, sua compreensão e seu

carinho.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Araçatuba, pela viabilidade da realização do doutorado.

À Dra. Kathleen F. Grego, do Instituto Butantan, pela autorização para colheita das amostras utilizadas neste experimento.

Ao colega Philipp Ricardo S.O. Paiva, pelo auxílio e colheita das amostras utilizadas neste experimento.

Ao Prof. Adj. Marcelo Vasconcelos Meireles, do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, UNESP – Araçatuba, por ter me orientado e auxiliado em todos os momentos necessários. Pela paciência, respeito e generosidade e, principalmente, pela oportunidade de aprendizado.

À minha mãe, Nair, aos meus irmãos Dulci, Cláudia, Marta e Joel, e ao namorado Antônio, pela compreensão e incentivo.

Às professoras Cárís Maroni Nunes e Valéria Marçal Félix de Lima, do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, UNESP – Araçatuba e do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, UNESP – Araçatuba, pelas orientações e sugestões para esse trabalho.

À Profa. Kátia Denise Saraiva Bresciani, do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, UNESP – Araçatuba, pela atenção e confiança.

À Diretora Ruth das Neves Alves de Lima, à toda a equipe da Escola Estadual Manoel Bento da Cruz e ao Colégio Salesiano Dom Luiz Lasagna, pela compreensão e generosidade.

Aos colegas: Alex, Camila, Milena, Guilherme, Fernanda, Eduardo, Juliana e Kathlenn pela colaboração, amizade e momentos de descontração durante o experimento.

A todos os estagiários que participaram do experimento, com dedicação nas tarefas do laboratório.

Aos funcionários da Biblioteca da faculdade de Medicina Veterinária - UNESP, pela ajuda em pesquisas e na normalização deste trabalho.

À querida técnica do laboratório Juliana, pelo auxílio no preparo de reagentes e materiais utilizados neste experimento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro para realização deste projeto de pesquisa (processo nº 2007/54312-2).

E a todos aqueles que contribuíram e fizeram parte deste projeto. Obrigada.

SUMÁRIO

Página

CAPÍTULO I

1. Considerações gerais.....	18
1.1 Subordem Ophidia.....	18
1.2 Histórico de <i>Cryptosporidium</i>	19
1.2.1 Agente etiológico.....	21
1.2.2 Ciclo biológico.....	21
1.3 Infecção em répteis.....	24
1.3.1 Classificação das espécies de <i>Cryptosporidium</i> em répteis.....	24
1.4 Ocorrência em serpentes no Brasil.....	25
1.5 Espécies de <i>Cryptosporidium</i> em répteis.....	25
1.6 Patogenia, sinais clínicos e lesões macroscópicas e microscópicas....	27
1.7 Importância da criptosporidiose em serpentários.....	29
1.8 Importância da criptosporidiose de répteis em saúde pública.....	30
1.9 Diagnóstico de criptosporidiose.....	31
1.9.1 Visualização de oocistos e outros estágios evolutivos por métodos de concentração e coloração.....	31
1.9.2 Métodos imunológicos.....	32
1.9.3 Métodos moleculares.....	32
1.10 Objetivos.....	34
Referências.....	35

CAPÍTULO II

- 1- Artigo científico - Detecção de *Cryptosporidium serpentis* em amostras fecais de serpentes utilizando a PCR em tempo real.

Resumo.....	51
Abstract.....	53
Introdução.....	54
Materiais e Métodos.....	56
Resultados e Discussão.....	62
Conclusões.....	71
Referências.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COWP =	<i>Cryptosporidium</i> oocyst wall protein (proteína da parede do oocisto de <i>Cryptosporidium</i>)
Ct =	cycle threshold (ciclo limiar)
mg =	miligrama
DNA =	deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
EDTA =	ácido etileno diamino tetracético
ELISA =	enzyme-linked immunosorbent assay (ensaio imunoenzimático)
et al =	e colaboradores
fg =	femtograma
GP60 =	glicoproteína de 60kDa
HE =	hematoxilina-eosina
Hsp70 =	heat shock 70 kda protein (proteína do choque térmico resistente ao calor de 70kDa)
mL =	mililitro
mM =	milimolar
ng =	nanograma
nM =	nanomolar
OMS =	Organização Mundial da Saúde
pb =	pares de base
PCR =	polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)
pH =	potencial hidrogeniônico
RFLP =	<i>restriction fragment length polymorphism</i> (polimorfismo do comprimento dos fragmentos por enzimas de restrição)
RNA =	<i>ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
rRNA =	RNA ribossômico
SVS/MS =	Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde
TE =	tampão Tris-EDTA
μL =	microlitro
UV =	luz ultravioleta
nPCR =	<i>nested</i> PCR(reação em cadeia de polimerase)
IFD =	imunofluorescência direta

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- Figura 1 Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. (PUTIGNANI e MENCHELLA, 2010)..... 23

Capítulo II

- Figura 1 Curva de regressão padrão da amplificação por PCR em tempo real de diluições, na base 10, de 4ng a 40 fg de DNA de fragmento parcial de DNA do gene Hsp70 de *C. serpentis*..... 63
- Figura 2 Especificidade analítica da PCR em tempo real das amostras de DNA de *C. galli*, *C. andersoni*, *C. tyzzeri*, *C. parvum*, genótipo II de aves, *C. muris* e *C. serpentis*..... 65
- Figura 3 Determinação da sensibilidade analítica da PCR em tempo real para amplificação do gene Hsp70 nas diluições de 10^4 a 10^0 oocistos de *C. serpentis*..... 66

LISTA DE QUADROS

Capítulo I

Quadro 1	Espécies de <i>Cryptosporidium</i> descritas.....	20
----------	---	----

Capítulo II

Quadro 1	Espécies de serpentes utilizadas para colheita de amostras de fezes.....	57
Quadro 2	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR em tempo real para detecção de sequência do gene Hsp70 de <i>C. serpentis</i>	59
Quadro 3	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na <i>nested</i> PCR para amplificação de fragmentos do gene Hsp70 de <i>C. serpentis</i>	60
Quadro 4	Alinhamento dos <i>primers</i> específicos (117bp) para o gene Hsp70 de <i>C. serpentis</i> com sequências de <i>Cryptosporidium</i> geneticamente mais relacionadas a <i>C. serpentis</i>	68

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Tabela 1	Amostras fecais de serpentes positivas para <i>Cryptosporidium</i> spp. pela <i>nested</i> PCR ou positivas para <i>C. serpentis</i> de serpentes pela PCR em tempo real e identificação molecular da espécie.....	67
Tabela 2	Desempenho do PCR em tempo real considerando a <i>nested</i> PCR e sequenciamento como padrão ouro, para diagnóstico de infecção por <i>C. serpentis</i>	70

DETECÇÃO DE *Cryptosporidium serpentis* EM AMOSTRAS FECAIS DE SERPENTES UTILIZANDO A PCR EM TEMPO REAL

RESUMO - A infecção por *Cryptosporidium serpentis* é comum em répteis, em particular em serpentes, e é caracterizada por infecção crônica com presença de gastrite hipertrófica grave, que pode ser letal. Esta pesquisa teve como objetivo utilizar a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, tendo como alvo o gene da proteína do choque térmico (Hsp70), para detecção de *C. serpentis* em amostras fecais de serpentes, e determinar a sua especificidade e sensibilidade analíticas e epidemiológicas utilizando, como padrão ouro, a *nested* PCR para amplificação de fragmento parcial do gene da subunidade 18S do rRNA (18S rRNA) seguida de sequenciamento dos fragmentos amplificados (nPCR/S). A PCR em tempo real foi positiva para *C. serpentis* em 17 amostras (3,37%), enquanto a nPCR/S resultou em positividade para *C. serpentis* em 15 amostras (2,98%). A nPCR/S resultou em positividade para *Cryptosporidium* spp. em 60 amostras (11,98%). O sequenciamento dos fragmentos amplificados pela nPCR foi possível em 38 amostras e resultou na identificação de *Cryptosporidium tyzzeri*, *Cryptosporidium muris*, *Cryptosporidium varanii* e *C. serpentis*, em diversas espécies de serpentes. Os valores de sensibilidade e especificidade epidemiológicas da PCR em tempo real foram, respectivamente, 93,8% e 99,5%. Embora três amostras tenham apresentado positividade para *C. serpentis* apenas pela PCR em tempo real, e foram consideradas como resultado falso positivo na estimativa da especificidade e sensibilidade epidemiológicas, a análise da curva de dissociação indicou que essas amostras apresentaram a mesma temperatura de dissociação que as amostras de *C. serpentis*. Assim, concluiu-se que a PCR em tempo real, visando ao gene Hsp70 é um método sensível e específico para detecção de *C. serpentis* em amostras fecais de serpentes.

Palavras-Chave: *Cryptosporidium*, diagnóstico molecular, epidemiologia, répteis.

DETECTION OF *Cryptosporidium serpentis* in SNAKES FECAL SAMPLES USING REAL-TIME PCR

SUMMARY - *Cryptosporidium serpentis* infection is common in reptiles, especially snakes, and is characterized by chronic infection with severe hypertrophic gastritis, which can be lethal. This research aimed to use the real-time polymerase chain reaction (PCR) targeting the heat shock protein gene (Hsp70) for detection of *C. serpentis* in fecal samples of 503 snakes, and to determine its analytical and epidemiological specificity and sensitivity using, as a gold standard, the nested PCR targeting the 18S rRNA (18S rRNA) gene followed by sequencing of the amplified fragments (nPCR/S). The real-time PCR was positive for *C. serpentis* in 17 samples (3.37%), and nPCR/S resulted in positive results for *C. serpentis* in 15 samples (2.98%). It was also observed that the nPCR/S was positive for *Cryptosporidium* spp. in 60 samples (11.98%). Sequencing of the fragments amplified by nPCR was possible in 38 samples, and resulted in the identification of *Cryptosporidium tyzzeri*, *Cryptosporidium muris*, *Cryptosporidium varanii* and *C. serpentis* in several species of snakes. The sensitivity and specificity of real-time PCR were, respectively, 93.8% and 99.5%. Although three samples were positive for *C. serpentis* only by real-time PCR, and were considered as false positive results in the estimation of the epidemiological specificity and sensitivity, the melting curve analysis indicated that these samples had the same melting temperature of the *C. serpentis* samples. Thus, we conclude that real-time PCR targeting the gene Hsp70 is a sensitive and specific method for the detection of *C. serpentis* in fecal samples from snakes.

Keywords: *Cryptosporidium*, epidemiology, molecular diagnosis, reptiles.

CAPÍTULO I

1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Subordem Ophidia

Serpentes são animais vertebrados pertencentes à Classe Reptilia, Ordem Squamata e Subordem Ophidia (BELUCCI et al., 2008) e são distribuídas em dois grupos: as serpentes que não exibem os dentes inoculadores de veneno, ou seja, ainda que possuam o veneno, não apresentam a presa necessária para o injetar em suas vítimas e as peçonhentas, que se caracterizam pela produção de peçonha, proteína altamente complexa que é inserida na vítima por meio de presas inoculadoras de veneno (POUGH; JANIS; HEISER, 2003). Em geral, as serpentes são de extrema importância no meio ambiente, pois atuam como reguladores naturais dos ecossistemas, sendo também importantes em pesquisas em diversas áreas de estudo.

A fauna de serpentes no Brasil é composta por 375 espécies, referentes a 10 famílias (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA, 2012). Aproximadamente 15% são peçonhentas e pertencem à família Viperidae, com 28 espécies descritas, que são responsáveis pela maior quantidade de acidentes ofídicos no Brasil (*Bothrops*, *Lachesis* e *Crotalus*), e à família Elapidae, com 27 espécies descritas.

A classificação das serpentes é fundamental para identificação das espécies, principalmente as de importância médica. De acordo com o Ministério da Saúde, 75% dos acidentes ofídicos são ocasionados por serpentes da família Viperidae e somente 0,7% por serpentes da família Elapidae (BRASIL, 2012).

O Instituto Butantan, local de origem das amostras que foram cedidas para esta pesquisa, é um dos maiores centros de pesquisas biomédicas do mundo e abriga diversas coleções de serpentes; é responsável por mais de 93% do total de soros e vacinas produzidas no Brasil. Fundado em 1901, seu primeiro diretor foi o médico sanitarista Vital Brazil. A instituição desenvolve pesquisas na área de reprodução e manutenção de serpentes em cativeiro, incluindo estudos nas áreas de patologia, hematologia e parasitologia (GREGO, 2000).

1.2 Histórico de *Cryptosporidium*

Cryptosporidium são coccídios que completam seu ciclo biológico na superfície de células epiteliais dos tratos gastrointestinal, respiratório e urinário de mamíferos, aves, répteis e peixes (CHERMETTE; BOUFASSA-OUZROUT, 1988). Apresenta distribuição mundial e foram descritos primeiramente por TYZZER (1907) que denominou, como *Cryptosporidium muris*, um pequeno coccídio encontrado em glândulas gástricas de camundongos de laboratório. O mesmo autor, em 1912, observou outra espécie localizada no intestino delgado de camundongo; após infecção experimental, observou infecções isoladas no estômago e no intestino, e denominou o novo isolado como *Cryptosporidium parvum*.

