

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

**BRUNA NICOLETI SANTANA**

**Validação de um protocolo de *nested* PCR em tempo real  
em um tubo e sequenciamento genético para detecção e  
caracterização de espécies e genótipos de  
*Cryptosporidium* em amostras fecais de aves**

ARAÇATUBA – SP  
2021

**BRUNA NICOLETI SANTANA**

**Validação de um protocolo de *nested* PCR em tempo real em um tubo e sequenciamento genético para detecção e caracterização de espécies e genótipos de *Cryptosporidium* em amostras fecais de aves**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Unesp, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles

ARAÇATUBA – SP  
2021

S232v

Santana, Bruna Nicoleti

Validação de um protocolo de nested PCR em tempo real em um tubo e sequenciamento genético para detecção e caracterização de espécies e genótipos de *Cryptosporidium* em amostras fecais de aves / Bruna Nicoleti Santana. -- Araçatuba, 2021

56 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),  
Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba

Orientador: Marcelo Vasconcelos Meireles

1. Biologia Molecular. 2. Criptosporidiose. 3. Protozoários. I.  
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de  
Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Validação de um protocolo de nested PCR em tempo real em um tubo e sequenciamento genético para detecção e caracterização de espécies e genótipos de *Cryptosporidium* em amostras fecais de aves

AUTORA: BRUNA NICOLETI SANTANA

ORIENTADOR: MARCELO VASCONCELOS MEIRELES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES (Participação Virtual)  
Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. DANIELA BERNADETE ROZZA (Participação Virtual)  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. GISELE FABRINO MACHADO (Participação Virtual)  
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. VALÉRIA DE SÁ JAYME (Participação Virtual)  
Departamento de Medicina Veterinária / Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás/UFG

Prof. Dr. WESLEN FABRÍCIO PIRES TEIXEIRA (Participação Virtual)  
Universidade Federal de Goiás / Goiânia/GO

Araçatuba, 27 de agosto de 2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Validação de um protocolo de nested PCR em tempo real em um tubo e sequenciamento genético para detecção e caracterização de espécies e genótipos de *Cryptosporidium* em amostras fecais de aves

AUTORA: BRUNA NICOLETI SANTANA

ORIENTADOR: MARCELO VASCONCELOS MEIRELES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES (Participação Virtual)  
Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. DANIELA BERNADETE ROZZA (Participação Virtual)  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. GISELE FABRINO MACHADO (Participação Virtual)  
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. VALÉRIA DE SÁ JAYME (Participação Virtual)  
Departamento de Medicina Veterinária / Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás/UFG

Prof. Dr. WESLEN FABRÍCIO PIRES TEIXEIRA (Participação Virtual)  
Universidade Federal de Goiás / Goiânia/GO

Araçatuba, 27 de agosto de 2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Validação de um protocolo de nested PCR em tempo real em um tubo e sequenciamento genético para detecção e caracterização de espécies e genótipos de *Cryptosporidium* em amostras fecais de aves


AUTORA: BRUNA NICOLETI SANTANA

ORIENTADOR: MARCELO VASCONCELOS MEIRELES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES (Participação Virtual)  
Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. DANIELA BERNADETE ROZZA (Participação Virtual)  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

  
Profa. Dra. GISELE FABRINO MACHADO (Participação Virtual)  
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. VALÉRIA DE SÁ JAYME (Participação Virtual)  
Departamento de Medicina Veterinária / Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás/UFG

Prof. Dr. WESLEN FABRÍCIO PIRES TEIXEIRA (Participação Virtual)  
Universidade Federal de Goiás / Goiânia/GO

Araçatuba, 27 de agosto de 2021.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**Título:** Validação de um protocolo de nested PCR em tempo real em um tubo e sequenciamento genético para detecção e caracterização de espécies e genótipos de *Cryptosporidium* em amostras fecais de aves

