

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Giardia duodenalis* E  
*Cryptosporidium* spp. EM AMOSTRAS FECAIS DE BOVINOS E OVINOS**

**FLÁVIO MEDEIROS PAZ E SILVA**

**Botucatu - SP  
Junho 2007**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Giardia duodenalis* E  
*Cryptosporidium* spp. EM AMOSTRAS FECAIS DE BOVINOS E OVINOS**

**FLÁVIO MEDEIROS PAZ E SILVA**

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção de título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior  
Co-orientador: Prof. Dr. Raimundo Souza Lopes

**Botucatu - SP  
Junho 2007**

## COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

**Nome do autor:** Flávio Medeiros Paz e Silva

**Título:** Diagnóstico e caracterização molecular de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bovinos e ovinos

**Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção de título de Mestre.**

### **BANCA EXAMINADORA:**

**Prof. Adj. João Pessoa Araújo Júnior**

Departamento de Microbiologia/Imunologia

Instituto de Biociências - UNESP – Botucatu – São Paulo

**Prof. Adj. Alessandro Francisco Talamini Amarante**

Departamento de Parasitologia

Instituto de Biociências - UNESP – Botucatu – São Paulo

**Profa. Ass. Dra. Kátia Denise Saraiva Bresciani**

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal

UNESP – Araçatuba – São Paulo

Botucatu, 21 de junho de 2007

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Flávio Medeiros Paz e Silva

**NASCIMENTO:** 16.01.1980 – Garanhuns / PE

**FILIAÇÃO:** José Paz e Silva  
Bernadete Medeiros do Nascimento

**1998/2003** Curso de graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

**2004/2005** Residência em Medicina Veterinária  
Área de Laboratório de Enfermidades Parasitárias  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnia  
Universidade Estadual Paulista  
FMVZ – Unesp - Campus de Botucatu-SP

**2005/2007** Curso de Pós-Graduação  
Área de Clínica Veterinária  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnia  
Universidade Estadual Paulista  
FMVZ – Unesp - Campus de Botucatu-SP

### **Outros dados**

Trabalho premiado no II Congresso de Iniciação a docência (CONID) – UFRPE – 2002

Trabalho premiado no III Congresso de Iniciação a docência (CONID) – UFRPE – 2003

Aluno do programa de Iniciação Científica (CIC/CNPq -UFRPE) - 2002/2003

Bolsista Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento Superior) – 05/2005 à 08/2005

Bolsista FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) - 05/2005 à 08/2007

## DEDICATÓRIA

*A Deus em quem acredito e confio*

*A minha mãe, Bernadete Medeiros, por ser a melhor mãe do mundo e o maior exemplo de força, garra, determinação e coragem*

*Ao meu pai, José Paz e Silva, por pedir a Deus todos os dias que cuide de mim*

*A minha esposa, Rafaela Morgana,  
Por todo o companheirismo e amor*

*Ao professor Raimundo Souza Lopes,  
por todo o cuidado e apreço que teve comigo desde que cheguei a Botucatu*

## **AGRADECIMENTOS**

*Ao meu orientador professor João Pessoa  
por todo apoio, confiança, amizade e por toda ajuda técnica e pessoal que me  
deu desde que o conheci*

*A família Medeiros (mãe, irmãos, tias e tios)*

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Miriam Nogueira Teixeira, minha primeira orientadora, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) em Recife-Pernambuco. Sou grato a você por tudo que me ensinou durante a minha graduação em medicina veterinária, desde quando fui estagiário, monitor de disciplina e bolsista de iniciação científica do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária. Com os seus ensinamentos e sua cooperação pude escrever vários trabalhos científicos, dos quais dois foram premiados em congressos ainda na UFRPE; através de você aprendi a amar estar dentro de um laboratório. Eu devo a você a minha presença atualmente em São Paulo, pois foi a partir dos seus conselhos, incentivos e ajuda que eu pude deixar a cidade do Recife e fazer um estágio em Botucatu. Depois de ter sido residente no Laboratório de Enfermidades Parasitárias, monitor do curso de especialização em Patologia Clínica Veterinária, pós-graduando da FMVZ e principalmente depois de conhecer e estar desenvolvendo um projeto com a técnica da PCR (um sonho meu); eu tenho um sentimento muito forte no meu coração quando lembro de você: Gratidão.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Clínica da UFRPE: Adriano da Silva Carneiro, Daniela Coutinho Godoy, Eduardo Oliveira, Clodomir Gomes, Petrônio, Roberto Araújo, Gissandra Braz e Ana Vidon.

Aos grandes casais amigos de Recife: Ediel & Helga, Nelson & Fabiana, Higor & Emilia, Diogo & Amanda, Inaldo & Juliana, Hatus & Cecília.

Ao Prof. Dr. Raimundo Souza Lopes e a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Kiomi Takahira, meus orientadores durante a residência no Laboratório de Enfermidades Parasitárias –FMVZ-Unesp, Botucatu. Obrigado por sempre me acolherem de braços abertos.

Aos amigos, ex-residentes e pós-graduandos do Laboratório Clínico Veterinário e do Laboratório de Enfermidades Parasitárias- FMVZ, Unesp, Botucatu.

Ao técnico de laboratório Valdir Ângelo Paniguel (Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências –IBB, Unesp-Botucatu, SP) por conseguir 70% das propriedades rurais que foram visitadas nessa pesquisa. Seu grande auxílio em nos conduzir até as propriedades e toda a sua boa vontade em ajudar foi fundamental. Sem sua cooperação esse trabalho não seria possível. Muito obrigado !!!

A todos os amigos do laboratório de Virologia/Laboratório de Diagnóstico Molecular do Departamento de Microbiologia/imunologia, IBB –UNESP-Botucatu: Tiago Neves Batista Neves, Taís Fukuta, Rodrigo “Smurf” Vela, Ariapuanã “Giraya” Watanabe, Andreza Soriano, Jossimara “Kero” Polentini, José “Zé” Augusto, Telma Papatotto, Marcela Mendes, Michelli Bufallo, Aline, Sueli Akemi e professor João Candeias. Se não fosse o auxílio de todos vocês esse eu nunca conseguiria desenvolver esse projeto.

Aos professores Lúcia Helena O’Dwyer e Reinaldo José da Silva e amigos do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências de Botucatu-IBB-Unesp -SP.

Ao Prof Dr. Alessandro Francisco Talamini Amarante (Departamento de Parasitologia Veterinária-IBB- Unesp, Botucatu -SP) e a Prof<sup>a</sup>. Ass. Dr<sup>a</sup>. Kátia Bresciani (FOA-Unesp, Araçatuba -SP) por serem colaboradores neste projeto.

Ao Prof. Ass. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles (FOA –Unesp, Araçatuba) por ter cedido gentilmente uma amostra de DNA de *Cryptosporidium* spp. que serviu como controle positivo quando estávamos padronizando nossas reações de PCR.

A Cristiane Barreto e Lousiane de Carvalho Nunes por terem sido minhas “irmãs” em Botucatu e por todo o carinho e cuidado que tiveram comigo enquanto estive morando em suas casas.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por ter concedido a bolsa de mestrado e o auxílio à pesquisa.

Ao meu companheiro fiel e inseparável de quatro patas Harrus, um labrador chocolate sempre disposto a brincar e bagunçar.

*Esse projeto foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo n°05/52175-2*



## SUMÁRIO

RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	ii
LISTA DE TABELAS .....	iii
LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	3
2.1. Parasitismo por <i>Giardia duodenalis</i> .....	3
2.2. Principais espécies de <i>Giardia</i> .....	5
2.3. Taxonomia molecular de <i>Giardia duodenalis</i> .....	5
2.4. Parasitismo por <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	8
2.5. Taxonomia de <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	9
2.6. Espécies válidas de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	12
2.7. Recentes genótipos descritos de <i>Cryptosporidium</i> que parasitam ruminantes.....	13
2.8. As recentes transformações sofridas no gênero <i>Cryptosporidium</i> .....	14
2.9. <i>Giardia</i> e <i>Cryptosporidium</i> no rebanho bovino e ovino .....	15
2.10. Genótipos de <i>Giardia duodenalis</i> encontrados em ruminantes .....	16
2.11. Espécies/genótipos de <i>Cryptosporidium</i> encontrados em ruminantes .....	17
2.11.1. <i>Cryptosporidium parvum</i> .....	17
2.11.2. <i>Cryptosporidium andersoni</i> .....	18
2.11.3. Genótipos .....	18
2.12. Zoonose .....	19
2.12.1. <i>Giardia duodenalis</i> .....	19
2.12.2. <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	20
2.13. <i>Giardia</i> e <i>Cryptosporidium</i> como enfermidades veiculadas pela água .....	21
2.14. Diagnóstico de <i>Giardia duodenalis</i> e <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	21
2.15. Situação no Brasil .....	22
3. OBJETIVO .....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	24
4.1. Animais e propriedades .....	24
4.2. Diagnóstico laboratorial de <i>Giardia</i> e <i>Cryptosporidium</i> .....	26
4.2.1. Local das análises .....	26
4.2.2. Processamento das amostras .....	26
4.2.3. Técnicas empregadas .....	29
4.2.3.1. Microscopia óptica .....	29
4.2.3.2. Ensaio imunoenzimático .....	30

4.2.3.2.1. Índice ELISA .....	31
4.2.3.3. Reação em cadeia da polimerase .....	31
4.2.3.3.1. Extração do DNA .....	31
4.2.3.3.2. Detecção molecular de <i>Giardia duodenalis</i> .....	32
4.2.3.3.3. Gene GDH .....	32
4.2.3.3.4. Gene SSU rRNA .....	32
4.2.3.3.5. Amplificação do DNA de <i>Giardia duodenalis</i> : gene GDH.....	33
4.2.3.3.6. Amplificação do DNA de <i>Giardia duodenalis</i> : gene SSU rRNA ....	33
4.2.3.3.7. Detecção molecular de <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	34
4.2.3.3.8. Amplificação do DNA de <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	34
4.2.3.3.9. Amplificação do DNA usando Go Taq Green Master Mix .....	35
4.2.4. Eletroforese em gel de agarose .....	35
4.2.5. Purificação de produtos de PCR .....	35
4.2.6. Quantificação de produtos purificados da PCR .....	36
4.2.7. Caracterização genética através da PCR-RFLP .....	36
4.2.7.1. PCR-RFLP para <i>Giardia duodenalis</i> .....	36
4.2.7.2. PCR-RFLP para <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	37
4.2.7.2.1. Enzimas de restrição <i>Sspl</i> , <i>Vspl</i> e <i>Ddel</i> .....	38
4.2.7.2.2. Enzima de restrição <i>MobII</i> .....	39
4.2.8. Sequenciamento do gene SSU r-RNA de <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	45
4.2.9. Controle a extração do DNA das amostras fecais .....	45
4.2.9.1. Nested-PCR para amplificação do DNA mitocondrial bovino e ovino ....	45
4.2.10. Comparação dos resultados .....	46
4.2.11. Validação das análises .....	46
4.2.12. Análise estatística .....	47
4.2.12.1. Co-positividade e co-negatividade .....	47
5. RESULTADOS .....	49
5.1. Análise das 10 propriedades da região de Botucatu e Itatinga –SP .....	49
5.1.1. Ocorrência de <i>Giardia duodenalis</i> e <i>Cryptosporidium</i> spp. nas propriedades.....	49
5.1.2. Ocorrência de <i>Giardia duodenalis</i> – Análise dos animais .....	49
5.1.3. Ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> spp – Análise dos animais .....	51
5.1.4. Comparação das técnicas de diagnóstico – <i>Giardia duodenalis</i> .....	52
5.1.4.1. CFMSZ versus Semi-Nested PCR amplificando o gene GDH .....	52
5.1.4.2. CFMSZ versus ELISA – Coproantígeno captura .....	53
5.1.4.3. ELISA versus Semi-Nesteted PCR amplificando o gene GDH .....	54
5.1.5. Resultados agregados obtidos pelos três testes .....	54
5.1.6. Comparação das técnicas de diagnóstico – <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	55
5.1.6.1. Resultados agregados obtidos pelos três testes .....	55

5.1.7.	Presença de diarreia nos animais .....	56
5.1.8.	Associação com diarreia .....	56
5.1.9.	Co-infecção por <i>Giardia duodenalis</i> e <i>Cryptosporidium</i> spp. nos bovinos .....	56
5.1.10.	Ocorrência de acordo com a idade .....	57
5.1.11.	Caracterização molecular de <i>Giardia duodenalis</i> através da PCR-RFLP .....	57
5.1.12.	Caracterização molecular de <i>Cryptosporidium</i> spp. através da PCR-RFLP .....	62
5.2.	Análise da propriedade de Tupi Paulista – SP .....	67
5.2.1.	Caracterização molecular de <i>Giardia duodenalis</i> através da PC-RRFLP .....	73
5.2.2.	Caracterização molecular de <i>Cryptosporidium</i> spp. através da PCR-RFLP .....	74
5.2.3.	Validação das extrações de DNA e das análises moleculares .....	78
6.	DISCUSSÃO .....	80
6.1.	Análise da presença de <i>Giardia</i> e <i>Cryptosporidium</i> nas propriedades .....	80
6.2.	Presença de diarreia nos animais .....	82
6.3.	Ocorrência das infecções por <i>Giardia duodenalis</i> nos bovinos .....	82
6.4.	Genótipos de <i>Giardia duodenalis</i> encontrados nos bovinos .....	84
6.5.	Ocorrência das infecções por <i>Cryptosporidium</i> spp. nos bovinos .....	85
6.6.	Considerações sobre a metodologia utilizada .....	86
6.7.	Espécies/genótipos de <i>Cryptosporidium</i> encontrados nos bovinos .....	88
6.7.1.	<i>Cryptosporidium andersoni</i> .....	91
6.8.	Zoonose .....	92
6.9.	Caracterização dos cistos/ocistos observados .....	95
6.10.	Nº de cistos/ocistos na amostra .....	95
6.11.	Considerações sobre a extração do DNA .....	96
6.12.	Comparação entre as técnicas de diagnóstico .....	99
6.12.1.	Microscopia x PCR .....	100
6.12.2.	Microscopia x Ensaio enzimático .....	102
6.12.3.	Microscopia x Ensaio enzimático x PCR .....	103
6.13.	Considerações sobre a técnica de Microscopia óptica CFMSZ .....	103
6.14.	Considerações sobre o método Imunoenzimático –ELISA .....	104
6.15.	Considerações sobre a técnica da PCR .....	106
6.16.	Considerações sobre o protocolo da PCR utilizado para <i>Cryptosporidium</i> spp ..	107
6.17.	Breve conclusão observada na comparação de técnicas de diagnóstico .....	108
6.18.	Comparação das técnicas de diagnóstico – outros atributos .....	108
6.18.1.	Custo .....	108
6.18.2.	Tempo gasto em cada análise .....	109
6.18.3.	Simplicidade da técnica .....	110
6.19.	Análise dos animais da propriedade de Tupi Paulista- SP .....	111
6.19.1.	Genótipos de <i>Giardia duodenalis</i> .....	112

6.19.2. Espécies/ genótipos de <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	113
6.19.3. Potencial zoonótico de <i>Cryptosporidium</i> spp. em ovinos .....	115
6.19.4. Considerações sobre os dados obtidos da propriedade de Tupl Paulista .....	116
6.20. Resultados inéditos desse experimento no Brasil .....	117
7. CONCLUSÕES .....	118
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	120

PAZ E SILVA, F.M. **Diagnóstico e caracterização molecular de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bovinos e ovinos.** Botucatu. 2007. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Campus de Botucatu-SP.

## RESUMO

Os protozoários *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. são comprovadamente patógenos potenciais para bovinos e ovinos (particularmente em bezerros e cordeiros). Recentemente, o uso de técnicas moleculares demonstrou que *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. são espécies compostas de populações morfologicamente indistinguíveis, porém com grande diversidade genética. Os isolados de *Giardia duodenalis* obtidos de amostras fecais de ruminantes podem pertencer a grupos genéticos hospedeiro-específicos (genótipo E) ou a grupos genéticos potencialmente zoonóticos (genótipo A e B). Quatro espécies/genótipos de *Cryptosporidium* spp. com diferenças biológicas e genéticas consideráveis, são capazes de infectar bovinos: *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium andersoni*, *Cryptosporidium bovis* e *Cryptosporidium* genótipo *deer-like*. Em ovinos uma longa lista de espécies/genótipos tem sido identificados, alguns dos quais ainda são descritos como espécies/genótipos desconhecidos. O objetivo desse estudo foi determinar a ocorrência de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em 10 propriedades de bovinos leiteiros e 1 propriedade de ovinos no Estado de São Paulo, realizando o diagnóstico por meio das técnicas de microscopia óptica (Centrifugo-flutuação em sulfato de zinco modificada e coloração por fucsina carbólica modificada), Ensaio imunoenzimático (ELISA) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR); e caracterizando geneticamente esses protozoários com o emprego da técnica de polimorfismo no tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP). A ocorrência de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* em 200 bovinos foi de 8 e 14%, respectivamente. O diagnóstico das infecções em bezerros foi significativamente maior do que em animais adultos. A técnica da PCR demonstrou uma sensibilidade diagnóstica superior quando comparada às técnicas de microscopia óptica e ensaio imunoenzimático. O genótipo E de *Giardia duodenalis* (animal-específico e não zoonótico) foi o mais prevalente (87,5%), enquanto que a espécie *Cryptosporidium andersoni* foi detectada em 82% dos animais positivos para *Cryptosporidium* spp. Em ovinos *Giardia duodenalis* esteve presente em 34% das amostras analisadas e *Cryptosporidium* spp. em 25%. Todos os animais parasitados por *Giardia duodenalis* apresentavam o genótipo E, enquanto que *Cryptosporidium felis* e/ou *Cryptosporidium* genótipo *cervine*, esteve presente em 21% dos animais. Esse estudo demonstrou que as infecções por *Giardia* e *Cryptosporidium* estão presentes em taxas variados no rebanho bovino e ovino da região e que os ovinos (cordeiros de 0-6 meses) podem atuar como hospedeiros de espécies/genótipos zoonóticos de *Cryptosporidium*, podendo ser fonte das infecções para humanos.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., PCR-RFLP, Bovinos, Ovinos

PAZ E SILVA, F.M. **Diagnosis and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in cattle and sheep fecal specimens.** Botucatu. 2007. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Campus de Botucatu-SP.

#### **ABSTRACT**

*Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. are protozoan organisms that can infect the intestinal tract of many animal species including mammals. Clinical signs reported in calves and lambs infected with these parasites include dullness, lethargy, anorexia, fever, dehydration, gastritis, reduced milk yield and poor weight gain and therefore have a potential clinical and economic impact. Despite morphological uniformity, considerable biotypic and genetic diversity exists within the *G. duodenalis* and *Cryptosporidium* species. *G. duodenalis* is a species complex comprising at least seven major assemblages or genotypes (A, B, C, D, E, F and G). These assemblages, which differ from each other significantly, appear to have distinct host preferences or have a limited host range. Recent studies suggest that cattle are infected with at least four *Cryptosporidium* parasites: *C. parvum*, *Cryptosporidium bovis*, *Cryptosporidium andersoni* and the *Cryptosporidium* deer-like genotype. In sheep, however, most prevalence information is based on microscopy and thus there is little information on *Cryptosporidium* species or genotypes. This study was undertaken to determine the occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dairy cattle and sheep in São Paulo State, Brazil through the use of microscopy, Enzyme Immunoabsorbent assay (EIA) and Polymerase chain Reaction (PCR); and to determine the species/genotypes by PCR-RFLP. Ten dairy farms in Botucatu city region are sampled. At each farm, 20 specimens are randomly collected. *Giardia* and *Cryptosporidium* was identified in 80% and 90% of farm locations, respectively. Of the 200 specimens collected, 8% and 14% has *Giardia* and *Cryptosporidium* DNA, respectively. Most infections were *Giardia duodenalis* Assemblage E (87,5%) and *Cryptosporidium andersoni* (82%) which are not zoonotic; however, one calf was infected with zoonotic *Giardia duodenalis* Assemblage All and another with B. Fecal samples of 100 sheep raised on a farm in Tupi Paulista city, São Paulo State, were examined for the presence of *Giardia* and *Cryptosporidium*. The occurrence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* was 34 and 25%, respectively. Infections in sheep were 100% *Giardia duodenalis* Assemblage E and 21% of animals harbor zoonotic species/genotypes of *Cryptosporidium* spp. In this study, *Giardia* and *Cryptosporidium* showed high occurrence in newborn animals, confirming that calves and lambs can act as asymptomatic carriers shedding small number of (oo)cysts into environment. Asymptomatic infected animals should be considered as an important reservoir of *Cryptosporidium* either for others animals or humans. The results of the analyses can also confirm previous findings, demonstrating the superior sensitivity of PCR methods over microscopy and Enzyme Immunoassay tests.

**KEY-WORDS:** *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., PCR-RFLP, Cattle, Sheep

## LISTA DE TABELAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1.</b> Principais espécies de <i>Giardia duodenalis</i> .....	5
<b>Tabela 2.</b> Classificação genética de <i>Giardia duodenalis</i> .....	6
<b>Tabela 3.</b> Classificação das espécies de <i>Cryptosporidium</i> e seus respectivos hospedeiros .....	12
<b>Tabela 4.</b> Espécies e genótipos de <i>Cryptosporidium</i> que infectam bovinos .....	18
<b>Tabela 5.</b> Número de amostras colhidas das diferentes categorias de animais realizada entre os meses de junho a dezembro de 2005 .....	25
<b>Tabela 6.</b> Número de (oo)cistos marcados semiquantitativamente observados em lâmina .....	30
<b>Tabela 7.</b> Condições da reação de PCR-RFLP para <i>Giardia duodenalis</i> utilizando a enzima <i>NlaIV</i> .....	37
<b>Tabela 8.</b> Condições da reação de PCR-RFLP para <i>Cryptosporidium</i> utilizando as enzimas <i>Sspl</i> e <i>Vspl</i> .....	38
<b>Tabela 9.</b> Condições da reação de PCR-RFLP para <i>Cryptosporidium</i> spp. utilizando a enzima <i>Ddel</i> .....	39
<b>Tabela 10.</b> Sítios de restrição das enzimas <i>Sspl</i> , <i>Vspl</i> , <i>Ddel</i> e <i>MobII</i> .....	39
<b>Tabela 11.</b> Tamanho dos fragmentos de restrição (em pares de base) e perfil genotípico de diagnóstico (em pares de base ) de produtos amplificados da SemiNested-PCR digeridos com a enzima <i>Nla IV</i> .....	41
<b>Tabela 12.</b> Análise de PCR-RFLP (em pares de base) no gene SSU rRNA de várias espécies e genótipos de <i>Cryptosporidium</i> spp. (adaptado de Xiao et al., 1999; Xiao et al., 1999; Xiao et al., 2001) .....	42

<b>Tabela 13.</b> Análise de PCR-RFLP (em pares de base) no gene SSU rRNA para diferenciação entre <i>C.andersoni</i> e <i>C. muris</i> através da enzima <i>Ddel</i> .....	42
<b>Tabela 14.</b> Diferenciação entre <i>Cryptosporidium parvum</i> (genótipo bovino), <i>C. bovis</i> , <i>C. andersoni</i> e <i>Cryptosporidium</i> genótipo deer-like pela análise de RFLP com as enzimas <i>Sspl</i> , <i>Vspl</i> e <i>MbolI</i> .....	44
<b>Tabela 15.</b> Índices de co-positividade e co-negatividade .....	48
<b>Tabela 16.</b> Características de cada propriedade e a distribuição da ocorrência de <i>Giardia duodenalis</i> e <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	50
<b>Tabela 17.</b> Ocorrência de <i>G. duodenalis</i> em amostras fecais coletadas de dez propriedades (A -J) de bovinos leiteiros na região do município de Botucatu e Itatinga, São Paulo .....	51
<b>Tabela 18.</b> Ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostras fecais coletadas de dez propriedades (A-J) de bovinos leiteiros na região do município de Botucatu e Itatinga, São Paulo .....	53
<b>Tabela 19.</b> Resultados comparativos do teste de centrifugo-flutuação modificada em sulfato de zinco (CFMSZ) com o teste da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) no diagnóstico de <i>Giardia duodenalis</i> .....	53
<b>Tabela 20.</b> Resultados comparados do teste de centrifugo-flutuação modificada em sulfato de zinco (CFMSZ) com o teste ELISA de pesquisa de coproantígenos de <i>Giardia duodenalis</i> em amostras fecais .....	54
<b>Tabela 21.</b> Resultados comparados do teste ELISA de pesquisa de coproantígenos de <i>Giardia duodenalis</i> em amostras fecais com o teste da Reação em cadeia da polimerase (PCR) no diagnóstico de <i>Giardia duodenalis</i> .....	54
<b>Tabela 22.</b> Resultados comparados do teste de centrifugo-flutuação modificada em sulfato de zinco (CFMSZ), teste enzimático de pesquisa de coproantígenos em amostras fecais (ELISA) e teste da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) no diagnóstico de <i>Giardia duodenalis</i> .....	55



<b>Tabela 23.</b> Resultados comparados do teste de coloração por fucsina-carbólica modificada (CFCM) com o teste da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) no diagnóstico de <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	55
<b>Tabela 24.</b> Resultados comparados do teste de coloração por fucsina Carbólica modificada (CFCM), teste enzimático de pesquisa de coproantígenos em amostras fecais (ELISA) e teste da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) no diagnóstico de <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	56
<b>Tabela 25.</b> Estratificação da consistência fecal das amostras de bezerros e a presença ou ausência de <i>Giardia duodenalis</i> e <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	56
<b>Tabela 26.</b> Genótipos de <i>Giardia duodenalis</i> encontrados nos bovinos .....	61
<b>Tabela 27.</b> Genotipagem de <i>Cryptosporidium</i> spp. por PCR-RFLP. Tamanho dos fragmentos de restrição gerados pelas enzimas <i>Sspl</i> , <i>Vspl</i> e <i>Ddel</i> .....	62
<b>Tabela 28.</b> Espécies e genótipos de <i>Cryptosporidium</i> spp. encontrados nos bovinos do experimento .....	66
<b>Tabela 29.</b> Resultados do processamento das análises de amostras fecais de cordeiros provenientes da propriedade de Tupi Paulista .....	70
<b>Tabela 30.</b> Resultados do processamento das análises de amostras fecais de cordeiros provenientes da propriedade de Tupi Paulista-SP pelas técnicas de Centrifugo-flutuação modificada em sulfato de zinco (CFMSZ), Coloração por fucsina carbólica modificada (CFCM), Ensaio imunoenzimático (ELISA) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	71
<b>Tabela 31.</b> Ocorrência de <i>Giardia duodenalis</i> e <i>Cryptosporidium</i> spp. em cordeiros e ovelhas de acordo com a técnica de diagnóstico (ELISA e PCR). Tupi Paulista-SP.....	72
<b>Tabela 32.</b> Resultados obtidos com a utilização do kit ELISA GIARDIA II para o diagnóstico de <i>Giardia duodenalis</i> em amostras fecais de cordeiros e ovelhas provenientes de Tupi Paulista-SP.....	72

<b>Tabela 33.</b> Resultados obtidos com a utilização do kit ELISA CRYPTOSPORIDIUM TEST para o diagnóstico de <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostras fecais de cordeiros e ovelhas provenientes de Tupi Paulista-SP.....	73
<b>Tabela 34.</b> Genótipos de <i>Giardia duodenalis</i> isolados de ovinos na propriedade de Tupi Paulista-SP .....	74
<b>Tabela 35.</b> Espécies e genótipos de <i>Cryptosporidium</i> isolados de ovinos na propriedade de Tupi Paulista-SP.....	75

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida de <i>Giardia</i> spp. ....	4
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	9
<b>Figura 3.</b> Distribuição das propriedades na região de Botucatu e Itatinga, Estado de São Paulo, onde foram coletadas 200 amostras de bovinos leiteiros .....	27
<b>Figura 4.</b> Vista aérea da divisão dos piquetes dos animais da propriedade em Tupi Paulista - São Paulo .....	27
<b>Figura 5.</b> Bovinos alocados no experimento originados das 10 propriedades rurais da região de Botucatu e Itatinga, Estado de São Paulo. (1) Bezerro da propriedade G. (2) Bezerro e animal adulto na propriedade F. (3) Bebedouro dos bezerros em um dos currais da propriedade E. (4) Habita dos animais no confinamento na propriedade D .....	28
<b>Figura 6.</b> Diagrama esquemático do fluxograma de etapas do experimento .....	29
<b>Figura 7.</b> Gel de agarose corado com brometo de etídio 2% demonstrando o DNA de <i>Giardia duodenalis</i> amplificado a partir do gene GDH de cada um dos genótipos AI, AII, B, C, D e E, digeridos com a enzima de restrição <i>Nla</i> IV .....	41
<b>Figura 8.</b> Análise de PCR-RFLP no gene SSU rRNA de várias espécies e genótipos de <i>Cryptosporidium</i> spp. através das enzimas <i>Vspl</i> , <i>Sspl</i> e <i>Ddel</i> .....	43
<b>Figura 9.</b> Similaridade no padrão de restrição provocada pela ação da enzima <i>Sspl</i> sobre os produtos de PCR amplificados do gene SSU r-RNA entre <i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>C. bovis</i> e <i>C.</i> genótipo deer-like em amostra de bovinos domésticos e de um bovino selvagem ( <i>Bos grunniens</i> ). Adaptado do original de Feng et al. (2007) .....	44
<b>Figura 10.</b> Análise percentual da distribuição do número de amostras positivas para <i>Giardia duodenalis</i> de acordo com a categoria animal (bezerros e adultos). Total de 200 amostras .....	49

<b>Figura 11.</b> Ocorrência de <i>Giardia duodenalis</i> em bezerros (A) e animais adultos (B). Total de 100 amostras em cada categoria animal .....	51
<b>Figura 12.</b> Análise percentual da distribuição do número de amostras positivas para <i>Cryptosporidium</i> spp. de acordo com a categoria animal (bezerros e adultos). Total de 200 amostras .....	52
<b>Figura 13.</b> Ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> spp. em bezerros (A) e animais adultos (B). Total de 100 amostras em cada categoria animal .....	52
<b>Figura 14.</b> Ocorrência de <i>Giardia duodenalis</i> e <i>Cryptosporidium</i> spp. de acordo com a faixa etária dos animais .....	57
<b>Figura 15.</b> Aspectos microscópicos de cistos de <i>Giardia duodenalis</i> observados após o uso da técnica de centrifugo-flutuação modificada em sulfato de zinco .....	58
<b>Figura 16.</b> Análise de PCR baseado na amplificação do gene GDH para <i>Giardia duodenalis</i> . Gel de agarose 1.5% corado com brometo de etídio. Amostras de bovinos .....	58
<b>Figura 17.</b> Análise de PCR baseado na amplificação do gene SSU-rDNA para <i>Giardia duodenalis</i> , segundo Hopkins et al. (1997). Reação de PCR. Gel de agarose 1.5% corado com brometo de etídio .....	59
<b>Figura 18.</b> Análise de PCR baseado na amplificação do gene SSU-rDNA para <i>Giardia duodenalis</i> . Reação de Nested- PCR. Gel de agarose 1.5% corado com brometo de etídio .....	59
<b>Figura 19.</b> Aspectos microscópicos de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. observados após o uso da técnica de coloração com fucsina-carbólica modificada .....	60
<b>Figura 20.</b> Análise de PCR baseado na amplificação do gene 18S small Subunit (SSU) rRNA para <i>Cryptosporidium</i> spp. Gel de agarose 1.5% corado com brometo de etídio. Amostras de bovinos .....	60

<b>Figura 21.</b> Análise de PCR-RFLP com a utilização da enzima <i>NlaIV</i> para amostras positivas de <i>Giardia duodenalis</i> amplificadas no gene GDH. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio .....	61
<b>Figura 22.</b> Análise de PCR-RFLP com a utilização das enzimas <i>Sspl</i> (A), <i>Vspl</i> (B) para amostras positivas de <i>Cryptosporidium</i> spp. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio .....	64
<b>Figura 23.</b> Análise de PCR-RFLP com a utilização da enzima <i>Ddel</i> para diferenciação entre amostras de <i>Cryptosporidium andersoni</i> e <i>Cryptosporidium muris</i> . Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio .....	65
<b>Figura 24.</b> Porcentagem de cada espécie/genótipo, de acordo com a idade dos animais, relativo ao total de animais positivos para <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	65
<b>Figura 25.</b> Porcentagem de espécies/genótipos de <i>Cryptosporidium</i> de acordo com a categoria de animal .....	66
<b>Figura 26.</b> Ocorrência de <i>Giardia</i> (A) e <i>Cryptosporidium</i> (B) de acordo com a categoria animal. Total de 100 animais. Amostras de ovinos. Tupi Paulista-SP.....	67
<b>Figura 27.</b> Aspectos microscópicos de cistos de <i>Giardia duodenalis</i> observados após o uso da técnica de centrifugo-flutuação modificada em sulfato de zinco (setas pretas). Cordeiro, aumento de 400x .....	68
<b>Figura 28.</b> Análise de PCR baseado na amplificação do gene GDH para <i>Giardia duodenalis</i> . Gel de agarose 1.5% corado com brometo de etídio. Amostras de ovinos .....	68
<b>Figura 29.</b> Aspectos microscópicos de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. observados após o uso da técnica de coloração com fucsina-carbólica modificada. Cordeiro, aumento de 1000x .....	69
<b>Figura 30.</b> Análise de PCR baseado na amplificação do gene 18S small Subunit (SSU) rRNA para <i>Cryptosporidium</i> spp. Gel de agarose 1.5% corado com brometo de etídio. Amostras de ovinos .....	69

<b>Figura 31.</b> Análise de PCR baseado na amplificação do gene GDH para <i>Giardia duodenalis</i> . Gel de agarose 1.5% corado com brometo de etídio. Amostras de ovinos .....	73
<b>Figura 32.</b> Análise de PCR-RFLP com a utilização das enzimas <i>Sspl</i> (A), <i>Vspl</i> (B) para amostras positivas de <i>Cryptosporidium</i> spp em ovinos. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio .....	76
<b>Figura 33.</b> Análise de PCR-RFLP com a utilização das enzimas <i>Sspl</i> (A), <i>Vspl</i> (B) para amostras positivas de <i>Cryptosporidium</i> spp. de ruminantes. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio .....	77
<b>Figura 34.</b> Análise de Nested-PCR baseado na amplificação do DNA mitocondrial Bovino (A) e ovino (B). Gel de agarose 1.5% corado com brometo de etídio..	78
<b>Figura 35.</b> Teste “Spike probe”: Análise de Semi-Nested PCR baseado na amplificação do gene GDH para <i>Giardia duodenalis</i> . Gel de agarose 1.5% corado com brometo de etídio .....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ® = Marca Registrada  
°C = Grau Celsius  
µg = Micrograma  
µM= Micromolar  
µl = Microlitro  
bp = Pares de base (*base paires*)  
CP = *Cryptosporidium parvum*  
CB = *Cryptosporidium Bovis*  
CGDL = *Cryptosporidium* genótipo deer-like  
COWP = *Cryptosporidium Oocyst Wall Protein*  
DNA = Ácido Desoxirribonucléico (*Desoxyribonucleic Acid*)  
CFMSZ = Centrifugo-flutuação Modificada em Sulfato de Zinco  
CFCM = Coloração por Fucsina Carbólica Modificada  
ELISA = Ensaio Imunoenzimático (*Enzyme linked Immunoabsorbent Assay*)  
FMVZ = Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
GDH = *Glutamase Dehydrogenase*  
GP60 = *Glycoprotein 60*  
HSP70 = *Heat Shock Protein 70*  
IBB = Instituto de Biociências de Botucatu  
LDM = Laboratório de Diagnóstico Molecular  
mL= Mililitro  
PCR = Reação em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction*)  
rpm = Rotações por minutos  
RFLP = Restriction Fragment Length Polimorphism  
RNA = Ácido ribonucléico (*Ribonucleic Acid*)  
SSU r-RNA = *Small Subunit Ribosomal Ribonucleic Acid*  
Taq = *Thermus aquaticus*  
TRAPC2 = *Thrombospodin-Related Anonymous Protein 2*  
U = unidade  
UNESP = Universidade Estadual Paulista

## 1. INTRODUÇÃO

*Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* são comprovadamente patógenos potenciais para bovinos e ovinos leiteiros e de carne (particularmente em animais jovens) causando diarreia, prejuízos na conversão alimentar, redução no ganho de peso, redução na produção de leite e redução no peso das carcaças. Ambos parasitas foram descritos por vários pesquisadores como importantes agentes de diarreia neonatal em bezerros, sozinhos os associados a outros agentes infecciosos.

Esses protozoários são capazes de parasitar o trato gastrointestinal do homem e de diversos mamíferos domésticos e silvestres, sendo um dos mais prevalentes e importantes parasitas intestinais nesses hospedeiros. A Giardíase e a Criptosporidiose recentemente têm sido reconhecidas como uma das mais prevalentes enfermidades veiculadas pela água. O parasitismo por esses agentes vem chamando a atenção científica pelo seu potencial zoonótico, com graves implicações em termos de saúde pública devido a capacidade de bovinos e ovinos atuarem como fonte da infecção para humanos. Recentemente, o uso de técnicas moleculares demonstrou que *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. são espécies geneticamente complexas composta de populações morfológicamente indistinguíveis, porém com grande diversidade genética. Os isolados de *Giardia duodenalis* obtidos de amostras fecais de ruminantes, apesar de morfológicamente semelhantes ao obtidos de várias outras espécies de mamíferos domésticos, incluindo o homem, podem pertencer a grupos genéticos hospedeiro-específicos (genótipo E) ou a grupos genéticos potencialmente zoonóticos (genótipo A e B).

Quatro espécies/genótipos de *Cryptosporidium* spp. com diferenças biológicas e genéticas consideráveis, são capazes de infectar bovinos: *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium andersoni*, *Cryptosporidium bovis* (conhecido anteriormente como *C. bovis* genótipo B) e *Cryptosporidium* genótipo deer-like. Em ovinos uma longa lista de espécies/genótipos tem sido identificados, alguns dos quais ainda são descritos como espécies/genótipos desconhecidos.

Os dois enteroparasitas estão presentes em taxas variáveis no rebanho bovino e ovino em nosso país. Entretanto estudos complementares da incidência das infecções e caracterização molecular das espécies/genótipos ainda são pouco realizados, não sendo possível avaliar a real importância de tais infecções para a saúde dos animais e o potencial zoonótico de ambas as enfermidades.



Se torna fundamental, dessa forma, determinar a ocorrência das infecções por *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em bovinos e ovinos e caracterizar geneticamente através dos métodos de diagnóstico baseados na Reação em Cadeia da Polimerase os isolados de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. obtidos desses ruminantes.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

*Giardia* e *Cryptosporidium* são protozoários que parasitam o trato gastrointestinal de mamíferos domésticos, silvestres e do homem (Xiao et al., 2001; Monis et al., 2003) sendo um dos mais prevalentes e importantes patógenos em ruminantes domésticos (O'Handley et al., 2000; Huetink et al., 2001; Barwick et al., 2003; Appelbee et al., 2003; Ralston et al., 2003). A giardíase e a criptosporidiose, recentemente têm emergido como causadoras de grandes perdas econômicas no rebanho bovino e ovino (Olson et al., 1995; Olson et al., 1997), chamando a atenção pública e científica devido ao seu potencial zoonótico, com graves significado em termos de saúde pública, pela capacidade de ruminantes atuarem como fonte da infecção desses enteroparasitas para o homem (Peng et al., 2003; Thompson et al., 2000; Monis & Thompson, 2003).

### 2.1. Parasitismo por *Giardia duodenalis*

*Giardia duodenalis* (também conhecida por *Giardia intestinalis* ou *Giardia lamblia*) é um protozoário flagelado unicelular que comumente parasita o intestino delgado de uma grande variedade de mamíferos domésticos e silvestres, sendo capaz de causar sinais clínicos relacionados à diarreia e distúrbios intestinais (Thompson et al., 2000). O microorganismo possui distribuição mundial e é de grande importância epidemiológica e clínica por sua alta prevalência (Adam, 2001). *G. duodenalis* é comumente aceito como importante agente causador de zoonose, sendo a giardíase a mais comum doença parasitária em humanos (Ali & Hill, 2003), estimado em cerca de  $2.8 \times 10^8$  casos por ano no mundo (Lloyd et al., 2002).

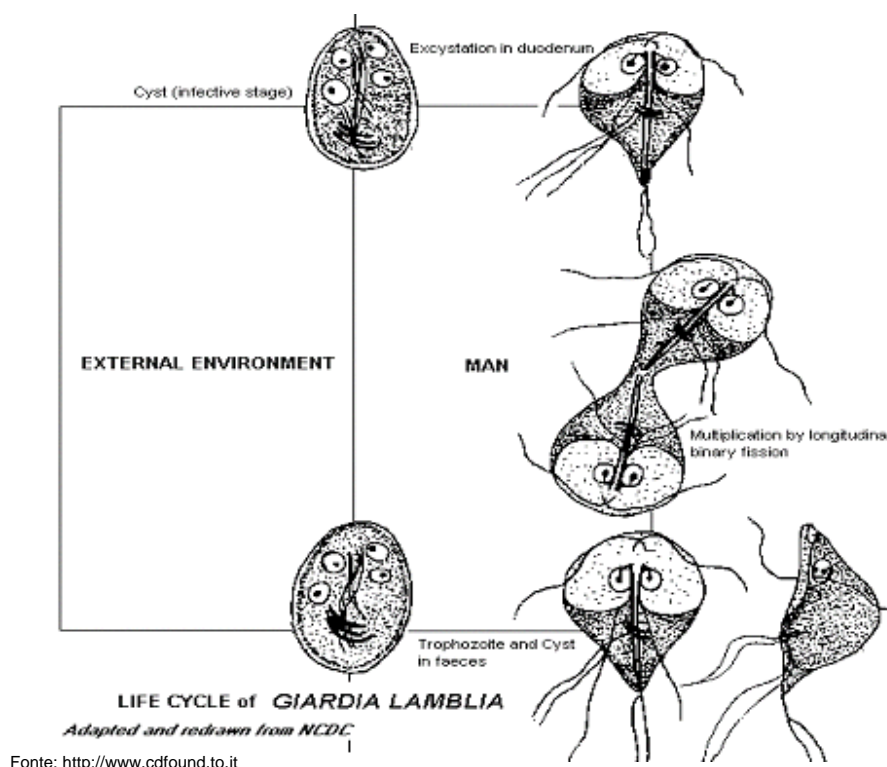
Em países em desenvolvimento da Ásia, África e América Latina, aproximadamente 200 milhões de pessoas tem giardíase sintomática (Sulaiman et al., 2003) e nos Estados Unidos cerca de 500 mil novos casos são diagnosticados por ano (Thompson, 2000; Hanson & Cartwright., 2001). Em nações industrializadas, a giardíase é referida com uma enfermidade parasitária re-emergente devido a sua crescente e reconhecida importância em surtos de doenças diarreicas em creches e em epidemias transmitidas pelo consumo de água contaminada (Read et al., 2002; Monis et al., 2003; Sulaiman et al., 2004; Hunter & Thompson, 2005).

Cerca de sete por cento da população mundial humana alberga *Giardia* no intestino, mas pouco se conhece sobre a epidemiologia deste organismo, especialmente

no que se refere à possibilidade de animais domésticos serem fonte da infecção humana (Van Keulen et al., 2002).

*Giardia duodenalis* possui ciclo de vida de dois estágios (figura 1). As formas infectante são os cistos que são excretados nas fezes e ingeridos pelo hospedeiro. A exposição aos ácidos do estômago e aos sais biliares no intestino estimula a transformação dos cistos em trofozoíto (forma parasitária). Os trofozoítos de *G. duodenalis* possuem forma de pêra, medindo aproximadamente 12 a 15  $\mu\text{m}$  x 5 a 9  $\mu\text{m}$ . O citoesqueleto inclui um corpo mediano, quatro pares de flagelos (anterior, posterior, caudal e ventral), e um disco ventral. O trofozoíto adere-se, desenvolve-se e coloniza a superfície da mucosa do intestino delgado onde se multiplica assexuadamente por divisão binária (Adam, 2001). A medida em que os trofozoítos passam através do intestino, eles se encistam e são excretados nas fezes.

**Figura 1.** Ciclo de vida de *Giardia* spp.



A transmissão desse parasita ocorre através da ingestão de cistos viáveis através do contato fecal oral direto ou indireto pela água e alimento contaminados (Monis & Thompson, 2003).

A patogenese da *Giardia* não é claramente compreendida, embora pareça envolver a atrofia das vilosidades e danos aos microvilos. Essas alterações são em parte correlacionadas com deficiências enzimáticas na superfície da mucosa e decréscimo na absorção, que retornam ao nível normal de atividade quando a infecção se resolve. Entretanto, os sinais, que incluem diarreia persistente, dor abdominal, desidratação e perda de peso rápida, são bastante variáveis e podem não ser evidentes em uma porção significativa de indivíduos (Thompson et al., 2000).

## 2.2. Principais espécies de *Giardia*

Com base na morfologia dos cistos e trofozoítos de *Giardia*, seis espécies são reconhecidas: *Giardia duodenalis* (sinônimo: *G. lamblia* ou *G. intestinalis*) que parasita uma grande variedade de mamíferos, incluindo humanos, animais de fazenda e animais de companhia; *Giardia agilis* parasita de anfíbios; *Giardia muris* parasita de roedores; *Giardia ardeae* e *Giardia psittaci* em aves; e *Giardia microti* parasita de ratazanas (Thompson, 2000; Van Keulen et al., 2002; Monis & Thompson, 2003; Thompson, 2004). As características de cinco espécies estão apresentadas na tabela 1.

**Tabela 1.** Principais espécies de *Giardia duodenalis*

Espécie	Hospedeiro	Morfologia dos trofozoítos	Dimensões (µm)
<i>G. duodenalis</i>	Humanos Animais domésticos Animais silvestres	Formato de pera com corpos medianos em formato de garras.	12–15/6–8
<i>G. agilis</i>	Anfíbios	Alongado, estreito, com corpos medianos em formato de dado.	20–30/4–5
<i>G. muris</i>	Roedores	Arredondados com corpos medianos pequenos e redondos	9–12/5–7
<i>G. ardeae</i>	aves	Arredondados, com entalhe proeminente no disco ventral e flagelo caudal rudimentar. Corpos medianos de formatos redondo-ovais a formato de garra	~10/~6.5
<i>G. psittaci</i>	aves	Formato de pêra, sem flagelo ventro-lateral flagelo. Corpos medianos em formato de garra	~14/~6

## 2.3. Taxonomia molecular de *Giardia duodenalis*

Classificada anteriormente com base em suas características morfológicas, a espécie *Giardia duodenalis* inclui organismos que possuem cistos e trofozoítos que são

semelhantes morfológicamente em uma grande variedade de hospedeiros mamíferos (Karanis & Ey, 1998). Entretanto, essa similaridade morfológica mascara significantes diferenças genéticas. Uma variedade de ferramentas moleculares, incluindo PCR-RFLP e sequenciamento de genes presentes no microrganismo, demonstraram que a espécie *Giardia duodenalis* é um enteroparasita geneticamente complexo; embora as características morfológicas dos cistos e trofozoítos recuperados de diferentes animais infectados sejam sempre idênticas (Van Keulen et al., 2002; Sulaiman et al., 2003).

Estudos comparando amostras de *G. duodenalis* originadas de diferentes hospedeiros foram capazes de identificar e caracterizar sete principais grupos genéticos nos quais estão contidas as populações de *G. duodenalis*. Esses grupos são geneticamente diferentes e encontram-se distribuídos mundialmente (Berrilli et al., 2004; Read et al., 2004). As amostras de *Giardia duodenalis* recuperadas de fezes humanas e de muitas outras espécies de mamíferos pertencem a dois principais grupos genéticos. Esses dois grupos tem sido descritos na Europa como “Polish” e “Belgian” (Homan et al., 1992) e na Austrália como “Assemblages” ou genótipo A e B (Ey et al., 1997). Novas análises provaram que esses grupos nomeados variavelmente são, de fato, geneticamente equivalentes (Ponce-Macotella et al., 2002; Monis et al., 2003).