A maioria das espécies de *Cryptosporidium* é morfologicamente semelhante, e a identificação da espécie só pode ser realizada utilizando técnicas moleculares. Até o momento, foram descritos vários genótipos e 26 espécies de *Cryptosporidium* (Quadro 1), em diversos hospedeiros. De acordo com Ren et al. (2012), *Cryptosporidium* spp. é amplamente diagnosticado em mamíferos, aves e em aproximadamente 80 espécies de répteis, inclusive serpentes.

Quadro1 - Espécies de *Cryptosporidium* atualmente descritas

Espécie	Hospedeiro	Bibliografia
<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 (ID)	Fayer et al. (2005)
<i>C. canis</i>	Caninos (ID)	Fayer et al. (2001)
<i>C. cuniculus</i>	Coelhos (D)	Robinson et al. (2010)
<i>C. fayeri</i>	Canguru vermelho (<i>Macropus rufus</i>)	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>	Várias espécies de aves (P)	Pavlásek (1999; 2001); Ryan et al. (2003)
<i>C. hominis</i>	Humanos (ID)	Morgan-Ryan et al. (2002)
<i>C. macropodum</i>	Canguru gigante (<i>Macropus giganteus</i>)	Power e Ryan (2008)
<i>C. meleagridis</i>	Várias espécies de 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>	Camundongo, bovinos, homem (ID)	Tyzzer (1912)
<i>C. ryanae</i>	Bovinos (D)	Fayer et al. (2008)
<i>C. saurophilum</i>	Lagartos (E, ID)	Koudela e Modrý (1998)
<i>C. serpentis</i>	Lagartos, serpentes (E)	Brownstein et al. (1977); Levine (1980); Tilley et al. (1990)
<i>C. scophthalmi</i>	Peixes (E, ID)	Alvarez-Pellitero et al. (2004)
<i>C. suis</i>	Suínos (ID, IG)	Ryan et al. (2004)
<i>C. tyzzeri</i>	Camundongos (ID)	Ren et al. (2012)
<i>C. ubiquitum</i>	Ruminantes, homem (ID)	Fayer et al. (2010)
<i>C. varanii*</i>	Monitor esmeralda (<i>Varanus prasinus</i>)	Pavlásek et al. (1995); Pavlásek e Ryan (2008)
<i>C. viatorum</i>	Humanos (D)	Elwin et al. (2012)
<i>C. wrairi</i>	Cobaio (<i>Cavia porcellus</i>) (ID)	Vetterling et al. (1971)
<i>C. xiaoi</i>	Ovinos (D)	Fayer e Santin (2009)

Principais sítios de infecção do parasito no hospedeiro: A-abomaso; B-bursa; C-cloaca; E-estômago; ID-intestino delgado; IG-intestino grosso; P-proventrículo ; TR-trato respiratório; *D-Desconhecido. *Em substituição a *C. saurophilum*. (Adaptado de XIAO; FAYER, 2008; PLUTZER; KARANIS, 2009 e REN et al., 2012).

1.2.1 Agente etiológico

Cryptosporidium é um coccídio pertencente ao Filo Apicomplexa, Classe Coccidea, Ordem Eucoccidiorida e Família Cryptosporidiidae (FAYER, 2008). São considerados parasitos intracelulares, porém extracitoplasmáticos, e completam seu ciclo biológico na superfície de células epiteliais dos tratos gastrointestinal, respiratório e urinário de mamíferos, aves, répteis e peixes (CHERMETTE; BOUFASSA-OUZROUT, 1988; CACCIO, 2005).

São monoxênicos e se distinguem de outros coccídios por apresentarem características próprias, como oocistos sem esporocistos e presença de quatro esporozoítos, além de auto-infecção (excistação de oocistos de parede fina) e oocistos (parede espessa) que são eliminados no ambiente. Há também a presença de um vacúolo parasitóforo (localização intracelular, porém extracitoplasmática), na superfície das microvilosidades de células epiteliais do intestino (BOROWSKI et al. 2008; WARD WANG; 2001).

Carreno et al. (1999), Barta e Thompson, (2006) e Kuo et al. (2008) identificaram, por meio de análise filogenética, que *Cryptosporidium*, em relação à sua taxionomia, está mais próximo da Classe Gregarinia do que da Classe Coccidea. Portanto, reforçando a teoria de Hijjawi et al. (2002, 2004) e Rosales et al. (2005) sobre a existência de estágios extracelulares no ciclo biológico de *Cryptosporidium andersoni* e sua multiplicação em meio de cultura livre de células. Além disso, Bull et al. (1998) citaram reatividade cruzada de anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium* com esporocistos do gênero *Monocystis*, em reação de imunofluorescência direta.

1.2.2 Ciclo biológico do *Cryptosporidium*

O ciclo de vida de *Cryptosporidium* possui seis estágios de desenvolvimento no hospedeiro e é muito semelhante ao de outros coccídios pertencentes à subordem Eimeriorina. O processo de infecção ocorre por meio

da excitação dos oocistos, merogonia, gametogonia, fertilização, formação da parede dos oocistos e esporogonia (SMITH; ROSE, 1998).

Conforme descrito na Figura 1, o ciclo biológico de *Cryptosporidium* inicia-se com eliminação de oocistos esporulados, por um hospedeiro infectado, geralmente em fezes ou em secreções respiratórias. O hospedeiro susceptível se infecta pela ingestão de oocistos, presentes na água, alimentos e, em menor escala, pela inalação de oocistos em suspensão (CURRENT et al., 1986; SMITH et al., 2007; SRÉTER; VARGA, 2000; XIAO et al., 2004; XIAO; FAYER, 2008).

Após ingestão de oocistos, ocorre sua excitação, com liberação de quatro esporozoítos, por meio de dissolução da sutura, e sua adesão à superfície de células epiteliais, onde serão englobados pelas microvilosidades, com formação de um vacúolo parasitóforo, onde irão se diferenciar em trofozoítos e iniciar um processo de reprodução assexuada (merogonia ou esquizogonia). Na reprodução assexuada, serão formados os esquizontes de primeira geração, com oito merozoítos, que podem sofrer desenvolvimento cíclico, dando origem a esquizontes de primeira geração ou então prosseguem no ciclo, com formação de esquizontes de segunda geração, contendo quatro merozoítos (CURRENT et al., 1986; SMITH et al., 2007; SRÉTER; VARGA, 2000; XIAO et al., 2004; XIAO; FAYER, 2008).

Cryptosporidium apresenta localização intracelular, todavia, extracitoplasmática, dentro de uma estrutura denominada vacúolo parasitóforo, que é formada por uma membrana derivada das microvilosidades da célula epitelial. A formação da “organela de alimentação”, resultante da fusão da parede do parasito com a membrana celular do hospedeiro, proporciona a captação de nutrientes do citoplasma da célula do hospedeiro (BOROWSKI et al., 2008).

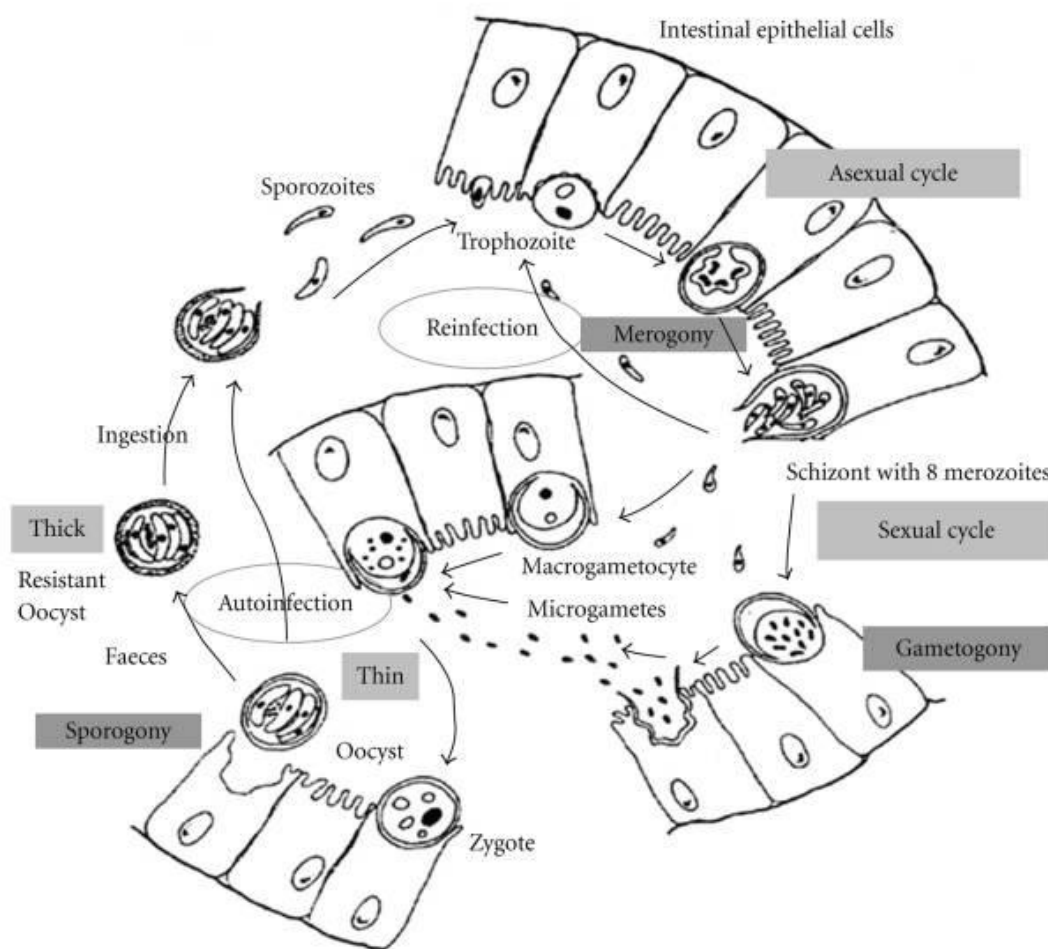


Figura 1. Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. (PUTIGNANI E MENCHELLA, 2010)

A parede dos oocistos é composta por três camadas, uma externa, de 5nm, formada por glicoproteínas ácidas e duas internas, uma de 10nm, composta por lipídeos complexos (glicolipídeos e lipoproteínas) e outra de 20 nm, provavelmente composta por glicoproteínas ácidas. Dois tipos de oocistos se formam: 80% têm parede espessa e são eliminados já infectantes, junto com as fezes; 20% são envolvidos apenas por uma membrana e se rompem na luz intestinal, determinando novo ciclo no mesmo hospedeiro (PETRY, 2004).

1.3 Infecção em Répteis

1.3.1 Classificação das espécies de *Cryptosporidium* em répteis

A criptosporidiose é uma enfermidade parasitária frequente em répteis, particularmente em serpentes, e geralmente apresenta curso crônico, com presença de gastrite e eventual mortalidade. A infecção por *Cryptosporidium* em serpentes é caracterizada por anorexia, regurgitação pós-prandial, letargia, aumento de volume na região gástrica e perda de peso (PEDRAZA-DÍAZ et al., 2009).

A infecção de *Cryptosporidium* em répteis foi relatada primeiramente por Brownstein et al. (1977) em 14 serpentes de três gêneros e quatro espécies (*Elaphe guttata*, *Elaphe subocularis*, *Crotalus horridus* e *Sansinia madagascarensis*) que apresentavam severa gastrite hipertrófica. Levine (1980), com base no hospedeiro infectado e nos relatos de Brownstein et al. (1977), denominou os isolados de serpentes como *C. serpentis*. Posteriormente, Koudela e Modry (1998) descreveram isolados de *Cryptosporidium saurophilum*, encontrados em 67 espécies de 220 lagartos de vida livre ou de cativeiro.

De acordo com Xiao et al., (2004a), há duas espécies de *Cryptosporidium* classificadas em répteis: *Cryptosporidium varanii* (em substituição a *Cryptosporidium saurophilum*) e *Cryptosporidium serpentis*. *C. serpentis* é um parasito gástrico, enquanto que *C. varanii* é um parasito de localização intestinal.

Há poucos relatos de infecção por *Cryptosporidium* sp. no epitélio intestinal de serpentes associada a evidências de enterite (BROWER e CRANFIELD, 2001; RICHTER et al, 2008). Oocistos de outras espécies que são ingeridos juntamente com os alimentos, tais como *C. muris*, *C. parvum* e *C. tyzzeri* não colonizam o epitélio gastrintestinal de serpentes.

1.4 Ocorrência em serpentes no Brasil

Até o momento há poucos relatos de infecção por *Cryptosporidium* em répteis no território brasileiro. No estado de São Paulo, Karasawa et al. (2002) registraram ocorrência de *Cryptosporidium* em serpentes (*Crotalus durissus terrificus*), em amostras fecais e de lavado intestinal de 50 animais. Posteriormente, encontraram oocistos em 14 animais, com eliminação intermitente de oocistos.

Na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, Sevá et al. (2011) relataram resultados positivos para *C. serpentis* em 16 (21,6%) animais presentes em 74 recintos, por meio de técnicas moleculares. Em apenas três serpentes (*Caudisona durissa*, *Lampropeltis mexicana* e *Epicrates crassus*) observaram enfermidade clínica, caracterizada por regurgitação e perda progressiva de peso.