**AUTORA:** BRUNA NICOLETI SANTANA

**ORIENTADOR:** MARCELO VASCONCELOS MEIRELES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES (Participação Virtual)  
Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. DANIELA BERNADETE ROZZA (Participação Virtual)  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. GISELE FABRINO MACHADO (Participação Virtual)  
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP



Profa. Dra. VALÉRIA DE SÁ JAYME (Participação Virtual)  
Departamento de Medicina Veterinária / Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás/UFG

Prof. Dr. WESLEN FABRÍCIO PIRES TEIXEIRA (Participação Virtual)  
Universidade Federal de Goiás / Goiânia/GO

Araçatuba, 27 de agosto de 2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Validação de um protocolo de nested PCR em tempo real em um tubo e sequenciamento genético para detecção e caracterização de espécies e genótipos de *Cryptosporidium* em amostras fecais de aves

AUTORA: BRUNA NICOLETI SANTANA

ORIENTADOR: MARCELO VASCONCELOS MEIRELES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES (Participação Virtual)  
Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. DANIELA BERNADETE ROZZA (Participação Virtual)  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. GISELE FABRINO MACHADO (Participação Virtual)  
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. VALÉRIA DE SÁ JAYME (Participação Virtual)  
Departamento de Medicina Veterinária / Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás/UFG

  
Prof. Dr. WESLEN FABRÍCIO PIRES TEIXEIRA (Participação Virtual)  
Universidade Federal de Goiás / Goiânia/GO

Araçatuba, 27 de agosto de 2021.

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**Bruna Nicoleti Santana** – Natural de Araçatuba/SP, nascida em 2 de setembro de 1988, filha de Ondina Nicoleti e Antônio Carlos Santana. No ano de 2011 se graduou no Curso de Ciências Biológicas na Universidade Paulista (UNIP). Em agosto de 2015, iniciou o curso de mestrado no programa de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal, na Faculdade de Medicina Veterinária – FMVA/ Unesp, Campus de Araçatuba – SP, sob orientação do professor associado Marcelo Vasconcelos Meireles. Foi bolsista CAPES no período de outubro de 2016 a fevereiro de 2017. Em 18 de dezembro de 2017, concluiu o Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e recebeu o título de Mestre em Ciência Animal. Ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Curso de Doutorado, em 01 de agosto de 2018, na área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal, na Faculdade de Medicina Veterinária – FMVA/ Unesp, Campus de Araçatuba – SP, sob orientação do professor associado Marcelo Vasconcelos Meireles. Foi bolsista CAPES e FAPESP. Em 01 de julho de 2021, foi aprovada no Exame Geral de Qualificação ao apresentar o trabalho intitulado “PCR em tempo real e sequenciamento genético para detecção e caracterização de *Cryptosporidium* spp. em aves.”

## **DEDICATÓRIA**

**Aos meus pais, Antônio Carlos e Ondina Nicoleti, que nunca mediram esforços para que eu pudesse realizar todos os meus sonhos, e à minha esposa, Janaina, por estar sempre ao meu lado**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por tudo que sou e que venho me tornando.

Ao prof. Marcelo Vasconcelos Meireles, que além de me orientar pelos caminhos da ciência com paciência e dedicação, me ensinou valores sobre honestidade, responsabilidade e humildade.

Aos meus pais, Ondina e Antonio Carlos, que sempre colocaram os meus sonhos acima das próprias prioridades, me apoiando, incentivando e aconselhando.

Aos meus familiares, Rosana, Marcos e Giovana, que sempre demonstraram preocupação e disposição para me ajudar, me apoiando em cada decisão da minha vida.

À Janaina, que esteve comigo nas etapas mais difíceis e, com amor e paciência, sempre me apoiou, incentivou e auxiliou, direta e indiretamente.

Às professoras e doutoras Sandra e Mara Lucia, que sempre me apoiaram e se preocuparam com meu presente e futuro desde a Faculdade.

A todos aqueles a quem posso verdadeiramente chamar de amigos, dentro e fora do ambiente de trabalho, os quais estiveram comigo em todos os momentos dessa trajetória, fazendo o caminho mais leve.