Estudos baseados no sequenciamento genético de *G. duodenalis* de animais identificaram genótipos adicionais: genótipo C e D, isolados de cães (Monis et al., 1998); genótipo E, isolado de animais domésticos de fazendas incluindo bovinos, ovinos e caprinos (Ey et al., 1997); genótipo F, isolado de gatos e genótipo G, isolado de ratos (Sulaiman et al., 2003), conforme tabela 2.

**Tabela 2.** Classificação genética de *Giardia duodenalis*.

<b>Genótipos</b>	<b>Hospedeiros</b>
Genótipo A	Humanos e outros primatas, mamíferos domésticos e silvestres
Genótipo B	Humanos e outros primatas, castores, ratos, cães, ruminantes
Genótipo C	Caninos
Genótipo D	Caninos
Genótipo E	Bovinos, ovinos, caprinos, suínos, alpaca
Genótipo F	Gatos
Genótipo G	Ratos

As populações de *Giardia duodenalis* que pertencem aos genótipos C, D, E, F, G parecem possuir preferência seletiva pela infecção de determinados hospedeiros (por exemplo: genótipo C pelo cão) ou possuem uma especificidade parasitária relativa (por exemplo: Genótipo E para ruminantes como bovinos, ovinos e caprinos). Por isso, muitas vezes eles são denominados especificamente pelo nome dos hospedeiros que parasitam (exemplo: genótipo C e D, como “Dog genótipo” ou Genótipo F, como “cat genótipo”) (Sulaiman et al, 2003). A escala restrita desses genótipos espécie-específicos sugere que eles possam ser biologicamente distintos daqueles isolados que pertencem a genótipos capazes de parasitar vários hospedeiros (A e B).

Pesquisas nesta área de conhecimento ainda foram capazes de evidenciar que os genótipos A e B de *Giardia duodenalis* possuem sub-genótipos contidos em cada uma de suas populações (Monis et al., 2003). O genótipo A consiste de isolados que podem ser agrupados em dois distintos conjuntos; AI consiste de uma mistura de isolados recuperados de humanos e animais. Esse sub-genótipo está presente em várias partes do mundo e possui grande potencial zoonótico (O’Handley et al., 2000; Hunt et al., 2000; Huetink et al., 2001; Appelbee et al., 2003).

Em contraste, o sub-genótipo AII consiste inteiramente de isolados recuperados de humanos e, com raras exceções (Ponce-Marcote et al., 2002), não é encontrado em animais. O genótipo B compreende dois subgrupos chamados BIII e BIV, sendo o primeiro zoonótico e o último específico de humanos. (Monis et al., 2003; Read et al., 2002; Thompson, 2004; Itagaki et al., 2005). Os genótipos A e B podem conceitualmente serem vistos como representativos da espécie *G. duodenalis*, enquanto outros genótipos hospedeiros-adaptados deverão no futuro representar espécies separadas.

Esse dado também reflete o ponto de vista de alguns pesquisadores que sugerem mudanças na nomenclatura taxonômica da espécie, com o reconhecimento de alguns genótipos como espécies separadas, por exemplo, o genótipo F que infecta exclusivamente felinos como *Giardia felis* (Hunter & Thompson, 2000).

Esses achados fazem refletir questionamentos sobre o quanto a giardíase é de fato uma zoonose e o quanto animais, principalmente os domésticos e os que habitam em áreas próximas a sistemas de captação de água para consumo humano, podem contribuir significativamente para a infecção em seres humanos (Karanis & Ey, 1998, Thompson, 2000).

#### 2.4. Parasitismo por *Cryptosporidium* spp.

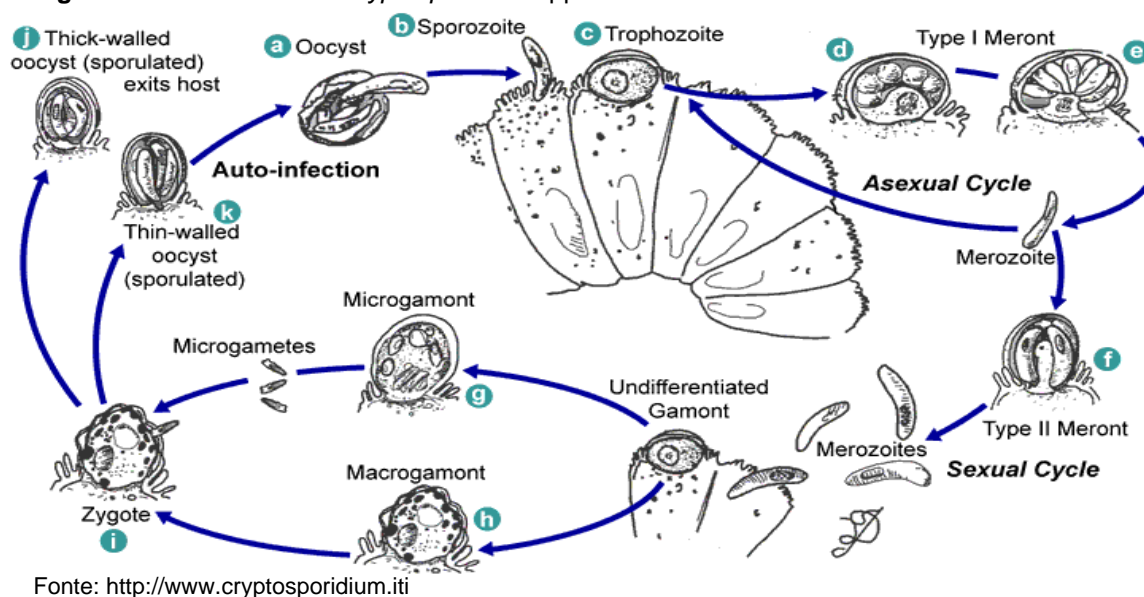
Os protozoários do gênero *Cryptosporidium* são parasitas intracelulares obrigatórios que pertencem ao filo Apicomplexa, capazes de parasitar as microvilosidades das células epiteliais do trato gastrointestinal (e em alguns casos do trato respiratório) de hospedeiros vertebrados. O protozoário causa danos aos microvilos das células da superfície da mucosa intestinal, com conseqüentes danos na eficiência da absorção dos nutrientes, podendo ocasionar quadro clínico de diarreia, gerando prejuízo na produtividade de animais de exploração comercial (Olson et al., 2004; Peng et al., 2003; Santin et al., 2004).

O gênero *Cryptosporidium* tem sido descrito em várias espécies de animais, incluindo humanos. Muitas espécies não possuem especificidade por hospedeiros e a transmissão entre eles pode ocorrer facilmente. Os oocistos de *Cryptosporidium* spp. variam em tamanho, apresentam-se de conformação esférica, possuindo estruturas internas de difícil visualização a microscopia óptica, com pouca ou nenhuma diferença morfológica capaz de distinguir as inúmeras espécies do gênero que são infectantes para os animais e para o homem (Huber et al., 2003; Morgan et al., 1998; Xiao et al., 2004). A presença de oocistos deste coccídeo no ambiente faz sugerir que humanos e animais podem adquirir a infecção através de diversas rotas de transmissão (Xiao et al., 2001; Guy et al., 2003). Em crianças e idosos, especialmente em creches, a transmissão antroponótica provavelmente desenvolve o papel principal na disseminação da infecção. Em áreas rurais, as infecções zoonóticas, via contato direto com animais de fazenda, têm sido muitas vezes descritas, mas a importância relativa desse tipo de transmissão não está inteiramente esclarecida.

O ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp. envolve uma fase assexuada e outra sexuada, com a formação de oocistos infectantes que são lançados no ambiente através das fezes. Conforme figura 2, o ciclo de vida de *Cryptosporidium* inicia-se após a ingestão do oocisto esporulado pelo hospedeiro (A). No intestino, os esporozoítos são liberados dos oocistos e infectam as células epiteliais da mucosa intestinal (B). Células epiteliais do pulmão também podem ser infectadas. Os esporozoítos então se diferenciam em trofozoítos (C), que se diferenciam por sua vez em merontes tipo I (D). Merozoítos produzidos por merontes do tipo I são liberados da célula do hospedeiro e podem infectar novas células, inicializando um novo ciclo de reprodução assexuada (E). Esses merozoítos podem iniciar a reprodução sexuada pela diferenciação em trofozoítos ou

iniciar o ciclo sexual pela diferenciação em merontes do tipo II (F). Os merozoítos originados dos merontes do tipo II irão resultar em um microgamonte masculino (G) e um macrogamonte feminino (H). Os microgamontes liberam microgametas que irão fundir-se aos macrogamontes realizando a reprodução sexuada (I). Os oocistos são produzidos após reprodução sexuada. Dois tipos de oocistos podem ser produzidos: oocistos de camada delgada (J), que são as formas infectantes encontradas no ambiente; e oocistos de camada fina (K) que são capazes de causar auto-infecção no hospedeiro.

**Figura 2.** Ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp.



## 2.5. Taxonomia de *Cryptosporidium* spp.

A taxonomia de *Cryptosporidium* spp. é confusa, incompleta e ainda objeto de muito debate no meio científico. Usando critérios baseados nas diferenças morfológicas dos oocistos, do local da infecção e da especificidade parasitária por determinada classe de hospedeiros; mais de vinte espécies de *Cryptosporidium* foram descritas. A maior parte das descrições, entretanto, foi realizada sem um cuidado criterioso na mensuração morfométrica dos oocistos ou dos dados relacionados à biologia da espécie e genética (Xiao et al., 2004). Historicamente, em 1910, Ernest Edward Tyzzer propôs a criação do gênero *Cryptosporidium* utilizando como referência *Cryptosporidium muris*, isolado nas glândulas gástricas de camundongos. Dois anos após, o mesmo autor identificou e nomeou como *Cryptosporidium parvum*, outra espécie isolada de camundongos, que possuía



oocistos menores e parasitava o intestino. Após o descobrimento inicial dessas duas espécies, um conceito errado de especificidade parasitária restrita foi aplicado ao gênero *Cryptosporidium*. Esse fato levou a criação de múltiplas novas espécies. Estudos subsequentes de transmissão cruzada entre as espécies demonstraram que os isolados de *Cryptosporidium* de diferentes animais podem frequentemente ser transmitidos de um hospedeiro para outro; fato esse que criou a prática de nomear espécies baseando-se na origem do hospedeiro e a sinonimização de muitos dessas novas espécies como *Cryptosporidium parvum* (Xiao et al., 2004). Entretanto, por um período curto de tempo, esses estudos muito limitados de transmissão cruzada (assegurados pelas indistinguíveis diferenças morfológicas dos oocistos) foram usados como evidência para a natureza monoespecífica do gênero *Cryptosporidium*, resultando no uso disseminado do nome *C. parvum* para oocistos encontrados em amostras fecais de todo tipo de mamíferos, incluindo humanos. Muitos outros isolados de *Cryptosporidium* spp. foram nomeados durante e após esse período e sobreviveram ao longo dos anos porque demonstraram algum tipo de diferença biológica das espécies *C. parvum* e *C. muris* já bem estabelecidas. Além das últimas, *C. baileyi* em galinhas, *C. felis* em gatos, *C. meleagridis* em perus, *C. saurophilum* em lagartos e *C. wairi* em porquinho da Índia; foram inicialmente relatadas como as principais espécies deste gênero encontradas em animais (Xiao et al., 2004). Através do uso da biologia molecular, algumas lacunas não compreendidas anteriormente foram fechadas (Xiao et al., 2002; Monis & Thompson, 2003). Recentes caracterizações moleculares têm demonstrado que existe uma extensa adaptação hospedeiro-específica na evolução do gênero *Cryptosporidium*, e muito mamíferos ou grupo de mamíferos, possuem genótipos (subtipos) de *Cryptosporidium* que são hospedeiro-adaptados e diferem-se de cada um através de sua infectividade e de sua constituição genética (Xiao et al., 1999a; Xiao et al., 1999b; Wu et al., 2003; Mallon et al., 2003).

Além de auxiliar no esclarecimento da taxonomia de todas as espécies de *Cryptosporidium*, os estudos moleculares também demonstraram que a espécie *Cryptosporidium parvum* possui diferentes genótipos. Oocistos de *C. parvum* foram isolados de humanos e bovinos infectados e tiveram seu DNA extraído, amplificado e analisado. As diferenças observadas pela análise de diversos genes foram usadas para distinguir inicialmente dois genótipos. O primeiro, *Cryptosporidium parvum* genótipo humano (também conhecido como tipo I, 1 ou *Human*) é antroponótico e capaz de parasitar apenas seres humanos (Xiao et al., 1999a; Xiao et al., 1999b).

O segundo, em contraste, *Cryptosporidium parvum* genótipo bovino (também conhecido como tipo II, 2 ou *Cattle*) é capaz de parasitar bovinos, ovinos, caprinos, humanos e outros mamíferos domésticos e silvestres (Spano et al., 1998; Patel et al., 1999; Yagita et al., 2001, Wu et al., 2003). O genótipo bovino ou tipo II é compreendido de populações distintas, algumas das quais foram associadas somente com seres humanos e outras associadas com seres humanos e animais, particularmente bovinos (Xiao et al., 1999). Ambos os genótipos de *C. parvum* foram implicados como maiores responsáveis pela infecção em humanos (Spano et al., 1998; Sulaiman et al., 1998; Guyot et al., 2001; MacLauchlin et al, 2000).

Estudos experimentais realizando infecções cruzadas entre espécies confirmaram a susceptibilidade da infecção por oocistos de *C. parvum* genótipo humano apenas para seres humanos e não para animais. Marcadas diferenças genéticas também foram observadas depois de análises de genes altamente polimórficos. Baseados nessas diferenças biológicas e moleculares, *C. parvum* genótipo humano (tipo I) foi separado em espécie e nomeado *Cryptosporidium hominis* (Morgan-Ryan et al, 2002).

Para evitar ainda mais confusão com a nomenclatura de *Cryptosporidium* spp. recomenda-se o uso do nome *C. parvum* apenas para o parasita previamente conhecido como *Cryptosporidium* genótipo bovino; devendo-se evitar o uso de *C. parvum* para outros tipos de *Cryptosporidium* encontrados em mamíferos e ainda não devidamente caracterizados. Dessa forma, *Cryptosporidium parvum* é a espécie conhecida de infectar principalmente ruminantes (bovinos, ovinos, caprinos e cervos) e humanos.

Outros genótipos de *Cryptosporidium parvum* encontrados em animais incluem o genótipo *mouse, horse, dog, cat, suis, rabbit, ferret, monkey, fox, goose, duck, cervid, bear, koala, kangaroo* e *marsupial* (Xiao et al, 2004). Todos eles foram diferenciados por seqüências polimórficas de vários genes, entre eles; Small Subunit Ribosomal RNA (Xiao et al., 1999a, Xiao et al., 1999b; Xiao et al., 2001, Santin et al., 2004), GP60 (Peng et al., 2003), TRAPC-2 (Sulaiman et al, 1998), HSP 70 (Sulaiman et al., 2000; Straub et al., 2002), COWP (Spano et al., 1998). A maior parte dos genótipos de *C. parvum* foram nomeados de acordo com a espécie ou classes de animais das quais eles foram derivados (Hunter e Thompson, 2005).

Após realização de vários experimentos e novas análises genéticas, alguns genótipos de *Cryptosporidium parvum* foram reconsiderados e classificados como espécies. Por exemplo, *C. parvum* “dog” genótipo e *C. parvum* “cat” genótipo são as espécies *Cryptosporidium canis* e *Cryptosporidium felis* respectivamente (Xiao et al.,

2001). Mais de 30 genótipos já foram descritos e acredita-se que muitos deles possam ser separados como novas espécies. Todavia a caracterização molecular de oocistos recuperados de animais infectados em muitas outras áreas endêmicas é requerida antes que essa suposição possa ser verificada (Xiao et al., 2004)

## 2.6. Espécies válidas de *Cryptosporidium* spp.

Apesar de 23 espécies de *Cryptosporidium* já terem sido descritas, recentes trabalhos utilizando critérios morfométricos, especificidade de hospedeiros e ferramentas moleculares como análise do DNA dos genes 18S rRNA, COWP, Trap-C1, *hsp70* (Xiao et al., 1999a; Xiao et al., 2000; Xiao et al., 2002) sugerem que apenas 16 espécies sejam válidas. Essas espécies são: *Cryptosporidium parvum*, *C. hominis*, *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. muris*, *C. suis*, *C. wrairi*, *C. felis* e *C. canis* encontrados em mamíferos; *C. baileyi* e *C. meleagridis* encontradas em aves; *C. serpentis* e *C. saurophilum* em répteis e; *C. molnari* em peixes (Xiao et al., 1999b; Xiao et al., 2001; Xiao et al., 2004; Lindsay et al., 2000; Fayer et al., 2006; Feng et al., 2007). Dentre essas, as espécies *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium hominis* são as mais disseminadas e importantes encontradas em animais domésticos e no homem (tabela 3).

**Tabela 3.** Classificação das espécies de *Cryptosporidium* e seus respectivos hospedeiros (segundo Xiao et al., 1999b; Xiao et al., 2001; Xiao et al., 2004; Lindsay et al., 2000; Fayer et al., 2006; Feng et al., 2007).

Espécie	Hospedeiro principal	Hospedeiro secundário
<i>C. muris</i>	Roedores, camelos	Caprinos
<i>C. andersoni</i>	Bovinos, camelos	Ovinos
<i>C. parvum</i>	Bovinos, ovinos, caprinos, humanos	Cervos, camundongos, suínos
<i>C. hominis</i>	Humanos, macacos	
<i>C. wrairi</i>	Porquinho da Índia	
<i>C. felis</i>	Gatos	Humanos, Bovinos
<i>C. canis</i>	Cães	Humanos
<i>C. meleagridis</i>	Perus, humanos	Papagaios
<i>C. baileyi</i>	Galinhas, perus	Codornas, avestruz, patos
<i>C. galli</i>	Galinhas	
<i>C. serpentis</i>	Serpentes, lagartos	
<i>C. saurophilum</i>	Lagartos	serpentes
<i>C. suis</i>	Suínos	
<i>C. hominis</i>	Humanos	
<i>C. molnari</i>	Peixes	
<i>C. bovis</i>	Bovinos	

## 2.7. Recentes genótipos descritos de *Cryptosporidium* que parasitam ruminantes

*Cryptosporidium parvum* é a espécie mais frequentemente estudada devido a sua elevada ocorrência e relevância em animais e humanos. Atualmente existem fortes evidências de que numerosos genótipos geneticamente distintos contidos no grupo *C. parvum* possam ser espécies separadas (Mallon et al., 2003). De forma que cada vez mais freqüente novos genótipos de *C. parvum* têm sido identificados; e parece que a dinâmica da transmissão é mais complicada do que se pensava anteriormente (Xiao et al., 2000; Xiao et al., 2004; Fayer et al. 2006).

Xiao et al. (2002) descreveram pela primeira vez *Cryptosporidium* genótipo *deer* em amostras fecais originadas de dois cervos de cauda branca na América do Norte. Em um estudo de prevalência de *Cryptosporidium* em 14 fazendas de exploração de leite em regiões dos Estados Unidos, através da técnica da PCR e do sequenciamento do gene 18S rRNA, Santín et al. (2004) detectaram 44 bezerros infectados com um novo genótipo de *Cryptosporidium*, ao qual nomearam de *Cryptosporidium* genótipo *deer-like*, pois essa nova cepa possuía 99% de identidade genética com a descrita por Xiao et al (2002).

*Cryptosporidium* Bovino genótipo B<sup>1</sup>, identificado em duas amostras fecais de bovinos foi descrito pela primeira vez por Xiao et al (2002). No mesmo estudo realizado por Santin et al. (2004), foram detectados 79 bezerros infectados com um novo genótipo de *Cryptosporidium*, ao qual nomeou-se *Cryptosporidium* Bovino genótipo B, pois essa nova cepa possuía 100% de identidade com a descrita por Xiao et al (2002). Alguns anos mais tarde, Fayer et al. (2005) baseados nestes estudos, e através de caracterizações moleculares e biológicas, classificaram *Cryptosporidium* Bovino B como uma espécie separada, nomeada *Cryptosporidium bovis*.

Tanto *Cryptosporidium bovis* quanto *Cryptosporidium* genótipo *deer-like* possuem oocistos morfologicamente semelhantes aos de *C. parvum* e foram detectados apenas em bovinos (Santín et al., 2004; Fayer et al., 2006; Feng et al., 2007). Ambos são geneticamente relacionados (Xiao et al., 2002; Xiao et al., 2004).

Perz & Le Blancq. (2001) em um estudo epidemiológico da infecção por *Cryptosporidium* spp. em uma população de cervos de cauda branca (*Odocoileus virginianus*) e animais silvestres no Estado de Nova York, Estados Unidos, descreveram pela primeira vez a presença de um genótipo não identificado anteriormente. Foi

---

<sup>1</sup> C. bovino genótipo B ≠ *C. parvum* genótipo bovino

constatado por da Silva et al. (2003), que a seqüência nucleotídica desses isolados possuíam 100% de identidade genética a isolados detectado por eles em primatas (*Propithecus verreauxi coquereli*).

Mais tarde, a nomenclatura *Cryptosporidium* genótipo *cervine* foi estabelecida. Esse genótipo também foi recentemente isolado em humanos (Ong et al., 2002; Trotz-Williams et al., 2006; Soba et al., 2006) e ovinos (Ryan et al., 2005; Santin et al., 2007). Como *Cryptosporidium* genótipo *cervine* parece estar disseminado em humanos e animais, ele pode vir a emergir como um importante patógeno de caráter zoonótico.

## **2.8. As recentes transformações sofridas no gênero *Cryptosporidium***

A taxonomia do gênero *Cryptosporidium* vem passando por mudanças periódicas na medida em que: (i) novos genótipos foram descritos; (ii) genótipos anteriormente descritos foram classificados como espécies separadas; (iii) houve o desenvolvimento de ferramentas moleculares de genotipificação, as quais se adaptaram rapidamente a cada descrição e surgimento de novos genótipos; (iv) a alta freqüência de detecção de *Cryptosporidium* e o caráter zoonótico de determinadas espécies/genótipos aliado aos esforços de pesquisadores para resolver a taxonomia do gênero, contribuiu para um número grande de estudos baseados em metodologias ligadas à biologia molecular, uma vez que somente com essa metodologia se pode identificar os isolados de *Cryptosporidium* ao nível de espécie/genótipo.

Tomando por exemplo, quando Santin et al. (2004) descreveram a presença e prevalência em bovinos de *Cryptosporidium* *bovis*, esses pesquisadores ainda nomeavam esses isolados como: *C. Bovino* genótipo B, pois eram 100% idênticos aos 2 únicos isolados caracterizados anteriormente por Xiao et al. (2002). Um ano depois, Fayer e colaboradores (2005) conseguiram provar que tratava-se de uma espécie separada e a nomeou *Cryptosporidium bovis*.

Da mesma forma, Santin et al. (2004) também identificaram e descreveram a prevalência de *C. genótipo deer-like*, nomeado dessa maneira por possuir 99,5%, de identidade genética com *C. genótipo deer*; que somente tinham sido identificado anteriormente em uma única amostra isolada de cervo por Xiao et al. (2000) nos Estados Unidos. Até hoje, nenhum autor conseguiu provar se *Cryptosporidium* genótipo *deer-like* é uma nova espécie (de forma semelhante à *C. bovis*) ou se trata apenas de mais um genótipo descrito de *Cryptosporidium* spp., na medida em que já existem cerca de 30

genótipos descritos (Feng et al., 2007). Quando alguns desses genótipos foram descritos, poderia tratar-se apenas de mais um novo relato de genótipos no meio científico, visto as mínimas diferenças genéticas que apresentavam. Da mesma forma que o nome *Cryptosporidium pestis* (Spaleta, 2006) foi proposto em substituição a *C. parvum* (genótipo bovino) e não foi aceito pelo meio científico internacional (Xiao et al. 2006). De acordo com o código internacional de nomenclatura zoológica (ICZN), o “genótipo bovino” de *Cryptosporidium parvum* nunca foi formalmente nomeado e atualmente ele não possui nenhum nome disponível (Spaleta, 2006).

Nos anos de 2004, 2006 e 2007 foram consideradas válidas 13, 15 e 16 espécies de *Cryptosporidium* respectivamente. Esse fato mostra as recentes transformações sofridas no gênero *Cryptosporidium*.

## **2.9. *Giardia* e *Cryptosporidium* no rebanho bovino e ovino**

*Giardia duodenalis* tem sido descrita em bovinos de exploração leiteira e de carne em todo o mundo. As taxas de prevalência podem variar muito entre países, provavelmente por reflexo das diferenças de manejo, clima e tipo de estudo empregado para determinação do diagnóstico das infecções. A infecção por esse parasita ocorre facilmente entre bezerros agudamente infectados e entre adultos cronicamente infectados.

A ocorrência das infecções por *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em rebanhos bovinos tem sido descrita em várias regiões geográficas. Estudos no Canadá (Olson et al., 1997a; Appelbee et al., 2003; Ralston et al., 2003; MacAllister et al., 2005), Austrália (O’Handley et al., 2000), Bélgica (Geurden et al., 2004), Nova Zelândia (Hunt et al., 2000), Estados Unidos (Peng et al., 2003; Santin et al., 2004; Fayer et al., 2006), Espanha (Castro-Hermida et al., 2006), Inglaterra (Robinson et al., 2006), Hungria (Plutzer & Karanis, 2007), Holanda (Huetink et al., 2001) e Brasil (Paz e Silva et al., 2006) tem pesquisado e identificado animais infectados por ambos parasitas.

Insuficiente atenção foi dada ao papel de *Giardia* e *Cryptosporidium* como agentes etiológicos de enfermidades e de perdas na produção no rebanho bovino, particularmente aos efeitos de infecções sub-clínicas e crônicas (Olson et al., 2004). Estudos Norte-Americanos, Australianos e Europeus demonstraram que ambos os parasitas podem apresentar taxas de infecção tão elevadas quanto 100% em alguns rebanhos, e relataram uma associação entre a infecção simultânea por esses dois protozoários e a presença de

diarréia e suas significativas perdas na produção (Olson et al., 1997a; O'Handley et al., 2000; Huetink et al., 2001; Olson et al., 2004).

Após a comprovação de altas taxas de prevalência de *Giardia* e *Cryptosporidium* em bovinos, recentes estudos têm sido providenciados para determinar o nível de infecções em ovinos (Majewska et al., 2000; Chalmers et al., 2002). Aloísio et al. (2006) descreveram casos de giardiase em cordeiros, implicando o protozoário como único agente responsável pela presença de sinais clínicos nos animais. Os resultados obtidos demonstraram que *G. duodenalis* pode causar uma síndrome de má absorção grave em cordeiros, e conseqüentemente, relevantes perdas econômicas; sugerindo que *G. duodenalis* deva sempre ser considerada no diagnóstico diferencial em animais que apresentem decréscimo no ganho de peso ou em casos prolongados de diarréia que não são responsivos ao tratamento com antibióticos. Xiao et al. (1993) também relataram a presença de sinais clínicos em cordeiros que apresentavam altas contagens de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas fezes. Em ovinos, a prevalência de *Giardia duodenalis* foi determinada em 1,5% na Itália (Giangaspero et al., 2005) e 11,6% nos Estados Unidos (Santin et al., 2007). Enquanto que *Cryptosporidium* spp. foi detectado em 30 % nos EUA (Santin et al. 2007), 26% na Austrália (Ryan et al., 2005) e em 53% no Reino Unido (Chalmers et al., 2002).

## **2.10. Genótipos de *Giardia duodenalis* encontrados em ruminantes**

O padrão de infecção por *Giardia duodenalis* é similar em bovinos leiteiros e de carne (O'Handley et al., 1999; Ralston et al., 2003), com o aparecimento de cistos nas fezes desde as primeiras quatro semanas de idade. Bezerros possuem as maiores taxas de excreção de cistos ( $10^5$ – $10^6$  por grama) entre quatro e doze semanas de idade (O'Handley et al., 1999; Ralston et al., 2003). Os cistos de *Giardia duodenalis* encontrado nas fezes de bovinos apesar de idênticos aos apresentados em outros animais domésticos e no homem, podem pertencer a sub-populações do microorganismo que são geneticamente diferentes (genótipos).

Bovinos e ovinos são susceptíveis a infecção com três genótipos de *Giardia duodenalis*: os zoonóticos genótipos A e B (O'Handley et al., 2000, van Keulen et al., 2002; Giangaspero et al., 2004; Aloísio et al., 2006) e o genótipo E hospedeiro-específico (Appelbee et al., 2003).

## 2.11. Espécies/genótipos de *Cryptosporidium* encontrados em ruminantes

Em bovinos, quatro espécies/genótipos de *Cryptosporidium* com marcadas diferenças biológicas e genéticas foram descritas: *Cryptosporidium parvum* (genótipo bovino), *Cryptosporidium andersoni* (conhecido anteriormente como *Cryptosporidium muris*; Lindsay et al., 2000), *Cryptosporidium bovis* (conhecido anteriormente como *C. bovis* genótipo B; Fayer et al., 2005) e *Cryptosporidium* genótipo *deer-like* (Santin et al., 2004 and Xiao et al., 2004; Fayer et al., 2006; Feng et al., 2007; Plutzer & Karanis, 2007).

Entretanto, as espécies de *Cryptosporidium* identificadas com maior frequência em ruminantes são *Cryptosporidium parvum* no intestino e *Cryptosporidium andersoni* no abomaso. Em adição a diferenças encontradas no local de predileção do parasitismo no hospedeiro, essas duas espécies possuem oocistos morfologicamente distintos e também diferem geneticamente uma da outra (Lindsay et al, 2000; Xiao et al., 2000; Olson et al., 2004).

A ocorrência dessas espécies de *Cryptosporidium* em bovinos parece ser ligada à idade (Fayer et al., 2006; Santin et al., 2004). *Cryptosporidium parvum*, a única espécie zoonótica prevalente em bovinos, é responsável por 85% das infecções por *Cryptosporidium* em bezerros em idade de pré-desmame (0-2 meses), mas por apenas 1% das infecções em bezerros em idade de pós-desmame (2-11 meses) e novilhas (1-2 anos). Bezerros em idade de pós-desmame e novilhas são, na maior parte das vezes, infectados com *C. andersoni*, *C. bovis* e *Cryptosporidium* genótipo *deer-like* (Fayer et al., 2006; Santin et al., 2004).

### 2.11.1. *Cryptosporidium parvum*

*Cryptosporidium parvum* é comumente encontrado em bovinos jovens, sendo um importante causa de diarreia em bezerros de 2-3 semanas de idade. Bezerros frequentemente se tornam infectados entre a primeira e quarta semana de vida e a duração da infecção é curta (cerca de duas semanas). A excreção de oocistos pelos animais pode iniciar tão cedo quanto dois dias de idade, com média de maior excreção ocorrendo aos 14 dias de idade (Olson et al., 2004).



### 2.11.2. *Cryptosporidium andersoni*

*Cryptosporidium andersoni* é outra espécie que infecta naturalmente ruminantes domésticos (Lindsay et al., 2000; Robinson et al., 2007). Essa espécie infecta o abomaso podendo causar gastrite, sendo mais comum em bovinos adultos, embora possa ocorrer em animais de todas as idades. Em termos de saúde pública, não representa grande ameaça devido a sua especificidade por ruminantes (Huetink et al., 2001, Peng et al., 2003; Xiao et al., 2004; Hunter & Thompson, 2005).

### 2.11.3. Genótipos

Atualmente, *Cryptosporidium bovis* (antes conhecida como *Cryptosporidium* bovino genótipo B) e *Cryptosporidium* genótipo *deer-like* tem sido diagnosticados apenas em bovinos nos Estados Unidos (Fayer et al., 2006, Santín et al., 2004; Xiao et al., 2002), desconhecendo-se sua prevalência em outros países.

A espécie *C. bovis* foi encontrada predominantemente infectando bezerros entre 2 a 11 meses de idade, não sendo associado com doença (Santín et al., 2004). *Cryptosporidium* genótipo *deer-like* foi descrita tanto em bezerros em idade de pré-desmame quanto em animais em idade de pós-desmame (tabela 4), não sendo também associado a sinais de doença (Santín et al., 2004).

**Tabela 4.** Espécies e genótipos de *Cryptosporidium* que infectam bovinos

<b>Especie</b>	<b>Prevalência- Idade</b>	<b>Local do parasitismo</b>	<b>Distribuição</b>
<i>C. parvum</i>	Pré-desmame	Intestino	Mundial
<i>C. andersoni</i>	Pós-desmame	Estômago	Mundial
<i>C. bovis</i>	Pós-desmame	Intestino	EUA
<i>C. genótipo deer-like</i>	Pré e pós demame	Intestino	EUA

Em ovinos uma longa lista de espécies/genótipos tem sido identificados, alguns dos quais ainda são descritos como espécies/genótipos desconhecidos (Chalmers et al., 2002). Santín et al. (2007) identificaram nos Estados Unidos *C. parvum*, *C. genótipo cervine* e um genótipo 99.9% semelhante a *Cryptosporidium bovis* denominado *C. bovis-like*. Na Austrália, Ryan et al. (2005) observaram a presença em ovinos de *C. hominis*, *C. andersoni*, *C. suis*, *C. genótipo cervine* e *C. genótipo marsupial*.

## 2.12. Zoonose

A conexão entre a infecção em animais e humanos tem sido uma questão que domina a maior parte das recentes pesquisas envolvendo *Giardia* e *Cryptosporidium* (Hunter & Thompson, 2005). Recentemente, o uso de técnicas ligadas a genética molecular vem sendo empregadas com sucesso no diagnóstico e caracterização desses protozoários. Através dessa metodologia vários estudos epidemiológicos demonstraram uma forte ligação entre o contato com animais infectados e a infecção em humanos (Hopkins et al., 1997; Traub et al., 2003). Com o objetivo de melhor entender o potencial zoonótico das infecções por *Giardia* e *Cryptosporidium* de animais domésticos e silvestres, é importante determinar o quanto humanos e outros animais são susceptíveis à infecções com formas geneticamente idênticas de ambos os parasitas e qual a frequência desses genótipos em ambos (Monis & Thompson, 2003; Hunter & Thompson, 2005). Numerosos estudos têm caracterizado isolados de *Giardia* e *Cryptosporidium* coletados de diferentes hospedeiros e tem demonstrado a ocorrência da mesma espécie/genótipo em humanos e animais.

### 2.12.1. *Giardia duodenalis*

Embora ao longo dos anos os animais de companhia tenham sido considerados potenciais fontes de infecção humana por *Giardia*, estudos nos quais cistos recuperados de cães e gatos são genotipados claramente demonstram que esses animais são frequentemente parasitados por genótipo hospedeiros adaptados: *Giardia duodenalis* genótipo C no cão; e genótipo F no gato (Abe et al., 2003; Macglade et al., 2003). Dessa forma, cães e gatos e provavelmente outros animais de companhia exercem um papel pequeno e podem não ser importantes reservatórios zoonóticos das infecções por *Giardia duodenalis*.

Em contrapartida, embora bovinos leiteiros e de carne estejam geralmente infectados com *Giardia duodenalis*, ainda existem evidências para suportar seu papel como reservatório da infecção nos seres humanos (não o principal, porque se deve levar em consideração que a taxa de transmissão entre humanos é alta, principalmente em áreas endêmicas). Estudos que compararam, em diversas regiões geográficas, a prevalência dos genótipos de *Giardia duodenalis* em bovinos de carne e leite e indicaram que 90% desses animais possuíam infecções com o genótipo não-zoonótico de *G.*

*duodenalis* (genótipo E). A prevalência do genótipo A em bezerros varia bastante entre os animais (O'Handley et al., 2000; Huetink et al., 2001; Alpelbe et al., 2003), podendo chegar até a 50% das propriedades rurais estudadas (Trout et al., 2004).

Bezerros infectados com *Giardia* frequentemente excretam cerca de  $10^5$  a  $10^6$  cistos/g de fezes. Dessa forma, mesmo que apenas uma quantidade mínima de animais no rebanho esteja infectada com o genótipo A ou B, eles podem representar um significativo risco a saúde pública.

Em humanos, a infecção por *G. duodenalis* é frequentemente auto-limitante, podendo ser grave em pacientes desnutridos, imunodeficientes ou em crianças e idosos (Loyd et al, 2002).

### **2.12.2. *Cryptosporidium* spp.**

Cinco espécies de *Cryptosporidium* já foram descritas infectando humanos: *Cryptosporidium hominis* (antigamente chamado *C. parvum* genótipo humano ou tipo I), *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis* e *C. canis* nesta ordem de prevalência. Além dessas espécies, um novo genótipo, *Cryptosporidium* genótipo *cervine* foi descrito parasitando humanos (Ong et al., 2002; Soba et al., 2006).

Nos seres humanos, a doença causa diarreia autolimitante de duração de sete a dez dias em indivíduos imunocompetentes, entretanto pode ser fatal em pacientes imunossuprimidos pelo vírus da Imunodeficiência adquirida (AIDS) ou com câncer (Gatei et al., 2003). Entre pacientes com criptosporidiose na fase aguda, tanto imunocompetentes quando imunodeficientes, a quantidade de oocistos excretados nas fezes é grande o suficiente para ser detectado por varias técnicas laboratoriais de diagnóstico. Entretanto quando a infecção aguda se resolve e o paciente se torna assintomático, o número de oocistos diminui drasticamente, tornando o diagnostico complicado.

O número de oocistos excretados nas fezes varia de dia a dia e de semana a semana (Garcia e Shimizu, 1997). A dose infectante de *Cryptosporidium* necessária para a infecção em humanos pode ser relativamente pequena. A ausência de um tratamento efetivo para a criptosporidiose enfatiza a necessidade para o entendimento da epidemiologia da doença e a correta identificação e caracterização das rotas e fontes de transmissão, proporcionando dessa forma que sejam implementadas medidas de prevenção eficazes.

### **2.13. *Giardia* e *Cryptosporidium* como enfermidades veiculadas pela água**

A infecção do hospedeiro por *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. pode ocorrer tanto pelo contato direto animal-humano via oro-fecal; ou por via indireta através do consumo de alimento ou água contaminados. Há evidências circunstanciais da giardíase e criptosporidiose humana associada com água contaminada (Xiao et al., 2001), visita à fazendas, e a exposição e manejo de animais domésticos infectados, particularmente bezerros (Thompson, 2004).

Embora os trabalhadores de propriedades rurais e as pessoas que as visitam possam contrair giardíase e criptosporidiose pelo contato direto, a transmissão zoonótica indireta, de origem bovina, através da água tem sido considerada por muito tempo como a fonte mais importante da infecção zoonótica humana (Monis & Thompson, 2003).

A transmissão desses parasitas através do consumo de água é de interesse crescente atualmente, porque essa via de infecção tem o potencial de atingir um número grande de indivíduos (Appelbee et al., 2003). Formas infectantes desses dois protozoários podem chegar a fontes de água utilizada para consumo humano através do escoamento das pastagens de bovinos (contaminação de fontes de água para abastecimento e consumo humano, águas superficiais e recreacionais), com diversos casos de epidemias relatadas no mundo, particularmente nos Estados Unidos e Reino Unido (Thompson, 2000; Xiao et al., 2001). A fonte de cistos/oocistos em epidemias associados ao consumo de água contaminada no Reino Unido tem sido atribuída à contaminação da água por fezes de origem humana e animal.

### **2.14. Diagnóstico de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp.**

Os métodos convencionais de diagnóstico incluem as técnicas de concentração-flutuação fecal para a observação de cistos de *Giardia duodenalis* e o exame de esfregaços fecais corados com corantes ácido-rápidos, como Ziehl-Neelsen ou fucsina-carbólica, para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. Esses são os dois métodos mais usados na rotina laboratorial. Entretanto, a microscopia óptica consome bastante tempo do analisador e requer experiência para identificação dos (oo)cistos dos microorganismos. Em adição, o limite de detecção dessas técnicas é sempre relatado como baixo. Métodos baseados na imunologia foram desenvolvidos para uso diagnóstico em amostras fecais (Boone et al., 1999; Aziz et al., 2001; Cirak & Bauer, 2004). Todavia,

a variabilidade antigênica contida em isolados desses protozoários (principalmente para *Cryptosporidium* spp.) pode proporcionar resultados falsamente negativos, e há relatos conflitantes sobre a sensibilidade dos métodos imunoenzimáticos comparados aos de microscopia óptica (Hanson & Cartwright, 2001).

Os métodos baseados na detecção do DNA (PCR) foram introduzidos e tem sido descritos como muito sensíveis para detecção desses patógenos em amostras fecais (Morgan et al., 1998). Essa laboriosa tecnologia requer profissionais qualificados para sua execução e ainda é de custo alto para ser usada como teste de rotina, embora possua sensibilidade analítica e diagnóstica superior aos outros métodos (Macglade et al., 2003).

### **2.15. Situação no Brasil**

Estudos de genética molecular de *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em ruminantes domésticos são escassos no Brasil e pouco se conhece sobre a real identidade genética de cistos de *Giardia duodenalis* e oocistos de *Cryptosporidium* sp. anteriormente descritos. A detecção em animais de cistos/oocistos de ambos parasitas que são morfologicamente e geneticamente indistinguíveis daqueles encontrados em humanos aumentou o interesse sobre a importância dos animais domésticos e silvestres na epidemiologia da doença nos seres humanos (Yagita et al., 2001; Wu et al., 2003).

A incidência da infecção por *Giardia* e *Cryptosporidium* e a caracterização genética das espécies/genótipos no rebanho bovino e ovino na região de Botucatu-SP, não é conhecida, sendo também pouco estudada em outras áreas do país. Nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, a caracterização molecular desses parasitas foi iniciada partindo da análise do DNA dos microorganismos presentes em amostras fecais isoladas de animais domésticos (Thomaz, 2006; Huber et al., 2006) e silvestres (Souza et al., 2006; Meireles et al., 2006). A maior parte dos estudos realizados anteriormente aos citados acima, foram baseados apenas nas características morfológicas dos cistos e oocistos de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp., fato esse que sabidamente não é capaz de identificar as espécies/genótipos.

### 3. OBJETIVO

#### Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho foi detectar e caracterizar geneticamente por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e do polimorfismo no tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP) *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. identificados em amostras fecais de bovinos e ovinos.

#### Objetivos específicos

- Determinar a ocorrência de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em 10 propriedades de bovinos leiteiros na região do município de Botucatu, Estado de São Paulo, caracterizando geneticamente esses protozoários através da técnica de PCR-RFLP
- Determinar a ocorrência de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp em 1 propriedade de criação de ovinos do município de Tupi Paulista, Estado de São Paulo, caracterizando geneticamente esses protozoários através da técnica de PCR-RFLP.
- Analisar comparativamente a utilização das técnicas de microscopia óptica, Imunoensaio enzimático de captura de coproantígeno (ELISA) e Reação em Cadeia da Polimerase no diagnóstico de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de ruminantes.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Animais e propriedades**

Foram coletadas 200 amostras fecais de bovinos, sendo 100 de bezerros e 100 de animais adultos, provenientes de 10 propriedades rurais de exploração comercial de bovinos leiteiros localizadas em diferentes regiões do município de Botucatu e Itatinga, Estado de São Paulo. Os animais engajados na pesquisa foram classificados em bezerros (animais com até 180 dias de idade) e adultos (animais >181 dias de idade), sendo o material colhido aleatoriamente do rebanho, independente da raça e condição física, de acordo com a disponibilidade de animais no local. Durante este procedimento, foram preenchidos formulários contendo os dados dos animais como identificação, sexo, raça, idade, habitat, presença ou ausência de diarreia no momento da coleta, além de dados relacionados à propriedade e ao manejo.

Os bovinos alocados no experimento integravam o rebanho das propriedades rurais, as quais estavam localizadas em regiões próximas aos municípios de Botucatu-SP (7 propriedades) e Itatinga-SP (3 propriedades). Essas propriedades, com características variando entre sítios e grandes fazendas comerciais, possuíam bovinos de exploração leiteira, de forma que, a extração do leite, aliado com a agricultura e a criação de animais, era a principal fonte de renda da propriedade. Cinco propriedades possuíam ordenha mecânica, enquanto que nas demais a ordenha era manual. Sob o ponto de vista das características das instalações, três propriedades possuíam instalações consideradas precárias.

Botucatu está localizada na região centro-sul do estado de São Paulo, a 247 km da capital, a 200 km de Campinas, 110 km de Piracicaba e 90 km de Bauru. Ela faz divisa, entre outras, com as cidades de Avaré e Itatinga. A temperatura média é de 22°C, e no inverno, a média fica em 17°C. O período da coleta variou entre a época seca (4 fazendas) e chuvosa (6 fazendas).

Foram coletadas também 100 amostras fecais de ovinos (40 ovelhas, 30 cordeiros, e 30 machos jovens) da raça Ile de France e 12 amostras de bovinos provenientes de 1 propriedade rural localizada no município de Tupi Paulista, Estado de São Paulo.

Essa propriedade foi alocada neste experimento por já ser cooperante em outro estudo relacionado a infecções experimentais cruzadas entre helmintos de bovinos e ovinos que vivem em um mesmo ambiente de criação (Fernandes, 2006). Parte dos

animais do referido estudo foram selecionados e tiveram amostras fecais coletadas e utilizadas neste experimento. Os doze bovinos que tiveram amostras fecais coletadas nesse estudo eram animais mestiços, machos, castrados com mais de dois anos de idade com peso aproximado de 350 kg. As ovelhas eram primíparas com dois a cinco anos de idade, enquanto que os cordeiros nasceram durante o experimento e permaneceram nos piquetes junto com as mães. A média de idade dos cordeiros era de 60 dias. Após a coleta de fezes, esses animais foram retirados da área experimental, de acordo com a metodologia adotada por Fernandes (2006). Foram introduzidos junto com as ovelhas e cordeiros, 30 machos jovens, com idade aproximada de 5 meses, chamados de “cordeiros traçadores”, vermifugados previamente e livres de infecções helmínticas. Os “cordeiros traçadores” eram animais introduzidos no pasto com o intuito de “limpar” a área de pastejo antes da introdução dos cordeiros mais novos e mais susceptíveis a infecções parasitárias gastrintestinais, ou seja, animais que se infectam com altas cargas parasitárias para evitar que cordeiros recém desmamados sejam atingidos de forma severa por parasitas intestinais, mediante a sua primeira pastagem. Após um período de pastejo de 32 dias, os cordeiros traçadores foram estabulados por mais 28 dias e no final desse período foram eutanasiados e tiveram as fezes coletadas. A coleta de amostras dos animais selecionados para o presente estudo aconteceu entre os meses de Junho a Dezembro de 2005 (tabela 5).

**Tabela 5.** Número de amostras colhidas das diferentes categorias de animais realizada entre os meses de junho a dezembro de 2005.

<b>Animais</b>	<b>Nº de amostras</b>	<b>Data da coleta</b>
Ovelhas	40	Novembro
Cordeiros	30	Novembro
Cordeiros traçadores	30	Junho (11), Setembro (12), Novembro (7)
Bovinos	12	Junho (6), Dezembro (6)

O número em parênteses indica a quantidade de animais coletados no mês.

A área experimental total possuía 8.4 hectares contendo pasto composto de capim *Panicum maximum* cv. Tanzânia e foi dividida em seis módulos de pastagem de 1.4 hectares cada. A lotação dos módulos foi de 15.6 ovelhas/hectare ou de 2.85 bovinos/hectare. A área de cada módulo de pastagem foi subdividida em oito piquetes. No centro de cada módulo havia uma estrutura coberta que propiciava ambiente com sombra onde ficavam os bebedouros e os cochos com sal mineral à vontade.

A localização de cada uma das 10 propriedades onde foram coletadas amostras fecais de bovinos leiteiros na região do município de Botucatu e Itatinga, Estado de São



Paulo, está exemplificada na figura 3. Para a obtenção exata da localização das propriedades foi utilizado aparelho de posicionamento global –GPS. A área experimental total da propriedade em Tupi Paulista –SP, onde foram coletadas amostras de ovinos e bovinos, está apresentada na figura 4. Os animais experimentais das propriedades rurais da região de Botucatu-SP, bem como uma das instalações do curral de uma das propriedade, estão exemplificados na figura 5.

## **4.2. Diagnóstico laboratorial de *Giardia* e *Cryptosporidium***

### **4.2.1. Local das análises**

O trabalho foi desenvolvido em conjunto no Laboratório de Enfermidades Parasitárias dos Animais, localizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ–UNESP, Campus de Botucatu, Estado de São Paulo (local de recebimento, processamento e análise microscópica das amostras) e no laboratório de Diagnóstico Molecular do Departamento de Microbiologia/Imunologia do Instituto de Biociências, IBB–UNESP, Campus de Botucatu.