Ruggiero et al. (2011) também descreveram *C. serpentis* por meio de técnicas moleculares, em 25 serpentes, de três diferentes espécies (*C. durissa*, *Bothropoides jararaca* e *Boa constrictor amarali*), mantidas no serpentário do Instituto Butantan de São Paulo. Nesse mesmo local, Paiva et al. (2013) relataram a presença de *C. serpentis* em várias espécies de serpentes, e observaram a presença de regurgitação, perda de peso progressiva, eliminação intermitente de oocistos e resposta imune humoral contra o parasito.

1.5 Espécies de *Cryptosporidium* em répteis

Em 1998, Koudela e Modry desenvolveram pesquisas com inoculação de oocistos de *Cryptosporidium* sp. de lagartos em cinco gêneros de lagartos, em serpentes, galinhas e camundongos, e observaram infecção somente em lagartos. Após realizarem análise morfométrica dos oocistos, do sítio de

infecção e de estudos de transmissão cruzada, a denominação *C. saurophilum* foi proposta para esse isolado.

Embora infecção por *C. saurophilum* seja a mais comum em lagartos, eles também são infectados por *C. serpentis*. Xiao et al. (2004a) realizaram PCR/RFLP tendo como alvo o gene da subunidade 18S do rRNA (18S rRNA), em 24 amostras de diversas espécies de lagartos, e observaram 10 animais parasitados por *C. serpentis*. De acordo com Xiao et al. (2002), várias espécies de *Cryptosporidium* podem ser detectadas em répteis. Upton et al. (1989) e O'Donoghue (1995) observaram pelo menos cinco morfotipos em répteis de cativeiro e selvagens e postularam que eles tem como origem a ingestão de oocistos de outras espécies presentes em presas ingeridas por esses animais, e que não colonizam o trato gastrintestinal de lagartos.

Em estudos com análise filogenética de sequência do gene 18S rRNA, Morgan et al. (1999) descreveram três genótipos distintos: um morfologicamente relacionado a *C. serpentis* mas, geneticamente, muito similar a *C. muris*; outro genótipo analisado em posição intermediária entre *C. serpentis* e *C. muris* e um genótipo classificado como genótipo camundongo, que é morfologicamente semelhante, mas geneticamente distinto de *C. parvum*.

Com base em técnicas moleculares, Xiao et al. (2004a) detectaram, em serpentes e lagartos, infecção por *C. serpentis* e por *Cryptosporidium* genótipo monitor do deserto, que anteriormente foi denominado como *C. saurophilum*. Nesse estudo, três isolados de *Cryptosporidium*, relatados em serpentes cativas, foram classificados como *C. muris* e *C. parvum* genótipo camundongo e *C. parvum* genótipo bovino, provavelmente originados de alimento ingerido por esses animais. Posteriormente, observaram quatro outros genótipos de *Cryptosporidium*: *Cryptosporidium* genótipo tartaruga, descritos em tartarugas terrestres, dois novos genótipos de serpentes e um novo genótipo de

Cryptosporidium em lagartos, todos geneticamente distintos, mas relacionados com *C. serpentis*.

De acordo com Xiao et al. (2004a), um isolado de *Cryptosporidium* foi detectado em um lagarto monitor na Nova Guiné, como nova espécie de *Cryptosporidium*: *C. varanii*, parasitando o epitélio intestinal de um lagarto monitor esmeralda (*Varanus prasinus*), principalmente em sua porção caudal. Em 2008, Pavlásek e Ryan consideraram essa espécie como válida, em substituição a *C. saurophilum*.

1.6 Patogenia, Sinais Clínicos e Lesões Macroscópicas e Microscópicas.

Em 2001, Brower e Cranfield observaram que, em serpentes, *Cryptosporidium* sp. é observado em região gástrica, mas os autores detectaram também algumas serpentes infectadas com *Cryptosporidium* sp., em localização restrita ao intestino. Da mesma forma, Xiao et al. (2002) descreveram, em quelônios, formas distintas de infecção por *Cryptosporidium* gástrico e intestinal. De acordo com O'Donoghue(1995) e Xiao et al. (2004b), geckos leopardo (*Eublepharis macularius*) pode apresentar criptosporidiose cloacal.

Em répteis, a criptosporidiose ocorre com maior frequência em serpentes adultas. O curso clínico nas serpentes é habitualmente demorado, não é auto-limitante, apresenta eliminação constante de oocistos e, quando infectadas, diversas serpentes manifestam doença gástrica crônica (CARMEL; GROVES, 1993; O'DONOGHUE, 1995)

Em serpentes, a criptosporidiose pode se revelar de forma clínica ou subclínica e a enfermidade pode se propagar rapidamente por toda a criação (ALVES et al., 2005). Determinadas espécies de serpentes, mesmo sem

manifestar sinais clínicos, podem desenvolver severa gastrite hipertrófica, com eliminação intermitente de oocistos que pode persistir por anos (GRACZYK; CRANFIELD, 1998)

Criptosporidiose em répteis, principalmente em serpentes, resulta em gastrite associada à anorexia, regurgitação pós-prandial, letargia, perda progressiva de peso e aumento de volume em região mediana do corpo, de consistência firme, que normalmente é fatal. Diferentemente do que ocorre em mamíferos, que geralmente manifestam enfermidade caracterizada por enterite aguda (GODSHALK et al., 1986; CARMEL; GROVES, 1993; O'DONOGHUE, 1995; CURRENT, 1999; RAMIREZ; 2004; XIAO et al., 2004b).

Em lagartos, a enfermidade resulta em anorexia, perda de peso, inchaço abdominal, letargia ou infecções gástricas subclínicas (DILLEHAY et al., 1986; O'DONOGHUE, 1995; CURRENT, 1999; RAMIREZ; 2004), podendo haver mortalidade (DILLEHAY et al., 1986; CURRENT, 1999; XIAO et al., 2004a). Já nos quelônios, foram observados sinais de gastrite e regurgitação (O'DONOGHUE, 1995; CURRENT, 1999).

Godshalk et al. (1986) e O'Donoghue (1995) relataram que *Cryptosporidium* induz à proliferação de células da mucosa gástrica, com atrofia de glândulas gástricas, excesso de secreção de muco, presença de petéquias, gastrite hiperplásica, acentuado aumento da espessura da parede estomacal e das pregas longitudinais, aumento do diâmetro do estômago e redução do lúmen gástrico.

Em diagnóstico histopatológico do estômago de serpentes, Godshalk et al. (1986) e O'Donoghue (1995) relataram a presença de inflamação, hiperplasia e hipertrofia das glândulas gástricas, edema da submucosa e lâmina própria, com infiltrado celular.

Cervený et al. (2012) relataram infecção por *C. serpentis*, por meio de

PCR convencional, em amostras fecais de diversas espécies de serpentes, após análise da mucosa gástrica por meio de histopatologia e imunofluorescência direta (IFD), e detectaram lesões histológicas graves no estômago e gastrite hipertrófica nesses animais.

1.7 Importância da criptosporidiose em serpentários

A infecção por *C. serpentis* apresenta importância fundamental para criadouros conservacionistas e comerciais e para centros de pesquisa, pois pode ser letal e resultar em sacrifício de toda a população existente no plantel. Isolados de mamíferos e aves não infectam serpentes, ao contrário do que ocorre com oocistos isolados de diversas espécies de répteis. Esta informação é de grande relevância para os centros herpetológicos e criadouros distintos, uma vez que alguns alojam uma ampla diversidade de répteis (CRANFIELD; GRACZYK, 1994; GRACZYK; CRANFIELD, 1998).

Devido à falta de um tratamento efetivo de criptosporidiose em serpentes, a infecção por *C. serpentis* normalmente resulta na eutanásia dos animais infectados. A ocorrência da enfermidade pode resultar em prejuízos inestimáveis, com perda de espécies raras. Desse modo, é necessário o controle da infecção em criatórios que visam à extração de peçonha para posterior liofilização ou produção de soros (CRANFIELD; GRACZYK, 2006).

No Brasil, o comércio de animais de estimação silvestres está se expandindo, especialmente o de serpentes e lagartos. O controle da criptosporidiose em criadouros comerciais é importante, porque a infecção por *Cryptosporidium* pode ser transmitida entre diferentes espécies de répteis e há perda principalmente de matrizes, uma vez que *Cryptosporidium* em répteis infecta, com maior frequência, animais adultos (CARMEL; GROVES, 1993; O'DONOGHUE, 1995; GRACZYK; CRANFIELD, 1998; XIAO et al., 2004; RAMIREZ; 2004).

Em cativeiro, o manejo é a principal medida profilática para evitar a disseminação da criptosporidiose. Os oocistos de *Cryptosporidium* são muito resistentes às condições ambientais, assim como à ação de diversos desinfetantes; da mesma forma, terapias com fármacos não são efetivas no tratamento (CARMEL; GROVES, 1993; GRACZYK; CRANFIELD, 1998; CRANFIELD; GRACZYK, 2006).

1.8 Importância da criptosporidiose de répteis em Saúde Pública

Embora ainda não haja comprovação de transmissão experimental de isolados de répteis para mamíferos, Carmel e Groves (1993) descreveram que as espécies de *Cryptosporidium* em répteis devem ser consideradas possivelmente patogênicas para humanos.

Fayer et al. (1995) relataram que, após transmissão experimental, isolados de *C. serpentis* de serpentes não foram infectantes para camundongos BALB/C. No entanto, o potencial zoonótico da criptosporidiose de répteis tem que ser estudado, uma vez que há poucos estudos de transmissão cruzada em mamíferos envolvendo amostras isoladas de répteis.

De acordo com Graczyk e Cranfield (1998) a detecção de infecção por *Cryptosporidium* em répteis é importante em termos de saúde pública, apesar da transmissão de *Cryptosporidium* de répteis para humanos ainda não ser confirmada. Porém, há possibilidade de contaminação do homem com outras espécies de *Cryptosporidium* que infectam o homem, devido à liberação da venda dos animais e ao maior contato com as pessoas.

Chen e Qiu (2012) observaram a presença de oocistos de *C. serpentis* em fezes de um bezerro que apresentava diarreia. Os oocistos obtidos de amostra fecal do bezerro foram então inoculados em camundongos de laboratório da linhagem BALB/c, imunocompetentes ou imunossuprimidos,

havendo o desenvolvimento de infecção gástrica e eliminação de oocistos em fezes, o que demonstra que *C. serpentis*, em algumas situações, pode infectar hospedeiros mamíferos.

1.9 Diagnóstico de criptosporidiose

1.9.1 Visualização de oocistos e outros estágios evolutivos por métodos de concentração e/ou coloração

O método de centrífugo-flutuação em solução de Sheather é o mais utilizado para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* a partir de amostras fecais, por apresentar custo mais baixo. Os oocistos são visualizados como estruturas brilhantes, contendo grânulos negros, em microscopia de contraste de fase, ou como estruturas translúcidas, com coloração levemente rósea e com grânulos em seu interior, em microscopia óptica de campo claro (SRÉTER; VARGA, 2000).

Há ainda outras técnicas que podem ser empregadas na detecção de oocistos de *Cryptosporidium*, como a coloração negativa com verde malaquita, na qual os oocistos são observados como estruturas brilhantes, envoltas por um fundo verde (ELLIOT et al., 1999), e a técnica de Kinyoun (álcool ácido resistente), em que os oocistos refletem coloração rósea a vermelha, contra um fundo verde (MA; SOAVE, 1983).

A visualização de *Cryptosporidium* em tecidos é realizada por meio de esfregaços de mucosas corados com a técnica de coloração de Kinyoun, que permite excelente visualização de estágios evolutivos de *Cryptosporidium* (LATIMER et al., 1988). A técnica mais utilizada para coloração de cortes histológicos é a hematoxilina-eosina (HE), na qual os estágios evolutivos são observados como corpos esféricos basófilos, de 2,0 - 7,5 µm, na superfície das células epiteliais. Em cortes histológicos, são empregadas as colorações à

base de prata, ácido periódico de Schiff e microscopia eletrônica, de transmissão ou de varredura, para visualização da morfologia ultra-estrutural do parasito (PETRY, 2004; VALIGUROVÁ et al., 2008).

1.9.2 Métodos Imunológicos

Os testes imunológicos para pesquisa de oocistos ou de antígenos solúveis, em fezes têm substituído a análise microscópica para diagnóstico de criptosporidiose (KHEL et al., 1995), pois apresentam melhor sensibilidade e especificidade que as técnicas tradicionais de coloração e reduzem o tempo para diagnóstico (ARROWOOD; STERLING, 1989; JOHNSTON et al., 2003).

Dentre os métodos imunológicos mais utilizados para diagnóstico de criptosporidiose encontram-se o ensaio imunoenzimático (ELISA) de captura (FAYER et al., 2000; JEX et al., 2008) e a imunofluorescência direta (IFD) (BIALEK et al., 2002; FAYER et al., 2000; JEX et al., 2008).