A todos os colegas e colaboradores do laboratório que, mesmo em pequenos detalhes, fizeram grande diferença para o resultado deste trabalho.

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – FMVA /UNESP, pela estrutura e suporte.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro ao projeto realizado (2018/06681-3) e pela concessão da bolsa de doutorado (processo 2018/03791-2).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado no início do projeto.

## EPÍGRAFE

***“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também  
sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar”***

***Anatole France***

SANTANA, B.N. **Validação de um protocolo de *nested* PCR em tempo real em um tubo associada a sequenciamento genético para detecção e caracterização de espécies e genótipos de *Cryptosporidium* em amostras fecais de aves.** 2021. 52 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.

## RESUMO

Protozoários do gênero *Cryptosporidium* infectam o trato gastrointestinal e, ocasionalmente, os tratos respiratório, biliar e urinário, causando doença clínica e subclínica em aves. O diagnóstico espécie-específico da criptosporidiose é comumente realizado pela *nested* PCR convencional seguida de sequenciamento genético. O objetivo deste trabalho foi validar um protocolo de *nested* PCR em tempo real em um tubo (nPCR-TR-1T) seguida da análise da curva de dissociação e de sequenciamento genético para detectar e caracterizar as espécies e genótipos de *Cryptosporidium* em aves. A reação foi padronizada com utilização do SsoFast® EvaGreen Supermix (Bio-Rad) e do equipamento para PCR em tempo real CFX96 (Bio-Rad). Um total de 443 amostras de DNA genômico de aves foi analisado pela *nested* PCR convencional e pela nPCR-TR-1. Após a validação, a nPCR-TR-1T foi utilizada para determinar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em frangos de corte em 64 núcleos comerciais de frangos de corte (NCFC) na região oeste do estado de Santa Catarina. Pela *nested* PCR convencional, foi observada positividade para *Cryptosporidium* spp. em 36/443 (8,1%), em contraste com a nPCR-TR-1T, que apresentou 90/443 (20,3%) amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. O teste de sensibilidade analítica mostrou que a nPCR-TR-1T detecta aproximadamente 0,5 oocisto (2 esporozoítos) por reação. A avaliação da especificidade analítica não revelou amplificação de microrganismos que comumente apresentam amplificação inespecífica com *primers* utilizados para diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. O cálculo da repetibilidade evidenciou o mesmo resultado em 27 de 30 amostras (90%). Em relação à reprodutibilidade da nPCR-TR-1T, foi observado o mesmo resultado em 24 das 30 amostras examinadas (80%). Foi possível realizar o sequenciamento em todas as 90 amostras amplificadas pela nPCR-TR-1T. As seguintes espécies foram identificadas: *C. baileyi*, *C. galli*, *C. meleagridis*, *C. proventriculi* e *Cryptosporidium* genótipo I em

aves. O sequenciamento dos fragmentos amplificados pela *nested* PCR convencional foi possível em 10/36 (27,8%) das amostras positivas, com identificação das mesmas espécies identificadas pela nPCR-TR-1T. A ocorrência observada nos NCFC foi de 0,2% (1/64), com identificação de *C. baileyi* em uma amostra. Os resultados observados demonstram que a nPCR-TR-1T, em comparação com a *nested* PCR convencional, apresenta mais rapidez para obtenção dos resultados, menor possibilidade de contaminação com produtos amplificados e menor consumo de reagentes, pois ela é realizada em somente uma etapa e os resultados são obtidos em tempo real, sem necessidade de eletroforese em gel de agarose.

**Palavras-chave:** Biologia molecular. Criptosporidiose. Protozoários.

SANTANA, B.N. **Validation of a one-tube nested real-time PCR assay and genetic sequencing for detection and molecular characterization of *Cryptosporidium* species and genotypes in fecal samples from birds.** 2021. 52 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.