### **4.2.2. Processamento das amostras**

Aproximadamente 1-2 gramas de fezes foram separadas para análises microscópicas. Para os testes Enzimáticos (Kit ELISA), uma alíquota do tamanho aproximado de um caroço de feijão (aproximadamente 200mg de fezes) foi colocada em tubos<sup>2</sup> de 15 ml contendo 5 ml de formalina 10%. Para as análises moleculares, 180-220 mg de fezes foram pesadas em balança de precisão<sup>3</sup> e colocadas em duplicata em microtubos<sup>4</sup> de 2ml, sendo mantidas a –20°C até a extração do DNA. As análises microscópicas foram realizadas no mesmo dia da coleta. A extração do DNA foi realizada no máximo até cinco dias após a coleta, enquanto que os testes enzimáticos foram realizados em até seis meses após a coleta (fezes conservadas em formalina 10%) de acordo com as recomendações do fabricante do Kit Elisa<sup>5</sup>.

---

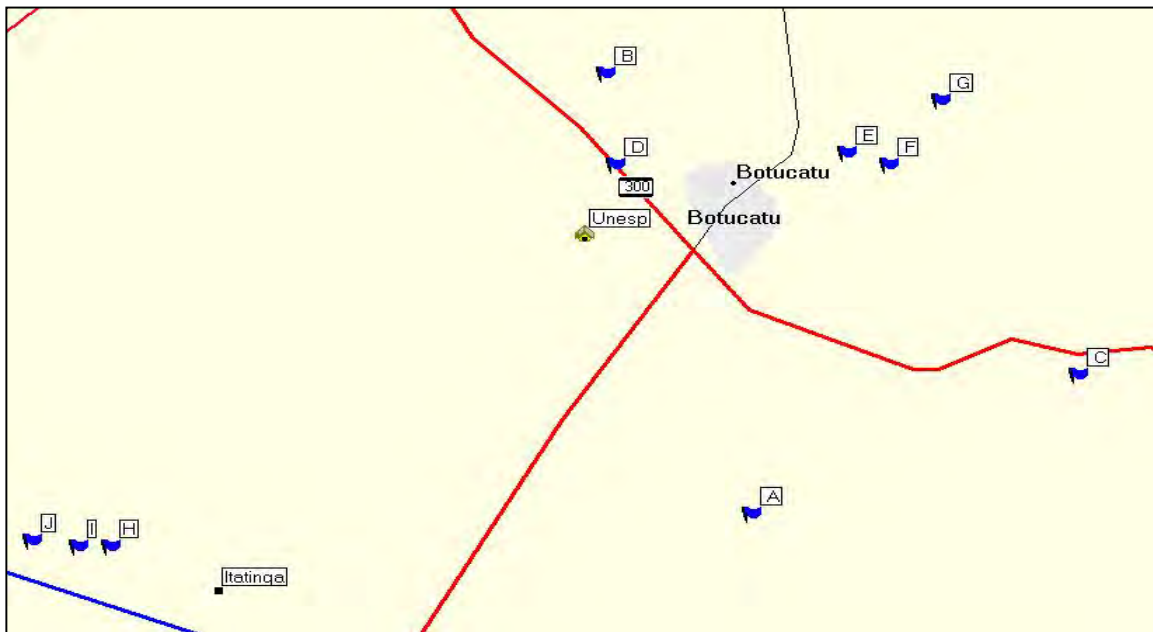
<sup>2</sup> Corning®

<sup>3</sup> Tecna®

<sup>4</sup> Eppendorf safe lock 2ml® -Germany

<sup>5</sup> (Techlab, Blacksburg, EUA).

**Figura 3.** Distribuição das propriedades na região de Botucatu e Itatinga, Estado de São Paulo, onde foram coletadas 200 amostras de bovinos leiteiros. As bandeirinhas em azul demonstram a localização de cada propriedade. Cada propriedade está representada por uma letra (A até J). No centro também pode ser observado o ponto relativo ao centro da cidade de Botucatu, a rodovia Castelo Branco- SP 300 (em vermelho), a localização do Campus Universitário da UNESP e o ponto relativo a cidade de Itatinga, São Paulo.



**Figura 4.** Vista aérea da divisão dos piquetes dos animais da propriedade em Tupi Paulista - São Paulo.



**Figura 5.** Bovinos alocados no experimento originados das 10 propriedades rurais da região de Botucatu e Itatinga, Estado de São Paulo. (1) Bezerro da propriedade G. (2) Bezerro e animal adulto na propriedade F. (3) Bebedouro dos bezerros em um dos currais da propriedade E. (4) Habita dos animais no confinamento na propriedade D.

1



2



3



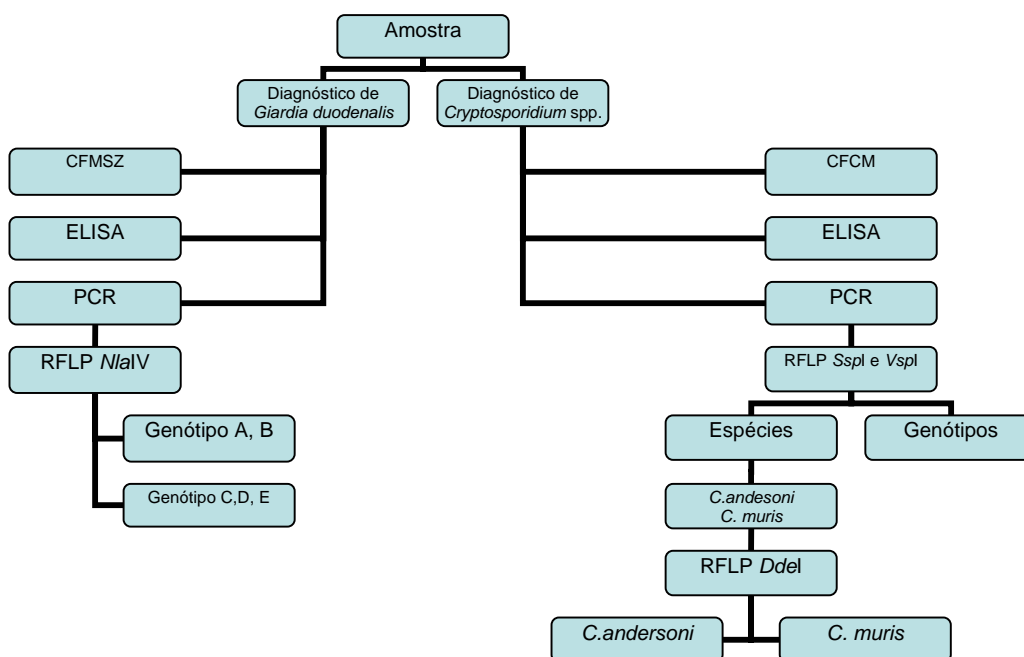
4



### 4.2.3. Técnicas empregadas

As análises das 200 amostras fecais de bovinos foram realizadas através de três técnicas de diagnóstico para detecção de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. A primeira etapa foi realizada através das técnicas de microscopia óptica: Centífugo flutuação modificada em sulfato de zinco (CFMSZ) e coloração por fucsina carbólica modificada (CFCM) A segunda etapa foram realizadas as análises imunoenzimáticas (ELISA) e da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). As amostras dos ovinos e bovinos da propriedade em Tupi Paulista foram analisadas pelas técnicas de ELISA e PCR. Apenas uma parte das amostras dessa propriedade foi analisada pelas técnicas de microscopia óptica (20 através da CFMSZ e 65 por meio da CFCM). Um diagrama esquemático do fluxograma das etapas do experimento está demonstrado na figura 6.

**Figura 6.** Diagrama esquemático do fluxograma de etapas do experimento.



#### 4.2.3.1. Microscopia óptica

A detecção de cistos de *Giardia duodenalis* foi realizada pela utilização de um teste de rotina coproparasitológica através da pesquisa direta e observação microscópica do enteroparasita (presença de cistos) com o emprego de uma técnica concentração fecal

através da centrifugo-flutuação por uma solução de alta densidade como descrito por Figueiredo et al. (1984) citado por Hubber e colaboradores (2003). A técnica será descrita nesse estudo como: CFMSZ (Centrifugo-flutuação modificada em sulfato de zinco). As modificações da técnica de CFMSZ incluíram o emprego uma solução de sulfato de zinco no lugar de uma solução saturada de açúcar e o processamento posterior de acordo com a técnica de Faust e colaboradores.

A detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. foi realizada através da realização da técnica de centrifugo-sedimentação pelo formaldeído-éter, de acordo com o protocolo descrito por Arrowod. (1997) citado por Hubber e colaboradores (2003), seguido do emprego da técnica modificada de coloração de esfregaços fecais pelo corante fucsina-carbólica, de acordo com Martinez & Belsa Neto (2003), e referida nesse estudo como CFCM (coloração por fucsina-carbólica modificada). As modificações da técnica de CFCM incluiu a permanência das lâminas no corante fucsina carbólica por um período de 5 minutos. As lâminas de esfregaço fecal coradas foram examinadas em microscópio óptico<sup>6</sup>, com auxílio de óleo de imersão, em aumento de 40x e 1000x e fotografadas com analisador de imagem<sup>7</sup>. Cada lâmina foi examinada por até cinco minutos. O número de (oo)cistos foram marcados semi-quantitativamente de acordo Huetink e colaboradores (2001), usando microscópio óptico em magnificação de 400x. (Tabela 6).

**Tabela 6.** Número de (oo)cistos marcados semiquantitativamente observados em lâmina

-	Sem presença de (oo)cistos
+	1-5 (oo)cistos por lamina
++	6- 25 (oo)cistos por campo
+++	26-50 (oo)cistos por campo
++++	>50 (oo)cistos por campo

#### 4.2.3.2. Ensaio imunoenzimático

A detecção de antígenos fecais de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. foi realizada através da técnica imunoenzimática processada com o kit GIARDIA II e CRYPTOSPORIDIUM TEST<sup>8</sup>- ELISA direto para detecção de antígenos de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais, respectivamente. Uma amostra foi considerada positiva quando a absorvância foi >0,150 at 450 nm.

<sup>6</sup> Olympus bx 60

<sup>7</sup> Image-Pro software -Leica®

<sup>8</sup> (Techlab, Blacksburg, EUA.)

#### 4.2.3.2.1. Índice ELISA

Para certificar-se dos resultados do teste ELISA e como medida auxiliar à interpretação dos dados do mesmo; aos valores da absorvância a 450nm de todas as amostras foram empregados o cálculo matemático denominado de *índice ELISA* que determina valores de *cutt-off* para as amostras, com o intuito de indicar se as mesmas podem ser consideradas positivas (Biondi et al, 1996). Primeiramente deve se estabelecer o valor de *cutt-off* do teste pela fórmula:

$$\text{Cutt-off} = (\text{ACPP} - \text{ACN}) / (\text{ACPT} - \text{ACN})$$

Onde, ACPP= Absorvância do controle positivo padrão (determinado pelo kit); ACN= Absorvância do controle negativo; ACP= Absorvância do controle positivo do teste.

Os valores das amostras positivas (P) na análise do *índice ELISA* devem ser maiores que o valor do *cutt-off* quando aplicados a fórmula:

$$P = (\text{AA} - \text{ACN}) / (\text{ACPT} - \text{ACN}), \text{ Onde AA} = \text{Absorvância da amostra.}$$

#### 4.2.3.3. Reação em Cadeia da Polimerase

##### 4.2.3.3.1. Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada diretamente das fezes com um kit comercial para extração de DNA de amostras fecais<sup>9</sup>, seguindo as recomendações do fabricante com pequenas modificações. As modificações incluíram 3 ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido (nitrogênio líquido durante 5 minutos x banho-maria a 70°C durante 5 minutos) após a adição do tampão de lise contido no kit (ASL Buffer). Para finalidades de comparação entre kits comerciais de extração de DNA das fezes, duplicatas de 20 amostras foram extraídas diretamente das fezes com o outro kit comercial<sup>10</sup> para extração de DNA de fezes, também seguindo as recomendações do fabricante. O DNA das amostras extraídas foi armazenado a -20°C até o uso nas análises moleculares.

<sup>9</sup> Qiagen DNA Stool Mini kit (QIAGEN®)

<sup>10</sup> kit E.Z.N.A Stool DNA Mini Prep Kit (OMEGA®)

#### 4.2.3.3.2. Detecção molecular de *Giardia duodenalis*

Para o diagnóstico de *Giardia duodenalis*, a região do gene GDH (Glutamate dehydrogenase) foi amplificada através de um protocolo baseado numa reação de semi-nested PCR. Este semi-nested PCR é uma ferramenta altamente sensível para a detecção e amplificação do DNA de *Giardia* diretamente das fezes (Read et al, 2004). O diagnóstico de *Giardia duodenalis* por PCR também foi obtido por um segundo protocolo capaz de amplificar o gene SSUr-DNA do microorganismo, de acordo com uma metodologia previamente descrita (Hopkins et al, 1997; Read et al, 2002; Macglade et al., 2003; Becher et al., 2004).

##### 4.2.3.3.2.1. Gene GDH

A detecção molecular de *Giardia duodenalis* foi realizada usando um protocolo baseado numa reação de semi-nested PCR. Uma região de 432 pares de base do gene glutamate dehydrogenase (GDH) foi amplificada utilizando as condições descritas por Read et al. (2004) com raras modificações. Foram utilizados os primers GDHeF (forward primer; 5'-TCA ACG TYA AYC GYG GYT TCC GT) e GDHiF (reverse primer; 3'-CAG TAC AAC TCY GCT CTC GG) na primeira reação de PCR. Para a segunda fase da reação (Semi-Nested) os primers usados foram novamente o GDHeF (forward primer; 5'-TCA ACG TYA AYC GYG GYT TCC GT) e o primer GDHiR (reverse primer; 3'-GTT RTC CTT GCA CAT CTC C). Esses primers contem seqüências de bases que permitem a amplificação dos isolados de *Giardia duodenalis* através de seus principais genótipos (AI, AII, BIII, BIV, C, D, E).

##### 4.2.3.3.2.2. Gene SSU-rDNA

A detecção molecular de *Giardia duodenalis* foi realizada usando um protocolo baseado numa reação de Nested-PCR. Uma região de aproximadamente 292 pares de base do gene SSU r-DNA foi amplificada inicialmente utilizando as condições descritas por Hopkins et al. (1997) para uma reação única de PCR. Com o produto obtido da reação de PCR, foi realizada uma reação de Nested-PCR de acordo com o protocolo descrito por Macglade et al. (2003) e Read et al. (2002).

Foram utilizados inicialmente os primers RH 11 e RH 4 (Hopkins et al, 1997) na primeira reação de PCR. Para a segunda fase da reação (Nested) os primers usados foram o GiarF (forward primer; 5'-GAC GCT CTC CCC AAG GAC) e GiarR (reverse primer; 3'-CTG CGT CAC GCT GCT CG) como descrito por Read et al. (2002), Macglade et al. (2003) e Becher et al. (2004).

#### **4.2.3.3.3. Amplificação do DNA de *Giardia duodenalis*: gene GDH**

A amplificação por PCR foi realizada em um volume final de 25 microlitros contendo 2.5 µl de 10X Biotools reaction buffer [75mM Tris-HCl (pH 8.0), 50mM KCl, 20nM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>], 250 µM de cada dNTP, 10 µmol/µl de cada Primer (1µl de primer), 0.1 unidade de DNA polimerase (Biotools, Madri-Espanha) e 2.5 µl do DNA da amostra.

Reações de amplificação foram realizadas em termociclador automático<sup>11</sup>. As condições de amplificação seguiram o seguinte protocolo: 1 ciclo de incubação inicial a 94°C por 5 minutos para desnaturação das fitas de DNA, seguidos de 55 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 20 segundos, 72°C por 45 segundos e uma extensão final de 7 minutos a 72°C. Foi adicionado 1µl do produto de PCR da reação primária à reação secundária. Para a segunda fase da reação (semi-Nested PCR) o protocolo seguiu as mesmas condições de temperaturas e tempos descritos acima para a reação de PCR.

#### **4.2.3.3.4. Amplificação do DNA de *Giardia duodenalis*: gene SSU r-DNA**

A amplificação por PCR foi realizada em um volume final de 25 microlitros contendo 12.5 µl de 2X GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix buffer [pH 8.5, 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP, 3.0 mM MgCl<sub>2</sub>], 10 µmol/µl de cada Primer e 2.5 µl do DNA da amostra. Como descrito acima, essa solução já contém além da enzima derivada da *Taq* DNA polimerase, o tampão de reação, os DNTPS e MgCl<sub>2</sub>.

As condições de amplificação seguiram o seguinte protocolo: 1 ciclo de incubação inicial a 96°C por 2 minutos para desnaturação das fitas de DNA, seguidos de 35 ciclos de 96°C por 20 segundos, 59°C por 20 segundos, 72°C por 30 segundos e uma extensão final de 7 minutos a 72°C. Foi adicionado 1µl do produto de PCR da reação primária à reação secundária. Para a segunda fase da reação (Nested PCR) o protocolo seguiu as

---

<sup>11</sup> Termociclador modelo Master cycler Gradiante<sup>®</sup>



mesmas condições de temperaturas e tempos descritos acima para a reação de PCR (Hopkins et al, 1997; Read et al, 2002; Macglade et al, 2003; Becher et al, 2004).

#### **4.2.3.3.5. Detecção molecular de *Cryptosporidium* spp.**

Para o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. as amostras foram submetidas ao isolamento e amplificação do DNA do parasita através da técnica de NESTD-PCR desenvolvida para a detecção do gene 18S small Subunit (SSU) rRNA e para diferenciação entre as espécies e genótipos de *Cryptosporidium* spp (Xiao et al., 1999a; Xiao et al., 1999b; Xiao et al., 2001; Peng et al., 2003). O DNA foi isolado e amplificado das amostras fecais através da metodologia baseada em um protocolo de Nested PCR (Xiao et al., 1999a; Xiao et al., 1999b) e aprimorada por Xiao e colaboradores (2001). Neste método, um produto de PCR de aproximadamente 1.325 pares de base foi amplificado usando os primers 5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3' (Forward) e 5'-CCCATTTTCCTTCGAAACAGGA-3' (reverse) para a reação inicial de PCR.

Para a segunda fase da reação (Nested) um produto de amplificação de aproximadamente 826 a 864 pares de base (dependendo da espécie/genótipo) foi detectado pelos primers 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3'(forward primer;) e 5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3' (reverse primer). Esses primers contêm seqüências únicas de bases que permitem a amplificação dos isolados de *Cryptosporidium* spp. através de todas as espécies e é capaz de fazer a diferenciação dos genótipos de *Cryptosporidium parvum* pelo uso posterior de enzimas de restrição na técnica de RFLP - polimorfismo no tamanho dos fragmentos de restrição (Xiao et al., 1999a; Xiao et al., 1999b, Xiao et al., 2001, Peng et al., 2003)

#### **4.2.3.3.6. Amplificação do DNA de *Cryptosporidium* spp.**

A amplificação por PCR foi realizada em um volume final de 25 microlitros contendo 2.5 µl de 10x Biotools reaction buffer [75mM Tris-Hcl (pH 8.0), 50mM KCl, 20nM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>], 250 µM de cada dNTP, 10µmol/µl de cada Primer, 0.625 unidade de Taq DNA polimerase e 2.5 µl do DNA da amostra (Xiao et al., 2001)

As condições de amplificação no termociclador seguiram o seguinte protocolo: 1 ciclo de incubação inicial a 94°C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 7

minutos a 72°C Foi adicionado 1µl do produto de PCR da reação primária à reação secundária. Para a segunda fase da reação (Nested PCR) o protocolo seguiu as mesmas condições de temperaturas e tempos descritos acima para a reação de PCR.

#### 4.2.3.3.7. Amplificação do DNA de usando Go Taq® Green Master Mix

As reações de PCR também foram realizadas utilizando-se uma solução de reagentes “pronta para uso” que já contem em seu interior o tampão de reação, os DNTPS, MgCl<sub>2</sub> e a enzima DNA Polimerase (GoTaq® Green Master Mix<sup>12</sup>), bastando apenas ao usuário acrescentar à reação os primers e o DNA da amostra. Neste caso, de forma semelhante as descritas acima, foram usados os primers específicos de *Giardia duodenalis* (gene GDH e SSU) e *Cryptosporidium* (gene SSU) para cada uma das reações. Quando este reagente foi usado para preparar as reações de PCR, as condições da reação seguiram um volume final de 25 microlitros contendo 12.5 µl de 2X GoTaq® Green Master Mix buffer [pH 8.5, 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP, 3.0 mM MgCl<sub>2</sub>], 10 µmol/µl de cada Primer (1µl de primer) e 2.0 µl do DNA da amostra. As condições de amplificação foram idênticas as descritas no protocolo de PCR para cada um dos parasitas.

#### 4.2.4. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese<sup>13</sup> em gel de agarose<sup>14</sup> 1.5% em TBE (EDTA -tris bórico tamponado) e revelados com brometo de etídio (0.5 mg/ml). Os fragmentos de DNA foram analisados comparativamente com marcadores<sup>15</sup> de DNA de 100 pares de base, sendo analisados e fotografados em analisador de imagem<sup>16</sup>.

#### 4.2.5. Purificação de produtos da PCR

Os produtos de PCR derivados de reações positivas para *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp foram purificados com a utilização do kit Wizard® SV Gel and PCR

---

<sup>12</sup> Promega, Madison, WI-USA

<sup>13</sup> Electrophoresis Power Supply model EPD 600–Amersham-Pharmacia Biotech® Inc.

<sup>14</sup> Sigma-Aldrich® co.

<sup>15</sup> 100 Base-pair Ladder–Amersham-Pharmacia Biotech® Inc.

<sup>16</sup> Alphaimager - Alpha easyFC Software- AlphaInotech Corporation®

Clean-up System<sup>17</sup>, de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA purificado foi armazenado a temperatura de -20°C até o uso.

#### 4.2.6. Quantificação de produtos purificados da PCR

Após a extração e a purificação do fragmento amplificado, o mesmo foi submetido à quantificação. Para essa etapa, foi realizada uma corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5%, na qual além das amostras a serem quantificadas, aplicou-se um marcador de massa molecular<sup>18</sup>. A quantificação foi feita através da comparação visual entre o fragmento amplificado e a banda do marcador molecular. Nesse marcador, cada banda apresentava uma quantidade de DNA (nanograma) pré-determinada pelo fabricante.

#### 4.2.7. Caracterização genética através da PCR-RFLP

##### 4.2.7.1. PCR-RFLP para *Giardia duodenalis*

Seguindo o protocolo descrito por Read et al. (2004) é possível distinguir entre os principais genótipos de *Giardia duodenalis* pela análise através de PCR-RFLP (reação de cadeia da polimerase- polimorfismo no tamanho do fragmento de restrição) dos produtos amplificados da reação secundária do PCR. Os produtos do semi Nested PCR foram clivados com a enzima de restrição *Nla* IV (New England Biolabs) que possui sitio de corte 5' ...GGN▼NCC...3' e 3' ...CCN▲NGG ...5'.

A análise por RFLP foi realizada pela digestão do produto do semi-Nested PCR com 2U da enzima de restrição em 1X tampão de restrição (New England Biolabs), BSA (contida no kit da enzima) e água Milli-q autoclavada para ajustar a reação para um volume final aproximado de 20µl por 3 horas a 37°C. A quantidade de DNA da amostra foi ajustada de acordo com a quantificação. Em sua maior parte, foram seguidas as condições descritas de acordo com a tabela 7.

A análise visual do perfil de padrão de restrição dos produtos amplificados da Nested PCR clivados com a enzima *Nla*IV seguiu o apresentado na figura 7 e tabela 11, de acordo com Read e colaboradores (2004).

---

<sup>17</sup> Promega, Madison, WI, USA

<sup>18</sup> Low DNA mass™ ladder (Invitrogen).

**Tabela 7 .** Condições da reação de PCR-RFLP para *Giardia duodenalis* utilizando a enzima *NlaIV*

Reagente	Quantidade
1X NEBuffer 4	2 $\mu$ l
BSA	0,2 $\mu$ l
Enzima Nla IV	2 $\mu$ l
DNA da amostra	15 $\mu$ l

Por esse perfil de bandas no gel de agarose, pode-se diferenciar os principais genótipos de *Giardia duodenalis*. Os genótipos observados na figura 8 são o AI, AII, B, C, D e E. A clivagem do genótipo B com a enzima de restrição produz apenas digestão parcial do produto, pelo qual não se consegue a diferenciação entre os genótipos BIII e BIV, entretanto qualquer resultado em que ambos apareçam o padrão de bandas do gel é diferente dos apresentados pelos demais genótipos permitindo a diferenciação do genótipo B com os outros genótipos.

Fragmentos menores que 50 pares de base não podem ser facilmente percebidos durante a análise do gel e os genótipos podem ser identificados sem a necessidade de analisar essas bandas pequenas; por isso o perfil de diagnóstico segue o apresentado na quarta coluna da tabela 11 (números em negrito). Os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose 2% corados com brometo de etídio por eletroforese horizontal, sendo analisados e fotografados em analisador de imagem<sup>19</sup>.

#### 4.2.7.2. PCR - RFLP para *Cryptosporidium* spp.

Seguindo o protocolo descrito por Xiao et al.(2001) é possível distinguir entre as principais espécies de *Cryptosporidium* spp. encontrados em animais e humanos e entre os genótipos de *Cryptosporidium parvum* pela análise através de PCR-RFLP (Reação de Cadeia da Polimerase- Polimorfismo no Tamanho dos Fragmentos de Restrição) dos produtos amplificados da reação secundária do PCR. Para a correta identificação por PCR-RFLP da(s) espécie(s)/genótipo(s) de *Cryptosporidium* presente(s) na amostra, os produtos do Nested PCR foram clivados com a enzima de restrição *SspI*, *VspI*<sup>20</sup> e *Ddel*.

<sup>19</sup> Alphaimager - Alpha easyFC Software- AlphaImotech Corporation<sup>®</sup>).

<sup>20</sup> Fermentas Life Sciences -USA

#### 4.2.7.2.1. Enzimas de restrição *Sspl*, *Vspl* e *Ddel*

A análise por RFLP foi realizada pela digestão do produto do Nested PCR com as enzimas de restrição, ajustando as quantidades de cada reagente na solução (tabela 8), de acordo condições descritas abaixo:

1. Pela digestão de 8µl do produto do Nested PCR com 2U da enzima de restrição em 1X tampão de restrição e água Milli-q autoclavada para ajustar a reação para um volume final de 30µl, *overnight* a 37°C para amostras que apresentavam bandas fracas durante a visualização no gel de agarose (pouca quantidade de DNA na amostra).
2. Pela digestão de 5 µl do produto do semi-Nested PCR com 2U da enzima de restrição em 1X tampão de restrição (New England Biolabs) e água Milli-q autoclavada para ajustar a reação para um volume final de 30µl, *overnight* a 37°C para amostras que apresentavam bandas fortes durante a visualização no gel de agarose (grande quantidade de DNA na amostra).

**Tabela 8 .** Condições da reação de PCR-RFLP para *Cryptosporidium* utilizando as enzimas *Sspl* e *Vspl*.

Reagente	Quantidade 1 <sup>a</sup>	Quantidade 2 <sup>b</sup>
Buffer	2µl	2µl
Água	22µl	19µl
Enzima	1µl	1µl
DNA da amostra	5µl	8µl
<b>Total</b>	<b>30µl</b>	<b>30µl</b>

<sup>a</sup> Amostras que apresentavam concentração alta de DNA na quantificação.

<sup>b</sup> Amostras que apresentavam concentração baixa de DNA na quantificação.

Uma vez que as espécies *Cryptosporidium andersoni* e *Cryptosporidium muris* apresentam padrões de restrição idênticos com as enzimas *Sspl* e *Vspl*, elas foram diferenciadas com a enzima de restrição *Ddel*<sup>21</sup> de acordo com as recomendações especificadas pelo fabricante com pequenas modificações.

<sup>21</sup> Fermentas Life Sciences -USA

As condições de reação estão descritas abaixo na tabela 9. A análise visual dos produtos da Nested-PCR clivados com as enzimas de restrição *Sspl*, *Vspl* e *Ddel* foi seguida como demonstrado na tabela 12 e figura 8 (A e B).

**Tabela 9.** Condições da reação de PCR-RFLP para *Cryptosporidium* utilizando a enzima *Ddel*.

Reagente	Quantidade
Buffer	2 $\mu$ l
Água	20 $\mu$ l
Enzima	1 $\mu$ l
DNA da amostra	5 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>28<math>\mu</math>l</b>

Devido a mudanças na nomenclatura de determinadas espécies/genótipos, na tabela 12 os nomes com asterísticos estão adaptados e são de espécies de *Cryptosporidium* ou genótipos de *C. parvum* que foram atualmente reconhecidas como espécies/genótipos separados (Santin et al., 2004, Fayer et al., 2006; Plutzer & Karanis, 2007).

#### 4.2.7.2.2. Enzima de restrição *MobII*

De acordo com Feng et al. (2007), as espécies/genótipos *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium bovis* e *Cryptosporidium* genótipo deer-like possuem os mesmos sítios de restrição pela análise de RFLP com as enzimas *Sspl*, *Vspl* não podendo dessa forma ser diferenciadas entre si com a utilização dessas enzimas (tabela x, figura X).

Dessa forma, elas foram diferenciadas com a enzima de restrição *MobII* de acordo com as recomendações especificadas pelo fabricante. As enzimas de restrição *Sspl*, *Vspl*, *Ddel* e *MobII* possuem sítio de corte como demonstrado abaixo na tabela 10.

**Tabela 10.** Sítios de restrição das enzimas *Sspl*, *Vspl*, *Ddel* e *MobII*

Enzima	Sítio de corte 5' – 3'	Sítio de corte 3' – 5'
<i>Vspl</i>	...AT▼TAAT...	...TAAT▲TA...
<i>Sspl</i>	...AAT▼ATT...	...TTA▲TAA...
<i>Ddel</i>	...C▼TNAG...	...GANT▲C...
<i>MobII</i>	...GAAGA N▼...	...CTTCT N▲...

Os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose 2% corados com brometo de etídio por eletroforese horizontal, sendo analisados e fotografados em analisador de imagem<sup>22</sup>.

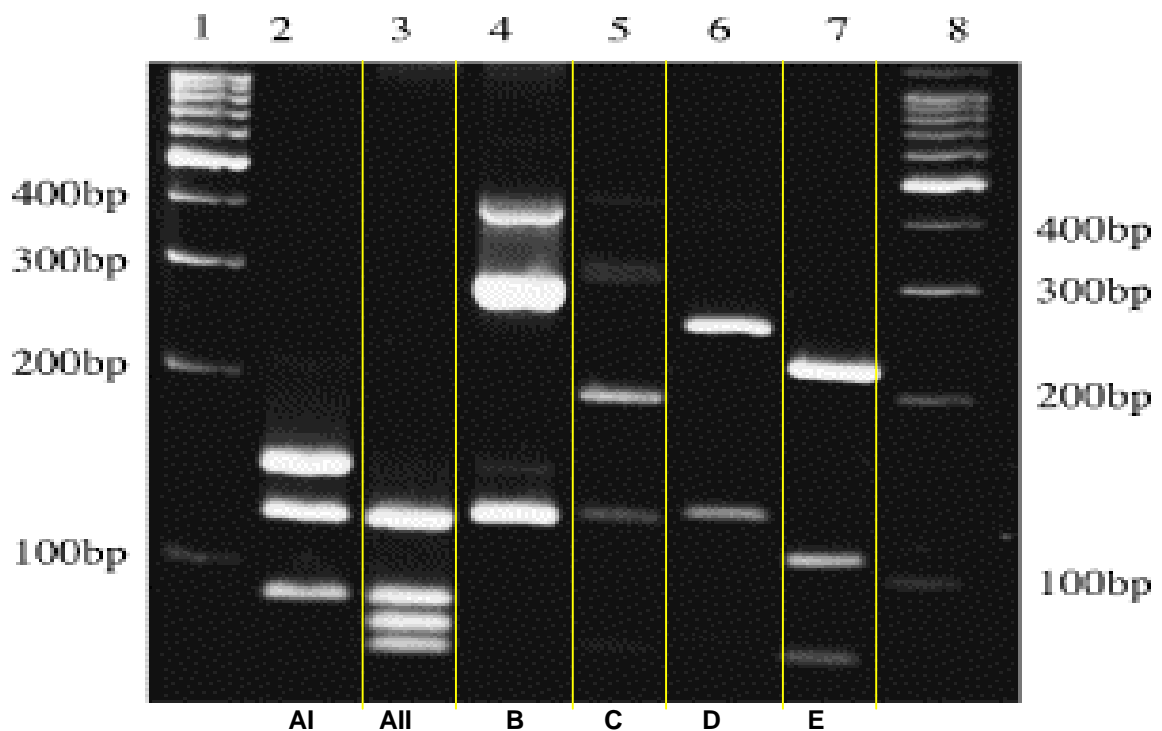
---

<sup>22</sup> Alphaimager - Alpha easyFC Software- AlphaInotech Corporation ®

**Tabela 11.** Tamanho dos fragmentos de restrição (em pares de base) e perfil genotípico de diagnóstico (em pares de base) de produtos amplificados da SemiNested-PCR digeridos com a enzima *Nla* IV (Original de Read et al.,2004).

Genótipo	Nº de sítios de restrição	Tamanho dos fragmentos	Padrão de Diagnóstico
A - I	5	16,18,39,87,123,149	<b>90, 120, 150</b>
A - II	6	18,16,39,72,77,87,123	<b>70, 80, 90, 120</b>
B - III	2	18,123,291	<b>120, 290</b>
B - IV	2	18,123,291	<b>120, 290</b>
C	4	19,31,72,123,187	<b>70, 120, 190</b>
D	3	18,39,126,249	<b>120, 250</b>
E	4	16,18,72,106,218	<b>80, 100, 220</b>

**Figura 7.** Gel de agarose corado com brometo de etídio 2% demonstrando o DNA de *Giardia duodenalis* amplificado a partir do gene GDH de cada um dos genótipos AI, AII, B, C, D e E, digeridos com a enzima de restrição *Nla* IV (Foto original de Read et al., 2004)



Linhas 1 e 8: Marcador de peso molecular de 100 bp; Linha 2: Genótipo AI; Linha 3: Genótipo AII; Linha 4: Genótipo B; Linha 5: Genótipo C; Linha 6: Genótipo D; Linha 7: Genótipo E.



**Tabela 12.** Análise de PCR-RFLP (em pares de base) no gene SSU rRNA de várias espécies e genótipos de *Cryptosporidium* spp. (adaptado de Xiao et al., 1999; Xiao et al., 1999; Xiao et al., 2001). Os nomes com asterisco referem-se a *Cryptosporidium parvum* genótipo Humano (*C. Hominis\**) e *Cryptosporidium parvum* genótipo dog (*C. Canis\*\**), do original do trabalho de Xiao et al. (2001).

<b>Espécie</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Sspl</b>	<b>Vspl</b>
<i>C. parvum</i> bovino A	Bovinos	11, 12, <b>108, 254, 449</b>	102, <b>104/ 628</b>
<i>C. parvum</i> bovino B	Bovinos	9, <b>119, 254, 449</b>	102, <b>104, 625</b>
<i>C. hominis*</i>	Humanos	11,12, <b>111, 254, 449</b>	70, 102, <b>104, 561</b>
<i>C. parvum</i> monkey	Macacos	11, <b>109, 254, 461</b>	70, 102, <b>104, 559</b>
<i>C. parvum</i> mouse	Ratos	11, 12, <b>112, 254, 449</b>	102, <b>104, 175, 457</b>
<i>C. parvum</i> ferret	Ferret	11, 12, <b>111, 254, 449</b>	102, <b>104, 174, 457</b>
<i>C. meleagridis</i>	Peru	11, <b>108, 254, 449</b>	102, <b>104, 171, 456</b>
<i>C. wrairi</i>	Porquinho da Índia	11, <b>109, 254, 449</b>	102, <b>104, 628</b>
<i>C. andersoni</i> / <i>C. muris</i>	Bovino	<b>385, 448</b>	<b>102, 731</b>
<i>C. serpentis</i>	Serpentes	14, 33, <b>370, 414</b>	<b>102, 729</b>
<i>C. baileyi</i>	Galinha	<b>254, 572</b>	102, <b>104, 620</b>
<i>C. felis</i>	Gato	15. 33, <b>390, 426</b>	102, <b>104, 182, 476</b>
<i>C. canis**</i>	Cão	20, 33, <b>105, 254, 417</b>	94, <b>102,633</b>

### **Sspl**

- 3 bandas visíveis :

*C. parvum* (Cattle, human, monkey, mouse, ferret) *C. meleagridis* e *C. wrairi*

- 2 bandas visíveis:

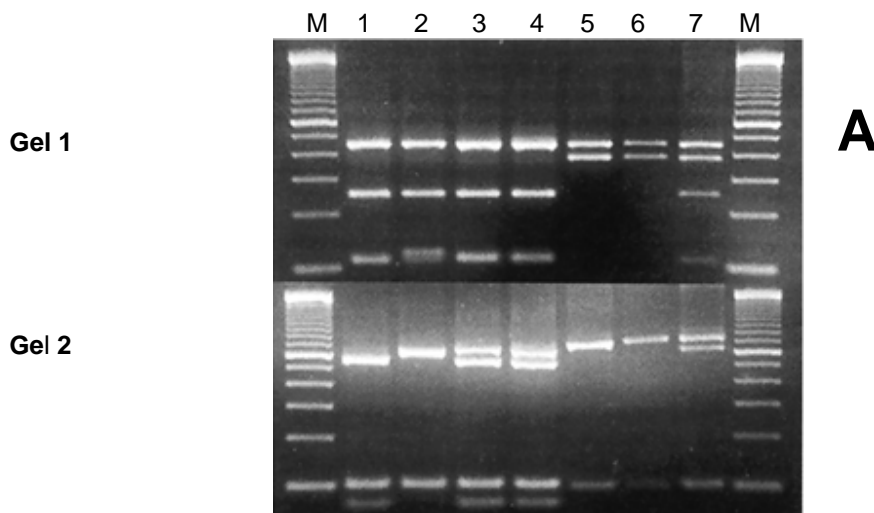
*C.andersoni* / *C. muris*, *C. felis*, *C. serpentis*, *C. baileyi*

**Tabela 13.** Análise de PCR-RFLP (em pares de base) no gene SSU rRNA para diferenciação entre *C.andersoni* e *C. muris* através da enzima *Ddel* (Xiao et al., 1999; Xiao et al., 1999; Xiao et al., 2001).

<b>Espécie</b>	<b>hospedeiro</b>	<b>Ddel</b>
<i>C. andersoni</i>	bovinos	156, 186, 470
<i>C. muris</i>	camundongo	156, 186, ,224, 247

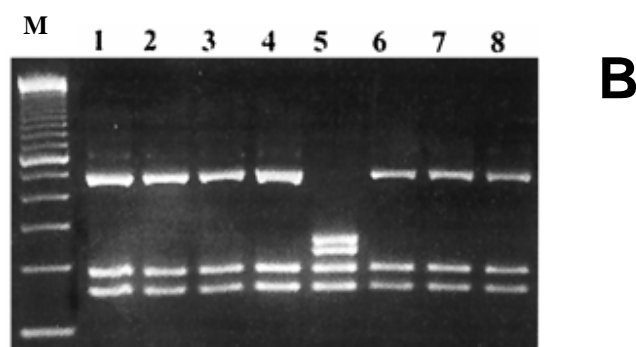
**Figura 8.** Análise de PCR-RFLP no gene SSU rRNA de várias espécies e genótipos de *Cryptosporidium* spp. através das enzimas *VspI*, *SspI* e *DdeI*, adaptado de Xiao et al. (2001).

**A** - Diferenciação de *Cryptosporidium* spp. pela digestão dos produtos da PCR com a enzima *SspI* (gel 1) e *VspI* (gel 2).



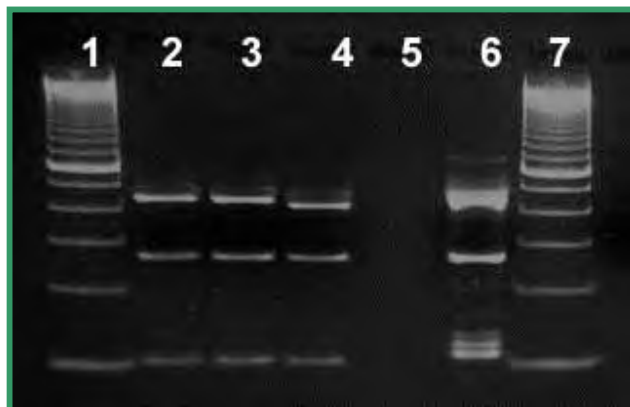
Linha M: Marcador de peso molecular de 100pb ; Linha 1: *Cryptosporidium parvum* genótipo humano (*C. hominis*); Linha 2: *Cryptosporidium parvum* genótipo bovino; Linha 3 e 4 *C. parvum* genótipo humano (*C. hominis*) e *C. parvum* genótipo bovino; Linha 5: *Cryptosporidium andersoni*; Linha 6: *Cryptosporidium muris*; Linha 7: *Cryptosporidium parvum* genótipo bovino e *Cryptosporidium andersoni*

**B** - Diferenciação de *Cryptosporidium andersoni* e *Cryptosporidium muris* pela digestão dos produtos secundários com a enzima *DdeI*.



Linha M: Marcador de peso molecular de 100pb;  
 Linha 1,2,3,4,7 e 8: *Cryptosporidium andersoni*;  
 Linha 5: *Cryptosporidium muris*

**Figura 9.** Similaridade no padrão de restrição provocada pela ação da enzima *Sspl* sobre os produtos de PCR amplificados do gene SSUr-RNA entre *Cryptosporidium parvum*, *C. bovis* e *C.* genótipo deer-like em amostra de bovinos domésticos e de um bovino selvagem (*Bos grunniens*). Adaptado do original de Feng et al. (2007).



Linha 1 e 7: marcador de peso molecular de 100 pb; Linha 2: *Cryptosporidium* genótipo deer-like; Linha 3: *C. bovis*; Linha 4: *Cryptosporidium* em um bovino selvagem; Linha 5: controle negativo; Linha 6: *C. parvum* (controle positivo).

As bandas duplas mas baixas na linha 6, do controle positivo de *C. parvum* são devido à presença de ambas cópias A e B do gene SSU rRNA nos produtos de PCR (Feng et al., 2007).

**Tabela 14.** Diferenciação entre *Cryptosporidium parvum* (genótipo bovino), *C. bovis*, *C. andersoni* e *Cryptosporidium* genótipo deer-like pela análise de RFLP com a enzimas *Sspl*, *Vspl* e *MbolI*. Adaptado de Feng et al. (2007).

<i>Cryptosporidium</i>	Produto*	<i>Sspl</i> *	<i>Vspl</i> *	<i>MbolI</i> *
<i>C. parvum</i>	847	449, 267, 108, 12 <sup>a</sup> , 11 <sup>a</sup>	628, 115, 104	771, 76
<i>C. bovis</i>	835	432, 267, 103, 33 <sup>a</sup>	616, 115, 104	412, 185 <sup>a</sup> , 162, 76
<i>C.</i> genótipo deer-like	835	432, 267, 103, 33 <sup>a</sup>	616, 115, 104	574, 185 <sup>a</sup> , 76
<i>C. andersoni</i>	845	448, 397	730, 115	769, 76

<sup>a</sup> Não são visíveis no gel de agarose; \*em pares de bases

#### 4.2.8. Sequenciamento do gene SSU r-RNA de *Cryptosporidium* spp.

Após amplificação, purificação e quantificação, os produtos da Nested-PCR foram seqüenciados bidirecionalmente (primer sense e anti-sense da reação de Nested) em seqüenciador automático. Os eletroferogramas obtidos foram avaliados individualmente quanto à qualidade do sequenciamento, intensidade do sinal obtido e presença de leituras inadequadas ou errôneas de nucleotídeos. As seqüências de cada uma das amostras foram alinhadas utilizando-se o algoritmo Clustal W (Thompson et al., 1994) e seqüências consensuais foram alinhadas e comparadas às seqüências obtidas, as quais foram alinhadas e comparadas às disponíveis no GenBank utilizando-se a ferramenta Blast<sup>23</sup>.

#### 4.2.9. Controle da extração do DNA das amostras fecais

Todas as amostras negativas para *Giardia duodenalis* ou *Cryptosporidium* spp. na PCR foram submetidas a um controle interno de qualidade para validação da extração do DNA com o objetivo de verificar se as amostras eram realmente negativas ou houve falha na extração.

##### 4.2.9.1. Nested-PCR para amplificação do DNA mitocondrial bovino e ovino

Para a amplificação do DNA constitutivo (mitocondrial) de células bovinas e ovinas, uma reação de PCR foi seguida segundo descrito por Martellini et al. (2005).

Para amostras fecais bovinas, a amplificação por PCR foi realizada em um volume final de 25 microlitros contendo 1x Biotools reaction buffer [75mM Tris-HCl (pH 8.0), 50mM KCl, 20mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>], 200 µM de cada dNTP, 10µmol/µl do Primer sense Bomito1-G (5'-ACATACCCTTGATTGGACTAGCAT-3') e anti-sense Bomito1-D (5' ATCACTACCCCTCAAACGCCTTCAAG-3'), 0.625 unidade de DNA polimerase e 5.0 µl do DNA da amostra. Para a segunda fase da reação (Nested) um produto de amplificação do gene Nadlt5 detectado pelos primers Bomito11-G 5'-GATTGGACTAGCATTAGCTGCAACC-3' (sense) e Bomito11-D 5'-CTTGAAGGCGTTTGAGGGGTAGTGAT-3' (anti-sense).

Para amostras fecais ovinas, as mesmas condições de amplificação foram seguidas exceto pelo uso dos primers Ovmito1-G (5'-

<sup>23</sup> versão 2.0 (Basic Local Alignment Search Tool).

GACAACCCCGATTTCACACCTCAT-3') e Ovmito1-D (5'-CACGATCCTCATTAGTACAACCTTAC-3') na primeira fase da reação e primers Ovmito11-G (5'-CAATGAAAATAACCCGTTCTAAT-3') e Ovmito11-D (5'-GTAAGGTTGTACTAATGAGGATCGTG-3') na segunda fase da reação.

As condições de amplificação no termociclador seguiram o seguinte protocolo: 1 ciclo de incubação inicial a 94°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 5 minutos a 72°C. Foi adicionado 1µl do produto de PCR da reação primária à reação secundária.

#### 4.2.10. Comparação dos resultados

Para essa parte do estudo de comparação entre técnicas de diagnóstico, 200 amostras fecais de bovinos foram testadas através da técnica de microscopia óptica (Centrifugo-flutuação modificada em sulfato de zinco-CFMSZ), Técnica imunoenzimática de captura de coproantígeno (Kit ELISA) e pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A PCR, recentemente considerada de alta sensibilidade analítica e diagnóstica para a identificação de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais, foi tomada como teste de referência (Macglade et al, 2003; Xiao et al., 2001).

#### 4.2.11. Validação das análises

Só foram consideradas amostras positivas para *Giardia duodenalis* e/ou *Cryptosporidium* spp. aquelas em que:

- Foram observados cistos e/ou trofozóitos de *Giardia duodenalis* na técnica de CFMSZ
- Foram observados oocistos de *Cryptosporidium* spp. na técnica de CFCM
- No ELISA, concordaram os índices de absorvância, índice ELISA e coloração dos poços da placa
- Na PCR para *Giardia duodenalis* apresentaram positividade nos 2 genes (GDH e SSU r-RNA).
- Na PCR para *Cryptosporidium* spp. apresentaram bandas entre 840 a 860 pb (Xiao et al, 2001)

Todos os procedimentos foram submetidos a controles internos e externos de qualidade, com a presença de controles positivos e negativos previamente caracterizados em cada análise.

Um controle positivo de *Cryptosporidium parvum* previamente estabelecido em outros estudos foi cedido gentilmente pelo prof. Ass. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles, Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução animal – FOA - Unesp, campus de Araçatuba- São Paulo. Amostras fecais de cães que continham grande quantidade de cistos de *Giardia duodenalis* foram devidamente extraídas com o kit de extração da QIAgen e foram usadas como controle positivo.