1.9.3 Métodos moleculares

As técnicas moleculares, como a reação em cadeia de polimerase (PCR), se caracterizam por alta sensibilidade e especificidade (BALATBAT et al., 1996; MORGAN; THOMPSON, 1998; JEX et al., 2008). 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.

Levando em consideração a baixa sensibilidade do diagnóstico por microscopia e a impossibilidade de diferenciação entre espécies pelos métodos imunológicos, as técnicas baseadas em técnicas moleculares, como a PCR,

seguida da análise do polimorfismo no comprimento de fragmentos de DNA, gerados por enzimas de restrição (RFLP), ou por sequenciamento dos fragmentos amplificados, são aquelas que permitem a diferenciação entre as diferentes espécies de *Cryptosporidium* (SARGENT et al., 1998; MORGAN et al., 1999a; SRÉTER; VARGA, 2000; JEX et al., 2008).

A caracterização molecular de *Cryptosporidium* geralmente é realizada por meio da PCR seguida da RFLP ou de sequenciamento dos fragmentos amplificados. O *locus* mais utilizado é o gene da subunidade 18S do rRNA. Esse *locus* apresenta cinco cópias por genoma e, pelo fato de caracterizar evolução mais lenta e menor polimorfismo, é 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 (Hsp70) (MORGAN et al., 1999b) e da proteína da parede de oocistos-COWP (XIAO et al., 2000a). Eles apresentam alto polimorfismo interespecies e, portanto, são muito importantes na análise genética de espécies ou genótipos geneticamente similares, como *Cryptosporidium baileyi* e *Cryptosporidium* sp. de avestruzes (XIAO et al., 2004).

Em relação à PCR, devido às variações do método de extração de DNA, do gene utilizado e do protocolo da reação, e à presença de inibidores da PCR, (CAREY et al., 2004), há relatos de resultados superiores (MORGAN et al., 1998b), similares (BIALEK, et al., 2002) ou inferiores (MAGI et al., 2006), quando esta técnica é comparada com métodos imunológicos ou de coloração.

A PCR em tempo real pode ser empregada como um método alternativo ao da PCR convencional com algumas vantagens, como o diagnóstico mais

rápido, a diminuição de possíveis contaminantes no laboratório (amplicons), a ausência de procedimentos após o término da PCR, como a eletroforese, e a possibilidade da visualização de resultados preliminares antes do término da reação.

Na literatura existem diversos relatos do uso da PCR em tempo real para diagnóstico ou diferenciação entre as espécies de *Cryptosporidium*, como *C. parvum* e *C. hominis*, em humanos (STROUP et al., 2006; JOTHIKUMAR et al., 2008). Utilizando PCR em tempo real, visando ao gene da actina para detecção de *C. parvum*, Homem et al. (2012) relataram positividade de 73,2% (153/209) para *C. parvum* em amostras fecais de bovinos; na PCR convencional, seguida de sequenciamento dos fragmentos amplificados, a positividade foi de 56,5% (118/209).

Lalonde et al. (2011) descreveram a identificação de *C. parvum* e *C. muris* em amostras fecais de humanos e de vários animais, por meio de PCR em tempo real e análise de curva de dissociação, e ressaltaram a importância dessa técnica para detecção rápida e confiável de *Cryptosporidium*.

Até o momento não foram encontradas informações na literatura sobre diagnóstico de criptosporidiose em répteis por meio da PCR em tempo real.

1.10 Objetivos

Este trabalho científico teve como objetivo padronizar a PCR em tempo real, tendo como alvo o gene Hsp70, para detecção de DNA de *C. serpentis* em amostras fecais de serpentes e analisar os atributos diagnósticos da PCR em tempo real quando comparada à *nested* PCR, para detecção de fragmento parcial do gene 18S rRNA.

Referências

- 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.
- ALVES M.; XIAO L.; LEMOS V.; ZHOU L.; CAMA V.; CUNHA M. B.; MATOS O.; ANTUNES F. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in mammals and reptiles at the Lisbon Zoo. **Parasitology Research** v. 97, p.108–112, 2005.
- 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.
- 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.

BELUCCI, M. P. et al. Acidentes ofídicos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano 6, n.10, jan. 2008.

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.

BOROWSKI, H.; CLODE, P.L.; THOMPSON, A.R.C. Active invasion and/or encapsulation? A reappraisal of host-cell parasitism by *Cryptosporidium*. **Trends in Parasitology**, v. 24 p.509-516, 2008.

BRASIL, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - MINISTÉRIO DA SAÚDE: Guia de Vigilância Epidemiológica: Acidentes Ofídicos. Disponível em :http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_aap.pdf f. Acesso em: 20 de jul. 2012.

BROWER, A.I.; CRANFIELD, M.R. *Cryptosporidium* sp. associated enteritis without gastritis in rough green snakes (*Opheodrys aestivus*) and a common garter snake (*Thamnophis sirtalis*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 32, p. 101-105, 2001.

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.

BULL, S.; CHALMERS, R.; STURDEE, A. P.; CURRY, A.; KENNAUGH, J. Cross-reaction of an anti-*Cryptosporidium* monoclonal antibody with sporocysts of *Monocystis* species. **Veterinary Parasitology**, v. 77, p.195-197, 1998.

CACCIÒ, S.M.; THOMPSON, R.C.A.; MCLAUCHLIN, J.; SMITH, H.V. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 430-437. 2005.

CAREY, C. M.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. **Water Research**, v. 38, p. 818-862, 2004.

CARMEL, B.P.; GROVES, V. Chronic cryptosporidiosis in Australian elapid snakes: control or an outbreak in captive colony. **Australian Veterinary Journal**, v. 70, p. 293-295, 1993.

CARRENO, R. A.; MARTIN, D. S.; BARTA, J. R. *Cryptosporidium* is more closely related to gregarines than to coccidian as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. **Parasitology Research**, v. 85, p. 899-904, 1999.

CERVENY S.N.; GARNER M.M.; D'AGOSTINO J.J.; Evaluation of gastroscopic biopsy for diagnosis of *Cryptosporidium* sp. infection in snakes. **Journal Zoo Wildlife Medicine**, v.43, p. 864-871, 2012.

CHEN, W.; HARP, J.A.; HARMSSEN, A.G. *Cryptosporidium parvum* infection in gene targeted B cell-deficient mice. **Journal of Parasitology**, v. 89, 391-393, 2003.

CHEN, F.; QIU, H. Identification and characterization of a Chinese isolate of *Cryptosporidium serpentis* from dairy cattle. **Parasitology Research**, v. 111, p. 1785-1791, 2012.

CHERMETTE, R., BOUFASSA-OUZROUT, S. Cryptosporidiosis: a

- Cosmopolitan Disease in Animals and in Man. 2. ed. p.122. Paris: OIE, 1988.
- CRANFIELD, M.R.; GRACZYK, T.K. Experimental Infection of Elaphid Snakes with *Cryptosporidium serpentis* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). **Parasitology**, v. 80, p. 823-826, 1994.
- CRANFIELD, M. R.; GRACZYK, T.K. Cryptosporidiosis. In: MADER, D.R. Reptile Medicine and Surgery, W. B. Saunders Elsevier, p. 756-762, 2006.
- 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.
- CURRENT, W.L. *Cryptosporidium* Species. In: FOWLER, M.E.; MILLER, R.E. Zoo and Wild Medicine Current Therapy. 4 ed., W.B. Saunders, Philadelphia, PA, p. 121-131, 1999.
- DILLEHAY, D.L.; BOOSINGER, T.R.; MacKENZIE, S. Gastric cryptosporidiosis in a chameleon. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 189, p. 1139-1140, 1986.
- 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.
- ELWIN, K.; HADFIELD, S.J.; ROBINSON, G.; CROUCH, N.D.; CHALMERS, R.M. *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007-2011. **International Journal for Parasitology**, v. 42, p. 675-682, 2012.
- FAYER, R.; GRACZYK, T.K.; CRANDFIELD, M.R. Multiple heterogeneous isolates of *Cryptosporidium serpentis* from captive snakes are not

transmissible to neonatal BALB/c mice (*Mus musculus*). **Journal of Parasitology**, v. 81, p. 482-484, 1995.

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

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

FAYER, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Experimental Parasitology**, v. 124, 90-97, 2010.

GODSHALK, C.P.; MacCOY, D.M.; PATTERSON, J.S.; McKIERNAN, B.C. Gastric hypertrophy associated with cryptosporidiosis in a snake. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 189, p. 1126-1128, 1986.

GRACZYK, T.; CRANFIELD, M.R. Experimental transmission of *Cryptosporidium* oocysts isolates from mammals, birds and reptiles to captive snakes. **Veterinary Research**, v. 29, p. 187-195, 1998.

GREGO, K.F., Patologia comparada das principais infecções parasitárias acometendo serpentes da espécie *Bothrops jararaca* (WIED, 1824), 2000, 155p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Patologia Experimental Comparada) **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo**, 2000.

HIJJAWI, N. S.; MELONI, B. P.; MORGAN, U. M.; OLSON, M. E.; THOMPSON, R. C. A. Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni* with evidence for the existence of novel extracellular stages in the *Cryptosporidium* life cycle. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 1719-1726, 2002.

HIJJAWI, N. S.; MELONI, B. P.; NG'ANZO, M.; RYAN, U. M.; OLSON, M. E.; COX, P. T.; MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. A. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 769-777, 2004.

HOMEM, C. G.; NAKAMURA, A. A.; SILVA, D. C.; TEIXEIRA, W. F.; COELHO, W. M.; MEIRELES, M. V. Real-time PCR assay targeting the actin gene for the detection of *Cryptosporidium parvum* in calf fecal samples. **Parasitology Research**, v. 110, p. 1741-1745, 2012.

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.

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.

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.

KARASAWA, A.S.M.; da SILVA, R.J.; MASCARINI, L.M.; BARRELLA, T.H.; LOPES, C.A.M. Occurrence of *Cryptosporidium* (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae) in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 779-781, 2002.

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.

KOUDELA, B.; MODRY D. New species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) from lizards. **Folia Parasitologica**, v. 40, p. 93-100, 1998.

KUO, C. H.; WARES, J. P.; KISSINGER, J. C. The apicomplexan whole genome phylogeny: an analysis of incongruence among gene trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, p. 2689-2698, 2008.

LALONDE L.F, GAJADHAR A.A. Detection and differentiation of coccidian oocysts by real-time PCR and melting curve analysis. **Journal Parasitology**, v. 97, p.725-30, 2011.

LATIMER, K. S.; GOODWIN, M. A.; DAVIS, M. K. Rapid cytologic diagnosis of respiratory cryptosporidiosis in chickens. **Avian Diseases**, v. 32, p. 826-830, 1988.

LEVINE, N.D. Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. **Journal of Parasitology**, v. 66, p. 830-834, 1980.

LIMOR, J. R.; LAL, A. A.; XIAO, L. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* parasites that are pathogenic for humans by Real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 2335-2338, 2002.

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

MA, P.; SOAVE, R. Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. **Journal of Infectious Diseases**, v. 147, p. 824-828, 1983.

MAGI, B.; CANOCCHI, V.; TORDINI, G.; CELLSEI, C.; BARBERI, A. *Cryptosporidium* infection: diagnostic techniques. **Parasitology Research**, v. 98, p. 150-152, 2006.

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.

MORGAN, U. M.; MONIS, P. T.; XIAO, L.; LIMOR, J.; SULAIMAN, I.; RAIDAL, S.; O'DONOGHUE, P.; GASSER, R.; MURRAY, A.; FAYER, R.; BLAGBURN, B. L.; LAL, A. A.; THOMPSON, R. C. A. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* from birds. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 289-296, 2001.

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

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, U. M.; 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.; PALLANT, L.; DWYER, B. W.; FORBES, D. A.; RICH, G.; THOMPSON, R. C. A. Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 995-998, 1998b.

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, 1733-1751, 1999a.

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.

O'DONOGHUE, P.J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. **International Journal for Parasitology**, v. 25, p. 139-195, 1995.

PAIVA, P.R.S.O.; GREGO, K.F.; LIMA, V.M.F.; NAKAMURA, A.A.; SILVA, D.C.; MEIRELES, M.V. Clinical, serological, and parasitological analysis of snakes naturally infected with *Cryptosporidium serpentis*. **Veterinary Parasitology**, v. 198, p. 54-61, 2013.

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

PAVLÁSEK, I. Findings of Cryptosporidia in the stomach of chickens and of exotic and wild birds. **Veterinarstvi**, v. 51, p. 103-108, 2001.

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

PAVLÁSEK, I.; RYAN, U. *Cryptosporidium varanii* takes precedence over *C. saurophilum*. **Experimental Parasitology**, v. 118, p. 434-437, 2008.

PEDRAZA-DÍAZ, S. et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pet reptiles. **Veterinary Parasitology**, v.160, p.204-210, 2009.

PETRY, F. Structural Analysis of *Cryptosporidium parvum*. **Microscopy and Microanalysis**, v. 10, p. 586-601, 2004.

PLUTZER, J.; KARANIS, P. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. **Veterinary Parasitology**, v.165, p. 187-199, 2009.

POUGH, F. H., JANIS, C. M. & HEISER, J. B. A vida dos vertebrados. Terceira Edição. Coord. Editorial: Ana Maria de Souza. São Paulo: Atheneu Editora. 2003.