## ABSTRACT

Protozoa of the genus *Cryptosporidium* infect the gastrointestinal tract and occasionally the respiratory, biliary, and urinary tracts, causing clinical and subclinical disease in birds. Species-specific diagnosis of cryptosporidiosis is commonly performed by conventional *nested* PCR followed by genetic sequencing. The objective of this study was to validate a one-tube real-time *nested* PCR protocol followed by melting curve analysis and genetic sequencing to detect and characterize *Cryptosporidium* species and genotypes in birds. The reaction was standardized using the SsoFast® EvaGreen Supermix (Bio-Rad) and the CFX96 real-time PCR system (Bio-Rad). A total of 443 avian genomic DNA samples were analyzed by conventional *nested* PCR and one-tube *nested* real-time PCR. After validation one-tube real-time *nested* PCR was used to determine the prevalence of *Cryptosporidium* spp. in 64 commercial broiler flocks in the western region of the state of Santa Catarina. By conventional *nested* PCR, 36/443 (8.4%) samples were positive for *Cryptosporidium* spp. In contrast, one-tube *nested* real-time PCR showed 90/443 (20.3%) positive samples for *Cryptosporidium* spp. The analytical sensitivity test showed that one-tube *nested* real-time PCR detects approximately 0.5 oocyst (2 sporozoites) per reaction. Analytical specificity evaluation did not reveal amplification of microorganisms that commonly present nonspecific amplification with *primers* used for the diagnosis of *Cryptosporidium* spp. The repeatability calculation showed the same result in 27 out of 30 samples (90%). Regarding the reproducibility of nPCR-TR-1T, the same result was observed in 24 of the 30 samples examined (80%). It was possible to perform sequencing on all 89 samples amplified by one-tube real-time *nested* PCR. The following species were identified: *C. baileyi*, *C. galli*, *C. meleagridis*, *C. proventriculi*, and *Cryptosporidium* genotype I in birds. Genetic sequencing of conventional *nested* PCR amplicons was possible in 10/36 (27.8%) of positive samples, with identification

of the same species identified by one-tube real-time *nested* PCR. *Cryptosporidium* spp. prevalence in broiler flocks was 0.2% (1/64), with identification of *C. baileyi* in one sample. The results of this study demonstrated that one-tube *nested* real-time PCR, in comparison with conventional *nested* PCR, presents faster results, less possibility of contamination with amplicons, and lower consumption of reagents, since it is performed in only one step and the results are obtained in real time, without the need for agarose gel electrophoresis.

**Keywords:** Cryptosporidiosis. Molecular biology. Protozoa.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Teste de temperaturas de anelamento para a *nested* PCR em tempo real em um tubo, com utilização do fluoróforo EvaGreen, realizado em duplicata, nas temperaturas de 64°C (azul), 62°C (vermelho) e controle negativo (laranja). A melhor temperatura foi 62°C (vermelho). 35
- Figura 2 - Teste de concentração de *primers* para a *nested* em PCR em tempo real em um tubo, com utilização do fluoróforo EvaGreen, realizado em duplicata, na temperatura de anelamento de 62°C, com concentrações de cada *primer* da 2ª etapa de (300nM – *primers* senso e antisenso -preto) e 400nM (*primers* senso e antisenso -vermelho). Concentração fixa dos *primers* da 1ª etapa (50nM) e controle negativo(azul). A melhor concentração foi de 400nM/400nM (vermelho) para os dois *primers* da 2ª etapa da reação. 36
- Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose. Teste de concentração de *primers* da PCR em tempo real, com utilização do fluoróforo EvaGreen, realizado em octuplicata na temperatura de 62°C, com combinações de concentrações de *primers* 100nM, 200nM, 300nM e 400nM,(C-) : controle negativo. A melhor concentração foi 400nM/400nM (vermelho) para os dois *primers*. 37
- Figura 4 - Temperatura de dissociação observada na *nested* PCR em tempo real em um tubo para as espécies e genótipos aviários pesquisados: 79,6°C, 79,6°C, 79,4°C, 80,2°C, 80°C para *Cryptosporidium baileyi*, *Cryptosporidium parvum*, genótipo I de aves, *Cryptosporidium proventriculi*, *Cryptosporidium galli*, respectivamente. 38
- Figura 5 - Sensibilidade analítica da *nested* PCR em tempo real em um tubo. DNA extraído de oocistos purificados (A). DNA extraído de fezes adicionadas com oocistos purificados (B). 10<sup>5</sup> oocistos (verde claro),10<sup>4</sup> oocistos (azul) ,10<sup>3</sup> oocistos (preto),10<sup>2</sup> oocistos (laranja),10<sup>1</sup> oocistos (verde escuro),10<sup>0</sup> oocisto (amarelo). 38
- Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose de produtos amplificados pela *nested* PCR em tempo real em um tubo. Amostras positivas para *Cryptosporidium parvum* (1) *Cryptosporidium baileyi* (2), *Cryptosporidium* genótipo I de aves (3), *Cryptosporidium proventriculi* (4), *Cryptosporidium galli* (5) e controle negativo (6). 39
- Figura 7 - Árvore filogenética das sequências do gene 18S rRNA (271 posições de base no conjunto de dados final) de *Cryptosporidium* spp. de aves deste trabalho (triângulo verde) e de espécies selecionadas de *Cryptosporidium*, de acordo com a análise de máxima verossimilhança e o modelo de substituição de Tamura-Nei, com *bootstrap* de 1.000 repetições. A árvore foi enraizada com a sequência AF457127 de *Monocysts agilis*. 40