Para fins de validação das análises moleculares, nas amostras negativas (n=30) na PCR para *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp foi realizado a “Spike probe”, que consiste em adicionar a uma fração de cada amostra negativa, uma quantidade de DNA purificado do parasita ou adicionar uma alíquota de uma outra amostra sabiamente positiva, de forma que para a reação de PCR realizada com essa amostra “adicionada” espera-se encontrar o padrão específico de bandas positivas no gel de agarose (Verweij et al., 2003).

#### 4.2.12. Análise Estatística

O teste exato de Fisher's foi utilizado para determinar a associação entre as técnicas de diagnóstico. O mesmo foi realizado usando o software GraphPad InStat<sup>24</sup>. A probabilidade de significância mínima foi estabelecida em 5%

##### 4.2.12.1. Co-positividade e co-negatividade

Deve-se lembrar que a co-positividade (CP) e a co-negatividade (CN) substituem os valores de sensibilidade diagnóstica e especificidade diagnóstica quando são testadas amostras biológicas coletadas de uma população, sendo empregados na ausência de inoculação experimental de um determinado agente e ausência de um teste padrão-ouro para o diagnóstico da enfermidade em questão, de acordo com tabela 14, onde:

$$CP = VP / VP + FN$$

$$CN = VN / VN + FP$$

---

<sup>24</sup> version 3.06 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

**Tabela 15.** Índices de co-positividade e co-negatividade.

<b>Teste A</b>	<b>Teste B</b>	
	Positivo	Negativo
Positivo	VP	FP
Negativo	FN	VN

VP= verdadeiro positivo; FP= falso positivo; FN= falso negativo; VN= verdadeiro negativo

## 5. RESULTADOS

A ocorrência de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em dez propriedades de bovinos leiteiros foi de 8 % e 14%, respectivamente. A ocorrência de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em ovinos na propriedade de Tupi Paulista foi de 34% e 25%, respectivamente.

### 5.1. Análise das 10 propriedades de bovinos da região de Botucatu e Itatinga-SP.

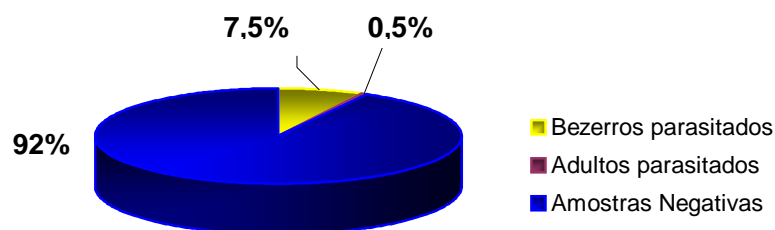
#### 5.1.1. Ocorrência de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. nas propriedades

*Giardia duodenalis* foi identificada em oito das dez propriedades visitadas (80%), enquanto que *Cryptosporidium* spp. foi diagnosticado em nove propriedades (90%). As características e a distribuição da ocorrência desses dois patógenos em cada propriedade está demonstrada na Tabela 15.

#### 5.1.2. Ocorrência de *Giardia duodenalis* – Análise dos animais

No estudo da ocorrência de *Giardia duodenalis* nos animais, das 200 amostras fecais analisadas, 6 (3%) foram positivas na microscopia óptica e 16 (8%) na PCR. Analisando em conjunto todos os animais do experimento (figura 9), a ocorrência de *Giardia* em bezerros foi de 7,5% (15/200), significativamente maior do que a presença em animais adultos 0,5 % (1/200).

**Figura 10.** Análise percentual da distribuição do número de amostras positivas para *Giardia duodenalis* de acordo com a categoria animal (bezerros e adultos). Total de 200 amostras



A ocorrência de *Giardia duodenalis* especificamente em bezerros foi de 15% (15/100). Em bovinos adultos, *Giardia duodenalis* foi identificada em 1% (1/100) dos animais (figura 10).



**Tabela 16.** Características de cada propriedade e a distribuição da ocorrência de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp.

Propriedades	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Raça dos animais	Holandesa <sup>a</sup>	Holandesa <sup>b</sup>	Mestiços	Mestiços	Mestiços	Mestiços	Mestiços	Holandesa	Mestiços	Mestiços
Habitat dos bezerros	Pasto <sup>c</sup>	CIB / CIP	Pasto	Conf.	Conf.	Pasto	Pasto	Pasto	Pasto	Pasto
Habitat dos adultos	Pasto	Pasto	Pasto	Conf.	Conf.	Pasto	Pasto	Pasto	Pasto	Pasto
Histórico de diarreia	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não
Ordenha	Mecânica	Mecânica	Manual	Manual	Manual	Mecânica	Manual	Mecânica	Manual	Manual
Tipo de instalações	Normais	Normais	Rústicas	Rústicas	Rústicas	Normais	Rústicas	Normais	Normais	Normais
Condições higiênicas	Adequadas	Adequadas	Regulares	Adequadas	Regulares	Adequadas	Adequadas	Adequadas	Adequadas	Adequadas
Outros animais	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Vermifugação	Não	Não	Sim <sup>d</sup>	Sim	Sim <sup>d</sup>	Sim <sup>d</sup>	Sim <sup>d</sup>	Sim <sup>e</sup>	Sim <sup>f</sup>	Sim <sup>g</sup>
Água dada aos animais	Poço <sup>h</sup>	Poço <sup>h</sup>	Rio	Poço <sup>h</sup>	Poço <sup>h</sup>	Rio / poço <sup>h</sup>	Rio	Poço <sup>h</sup>	Poço <sup>h</sup>	Poço <sup>h</sup>
Próxima a rios, riacho	Não	Sim	Sim	Não	Sm	Sim	Sim	Não	Não	Sim
<i>Giardia duodenalis</i>	5%	20%	15%	0%	0%	10%	5%	10%	10%	5%
<i>Cryptosporidium</i> spp.	5%	10%	20%	5%	45%	5%	5%	10%	35%	0%

Conf.= Confinamento ; CIB= Confinamento individual (em baia) ; CIP= Confinamento individual (no pasto).

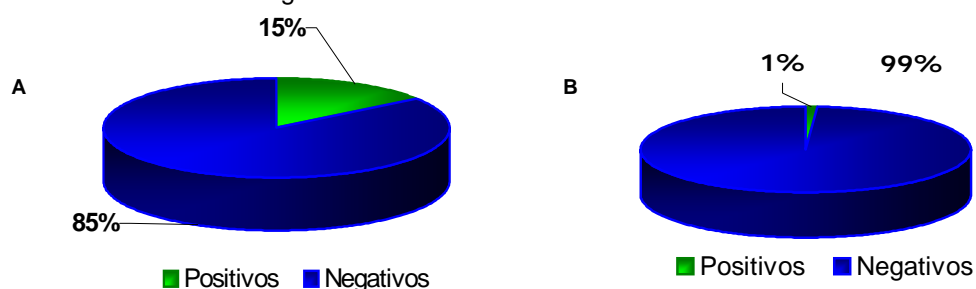
<sup>a</sup> 1 bezerro e 2 adultos da raça Gersey; <sup>b</sup> 1 bezerros da raça Gir

<sup>c</sup> 1 animal em confinamento

<sup>d</sup> Vermifugação tradicional a base de Ivermectina; <sup>e</sup> Ripercol® e homeopatia (arevalis®), <sup>f</sup> Ripercol®, <sup>g</sup> Albendazole®

<sup>h</sup> Água retirada de poço artesiano e servida nos cochos.

**Figura 11.** Ocorrência de *Giardia duodenalis* em bezerros (A) e animais adultos (B). Total de 100 amostras em cada categoria animal.



Os valores de ocorrência para *Giardia duodenalis* variaram de 0 a 20% entre as propriedades (tabela 16). O maior número de animais infectados por *Giardia duodenalis* em uma propriedade foi de 4 animais (propriedade B).

**Tabela 17.** Ocorrência de *G. duodenalis* em amostras fecais coletadas de dez propriedades (A -J) de bovinos leiteiros na região do município de Botucatu e Itatinga, São Paulo.

Propriedade	N° de amostras	N° de positivos	% de animais infectados	M.O <sup>a</sup>	PCR <sup>b</sup>
A	20	1	5	0	1
B	20	4	20	1	4
C	20	3	15	1	3
D	20	0	0	0	0
E	20	0	0	0	0
F	20	2	10	2	2
G	20	1	5	1	1
H	20	2	10	0	2
I	20	2	10	1	2
J	20	1	5	0	1
<b>Total</b>	<b>200</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>16</b>

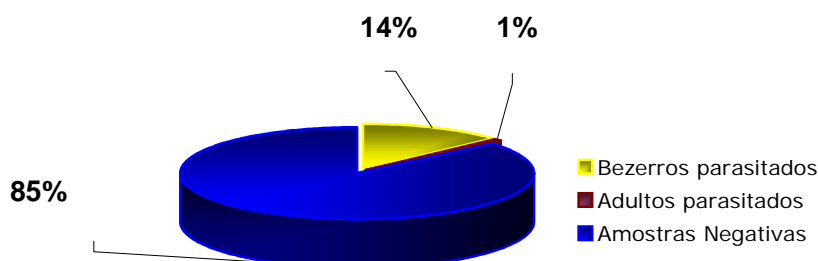
<sup>a</sup> Microscopia óptica; <sup>b</sup> Reação em Cadeia da Polimerase

### 5.1.3. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp – Análise dos animais

No estudo da ocorrência de *Cryptosporidium* spp nos animais, das 200 amostras fecais analisadas, 17 (8,5%) foram positivas na microscopia óptica e 28 (14%) na PCR.

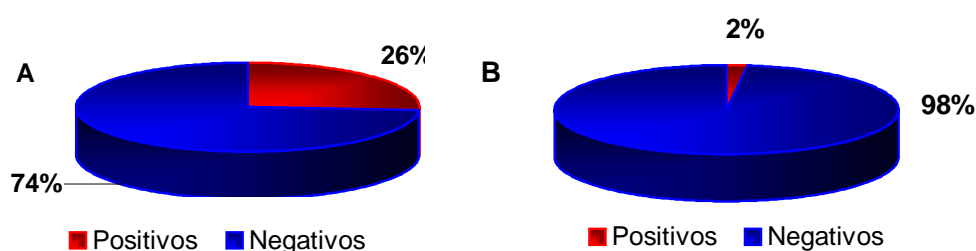
Analisando em conjunto todos os animais do experimento (figura 11), a ocorrência de *Cryptosporidium* em bezerros foi de 14%(26/200), significativamente maior do que a presença em animais adultos 1 % (2/200).

**Figura 12.** Análise percentual da distribuição do número de amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. de acordo com a categoria animal (bezerros e adultos). Total de 200 amostras.



A ocorrência de *Cryptosporidium* spp. especificamente em bezerros foi de 26% (26/100). Em bovinos adultos, *Cryptosporidium* spp. foi identificado em 2% (2/100) dos animais (figura 13).

**Figura 13.** Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em bezerros (A) e animais adultos (B). Total de 100 amostras em cada categoria animal.



Os valores de ocorrência para *Cryptosporidium* spp. variaram de 0 a 45%. O maior número de animais infectados por *Cryptosporidium* spp. em uma propriedade foi de 9 animais (propriedade E), demonstrado na tabela 17.

#### 5.1.4. Comparação das técnicas de diagnóstico – *Giardia duodenalis*

##### 5.1.4.1. CFMSZ versus Semi-Nested PCR amplificando o gene GDH

Das 200 amostras testadas por ambos os métodos, 10 amostras tiveram resultados discordantes. A técnica de CFMSZ não foi capaz de detectar 10 amostras que foram positivas na PCR (tabela 18), dessa forma elas foram consideradas “falso-negativas”. A concordância entre os testes foi de 95% (Nº de amostras positivas identificadas nos dois testes somadas ao Nº de amostras negativas em ambos, divididas

pelo N. total de amostras). A co-positividade da CFMSF foi de 37,5% e a co-negatividade de 100% (intervalo de confiança de 95%).

**Tabela 18.** Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais coletadas de dez propriedades (A-J) de bovinos leiteiros na região do município de Botucatu e Itatinga, São Paulo.

Propriedade	Nº de amostras	Nº de positivos	% de animais infectados	M.O <sup>a</sup>	PCR <sup>b</sup>
A	20	1	5	0	1
B	20	2	10	0	2
C	20	4	20	2	4
D	20	1	5	0	1
E	20	9	45	9	9
F	20	1	5	1	1
G	20	1	5	0	1
H	20	2	10	1	2
I	20	7	35	4	7
J	20	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>200</b>	<b>28</b>	<b>14</b>	<b>17</b>	<b>28</b>

<sup>a</sup> Microscopia óptica; <sup>b</sup> Reação em Cadeia da Polimerase

**Tabela 19.** Resultados comparativos do teste de centrifugo flutuação-modificada em sulfato de zinco (CFMSZ) com o teste da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) no diagnóstico de *Giardia duodenalis*.

CFMSZ	PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	6	0	6
Negativo	10	184	194
<b>Total</b>	<b>16</b>	<b>184</b>	<b>200</b>

P<0,001, considerado extramamente significativo

#### 5.1.4.2. CFMSZ versus ELISA – coproantígeno de captura

Das 200 amostras testadas por ambos os métodos, cinco amostras foram positivas pelas duas técnicas e duas amostras tiveram resultados discordantes; sendo que uma amostra foi positiva pela CFSZ e negativa no ELISA e a outra amostra negativa no CFSZ e positiva no ELISA. Para as duas amostras discordantes, a confirmação foi suportada pela análise na técnica da PCR (tabela 19). Duas amostras foram consideradas falso positivas pela técnica de ELISA, de acordo com os resultados da absorvância e Índice ELISA.

**Tabela 20.** Resultados comparados do teste de centrifugo-flutuação modificada em sulfato de zinco (CFMSZ) com o teste ELISA de pesquisa de coproantígenos de *Giardia duodenalis* em amostras fecais.

CFMSZ	ELISA		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	5	1	6
Negativo	1	193	194
<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>194</b>	<b>200</b>

P<0,001, considerado extramamente significante

A concordância entre os testes foi de 99%. A co-positividade da CFMSF foi de 83,3% e a co-negatividade de 99,4%.

#### 5.1.4.3. ELISA versus Semi-Nested PCR amplificando o gene GDH

Das 200 amostras testadas por ambos os métodos, 6 amostras foram positivas pelas duas técnicas e 10 amostras tiveram resultados discordantes (tabela 20). Duas amostras foram consideradas falso-positivas pela técnica de ELISA, de acordo com os resultados da absorvância, colorimetria e *Índice Elisa*.

**Tabela 21.** Resultados comparados do teste ELISA de pesquisa de coproantígenos de *Giardia duodenalis* em amostras fecais com o teste da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) no diagnóstico de *Giardia duodenalis*.

ELISA	PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	6	0	6
Negativo	10	184	194
<b>Total</b>	<b>16</b>	<b>184</b>	<b>200</b>

P<0,001, considerado extramamente significante

A concordância entre os testes foi de 95%. A co-positividade do teste ELISA foi de 37,5% e a co-negatividade de 100%.

#### 5.1.5. Resultados agregados obtidos pelos três testes

Das 200 amostras analisadas pelas três técnicas de diagnóstico, 16 foram positivas pela PCR, 6 amostras na CFMSZ e 6 na técnica de ELISA. Apenas 6 amostras

foram positivas pelas 3 técnicas. A técnica de CFSZ detectou uma amostra que foi negativa pelo teste ELISA e de semelhante forma o teste ELISA foi capaz de identificar 1 amostra positiva que foi negativa na CFSZ. Nenhuma amostra positiva na CFSZ e ELISA foi negativa na PCR (tabela 21).

**Tabela 22.** Resultados comparados do teste de centrifugo flutuação modificada em sulfato de zinco (CFMSZ), teste enzimático de pesquisa de coproantígenos em amostras fecais (ELISA) e teste da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) no diagnóstico de *Giardia duodenalis*.

Resultado	CFMSZ	ELISA	PCR
Positivo	6	6	16
Negativo	194	194	184

#### 5.1.6. Comparação das técnicas de diagnóstico – *Cryptosporidium* spp.

Das 200 amostras testadas por ambos os métodos, 11 amostras tiveram resultados discordantes. A técnica de CFM não foi capaz de detectar 11 amostras que foram positivas na PCR, dessa forma elas foram consideradas “falso-negativas” (tabela 22). A concordância entre os testes foi de 94,5%. A co-positividade da CFM foi de 60,7% e a co-negatividade de 100%.

**Tabela 23.** Resultados comparados do teste de coloração por fucsina Carbólica modificada (CFM) com o teste da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) no diagnóstico de *Cryptosporidium* spp.

CFM	PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	17	0	17
Negativo	11	172	183
<b>Total</b>	<b>28</b>	<b>172</b>	<b>200</b>

P<0,001, considerado extramamente significativo

##### 5.1.6.1. Resultados agregados obtidos pelos três testes

Das 200 amostras analisadas, 28 foram positivas pela PCR, 17 amostras na CFMSZ e apenas uma pela técnica de ELISA (tabela 23).

### 5.1.7. Presença de diarreia nos animais

Dos 200 animais testados, 18 possuíam fezes consideradas diarreicas no momento da coleta, dessas amostras, apenas uma foi originada de bovino adulto e as restantes de bezerros.

**Tabela 24.** Resultados comparados do teste de coloração por fucsina Carbólica modificada (CFCM), teste enzimático de pesquisa de coproantígenos em amostras fecais (ELISA) e teste da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) no diagnóstico de *Cryptosporidium* spp.

Resultado	CFCM	ELISA	PCR
Positivo	17	1	28
Negativo	183	199*	172

\*85% das amostras positivas eram da espécie *Cryptosporidium andersoni*

### 5.1.8. Associação com diarreia

Do total de 100 amostras de bezerros, *Giardia duodenalis* foi observada em 14,4% (12/83) daquelas que possuíam consistência normal e em 17,6% das diarreicas (3/17). Enquanto que *Cryptosporidium* spp. foi observado em 28,9% (24/83) dos animais não diarreicos e em 23,5% (4/17) dos diarreicos (tabela 24). Nos bovinos adultos os protozoários foram observados apenas em amostras de consistência normal. *G. duodenalis* esteve presente em uma amostra fecal não diarreica e *Cryptosporidium* spp. em duas. A única amostra diarreica de bovino adulto não estava parasitada por *Giardia duodenalis* e/ou *Cryptosporidium* spp.

**Tabela 25.** Estratificação da consistência fecal das amostras de bezerros e a presença ou ausência de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp.

Consistência da amostra	Negativas	+ <i>Giardia</i>	+ <i>Cryptosporidium</i>
Normal	83	13	24
Diarreica	17	3	4
Total	100	15	28

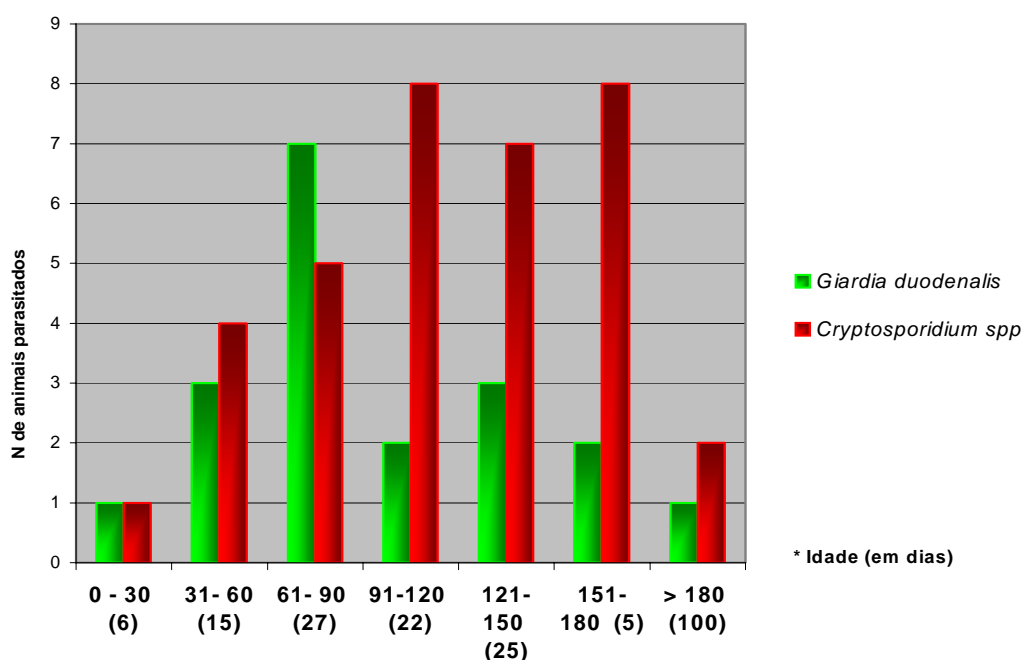
### 5.1.9. Co-infecção por *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. nos bovinos

Apenas três amostras de bezerros estavam parasitadas pelos dois enteroprotzoários (Bezerros n°14, n°77 e n°84), sendo que apenas um desses animais apresentava diarreia (bezerro n°14).

### 5.1.10. Ocorrência de acordo com a idade

A idade dos bezerros incluídos no experimento variou de 15 a 180 dias. A maior ocorrência de *Giardia duodenalis* foi observada em animais com média de idade de 90 a 120 dias. Para *Cryptosporidium* spp. a maior ocorrência de animais positivos foi observada em bezerros de 90 a 180 dias (figura 13).

**Figura 14.** Ocorrência de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. de acordo com a faixa etária dos animais.



\* O número em parênteses no eixo X das categorias indica a quantidade de animais em cada categoria.

A presença de cistos de *Giardia duodenalis* e oocistos de *Cryptosporidium* spp., bem como os resultados da técnica PCR para ambos, estão demonstrados nas figuras 14, 15, 16, 17, 18 e 19.

### 5.1.11. Caracterização molecular de *Giardia duodenalis* através da PCR-RFLP

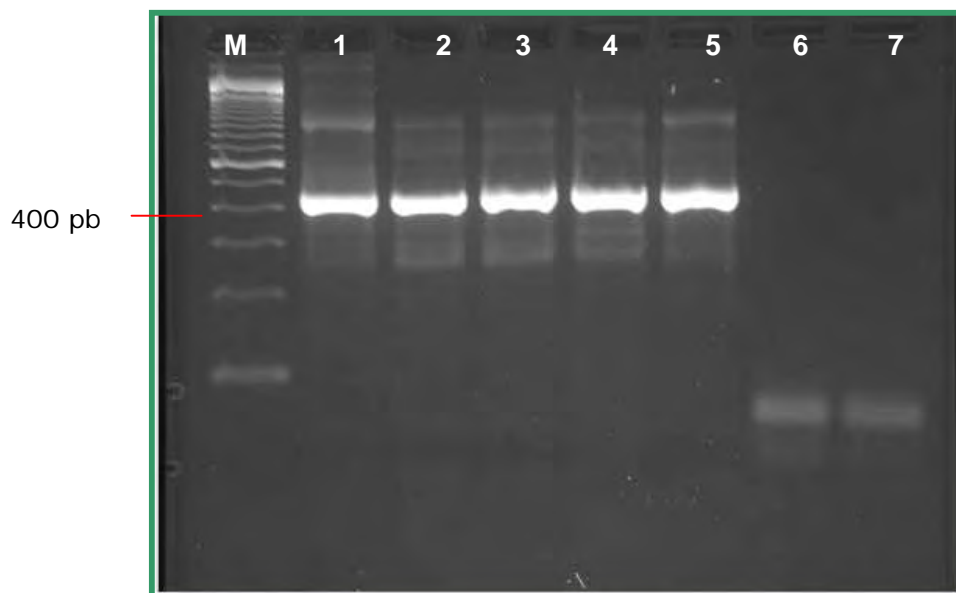
A clivagem com a enzima *NlaIV* nas 16 amostras que tiveram produtos amplificados da Semi-Nested PCR apresentaram-se em conformidade aos descrito por Read et al. (2004). O genótipo E (não zoonótico) foi observado em 14 amostras (tabela 25, figura 20), enquanto que o genótipo AI (zoonótico) em 1 amostra e B em outra.



**Figura 15.** Aspectos microscópicos de cistos de *Giardia duodenalis* observados após o uso da técnica de centrifugo-flutuação modificada em sulfato de zinco. As setas pretas indicam os cistos de *Giardia*, enquanto que a seta vermelha indica um ovo do tipo *Strongilydeo*. Bezerra, aumento de 400x.

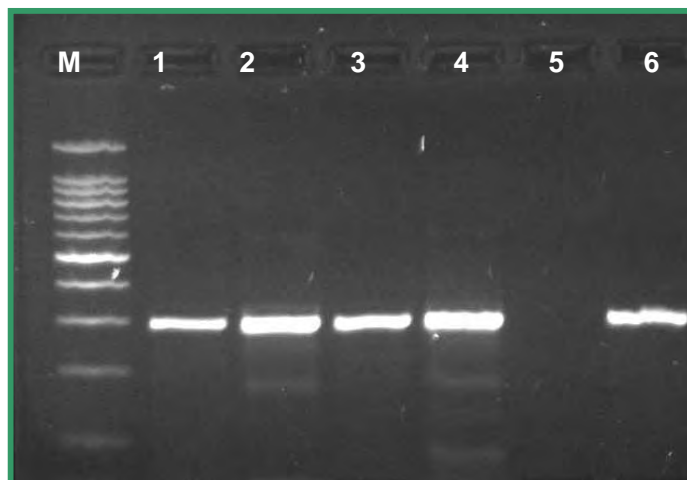


**Figura 16.** Análise de PCR baseado na amplificação do gene GDH para *Giardia duodenalis*. Gel de agarose 1.5% corado com brometo de etídio. Amostras de bovinos.



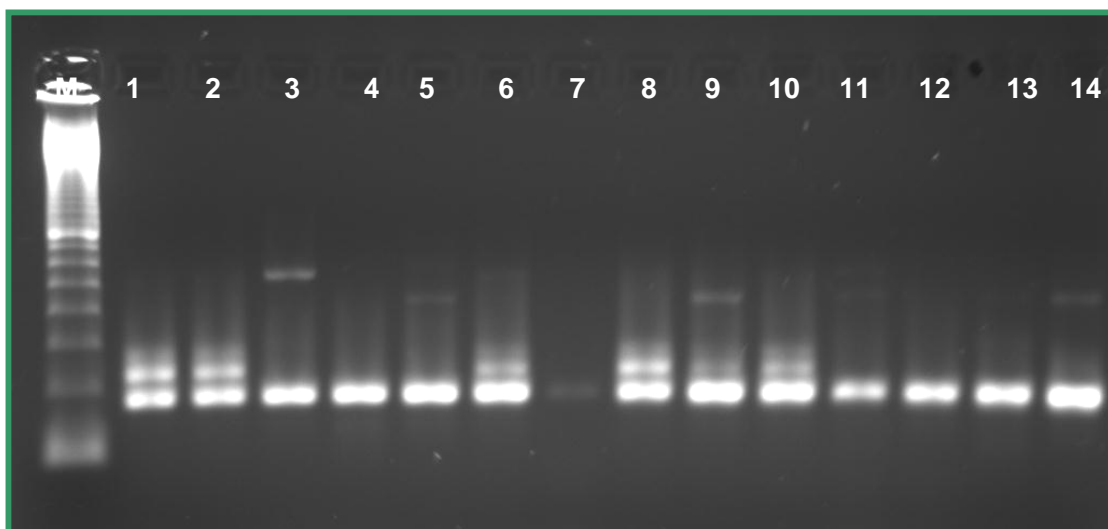
Linha M: Marcador de peso molecular de 100 pares de base  
 Linhas 1, 2, 3, 4 : Amostras positivas de *Giardia duodenalis* isoladas de bovinos  
 Linha 5: Controle positivo  
 Linha 6: Controle negativo da reação de PCR  
 Linha 7: Controle negativo da reação de NESTED-PCR

**Figura 17.** Análise de PCR baseado na amplificação do gene SSU-rDNA para *Giardia duodenalis*, segundo Hopkins et al. (1997). Reação de PCR. Gel de agarose 1.5% corado com brometo de etídio.



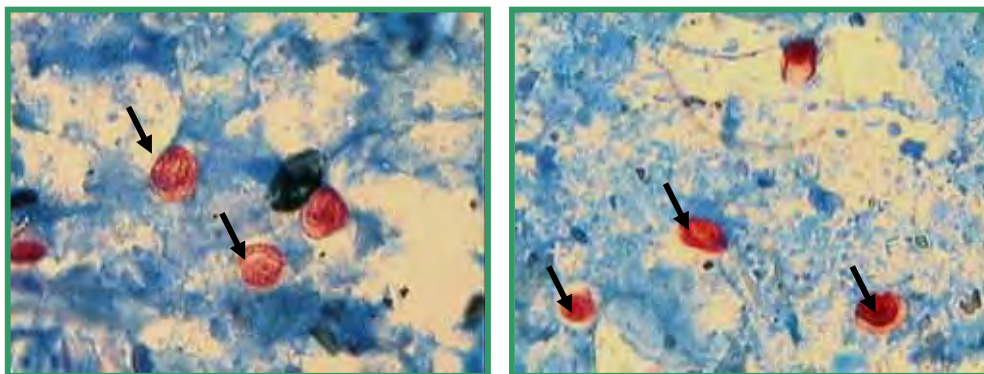
Linha M: Marcador de peso molecular de 100 pares de base  
Linhas 1, 2, 3, 4: Amostras positivas de *Giardia duodenalis*  
Linha 5: Controle negativo  
Linha 6: Controle positivo

**Figura 18.** Análise de PCR baseado na amplificação do gene SSU-rDNA para *Giardia duodenalis*. Reação de Nested-PCR (Read et al., 2002; Macglade et al., 2003, Becher et al., 2004). Gel de agarose 1.5% corado com brometo de etídio.

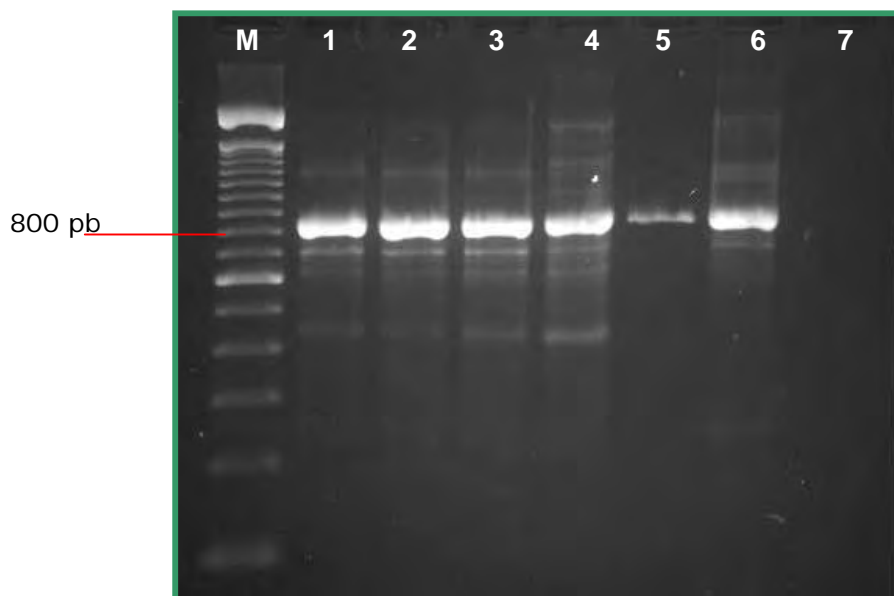


Linha M: Marcador de peso molecular de 100 pares de base,  
Linhas 1 até 14 : amostras positivas de *Giardia duodenalis*

**Figura 19.** Aspectos microscópicos de oocistos de *Cryptosporidium* spp. observados após o uso da técnica de coloração com fucsina-carbólica modificada. Os oocistos são visualizados como corpos redondos corados de vermelho (setas pretas) em contraste com um fundo azul. Bezerra, aumento de 1000x.



**Figura 20.** Análise de PCR baseado na amplificação do gene 18S small Subunit (SSU) rRNA para *Cryptosporidium* spp. Gel de agarose 1.5% corado com brometo de etídio. Amostras de bovinos.



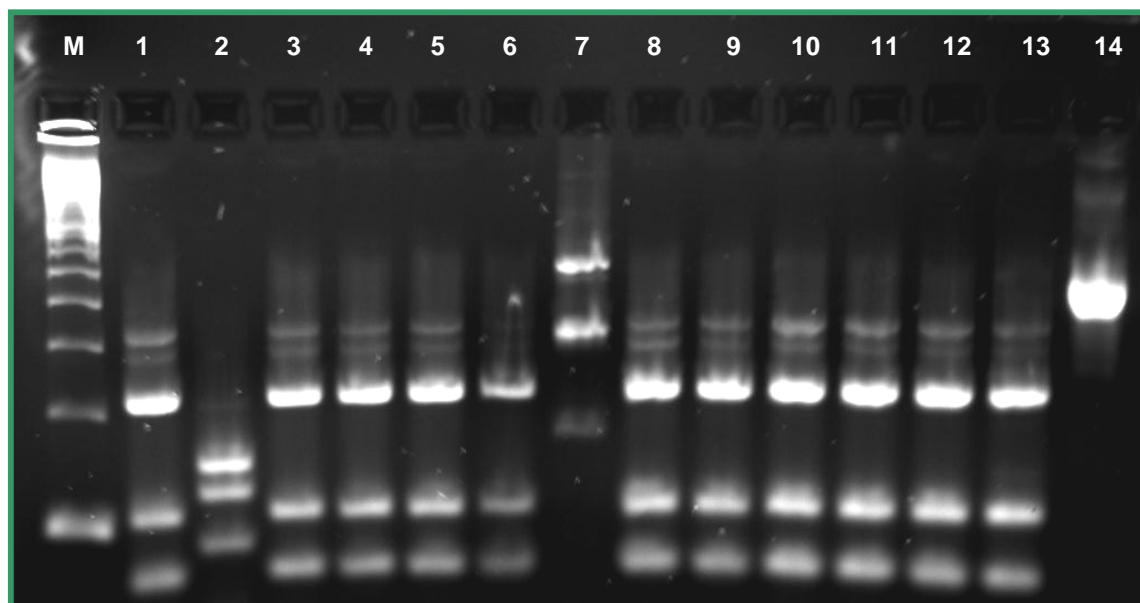
Linha M: Marcador de peso molecular de 100 pares de base

Linhas 1, 2, 3, 4, 5 : Amostras positivas de *Cryptosporidium* spp.

Linha 6: Controle positivo

Linha 7: Controle negativo

**Figura 21.** Análise de PCR-RFLP com a utilização da enzima *NlaIV* para amostras positivas de *Giardia duodenalis* amplificadas no gene GDH (Read et al., 2004). Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.



Linha M: Marcador de peso molecular de 100 pares de base; Linhas 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13 : Amostras positiva de *Giardia duodenalis* – genótipo E; Linha 2 : Amostra positiva de *Giardia duodenalis* – genótipo AI; Linha 7 : Amostra positiva de *Giardia duodenalis* – genótipo B (digestão parcial da amostra); Linha 14 : Amostras positiva de *Giardia duodenalis* – DNA não submetido à clivagem com *NlaIV* .

**Tabela 26.** Genótipos de *Giardia duodenalis* encontrados nos bovinos.

Animal ID	Idade	Diarréia	Propriedade	PCR		Genótipo
				Gene GDH	Gene 16S-rRNA	
Ba 2	Adulto	Não	A	+	+	E
Bz 12	3 meses	Não	B	+	+	E
Bz 13	3 meses	Sim	B	+	+	E
Bz 14*	4 meses	Sim	B	+	+	AI
Bz 20	60 dias	Não	B	+	+	E
Bz 21	3 meses	Não	C	+	+	E
Bz 26	3 meses	Não	C	+	+	E
Bz 29	3 meses	Não	C	+	+	E
Bz 53	3 meses	Sim	F	+	+	E
Bz 54	3 meses	Não	F	+	+	E
Bz 61	15 dias	Não	G	+	+	E
Bz 76	4 meses	Não	H	+	+	E
Bz 77*	5 meses	Não	H	+	+	E
Bz 84*	50 dias	Não	I	+	+	E
Bz 87	5 meses	Não	I	+	+	B
Bz 91	60 dias	Não	J	+	+	E

\*Animais parasitados também por *Cryptosporidium* spp.

### 5.1.12. Caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. em através da PCR-RFLP

Do total de 28 amostras positivas, 23 apresentaram fragmentos de restrição gerados pela digestão com a enzima *Sspl* com duas bandas visíveis de aproximadamente 385 e 448 pares de base (pb) na eletroforese em gel de agarose. As outras 5 amostras possuíam três bandas visíveis de aproximadamente 108, 254 e 449 pares de base (tabela 26).

A digestão com a enzima *Vspl* produziu duas bandas visíveis de aproximadamente 102, 731pb para as primeiras 23 que geraram duas bandas visíveis na primeira clivagem, enquanto que as 5 restantes produziram duas bandas visíveis de aproximadamente 104 e 625 pb (compatíveis com *Cryptosporidium parvum*, *C. bovis* e *C. genótipo deer-like*, que não podem ser diferenciadas entre si)

Para as 23 amostras, o resultado das análises dos fragmentos de restrição produzidos pela enzima *Sspl* são similares para as espécies *C. andersoni*, *C. muris* e *C. felis*. As análises da enzima *Vspl* produziram duas bandas visíveis de 102 e 731 pares de base, excluindo a possibilidade da espécie *C. felis* e impossibilitando a diferenciação entre *C. andersoni* e *C. muris* (Xiao et al.,1999; Xiao et al., 2001). *Cryptosporidium andersoni* e *C. muris* foram diferenciados pela digestão dos produtos secundários da PCR com a enzima *Ddel*.

Os produtos secundários originados desta etapa resultaram em bandas de 156, 186 e 470 bp visíveis no gel de agarose para todas as amostras, resultado esse característico do perfil apresentado por *C. andersoni* (Xiao et al.,1999; Xiao et al., 2001).

**Tabela 27.** Genotipagem de *Cryptosporidium* spp. por PCR-RFLP. Tamanho dos fragmentos de restrição gerados pelas enzimas *Sspl*, *Vspl* e *Ddel*.

Nº de amostras	<i>Sspl</i>	<i>Vspl</i>	<i>Ddel</i>
23	385, 448	102, 731	153,186,470
5	108, 254, 449	104,625	-----

A imagem dos géis de agarose resultantes da clivagem pelas enzimas *Sspl*, *Vspl* e *Ddel* estão demonstrados na figura 21 e 22.

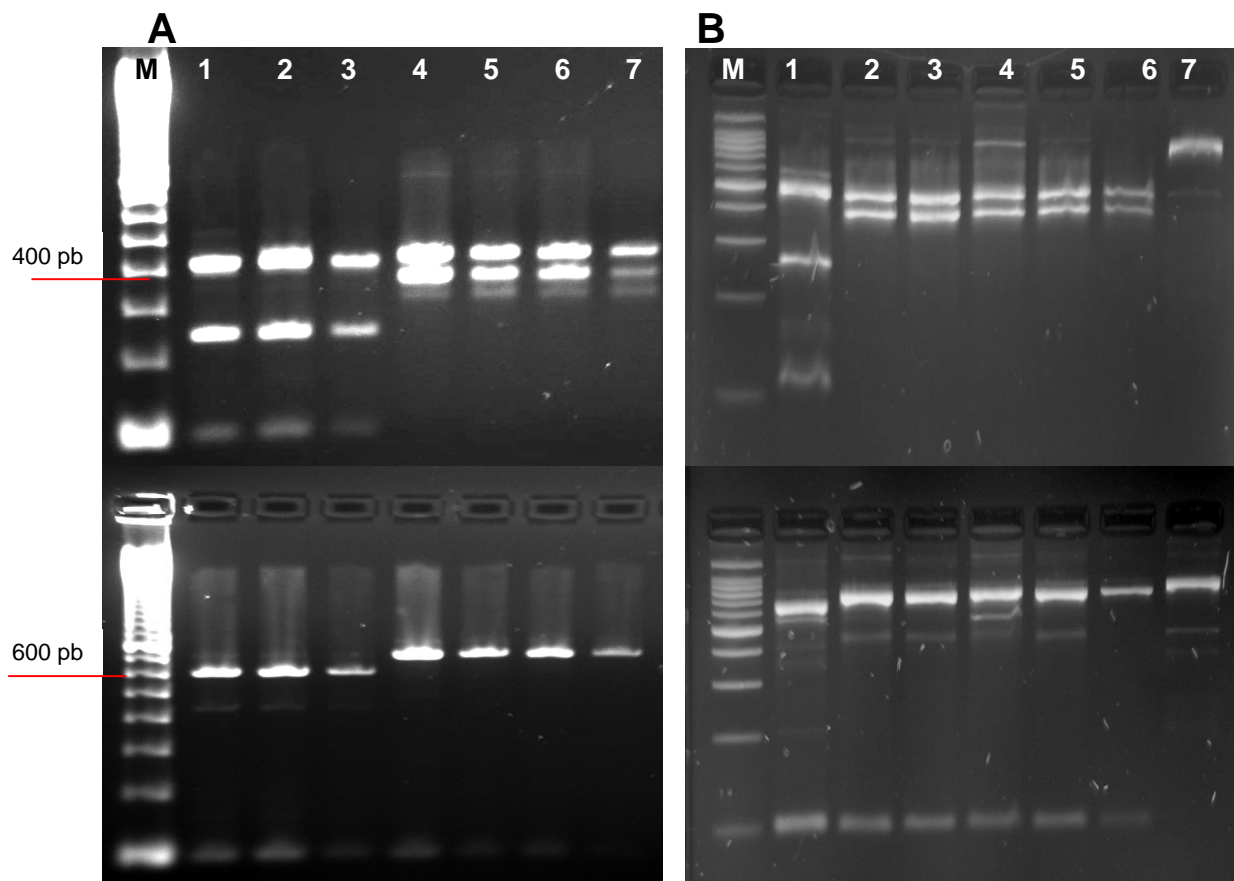
Para a diferenciação entre *C. parvum*, *C. bovis*, e *C. genótipo deer-like*, o produto de Nested-PCR amplificado das 5 amostras restantes foi clivado com a enzima de restrição *MobII*, gerando para três amostras bandas de 76, 162 e 412 pb (compatíveis

com *Cryptosporidium bovis*) e para uma amostra bandas de 76 e 771 pb (compatíveis com *Cryptosporidium parvum*).

A figura X demonstra o gel de agarose com os resultados da análise de restrição pela enzima *MobII*. Apenas uma amostra não pode ser diferenciada devido a presença de bandas muito fracas no gel de agarose que impossibilitava a visualização (amostra com pequena quantidade de DNA).

As espécies/genótipos de acordo com faixa etária e categoria animal estão demonstrados nas figuras 23 e 24 e na tabela 27.

**Figura 22.** Análise de PCR-RFLP com a utilização das enzimas *Sspl* (A), *Vspl* (B) para amostras positivas de *Cryptosporidium* spp. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.



Linha M: Marcador de peso molecular de 100 pares de base

**A- *Sspl* (painel de cima)**

Linhas 1, 2, 3: *C. parvum*, *C. bovis*, *C. genótipo deer-like* (108, 254, 449 pb)

Linhas: 4, 5, 6 : *C. andersoni* (385, 448 pb)

**A- *Vspl* (painel de baixo)**

Linhas 1, 2, 3: *C. parvum* genótipo bovino, *C. bovis*, *C. genótipo deer-like* (104, 625 pb)

Linhas: 4, 5, 6 : *C. andersoni* (102, 731 pb)

**B- *Sspl* (painel de cima)**

Linhas 1: *C. parvum*, *C. bovis*, *C. genótipo deer-like* (108, 254, 449 pb)

Linhas: 2, 3, 4, 5, 6 : *C. andersoni* (385, 448 pb)

Linha 7 : DNA não submetido à clivagem

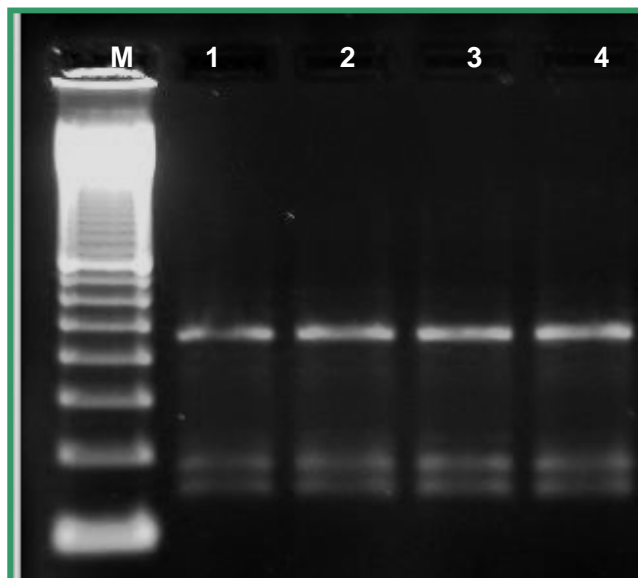
**B2- *Vspl* (painel de baixo)**

Linhas 1: *C. parvum* genótipo bovino, *C. bovis*, *C. genótipo deer-like* (104, 625 pb)

Linhas: 2, 3, 4, 5, 6 : *C. andersoni* (102, 731 pb)

Linha 7: DNA não submetido à clivagem

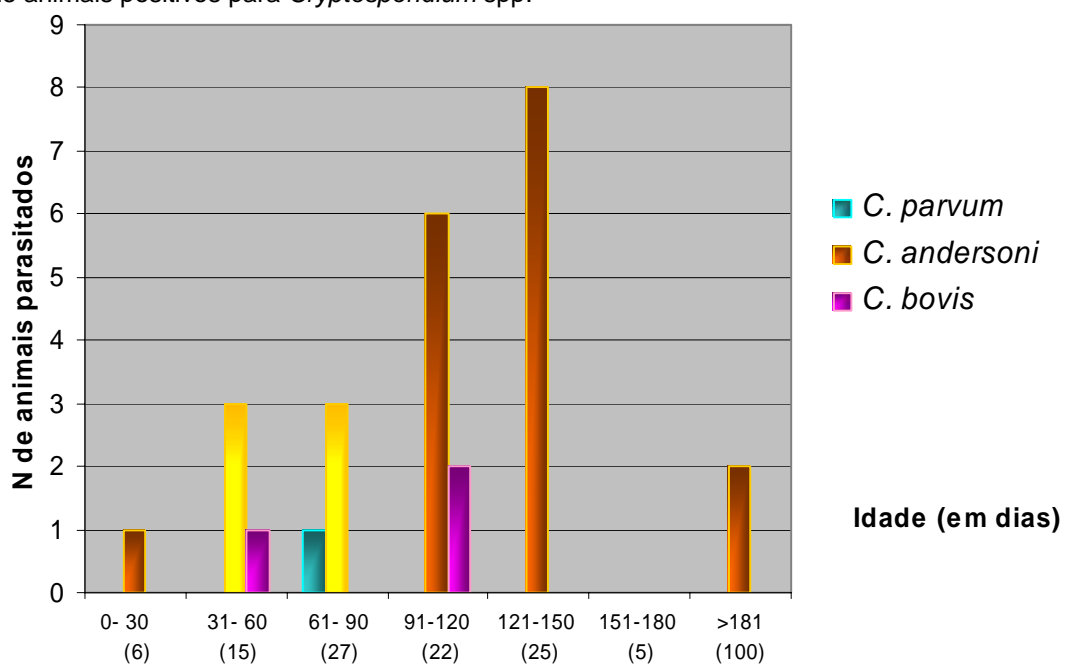
**Figura 23.** Análise de PCR-RFLP com a utilização da enzima *Ddel* para diferenciação entre amostras de *Cryptosporidium andersoni* e *Cryptosporidium muris*. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.