POWER, M.; RYAN, U. *Cryptosporidium* macropodum n.sp (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern gray kangaroos *Macropus giganteus*. **Journal of Parasitology**, v. 94, p. 1114-1117, 2008.

PUTIGNANI L.; MENICHELLA D. Global Distribution, Public Health and Clinical Impact of the Protozoan Pathogen *Cryptosporidium*. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Disease** Article ID 753512, p.39, 2010 <http://dx.doi.org/10.1155/2010/753512>.

RAMIREZ, N.E.; WARD, L.A.; SREEVATSAN, S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. **Microbes and Infection**, v.6, p. 1-13, 2004.

REN X. ; ZHAO J. ; ZHANG L.; NING C.; JIAN F. ; WANG R.; LV C.; WANG Q.; ARROWOOD M. J.; Xiao L. *Cryptosporidium* tyzzeri n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). **Experimental Parasitology**, v. 130, p. 274–281, 2012.

RICHTER, B., KÜBBER-HEISS, A., WEISSENBOCK, H., SCHMIDT, P. Detection of *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba* spp. and *Monocercomonas* spp. in the gastrointestinal tract of snakes by in-situ hybridization. **Journal of Comparative Pathology**, v.138, p. 63–71, 2008.

RICHTER, B.; NEDOROST, N.; MADERNER, A.; WEISSENBOCK, H. Detection of *Cryptosporidium* species in feces or gastric contents from snakes and lizards as determined by polymerase chain reaction analysis and partial sequencing of the 18S ribosomal RNA gene. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, p. 430-435, 2011.

ROBINSON, G.; WRIGHT, S.; ELWIN, K.; HADFIELD, S. J.; KATZER, F. Redescription of *Cryptosporidium cuniculus* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Morphology, biology and phylogeny. **International Journal for Parasitology**, v.40, p. 1539–1548, 2010.

ROSALES, M. J.; PERÉZ CORDÓN, G.; SÁNCHEZ, M. Extracellular like-gregarine stages of *Cryptosporidium parvum*. **Acta Tropica**, v. 95, p. 74–78, 2005.

RUGGIERO, P. C.; ZACARIOTTI, R.L.; BONDAN, E. F.; LALLO, M.A. Prevalência de *Cryptosporidium serpentis* em serpentes de cativeiro. **Ciência Rural**, v.41, p. 1975-1978, 2011.

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.

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.

SEVÁ, A.P.; SERCUNDES, M.K.; MARTINS, J.; SOUZA, S.O.; CRUZ, J.B.; LISBOA, C.B.; CORREA, S.H.R.; SOARES, R.M. Occurrence and molecular diagnosis of *Cryptosporidium serpentis* in captive snakes in São Paulo, Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 42, p. 326-329, 2011.

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. B.; TAIT, A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 29-40, 2007.

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

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA. **Brazilian Reptiles – List of Species**. Disponível em: http://www.sbherpetologia.org.br/?page_id=629. Acesso em: 20 de jul. 2012.

SRÉTER, T.; KOVACS, G.; SILVA, A. J.; PIENIAZEK, N. J.; SZELL, Z.; DOBOS-KOVACS, M.; MARIALIGETI, K.; VARGA, I. Morphologic, host specificity, and molecular characterization of a Hungarian *Cryptosporidium meleagridis* isolate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 735-738, 2000.

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

STROUP, S. E.; ROY, S.; MCHELE, J.; MARO, V.; NTABAGUZI, S.; SIDDIQUE, A.; KANG, G.; GUERRANT, R. L.; KIRKPATRICK, B. D.; FAYER, R.; HERBEIN, J.; WARD, H.; HAQUE, R.; HOUP, E. R. Real-time PCR detection and speciation of *Cryptosporidium* infection using Scorpion probes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 1217-1222, 2006.

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.

TILLEY, M.; UPTON, S.J.; FREED, P. S. A comparative study of the biology of *Cryptosporidium serpentis* and *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 21, p. 463-467, 1990.

TYZZER, E.E. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. **Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine**, v. 5, p. 12-13, 1907.

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.

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

UPTON, S.J.; McALLISTER, C.T.; FREED, P.S.; BARNARD, S.M. *Cryptosporidium* spp. in wild and captive reptiles. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 25, p. 20-30, 1989.

VALIGUROVÁ, A.; JIRKŮ, M.; KOUDELA, B.; GELNAR, M.; MODRÝ, D.; ŠLAPETA, J. Cryptosporidia: Epicellular parasites embraced by the host cell membrane. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 913-922, 2008.

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.; 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.; LIMOR, J.; MORGAN, U. M.; SULAIMAN, I. M.; THOMPSON, R. C. A.; LAL, A. A. Sequence differences in the diagnostic target region of the oocysts wall protein gene of *Cryptosporidium* parasites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5499- 5502, 2000a.

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.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S. J. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n.1, p. 72-97, 2004.

XIAO, L.; RYAN, U.M.; GRACZYK, T.K.; LIMOR, J.; LI, L.; KOMBERT, M.; JUNGE, R.; SULAIMAN I. M.; ZHOU, L.; ARROWOOD, M.J.; KOUDELA, B.; MODRY, D.; LAL, A.A. Genetic Diversity of *Cryptosporidium* spp. in Captive Reptiles. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 891-899, 2004a.

XIAO, L., RYAN, U.M., GRACZYK, T.K., LIMOR, J., LI, L., KOMBERT, M., JUNGE, R., SULAIMAN, I.M., ZHOU, L., ARROWOOD, M.J., KOUDELA, B., MODRÝ, D., LAL, A.A. Genetic Diversity of *Cryptosporidium* spp. in captive reptiles. **Applied and Environmental Microbiology**. v.70, p. 891–899, 2004b.

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

WARD, L. A.; WANG, Y. Rapid methods to isolate *Cryptosporidium* DNA from frozen feces for PCR. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 41, p. 37-42, 2001.

Capítulo II - Artigo Científico

DETECÇÃO DE *Cryptosporidium serpentis* EM AMOSTRAS FECAIS DE SERPENTES UTILIZANDO A PCR EM TEMPO REAL

Deuvânia Carvalho da Silva¹, Philipp Ricardo Scaciotte de Oliveira², Alex Akira Nakamura¹, Camila Guariz Homem¹, Kathleen Fernandes Grego³; Marcelo Vasconcelos Meireles¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária, FMV/UNESP, Araçatuba, SP, Rua Clóvis Pestana, nº 793, CEP: 16050-680, Araçatuba, SP.; ²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ/USP, São Paulo, SP. ³Instituto Butantan, São Paulo, SP.

RESUMO – A infecção por *Cryptosporidium serpentis* é comum em répteis, em particular em serpentes, e é caracterizada por infecção crônica com presença de gastrite hipertrófica grave, que pode ser letal. Esta pesquisa teve como objetivo utilizar a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, tendo como alvo o gene da proteína do choque térmico (Hsp70), para detecção de *C. serpentis* em amostras fecais de 503 serpentes, e determinar a sua especificidade e sensibilidade analíticas e epidemiológicas utilizando, como padrão ouro, a *nested* PCR para amplificação de fragmento parcial do gene da subunidade 18S do rRNA (18S rRNA) seguida de sequenciamento dos fragmentos amplificados (nPCR/S). A PCR em tempo real foi positiva para *C. serpentis* em 17 amostras (3,37%), enquanto a nPCR/S resultou em positividade para *C. serpentis* em 15 amostras (2,98%). Foi observado ainda, que a nPCR/S resultou em positividade para *Cryptosporidium* spp. em 60 amostras (11,98%). O sequenciamento dos fragmentos amplificados pela nPCR foi possível em 38 amostras e resultou na identificação de *Cryptosporidium tyzzeri*, *Cryptosporidium muris*, *Cryptosporidium varanii* e *C.*

serpentis em diversas espécies de serpentes. Os valores de sensibilidade e especificidade epidemiológicas da PCR em tempo real foram, respectivamente, 93,8% e 99,5%. Embora três amostras tenham apresentado positividade para *C. serpentis* apenas pela PCR em tempo real, e foram consideradas como resultado falso positivo na estimativa da especificidade e sensibilidade epidemiológicas, a análise da curva de dissociação indicou que essas amostras apresentaram a mesma temperatura de dissociação que as amostras de *C. serpentis*. Assim, podemos concluir que a PCR em tempo real visando ao gene Hsp70 é um método sensível e específico para a detecção de *C. serpentis* em amostras fecais de serpentes.

Palavras-Chave: *Cryptosporidium*, diagnóstico molecular, epidemiologia, répteis.

DETECTION OF *Cryptosporidium serpentis* IN SNAKES FECAL SAMPLES USING REAL-TIME PCR

ABSTRACT - *Cryptosporidium serpentis* infection is common in reptiles, especially snakes, and is characterized by chronic infection with severe hypertrophic gastritis, which can be lethal. This research aimed to use the real-time polymerase chain reaction (PCR) targeting the heat shock protein (Hsp70) gene for detection of *C. serpentis* in fecal samples of 503 snakes, and to determine its analytical and epidemiological specificity and sensitivity using, as a gold standard, the nested PCR for amplification of partial fragment of the 18S subunit of rRNA (18S rRNA) gene followed by sequencing of the amplified fragments (nPCR/S). The real-time PCR was positive for *C. serpentis* in 17 samples (3.37%), and nPCR/S was positive for *C. serpentis* in 15 samples (2.98%). It was also observed that the nPCR/S resulted in positivity for *Cryptosporidium* spp. in 60 samples (11.98%). Sequencing of the amplified fragments by nPCR was possible in 38 samples and resulted in the identification of *Cryptosporidium tyzzeri*, *Cryptosporidium muris*, *Cryptosporidium varanii* and *C. serpentis* in several species of snakes. The epidemiological sensitivity and specificity of real-time PCR were, respectively, 93.8 % and 99.5 %. Although three samples were positive for *C. serpentis* only by real-time PCR, and were considered as false positive results in the estimation of the epidemiological specificity and sensitivity, the melting curve analysis indicated that these samples contained the same melting temperature of the *C. serpentis* samples. Thus, we conclude that real-time PCR targeting the Hsp70 gene is a sensitive and specific method for the detection of *C. serpentis* in fecal samples from snakes.

Keywords: *Cryptosporidium*, epidemiology, molecular diagnosis, reptiles.

Introdução

Cryptosporidium é um protozoário que pertence ao Filo Apicomplexa, e infecta anfíbios, aves, mamíferos e aproximadamente 80 espécies de répteis. Há duas espécies de *Cryptosporidium* consideradas válidas em répteis: *Cryptosporidium varanii* (em substituição a *Cryptosporidium saurophilum*), mais frequente em epitélio intestinal de lagartos, e *Cryptosporidium serpentis*, encontrado em epitélio gástrico de serpentes (PAVLASEK; RYAN, 2008; FAYER, 2010).

A infecção por *C. serpentis* é comum em serpentes, e se manifesta como gastrite hipertrófica crônica, com presença de anorexia, regurgitação pós-prandial, letargia e aumento de volume em região mediana do corpo (BROWNSTEIN et al., 1977; GODSHALK et al., 1986; CARMEL; GROVES, 1993; O'DONOGHUE, 1995).

A criptosporidiose é uma enfermidade de extrema importância em criadouros conservacionistas e comerciais, centros de pesquisa e coleções de serpentes (CRANFIELD; GRACZYK, 1994; GRACZYK; CRANFIELD, 1998). A falta de um tratamento efetivo para a criptosporidiose quase sempre resulta na eutanásia dos animais com o intuito de controlar a infecção no criatório, muitas vezes levando à perda de espécies importantes e raras do plantel (ALVES et al., 2005).

O diagnóstico de criptosporidiose em répteis pode ser realizado por métodos tradicionais, como pesquisa de oocistos em amostra fecais por microscopia, utilizando diversas técnicas de coloração. Entretanto, apesar de mais rápido e de baixo custo, o diagnóstico microscópico requer muita experiência, tempo e trabalho. Testes mais específicos podem ser utilizados, como o ensaio imuno-enzimático de captura, para detecção de antígenos solúveis de *Cryptosporidium* ou a imunofluorescência, para detecção de

oocistos em amostras fecais, porém, não permitem a definição da espécie do parasito (FAYER et al., 2000; JEX et al., 2008).

Os métodos que tem como princípio a classificação molecular, como a reação em cadeia da polimerase *nested* PCR, seguida de sequenciamento dos fragmentos amplificados (SPANO et al., 1998; XIAO et al., 2000) são os mais utilizados para detecção e classificação da espécie ou genótipo de *Cryptosporidium*. Dentre os métodos moleculares mais recentes, destaca-se a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, 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 (FONTAINE; GUILLOT, 2003; DE WAELE et al., 2011; MINAROVICOVÁ et al., 2009; HADFIELD et al. 2011).

Na literatura há diversos estudos sobre a utilização da PCR em tempo real para detecção de *Cryptosporidium*, principalmente *C. parvum* e *C. hominis* em humanos (STROUP et al., 2006; JOTHIKUMAR et al., 2008), porém, não há nenhum estudo sobre a detecção específica de *C. serpentis*.