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - *Primers* utilizados na *nested* PCR em tempo real em um tubo 26  
para amplificação de fragmento parcial do gene 18S rRNA de  
*Cryptosporidium* spp.

Quadro 2 - Concentrações dos *primers* senso e antisenso utilizadas para a 27  
padronização da PCR em tempo real.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Amostras fecais de aves positivas para *Cryptosporidium* spp. pela 41  
*nested* PCR convencional ou pela *nested* PCR em tempo real  
em um tubo e identificação molecular da espécie ou genótipo de  
*Cryptosporidium*.

## LISTA DE ABREVIATURAS

18S rRNA	gene da subunidade 18S do RNA ribossômico
DNA	ácido desoxirribonucleico
μl	microlitro
μg	micrograma
NCFC	núcleo comercial de frangos de corte
nPCR-TR-1T	<i>nested</i> PCR em tempo em um tubo
PCR	reação em cadeia pela polimerase
pb	pares de bases
PBS	solução salina fosfatada tamponada

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Criptosporidiose em aves	18
2.2 Aspectos zoonóticos da criptosporidiose	19
2.3 Diagnóstico da criptosporidiose	20
3 OBJETIVOS	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 <i>Nested</i> PCR em tempo real em um tubo para amplificação de fragmento do gene 18S do rRNA	25
4.1.1 Sensibilidade analítica	27
4.1.1.1 Sensibilidade analítica em amostras de fezes adicionadas com oocistos	28
4.1.1.2 Sensibilidade analítica em DNA extraído de oocistos purificados	28
4.1.2 Especificidade analítica	28
4.1.3 Repetibilidade e reprodutibilidade	29
4.1.4 Sensibilidade e especificidade diagnósticas	29
4.1.4.1 <i>nested</i> PCR convencional para amplificação de fragmento da subunidade 18S do gene do RNA ribossômico	29
4.2 Sequenciamento dos fragmentos amplificados pela <i>nested</i> PCR em tempo real em um tubo e pela <i>nested</i> PCR convencional	30
4.2.1 Análise filogenética	30
4.3 Determinação da ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostras de campo	31
5 RESULTADOS	34
5.1 <i>nested</i> PCR em tempo real em um tubo para amplificação de fragmento do gene 18S do rRNA	34
5.1.1 Sensibilidade e especificidade analíticas	34
5.1.2 Sensibilidade e especificidade diagnósticas	34
5.1.3 Repetibilidade e reprodutibilidade	35
5.2 Sequenciamento do fragmento amplificado pela <i>nested</i> PCR	37

em tempo real em um tubo e pela <i>nested</i> PCR convencional	
5.2.1 Análise filogenética	39
5.3 Determinação da ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostras de campo	42
6 DISCUSSÃO	42
7 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47