Linha M: Marcador de peso molecular de 100 pares de base;

Linhas 1 até 4: *C. andersoni* (clivagem com a enzima *Ddel* produzindo 156, 186, 470 pb)

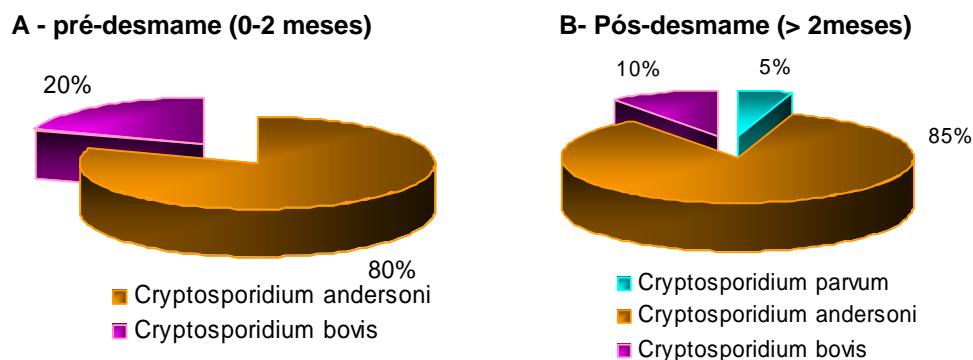
**Figura 24.** Porcentagem de cada espécie/genótipo, de acordo com a idade dos animais, relativo ao total de animais positivos para *Cryptosporidium* spp.



\* O número em parênteses no eixo X das categorias indica a quantidade de animais em cada categoria



**Figura 25.** Porcentagem de espécies/genótipos de *Cryptosporidium* de acordo com a categoria de animal: A, no pré-desmame (0-2 meses idade), B, pós-desmame (2-6 meses de idade).



**Tabela 28.** Espécies e genótipos de *Cryptosporidium* spp. encontrados nos bovinos do experimento.

Animal ID	Idade	Diarréia	Propriedade	PCR -RFLP			
				SSPI	VSPI	DDEI	MOBII
Bz 1	46 dias	Não	A	<i>C.bovis</i>	<i>C.bovis</i>		<i>C.bovis</i>
Bz 14 <sup>a</sup>	4 meses	Sim	B	<i>C.bovis</i>	<i>C.bovis</i>		<i>C.bovis</i>
Bz 15	4 meses	Sim	B	<i>C.bovis</i>	<i>C.bovis</i>		<i>C.bovis</i>
Bz 23	3 meses	Não	C	NR*	NR*		NR*
Bz 24	60 dias	Não	C	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	
BA 26	Adulto	Não	C	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	
Bz 30	3 meses	Não	C	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	
BA 37	Adulto	Não	D	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	
Bz 41	4 meses	Não	E	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	
Bz 42	60 dias	Não	E	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	
Bz 43	4 meses	Não	E	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	
Bz 44	4 meses	Não	E	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	
Bz 45	5 meses	Não	E	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	
Bz 46	5 meses	Não	E	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	
Bz 48	3 meses	Sim	E	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	
Bz 49	4 meses	Não	E	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	
Bz 50	5 meses	Não	E	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	
Bz 52	5 meses	Não	F	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	
Bz 62	15 dias	Não	G	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	
Bz 72	3 meses	Sim	H	<i>C.parvum</i>	<i>C.parvum</i>	<i>C.parvum</i>	<i>C.parvum</i>
Bz 77 <sup>b</sup>	5 meses	Não	H	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	
Bz 81	4 meses	Não	I	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	
Bz 83	5 meses	Não	I	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	
Bz 84 <sup>b</sup>	50 dias	Não	I	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	
Bz 85	5 meses	Não	I	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	
Bz 86	5 meses	Não	I	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	
Bz 88	3 meses	Não	I	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	
Bz 89	4 meses	Não	I	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	<i>C.andersoni</i>	

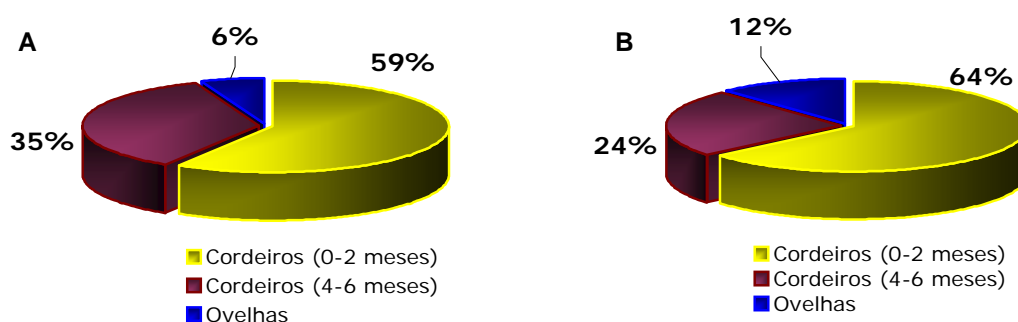
\*NR = Não obteve-se diferenciação entre *Cryptosporidium parvum*; *Cryptosporidium bovis* e *Cryptosporidium* genótipo *deer-like* devido a presença de bandas muito fracas no gel de agarose.

<sup>a</sup> Também parasitado por *Giardia duodenalis* genótipo A, <sup>b</sup> Também parasitado por *Giardia duodenalis* genótipo E.

## 5.2. Análise da propriedade de Tupi Paulista - SP.

Na análise da ocorrência de *Giardia duodenalis* na propriedade de Tupi Paulista-SP, das 100 amostras analisadas, 34 foram diagnosticadas positivas, sendo 20 originadas de cordeiros, 12 de machos jovens (cordeiros traçadores) e 2 de ovelhas (figura 25). *Cryptosporidium* spp. foi diagnosticado em 25 amostras, sendo 16 originadas de cordeiros, 6 de machos jovens (cordeiros traçadores) e 3 de ovelhas. Nenhuma das 12 amostras de bovinos foram positivas para *Giardia duodenalis* e/ou *Cryptosporidium* spp.

**Figura 26.** Ocorrência de *Giardia* (A) e *Cryptosporidium* (B) de acordo com a categoria animal. Total de 100 animais. Amostras de Ovinos. Tupi Paulista-SP.

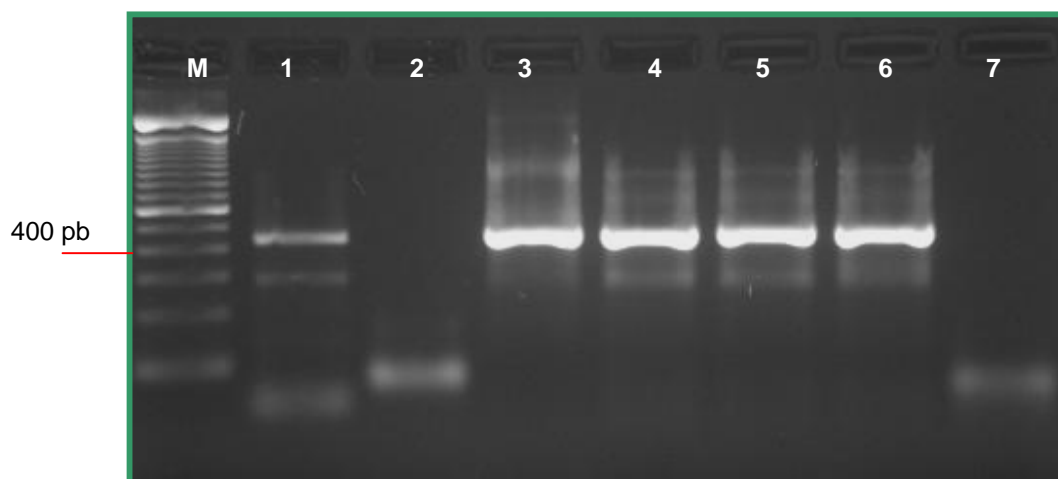


Cistos de *Giardia duodenalis* foram observados em 5 amostras, do total de 20 analisadas pela técnica de microscopia óptica (CFMSZ), enquanto que a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. foi detectada em 8 amostras, do total de 65 analisadas pela técnica de microscopia óptica (CFCM). O diagnóstico de *Giardia duodenalis* foi obtido em 32% dos animais pela PCR versus 27% por ELISA, e *Cryptosporidium* spp. foi detectado em 25% dos animais pela PCR versus 13% pela técnica de ensaio imunoenzimático (figuras 26, 27 28 e 29). Todos os resultados dos ovinos de acordo com as análises pelas três técnicas de diagnósticos estão demonstrados nas tabelas 28 e 29. Os cordeiros estavam mais parasitados do que as ovelhas. *Giardia duodenalis* foi encontrada em 32 cordeiros e apenas 2 ovelhas, enquanto que *Cryptosporidium* spp. esteve presente em 22 cordeiros e apenas 3 ovelhas. Infecções mistas ocorreram em 14 cordeiros. A ocorrência de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. de acordo com a faixa etária (cordeiros x ovelhas) e com a técnica de diagnóstico usada para detecção dos enteroparasitas (ELISA x PCR) estão caracterizados na tabela 30. Nenhum dos doze bovinos testados apresentaram resultados positivos em qualquer uma das três técnicas.

**Figura 27.** Aspectos microscópicos de cistos de *Giardia duodenalis* observados após o uso da técnica de centrifugo-flutuação modificada em sulfato de zinco (setas pretas). Cordeiro, aumento de 400x.



**Figura 28.** Análise de PCR baseado na amplificação do gene GDH para *Giardia duodenalis*. Gel de agarose 1.5% corado com brometo de etídio. Amostras de ovinos.



Linha M: Marcador de peso molecular de 100 pares de base

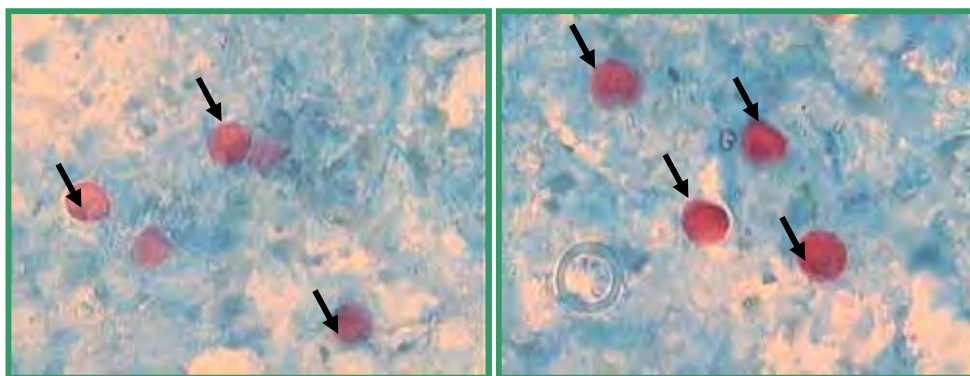
Linhas 1, 3, 4, 5 : Amostras positivas de *Giardia duodenalis* isoladas de ovinos

Linha 2: Amostra negativa

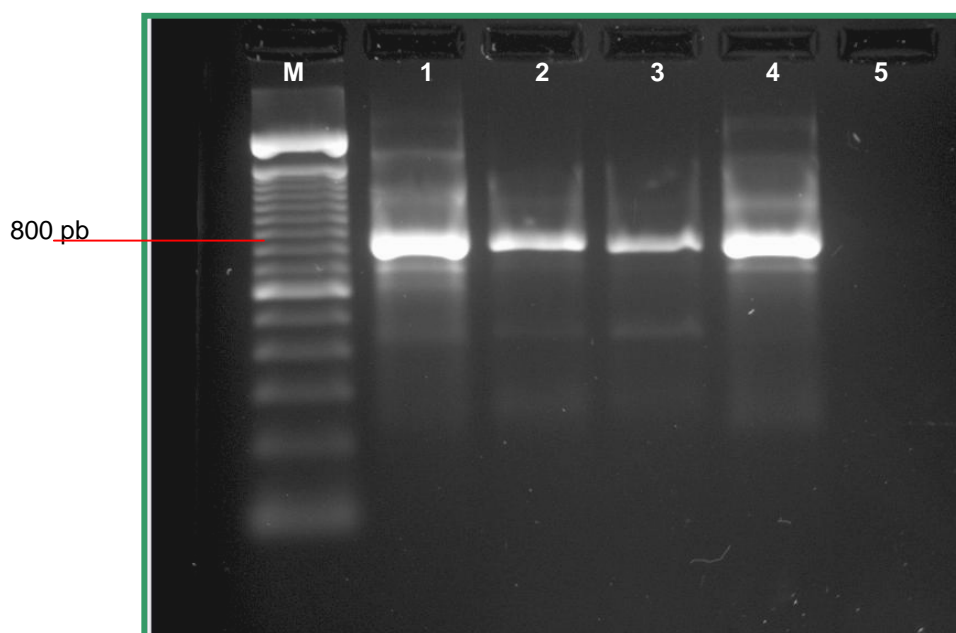
Linha 6: Controle positivo

Linha 7: Controle negativo

**Figura 29.** Aspectos microscópicos de oocistos de *Cryptosporidium* spp. observados após o uso da técnica de coloração com fucsina-carbólica modificada. Os oocistos são visualizados como corpos redondos corados de vermelho em contraste com um fundo azul (setas pretas). Cordeiro, aumento de 1000x.



**Figura 30.** Análise de PCR baseado na amplificação do gene 18S small Subunit (SSU) rRNA para *Cryptosporidium* spp. Gel de agarose 1.5% corado com brometo de etídio. Amostras de ovinos.



Linha M: Marcador de peso molecular de 100 pares de base

Linhas 1, 2, 3: Amostras positivas de *Cryptosporidium* spp. isoladas de ovinos

Linha 4: Controle positivo

Linha 5: Controle negativo

**Tabela 29.** Resultados das análises de amostras fecais de cordeiros provenientes da propriedade de Tupi Paulista –SP.

ID ovino	CFMSZ *	C FCM**	ELISA		PCR	
			<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>
26 CT <sup>a</sup>	+	-	+	-	+	-
27 CT	+	-	+	-	+	-
28 CT	-	-	-	-	+	-
30 CT	-	-	-	-	-	-
59 CT	+	-	+	-	+	-
60 CT	+	-	+	-	+	-
95 CT	-	-	-	-	-	-
99 CT	+	-	+	-	+	-
100 CT	-	-	-	-	+	-
16 CT	-	-	-	-	-	-
19 CT	-	-	-	-	-	-
33 CT	-	-	-	-	-	-
35 CT	-	-	-	-	-	-
38 CT	-	-	-	-	-	+
39 CT	-	-	-	-	-	-
41 CT	-	-	-	-	-	-
46 CT	-	-	-	-	-	+
48 CT	-	-	-	-	-	-
56 CT	-	-	-	-	-	-
79 CT	-	-	-	-	-	+
34 CT	NR	NR	+	-	+	-
36 CT	NR	NR	+	-	+	-
40 CT	NR	NR	+	-	+	-
49 CT	NR	NR	-	-	-	-
53 CT	NR	+	+	-	+	+
37 CT	NR	+	-	-	+	+
74 CT	NR	-	-	-	-	+
43 CT	NR	-	-	-	-	-
44 CT	NR	NR	-	-	-	NR
63 CT	NR	NR	-	-	-	-
1 C <sup>b</sup>	NR	+	+	+	+	+
4 C	NR	NR	-	-	-	-
6 C	NR	NR	+	-	+	-
13 C	NR	-	+	+	+	+
18 C	NR	-	+	+	+	+
19 C	NR	NR	+	-	+	-
25 C	NR	+	+	+	+	+
27 C	NR	-	+	-	+	-
28 C	NR	NR	+	-	+	+
29 C	NR	+	+	+	+	+
36 C	NR	+	NR	+	+	+
39 C	NR	-	+	-	+	-
41 C	NR	-	+	+	+	+
2 C	NR	NR	+	-	+	-
7 C	NR	+	+	+	+	+
9 C	NR	NR	-	+	+	+
14 C	NR	NR	+	-	+	-
26 C	NR	NR	NR	-	-	-
40 C	NR	+	-	+	-	+
43 C	NR	NR	-	-	-	+
50 C	NR	-	-	-	-	-
52 C	NR	NR	-	+	-	+
53 C	NR	NR	-	+	-	+
17 C	NR	NR	+	+	+	+
22 C	NR	NR	+	-	+	+
5 C	NR	NR	-	-	-	-
8 C	NR	NR	-	-	-	-
23 C	NR	NR	+	-	+	-
32 C	NR	NR	NR	NR	-	-
35 C	NR	NR	+	-	+	-

\*CFMSZ= Centrifugo-flutuação modificada em sulfato de zinco; \*\*CFCM= Coloração por Fucsina Carbólica Modificada, aCordeiros traçadores; bCordeiros; NR= Não realizado; (+) = Amostra positiva; (-) = Amostra negativa

**Tabela 30.** Resultados do processamento das análises de amostras fecais de ovelhas provenientes da propriedade de Tupi Paulista–SP pelas técnicas de Centrifugo-flutuação modificada em sulfato de zinco (CFMSZ), Coloração por fucsina carbólica modificada (FCM), Ensaio imunoenzimático (ELISA) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Ovino	Coloração		ELISA		PCR
	FCM**				
	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>
537 O <sup>a</sup>	-	-	-	-	-
545 O	-	-	-	-	+
627 O	-	-	-	-	-
629 O	-	-	-	-	-
668 O	-	-	-	-	-
709 O	NR	-	-	-	-
25 O	NR	-	-	-	-
163 O	NR	-	-	-	-
179 O	NR	-	-	-	-
206 O	NR	-	-	+	-
224 O	NR	-	-	-	-
473 O	NR	-	-	-	-
148 O	NR	-	-	-	-
165 O	-	-	-	-	-
217 O	-	-	-	-	-
229 O	-	-	-	-	-
232 O	-	-	-	-	-
449 O	-	-	-	-	-
487 O	-	-	-	-	-
515 O	-	-	-	-	-
562 O	-	-	-	-	+
618 O	-	-	-	-	-
748 O	-	-	-	-	-
51 O	-	-	-	-	-
52 O	NR	-	-	-	-
171 O	-	-	-	+	+
182 O	NR	-	-	-	-
189 O	-	-	-	-	-
201 O	-	-	-	-	-
202 O	-	-	-	-	-
229 O	-	-	-	-	-
457 O	-	-	-	-	-
483 O	-	-	-	-	-
531 O	NR	-	-	-	-
598 O	-	-	-	-	-
625 O	-	-	-	-	-
628 O	-	-	-	-	-
176 O	-	-	-	-	-
209 O	-	-	-	-	-
529 O	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Ovelhas ; (+) = Amostra positiva; (-) = Amostra negativa; NR= Não realizado; \*CFMSZ= Sulfato de zinco modificada; \*\*FCM= Fucsina Carbólica Modificada

**Tabela 31.** Ocorrência de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em cordeiros e ovelhas de acordo com a técnica de diagnóstico (ELISA e PCR) na propriedade de Tupi Paulista-SP.

	No. de animais examinados	No. de positivos (% de ocorrência)			
		<i>G. duodenalis</i>		<i>Cryptosporidium</i> spp.	
		ELISA	PCR	ELISA	PCR
Cordeiros	60	27 (27%)	32 (32%)	13 (13%)	22 (22%)
Ovelhas	40	0	2 (2%)	0	3 (3%)
<b>Total</b>	100	27	34	13	25

Valores em parênteses denotam a porcentagem

Os resultados dos valores de absorvância a 450nm e do *índice ELISA* resultantes da análise de 10 amostras testadas para *G. duodenalis* estão exemplificados na tabela 28. A técnica de ensaio imunoenzimático para detecção de antígenos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais foi testada em 100 amostras fecais de ovinos e 12 de bovinos. Através dessa metodologia, 13 amostras de ovinos foram consideradas positivas. Os resultados dos valores de absorvância a 450nm e do *índice ELISA* resultantes da análise de 10 amostras testadas para *Cryptosporidium* spp. estão exemplificados na tabela 29

**Tabela 32.** Resultados obtidos com a utilização do kit ELISA GIARDIA II para o diagnóstico de *Giardia duodenalis* em amostras fecais de cordeiros e ovelhas provenientes de Tupi Paulista-SP.

Amostra	Intensidade de cor	Absorvância	Índice ELISA	Resultado
Cordeiro 1	+	0.276	0.23	Positivo
Cordeiro 13	+	1.278	1.56	Positivo
Cordeiro 18	+++	2.756	3.54	Positivo
Cordeiro 25	+	0.887	1.04	Positivo
Cordeiro 27	+	0.541	0.58	Positivo
Cordeiro 29	-	0.073	0.04	Negativo
Ovelha 182	-	0.135	0.04	Negativo
Ovelha 189	-	0.098	0.00	Negativo
Ovelha 201	-	0.092	0.01	Negativo
Controle positivo	+++	2.692		Positivo

+= amarelo fraco / ++= amarelo médio / +++= amarelo intenso / -= sem cor

**Tabela 33.** Resultados obtidos com a utilização do kit ELISA CRYPTOSPORIDIUM TEST para o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de cordeiros e ovelhas provenientes de Tupi Paulista-SP.

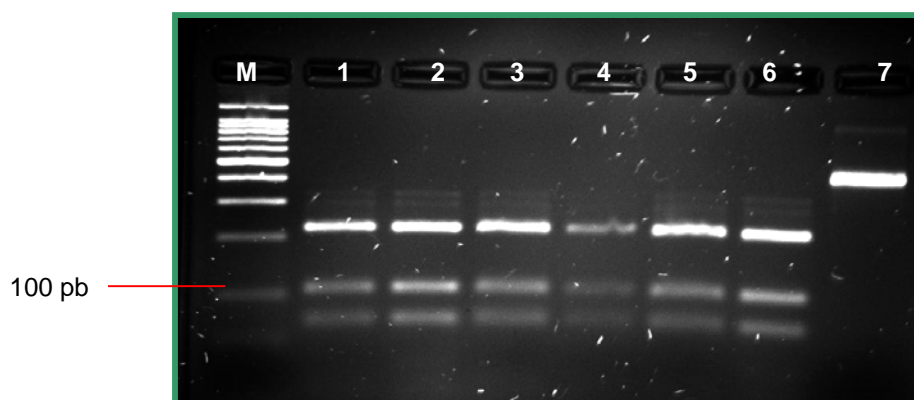
Identificação – Amostra	Intensidade de cor	Absorvância	Índice ELISA	Resultado
Cordeiro 1	+	0.276	-0,07563	Positivo
Cordeiro 9	+	1.278	-0,02153	Positivo
Cordeiro 13	+	2.756	-0,11239	Positivo
Cordeiro 25	+	0.887	-0,09139	Positivo
Cordeiro 28	+	0.541	-0,05147	Positivo
Cordeiro 41	+	0.073	-0,10872	Positivo
Ovelha 182	-	0.135	-0,19905	Negativo
Ovelha 189	-	0.098	-0,19853	Negativo
Ovelha 201	-	0.092	-0,1917	Negativo
Controle positivo	+++	2.692		Positivo

+= amarelo fraco / +++= amarelo médio / ++++= amarelo intenso / -= sem cor

### 5.2.1. Caracterização molecular de *Giardia duodenalis* por PCR-RFLP

O genótipo E de *Giardia duodenalis* foi o único encontrado na propriedade (figura 30 e tabela 33). O mesmo esteve presente tanto em amostras de cordeiros (0 a 2 meses) como de animais juvenis com idade média de cinco meses (cordeiros traçadores).

**Figura 31.** Análise de PCR baseado na amplificação do gene GDH para *Giardia duodenalis*. Gel de agarose 1.5% corado com brometo de etídio. Amostras de ovinos.



Linha M: Marcador de peso molecular de 100 pares de base

Linhas 1, 2, 3, 4, 5, 6 : Amostras positiva de *Giardia duodenalis* – genótipo E

Linha 7 : Amostras positiva de *Giardia duodenalis* – DNA não submetido à clivagem com *NlaIV*



**Tabela 34.** Genótipos de *Giardia duodenalis* isolados de ovinos na propriedade de Tupi Paulista- SP.

Animal	PCR		Genótipo
	Gene GDH	Gene 16S-rRNA	
26 CT <sup>a</sup>	+	+	E
27 CT	+	+	E
28 CT	+	+	E
59 CT	+	+	E
60 CT	+	+	E
99 CT	+	+	E
100 CT	+	+	E
34 CT	+	+	E
36 CT	+	+	E
37 CT	+	+	E
40 CT	+	+	E
53 CT	+	+	E
1 C <sup>b</sup>	+	+	E
6 C	+	+	E
13 C	+	+	E
18 C	+	+	E
19 C	+	+	E
25 C	+	+	E
27 C	+	+	E
28 C	+	+	E
29 C	+	+	E
36 C	+	+	E
39 C	+	+	E
41 C	+	+	E
2 C	+	+	E
7 C	+	+	E
9 C	+	+	E
14 C	+	+	E
17 C	+	+	E
22 C	+	+	E
23 C	+	+	E
35 C	+	+	E
179 O <sup>c</sup>	+	+	E
206 O	+	+	E

<sup>a</sup> Cordeiros traçadores;    <sup>b</sup> Cordeiros;    <sup>c</sup> Ovelhas

### 5.2.2. Caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. através da PCR-RFLP

Os fragmentos de restrição gerados pela digestão com a enzima *Sspl* de 21 amostras apresentaram duas bandas de aproximadamente 385 e 448 pares de base (pb) na eletroforese em gel de agarose. As outras seis amostras possuíam três bandas de aproximadamente 108, 254 e 449 pares de base.

A digestão com a enzima *Vspl* produziu três bandas visíveis de aproximadamente 102, 182 e 446 pb para as primeiras 21 amostras que geraram três bandas na primeira clivagem, enquanto que as seis restantes produziram duas bandas visíveis de

aproximadamente 104 e 625 pares de bases. Para as 21 amostras, o resultado das análises dos fragmentos de restrição produzidos pela enzima *Sspl* são similares para as espécies *C. andersoni*, *C. muris* e *C. felis*. As análises da enzima *Vspl* produziram três bandas visíveis (excluindo a possibilidade das espécies *C. andersoni* e *C. muris*) de 104,182 e 476 pares de bases (figura 31 ).

Este perfil de diagnóstico é compatível com *Cryptosporidium felis* (Xiao et al., 1999; Xiao et al., 2001) e com *C. genótipo cervine* (Trotz-Williams et al., 2006). As espécies/genótipos de *Cryptosporidium* spp. encontrados na propriedade estão apresentados na tabela 34.

**Tabela 35.** Espécies e genótipos de *Cryptosporidium* isolados de ovinos na propriedade de Tupi Paulista-SP

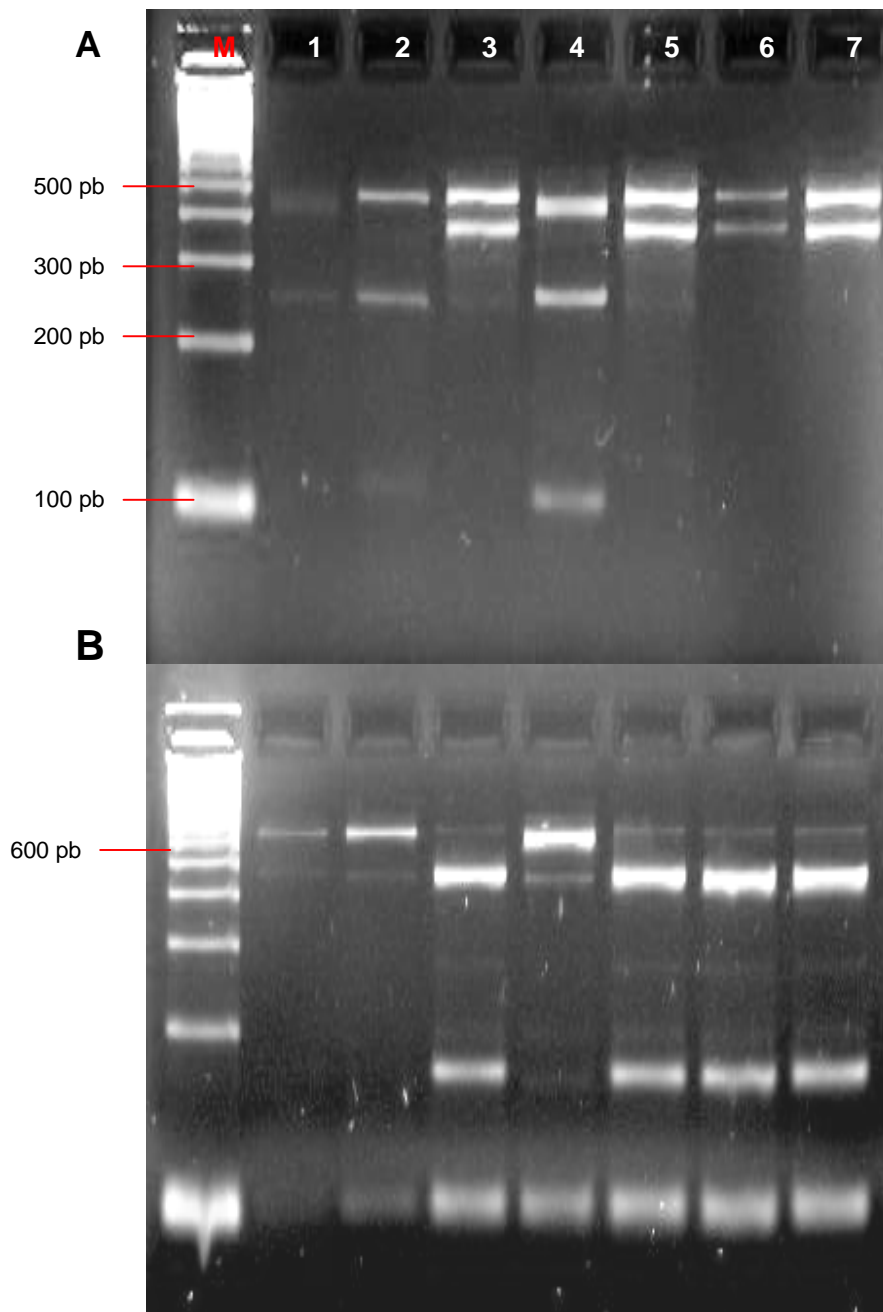
Animal	PCR -RFLP		
	<i>Sspl</i>	<i>Vspl</i>	<i>MobII</i>
38 CT <sup>a</sup>	ND*	ND*	ND*
46 CT	<i>C. bovis</i>	<i>C. bovis</i>	<i>C. bovis</i>
79 CT	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i>
53 CT	<sup>2</sup> <i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	-
37 CT	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	-
74 CT	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	-
1 C <sup>b</sup>	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	-
13 C	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	-
18 C	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	-
25 C	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	-
28 C	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	-
29 C	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	-
36 C	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	-
41 C	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	-
7 C	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	-
9 C	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	-
40 C	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	-
43 C	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	-
52 C	<i>C. bovis</i>	<i>C. bovis</i>	<i>C. bovis</i>
53 C	NR	NR	NR
17 C	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	-
22 C	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i>
545 O <sup>c</sup>	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	-
562 O	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	-
171 O	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	<i>C. felis</i> / <i>C. genótipo cervine</i>	-

<sup>a</sup> Cordeiros traçadores; <sup>b</sup> Cordeiros; <sup>c</sup> Ovelhas,

\*ND = Não obteve-se diferenciação entre *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium bovis* e *Cryptosporidium* genótipo *deer-like* devido a presença de bandas muito fracas no gel de agarose.

<sup>2</sup> Não foi possível obter a diferenciação entre essas duas espécies de *Cryptosporidium* pelas enzimas de restrição *Sspl* e *Vspl*.

**Figura 32.** Análise de PCR-RFLP com a utilização das enzimas *Sspl* (A), *VspI* (B) para amostras positivas de *Cryptosporidium* spp em ovinos. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. Algumas amostras apresentaram bandas discretas, mas a diferenciação pode ser provada pela análise em conjunto dos dois géis. Amostras de ovinos.

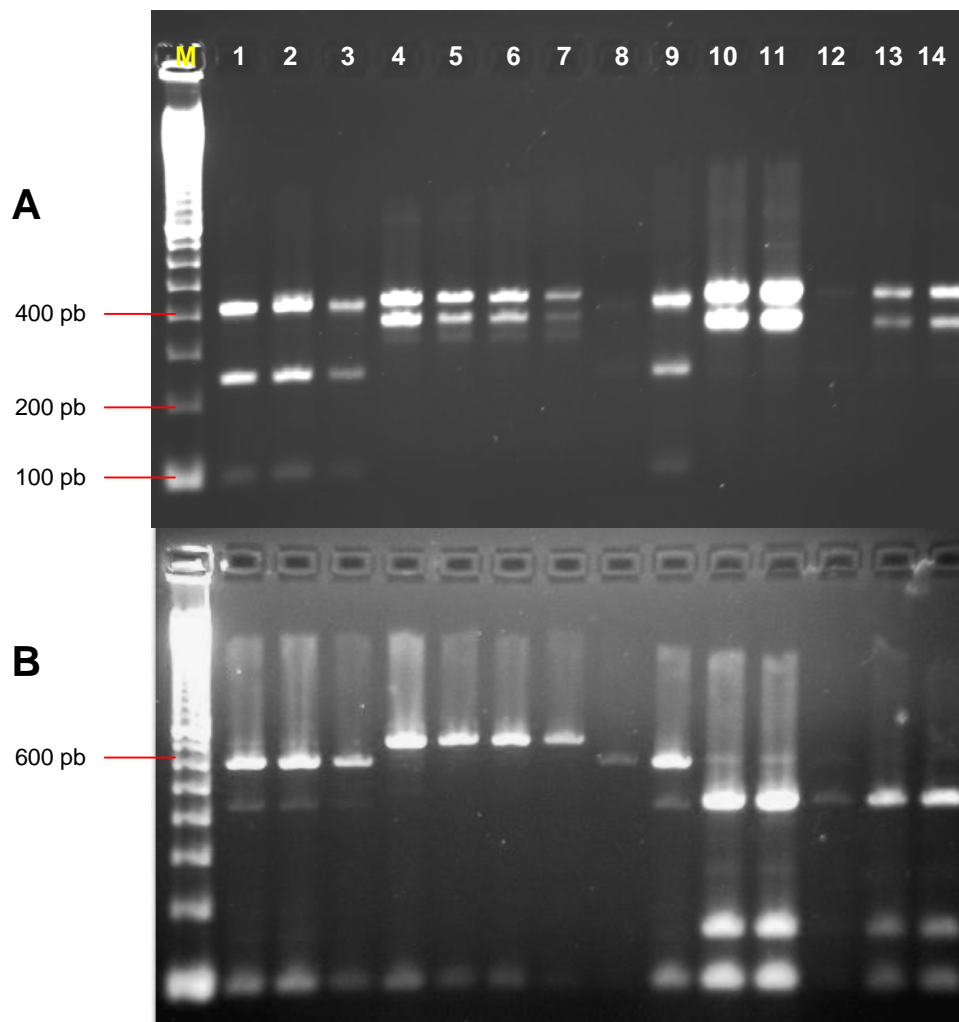


Linha M: Marcador de peso molecular de 100 pares de base

Linhas 1, 2, 4 *C. parvum*, *C. bovis*, *C. genótipo deer-like*

Linhas: 3, 5, 6, 7 : *C. felis* ou *C. genótipo cervine*

**Figura 33.** Análise de PCR-RFLP com a utilização das enzimas *Sspl* (A), *Vspl* (B) para amostras positivas de *Cryptosporidium* spp de ruminantes. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. Algumas amostras apresentaram bandas discretas, mas a diferenciação pode ser provada pela análise em conjunto dos dois géis. Amostras de bovinos e ovinos.



Linha M: Marcador de peso molecular de 100 pares de base

**A- *Sspl* (painel de cima)**

Linhas 1, 2, 3, 8, 9: *C. parvum*, *C. bovis*, *C. genótipo deer-like* (108, 254, 449 pb) de bovinos

Linhas: 4, 5, 6, 7: *C. andersoni* (385, 448 pb) de bovinos

Linhas: 10, 11, 12, 13, 14: *C. felis* ou *C. genótipo cervine* (385, 448 pb) de ovinos

**A- *Vspl* (painel de baixo)**

Linhas 1, 2, 3, 8, 9: *C. parvum*, *C. bovis*, *C. genótipo deer-like* (104, 625 pb) de bovinos

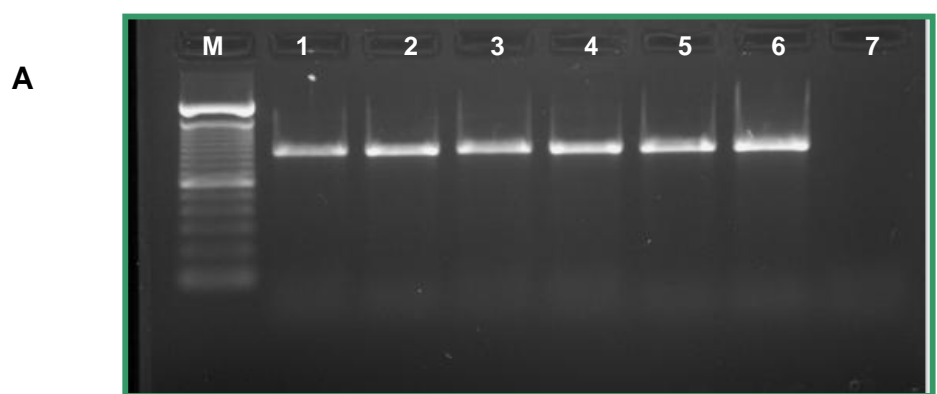
Linhas: 4, 5, 6, 7: *C. andersoni* (102, 731 pb) de bovinos

Linhas: 10, 11, 12, 13, 14: *C. felis* ou *C. genótipo cervine* (104, 182, 476 pb) de ovinos

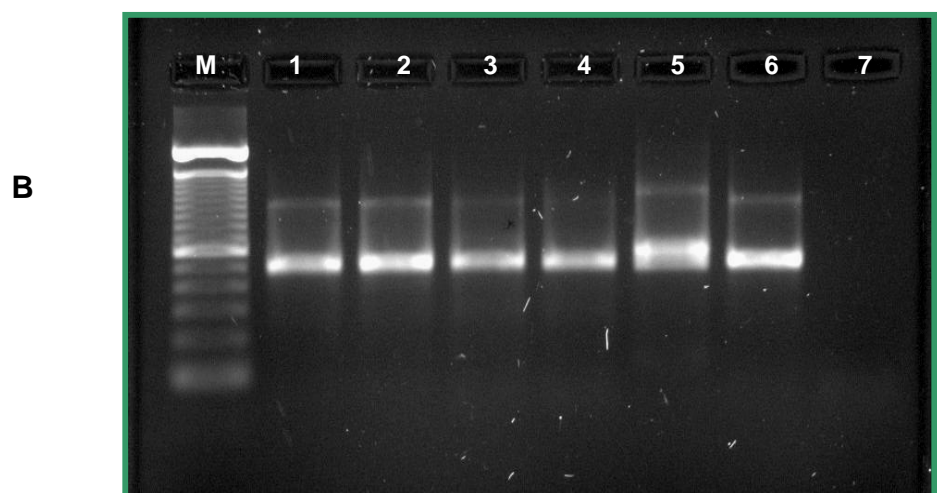
### 5.3. Validação das extrações de DNA e das análises moleculares

Em todas amostras em que a técnica PCR foi negativa para *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. foi obtido a amplificação do DNA mitocondrial bovino (para amostras de origem bovina) e ovino (para amostras de origem ovina). Nas amostras testadas, todas tiveram o DNA mitocondrial amplificado (figura 33).

**Figura 34.** Análise de Nested-PCR baseado na amplificação do DNA mitocondrial Bovino (A) e ovino (B). Gel de agarose 1.5% corado com brometo de etídio.



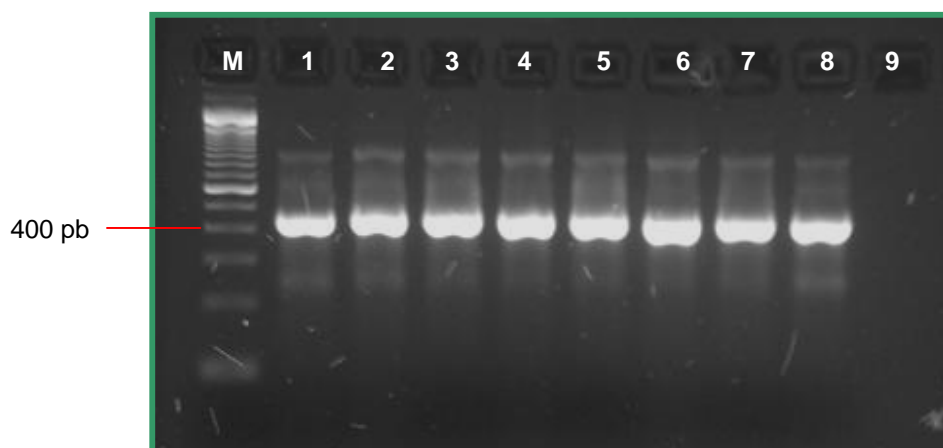
Linha M: Marcador de peso molecular de 100 pares de bases,  
Linhas 1, 2, 3, 4, 5 e 6: Amostras fecais extraídas de bovinos;  
Linha 7: Controle negativo: todos os reagentes, exceto DNA da amostra



Linha M: Marcador de peso molecular de 100 pares de bases,  
Linhas 1, 2, 3, 4, 5 e 6: Amostras fecais extraídas de ovinos  
Linha 7: Controle negativo: todos os reagentes, exceto DNA da amostra

As amostras negativas na PCR que foram submetidas ao teste “spike probe” produziram bandas de tamanho esperado (figura 34). No exemplo da figura 34, o DNA de uma amostra positiva de *Giardia duodenalis* foi acrescentado a uma fração de 8 amostras negativas na PCR para esse parasita.

**Figura 35.** Teste “Spike probe”. Análise de Semi-Nested PCR baseado na amplificação do gene GDH para *Giardia duodenalis*. Gel de agarose 1.5% corado com brometo de etídio



Linha M: Marcador de peso molecular de 100 pares de bases,

Linhas 1 até 8: Amostras que amplificaram o DNA de *Giardia duodenalis* após o teste “Sipke probe”

Linha 9: Controle negativo: todos os reagentes, exceto DNA da amostra

## 6. DISCUSSÃO

Amostras fecais contendo cistos ou oocistos devem ser investigadas para a correta identificação das espécies/genótipos de *Giardia* e *Cryptosporidium*, com o objetivo de se conhecer qual a verdadeira identidade do parasita isolado, para que dessa forma se possa compreender a especificidade parasitária desses microorganismos, podendo esse conhecimento ser útil no delineamento de medidas preventivas à transmissão dessas enfermidades para o homem e minimizar as perdas econômicas e o potencial perigo à saúde pública. Para se avaliar o último ponto se faz necessário o uso de ferramentas moleculares (PCR, PCR-RFLP, Sequenciamento genético) para se determinar quais as espécies/genótipos de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. estão presentes nos animais.

A situação epidemiológica aponta uma ampla freqüência das infecções, com valores variando entre 0–100% (O’Handley et al., 1999). Os resultados observados no presente trabalho demonstram uma freqüência de infecção de 8% para *Giardia duodenalis* e 13% *Cryptosporidium* spp., valores semelhantes e superiores a estes foram encontrados por vários autores (Olson et al 1997; O’Handley et al, 2000; Huetink et al., 2001; Alpelbe et al, 2003).

### 6.1. Análise da presença de *Giardia* e *Cryptosporidium* nas propriedades

*Giardia* e *Cryptosporidium* estiveram presentes independente do porte da propriedade, do manejo adotado, das características de ordenha e da higiene das instalações. Huetink et al. (2001), estudando as possíveis rotas de transmissão de *Giardia* e *Cryptosporidium* entre bovinos em uma propriedade, também relatou que os animais se tornam infectados independente do local e tipo de instalações onde vivem e/ou se estão em contato com outros da mesma idade ou idades diferentes. Uma possível explicação para a transmissão poderia ser a presença de tratadores atuando como carreadores mecânicos de (oo)cistos. O fator de risco para as infecções por *Cryptosporidium* foi estudado por Mohammed et al. (1999) que observaram que a infecção é dependente do tipo de manejo adotado nos animais na desmama e pós-desmama, além de estar correlacionado com a idade (quanto menor a idade, maior o fato de risco).

A proporção de animais infectados por *G. duodenalis* presentes em todas as propriedades foi similar, com a presença média de dois animais parasitados naquelas onde o microorganismo foi diagnosticado.

Para *Cryptosporidium* spp., a propriedade E apresentou nove bezerros parasitados (ocorrência de 90% entre bezerros), enquanto que na propriedade I, 70% dos bezerros estavam parasitados. A infecção desses hospedeiros pode ter ocorrido pelo contato direto entre eles ou através da água e/ou alimento contaminados. Para pelo menos uma das propriedades (E), as instalações eram precárias; e ambas possuíam áreas pequenas para comportar os bezerros que permaneciam confinados todos juntos durante o período em que se realizava a ordenha. Também pode-se sugerir que a excreção de oocistos por animais infectados com *Cryptosporidium* e/ou a taxa de transmissão entre os bezerros seja alta, uma vez que são mais susceptíveis a infecção do que animais adultos (não foram identificados animais adultos parasitados em ambas propriedades). A transmissão de *Cryptosporidium* spp. entre esses bezerros pode não ser reduzida devido a taxa contínua de números de oocistos excretados pelos mesmos (embora a quantidade de oocistos excretada possa ser baixa e de forma intermitente), criando dessa forma um alto nível de contaminação ambiental (principalmente nos locais onde todos os animais permanecem confinados), fazendo com que os bezerros possam ter um contato maior com os oocistos infectantes. É provável que nessas propriedades, onde a taxa de ocorrência é alta, os bezerros que foram diagnosticados como negativos para *Cryptosporidium* spp., se tornem infectados caso não haja nenhuma mudança no manejo ou se medidas para a prevenção das possíveis contaminações não forem tomadas (respeitando as variações de resistência aos parasitas inerente de cada animal).

A presença de um parasita nos animais na propriedade não foi determinante para a ausência do outro. Em uma mesma propriedade existiam animais que estavam infectados tanto por *Giardia* quanto por *Cryptosporidium*, incluindo aquela em que a ocorrência de uma da espécie foi alta (propriedade I com 70% de bezerros parasitados por *Cryptosporidium* spp.). Contudo apenas três animais apresentaram infecções mistas e na propriedade E, onde a infecção dos bezerros por *Cryptosporidium* spp. chegou a 90%, não foram diagnosticados animais com *Giardia*. A metade (50%) das propriedades onde ocorreram a presença de *Giardia* e *Cryptosporidium* estavam próximas a fontes de águas como rio, riacho e córregos.



## 6.2. Presença de diarreia nos animais

Um total de 60% das propriedades tinha histórico de diarreia no rebanho, sendo que a presença de *Giardia* e/ou *Cryptosporidium* foi confirmada em todas. Neste estudo, foi observado que a presença de *Giardia* e *Cryptosporidium* nas amostras fecais não está diretamente ligada a presença de diarreia nos animais, sendo encontrados ambos parasitas de forma semelhante em amostras de consistência normal e diarreicas.

Embora não tenham sido pesquisados outros agentes etiológicos da diarreia nestes animais, *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. são comprovadamente patógenos causadores de diarreia em bezerros, estando associados ou não com outros agentes (Olson et al., 1995). A maior parte dos animais também apresentava outros parasitas intestinais, como helmintos, cestódeos, coccídeos e outros protozoários intestinais, de forma que não podemos conclusivamente implicar *Giardia* e/ou *Cryptosporidium* spp. como sendo o único agente etiológico da diarreia nestes animais

## 6.3. Ocorrência das infecções por *Giardia duodenalis* nos bovinos

Devido à excreção dos cistos de *Giardia duodenalis* ser intermitente (Ali & Hill, 2003) e apenas uma única amostra ter sido coletada de cada animal no presente estudo, é possível que os dados da ocorrência das infecções apresentados aqui, subestimem o exato número de animais infectados nas propriedades, ainda que técnicas de alta sensibilidade analítica e diagnóstica tenham sido empregadas para a detecção dos enteroparasitas. Provavelmente, se durante o período de estudo, os animais fossem acompanhados mensalmente ou periodicamente, os valores de ocorrência seriam maiores. Esse dado conduz ao raciocínio de que naquelas propriedades onde existiam animais infectados, a coleta e análise posterior de novas amostras poderiam demonstrar o parasita em animais considerados livres da infecção (deve-se levar em conta os fatores ambientais, de manejo e a taxa de transmissão das infecção entre os animais). Este estudo foi capaz de detectar *Giardia* em 8% dos animais (16/200) testados com a análise de uma única amostra fecal. A presença de *Giardia duodenalis* foi detectada nas fezes de bovinos leiteiros em oito das dez fazendas visitadas, com ocorrência pela microscopia óptica e PCR variando de 5 a 10% e 5 a 20%, respectivamente. O método da PCR foi mais sensível que a microscopia, frequentemente detectando um número maior de amostras positivas em cada fazenda.