O diagnóstico da criptosporidiose por PCR em tempo real pode ser direcionado para o gênero *Cryptosporidium* ou ser espécie-específico. Os genes alvo mais utilizados para detecção do gênero são os que codificam a subunidade 18S do gene do RNA ribossômico (18S rRNA), o gene da actina, a proteína da parede dos oocistos (COWP), a proteína CP11, a proteína do choque térmico (Hsp70) e o LIB3, que é um *locus* que codifica uma proteína de função desconhecida (DI GIOVANNI; LECHEVALLIER, 2005; GUY et al., 2003; HADFIELD et al., 2011; JOTHIKUMAR et al., 2008; LIMOR et al., 2002; SUNNOTEL et al., 2006).

Até o momento, não há informações na literatura sobre diagnóstico de criptosporidiose em répteis, por meio da PCR em tempo real. Este trabalho teve como objetivo padronizar a PCR em tempo real, tendo como alvo o gene Hsp70, para detecção de DNA de *C. serpentis*, em amostras fecais de

serpentes, e comparar seus resultados aos do teste utilizado como padrão ouro, a *nested* PCR tendo como alvo o gene 18S rRNA, seguida de sequenciamento dos fragmentos amplificados (nPCR/S).

Material e Métodos

Amostras de fezes

Foram utilizadas amostras fecais colhidas uma única vez, de forma individual, em 503 serpentes referentes a nove gêneros e 25 espécies alojadas no serpentário do Instituto Butantan, em São Paulo (Quadro 1). As amostras foram colhidas em frascos coletores universais e armazenadas em solução de bicromato de potássio 2,5% (concentração final), a 4°C, coadas utilizando-se peneiras descartáveis e submetidas à centrifugo-sedimentação em água/éter (MELONI; THOMPSON, 1996).

Uma alíquota de 200 mg do sedimento resultante do processo de purificação foi lavada com água deionizada/*tween* 20 (0,1%) e armazenada a -20° C, em um microtubo tipo eppendorf de 2 ml, para posterior extração do DNA genômico.

Classificação Molecular de *Cryptosporidium* spp.

A extração do DNA genômico de *Cryptosporidium* foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Silva et al. (2010). A *nested* PCR para amplificação de fragmento parcial do gene 18S rRNA (XIAO et al., 2000) de *Cryptosporidium* spp. foi realizada em todas as amostras. Em todas as reações foram incluídos o controle positivo (DNA de *C. parvum*) e o controle negativo (água ultrapura). O produto amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 2%, com coloração com brometo de etídio e visualização em luz UV.

Quadro 1- Espécies de serpentes utilizadas para colheita de amostras de fezes

Nome científico	Nome comum	Número de amostras
<i>Boa constrictor amarali</i>	Jiboia	32
<i>Boa constrictor constrictor</i>	Jiboia	9
<i>Bothrops alternatus</i>	Jararaca	14
<i>Bothrops atrox</i>	Jararaca	33
<i>Bothrops bilineatus</i>	Jararaca	1
<i>Bothrops erythromelas</i>	Jararaca	1
<i>Bothrops fonsecai</i>	Jararaca	4
<i>Bothrops insularis</i>	Jararaca	2
<i>Bothrops jararaca</i>	Jararaca	74
<i>Bothrops jararacussu</i>	Jararaca	35
<i>Bothrops leucurus</i>	Jararaca	17
<i>Bothrops matogrossensis</i>	Jararaca	11
<i>Bothrops moojeni</i>	Jararaca	35
<i>Bothrops neuwiedi</i>	Jararaca	45
<i>Bothrops pauloensis</i>	Jararaca	5
<i>Crotalus durissus collilineatus</i>	Cascavel	22
<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Cascavel	41
<i>Crotalus durissus vegrandis</i>	Cascavel	2
<i>Corallus hortulanus</i>	Suacuboia	1
<i>Epicrates cenchria cenchria</i>	Salamanta	16
<i>Eunectes notaeus</i>	Sucuri	1
<i>Micrurus corallinus</i>	coral verdadeira	1
<i>Oxyrhopus guibei</i>	coral falsa	2
<i>Pantherophis guttata</i>	Cobra do milho	96
<i>Python regius</i>	Pítton	1
	Total	503

A determinação da espécie de *Cryptosporidium* foi realizada por meio de sequenciamento dos fragmentos amplificados, após purificação utilizando o QIAquick Gel® Extraction kit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha), e submetidas ao sequenciamento no ABI PRISM® DyeTerminator 3,1 kit, em um seqüenciador ABI 3730XL automatizado (Applied Biosystems, Foster City, EUA), em duplicata e nas duas direções, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores da reação secundária.

As sequências consenso foram determinadas utilizando o software CodonCode Aligner v. 2.0.4 (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts, USA), considerando somente os nucleotídeos com qualidade acima de 20, e alinhadas com sequências homólogas publicadas no *GenBank*, utilizando o software Clustal X (THOMPSON et al., 1997) e o *Bioedit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999).

Reação em cadeia da polimerase em tempo real

A PCR em tempo real para amplificação de um fragmento de 117 pb do gene Hsp70 de *C. serpentis* foi realizada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores 5' GGAGATTAAGAACCTCATGTGAACGT 3' e 5' CACGGCTTATAGAGACAGAGTAATCAA 3', que foram elaborados com auxílio do programa Primer Express® versão 3.0 (Applied Biosystems). Foi realizada análise *in silico* para verificação da especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores utilizando o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Quadro 2).

Quadro 2- Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR em tempo real para detecção de sequência do gene Hsp70 de *C. serpentis*

Espécie	Oligonucleotídeos iniciadores	Posição*	Sequência 5' - 3'	Produto amplificado (pb)
<i>C. serpentis</i>	Senso	782 a 807	GGAGATTAAGAACCTCATGTGAACGT	117
	Anti-senso	872 a 898	CACGGCTTATAGAGACAGAGTAATCAA	

*Posição de anelamento no gene Hsp70 de *C. serpentis* (GenBank AF221541).

A reação foi padronizada por meio de determinação da curva de regressão padrão, utilizando como DNA um fragmento de 475 pb correspondente à sequência parcial do gene Hsp70 de *C. serpentis* (GenBank AF221541) (Quadro 3). O fragmento foi amplificado a partir de DNA genômico de *C. serpentis* por meio de *nested* PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores 5'GGATGCTGGTGCAATTGCTGG 3' e 5'ACCACGTGGAGCTGGTGGAA 3', para a reação primária, e 5'CGCCTGAACTGCAGCACCATA3' e 5'GGCAACAGCTGGTGATACACA 3' para a reação secundária, elaborados com utilização do software *Primer Blast*. Os fragmentos amplificados pela *nested* PCR foram purificados utilizando o QIAquick Gel® Extraction kit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha) e utilizados em diluições seriadas na base 10 (4ng a 40 fg) para determinação da curva de regressão padrão. Cada diluição foi testada em triplicata.

Quadro 3- Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na *nested* PCR para amplificação de fragmentos do gene Hsp70 de *C. serpentis*

Espécie	Oligonucleotídeos iniciadores	Posição*	Sequência 5' - 3'	Produto amplificado (pb)
<i>C. serpentis</i>	Oligonucleotídeo iniciador externos Senso/anti-senso	474 a 494 1391 a 1410	GGATGCTGGTGCAATTGCTGG ACCACGTGGAGCTGGTGGA	937
	Oligonucleotídeo iniciador internos Senso/anti-senso	657 a 677 1111 a 1131	CGCCTGAACTGCAGCACCATA GGCAACAGCTGGTGATACACA	475

*Posição de anelamento no gene Hsp70 de *C. serpentis* (GenBank AF221541) de serpentes.

Inicialmente foram realizados os testes de concentração dos oligonucleotídeos iniciadores e da temperatura de anelamento, e verificação do tamanho do fragmento amplificado, por meio de eletroforese em gel de agarose 3%. As condições ideais da reação foram estabelecidas como: preparação de 20 µL de solução contendo 10 µL de SsoFast™ EvaGreen® Supermix, 400 nM de cada oligonucleotídeo iniciador e 2 µL de DNA. O ciclo de amplificação consistiu em desnaturação inicial por 2 minutos a 98°C, seguida por 40 ciclos de 5 segundos a 98°C e 5 segundos a 60°C. Após o término da reação, os produtos amplificados foram submetidos a aumento na temperatura de 65 a 95°C, com variação de 0,2°C e leitura por 10 segundos, para análise da curva de dissociação.

Sensibilidade analítica da PCR em tempo real

O cálculo da sensibilidade analítica foi realizado com oocistos de *C. serpentis* isolados de amostras de fezes de cobra do milho (*Pantherophis guttatus*), quantificados em câmara de Neubauer (BENNETT et al., 1999) e diluídos de forma seriada para obtenção de aproximadamente 10^4 , 10^3 , 10^2 ,

10^1 e 10^0 oocistos em 2 μ L de uma solução de Chelex 100® 50% em TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8,0), com volume final de 200 μ L. Uma amostra não foi adicionada com oocistos de *C. serpentis*, para ser utilizada como controle. O DNA genômico dos oocistos foi extraído de acordo com protocolo de Di Giovanni e LeChevallier (2005).

Especificidade analítica da PCR em tempo real

Amostras de DNA genômico de *C. andersoni*, *C. galli*, *Cryptosporidium* genótipo II de aves, *C. muris*, *C. parvum* e *C. tyzzeri*, previamente identificadas e armazenadas no laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP, Campus de Araçatuba, foram testadas por meio da PCR em tempo real, em duplicata, para verificação da especificidade analítica da reação.

Sensibilidade e especificidade epidemiológicas e valores preditivos positivo e negativo da PCR em tempo real

A *nested* PCR para amplificação de fragmento do gene 18S rRNA foi utilizada como padrão ouro, e o cálculo da sensibilidade e especificidade epidemiológicas e dos valores preditivos positivo e negativo da PCR em tempo real foi realizado utilizando as fórmulas: sensibilidade= $a/(a+c) \times 100$; especificidade= $d/(b+d) \times 100$; VPP= valor preditivo positivo = $a/(a+b)$ e VPN= valor preditivo negativo= $d/(c+d)$, onde a= verdadeiro positivo, b= falso positivo, c= falso negativo e d= verdadeiro negativo.

Análise estatística

O índice de concordância entre os dois testes utilizados foi determinado pela pelo coeficiente Kappa, com intervalo de confiança de 95% (COHEN, 1960).

Resultados e Discussão

Neste trabalho, foi feita a opção pela amplificação do gene Hsp70, que apresenta alto polimorfismo entre diferentes espécies do parasito (SULAIMAN et al., 2000), e apresenta também um grande número de sequências publicadas no *GenBank*, o que permite a comparação das sequências entre as espécies e genótipos de *Cryptosporidium*.

A curva de regressão padrão da PCR em tempo real resultou em eficiência de 97,6%, R²: 0,99 e slope: - 3,38 (Figura 1). O fragmento de DNA de *C. serpentis* amplificado apresentou temperatura de dissociação de 75,8 a 76°C (Figura 2).

O teste da especificidade analítica revelou amplificação de DNA de *C. galli*, apesar de haver substituições de nucleotídeos na região de anelamento dos oligonucleotídeos senso (3) e antisenso (2) (Quadro 4). No entanto, é possível a diferenciação entre as duas espécies pela temperatura de dissociação de *C. galli* (77,5°C). O cálculo da sensibilidade analítica da PCR em tempo real revelou detecção de aproximadamente 10 oocistos de *C. serpentis* (Figura 3). Homem et al. (2012) detectaram resultados semelhantes com a PCR em tempo real, tendo como alvo o gene da actina, para detecção de *C. parvum* em amostras fecais de bezerros.