Trout et al. (2004) detectaram a presença de *Giardia duodenalis* em fezes de bezerros leiteiros (0-2 meses de idade) em 70% das propriedades por eles examinadas (14 no total), com a prevalência determinada pela técnica de IFA (imunofluorescência antibody) variando entre 0 a 83% e pela técnica da PCR e variando entre 20 a 81%. A PCR é geralmente mais sensível que a IFA, detectando com frequência um alto número de amostras positivas. No presente estudo, *G. duodenalis* foi detectada em 80% das propriedades (10 no total), com a ocorrência de 6% pela técnica de microscopia óptica (CFMSZ) e 16% pela técnica da PCR.

A infecção por *Giardia* tem sido descrita frequentemente em bezerros jovens (O'Handley et al., 1999; Hunt et al., 2000). Um estudo realizado por Huetink et al. (2001) indicou que a prevalência de *Giardia* alcançou os níveis mais elevados aos 4–5 meses de idade, mas foi muito menor em bezerros de 1-2 meses de idade. O'Handley et al. (1999) em seus estudos de prevalência de *Giardia duodenalis* em bovinos de leite, observou que a taxa de prevalência alcançou 25% em bezerros de 2 semanas de idade, aproximadamente 50% em animais de 3 semanas de idade e cerca de 60% em bezerros de 6-7 semanas de idade. Comparativamente a esses dados obtidos por O'Handley et al. (1999), no presente experimento, a ocorrência de infecções foi diagnosticada apenas em bezerros de a partir da 4ª semana de vida (16% em animais de até 30 dias de idade). A diferença entre os estudos pode ser também reflexo do número de animais presentes em cada faixa etária em cada estudo.

Discriminado com detalhes, no presente experimento, a ocorrência das infecções alcançou 20% em bezerros de 31 a 60 dias, cerca de 30% em bezerros de 31 a 90 dias; 9% em bezerros de 91 a 120 dias; 12% em bezerros de 121 a 150 dias; e 40% em bezerros de 151 a 180 dias. Entretanto, esses dados podem ser reflexos da quantidade de amostras coletadas por faixa etária dos bezerros, no momento da visita na propriedade. Vale ressaltar que a coleta foi realizada de forma aleatória e de acordo com a disponibilidade de animais do local.

A infecção de *Giardia duodenalis* entre animais adultos foi de apenas 1% (1/100). Assim como em outros estudos (O'Handley et al., 2000; Alpelbe et al., 2003; Trout et al 2004), os resultados obtidos aqui indicam que a maior prevalência de *G. duodenalis* se dá em bezerros do que em animais adultos. A infecção por *G. duodenalis* foi detectada em novilhas leiteiras (12-24 meses de idade) com prevalência nesses animais de 11 a 75%. (Trout et al., 2006).

Os estudos de prevalência anteriores também descreveram grande variação na taxa de infecção em animais dessa faixa etária. (O'Handley et al., 1999, O'Handley et al., 2000, Trout et al., 2004). Possivelmente as diferenças da prevalência entre os estudos, sejam devidas as variações na metodologia de pesquisa para o diagnóstico das infecções e/ou a fatores ambientais.

No Brasil, a prevalência de 67% (21/31) de animais infectados por *Giardia* foi descrita no Estado do Rio de Janeiro em amostras de bezerros com menos de três meses de idade (Huber et al., 2003). Em Minas Gerais, 9% de amostras fecais de bezerros de 1 a 90 dias possuíam cistos de *Giardia* (Guimarães et al., 2001).

#### **6.4. Genótipos de *Giardia duodenalis* encontrados nos bovinos**

Três genótipos de *Giardia duodenalis* foram identificados nos animais: genótipo E, o qual tem sido descrito infectante apenas para ruminantes; genótipo A que é infectante para humanos e outros mamíferos por isso considerado zoonótico; e o genótipo B. A clivagem com a enzima *NlaIV* provocou digestão parcial de 1 amostra de bezerro (bezerro nº 87). Esse padrão de restrição foi produzido pela presença do genótipo B, que não pode ser totalmente diferenciado através da ação dessa enzima (Read et al., 2004). Todos os outros genótipos (A1, AII, C, D, E) são claramente diferenciados. O genótipo B compreende dois principais subgrupos chamados BIII e BIV, sendo o primeiro encontrado em animais e o último específico de humanos (Monis et al., 2003; Read et al., 2002). O protocolo de Read et al. (2004) é capaz de amplificar ambos, porém não é capaz de diferenciá-los. Apesar da enzima *NlaIV* não promover a diferenciação dentro do genótipo B, acredita-se que a amostra em questão estava parasitada com *G. duodenalis* genótipo BIII (zoonótico) uma vez que BIV é específico de humanos (Read et al., 2002; Monis et al., 2003).

Entre todas as propriedades, 87,5% (14/16) dos animais positivos estavam infectados com genótipo E, enquanto 6,25% (1/16) estavam infectados com genótipo A1, e 6,25% (1/16) infectados com genótipo B. Os genótipos A e B de *Giardia duodenalis* são considerados zoonóticos e já foram descritos em bovinos (Trout et al., 2005; Itagaki et al., 2005) e outros ruminantes (Trout et al., 2003), entretanto o genótipo E que possui especificidade por ruminantes (bovinos, ovinos e caprinos) é o mais prevalente em bovinos na Austrália, Estados Unidos e Canadá (O'Handley et al., 2000). Considerando-se a exploração comercial dos bovinos, estudos mostraram que o genótipo E (não-

zoonótico) foi o mais predominante, todavia as taxas de prevalência para o genótipo zoonótico A pode chegar a 20% (O'Handley et al., 2000). Apesar da prevalência do genótipo A ser variada nos animais (baixa, na maior parte dos estudos), o mesmo esteve presente em 71% (10/14) das propriedades estudadas por Trout et al. (2006). Em nosso estudo, o genótipo A foi detectado em 1% das propriedades (1/10) e em aproximadamente 6% dos animais positivos (1/16). Fato curioso é que esse animal era um bovino adulto e único animal parasitado por *Giardia duodenalis* na propriedade (propriedade A). O outro animal parasitado nesta mesma propriedade era um bezerro de 46 dias que apresentava *Cryptosporidium bovis* (uma espécie considerada não-zoonótica). Observando os estudos publicados e a prevalência dos genótipos A entre diferentes grupos de idade, o genótipo A foi detectado em 15% dos bezerros no pré-desmame (1-7 semanas), 13% em bezerros no pós desmame (3-11 meses) e 9% em novilhas de 1-2 anos, enquanto que o genótipo E foi detectado em 85, 87 e 91% dos mesmo animais respectivamente (Trout et al., 2004; Trout et al., 2005; Trout et al., 2006). A ocorrência do genótipo E em nosso estudo foi maior na faixa etária de 31-90 dias.

São necessários mais estudos comparativos para confirmar se a estrutura genética das populações de *Giardia duodenalis* encontradas nesse estudo são geneticamente equivalente àquelas caracterizadas em outra áreas do globo (Thompson et al., 2000). O presente estudo contribui para a confirmação de que no Estado de São Paulo, as amostras de *G. duodenalis* isoladas de bovinos pertencem, em sua maior parte, ao genótipo animal-específico E, o mais comumente encontrado em ruminantes em outras partes do mundo.

Também foi importante a constatação que bovinos leiteiros podem albergar populações de *Giardia* que fazem parte de genótipos considerados zoonóticos A e B. O grau de importância epidemiológica dessas observações deverá ser melhor analisado. Estudos epidemiológicos em bovinos de outras regiões do país são necessários para a confirmação de que essa taxa de prevalência se encontra semelhante em animais infectados em todo o território nacional.

#### **6.5. Ocorrência das infecções por *Cryptosporidium* spp. nos bovinos**

A ocorrência de *Cryptosporidium* spp. nos 200 animais testados foi de 16% (28/200), utilizando a técnica de PCR para o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. em uma única amostra fecal coletada por animal. Esses dados são similares aos de Fayer et al.

(2006), que também utilizando apenas a detecção molecular por PCR em uma única amostra fecal encontrou 11,9% (68/571) dos animais infectados por *Cryptosporidium* spp., em 13 das 14 fazendas visitadas em sete Estados dos EUA. Embora o número de fazendas visitadas e o número de animais coletados tenham sido maiores nos estudos de Fayer e colaboradores, os níveis de ocorrência para *Cryptosporidium* spp. nos EUA e Brasil para as fazendas estudadas foi semelhante, ambos utilizaram o mesmo protocolo de PCR descrito por Xiao et al. (1999a).

Em outras regiões geográficas, as taxas de infecções por *Cryptosporidium* spp. também variaram de acordo com a endemicidade local, com a técnica de diagnóstico empregada e o tipo de estudo realizado. Em Portugal, 74 de 291 bezerros (25,4%); e 8 de 176 adultos (4,5%) estavam infectados por *Cryptosporidium* spp. (Mendonça et al., 2007). Nos Estados Unidos a taxa de animais positivos foi de 30% (Santin et al., 2004), enquanto que na Hungria, Plutzer & Karanis (2007) observaram cerca de 50% dos animais parasitados.

## 6.6. Considerações sobre a metodologia utilizada

O protocolo utilizado neste estudo para caracterização genética de *Cryptosporidium* spp. foi descrito pela primeira vez por Xiao e colaboradores em 1999. O mesmo é baseado na detecção do gene SSU-rRNA do microorganismo, sendo capaz de promover a amplificação do DNA e a diferenciação genotípica, tanto através do uso de enzimas de restrição (*VspI*, *SspI* e *DdeI*), quanto através do sequenciamento genético. Através dele, foram descritos mais de 10 genótipos de *Cryptosporidium* e confirmadas as características genéticas de várias espécies. (Xiao et al., 1999b; Xiao et al., 2001). Sulaiman et al. (1999), compararam todos os protocolos de PCR existentes para detecção e diferenciação de *Cryptosporidium* spp. e notaram que o protocolo de Xiao et al. (1999a), era um dos mais sensíveis e específicos, sendo uma excelente ferramenta para análises de seqüências polimórficas capazes de diferenciar espécies e/ou genótipos entre si.

Mendonça et al. (1997) observaram que o protocolo de Xiao et al. (1999), que analisa o gene SSU r-RNA, produz melhores resultados na caracterização de *Cryptosporidium* spp. do que o gene HSP70. Xiao et al. (2000) também constataram que alguns protocolos usados para amplificação de *Cryptosporidium* no gene COWP, falharam em amplificar algumas espécies e genótipos. Trotz-Williams e colaboradores (2005) detectaram que o método de amplificação pelo gene COWP, falhou em obter amostras

positivas de *C. cervine* genótipo. Somente com o protocolo descrito por Xiao et al. (1999) que Trotz-Williams e sua equipe conseguiram identificar uma amostra de *C.* genótipo cervine em humanos, enquanto que a mesma amostra foi negativa no gene COWP.

Lindergard et al. (2003) também observaram que primers para amplificação do gene SSU r-RNA obtem mais sucesso em produzir amostras positivas de *Cryptosporidium* spp. do que primers para o gene TRAP-C2, o que torna o primeiro protocolo de PCR o método de escolha para detecção de oocistos de *Cryptosporidium parvum* em amostras de campo.

O método descrito por Xiao et al. (2001), que é um aperfeiçoamento daquele descrito em 1999, capaz de caracterizar geneticamente as espécies/genótipos de *Cryptosporidium* no gene SSU-rRNA seja por PCR-RFLP ou sequenciamento, sendo utilizado de forma quase que absoluta na maior parte dos estudos (Peng et al., 2003; Gatei et al., 2003; Santin et al., 2004 Fayer et al., 2005; Santin et al., 2007; Trotz-Williams et al., 2006). Uma das vantagens desse protocolo, é a capacidade de diferenciar por RFLP, sem a necessidade do sequenciamento, as principais espécies e genótipos encontrados em ruminantes. Dessa forma, quando esse estudo foi elaborado no final de 2004, o protocolo de Xiao et al. (1999a; 1999b; 2001) foi escolhido para as análises.

Entretanto, durante o período de realização desse estudo, novos genótipos surgiram e outros antigos genótipos foram reconsiderados e classificados como espécie (Fayer et al, 2005). Analisando o trabalho de Feng et al.(2007), ao qual o próprio Xiao é co-autor, observa-se que o protocolo de Xiao et al. (2001), que usa enzimas de restrição, não distingue *C. parvum* (genótipo bovino), *C. bovis* e *C.* genótipo *deer-like*, três das quatro espécies reconhecidas atualmente capazes de parasitar ruminantes. Para os três parasitas, existe uma similaridade no padrão de RFLP da enzima SSPI e VSPI, com três bandas visíveis de 449, 267 e 108 pb (figura 35), embora alguns isolados apresentem produtos da RFLP por *SspI* que são ligeiramente menores daquelas de *C. parvum* (432 pb *versus* 449 pb e 103 *versus* 108). Todavia, um diagnóstico baseado nessas diferenças observadas em géis de agarose sem a confirmação através do sequenciamento, é no mínimo presunso. Essa realidade é apenas para o uso de enzimas de restrição, devido a descrição de novos genótipos, mas o sequenciamento do gene SSU rRNA, com os primers desenvolvidos por Xiao et al. (1999), continua sendo o mais apropriado para a caracterização genética de todas as espécies/genótipos de *Cryptosporidium* encontradas em humanos, animais e no ambiente (Sulaiman et al., 1999; Xiao et al., 2001). Um outro dado interessante sobre o protocolo de Xiao et al. (2001) diz respeito a sua grande

utilização no meio científico para a distinção entre as espécies/genótipos. A maior parte dos trabalhos utilizam o locus SSU rRNA e depositam essas seqüências no genBank. Quando se utiliza outro locus, não há como comparar os resultados obtidos com os que existem em maioria disponíveis para análise. Nesse estudo, optou-se pelo uso de enzimas de restrição devido a sua vantagem em promover a tipificação genética sem a necessidade do sequenciamento, tornando o processo prático, rápido e simples de ser realizado, embora fosse esperado que algumas das possíveis amostras positivas de *Cryptosporidium* fossem diferenciadas apenas por sequenciamento.

Nesse estudo, após a análise dos resultados e a constatação dos recentes dados descritos acima, o sequenciamento foi realizado; contudo apenas seqüências parciais foram obtidas (obteve-se, em média, 300 pb para cada uma das fitas), as quais não foram capazes de diferenciar as espécies/genótipos entre si.

Feng e colaboradores, em março de 2007, publicaram um artigo científico que descreve o uso da enzima *MbolI* como sendo capaz de fazer essa diferenciação através de PCR-RFLP utilizando curiosamente o protocolo padronizado por Xiao et al. (2001), o mesmo usado nesse estudo.

De forma semelhante, *Cryptosporidium felis* e *Cryptosporidium* genótipo *cervine* não podem ser diferenciados entre si por PCR-RFLP usando o método descrito por Xiao et al. (2001), segundo o estudo de Trotz-Williams et al. (2006), que usaram o mesmo protocolo para identificar por PCR-RFLP com as enzimas *Sspl* e *Vspl*, isolados de *Cryptosporidium* em animais e humanos.

#### **6.7. Espécies e genótipos de *Cryptosporidium* encontrados nos bovinos**

Os resultados da PCR-RFLP com as enzimas *Sspl* e *Vspl* foram compatíveis com a espécie *Cryptosporidium andersoni* (genótipo bovino) para 23 amostras (Xiao et al., 1999a; Xiao et al., 1999b; Xiao et al., 20001), com *Cryptosporidium bovis* para três amostras e com *Cryptosporidium parvum* (genótipo bovino) para uma amostra.

Recentes estudos (Feng et al., 2007) demonstraram que produtos amplificados no locus SSU r-RNA pela metodologia adotada de Xiao et al. (2001), quando clivados com as enzimas *Sspl* e *Vspl*, produzem um padrão de restrição que não é capaz de diferenciar entre si *Cryptosporidium parvum* (genótipo bovino), *Cryptosporidium bovis* e *Cryptosporidium* genótipo *deer-like*, pois essas três espécies/genótipos apresentam sítios de restrição absolutamente idênticos. O mesmo tamanho de bandas visualizadas no gel

de agarose pode ser observado quando encontrado qualquer um desses *Cryptosporidium* spp. Esse recente dado tem grande significado, uma vez que as análises de prevalência de *Cryptosporidium* que utilizaram esse o protocolo de Xiao et al. (2001) para a caracterização genética por RFLP, podem ter subestimado a presença de algumas dessas espécies/genótipos. Em uma amostra do presente estudo, que apresentava padrão de restrição compatível com *C. parvum*, *C. bovis* e *C.* genótipo deer-like, não foi possível obter a diferenciação. Dessa forma, não pode ser descartada a possibilidade de *C.* genótipo deer-like nos animais do presente estudo.

A presença da espécie *Cryptosporidium bovis* (antigamente chamado de *C. bovis* genótipo B) e de *Cryptosporidium* genótipo deer-like foi descrita em bovinos primeiramente nos Estados Unidos (Santin et al., 2004; Fayer et al., 2005). Essas espécies/genótipos estão presentes em taxas variadas no rebanho bovino, embora na maior parte das vezes, em pequenas proporções.

Recentes estudos tem relatado a presença em outras localizações geográficas, como por exemplo na Hungria (Plutzer & Karanis, 2007), Irlanda (Thompson et al., 2007), Dinamarca (Langkjaer et al., 2007) e em amostras ambientais no Canadá (Ruecker et al., 2007). A prevalência e caracterização genética de *Cryptosporidium* spp. recuperados de fezes de bovinos em outras áreas do mundo, estão sendo determinadas para confirmar se essa situação ocorre em outras nações (Robinson et al., 2006).

A susceptibilidade da infecção por *Cryptosporidium* spp. em bovinos está relacionada a idade do hospedeiro. Nos estudos Santin et al. (2004), *C. parvum* constituiu 100% das amostras identificadas de bezerros com 1 e 2 semanas de idade e 60–90% das amostras de bezerros com idade superior a 2 meses. Plutzer & Karanis descreveram em seus estudos que das 22 amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. submetidas ao sequenciamento genético, 21 eram *C. parvum* (95,4%) e *Cryptosporidium* genótipo deer-like apenas a outra amostra restante. Thompson et al. (2007) detectaram na Irlanda, cerca de 95% de bezerros abaixo de 30 dias de idade parasitados com *C. parvum*. Santin et al. (2004), detectaram *C. parvum* como responsável por cerca de 85% das infecções em bezerros antes do desmame (0-2meses), mas apenas por 1% das infecções em bezerros e novilhas após o demame, com 3-11 meses de idade. Esses últimos animais e novilhas (1–2 anos de idade) são infectados com maior frequência por *C. bovis*, *C. andersoni* e *Cryptosporidium* deer-like genótipo (Fayer et al., 2006 and Santin et al., 2004). Trotz-Williams et al. (2006), selecionaram 44 amostras positivas de *Cryptosporidium* spp. obtidas de bezerros (7-21 de idade) com e sem diarreia, e constaram que 100% dos



animais estavam parasitados com *C. parvum* (análise do gene COWP e Ssu r-RNA) . No presente estudo, dos cinco animais positivos para *Cryptosporidium* spp. na faixa etária de 0-2 meses de idade, nenhum estava parasitado por *C. parvum*.

A maior taxa de ocorrência de *C. bovis* é em bezerros após-desmama (3-11 meses). Santin et al. (2004) diagnosticaram *C. bovis* em 9% e 55% das amostras positivas originadas de bezerros em idade de pré-desmame e pós-desmame, respectivamente. No presente estudo, *C. bovis* foi identificado em 20% (1/5) dos animais parasitados na faixa etária de 0-2 meses de idade; e em 5% (1/20) dos bezerros parasitados na faixa etária de 2 – 6 meses.

A presença e disseminação de *C. bovis* e *Cryptosporidium* genótipo deer-like em bovinos leiteiros de 12-24 meses de idade não tinha sido descrita anteriormente (Fayer et al., 2006). No presente estudo, animais nessa faixa etária estavam apenas parasitados por *Cryptosporidium andersoni*.

Estudos similares da determinação das espécies e genótipos de *Cryptosporidium* descreveram que bezerros pré-desmame eram a fonte primária da espécie zoonótica *Cryptosporidium parvum*, enquanto que bezerros pós-desmame e novilhas (1–2 anos de idade) foram primariamente infectados com espécies e genótipos que não são infectantes para humanos (Santín et al., 2004 ; Fayer et al., 2006).

A cryptosporidiose bovina, caracterizada por diarreia aquosa profusa é frequentemente causada por *C. parvum*, enquanto que as infecções com *C. bovis* e *C. andersoni* geralmente não provocam doença (Robinson et al., 2006; Fayer et al., 2005). Entretanto, as infecções crônicas provocadas por *C. andersoni* podem causar gastrite aguda, redução na produção de leite e redução no ganho de peso e dessa forma possuem um elevado impacto clínico e econômico.

É possível que *Cryptosporidium* genótipo deer-like encontrado em bovinos nos Estados Unidos possa também ocorrer no Brasil, entretanto, como não foi possível a distinção entre *C. parvum*, *C. bovis* e *C. genótipo deer-like* por PCR-RFLP em uma única amostra; e desde que não foi possível através do sequenciamento obter sequências nucleotídicas capazes de proporcionar a diferenciação dos mesmos, isto não pode ser verificado por completo.

É importante observar que tanto *C. bovis*, quanto *C. genótipo deer-like*, parecem estar presentes em taxas variadas no rebanho bovino dos EUA (Santin et al., 2004; Fayer et al., 2006). No Brasil, o presente estudo foi o primeiro a relatar a infecção por *Cryptosporidium bovis* em ruminantes. A ausência de informações sobre *Cryptosporidium*

*bovis* e *Cryptosporidium* deer-like em países da América do Sul pode ser explicada porque: (i) a maior parte da caracterização molecular dos isolados de *Cryptosporidium* envolveram bezerros neonatos e não animais de todas faixas etárias; (ii) o tamanho dos oocistos de *Cryptosporidium bovis* e *C.* genótipo *deer-like* são similares em tamanho àqueles descritos para *C. parvum* não permitindo a diferenciação por microscopia óptica.

A maior parte dos estudos publicados sobre a prevalência de *Cryptosporidium* spp. em bovinos no Brasil e no mundo foram baseados na identificação de oocistos através da microscopia óptica e não utilizaram métodos moleculares que permitiriam a identificação das espécies e genótipos (Quilez et al., 1996; Guimarães et al., 2001; McAllister et al., 2005).

### **6.7.1. *Cryptosporidium andersoni***

No presente estudo, a ocorrência de *C. andersoni* nos animais foi de 11,5% (23/200), dado esse que está de acordo com os obtidos por Robinson et al. (2006), que identificaram 16,8% (17/101) de bovinos leiteiros adultos positivos em uma única fazenda no Reino Unido, entretanto abaixo dos 40% encontrado por Kvac & Vitovec (2003) em bovinos adultos de exploração de carne. A ocorrência dessa espécie de acordo com a quantidade de animais positivos alcançou 82% (23/28).

*C. andersoni* possui maior prevalência em novilhas (1-2 anos) e bovinos adultos, (Kvac and Vitovec, 2003; Santin et al., 2004; Robinson et al., 2006; Fayer et al., 2006). Nos estudos de Fayer e colaboradores (2005), *C. andersoni* foi diagnosticado em 46% dos animais com idade superior a 1 ano. Nesse estudo, 4%(4/100) e 17% (17/100) dos bezerros de 0-2 meses e 3-6 meses estavam parasitados por *C. andersoni*, respectivamente. Enquanto que a porcentagem relativa ao números de animais parasitados por *Cryptosporidium* spp. na faixa etária de 0-2 meses e de 3-6 meses foi de 16% (4, do total de 21 animais nessa faixa etária) e 21,5% (17, do total de 79 animais nessa faixa etária), respectivamente. Dos quatro bezerros positivos que apresentavam diarreia, 2 estavam parasitados por *Cryptosporidium andersoni*. A identificação de *C. andersoni* como uma espécie altamente prevalente infectando bovinos de todas as idades, claramente resulta na necessidade de outros estudos detalhados da ocorrência dessa espécie em bovinos de diferentes regiões do país para se verificar se no Brasil, como ocorre na maior parte do mundo (Ralston et al., 2003; Santin et al., 2004), o quanto a infecção por *C. parvum* é restrita a bezerros mais jovens.

## 6.8. ZOONOSE

Embora o genótipo E de *Giardia duodenalis* seja observado com maior frequência em rebanhos bovinos ao redor do mundo, a ocorrência do genótipo A (o mais comum em humanos) e B é de grande importância na saúde pública. Através de análises moleculares dos genes presentes no microrganismo, constatou-se que cerca de 20% das amostras positivas de bezerros para *Giardia duodenalis* no Canadá e Austrália apresentaram seqüências nucleotídicas idênticas ao do genótipo A (O'Handley et al., 2000; Appelbee et al., 2003). Esses resultados sugerem que bezerros, embora primariamente infectados com o genótipo animal-específico, possam também ser infectados com um genótipo potencialmente infeccioso para humanos, especialmente considerando-se que algumas das mais altas taxas de prevalência do genótipo A são em áreas de grande população humana, levando a possibilidade desses organismos serem transmitidos entre humanos e animais, mantendo dessa forma o nível alto desse genótipo ((Van Keulen et al., 2002; Appelbee et al., 2003; Trout et al., 2006.)

No presente estudo, apenas dois animais (menos de 13%) apresentavam genótipos com capacidade zoonótica (um animal do A e um outro do B) e mais de 80% dos bovinos estavam parasitados com o genótipo hospedeiro-específico E. Com base nesses dados, bovinos (particularmente bezerros, pois os genótipos zoonóticos foram isolados desses animais) podem atuar como fontes da infecção para humanos, como descrito em outros estudo ao redor do mundo (Thompson et al., 2000; Trout et al., 2004).

Em países de pecuária leiteira ou de corte em sistema de criação intensivo (confinamento), a giardíase e a criptosporidiose é de grande importância em termos epidemiológicos, devido as altas concentrações de animais em uma pequena área de terra; e a grande quantidade de fezes que esses sistemas produzem. Existe um potencial para a contaminação de águas superficiais e subterrâneas através do manejo e escoamento das pastagens e da utilização das fezes dos animais como adubo orgânico. Nesse estudo, os animais parasitados pelos genótipos A e B, habitavam em propriedades próximos a fontes de água e que também possuíam outros animais nas suas imediações (cães, gatos, aves).

*Cryptosporidium parvum* é um importante e prevalente agente de diarreia em humanos, se constituindo uma zoonose grave e emergente em decorrência das altas taxas de infecção em pacientes imunossuprimidos (Gatei et al., 2003; Guyot et al., 2001). O contato com bezerros infectados foi implicado como a causa de muitos surtos de

criptosporidiose em estudantes de medicina veterinária, profissionais que lidam com bovinos e crianças que visitaram fazendas recreacionais e acampamentos ou feiras agropecuárias (Smith et al., 2004). Essa afirmativa foi suportada na Inglaterra por dados que demonstraram que a restrição a visitas a fazendas durante um surto de febre aftosa e o sacrifício massivo de animais reduziu casos esporádicos de da infecção por *C. parvum* em grandes comunidades (Hunter et al., 2003 e Smerdon et al., 2003 citado por Feng et al., 2007)

No presente estudo, em 90% das propriedades existiam animais positivos para *Cryptosporidium* spp., porém em apenas uma delas existia a presença de *Cryptosporidium parvum*, a única espécie zoonótica que comumente é encontrada em bovinos. A ocorrência da espécie *C. parvum* nos animais positivos foi de 4%, com relação a 96% das outras espécies/genótipos (85% por *C. andersoni* e 11% por *C. bovis*). Observando os 200 animais testados nas 10 propriedades visitadas, apenas um único bezerros estava infectado por *C. parvum*, o que representa 0,5% (1/200) de ocorrência. De acordo com esses dados, cogita-se que bovinos não seriam reservatórios de *Cryptosporidium* spp. na região de Botucatu e Itatinga, Estado de São Paulo. Obviamente, estudos de prevalência longitudinais devem ser realizados para se constatar essa observação.

A presença de *Cryptosporidium parvum* foi observada apenas em bezerros. Esses achados correlacionam-se com os de Fayer et al. (2006) que constatou que nos Estados Unidos apenas bezerros em idade de pré-desmame (0-2 meses) são importantes fontes de criptosporidiose para humanos.

De acordo com Monis e Thompson (2003), o risco da infecção zoonótica não pode ser determinado sem dados da prevalência para a espécie/genótipo de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. Não há nenhuma dúvida que determinados genótipos de ambas as espécies tem potencial para a transmissão zoonótica, mas a ocorrência dessas espécies/genótipos ainda é pouco conhecida no Brasil. Existe uma necessidade urgente para novos estudos de epidemiologia molecular nos focos endêmicos localizados onde a frequência da transmissão zoonótica pode ser determinada (Xiao et al., 2004).

Entretanto, Thompson (2004) retrata que do ponto de vista da transmissão zoonótica direta, o achado de genótipos semelhantes que estão dispersos em diferentes hospedeiros, não é por si só evidência conclusiva que a transmissão zoonótica está ocorrendo. Um melhor entendimento para esse fato pode apenas ser originado em

estudos no qual se examine a dinâmica da transmissão entre hospedeiros vivendo em uma mesma área geográfica ou localizados em uma área endêmica.

No Brasil, onde a maior parte dos bovinos são criados a campo, o potencial para que animais infectados com espécies/genótipos zoonóticos pode ser grande se os mesmos forem capazes de transmitir de alguma forma os (oo)cistos infectantes para o homem; seja de forma direta ou indireta (pela contaminação da água ou alimento com fezes infectadas). Embora pareça difícil que humanos possam se infectar com (oo)cistos através de água recreacionais (rios, riachos, lagos e córregos) ou de abastecimento e suprimento humano contaminada com fezes de bovinos, em países de primeiro mundo, cada vez mais são detectados surtos de giardíase e criptosporidiose onde a fonte da infecção é atribuída a animais domésticos e silvestres (Olson et al., 2004; Hunter & Thompson, 2005).

Em um estudo realizado por Hopkins et al. (1997), demonstrou-se que o genótipo não zoonótico (animal-específico) predomina entre os cães. Nessa comunidade o contato de cães com humanos é restrito e a transmissão de *Giardia* ocorre de cão para cão, favorecendo a predominância dos genótipos C e D que são específicos desses animais. Analisando o pensamento de Thompson (2004) que presumiu que em ambientes onde a frequência de transmissão de diferentes genótipos é alta, interações competitivas são mais fáceis de permitir que o genótipo hospedeiro-adaptado predomine em sua respectiva espécie hospedeira, como ocorre com o genótipo E em bovinos. Considerando esses dados para o presente estudo, teoricamente, naquelas propriedades onde os bovinos estavam parasitados por genótipos zoonóticos (A e B) e existia a presença do outro genótipo hospedeiros-específico (E) em outros animais, com o passar do tempo (se os animais não forem mais expostos a re-infecção com esses mesmo genótipos), o genótipo E teria predominância, uma vez que competiria com o A e B por seu hospedeiro preferencial, no caso os bovinos.

Não se sabe se a fonte da infecção dos bovinos nesse estudo por parasitas com genótipos zoonóticos foi humana, animal ou ambiental. Para os últimos dois casos, nas propriedades onde os genótipos zoonóticos foram isolados, havia a presença de outros animais domésticos (cães, gatos, aves) e a mesma ficava próxima a fontes de água (rio, córrego).

Em circunstâncias onde a infecção por *Giardia* são comuns em humanos e animais (como na comunidade aborígina da Austrália, local que representa um foco altamente endêmico da transmissão de giardíase com altas taxas de ocorrência em crianças e cães,

frequentemente maiores que 50%), os bovinos poderão ser igualmente predisposto a exposição regular com ambos genótipos zoonótico e não-zoonótico. Sob essas condições, evidências experimentais em cães sugerem que o genótipo hospedeiro-adaptado irá, através de competição, excluir outros genótipos prevenindo a colonização deles no intestino do hospedeiro (Thompson, 2004).

### **6.9. Caracterização dos cistos/ocistos observados**

Os cistos de *Giardia* sp. observados ao microscópio óptico após a técnica de CFMSZ eram ovais, medindo aproximadamente de 11 a 14 µm característicos de *Giardia duodenalis*

Para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* sp., as amostras foram coradas com o método de CFCM lâminas de esfregaços fecais. Esse método de coloração foi preparado com corantes álcool-ácido rápidos que são baseadas nas propriedades ácido resistentes dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. Através deste protocolo, oocistos de *Cryptosporidium* sp., presentes na amostra, podem ser visualizados como pequenos corpos redondos intensamente corados de vermelhos em contraste com um fundo de cor azul. Os oocistos de *Cryptosporidium* sp. encontrados tinham formato redondo, medindo aproximadamente de 4 a 6µm dependendo da espécie. Parte dos oocistos de *Cryptosporidium* sp. observados durante a análise do esfregaço fecal corado com fucsina carbólica, foram mensurados e apresentaram em média 5,35 × 5,05 µm. Os oocistos de *C. bovis* são morfologicamente indistinguíveis dos oocistos de *C. parvum*. A maior parte dos oocistos observados das amostras positivas, em lâminas de esfregaço fecais coradas, mediam em média 7,75 × 5,5 µm, sendo morfologicamente idênticos aqueles descritos por Lindsay et al. (2000) para *Cryptosporidium andersoni*.

Durante a análise de lâminas derivadas da técnica de centrifugo-flutuação modificada em sulfato de zinco (lâminas não coradas) também foi possível observar a presença de oocistos de *Cryptosporidium* sp. (microscopia óptica em contraste de fase) com formato elipsoide e uma fina, incolor e única camada que recobre os esporozoítos.

### **6.10. N° de cistos e oocistos na amostra**

Um diagnóstico positivo de ambos parasitas pode ser determinado pelo achado de um único cisto de *Giardia duodenalis* na amostra observado na lâmina originada da

técnica de CFMSZ ou um único oocisto de *Cryptosporidium* sp. observado no esfregaço fecal corado com fucsina carbólica. No experimento, as amostras positivas para ambos parasitas na microscopia, sempre possuíam um número grande de cistos/oocistos excretados (classificados como 2+, 3+), sendo poucos os casos em que as amostras possuíam raros parasitas.

### **6.11. Considerações sobre a extração do DNA**

Amostras fecais tipicamente contem muitos componentes que podem degradar o DNA e prejudicar as reações de PCR, através da inibição da atividade da enzima DNA polimerase. Os atuais métodos de extração de DNA de material biológico fecal, devem assegurar a remoção dessas substâncias, de tal forma que as amostras sejam livres delas e de outras impurezas (proteínas, nucleases, etanol, etc), particularmente quando aplicados às amostras clínicas e ambientais (Harmon et al., 2006). Alguns constituintes presentes nas fezes de bovinos, como bilirrubina, sais biliares, ácidos húmicos, polissacarídeos complexos e compostos polifenólicos inibem a reação de PCR mesmo quando presentes em baixas concentrações (Morgan et al, 1998; Inglis & kalischuk, 2003). Estando os polissacarídeos e compostos polifenólicos presentes nas plantas e sendo as últimas a principal composição da matéria fecal de ruminantes, não é surpresa que em anos anteriores o sucesso da extração do DNA de fezes bovinas tenha sido descrito como insatisfatórios (Monteiro et al., 1997). Muitos métodos utilizando fenol clorofórmio, polivinil-polipirrolidone, SDS, guanidina ou associações, foram adaptados para a extração de DNA das fezes (Morgan et al, 1998; Patel et al.; 1999; Amar et al., 2003; Martellini et al., 2005) entretanto a extração orgânica embora apresente possa apresentar bons resultados (Zarlenga et al., 1997 citado por Harmon et al., 2006) e custo relativamente baixo, não é capaz de remover completamente as substâncias inibidoras.

As variações na consistência (seca, pastosa, aquosa e com presença de muco) e composição (fibra *versus* grão) das fezes de bovinos são variáveis importantes que devem ser observadas e que possuem impacto na eficiência remoção de inibidores da PCR e na qualidade do DNA obtido (Inglis & kalischuk, 2003).

A escolha do método de extração do DNA das amostras fecais com o kit QIAamp® DNA Stool foi devidamente estudada, uma vez que vários estudos demonstram que o mesmo permite uma purificação de DNA total rápida e de execução prática, além de render uma quantidade de DNA eluída satisfatória e de boa qualidade para as análises

(Li et al, 2003); sendo capaz de remover efetivamente qualquer substâncias inibidoras da reação de PCR em amostras fecais (Alves et al, 2003; Inglis & Kalischuk, 2003; Becher et al, 2004; Gioffre et al, 2004; Trotz-Williams et al, 2005; Johnson et al, 2005) e por analogia em fezes ovinas também.

Esse mesmo kit comercial foi comparado com outros quatro kits e com um processo de extração baseado no método de “matrix guanidium isothiocyanate/silica” para a eficiência da extração de DNA de amostras fecais humanas e apresentou-se como o mais eficiente entre os cinco kits testados (McOrist et al., 2002).

De acordo com Bialek et al. (2002), o limite de detecção de oocistos aumenta em 100 vezes quando a ruptura mecânica dos mesmos é realizada através da imersão das amostras em ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. Por analogia e devido a esse procedimento também ser utilizado em outros estudos (O’Handley et al., 2000), ele foi adotado nesta pesquisa para o rompimento da parede dos cistos de *Giardia duodenalis* e oocistos de *Cryptosporidium* spp.

A excreção dos cistos de *G. duodenalis* e oocistos de *Cryptosporidium* sp. ocorre de forma intermitente, com a quantidade de parasitas excretados variando de um dia para o outro (Hanson & Cartwright, 2001). Entratanto, muito pouco é conhecido sobre a distribuição espacial dos (oo)cistos nas fezes, e se os mesmo forem eliminados agregados ou distribuídos irregularmente, a pequena quantidade da amostra fecal usada para a extração do DNA pode gerar um resultado falso-negativo e uma mensuração errônea da prevalência dessas espécies na população estudada.

Neste estudo foi usada a quantidade de 200mg de fezes para extração do DNA das amostras, conforme orientação do fabricante do kit. Mesmo com a quantidade inicial de apenas 200mg de fezes usadas para a extração, o fato de prováveis resultados negativos possivelmente atribuídos a ausência de (oo)cistos na alíquota de 200mg da amostra retirada para a extração (embora, por exemplo, no restante da amostras pudesse haver cistos/oocistos) não pareceu ser problema durante o estudo. Neste estudo, foram usados inicialmente nas técnicas de microscopia óptica cerca de 1-2 gramas de fezes para o processamento e análise; e em todas as amostras onde foram visualizados (oo)cistos, a técnica de PCR também foi capaz de amplificar o DNA dos microorganismos. Existe a possibilidade de aumentar a quantidade da amostra de fezes usada para extração (1g), mas o aumento do tamanho da amostra pode pelo motivos discutidos inicialmente (inibidores, quantidade de materia vegetal) pode sobrecarregar os passos de purificação (Inglis & kalischuk, 2003). Inglis & kalischuk (2003) também levantam a suspeita de que a



grande quantidade de matéria vegetal das fezes de bovinos pode contribuir para significativamente para o aumento na presença de complexos polissacarídeos e compostos polifenólicos (substâncias inibidoras da reação de PCR) e que esse um fator também limita a biomassa de fezes que pode ser eficazmente processada pelo método de extração do kit QIAamp DNA stool minikit (extração de maior quantidade de matéria vegetal do que de fezes propriamente dita), mas como contextualizado acima, a ausência de amostras positivas na microscopia optica e negativas na PCR prova o contrário.

Neste estudo também foi testado um novo kit comercial para extração de DNA das fezes: E.Z.N.A Stool DNA Miniprep kit - OMEGA<sup>®</sup>. Esse kit possui o mesmo princípio de utilização do kit QIAamp DNA Stool Mini Kit - QIAGEN<sup>®</sup> e seu custo é comparativamente menor. Entretanto, resultados obtidos com esse novo kit não foram satisfatórios. Metade das amostras (n=10) que foram submetidas a extração com o novo kit falharam, enquanto que não houve falha na extração em todas as amostras extraídas com o kit da QUIAGEN. A falha pode ser comprovada através do nosso protocolo de amplificação de DNA mitocondrial bovino de cada amostra (Martellini et al., 2005).

Por isso, embora os custos fossem menores, optou-se por não utilizar o novo kit de extração para não haver comprometimento dos resultados, além de uma maior gasto de tempo nas análises, uma vez que caso alguma amostra não tenha o DNA mitocondrial bovino amplificado, uma nova extração é realizada, algo que requer tempo e gasto de material.

Todas amostras negativas para *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. na PCR, foram submetidas a análise da qualidade da extração e para a verificação da possível presença de inibidores da reação de PCR, realizando-se a amplificação do DNA mitocondrial bovino ou ovino (no caso de amostras de origem ovina). Todas essas amostras tiveram o DNA mitocondrial amplificado. Aquelas amostras em que o DNA mitocondrial bovino/ovino não foi amplificado, a extração foi processada outra vez.

Nos últimos anos muitas metodologias baseadas no DNA tem sido publicadas para o diagnóstico de vírus, bactérias e em grau menor para a detecção de DNA de protozoários intestinais. O uso dessas técnicas para o diagnóstico parasitológico de rotina é ainda muito limitado. No passado, o isolamento de DNA, especialmente das fezes, era problemático e laborioso. Ainda conta o fato de que a amplificação e detecção de DNA era extremamente sensível a contaminação, tinha custo muito elevado, consumia bastante tempo e apenas um DNA alvo poderia ser detectado na reação. Para que a PCR possa ser aceita como uma ferramenta diagnóstica de enteropatogenos presentes nas

fezes, os possíveis problemas durante o processo de extração do DNA necessitam ser superados e em conjunto desenvolvidos métodos de confiança, rápidos e de fácil execução para a extração de ácidos nucleicos amplificáveis por PCR (Inglis & Kalischuk, 2003).

## 6.12. Comparação entre as técnicas de diagnóstico

A sensibilidade do exame de uma única amostra fecal por técnicas convencionais de microscopia óptica tem sido demonstrada em vários estudos de ser abaixo do ideal (Hanson & Cartwright, 2001). Classicamente a sensibilidade depende grandemente do número de amostras analisadas, do uso de técnicas de concentração fecal e da habilidade do técnico no reconhecimento das formas parasitárias do microorganismo (Verweij et al., 2003).

A pobre sensibilidade de uma análise única das amostras obtida através do emprego de métodos tradicionais de diagnóstico de *Giardia duodenalis* é primariamente devido a excreção intermitente e/ou aos baixos níveis de excreção de cistos do parasita por pacientes infectados (Hanson & Cartwright, 2001) e é uma das principais razões para que os livros de parasitologia e os manuais de diagnóstico de laboratórios recomendem que múltiplas e independentes amostras fecais (3 amostras com intervalo de 3 dias entre cada) sejam obtidas e analisadas.

A detecção de *G. duodenalis* através da microscopia ou ELISA é de valor epidemiológico limitado, especialmente em termos da origem da fonte da infecção, uma vez que esses métodos não são capazes de identificar as espécies/genótipos dos microorganismos (Thompson, 2004).

O desenvolvimento de técnicas de maior sensibilidade, como aquelas baseadas em imunofluorescência e biologia molecular, quando comparadas às técnicas convencionais de microscopia óptica, tem geralmente aumentado a sensibilidade da detecção e quantificação relativa de (oo)cistos de protozoários intestinais e podem permitir que determinações das taxas de prevalência sejam mais acuradas (Gosh et al., 2000; O'Handley, 2002; McGlade et al., 2003).

Técnicas moleculares foram desenvolvidas com o objetivo de fornecer informações sobre as espécies/genótipos de *Giardia* e *Cryptosporidium*. Algumas delas são baseadas na PCR em combinação com as análises dos tamanhos dos fragmentos de restrição (RFLP), sem a necessidade de recorrer às técnicas de sequenciamento, que são

normalmente caras e demoradas (Xiao et al., 2001; Amar et al., 2002; Read et al., 2004). O custo dessas técnicas está declinado, mas ainda há necessidade para a dispersão dessas tecnologias, de forma que esses procedimentos possam ser aplicados rotineiramente em laboratórios de países em desenvolvimento, particularmente naqueles em que existem áreas endêmicas para as enfermidades.

A sensibilidade alta da maioria dos métodos de PCR pode, se mal analisada, apresentar problemas de interpretação. Thompson (2004), descreveu esse fato observando que em um estudo conduzido na Austrália, que visava determinar a prevalência de infecções parasitárias por *Giardia duodenalis*, a taxa de prevalência baseada no diagnóstico por microscopia óptica foi de 5%, enquanto que a PCR identificou 80% de animais infectados, fato esse suportado pela análise conjunta com a técnica enzimática de captura de antígeno fecais (McGlade et al., 2003). De forma similar, um estudo em cães conduzido na Índia encontrou uma prevalência de 3% usando microscopia, comparado com 20% pela PCR (Traub et al., 2004). Esses dados não podem ser apontados devido a natureza de excreção intermitente de cistos de *Giardia*, ou seja, a diferença entre resultados obtidos por essas duas técnicas foi marcante devido a pobre sensibilidade analítica e diagnóstica da técnica de microscopia óptica.

Apesar de não existir um teste padrão-ouro para o diagnóstico de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais, devido ao caráter intermitente de excreção dos parasitas e/ou ao número baixo de (oo)cistos passados nas fezes, o método da PCR, recentemente considerada de alta sensibilidade analítica e diagnóstica para a identificação de *G. duodenalis* (Macglade et al, 2003) e *Cyptosporidium* (Xiao et al., 2001) em amostras fecais, foi tomada como teste de referência.

#### **6.12.1. Microscopia óptica x PCR**

Um total de 200 amostras foram analisadas para o diagnóstico de *Giardia duodenalis* pelo método de microscopia óptica (CFMSZ) e PCR. A análise por PCR identificou um total de 16 amostras positivas (8% das amostras testadas). Microscopia detectou 6 amostras positivas (3% das amostras testadas). Nenhuma amostra positiva na microscopia foi negativa na PCR. O valor de co-positividade indicou que apenas 37,5% das amostras podem ser consideradas realmente negativas utilizando o diagnóstico microscópico através da técnica de CFMSZ. Em consequência, 62,5% das amostras negativas na CFMSZ podem ser falso-negativas ( $P < 0.0001$  considerado significativo).

Resultados discordantes foram observados em 10 amostras (negativas na microscopia e positivas na PCR). A técnica de CFMSZ não foi capaz de detectar essas amostras e por isso foram consideradas “falso-negativas”. Em casos onde o número de cistos por grama de fezes é muito baixo, a técnica da PCR é capaz de detectar amostras positivas que foram consideradas negativas na técnica de microscopia óptica. Dessa forma, dez amostras adicionais foram detectadas.

Com relação a comparação entre a microscopia óptica (técnica de CFCM) e PCR para o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais, das 200 amostras fecais coletadas de bovinos, 17 (8,5%) foram positivas, enquanto que a PCR detectou 28 (14%). O valor de co-positividade indicou que apenas 60,7% das amostras podem ser consideradas realmente negativas utilizando o diagnóstico microscópico através da técnica de CFCM. Em consequência, 39,3% das amostras negativas na CFCM podem ser falso-negativas.

O perfeito funcionamento das reações da PCR foi comprovado com a presença de controles positivos e negativos em cada análise e com a amplificação do DNA mitocondrial bovino de cada amostra extraída (comprovando que o resultado “PCR-negativo” não foi devido baixa qualidade do DNA da amostra devido à falhas durante o processo de extração). Todas as amostras que não produziram amplicons do DNA alvo na PCR, ou seja, amostras “PCR-negativas”, foram testadas para a presença de inibidores da reação de PCR por constituintes fecais com a realização da “spike probe”. Todas as amostras apresentara-se positivas após a realização desse teste; evidenciando dessa forma que não houve presença de inibidores da reação de PCR em nenhuma das amostras.

Neste estudo, e somente para as amostras testadas, podemos afirmar que a técnica da PCR se mostrou viável como teste de referência para o diagnóstico de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. Ela foi suportada com base nos resultados agregados dos outros métodos empregados neste experimento (todas as amostras positivas na microscopia óptica e ELISA também foram positivas na PCR), na realização de testes para medir o controle de qualidade da técnica (DNA mitocondrial bovino, controle positivo/negativos, “spike probe”) e na extensa descrição científica da eficiência da mesma (Morgan et al., 1998; Gosh et al., 2000; Macglade et al., 2001; Xiao et al., 2001), comprovando sua maior sensibilidade diagnóstica quando se é testada apenas uma amostra fecal de cada animal.

Esses resultados sugerem que uma porcentagem de animais (doentes ou sadios) podem não ter sido propriamente diagnosticados, em análises laboratoriais empregadas rotineiramente com diversas finalidades na medicina veterinária, se a técnica de microscopia óptica foi usada como método único para diagnóstico de *Giardia* e *Cryptosporidium*.

A eficiência da técnica da PCR deve ser analisada através de outros estudos com diferentes tipos de amostras clínicas e/ou em estudos de infecção experimental onde se pode ter controle sobre a real condição dos animais testados.

Em pacientes com giardiase ou criptosporidiose, o uso de técnicas de diagnóstico de rotina, como os métodos de concentração fecal e os de coloração de esfregaços fecais, podem não ser capazes de demonstrar a presença desses microrganismos (Garcia & Shimizu, 1997).

#### **6.12.2. Microscopia x Ensaio enzimático**

Resultados controversos foram encontrados comparando-se essas técnicas para o diagnóstico de *Giardia duodenalis*: cinco amostras foram positivas pelas duas técnicas e duas amostras tiveram resultados discordantes; sendo que, uma amostra foi positiva pela CFSZ e negativa no ELISA e a outra amostra negativa no CFSZ e positiva no ELISA. Para as duas amostras discordantes, a confirmação foi suportada pela análise na técnica da PCR. Apesar da concordância entre os testes atingir de 99%.

Para o diagnóstico de *Cryptosporidium*, o teste ELISA obteve resultados inferiores aos apresentados pelo método de microscopia óptica (CFCM) e PCR, com apenas uma única amostra considerada positiva em contrapartida às 17 apresentadas pela CFCM e 28 apresentadas na PCR. A especificidade do teste ELISA provavelmente foi o fator crítico para esses resultados.

Devido a este motivo, o mesmo não foi usado para comparação com as outras duas técnicas de diagnóstico. É provável que a especificidade deste teste seja nula quando aplicado em amostras de origem bovina e/ou ovina que estejam parasitadas pela espécie *Cryptosporidium andersoni*, como ocorreu com grande parte dos animais desse experimento. O kit é desenvolvido para teste em amostras fecais humanas e os anticorpos de captura usados provavelmente foram desenvolvidos para *Cryptosporidium parvum* ou outras espécies/genótipos mais proximamente relacionadas uma vez que *Cryptosporidium andersoni* não é capaz de parasitar humanos e é uma espécie que

habita o estomago do hospedeiro (e não o intestino como *C. parvum*). Isso pode explicar a baixa sensibilidade e os resultados negativos do teste em amostras positivas tanto na microscopia óptica quanto na PCR.

### **6.12.3. Microscopia x Ensaio enzimático x PCR**

Do total de 200 amostras analisadas para o diagnóstico de *Giardia duodenalis* pelo método de microscopia óptica (CFMSZ) e Ensaio enzimático (ELISA), identificou-se um total de 6 amostras positivas para ambas as técnicas, resultando em uma ocorrência de 8% das amostras testadas. Entretanto os métodos foram semelhantemente incapazes de detectar 10 amostras que foram positivas pela técnica da PCR. O método imunoenzimático ainda teve como agravante a presença de amostras falso-positivas (indicada pelos valores do *Índice Elisa* e pelo agregamento dos resultados obtidos dos outros dois testes; tomando a PCR como referência). Neste estudo, o teste ELISA para o diagnóstico de *Giardia*, obteve resultados de co-positividade e co-negatividade equivalentes aos apresentados pelo método de microscopia óptica (CFMSZ) e inferiores comparados aos da técnica da PCR.

### **6.13. Considerações sobre a técnica de microscopia óptica - CFMSZ**

Observou-se que comparativamente com o uso de Sulfato de zinco, a utilização de açúcar para obtenção de uma solução hipersaturada trouxe resultados pouco satisfatórios em termos de diagnóstico, uma vez que a solução final analisada após o processo de centrifugo-flutuação, apresenta-se mais escura e com maior número de detritos e partículas fecais, impossibilitando a melhor observação microscópica dos cistos de *Giardia duodenalis*. Dessa forma, realizamos pequenas modificações e adaptamos a técnica de centrifugo-flutuação em Solução de Sulfato de zinco (técnica de Faust e Colaboradores) ao método descrito por Hubber e colaboradores (2003).

Essa adaptação emprega uma solução hipersaturada de sulfato de zinco no lugar da solução hipersaturada de açúcar da técnica de centrifugo-flutuação modificada em Solução de Sacarose. Ambas possuem o mesmo princípio, a saber: flutuação de ovos leves e cistos de protozoários graças ao emprego de uma solução de alta densidade específica. Com a adaptação desse protocolo à técnica de Faust e colaboradores, melhores resultados foram obtidos, pois a solução de flutuação que é analisada ao

microscópio é mais límpida e clara, livre de maiores detritos fecais e desta forma de melhor uso para as análises.

A mudança não modificou nenhuma metodologia quanto à comparação entre a microscopia óptica e as outras técnicas de diagnóstico, uma vez que apenas houve a substituição de uma solução empregada por outra (sulfato de zinco no lugar de açúcar).

#### **6.14. Considerações sobre o método Imunoenzimático -ELISA**

A disponibilidade de kits comerciais baseados em princípios imunoenzimáticos (ELISA) para o diagnóstico de antígenos *Giardia*-específicos presentes em amostras fecais tem providenciado uma atrativa e potencialmente alternativa aos métodos microscópicos par ao diagnóstico da giardiase. Um número grande de avaliações clínicas e experimentais desses kits ELISA demonstraram que eles são práticos, rápidos, de fácil realização e talvez mais importante, possuem um custo-benefício bom para detectar a infecção por *Giardia duodenalis* (Garcia & Shimizu, 1997; Hanson & Cartwright, 2001).

A sensibilidade desses kits ELISA em vários estudos tem sido descritas como comparáveis e em muitos casos superiores do que os métodos de microscopia (Garcia et al., 1992; Mank et al., 1997). Entretanto, kits comerciais ELISA para o diagnóstico de antígenos fecais de *Giardia* e *Cryptosporidium* já foram descritos de ter problemas com a sensibilidade e especificidade (Johnston et al., 2003), resultando em significantes números de resultados falso-positivos e falso-negativos. Johnston e colaboradores (2003) observaram que os ensaios imunoenzimáticos utilizando kits comerciais para o diagnóstico de *Giardia* e *Cryptosporidium* geralmente detectam amostras positivas com >175 organismos/10µl, frequentemente havendo falhas na detecção de amostras com baixo número de parasitas.

Hanson & Cartwright, 2001 confirmaram a superior sensibilidade do método imunoenzimático comparado as técnicas tradicionais de microscopia óptica para o diagnóstico de *Giardia duodenalis* em amostras fecais humanas de pacientes sintomáticos e assintomáticos. Os autores entretanto consideram que a utilização de kits ELISA em única amostra fecal pode ser preferível em ambientes onde a prevalência de infecções parasitárias intestinais é baixa e onde o patógeno intestinal primário indentificado é *Giardia* (em países de primeiro mundo, não parecendo ser o caso dos animais desse experiemnto, já que a causa de diarreia em bovinos pode ser atribuída a

outros patógenos intestinais, como helmintos *strongylideos* e coccideos, presentes em 35% e 33% nos animais desse estudo, respectivamente).

Em ambientes com alta prevalência de infecções parasitárias, ou para indivíduos que estão em risco crescente a exposição à giardíase (como no caso de bovinos susceptíveis em 80% das propriedades onde ocorreram infecções por *Giardia*), a análise de uma única amostra fecal pela técnica de ELISA não é suficiente para excluir a possibilidade da infecção por *G. duodenalis*, recomendando-se nesses casos, que duas amostras fecais sejam submetidas ao laboratório e testadas por ELISA, com a análise da segunda amostra sendo realizado, caso a primeira render um resultado negativo (Hanson & Cartwright, 2001). No presente estudo apenas uma única amostra fecal foi analisada por ELISA, o que pode explicar os resultados equivalentes dessa técnica com a de microscopia óptica para o diagnóstico de *Giardia*.

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo, onde nenhuma das 23 amostras positivas na PCR para *Cryptosporidium andersoni* foi positiva no ELISA, no caso da análises de amostras originadas de ruminantes domésticos (bovinos, ovinos e caprinos) que podem estar parasitados por *C. andersoni*, o kit ELISA (techlab) ou outros equivalentes que usem o mesmo princípio, deve ser usado criteriosamente (ou não devem ser usados) como método único ou teste “screening” para o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. A interpretação dos resultados das amostras pelo kit ELISA pode ser problemática em algumas ocasiões, principalmente quando não se dispõe de aparelhos para leitura da absorvância das amostras, deixando os resultados dependentes apenas com base na intensidade de cor observada nos poços da placa.

Devido a baixa intensidade de cor produzidas nos poços da placa do kit por algumas amostras sabiamente positivas, sobretudo porque a intensidade de cor do controle positivo é sempre muito mais forte do que qualquer uma das amostras testadas, os resultados de absorvância são fundamentais para confirmar tais infecções.

Sobretudo porque que a intensidade da coloração não é proporcional ao número de parasitas presentes na amostra, como já se é estabelecido pelo manual do kit e como foi observado neste estudo com base de comparações com a análise de lâminas na microscopia óptica ou pela leituras dos valores de absorvância a 450nm das amostras, sendo fundamental a análise do último para verificação de resultados confiáveis.



### 6.15. Considerações sobre a técnica da PCR

Após o processamento inicial pela PCR utilizando o protocolo para isolamento do DNA de *Giardia duodenalis* através do gene GDH (Read et al., 2004), foi observado que determinadas amostras apresentaram bandas inespecíficas no gel de agarose, em padrões diferentes dos 430 pares de base das amostras positivas. Essas amostras (n=32) tinham em comum a presença em grande quantidade de outro protozoário intestinal comum em ruminantes, a saber: *Eimeria* spp.

Através dessa observação foi levantada a hipótese que o DNA de *Eimeria*, co-extraído na amostra, poderia estar tendo uma amplificação inespecífica junto com o DNA de *Giardia duodenalis* através do uso dos primers do protocolo utilizado (Read et al., 2004). Essas bandas inespecíficas não atrapalharam o padrão de diagnóstico das amostras (pois nenhuma banda se apresentou próxima aos 432 pb das características de bandas positivas). O controle positivo utilizado era de uma mostra de origem canina com grande quantidade de cistos apresentados na microscopia (4+) que não apresentava bandas inespecíficas. A especificidade desse PCR foi testada usando DNA extraído de *Cryptosporidium parvum*, *Isospora* e fezes humanas normais (Read et al., 2004). Apesar de amostras bovinas serem utilizadas, não se sabe se as mesmas continham oocistos de *Eimeria* spp., e se o autor teve os problemas com bandas inespecíficas em outras amostras usando os primers desenvolvidos por ele. A grande vantagem deste PCR-RFLP é a habilidade de genotipar os isolados diretamente das fezes sem a necessidade da propagação *in vitro* através de cultura. Outra grande vantagem prática é que através da amplificação do gene GDH obtida com os primers deste protocolo e o uso da enzima de restrição *NlaIV* é possível genotipar os isolados sem a necessidade de realizar o sequenciamento genético. Se a digestão dos produtos da PCR for ótima, uma fácil interpretação dos genótipos é obtida, frequentemente envolvendo a visualização de um número pequeno de bandas no gel. Para comparar os resultados da genotipagem obtidos do sequenciamento e da PCR-RFLP no gene GDH, o produto de PCR de trinta e duas amostras fecais foram sequenciados anteriormente a análise da RFLP. Uma correlação de 100% foi observada entre os resultados obtidos por PCR-RFLP e o sequenciamento (Read et al., 2004). Desta forma o processo de genotipagem por PCR-RFLP torna-se muito mais simplificado quando comparado ao do sequenciamento genético. A técnica de sequenciamento é trabalhosa, laboriosa e possui um alto custo, pois além da necessidade da purificação dos produtos da PCR e do preparo de reações

de sequenciamento, é fundamental um sequenciador automático. Sendo assim este protocolo de PCR-RFLP provou ser altamente reproduzível, tornando-se ideal para genotipagem de rotina.

Mesmo assim, foi realizada uma nova padronização para a detecção do DNA de *Giardia duodenalis* através da amplificação de um outro gene do microorganismo, a saber: Gene SSU-rDNA de acordo com Hopkins e colaboradores (1997). A amplificação do DNA de *Giardia duodenalis* através desse gene e pelo uso de primers específicos desenvolvidos por Hopkins e colaboradores foi extensamente usada no meio científico (O'Handley et al., 2000; Read et al., 2002; Berrilli et al., 2004; Trout et al., 2004; Appelbee et al., 2003; Ryan et al., 2005).

Uma reação de Nested PCR foi adaptada para aumentar a sensibilidade analítica e diagnóstica dessa reação, de acordo com um protocolo de reação já estabelecido em outros relevantes trabalhos publicados (Read et al, 2002; Macglade et al, 2003; Becher et al, 2004).

A genotipagem por sequencias de DNA derivadas do gene GDH providenciar informações mais detalhadas contendo diferentes genótipos de *G. duodenalis* (Read et al., 2004; Giessen et al. 2006), uma vez que esse gene possui sequencias polimórficas capazes de diferenciar os genótipos de forma mais precisa. O protocolo de Read et al. (2004) por exemplo, amplifica 432 pb, enquanto que um dos mais usados protocolos para detecção e caracterização molecular de *Giardia* usa o gene 18S rDNA com apenas 292 pb (Hopkins et al., 1997). O gene GDH é menos conservado que o 18SrDNA, fazendo-o possível distinguir entre os subgrupos dos genótipos A e B.

#### **6.16. Considerações sobre o protocolo da PCR utilizado para *Cryptosporidium***

A existência de *Cryptosporidium* spp. hospedeiro-adaptado e *Cryptosporidium parvum* incluindo seus genótipos torna necessário o desenvolvimento de ferramentas moleculares para determinação da diferenciação das espécies e/ou genótipos, e dessa forma esclarecer o quanto os oocistos de *Cryptosporidium* encontrados em amostras fecais de animais são de espécies capazes de infectar humanos. Uma dessas ferramentas, a PCR-RFLP do gene small-subunit (SSU) rRNA tem sido usado com sucesso por diversos pesquisadores para diferenciar genótipos e as espécies de *Cryptosporidium parvum* em amostras ambientais e em amostras fecais de animais e humanos (Xiao et al., 1999a; Xiao et al 1999b; Xiao et al., 2001).

Estudos realizados por Sulaiman e colaboradores (1999) compararam a eficiência da amplificação e o potencial de diferenciação entre as espécies/genótipos de *Cryptosporidium* de vários protocolos de PCR-RFLP e sequenciamento obtidos dos principais genes (rRNA, COWP, DHFR, Trap-C1, Trap-C2, Poly-T) e detectaram que o protocolo desenvolvido por Xiao e colaboradores (1999) possui melhor sensibilidade (os primers foram capazes de amplificar o DNA de apenas 1 oocisto), especificidade e capacidade superior para a melhor distinção entre as espécies/genótipos de *Cryptosporidium*. Esse mesmo protocolo foi utilizado no presente estudo.

A Nested-PCR envolve uma etapa secundária de amplificação usando primers específicos, tendo sido aplicada para aumentar a especificidade e sensibilidade das reações. Classicamente, as reações que envolvem uma etapa de Nested-PCR não são recomendadas para o uso em laboratórios de diagnóstico devido principalmente a um risco de contaminação com produtos da PCR. Entretanto, se o devido cuidado for mantido e se protocolos-padrão para evitar contaminações forem estritamente seguidos, a contaminação por produtos da PCR não deverão ser um problema e serão observados raramente. O uso de controles negativos na segunda etapa da reação (Nested) adicionais ao controle negativo da primeira etapa da reação (PCR) são fundamentais nestes casos.

### **6.17. Breve conclusão observada na comparação de técnicas de diagnóstico**

Para as amostras testadas neste experimento, os resultados demonstraram que a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (Nested- PCR) é o método de detecção mais sensível para o diagnóstico de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp em amostras fecais de bovinos. Esse método é capaz de amplificar em milhões de vezes o DNA do microorganismo se o mesmo estiver presente na amostra extraída.

### **6.18. Comparação das técnicas de diagnóstico – outros atributos**

#### **6.18.1. Custo**

O valor médio de materiais consumidos requeridos para o teste de microscopia (CFMSZ) é baixo quando comparado ao custo da aquisição do teste ELISA, uma vez que o kit é importado dos Estados Unidos. Os custos de todas as etapas da PCR, desde a extração de DNA, compra de primers específicos, matérias plásticas como ponteiras e

microtubos, além de todos os outros materiais de consumo utilizados na eletroforese faz com que o custos dessa técnica sejam bem mais altos. De acordo com as instruções do fabricante do kit ELISA, nenhum equipamento adicional é requerido para a realização do teste, embora um leitor de ELISA seja aconselhado para a leitura da absorvância das amostras para que a confirmação dos resultados não seja apenas visual através da coloração dos poços utilizados na placa do kit. Para a técnica de CFMSZ e CFCM um microscópio óptico se faz necessário e o uso de materiais descartáveis como pipetas, copos plásticos e coadores barateiam a técnica. A técnica de PCR necessita de um capital de investimento bem maior, assim como requer o uso de equipamentos relativamente caros, como os termocicladores, microcentrifugas, cubas de eletroforese, transluminador UV, além dos custos com o pessoal técnico que deve ser altamente qualificado para a realização.

#### **6.18.2. Tempo gasto em cada análise**

A técnica de CFMSZ requer aproximadamente 10 minutos para preparação e leitura de 1 única amostra. Esse tempo aumenta e substancialmente devendo ser otimizado de acordo com a quantidade de amostras, uma vez que o técnico irá analisar visualmente as mesmas no microscópio necessitando de no mínimo cinco minutos de duração gastos na procura por cistos de *Giardia duodenalis* em cada slide. Além da etapa inicial de processamento das amostra, a técnica de CFCM requer o crescimento de aproximadamente 20 minutos entre a confecção do esfregaço fecal e as etapas de coloração da lamina. O exame de esfregaços fecais corados pode levar aproximadamente dez minutos ou mais, dependendo da qualidade do esfregaço e da experiência do examinador no reconhecimento das formas dos oocistos de *Cryptosporidium* sp. (Garcia et al., 1992). Segundo Garcia e colaboradores (1992), com aproximadamente 60% do orçamento de qualquer laboratório sendo alocado para os profissionais, o tempo-pago de cada profissional necessário para processar e analisar ao microscópio muitas amostras suspeitas pode ser significativo. Em outras palavras, quando se analisa apenas uma única amostra, o tempo gasto com as técnicas de microscopia é relativamente curto, entretanto quanto maior o número de amostras a serem analisadas, maior será o tempo em que o examinador ficara preso as etapas de processamento da técnica e detecção de formas parasitárias ao microscópio, não podendo exercer outra atividade ou ate outros tipos de analise no laboratório. No caso de muitas amostras, um tempo de descanso para

o técnico se faz necessário, devido ao cansaço que a observação ocular produz nos olhos do analisador.

O kit ELISA requer pelo menos duas horas e meia para análise. A sua grande vantagem é que 94 amostras podem ser processadas de uma única vez nesse tempo. Fazendo uma analogia ao número de amostras, em menos de 24 horas é impossível analisar essa quantidade de amostras pela técnica de microscopia óptica (CFMSZ e CFCM). O tempo gasto do técnico com a manipulação e preparação dos testes também é relativamente curto, restando a maior demora em 2 períodos de incubação que somam cerca de 80 minutos, com a vantagem que durante esse período o examinador estará livre para outras atividades. Com o renovado interesse dos laboratórios no treinamento rápido de profissionais e na redução contínua de funcionários, são bastante vantajosos os procedimentos de diagnóstico que não requerem o exame extensivo de análises ao microscópio (Garcia & Shimizu, 1997). Essa é uma das vantagens do método de ELISA, comparado aos testes baseados na microscopia óptica (CFMSZ e CFCM). A extração do DNA, preparação das reações de PCR, o período em que as amostras permanecem no termociclador e a eletroforese em gel de agarose da técnica da PCR levam um grande tempo, com um mínimo de 8 horas requeridas para o processamento de uma única amostra. Entretanto, desse total, o tempo gasto é quase que totalmente necessitado em etapas em que o técnico não precisa estar manipulando a amostra (termociclador e eletroforese), fazendo com que o mesmo tenha cerca de metade desse tempo para outras atividades no laboratório.

### **6.18.3. Simplicidade da Técnica**

A técnica de CFMSZ é um teste simples de ser executado. Não há envolvimento de equipamentos sofisticados. O único requerimento aprofundando dessa técnica, é o reconhecimento dos cistos de *Giardia duodenalis* e oocistos de *Cryptosporidium* sp. por parte do analisador. Para tal, a vivência e experiência na área se faz necessário. O kit ELISA para diagnóstico de antígenos de *Giardia* e *Cryptosporidium* em amostras fecais é fácil de ser executado e pode ser conduzido em etapas simples que são descritas em etapas de forma razoavelmente fácil de serem compreendidas no seu manual. A técnica de PCR é, das três, a mais complexa de se realizar, envolvendo muitos passos minuciosos durante as várias etapas da extração do DNA, preparo das reações, eletroforese do gel de agarose. A escolha do método de diagnóstico deve ser averiguada

por cada laboratório, devendo levar em consideração o custo dos equipamentos, a contratação de pessoal qualificado, ao estado endêmico da enfermidade no local, etc.

#### **6.19. Análise dos animais da propriedade de Tupi Paulista –SP.**

A prevalência e o significado patogênico das infecções por protozoários intestinais como *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em ovinos tem recebido comparativamente pouca atenção no Brasil e em outras nações. Estudos anteriores que foram conduzidos para determinar a prevalência de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em ovinos baseados no diagnóstico por microscopia óptica, descreveram prevalências variando de 6% a 38% para *Giardia* (Olson et al., 1997) e 10% a 55% para *Cryptosporidium* spp. (Olson et al. 1997; Causape et al., 2002; Majewska et al., 2000; Green et al., 2004).

A ocorrência de *Giardia duodenalis* (34%) e *Cryptosporidium* spp. (25%) observada neste estudo está de acordo com as descritas por outros pesquisadores (Buret et al, 1990; Ryan et al., 2005; Santin et al., 2007).

A técnica da PCR demonstrou uma sensibilidade diagnóstica superior quando comparada à técnica de Ensaio imunoenzimático (Kit ELISA) para a detecção de ambos parasitas. O diagnóstico de *Giardia duodenalis* observada em 34% pela PCR versus 27% por ELISA (teste exato de Fisher,  $P < 0.0001$ , considerado extremamente significativo) e *Cryptosporidium* spp. detectado em 25% pela PCR versus 13% por ELISA ( $P < 0.0001$ , considerado extremamente significativo) constatam a superior sensibilidade das técnicas de amplificação do DNA sobre as de captura de antígenos em amostras fecais. Esses dados estão de acordo com (Macglade et al, 2003), que também analisaram amostras fecais de animais. Embora os kits não sejam desenvolvidos para uso em animais, nesse caso apresentaram resultados aceitáveis. O uso único de kits comerciais ELISA para o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de ovinos deve ser criteriosamente avaliado, pois dependendo da endemicidade do rebanho com relação à *Cryptosporidium andersoni*, o custo-benefício do kit é insatisfatório, uma vez que como observado nos resultados das amostras de bovinos, se essa espécie estive presente, o número de resultados falso-negativos é alto.

Prevalência das infecções em cordeiros é significativamente maior do que em ovelhas (Buret et al., 1990; Xiao et al., 2003; Santin et al., 2007). Isso também foi observado no presente estudo, onde observamos que com relação ao total de animais,

32% e 22% dos cordeiros e apenas 2% e 3% das ovelhas estavam parasitados por *Giardia* e *Cryptosporidium* respectivamente.

A análise do parasitismo por *Giardia duodenalis* em relação a faixa etária dos animais indicou a ocorrência em 62,5% (20/32) dos cordeiros de 0-2 meses; em 37,5% (12/32) dos cordeiros traçadores de 3-5 meses; enquanto que apenas 6,25% (2/32) dos animais parasitados eram ovelhas. A análise do parasitismo por *Cryptosporidium* spp. em relação a faixa etária dos animais indicou a ocorrência em 64% (16/25) dos cordeiros de 0-2 meses; em 24% (6/25) dos cordeiros traçadores de 3-5 meses; e em 12% (3/25) das ovelhas. Infecções mistas por *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. ocorreram em 12 animais.

Observando o manejo dos animais, de acordo com Fernandes, (2006); e comparando os dados obtidos, pode-se supor que com relação a infecção de *Giardia* e *Cryptosporidium* nos cordeiros (0-2 meses): (i) as ovelhas poderiam ser a fonte das infecções para os cordeiros mesmo que apenas uma pequena parcela foi diagnosticada positiva (possivelmente elas estariam cronicamente infectadas), (ii) pode ter ocorrido devido a contaminação do pasto, dos locais de alimentação, ou por via direta oro-fecal pelo contato entre animais doentes e animais susceptíveis (iii) a taxa de transmissão de *Giardia* e *Cryptosporidium* spp. é alta em cordeiros, uma vez que permaneceram apenas 2 meses no pasto e depois foram sacrificados, (iii) ocorre devido a maior susceptibilidade de animais novos ao parasitismo. Em relação aos cordeiros traçadores, é provável que se infectaram durante pastejo ou estabulação.

#### **6.19.1. Genótipos de *Giardia duodenalis***

A caracterização molecular por PCR-RFLP, demonstrou que todos os animais positivos estavam parasitados por *Giardia duodenalis* genótipo E (animal específico). Esse estudo foi um dos primeiros (se não o primeiro, para o nosso conhecimento) que caracterizou geneticamente os isolados de *Giardia duodenalis* encontrados em ovinos no Brasil.

Santin et al. (2007) obteve o resultado parecido com ovinos nos Estados Unidos, onde 99% dos animais estavam parasitados com o genótipo E e apenas 1% com o genótipo A. Ryan et al. (2005) detectaram 33 amostras do genótipo E e 11 amostras do genótipo A. Giangaspero et al. (2005) detectaram presença de *Giardia* em 1,5% (5/325) dos cordeiros em 20 fazendas na Espanha, obtendo desses 5 isolados a caracterização

do genótipo A1 de *G. duodenalis*. Aloísio et al. (2006), descreveram a presença do genótipo B através da PCR e sequenciamento do gene TPI, em um surto de giardiase em cordeiros em uma propriedade na Itália e caracterizou o agente como único responsável pela presença de sinais clínicos nos animais, porém não conseguiram provar se a severidade dos sinais e os efeitos patogênicos observados eram devido a presença desse genótipo, uma vez que outros estudos já relatam sinais clínicos de giardiase, porém, sem a caracterização molecular do genótipo em questão (Olson et al, 1997).

Observando esses os dados do presente estudo e os apresentados em outras regiões do mundo, pode-se concluir que, em sua maior parte, ovinos podem não ser fonte importantes de infecções zoonóticas por *Giardia duodenalis*, entretanto estudos de genética molecular para caracterização dos genótipos infectando esses animais devem ser conduzidos em outras regiões, para se conhecer qual a real importância dos ovinos na epidemiologia da giardiase em humanos.

#### **6.19.2. Espécies/ genótipos de *Cryptosporidium* spp.**

Resultados obtidos demonstraram 19 amostras apresentaram perfil de restrição idêntico ao de *Cryptosporidium felis*. Entretanto, um novo genótipo, *Cryptosporidium* genótipo *cervine*, possui os mesmos sítios de restrição de *C. felis*, de acordo com os trabalhos publicados por Trotz-Williams e colaboradores (2006), que também utilizaram o protocolo de Xiao et al. (2001) semelhante a este estudo. Dessa forma, a presença de *Cryptosporidium* genótipo *cervine* não pode ser descartada nos animais do presente experimento. As outras seis amostras apresentaram o seguinte padrão de restrição: 2 amostras compatíveis com *C. parvum* (genótipo bovino), 2 compatíveis com *C. bovis* e duas nas quais as bandas no gel de agarose apresentaram-se muito fracas (provavelmente devido a baixa concentração de oocistos na amostra e conseqüentemente pouca quantidade de DNA de *Cryptosporidium*) e não pode haver a diferenciação entre *Cryptosporidium parvum*, *C. bovis* e *C.* genótipo *deer-like*.

*Cryptosporidium bovis* foi primeiramente identificadas em bovinos nos EUA, e pouco se conhece sobre sua prevalência e distribuição em rebanhos ovinos na maior parte do globo e conseqüentemente no Brasil. Ryan et al. (2005) identificaram *C. bovis* (eles descreveram ainda como *Cryptosporidium* genótipo bovino B, nomenclatura essa já substituída) em 14 amostras nos EUA; enquanto que um isolado com seqüências muito semelhantes ao de *C. bovis*, chamado de *C. bovis-like*, foi descrito por Santin et al. (2007)



em 7 ovinos. Interessante que Ryan et al. (2005) não observaram isolados de *Cryptosporidium parvum* (genótipo bovino) em 60 amostras de cordeiros seqüenciadas na Austrália. De forma semelhante, Santin et al. (2007) detectaram a presença de apenas 2 isolados de *C. parvum* (genótipo bovino) das 57 amostras seqüenciadas nos EUA.

A primeira descrição de *Cryptosporidium* genótipo *cervine* foi em cervos e primatas na América do Norte (Perz & Le Blancq, 2001; da Silva et al., 2003). Recentemente esse genótipo vem sendo apontado como parasita de humanos (Soba et al., 2006) e ovinos (Ryan et al., 2005; Santin et al., 2007). Fato interessante é que *C. genótipo cervine* foi detectado em 48 das 57 amostras seqüenciadas por Santin e colaboradores (2007), o que leva a uma prevalência de 84% entre os genótipos isolados. Por exemplo, *C. genótipo cervine* foi também o mais prevalente 68% (33/57 amostras) nos estudos conduzidos por Ryan et al. (2005) na Austrália.

Se consideramos que as 19 amostras que não puderam ser diferenciadas forem *C. cervine* genótipo, a prevalência das infecções por esse genótipo nos ovinos desse estudo, cerca de 76% (19/25), estariam próximas as descritas em outros trabalhos. Dos 27 animais positivos, *C. genótipo cervine* estaria presente em 16 cordeiros (0-2 meses), três “cordeiros traçadores” (4-6 meses) e três ovelhas.

Por outro lado, *Cryptosporidium felis* é a mais prevalente espécie de *Cryptosporidium* encontrada em gatos (Monis & Thompson, 2003; Olson et al, 2004; Santin et al., 2006). *C. felis* nunca foi descrito em ovinos anteriormente, embora exista uma descrição em bovinos (Bornay-Llinares et al., 1999). Porém Mtambo et al. (1996) em estudos de infecção cruzada, infectou experimentalmente por via oral 2 cordeiros, em idade neonatal, com oocistos purificados de *Cryptosporidium* spp. isolados de um gato originado de uma fazenda. Esse animal apresentava oocistos nas fezes de dois tamanhos diferentes (de 6 a 5 µm e 5 a 4.5µm). Os ovinos apresentaram nas fezes, no terceiro e décimo dia pós-infecção, oocistos que eram similares em tamanho aos apresentados no gato. Uma suspensão de oocistos dos cordeiros foi inoculada em 20 camudongos, dos quais 19 se tornaram infectados. Uma suspensão de oocistos dos gatos foi inoculada em 10 camudongos, dos quais nenhum se tornou infectado. Embora nesse estudo não foi realizada a caracterização molecular dos oocistos, teoricamente *C. felis* seria infectante para cordeiros.

Dessa forma, nem a presença de *Cryptosporidium* genótipo *cervine* e nem a de *Cryptosporidium felis* podem ser descartadas nos animais do presente experimento. Infelizmente, não foi possível de realizar o sequenciamento dessas amostras.

A maior parte dos isolados de *Cryptosporidium* cervine genótipo foram identificados pela PCR-RFLP e sequenciamento do gene 18S rRNA. Trotz-Williams et al. (2005) com base em seus resultados, sugere que para alguns estudos utilizando protocolos de PCR baseados em outros marcadores genéticos, como o locus COWP, a ausência de *Cryptosporidium* genótipo cervine pode ser explicada pela inabilidade desses protocolos em detectar esse genótipo.

Os dados obtidos nesse estudo e os demais apresentados, conduzem primeiramente ao raciocínio de que a maior parte das pesquisas anteriores em que *Cryptosporidium parvum* foi descrito parasitando ovinos, estavam baseados apenas na microscopia óptica, sem a caracterização molecular. Dessa forma, não é possível saber qual espécie/genótipo em questão nesses estudos.

Detalhadamente, os estudos de Ryan et al. (2005) observam que as sequências nucleotídicas obtidas de 60 amostras *Cryptosporidium*-positivas identificaram oito distintos espécies/genótipos de *Cryptosporidium* spp. no locus 18SrRNA: *C. hominis* (uma amostra), *C. andersoni* (uma amostra), *C. cervine* genótipo (33 amostras), *C. bovino* genótipo B (14 amostras), *C. marsupial* genótipo (4 amostras), *C. pig* genótipo II (duas amostras), *C. suis* (duas amostras), e um novo genótipo não identificado (uma amostra).

## **6.20. Potencial zoonótico de *Cryptosporidium* spp. em ovinos**

Ovinos já foram considerados reservatórios de *Cryptosporidium* spp. para humanos. Durante a investigação de um surto de criptosporidiose em humanos, foram coletadas amostras fecais de ovelhas que pastavam nas proximidades do local da fonte de água a qual acreditava-se ser a origem das infecções. Observou-se que 70% das amostras fecais desses ovinos estavam parasitados com *Cryptosporidium* spp. (Chalmers et al, 2002).

*Cryptosporidium* cervine genótipo possui uma larga escala de hospedeiros distribuído em uma ampla área geográfica, tendo sido descrito em ovinos na Austrália e Estados Unidos, em primatas e cervos na América do Norte e na República Checa; e em humanos no Canadá, Nova Zelândia, Reino Unido, Slovenia e Estados Unidos (Perz and Le Blancq, 2001, Ong et al., 2002, da Silva et al., 2003, Ryan et al., 2005; Santin et al., 2007; Soba et al., 2006). Dessa forma, esse genótipo pode emergir como um importante patógeno zoonótico.

Ryan et al. (2005) e Santin et al. (2007) encontraram *Cryptosporidium* genótipo cervine em altas taxas parasitando naturalmente cordeiros e ovelhas. Fato curioso é que Ryan e colaboradores, mesmo tendo encontrado prevalência de 68% de animais infectados com *C.* genótipo cervine, publicaram o seu estudo com o título: “Ovino pode não ser um importante reservatório zoonótico para *Giardia* e *Cryptosporidium*” (traduzido pelo autor). É provável que em 2005, ano da publicação do trabalho, poucos ou nenhum outro estudo tenha detectado taxas de prevalência tão altas em ovinos com um genótipo capaz de infectar seres humanos.

Green et al. (2004) encontraram uma prevalência de 70% de *Cryptosporidium* spp. em ovinos no Estado de São Paulo. Embora não fosse feita a caracterização molecular para identificação da espécie/genótipo, esse dado corrobora com o do presente estudo, demonstrando a alta ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em ovinos. Cordeiros naturalmente infectados podem excretar oocistos de forma intermitente por meses (Buret et al., 1990; Green et al., 2004).

O achado de *Cryptosporidium* spp. que podem ter capacidade zoonótica em ovinos naturalmente infectados é de grande importância epidemiológica, uma vez que esses animais podem atuar com fonte da infecção para humanos. Existe a necessidade urgente de novos estudos de prevalência e caracterização genética desses parasitas no Estado de São Paulo, bem como em outras regiões do país, com o objetivo de verificar se em outras propriedades, as taxas de infecções por *Cryptosporidium* spp. também são altas, e para que sejam traçadas metas para evitar a possível infecção de humanos com oocistos originados de animais.

#### **6.21. Considerações sobre os dados obtidos da propriedade de Tupi Paulista**

A caracterização molecular por PCR-RFLP, demonstrou que todos os animais positivos estavam parasitados por *Giardia duodenalis* genótipo E (animal específico). Esse estudo foi um dos primeiros (se não o primeiro, para o nosso conhecimento) que caracterizou geneticamente os isolados de *Giardia duodenalis* encontrados em ovinos no Brasil.

Para qualquer uma das duas espécies *Cryptosporidium* encontrada no atual experimento (*C. parvum*, *C. bovis*), para o nosso conhecimento, esse estudo é o primeiro a promover a caracterização molecular desses parasitas em ovinos no Estado de São Paulo.

Mesmo não havendo a diferenciação genotípica entre *Cryptosporidium felis* e *Cryptosporidium* cervine genótipo nesse estudo, essa é a primeira descrição de *C. felis* e/ou *C.* genótipo cervine em ovinos no Brasil, e a primeira descrição de espécies e/ou genótipos zoonóticos de *Cryptosporidium* nesse animais, comprovada através da caracterização genética.

Não foi possível obter a comparação molecular de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. entre ovinos e bovinos, uma vez que os últimos não estavam parasitados por esses dois protozoários intestinais, embora estivessem parasitados por outros protozoários intestinais e helmintos.

#### **6.22. Resultados inéditos desse experimento no Brasil**

- Caracterização molecular de *Cryptosporidium andersoni* em bovinos
- Relato de *Cryptosporidium bovis* em bovinos
- Caracterização molecular de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em ovinos
- Relato de *Giardia duodenalis* “genótipo E” em ovinos
- Relato de *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium bovis* em ovinos
- Relato de *Cryptosporidium* genótipo cervine em ovinos

## 7. CONCLUSÕES

- A ocorrência *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em 10 propriedades de bovinos leiteiros na região de Botucatu e Itatinga foi respectivamente: 8% (16/200) e 14% (28/200).
- O diagnóstico de *Giardia duodenalis* pelas técnicas de microscopia óptica, ELISA e PCR foi obtido em 3% (6/200), 3% (6/200) e 8% (16/200) dos bovinos testados, respectivamente.
- O diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. pelas técnicas de microscopia óptica, ELISA e PCR foi obtido em 8,5% (17/200), 0,5% (1/200) e 14% (28/200) dos bovinos testados, respectivamente.
- O método de ELISA de captura de antígeno fecal deve ser usado criteriosamente (ou não deve ser usado) para o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de ruminantes.
- A presença de cistos de *Giardia duodenalis* e oocistos de *Cryptosporidium* spp. na amostra fecal não está diretamente ligada a ocorrência de diarreia no hospedeiro.
- Os genótipos encontrados de *Giardia duodenalis* em bovinos foram: genótipo “E” (87,5%), “A1” (6,25%) e “B” (6,25%).
- A espécie *Cryptosporidium andersoni* é a mais prevalente no rebanho bovino da região do estudo.
- A ocorrência *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em ovinos (100 animais) na propriedade de Tupi Paulista foi respectivamente: 34% e 25%.
- O genótipo “E” de *Giardia duodenalis* (hospedeiro-específico) prevaleceu em 100% dos ovinos infectados.

- Ovinos são infectados naturalmente por espécies/genótipos de *Cryptosporidium* e podem atuar como reservatórios da infecção para humanos.
- A técnica de amplificação de DNA por PCR apresentou resultados superiores no diagnóstico de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. nas amostras fecais dos animais do experimento quando comparada às técnicas de microscopia óptica e ELISA de captura de antígeno fecal.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, N.; KIMATA, I.; ISEKI, M. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* isolates from dogs in Japan by direct sequencing of the PCR amplified glutamate dehydrogenase gene. **Vet. Med. Sci.**, v.65, n.1, p.29-33, 2003.

ADAM, R. D.. Biology of *Giardia lamblia*. **Clinical Microbiology Reviews.**, v. 14, n.3, p. 447-475, 2001.

Ali, S.A.; Hill, D.R. *Giardia intestinalis*. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v.16, n.5, p.453-60, 2003.

ALOISIO, F.; FILIPPINI, G.; ANTENUCCI, P.; LEPRI, E.; PEZZOTTI, G.; CACCIO, S.M. Severe weight loss in lambs infected with *Giardia duodenalis* assemblage B. **Veterinary Parasitology.**, v.142, n.1-2, p.154-158, 2006.

ALVES, M.; XIAO, L.; SULAIMAN, I.; LAL, A. A.; MATOS, O.; ANTUNES, F. Subgenotype Analysis of *Cryptosporidium* Isolates from Humans, Cattle, and Zoo Ruminants in Portugal. **Journal of Clinical Microbiology.**, v.41, n.6, p.2744-2747, 2003.

AMAR, C.F.; DEAR, P.H.; MCLAUCHLIN, J. Detection and genotyping by real-time PCR/RFLP analyses of *Giardia duodenalis* from human faeces. **J. Med. Microbiol.**, v.52, p. 681-683, 2003.

APPELBEE, A.J.; FREDERICK, L.M.; HEITMAN, T.L.; OLSON, M.E. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. **Vet. Parasitol.**, v.112, n.4, p.289-94, 2003.

AZIZ H, BECK CE, LUX MF, HUDSON MJ. A comparison study of different methods used in the detection of *Giardia lamblia*. **Clin. Lab. Sci.**, v.14, n.3, p.150-154, 2001.

BARWICK, R.S.; MOHAMMED, H.O.; WHITE, M.E.; BRYANT, R.B. Prevalence of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. on dairy farms in southeastern New York State. **Prev Vet Med.**, v.59, n.1-2, p.1-11, 2003.

BECHER, K. A.; ROBERTSON, I. D.; FRASER, D. M.; PALMER D. G.; THOMPSONM, R. C. A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dairy calves originating from three sources in Western Australia. **Veterinary Parasitology.**, v.123, n.1-2, p.1-9, 2004.

BERRILLI, F.; DI CAVE, D.; DE LIBERATO, C.; FRANCO, A.; SCARAMOZZINO, P.; ORECCHIA, P. Genotype characterization of *Giardia duodenalis* isolates from domestic and farm animals by SSU-rRNA gene sequencing. **Vet. Parasitol.**, v.14, n.122-123, p.193-199, 2004.

BIALEK, R.; BINDER, N.; DIETZ, K.; JOACHIM, A.; KNOBLOCH, J.; ZELCK, U.E. Comparison of fluorescence, antigen and PCR assays to detect *Cryptosporidium parvum* in fecal specimens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.**, v.43, n.4, p.283-288, 2002.

BIONDI, G.F.; MUCCIOLO, R.G.; NUNES, C.M.; RICHTZENHAIN, L.J. Immunodiagnosis of swine cysticercosis by indirect ELISA employing a heterologous antigen from *Taenia crassiceps* metacestode. **Vet Parasitol.**, v.16, n.64, p.261-266, 1996.

BOONE, H.J.; WILKINS, T.D.; NASH, BRANDON, J.E.; MACIAS, E.A.; JERRIS, R.C.; LYERLY, D.M. TechLab and Alexon *Giardia* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits Detect Cyst Wall Protein 1. **Journal of Clinical Microbiology.**, v.37, n.3, p. 611-614, 1999.

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

BURET, A.; DENHOLLANDER, N.; WALLIS, P.M.; BEFUS, D.; OLSON, ME. Zoonotic potential of giardiasis in domestic ruminants. **J. Infect. Dis.**, v.162, n.1, p.231-237, 1990.

CHALMERS, R.M.; ELWIN, K.; REILLY, W.J.; IRVINE, H.; THOMAS, A.L.; HUNTER, P.R. *Cryptosporidium* in farmed animals: the detection of a novel isolate in sheep. **Int. J. Parasitol.**, v.32, p. 21-26. 2002.

CASTRO-HERMIDA, J.A.; ALMEIDA, A.; GONZALEZ-WARLETA, M.; DA COSTA, J.M.; MEZO, M. Prevalence and preliminary genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from asymptomatic heifers in Galicia (NW, Spain). **J. Eukaryot. Microbiol.**, v.53, n.1, p.22-23, 2006.

CAUSAPE, A.C.; QUILEZ, J.; SANCHEZ-ACEDO, C.; DEL CACHO, E.; LOPEZ-BERNAD, F. Prevalence and analysis of potential risk factors for *Cryptosporidium parvum* infection in lambs in Zaragoza (northeastern Spain). **Vet. Parasitol.**, v.104, p. 287-298, 2002.



CIRAK, V.Y.; BAUER, C. Comparison of conventional coproscopical methods and commercial coproantigen ELISA kits for the detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dogs and cats. **Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.**, v.117, n.9-10, p. 410-413, 2004.

DA SILVA, A. J.; CACCIO, S.; WILLIAMS, C.; WON, K.Y.; NACE, E.K.; WHITTIER, C.; PIENIAZEK, N.J.; EBERHARD, M.L.. Molecular and morphologic characterization of a *Cryptosporidium* genotype identified in lemurs. **Vet. Parasitol.**, v.111, p. 297-307, 2003.

EY, P.L.; MANSOURI, M.; KULDA, J.; NOHYNKOVA, E.; MONIS, P.T.; ANDREWS, R.H.; MAYRHOFER, G. Genetic analysis of *Giardia* from hoofed farm animals reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v.44, n.6, p.626-635, 1997.

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

FAYER, R.; SANTIN, M.; TROUT, J.M.; GREINER, E. Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1–2-year-old dairy cattle in the eastern United States. **Vet. Parasitol.**, v.135, n.2, p. 205-112, 2006.

FENG, Y.; ORTEGA, Y.; HE, G.; DAS, P.; XU, MEIQIAN.; ZHANG, X.; FAYER, R.; GATEI, W.; CAMA, V.; XIAO, L. Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. **Vet. Parasitol.** v.144, n.1-2, p. 1-9, 2007.

FERNANDES, L.H. **Pastejo alternado de ovinos e bovinos na profilaxia das helmintoses ovinas.** 2006. 80p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

GARCIA, L.S.; SHUM, A.C.; BRUCKNER, D.A. Evaluation of a new monoclonal antibody combination reagent for direct fluorescence detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens. **Journal of Clinical Microbiology.**, v.30, n.12, p.3255-3257, 1992.

GARCIA, L.S.; SHIMIZU, R.Y. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. **Journal of Clinical Microbiology.**, v. 35, n.6, p. 526-1529, 1997.

GATEI, W.; GREENSILL, J.; ASHFORD, R.W.; CUEVAS, L.E.; PARRY, C.M.; BEECHING, N.J.; HART, C.A. Molecular Analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients

with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, p. 1458-1462, 2003.

GEURDEN, T.; CLAEREBOUT, E.; VERCRUYSSSE, J.; BERKVENS, D. Estimation of diagnostic test characteristics and prevalence of *Giardia duodenalis* in dairy calves in Belgium using a Bayesian approach. **International Journal for Parasitology.**, v.34, n.10, p. 1121-1127, 2004.

GIANGASPERO, A.; PAOLETTI, B.; IORIO, R.; TRAVERSA D. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* from sheep in central Italy. **Parasitol. Res.**, v.96, n.1, p.32-37, 2005.

GIOFFRE, A.; MEICHTRI, L.; ZUMARRAGA, M.; RODRIGUEZ, R.; CATALDI, A. Evaluation of a QIAamp DNA stool purification kit for Shiga-toxigenic *Escherichia coli* detection in bovine fecal swabs by PCR. **Rev. Argent. Microbiol.**, v.36, n.1, p. 1-5, 2004.

GHOSH S, DEBNATH A, SIL A, DE S, CHATTOPADHYAY D.J, DAS P. PCR detection of *Giardia lamblia* in stool: targeting intergenic spacer region of multicopy rRNA gene. **Molecular and cellular probes.**, v.14, n.3 , p. 181-189, 2000.

GREEN, R.E.; AMARANTE, A.F.T.; MASCARINI, L.M. The seasonal distribution of *Cryptosporidium* oocysts in sheep raised in the state of Sao Paulo. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, V.13, n.3, p.125-127, 2004.

GUIMARÃES, A.M.; GUEDES, E.; CARVALHO, R.A. Ocorrência de *Giardia* spp. em bezerros leiteiros no Brasil. **Arq. Bras. Vet. Zootec.**, v.53, n.6, p. 4, 2001.