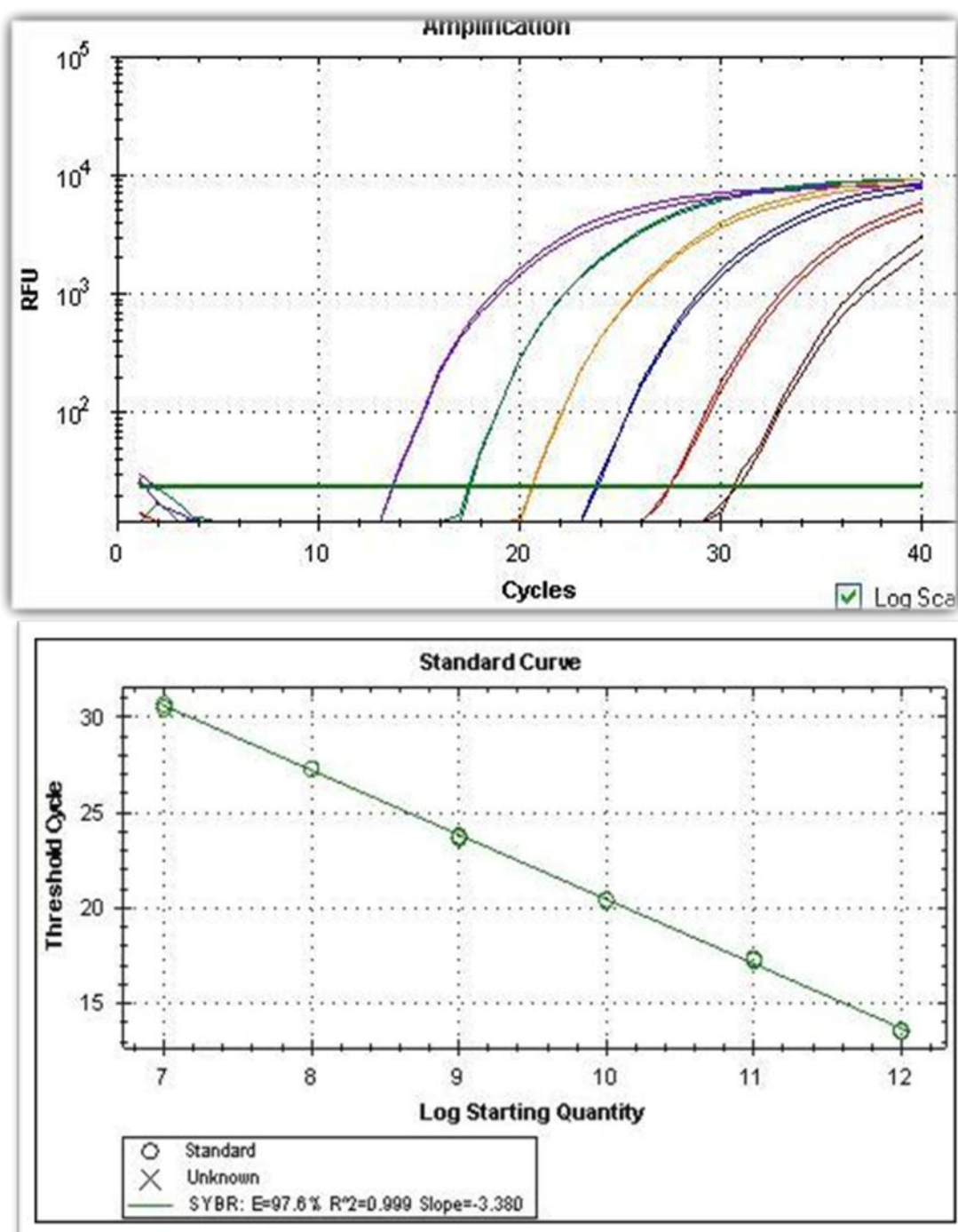


Figura 1. Curva de regressão padrão da amplificação por PCR em tempo real de diluições, na base 10, de 4ng a 40 fg de DNA de fragmento parcial de DNA do gene Hsp70 de *C. serpensis*.

A PCR em tempo real foi positiva para *C. serpentis* em 17 amostras (3,37%), com ciclo limiar médio (Ct) de 22,04, e os valores mínimo e máximo de Ct foram 13,60 e 30,48, respectivamente. A nPCR/S resultou em positividade para *C. serpentis* em 15 amostras (2,98%) (Tabela 1).

Pela nPCR/S foi observada positividade para *Cryptosporidium* spp. em 60 (11,98%) amostras (Tabela 1). O seqüenciamento dos fragmentos amplificados pela nPCR foi possível em 38 amostras e resultou na identificação de *C. tyzzeri* em *Bothrops jararaca* (2), *Bothrops neuwiedi* (3), *Crotalus durissus terrificus* (1) e *Crotalus durissus collilineatus* (1); *C. muris* em *B. jararaca* (2); *Bothrops erythromelas* (1) e *P. guttatus* (1), *C. varanii* em *Bothrops matogrossensis* (1), *Eunectes notaeus* (1) e *P. guttatus* (10) e *C. serpentis* em *P. guttatus* (13), *Epicrates cenchria cenchria* (1) e *Boa constrictor constrictor* (1) (Tabela 1). Cervený et al., 2012 descreveram resultados semelhantes com amplificação de *C. serpentis* em diversas espécies de serpentes por meio do PCR convencional, após o diagnóstico de biópsia gástrica.

A PCR em tempo real apresentou 93,84% de sensibilidade epidemiológica e 99,5% de especificidade epidemiológica, e o índice Kappa foi de 0,871, considerado muito bom (Tabela 2). A PCR em tempo real geralmente apresenta maior sensibilidade quando comparada à nPCR (YANG et al., 2009; DE WAELE et al., 2011; HOMEM et al., 2012). Embora três amostras tenham apresentado positividade para *C. serpentis* apenas pela PCR em tempo real, e foram consideradas como resultado falso positivo na estimativa da especificidade e sensibilidade epidemiológicas, a análise da curva de dissociação indicou que essas amostras apresentaram a mesma temperatura de dissociação que as amostras de *C. serpentis*.

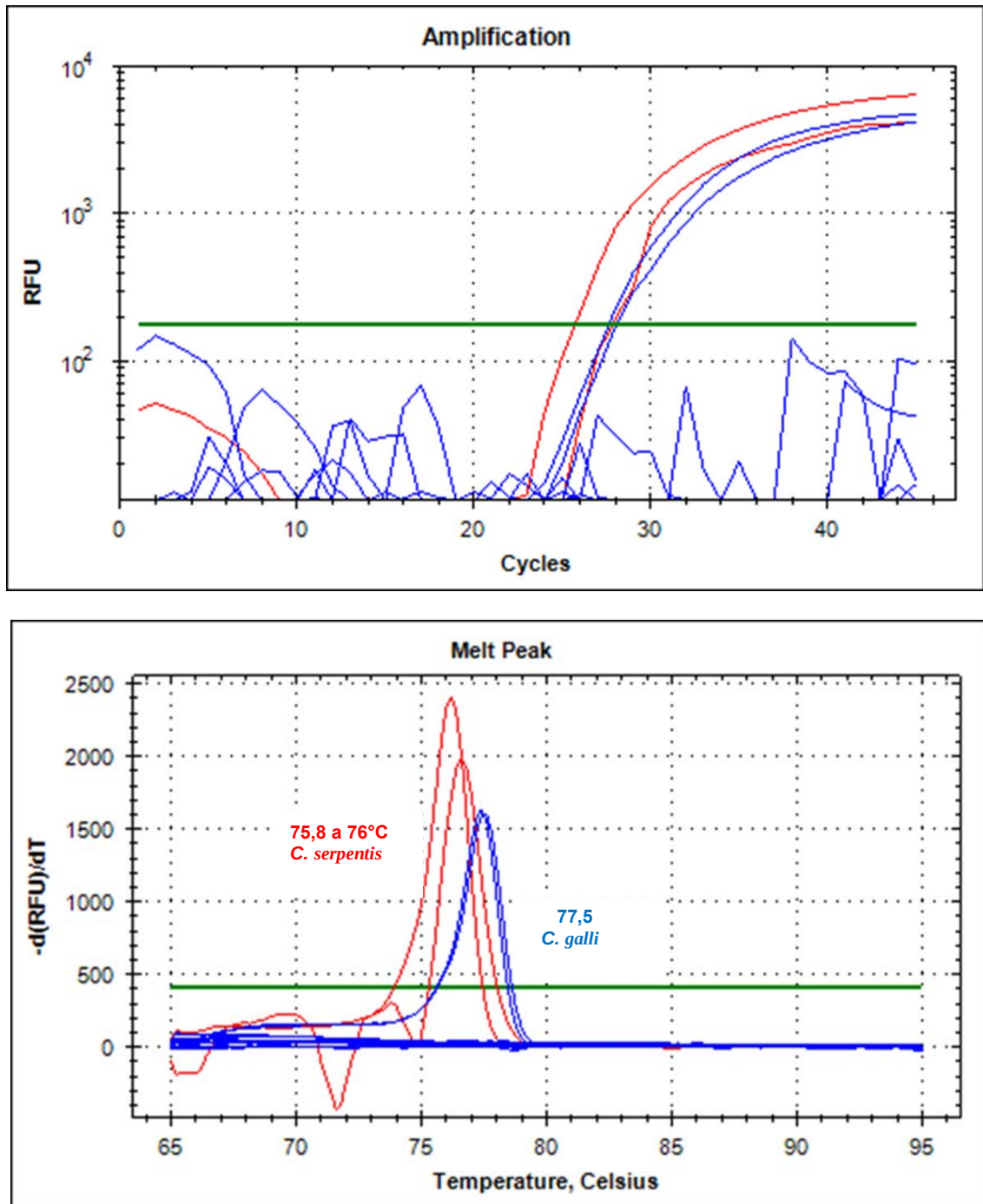


Figura 2. Especificidade analítica das amostras de DNA de *C. galli*, *C. andersoni*, *C. tyzzeri*, *C. parvum*, genótipo II de aves, *C. muris* e *C. serpentis*.

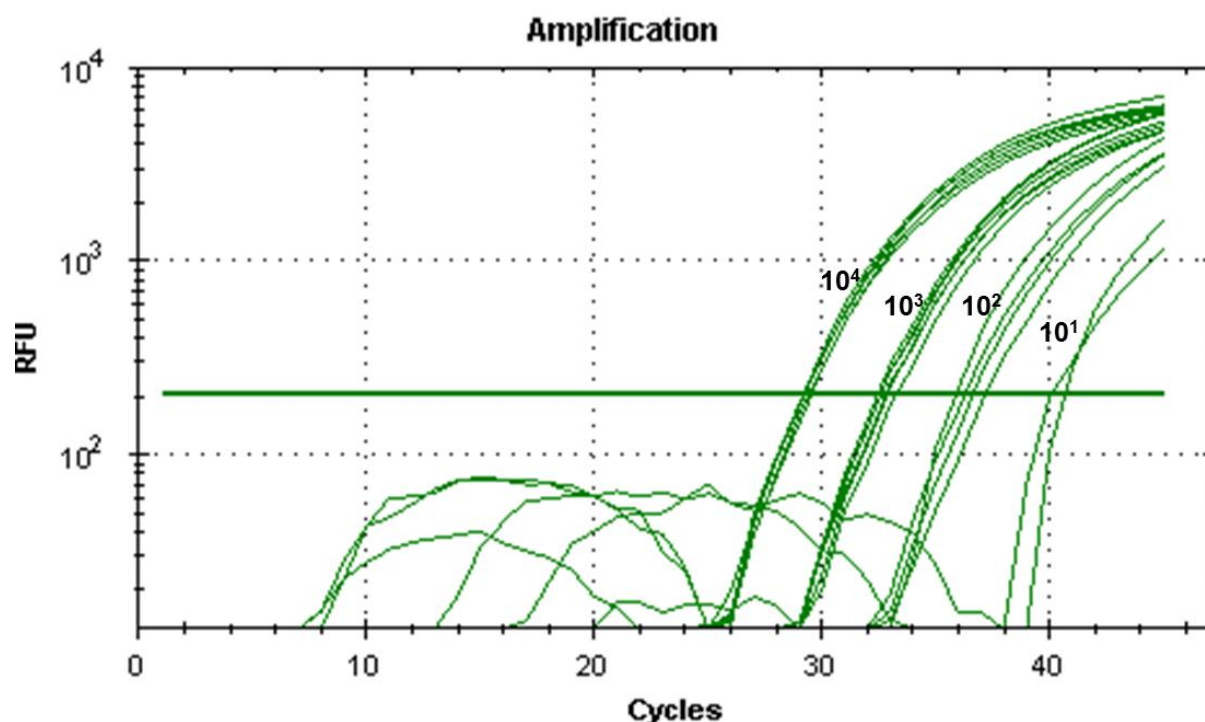


Figura 3. Determinação da sensibilidade analítica da PCR em tempo real para amplificação do gene Hsp70 nas diluições de 10^4 a 10^0 oocistos de *C. serpentis*.

Pela nPCR/S, *C. muris* e *C. tyzzeri* foi detectado nas serpentes dos gêneros *Crotalus* e *Bothrops* e provavelmente são originados dos roedores utilizados como alimentação, não colonizam o epitélio gastrointestinal de serpentes e são eliminados de forma passiva, em fezes (KARASAWA et al., 2002). Também foi observada positividade para *C. varanii*, espécie pouco estudada em serpentes, mas que já foi encontrada em diversas espécies de serpentes (PAVLASEK; RYAN, 2008; RICHTER et al., 2011) (Tabela 1), e foi também relacionada à ocorrência de diarreia e regurgitação pós-prandial persistente em *Elaphe guttata guttata* (PLUTZER; KARANIS, 2007).

Tabela 1. Amostras fecais de serpentes positivas para *Cryptosporidium* spp. pela *nested* PCR ou positivas para *C. serpentis* de serpentes pela PCR em tempo real e identificação molecular da espécie

Nome científico	Nome comum	Nested-PCR e PCR em tempo real			
		Número de amostras positivas/total de amostras colhidas por espécie de serpente (%)	Nested-PCR (<i>Cryptosporidium</i> spp.)	PCR em tempo real (<i>C. serpentis</i>)	Sequenciamento dos fragmentos da <i>nested</i> - PCR
<i>Boa constrictor amarali</i>	Jiboia	0/32	-	-	—
<i>Boa constrictor constrictor</i>	Jiboia	1/9 (11.1)	1	1	<i>C. serpentis</i>
<i>Bothrops alternatus</i>	Jararaca	2/14 (14.28)	2	—	nd*
<i>Bothrops atrox</i>	Jararaca	0/33	—	—	—
<i>Bothrops bilineatus</i>	Jararaca	0/1	—	—	—
<i>Bothrops erythromelas</i>	Jararaca	1/1 (100)	1	—	<i>C. muris</i>
<i>Bothrops fonsecai</i>	Jararaca	0/4	—	—	—
<i>Bothrops insularis</i>	Jararaca	1/2 (50)	1	—	nd*
<i>Bothrops jararaca</i>	Jararaca	7/74 (9.45)	7	—	<i>C. tyzzeri</i> (2), <i>C. muris</i> (2), nd* (3)
<i>Bothrops jararacussu</i>	Jararaca	4/35 (11.42)	4	1	nd*
<i>Bothrops leucurus</i>	Jararaca	2/17 (11.76)	2	—	nd*
<i>Bothrops matogrossensis</i>	Jararaca	1/11 (9.09)	1	—	<i>C. varanii</i>
<i>Bothrops moojeni</i>	Jararaca	3/35 (8.57)	3	—	nd*
<i>Bothrops neuwiedi</i>	Jararaca	4/45 (8.88)	4	—	<i>C. tyzzeri</i> (3), nd* (1)
<i>Bothrops pauloensis</i>	Jararaca	0/5	—	—	—
<i>Crotalus durissus collilineatus</i>	Cascavel	3/22 (13.63)	3	—	<i>C. tyzzeri</i> (1), nd* (2)
<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Cascavel	1/41 (2.4)	1	—	<i>C. tyzzeri</i> (1)
<i>Crotalus durissus vegrandis</i>	Cascavel	0/2	—	—	—
<i>Corallus hortulanus</i>	Suacuboia	0/1	—	—	—
<i>Epicrates cenchria cenchria</i>	Salamanta	1/16 (6.25)	1	1	<i>C. serpentis</i>
<i>Eunectes notaeus</i>	Sucuri	1/1 (100)	1	—	<i>C. varanii</i>
<i>Micrurus corallinus</i>	coral verdadeira	0/1	—	—	—
<i>Oxyrhopus guibei</i>	coral falsa	0/2	—	—	—
<i>Pantherophis guttata</i>	Cobra do milho	28/96 (29.16)	28	14	<i>C. muris</i> (1), <i>C. serpentis</i> (13), <i>C. varanii</i> (10), nd* (3), nr** (1)
<i>Python regius</i>	Pítton	0/1	—	—	—
Total		60/503 (11,92)	60	17	

**nr: amostra positiva pela nested PCR e negativa pela PCR em tempo real. A espécie não foi identificada

*nd: A espécie não foi identificada por sequenciamento devido à pequena quantidade de DNA amplificado pela nested PCR.

Quadro 4- Alinhamento dos *primers* específicos para o gene Hsp70 de *C. serpentis* com sequências de *Cryptosporidium* geneticamente mais relacionadas a *C. serpentis*.

Espécie ou Genótipo de <i>Cryptosporidium</i>	Identificação das Sequências no GenBank	Alinhamento das Sequências					
		785	795	805	815	825	835
							
<i>C. serpentis</i> ¹	AF221541	AGGAGATTAAGAACCTCATGTGAACGT	GCAAAGAGAACACTTTCTTCATCTACACAAGCA				
<i>C. muris</i> ²	AF221543	..A.....CAG.....					
<i>C. galli</i> ²	AY168849	..A.....CA.....G.....C.....					
<i>C. andersoni</i> ²	FJ463198	..A.....CAG.....					
<i>C. genótipo III</i> de aves ²	AB471664	CA.....A.....C.....					
		845	855	865	875	885	895
							
<i>C. serpentis</i> ¹	AF221541	ACAATTGAATTGGATTCTTTATTTGAAGGTATTGATTACTCTGTCTCTATAAGCCGTGC					
<i>C. muris</i> ²	AF221543	C.....G..C.....C....T...A.....T.....					
<i>C. galli</i> ²	AY168849	...G.....C.....T.....T.....					
<i>C. andersoni</i> ²	FJ463198	C.....G..C.....C....T...A.....T.....					
<i>C. genótipo III</i> de aves ²	AB471664	...G.....A.TA.....T.....					

Três amostras foram positivas para *C. serpentis* apenas pela PCR em tempo real, e foram consideradas como resultado falso positivo para determinação da especificidade e sensibilidade epidemiológicas, utilizando como padrão ouro a nPCR/S (Tabela 2). No entanto, a análise da curva de dissociação do fragmento amplificado a partir dessas amostras indicou temperatura de dissociação idêntica às das amostras de *C. serpentis*, o que demonstra que elas correspondem a resultados verdadeiros positivos, e que a PCR em tempo real na realidade apresentou sensibilidade epidemiológica superior à nPCR.

Durante o curso da infecção por *C. serpentis* são comuns a intermitência e variação na quantidade de oocistos eliminados em amostras fecais (GRACZYK et al., 1996b; GRACZYK; CRANFIELD, 1996; KARASAWA et al., 2002; SEVÁ et al., 2011, PAIVA et al., 2013), tanto em animais sintomáticos, como assintomáticos, o que dificulta o diagnóstico microscópico e resulta em diagnóstico falso-negativo, o que reforça a necessidade de desenvolvimento de técnicas mais sensíveis para diagnóstico de criptosporidiose em serpentes (GRACZYK; CRANFIELD, 1998).

As espécies de *Cryptosporidium* presentes em fezes só podem ser determinadas por técnicas de biologia molecular, sendo que a mais utilizada é a nPCR/S, que apresenta como desvantagens o fato de ser realizada em duas etapas (PCR e nPCR), a necessidade de realização de eletroforese, de purificação do fragmento amplificado e sequenciamento para identificação da espécie de *Cryptosporidium*. A PCR em tempo real desenvolvida neste trabalho, por suas características de alta sensibilidade e especificidade, representa uma alternativa rápida e específica para o diagnóstico de infecção por *C. serpentis* em amostras fecais.

Tabela 2. Desempenho do PCR em tempo real, considerando a *nested* PCR e sequenciamento como padrão ouro para diagnóstico de infecção por *C. serpentis*

		Nested PCR e sequenciamento		Total
		Positivo	Negativo	
PCR em tempo real	Positivo	14	3	17
	Negativo	1	485	486
	Total	15	488	503
	Sensibilidade/IC*	93,84% (58,97 a 93,91%)	-	-
	Especificidade/IC*	-	99,50% (98,84 a 99,96%)	-
	VPP/IC*	82,35% (70,18 a 98,81%)	-	-
	VPN/IC*	-	99,79% (98,21 a 99,79%)	-

*IC- Intervalo de confiança, VPP- Valor preditivo positivo, VPN- Valor preditivo negativo

CONCLUSÕES

A PCR em tempo real visando à amplificação de um fragmento parcial do gene Hsp70, quando comparada à *nested* PCR para amplificação de fragmento parcial do gene 18S rRNA seguida de sequenciamento do fragmento amplificado, demonstrou ser uma técnica com características de alta sensibilidade e especificidade analíticas e epidemiológicas, para diagnóstico da infecção por *C. serpentis*.

REFERÊNCIAS

ALVES M.; XIAO L.; LEMOS V.; ZHOU L.; CAMA V.; CUNHA M. B.; MATOS O.; ANTUNES F. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in mammals and reptiles at the Lisbon Zoo. **Parasitology Research**, v. 97, p.108-112, 2005.

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.

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.

CARMEL, B.P.; GROVES, V. Chronic cryptosporidiosis in Australian elapid snakes: control or an outbreak in captive colony. **Australian Veterinary Journal**, v. 70, p. 293-295, 1993.

CERVENY S.N.,; GARNER M.M.,; D'AGOSTINO J.J.; Evaluation of gastroscopic biopsy for diagnosis of *Cryptosporidium* sp. infection in snakes. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**; v.43 p. 864-71, 2012.

COHEN, J. A coeficient of agreement for nominal scales. **Education and Psychological Measurement**, v. 20, p. 37-46, 1960.

CRANFIELD, M.R., GRACZYK, T.K. Experimental infection of elapid snakes with *Cryptosporidium serpentis* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). **Parasitology** v. 80, 823–826. 1994.

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, n.3, p.1495- 1500, 2005.

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

FAYER, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Experimental Parasitology**, v. 124, 90-97, 2010.

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.

GODSHALK, C.P.; MacCOY, D.M.; PATTERSON, J.S.; McKIERNAN, B.C. Gastric hypertrophy associated with cryptosporidiosis in a snake. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 189, p. 1126-1128, 1986.

GRACZYK, T.K., CRANFIELD, M.R. Assessment of the conventional detection of fecal *Cryptosporidium serpentis* oocysts in subclinically 253 infected captive snakes. **Veterinary Research**, v. 27, 185-192, 1996.

GRACZYK, T.K., OWENS, R., CRANFIELD, M.R. Diagnosis of subclinical cryptosporidiosis in captive snakes based on stomach lavage and cloacal sampling. **Veterinary Parasitology**, v. 67, 143-151. 1996b.

GRACZYK T.K, CRANFIELD M.R. Experimental transmission of *Cryptosporidium* oocyst isolates from mammals, birds and reptiles to captive snakes. **Veterinary Research**, v. 29, p. 187-195, 1998.

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.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HOMEM, C. G.; NAKAMURA, A. A.; SILVA, D. C.; TEIXEIRA, W. F.; COELHO, W. M.; MEIRELES, M. V. Real-time PCR assay targeting the actin gene for the detection of *Cryptosporidium parvum* in calf fecal samples. **Parasitology Research**, v. 110, p. 1741-1745, 2012.

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.

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.

KARASAWA, A.S.M.; da SILVA, R.J.; MASCARINI, L.M.; BARRELLA, T.H.; LOPES, C.A.M. Occurrence of *Cryptosporidium* (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae) in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 779-781, 2002.

LIMOR, J. R.; LAL, A. A.; XIAO, L. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* parasites that are pathogenic for humans by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n.7, p. 2335-2338, 2002.

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.; KACLÍKOVA, E., KRASCENICSOVÁ, K.; SIEKEL, P.; KUCHTA, 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.

O'DONOGHUE, P.J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. **International Journal for Parasitology**, v. 25, p. 139-195, 1995.

PAIVA, P.R.S.O.; GREGO, K. F.; LIMA, V.M.F.; NAKAMURA, A.A.; SILVA, D.C.; MEIRELES, M.V. Clinical, serological, and parasitological analysis of snakes naturally infected with *Cryptosporidium serpentis*. **Veterinary Parasitology**, v. 198, p. 54-61, 2013.

PAVLASEK, I.; RYAN, U. *Cryptosporidium varanii* takes precedence over *C. saurophilum*. **Experimental Parasitology**, v. 118, p. 434-437, 2008.

PLUTZER, J.; KARANIS, P. Molecular identification of a *Cryptosporidium saurophilum* from corn snake (*Elaphe guttata guttata*). **Parasitology Research**, v. 101, p. 1141-1145, 2007.

RICHTER, B.; NEDOROST, N.; MADERNER, A.; WEISSENBOCK, H. Detection of *Cryptosporidium* species in feces or gastric contents from snakes and lizards as determined by polymerase chain reaction analysis and partial sequencing of the 18S ribosomal RNA gene. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, p. 430-435, 2011.

SEVÁ, A.P.; SERCUNDES, M.K.; MARTINS, J.; SOUZA, S.O.; CRUZ, J.B.; LISBOA, C.B.; CORREA, S.H.R.; SOARES, R.M. Occurrence and molecular diagnosis of *Cryptosporidium serpentis* in captive snakes in São Paulo, Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 42, p. 326-329, 2011.

SILVA, D.C.; HOMEM, C.G.; NAKAMURA, A.A.; TEIXEIRA, W.F.P.; PERRI, S.H.; MEIRELES, M.V. Physical, epidemiological, and molecular evaluation of infection by *Cryptosporidium galli* in Passeriformes. **Parasitology Research**, v. 107, p. 271-277, 2010.

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, n. 11, p. 3255-3259, 1998.

STROUP, S.E.; ROY, S.; MCHELE, J.; MARO, V.; NTABAGUZI, S.; SIDDIQUE, A.; KANG, G.; GUERRANT, R.L.; KIRKPATRICK, B.D.; FAYER,

R.; HERBEIN, J.; WARD, H.; HAQUE, R.; HOUP, E.R. Real-time PCR detection and speciation of *Cryptosporidium* infection using scorpion probes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 1217-1222, 2006.

SULAIMAN, I. M.; MORGAN, U. M.; THOMPSON, R.C.A.; LAL, A.A.; XIAO, L. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2385-2391, 2000.

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.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality tools. **Nucleic Acids Researchs**, v. 24, p. 4876-4882, 1997.

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, 5492-5498, 2000.

XIAO, L.; RYAN, U.M.; GRACZYK, T.K.; LIMOR, J.; LI, L.; KOMBERT, M.; JUNGE, R.; SULAIMAN I. M.; ZHOU, L.; ARROWOOD, M.J.; KOUDELA, B.; MODRY, D.; LAL, A.A. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in captive reptiles. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 891-899, 2004.

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