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

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. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.69, n.9, p.5178-85, 2003.

HANSON, K.L.; CARTWRIGHT, C.P. Use of an Enzyme Immunoassay Does Not Eliminate the Need To Analyze Multiple Stool Specimens for Sensitive Detection of *Giardia lamblia*. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, n.2, p.474-477, 2001.

HARMON, A.F.; ZARLENGA, D.S.; HILDRETH, M.B. Improved methods for isolating DNA from *Ostertagia ostertagi* eggs in cattle feces. **Veterinary Parasitology**, v.135, n.3-4, p. 297-302, 2006.

HOMAN, W.L.;VAN ENCKEVORT, F.H.; LIMPER, L.; VAN EYS, G.J.; SCHOONE, G.J.; KASPRZAK, W.; MAJEWSKA, A.C.; VAN KNAPEN, F. Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and recombinant DNA probes. **Parasitol Res.**, v.78, n.4, p.316-323, 1992.

HOPKINS, R.M.; MELONI, B.P.; GROTH, D.M.; WETHERALL, J.D.; REYNOLDSON, J.A.; THOMPSON, R.C. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. **J. Parasitol.**, v.83, n.1, p.44-51, 1997.

HUBER, F.; BONFIM, T.C.; GOMES, R.S. Comparação da eficiência da técnica de sedimentação pelo formaldeído-eter e da técnica de centrifugo-flutuação modificada na detecção de cistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* sp em amostras fecais de bezerros. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.2, n.3, p. 135-137, 2003.

HUBER, F.; BOMFIM, T.C.B.; GOMES, R.S.; SILVA, S.; BELLO, A.R. Infecção natural por *Cryptosporidium parvum* em bezerros com menos de três meses de idade, no Estado do Rio de Janeiro. In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA & II CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 2006, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto:São Paulo, 2006.p.324.

HUETINK, R.E.; VAN DER GIESSEN, J.W.; NOORDHUIZEN, J.P.; PLOEGER, H. W. Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. **Vet. Parasitol.**, v.102, n.1-2, p.53-67, 2001.

HUNT, C.L.; IONAS, G.; BROWN, T.J. Prevalence and strain differentiation of *Giardia intestinalis* in calves in the Manawatu and Waikato regions of North Island, New Zealand. **Veterinary Parasitology**, v.91, n.1-2, p. 7-13, 2000.

HUNTER, P.R.; THOMPSON, R. C. A. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. **International Journal for Parasitology**, v.35, n.11-12, p.1181-1190, 2005.

INGLIS, G.D.; KALISCHUK, L.D. Use of PCR for direct detection of *Campylobacter* species in Bovine Feces. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.69, n.6, p.3435-3437, 2003.

ITAGAKI, T.; KINOSHITA, S.; AOKI, M.; ITOH, N.; SAEKI, H.; SATO, N.; UETSUKI, J.; IZUMIYAMA, S.; YAGITA, K.; ENDO, T. Genotyping of *Giardia intestinalis* from domestic and wild animals in Japan using glutamate dehydrogenase gene sequencing. **Veterinary Parasitology**, v.133, n.4, p. 283-287, 2005.

JOHNSON, D.J.; MARTIN, L.R.; ROBERTS, K.A. STR-typing of human DNA from human fecal matter using the QIAGEN QIAamp stool mini kit. **J. Forensic. Sci.**, v.50, n.4, p.802-808, 2005.

KARANIS, P.; EY, P.L. Characterization of axenic isolates of *Giardia intestinalis* established from humans and animals in Germany. **Parasitol. Res.**, v.84, n.6, p.442-449, 1998.

KVAC, M.; VITOVEC, J. Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattl. **J. Vet. Med.**, v. 50, p. 451–457, 2003.

LANGKJAER, R.B.; VIGRE, H.; ENEMARK, H.L.; MADDOX-HYTTEL, C. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. **Parasitology**, v.134, n. 3, p. 339-350, 2007.

LI, M.; GONG, J.; COTTRILL, M.; YU, H.; DE LANGE, C.; BURTON, J.; TOPP E. Evaluation of QIAamp® DNA Stool Mini Kit for ecological studies of gut microbiota. **journal of Microbiological Methods**, v.54, n.1, p.13-20, 2003.

LINDERGARD, G.; NYDAM, D.V.; WADE, S.E.; SCHAAF, S.L.; MOHAMMED. H. O. The sensitivity of PCR detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal samples using two DNA extraction methods. **Mol. Diagn.**, v.7, n.3-4, p.147-53, 2003.

LINDSAY, D.S.; UPTON, S.J.; OWENS, D.S.; MORGAN. U.M.; MEAD. J.R.; BLAGBURN. B.L. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v.47, n.1, p.91-95, 2000.

LLOYD, D.; RALPHS, J.R.; HARRIS, J.C. Hydrogen production in *Giardia intestinalis*, a eukaryote with no hydrogenosomes. **Trends in Parasitology**, v.18, n.4, p.155-156, 2002.

MCALLISTER, T.A.; OLSON, M.E.; FLETCH, A.; WETZSTEIN, M.; ENTZ, T. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in beef cows in southern Ontario and in beef calves in southern British Columbia. **Can. Vet. J.**, v.46, n.1, p. 47–55, 2005.

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

MACGLADE, T.R.; ROBERTSON, I.D.; ELLIOT, A.D.; THOMPSON, R.C.A. High prevalence of *Giardia* detected in cats by PCR. **Veterinary parasitology.**, v.110, n.3-4, p.197-205, 2003.

MAJEWSKA, A.C.; WERNER, A.; SULIMA, P.; LUTY, T. Prevalence of *Cryptosporidium* in sheep and goats bred on five farms in west-central region of Poland. **Vet. Parasitol.**, v.89, p.269-275, 2000.

MALLON, M.E.; MACLEOD, A.; WASTLING, J.M.; SMITH, H.; TAIT, A. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium parvum* Type 2: population genetics and sub-structuring. **Infect. Genet. Evol.**, v.3, p.207-218, 2003.

MANK TG, ZAAT JO, DEELDER AM, VAN EIJK JT, POLDERMAN AM. Sensitivity of microscopy versus enzyme immunoassay in the laboratory diagnosis of giardiasis. **European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.**, v.16, n.8, p. 615-619, 1997.

MARTELLINI, A.; PAYMENT, P.; VILLEMUR, R. Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate human, bovine, porcine and ovine sources in fecally contaminated surface water. **Water Research.**, v.39, n.4, p.541-548, 2005.

MENDONÇA, C.; ALMEIDA, A.; CASTRO, A.; DE LURDES DELGADO, M.; SOARES, S.; DA COSTA, J.M.; CANADA N. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal. **Vet. Parasitol.**, 2007 [Article in Press], disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>> Acesso em: 01 abr. 2007.

MARTINEZ, I.; BELDA NETO, F.M. Contribution to the laboratory diagnosis of human cryptosporidiosis. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.**, v.43, n. 2, p.79-82, 2001.

MEIRELES, M.V.; SOARES, R.M.; BONELLO, F.; GENNARI, S.M. Natural infection with zoonotic subtype of *Cryptosporidium parvum* in Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from Brazil. **Vet. Parasitol.**, (2007) [Article in Press], disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>> Acesso em: 01 abr. 2007.

MTAMBO, M.M.; WRIGHT, E.; NASH, A.S.; BLEWETT, D.A. Infectivity of a *Cryptosporidium* species isolated from a domestic cat (*Felis domestica*) in lambs and mice. **Res Vet Sci.**, v.60, n.1, p.61-64, 1996.

MCORIST, A.L.; JACKSON, M.; BIRD, A.R. A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. **J. Microbiol. Methods.**, v.50, p. 131–139, 2002.

MOHAMMED, O. H.; WADE, S.E.; SCHAAF, S. Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection in dairy cattle in southeastern New York State. **Veterinary Parasitology.**, v.83, n. 1, p.1-13, 1999.

MONIS, P.T.; ANDREWS, R.H.; MAYRHOFER, G.; MACKRILL, J.; KULDA, J.; ISAAC-RENTON, J.L.; EY, P.L. Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. **Parasitology.**, v.116, n.1, p.7-19, 1998.

MONIS, P.T.; ANDREWS, R.H.; MAYRHOFER, G.; EY, P.L. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. **Infection, Genetics and Evolution.**, v.3, n.1, p.29-38, 2003.

MONIS, P.T.; THOMPSON, R.C. A. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction?. **Infection, Genetics and Evolution.**, v.3, n. 4 , p. 233-244, 2003.

MONTEIRO, L.; BONNEMAISON, D.; VEKRIS, A.; PETRY, K.G.; BONNET, J.; VIDAL, R.; CABRITA, J.; MEGRAUD, F. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in faeces: *Helicobacter pylori* model. **J. Clin. Microbiol.**, v.35, p. 995-998, 1997.

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, n.4, p. 995-998, 1998.

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

O'HANDLEY, R.M.; COCKWILL, C.; MCALLISTER, T.A.; JELINSKI, M.; MORCK, D.W.; OLSON, M.E. Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.214, p. 391–396, 1999.

O'HANDLEY, R.M.; OLSON, M. E.; FRASER, D.; ADAMS, P.; THOMPSON, R.C. *Giardia* in dairy calves from Western Australia and Western Canada. **Veterinary Parasitology.**, v.90, n.3, p.193-200, 2000.

OLSON, M.E.; MCALLISTER, T.A.; DESELLIERS, L.; MORCK, D.W.; CHENG, K.J.; BURET, A.G.; CERI, H. Effects of giardiasis on production in a domestic ruminant (lamb) model. **Am. J. Vet. Res.**, v.56, p. 1470-1474, 1995.

OLSON, M.E.; THORLAKSON, C.L.; DESELLIERS, L.; MORCK, D.W.; MCALLISTER, T.A. *Giardia* and *Cryptosporidium* in Canadian farm animals. **Vet. Parasitol.**, v.68, p.375-381, 1997.

OLSON, M.E.; THORLAKSON, C.L.; DESELLIERS, L.; MORCK, D.W.; MCALLISTER, T.A. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. **Trends in Parasitology.**, v.20, n.4, p.185-191, 2004.

ONG, C.S.; EISLER, D.L.; ALIKHANI, A.; FUNG, V.W.; TOMBLIN, J.; BOWIE, W.R.; ISAAC-RENTON, J.L. Novel *Cryptosporidium* genotypes in Sporadic Cryptosporidiosis Cases: First Report of Human Infections with a Cervine Genotype. **Emerg. Infect. Dis.**, v.8, n.3, p.263-268, 2002.

PATEL, S.; PEDRAZA-DIAZ, S.; MCLAUCHLIN, J. The identification of *Cryptosporidium* species and *Cryptosporidium parvum* directly from whole faeces by analysis of a multiplex PCR of the 18S rRNA gene and by PCR/RFLP of the *Cryptosporidium* outer wall protein (COWP) gene. **Int. J. Parasitol.**, v.29, p.1241–1247, 1999.

PAZ E SILVA, F.M.; MARTINS, T.F.; LOPES, R.S.; AMARANTE, A.F.T.; ARAÚJO-JR, J.P. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy cattle. In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA & II CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSSES, X., 2006, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: São Paulo, 2006. p.314.

PAZ E SILVA, F.M.; MARTINS, T.F.; LOPES, R.S.; BRESCIANI, K.D.S.; AMARANTE, A.F.T.; ARAÚJO-JR, J.P. Use of ELISA and PCR for detection of *Cryptosporidium* in sheep and cattle raised on a farm in Brazil. In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA & II CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSSES, X., 2006, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: São Paulo. 2006. p.315.

PENG, M.M.; WILSON, M.L.; HOLLAND, R.E.; MESHNICK, S.R.; LAL, A.A.; XIAO, L. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in cattle in Michigan: implications for understanding the transmission dynamics. **Parasitology Research.**, v.90, n.3, p. 175-180, 2003.

PERZ, J.F.; LE BLANCQ, S.M. *Cryptosporidium parvum* Infection Involving Novel genotypes in Wildlife from Lower New York State. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.67, n.3, p.1154–1162, 2001.

PONCE-MACOTELA, M.; MARTINEZ-GORDILLO, M.N.; BERMUDEZ-CRUZ, R.M.; SALAZAR-SCHETTINO, P.M.; ORTEGA-PIERRES, G.; EY, P.L. Unusual prevalence of the *Giardia intestinalis* A-II subtype amongst isolates from humans and domestic animals in Mexico. **International Journal for Parasitology.**, v.32, n.9, p.1201-1202, 2002.

PLUTZER, J.; KARANIS, P. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from cattle in Hungary. **Vet. Parasitol.**, v.31, n.146, p.357-362, 2007.

QUILEZ, J.; SANCHEZ-ACEDO, C.; DEL CACHO, E.; CLAVEL, A.; CAUSAPE, A.C. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle in Aragon (northeastern Spain). **Vet. Parasitol.**, v.15, n.66(3-4), p.139-46, 1996.

RALSTON, B.J.; MCALLISTER, T.A.; OLSON, M.E. Prevalence and infection pattern of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in range beef calves and their dams, **Vet. Parasitol.**, v.114, p. 113–122, 2003.

READ, C.; WALTERS, J.; ROBERTSON, I.D.; THOMPSON, R.C. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. **International journal for parasitology.**, v.32, n.2, p.229-231, 2002.

READ, C.M.; MONIS, P.T.; THOMPSON, R.C. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. **Infection, Genetics and Evolution.**, v.4, n.2, p.125-130, 2004.

ROBINSON, G.; THOMAS, A.L.; DANIEL R.G.; HADFIELD, S.J.; ELWIN, K.; CHALMERS, R.M. Sample prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium andersoni* within a dairy herd in the United Kingdom. **Vet. Parasitol.**, v.30;n.142(1-2), p.163-167, 2006.

RUECKER, N.J.; BRAITHWAITE, S.L.; TOPP, E.; EDGE, T.; LAPEN, D.R.; WILKES, G.; ROBERTSON, W.; MEDEIROS, D.; SENSEN, C.W .; NEUMANN, N.F. Tracking Host Sources of *Cryptosporidium* spp. in Raw Water for Improved Health Risk Assessment. **Appl. Environ. Microbiol.**, 2007 [Article in Press], disponivel em: <<http://www.sciencedirect.com>> Acesso em: 01 abr. 2007.



RYAN, U.M.; BATH, C.; ROBERTSON, I.; READ, C.; ELLIOT, A.; MCINNES, L.; TRAUB, R.; BESIER, B. Sheep May Not Be an Important Zoonotic Reservoir for *Cryptosporidium* and *Giardia* Parasites. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.71, n.9, p, 4992-4497, 2005.

SANTIN, M.; TROUT, J.M.; XIAO, L.; ZHOU, L.; GREINER, E.; FAYER, R. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. **Vet. Parasitol.**, v.21, n.122(2), p.103-17, 2004.

SANTIN, M.; TROUT, J.M.; VECINO, J.A.; DUBEY, J.P.; FAYER, R. *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bieneusi* in cats from Bogotá (Colombia) and genotyping of isolates. **Veterinary Parasitology.**, v.141, n. 3-4, p. 334-339, 2006.

SANTIN, M.; TROUT, J.M.; FAYER, R. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species and genotypes in sheep in Maryland. **Vet. Parasitol.**, v.146, n.1-2, p. 17-24, 2007.

ŠLAPETA, J. *Cryptosporidium* species found in cattle: a proposal for a new species. **Trends in Parasitology.**, v. 22, n.10, p. 469-474, 2006.

SMITH, K.E.; STENZEL, S.A.; BENDER, J.B.; WAGSTROM, E.; SODERLUND, D.; LEANO, F.T.; TAYLOR, C.M.; BELLE-ISLE, P.A.; DANILA, R. Outbreaks of enteric infections caused by multiple pathogens associated with calves at a farm day camp. **Pediatr. Infect. Dis.**, v. 23, p. 1098–1104, 2004.

ŠOBA, B.; PETROVEC, M.; MIOČ, V.; LOGAR, J. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from humans in Slovenia. **Clinical Microbiology and Infection.**, v.12, n. 9, p. 918–921, 2006.

SOUZA, S.L.; FUNADA, M.R.; PENA, H.F.J.; YAI, L.E.O.; CORTEZ, A.; GENNARI, S.M.; SOARES, R.M. Identificação molecular de isolados de *Giardia* sp provenientes de amostras fecais de bugio (*alouatta fusca*), cachorro do mato (*cerdocyon thous*) e avestruz (*Struthio camelus*). In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA & II CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSSES, X., 2006, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: São Paulo. 2006. p.312.

SPANO, F.; PUTIGNANI, L.; GUIDA, S.; CRISANTI, A. *Cryptosporidium parvum*: PCR-RFLP Analysis of the TRAP-C1 (Thrombospondin-Related Adhesive Protein of *Cryptosporidium*-1) Gene

Discriminates between Two Alleles Differentially Associated with Parasite Isolates of Animal and Human Origin. **Experimental Parasitology.**, v.90, n.2, p. 195-198, 1998.

STRAUB, T.M.; DALY, D.S.; WUNSHEL, S.; ROCHELLE, P.A.; DELEON, R.; CHANDLER, D.P. Genotyping *Cryptosporidium parvum* with an hsp70 single-nucleotide polymorphism microarray. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.68, n.4, p.1817-1826, 2002.

SULAIMAN, I.M.; XIAO, L.; YANG, C.; ESCALANTE, L.; MOORE, A.; BEARD, C.B.; ARROWOOD, M.J.; LAL, A.A.. Differentiating human from animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. **Emerg. Infect. Dis.**, v.4, p.681-685, 1998.

SULAIMAN, I.M.; XIAO, L.; LAL, A.A. Evaluation of *Cryptosporidium parvum* genotyping techniques. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.65, n.10, p.4431-4445, 1999.

SULAIMAN, I.M.; MORGAN, U.M.; THOMPSON, R.C.; LAL, A.A.; XIAO, L. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.66, n.6, p.2385-2391, 2000.

SULAIMAN, I.M.; FAYER, R.; BERN, C.; GILMAN, R.H.; TROUT, J.M.; SCHANTZ, P.M.; DAS, P.; LAL, A.A.; XIAO, L. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. **Emerg. Infect. Dis.**, v.9, n.11, p.1444-1452, 2003.

SULAIMAN, I.M.; JIANG, J.; SINGH, A.; XIAO, L. Distribution of *Giardia duodenalis* genotypes and subgenotypes in raw urban wastewater in Milwaukee, Wisconsin. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.70, n.6, p.3776-3380, 2004.

THOMAZ, A. Caracterização genotípica de *Cryptosporidium* spp. Proveniente de amostras fecais de caninos, felinos e bovinos no Estado de São Paulo. Dados preliminares. In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA & II CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, X., 2006, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: São Paulo, 2006. p.306.

THOMPSON, H.P.; DOOLEY, J.S.; KENNY, J.; MCCOY, M.; LOWERY, C.J.; MOORE, J.E.; XIAO, L.. Genotypes and subtypes of *Cryptosporidium* spp. in neonatal calves in Northern Ireland. **Parasitol. Res.**, v.100, n.3, p.619-24, 2007.

THOMPSON, J.D. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids res.**, v.22, p. 4673-4680, 1994.

THOMPSON, R.C.A. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. **Int. J. Parasitol.**, v.30, p. 1259–1267, 2000.

THOMPSON, R.C.; HOPKINS, R.M.; HOMAN, W.L. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. **Parasitol. Today.**, v.16, n.5, p.210-213, 2000.

THOMPSON, R.C. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Vet. Parasitol.**, v.9, n.126(1-2), p.15-35, 2004.

TRAUB, R.J.; ROBERTSON, I.D.; IRWIN, P.; MENCKE, N.; MONIS, P.; THOMPSON, R.C. Humans, dogs and parasitic zoonoses--unravelling the relationships in a remote endemic community in northeast India using molecular tools. **Parasitol. Res.**, v.90, n.3, p.156-157, 1993.

TROTZ-WILLIAMS, L.A.; MARTIN, S.W.; MARTIN, D.; DUFFIELD, T.; LESLIE, K.E.; NYDAM, D.V.; JAMIESON, F.; PEREGRINE, A.S. Multiattribute evaluation of two simple tests for the detection of *Cryptosporidium parvum* in calf faeces. **Veterinary Parasitology.**, v.134, n.1-2, p.15-23, 2005.

TROTZ-WILLIAMS, L.A.; MARTIN, D.; GATEI, W.; CAMA, V.; PEREGRINE, A.S.; MARTIN, S.W.; NYDAM, D.V.; JAMIESON, F.; XIAO, L.. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. **Parasitol Res.**, v.99, n.4, p. 346-352, 2006.

TROUT, J.M.; SANTIN, M.; FAYER, R. Identification of assemblage A *Giardia* in white-tailed deer. **J. Parasitol.**, v.89, n.6, p.1254-1255, 2003.

TROUT, J.M.; SANTIN, M.; GREINER, E.; FAYER, R. Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in pre-weaned dairy calves. **Vet. Parsitol.**, v.124, p. 179–186, 2004.

TROUT, J.M.; SANTIN, M.; GREINER, E.; FAYER, R. Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* in post-weaned dairy calves. **Vet. Parsitol.**, v.130, p. 177–183, 2005.

TROUT, J.M.; SANTIN, M.; GREINER, E.C.; FAYER, R. Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* in 1-2 year old dairy cattle. **Vet Parasitol.**, v.140, n.3-4, p. 217-22, 2006.

TRAUB, R.J.; MONIS, P.T.; ROBERTSON, I.; IRWIN, P.; MENCKE, N.; THOMPSON, R.C. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. **Parasitology.**, v.128, n.3, p. 253-262, 2004.

VAN KEULEN, H.; MACECHKO, P.T.; WADE, S.; SCHAAF, S.; WALLIS, P.M.; ERLANDSEN, S.L. Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis. **Vet Parasitol.**, v.10, n.108-102, p.97-107, 2002.

VERWEIJ, J.J.; SCHINKEL, J.; LAEIJENDECKER, D.; VAN ROOYEN, M.A.; VAN LIESHOUT, L.; POLDERMAN, A.M. Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. **Molecular and Cellular Probes.**, v.17, n. 5, p. 223-225, 2003.

XIAO, L.; HERD, R.P.; RINGS, D.M. Diagnosis of *Cryptosporidium* on a sheep farm with neonatal diarrhea by immunofluorescence assays. **Vet. Parasitol.**, v.47, n.1-2, p.17-23, 1993.

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, n.4, p.1578-1583, 1999a.

XIAO, L.; MORGAN, U.M.; LIMOR, J.; ESCALANTE, A.; ARROWOOD, M.; SHULAW, W.; THOMPSON, R.C.; FAYER, R.; LAL, A.A. Genetic Diversity within *Cryptosporidium parvum* and Related *Cryptosporidium* Species. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.65, n.8, p.3386-3391, 1999b.

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. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.66, n.12, p.5492-5498, 2000.

XIAO, L.; SINGH, A.; LIMOR, J.; GRACZYK, T.K.; GRADUS, S.; LAL, A. Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.67, n.3, p.1097-1101, 2001.

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. **Int. J. Parasitol.**, v.32, p.1773-1785, 2002.

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S. J. *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.17, n.1, p. 72–97, 2004.

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S. J. Response to the newly proposed species *Cryptosporidium pestis*. **Trends in Parasitology.**, v.22, n. 10, p.469-474, 2006.

YAGITA, K.; IZUMIYAMA, S.; TACHIBANA, H.; MASUDA, G.; ISEKI, M.; FURUYA, K.; KAMEOKA, Y.; KUROKI, T.; ITAGAKI, T.; ENDO T. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human and bovine infections in Japan. **Parasitol. Res.**, v.87, p.950-955, 2001.

WU, Z.; NAGANO, I.; BOONMARS, T.; NAKADA, T.; TAKAHASHI, Y. Intraspecies polymorphism of *Cryptosporidium parvum* revealed by PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) and RFLP-single-strand conformational polymorphism analyses. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.69, n.8, p. 4720-4726, 2003.

## REVISTA BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA

### NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

Os trabalhos deverão ser apresentados em três cópias impressas em uma só face, com páginas numeradas, não excedendo a 15 para artigos completos e 5 para notas de pesquisa, digitados em fonte Times New Roman tamanho 12, margens superior e inferior com 2,5 cm, esquerda e direita com 3 cm e espaço entre linhas 1,5. As tabelas e as ilustrações deverão ser apresentadas em folhas separadas e anexadas ao final do trabalho. A versão final dos trabalhos, aceitos para publicação, deverá ser apresentada em disquete (3 ½ polegadas) ou em CD ROM identificados, em editor de texto compatível com o Word for Windows, sem formatação do texto, devidamente acompanhados de uma cópia impressa.

Os trabalhos podem ser redigidos em português, espanhol ou inglês, da forma mais concisa possível, com linguagem sempre que possível no passado e impessoal, com os sinais de chamadas de rodapé em números arábicos e lançados ao pé da página em que estiver o respectivo número e em ordem crescente.

Siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso.

As citações no texto devem ser efetuadas pelo sistema autor-data, conforme norma NBR 10520/2002 da ABNT.

Os artigos completos devem ser organizados obedecendo a seguinte seqüência: **Título, Autores, Abstract, Resumo, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões** (ou combinação destes três últimos), **Agradecimentos** (facultativo) e **Referências Bibliográficas**.

As notas de pesquisa obedecem a seqüência acima sem a necessidade de se destacar os tópicos, sendo escrito em texto corrido.

#### **Características dos elementos de um trabalho científico:**

**Título/autores:** Original e traduzido e logo abaixo do título deve constar o (s) nome(s) do (s) autor (res). No rodapé, vinculação dos autores, órgão financiador e endereço completo para correspondência, incluindo e-mail, telefone e fax.

**Abstract:** Deve ser sempre escrito em língua inglesa, em um único parágrafo sem deslocamento, e inserido logo após os autores, constituindo-se em tradução fiel do resumo, seguido por key-words.

**Resumo:** deve conter no máximo 200 palavras em um só parágrafo sem deslocamento, redigido na língua de origem do trabalho. Não deve conter citações bibliográficas; siglas e abreviações dos

nomes de instituições. Deve ser informativo, apresentando o objetivo do trabalho, metodologia sucinta, os resultados mais relevantes e a conclusão. Os trabalhos redigidos em língua inglesa deverão apresentar o resumo em língua portuguesa, seguido das palavras-chave.

**Palavras-chaves e Key-words:** as palavras-chave devem expressar com precisão o conteúdo do trabalho e seu uso limitado a cinco.

**Introdução:** Explanação clara e objetiva do problema, da qual devem constar a relevância e objetivos do trabalho, restringindo as citações ao necessário.

**Material e Métodos:** Descrição concisa, sem omitir o essencial para a compreensão e reprodução do trabalho. Métodos e técnicas já estabelecidos devem ser apenas citados e referenciados. Trabalhos submetidos à avaliação em Comitê de Ética deverão incluir um parágrafo nesta seção para notificação.

**Resultados:** Sempre que necessário devem ser acompanhados de tabelas, figuras ou outras ilustrações, auto-explicativas. O conteúdo deve ser informativo e não interpretativo.

**Discussão:** Deve ser limitada aos resultados obtidos no trabalho e o conteúdo deve ser interpretativo. Poderá ser apresentada como um elemento do texto ou juntamente com os resultados, formando o tópico Resultados e Discussão.

**Tabelas:** Elaboradas apenas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e ao final. A legenda (título) é precedida da palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismos arábicos, devendo ser descritivas, concisas e inseridas acima das mesmas. As tabelas devem estar limitadas a um número mínimo necessário, lembrando que tabelas muito grandes são difíceis de serem lidas. Devem ser digitadas em espaço duplo em arquivos separados. Todos os dados das tabelas devem ser digitados em minúsculo, exceto as siglas.

**Figuras:** as figuras são ilustrações tais como: desenho, fotografia, prancha, gráfico, fluxograma e esquema. Devem ser de boa qualidade e numeradas consecutivamente. As legendas devem ser precedidas da palavra Figura, seguida da numeração em algarismo arábico e inseridas abaixo das mesmas. Listar as legendas numeradas com os respectivos símbolos e convenções em folha separada em espaço duplo. O número de ilustrações deve ser restrito ao mínimo necessário. Fotografias digitais deverão ser enviadas em arquivos separados, tal qual foram obtidas, nos casos de foto em papel enviar o(s) original(ais). A revista não publica figuras em cores.

**Conclusões:** As conclusões podem estar inseridas na discussão ou em resultados e discussão, conforme a escolha dos autores. Neste caso, este item não será necessário.

**Agradecimentos:** Quando necessário, limitados ao indispensável.

**Referências bibliográficas:** A lista de referências deverá ser apresentada em ordem alfabética pelo sobrenome do primeiro autor, sem numeração, registrando-se o nome de todos os autores, usando as normas da ABNT (NBR 6023/2002) simplificada conforme exemplos:

**Livro:**

LEVINE, J. D. Veterinary Protozoology. Ames: ISU Press, 1985. 414 p.

**Artigo completo:**

BUGG, R. J.; ROBERTSON, I. D.; ELLIOT, A. D.; TOMPSON, R. C. A. Gastrointestinal parasites of urban dogs in Perth, Western Australia. Veterinary Journal, v. 157, n. 3, p. 295-301, 1999.

**Resumo:**

LIMA, N. D. Eimeriose dos ruminantes. In: II SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 20, 1980, Fortaleza. Anais ... Brasília: C B P V, 1980. p. 79-97.

**Tese, dissertação:**

ARAUJO, M. M. Aspectos ecológicos dos helmintos gastrintestinais de caprinos do município de Patos, Paraíba – Brasil. 2002. 40 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.

**Documento eletrônico:**

CDC. Epi Info, 2002. Disponível em: <http://www.cdc.gov/epiinfo/ei2002.htm>. Acesso em: 10 jan. 2003. JESUS, V. L. T.; PEREIRA, M. J. S.; ALVES, P. A. M. Susceptibilidade de raças bovinas a tricomose genital. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12, 2002, Rio de Janeiro. Anais...Rio de Janeiro: CBPV, 2002. 1 CD-ROM.

**Endereço para envio de trabalhos:**

Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária UFRRJ/ Instituto de Veterinária –  
DepartamentodeParasitologiaAnimal Br 465, Km 7 Seropédica – Rio de Janeiro  
CEP:23890000

e-mail:[revista-cbpv@ufrj.br](mailto:revista-cbpv@ufrj.br) Tel/fax: (21) 2682-1617



## REVISTA BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA

## NOTA DE PESQUISA

DETECÇÃO MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE *Giardia duodenalis*  
EM BOVINOS LEITEIROS NO ESTADO DE SÃO PAULOFLÁVIO M. PAZ E SILVA<sup>25</sup>; RAIMUNDO S. LOPES<sup>26</sup>; JOÃO P. ARAÚJO JR<sup>27</sup>

**ABSTRACT:-** PAZ E SILVA, F.M.; LOPES, R.S.; ARAÚJO-JR, J.P. [**Molecular detection and genotype characterization of *Giardia duodenalis* in dairy cattle in São Paulo State.**] Detecção molecular e caracterização genotípica de *Giardia duodenalis* em bovinos leiteiros no estado de São Paulo. Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu-SP, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, CEP 18618-000, Botucatu-SP, Brasil.  
E-mail: flaviopaz@hotmail.com

The intestinal protozoan parasite *Giardia duodenalis* has emerged as a widespread enteric pathogen in human and domestic animals. Currently molecular tools are being employed to genetically characterize *Giardia* isolates from different host species. This study was carried out to determine the occurrence and genotypes of *Giardia duodenalis* in dairy cattle in ten farms localized in Botucatu city, São Paulo State, Brazil. In the total, 200 fecal samples had been collected (100 from calves and 100 from adult animals). Diagnosis was determined by three techniques: Modified zinc sulphate flotation (MZSF), enzyme immunoassay (coproantigen-capture ELISA) and Polymerase Chain Reaction (PCR). *Giardia* isolates were characterized by restriction fragment length polymorphism assay (RFLP) with restriction enzyme *Nla* IV. *Giardia* was identified in 80% (8/10) of farm locations. Of the 200 specimens collected, 16 (8%) had *Giardia* DNA. Most infections were genotype E (14 fecal samples) which is not zoonotic; however, one calf was infected with zoonotic genotype AI and another with B. This study demonstrated that *Giardia* infection are present in dairy calves from farm sampled and the genotype E (not zoonotic and host-restricted to farm animals) is predominant in cattle in this region.

---

<sup>25</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, Unesp, Campus de Botucatu-SP, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, CEP 18618-000, Botucatu-SP, Brasil, Bolsista FAPESP. E-mail: flaviopaz@hotmail.com

<sup>26</sup>Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, Unesp, Campus de Botucatu-SP.

<sup>27</sup>Departamento de Microbiologia-Imunologia, Instituto de Biociências, IBB, Unesp, Botucatu-SP

**KEY WORDS:** *Giardia duodenalis*; Calves; Cow; PCR-RFLP, Genotype

## RESUMO

O protozoário intestinal *Giardia duodenalis* tem sido descrito com um dos principais enteropatógenos encontrado em humanos e animais. Atualmente, ferramentas moleculares têm sido desenvolvidas para caracterizar geneticamente os isolados desse parasita em diferentes espécies de hospedeiros. O objetivo desse estudo foi determinar a ocorrência de *Giardia duodenalis* e caracterizar geneticamente os isolados encontrados em bovinos leiteiros originados de 10 propriedades rurais da cidade de Botucatu, Estado de São Paulo. No total, foram coletadas 200 amostras fecais (100 de bezerros e 100 de animais adultos). O diagnóstico foi determinado por meio das técnicas de Centrífugo-flutuação modificada em sulfato de zinco (CFMSZ), Ensaio imunoenzimático (ELISA de captura de antígeno fecal) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A caracterização genética foi realizada com o emprego da técnica de polimorfismo no tamanho do fragmento de restrição (RFLP), utilizando a enzima de restrição *NlaIV*. *Giardia* foi detectada em 80% (8/10) das propriedades estudadas. O microorganismo esteve presente em 8% dos animais (16/200). Três genótipos de *Giardia duodenalis* foram identificados: genótipo E (14 amostras), o qual tem sido descrito infectante apenas para ruminantes; genótipo AI (1 amostra) e genótipo B (1 amostra) que são infectantes para humanos e outros mamíferos por isso considerados zoonóticos. Esse estudo demonstrou que a infecção por *Giardia duodenalis* está presente em bovinos leiteiros e que o genótipo E (não zoonótico) é o de maior predominância nos animais dessa região.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Giardia duodenalis*, bovinos, PCR-FLP, genótipos

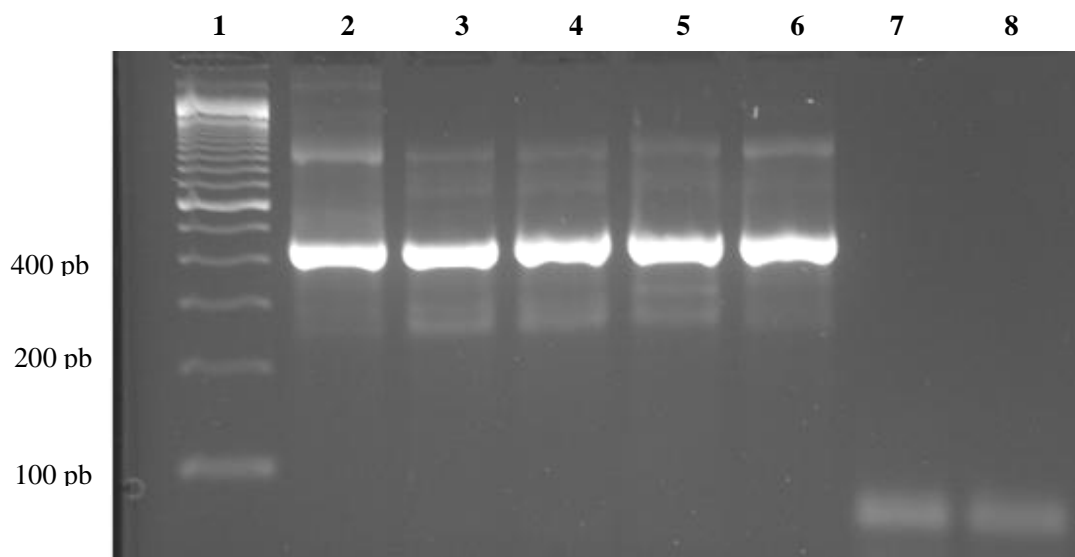
*Giardia duodenalis* é comprovadamente um patógeno para bovinos leiteiros e de carne (particularmente em bezerros) causando diarreia, prejuízos na conversão alimentar, redução no ganho de peso, redução na produção de leite e redução no peso das carcaças. Esse parasita foi descrito por vários pesquisadores como importante agente de diarreia neonatal em bezerros, sozinho ou associados a outros patógenos (Olson et al., 1995; Trout et al., 2004). *G. duodenalis* é capaz de parasitar o trato gastrointestinal de diversos mamíferos domésticos, silvestres e do homem, sendo um dos mais prevalentes e importantes parasitas intestinais nesses hospedeiros. O parasitismo por *G. duodenalis* vem chamando a atenção científica devido a seu potencial zoonótico e pela a capacidade de bovinos atuarem como fonte da infecção para humanos. Recentemente, o uso de técnicas moleculares demonstrou que *Giardia duodenalis* são espécies geneticamente complexas, composta de populações morfológicamente indistinguíveis, porém com grande diversidade genética (Monis;

Thompson, 2003). Os isolados de *Giardia duodenalis* obtidos de amostras fecais de ruminantes, apesar de morfologicamente semelhantes ao obtidos de varias outras espécies de mamíferos domésticos, incluindo o homem, podem pertencer a grupos genéticos hospedeiro-específicos (genótipo E) ou a grupos genéticos potencialmente zoonóticos (genótipo A e B) com possíveis implicações na saúde publica (Thompson et al., 2000).

Nesse contexto, objetivou-se determinar a ocorrência de *Giardia duodenalis* em 10 propriedades de bovinos leiteiros na região do município de Botucatu, Estado de São Paulo, caracterizando geneticamente esses protozoários através da técnica de PCR-RFLP.

Foram coletadas 200 amostras fecais de bovinos, sendo 100 de bezerros e 100 de animais adultos, provenientes de 10 propriedades rurais do municipio de Botucatu. No laboratório, o diagnóstico foi determinado por meio das técnicas de Centrífugo-flutuação modificada em sulfato de zinco (Hubber et al., 2003), Ensaio imunoenzimático (Kit GIARDIA II – Techlab, Blacksburg, EUA) e Reação em Cadeia da Polimerase (Read et al., 2004). A caracterização genética foi realizada com o emprego da técnica de polimorfismo no tamanho do fragmento de restrição (RFLP), utilizando a enzima de restrição *NlaIV* (Read et al., 2004). A análise estatística foi realizada com o teste exato de Fischer, com nível de significancia de 5%.

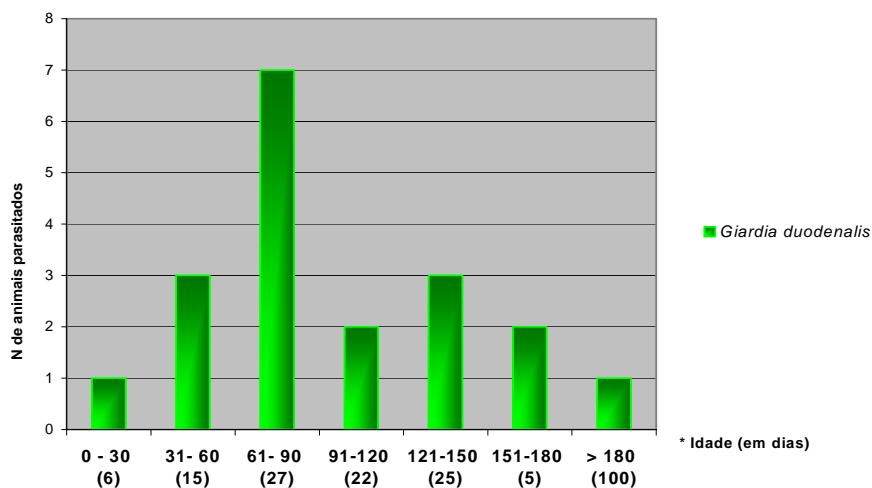
A ocorrência de *Giardia duodenalis* foi de 8% (16/200). O microorganismo esteve presente em 80% das propriedades (8/10). Das 200 amostras fecais analisadas, seis (3%) foram positivas na microscopia óptica e ELISA e 16 (8%) na PCR (figura 1).



**Figura 1.** Análise de PCR baseado na amplificação do gene GDH para *Giardia duodenalis*. Gel de agarose 1.5% corado com brometo de etídio. Amostras de bovinos. Linha 1: Marcador de peso molecular de 100 pares de base. Linhas 2, 3, 4, 4, 5: Amostras positivas de *Giardia duodenalis* isoladas de bovinos. Linha 6:

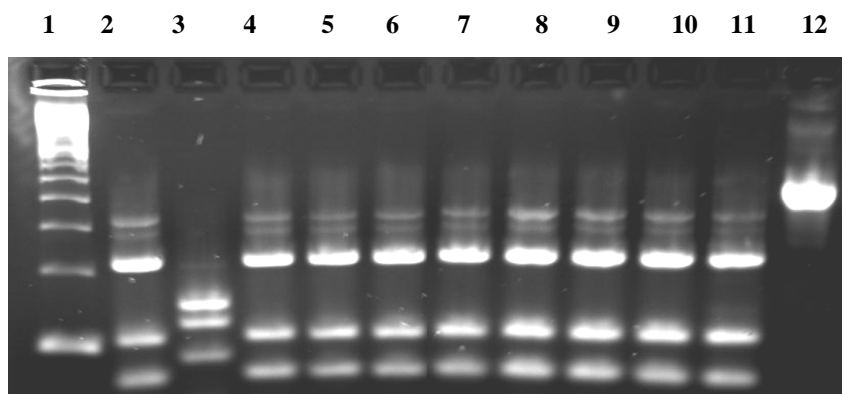
Controle positivo. Linha 7: Controle negativo da reação de PCR. Linha 8: Controle negativo da reação de Semi-Nested PCR.

O diagnóstico das infecções em bezerros (15/16) foi significativamente maior do que em animais adultos (1/16), conforme figura 2.



**Figura 2.** Ocorrência de *Giardia duodenalis* de acordo com a faixa etária dos animais (O número entre parênteses no eixo X das categorias indica a quantidade de animais em cada categoria)

Três genótipos de *Giardia duodenalis* foram identificados: genótipo E (14 amostras), o qual tem sido descrito infectante apenas para ruminantes; genótipo A (1 amostra) e genótipo B (1 amostra) que são infectantes para humanos e outros mamíferos por isso considerados zoonóticos (figura 3).



**Figura 3.** Análise de PCR-RFLP com a utilização da enzima *Nla* IV para amostras positivas de *Giardia duodenalis* amplificadas no gene GDH (Read et al., 2004). Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. Linha 1: Marcador de peso molecular de 100 pares de base; Linhas 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11: Amostras de

*Giardia duodenalis* genótipo E (70, 105 e 220 pares de base); Linha 3 : Amostra de *Giardia duodenalis* genótipo AI (90, 120 e 150 pares de base), Linha 12: DNA não submetido a clivagem com a enzima de restrição (430 pb).

Estudos Norte-Americanos, Australianos e Europeus demonstraram que esse parasita é altamente prevalente na bovinocultura leiteira e de carne, com taxas de infecção tão elevadas quanto 100% em alguns rebanhos, e relataram uma associação entre a infecção e a presença de diarreia e suas significativas perdas na produção (Olson et al., 1997; O'Handley et al., 2000; Huetink et al., 2001; Olson et al., 2004). A ocorrência de *Giardia* em bezerros foi de 7,5% (15/200), significativamente maior do que a presença em animais adultos 0,5 % (1/200). Esses dados estão de acordo com vários autores (Appelbbe et al., 2003; Hunt et al., 2000). No presente estudo, a porcentagem de bezerros parasitados por *Giardia duodenalis* apresentando diarreia (17,6%) foi muito próxima a dos animais parasitados que possuíam fezes de consistência normal (14,4%). A análise de RFLP revelou que 87,5% dos animais positivos apresentavam o genótipo E de *Giardia duodenalis* (não zoonótico e restrito a ruminantes). Entretanto um bezerro estava parasitado pelo genótipo AII (6,25 %) e outro pelo genótipo B (6,25%). De acordo com recentes estudos, a prevalência do genótipo A em bezerros varia consideravelmente em bovinos (O'Handley et al., 2000; Huetink et al., 2001; Alppelbe et al., 2003), podendo chegar até 20% dos animais infectados e o mesmo pode estar presente em até 50% das propriedades rurais estudadas (Trout et al., 2004).

Esse estudo contribuiu para a confirmação de que na região de Botucatu, Estado de São Paulo, as amostras de *G. duodenalis* isoladas de bovinos pertencem, em sua maior parte, ao genótipo animal-específico E, o mais comumente encontrado em ruminantes em outras partes do mundo. A presença do genótipo A e B em bovinos é de grande importância epidemiológica, uma vez que bezerros infectados com *Giardia* frequentemente excretam cerca de  $10^5$  a  $10^6$  cistos/g de fezes. Dessa forma, mesmo que apenas uma quantidade mínima de animais no rebanho esteja infectada com o genótipo A ou B, eles podem representar um significativo risco a saúde pública. Avaliações epidemiológicas em outras regiões do país são necessárias para a confirmação de que a presença do genótipo E (animal-específico) em bovinos ocorre de forma semelhante a observada no presente estudo.

### **Agradecimentos**

Agradecemos a FAPESP pelo apoio financeiro recebido. Processo n°05/52175-2

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

APPELBEE, A.J.;FREDERICK, L.M.; HEITMAN, T.L.; OLSON, M.E. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. **Vet. Parasitol.**, v.112, n.4, p.289-94, 2003.

HUBER, F.; BONFIM, T.C.; GOMES, R.S. Comparação da eficiência da técnica de sedimentação pelo formaldeído-eter e da técnica de centrifugo-flutuação modificada na detecção de cistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* sp em amostras fecais de bezerros. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.**, v.2, n.3, p. 135-137, 2003.

HUETINK, R.E.; VAN DER GIESSEN, J.W.; NOORDHUIZEN, J.P.; PLOEGER, H. W. Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. **Vet. Parasitol.**, v.102, n.1-2, p.53-67, 2001.

HUNT, C.L.; IONAS, G.; BROWN, T.J. Prevalence and strain differentiation of *Giardia intestinalis* in calves in the Manawatu and Waikato regions of North Island, New Zealand. **Veterinary Parasitology.**, v.91, n.1-2, p. 7-13, 2000.

MONIS, P.T.; THOMPSON, R.C. A. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction?. **Infection, Genetics and Evolution.**, v.3, n. 4 , p. 233-244, 2003.

OLSON, M.E.; MCALLISTER, T.A.; DESELLIERS, L.; MORCK, D.W.; CHENG, K.J.; BURET, A.G.;CERI, H. Effects of giardiasis on production in a domestic ruminant (lamb) model. **Am. J. Vet. Res.**, v.56, p. 1470-1474, 1995.

OLSON, M.E.; THORLAKSON, C.L.; DESELLIERS, L.;MORCK, D.W.; MCALLISTER, T.A. *Giardia* and *Cryptosporidium* in Canadian farm animals. **Vet. Parasitol.**, v.68, p.375-381, 1997.

OLSON, M.E.; THORLAKSON, C.L.; DESELLIERS, L.; MORCK, D.W.; MCALLISTER, T.A. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. **Trends in Parasitology.**, v.20, n.4, p.185-191, 2004.

O'HANDLEY, R.M.;OLSON, M. E.; FRASER, D.; ADAMS, P.; THOMPSON, R.C. *Giardia* in dairy calves from Western Australia and Western Canada. **Veterinary Parasitology.**, v.90, n.3, p.193-200, 2000.

READ, C.M.; MONIS, P.T.; THOMPSON, R.C. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. **Infection, Genetics and Evolution.**, v.4, n.2, p.125-130, 2004.

THOMPSON, R.C.; HOPKINS, R.M.; HOMAN, W.L. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. **Parasitol. Today.**, v.16, n.5, p.210-213, 2000.

TROUT, J.M.; SANTIN, M.; GREINER, E.; FAYER, R. Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in pre-weaned dairy calves. **Vet. Parsitol.**, v.124, p. 179–186, 2004.