## 1 INTRODUÇÃO

Os protozoários do gênero *Cryptosporidium* pertencem ao filo Apicomplexa, classe Gregarinomorpha, subclasse Cryptogregarina e família Cryptosporidiidae (BARTA; THOMPSON, 2006; RYAN et al., 2016), apresentam localização epicelular, no epitélio de mucosas, particularmente do trato gastrointestinal (BARTA; THOMPSON, 2006; VALIGUROVÁ et al., 2008), e ocasionalmente infectam os tratos respiratório, biliar (VALIGUROVÁ et al., 2008) e urinário (TRAMPEL et al., 2000), causando doença clínica e subclínica em humanos e diversas espécies de animais (SANTIN, 2013). Aproximadamente 42 espécies de *Cryptosporidium* são consideradas como válidas e mais de 40 genótipos foram descritos em diversos hospedeiros vertebrados (FENG et al., 2018; ZAHEDI; RYAN, 2020).

A técnica universalmente utilizada para o diagnóstico e caracterização genotípica de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais é a *nested* PCR convencional seguida de sequenciamento genético para amplificar um fragmento parcial do gene da subunidade 18S do rRNA (18S rRNA). Apesar de ser a técnica utilizada na maioria dos laboratórios de pesquisa e diagnóstico de criptosporidiose, a *nested* PCR convencional é demorada, pois é realizada em duas etapas, e demanda a realização de eletroforese para visualização do resultado da reação, o que resulta em maior tempo para determinação do diagnóstico, maior probabilidade de contaminação do ambiente com amplicons resultantes das duas reações (PCR e *nested* PCR) e maior custo de material de consumo.

A PCR em tempo real é um método alternativo à PCR convencional e proporciona um diagnóstico mais rápido e a diminuição de possíveis contaminantes no laboratório. Além disso, não é necessária a realização de eletroforese para visualização do resultado, há possibilidade de visualização de resultados preliminares antes do término da reação e é possível determinar o grau de infecção a partir da quantificação absoluta do DNA amplificado (ARYA et al., 2005).

Uma alternativa à *nested* PCR convencional é a realização das duas etapas da reação em somente um tubo. Essa técnica é utilizada com menor frequência que a *nested* PCR em dois tubos, porém ela apresenta sensibilidade semelhante à reação realizada em dois tubos, em protocolos de PCR convencional (detecção por eletroforese) ou mesmo em protocolos de PCR em tempo real, para detecção de DNA de bactérias (CHOY et al., 2014), fungos (THONGSRI et al., 2013), vírus (ATKINSON

et al., 2014) ou de vegetais (COSTA et al., 2013). Em relação à criptosporidiose, Minarovičová et al. (2009) desenvolveram um trabalho com a utilização de *nested* PCR em tempo real em um tubo (nPCR-TR-1T) para detecção específica de *Cryptosporidium parvum* utilizando uma sonda espécie-específica.

Não há estudos relacionados à aplicação de protocolos de nPCR-TR-1T para detecção de *Cryptosporidium* spp. em aves. A validação de um teste com esse objetivo disponibilizaria uma alternativa aos métodos atualmente disponíveis, com alta sensibilidade, alta especificidade, menor consumo de reagentes, menor possibilidade de contaminação e de realização mais rápida.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Criptosporidiose em aves

Em aves, a criptosporidiose constitui-se em uma das principais infecções por protozoários, se manifestando como doença de curso agudo nos tratos respiratório ou digestivo de várias espécies, dentre as quais o avestruz, galinha doméstica, codornas, perus, faisões, pavões e diversas espécies de Passeriformes e Psittaciformes domésticos e selvagens (SRÉTER; VARGA, 2000; NAKAMURA; MEIRELES, 2015).

Seis espécies de *Cryptosporidium* infectam em aves: *Cryptosporidium meleagridis* (SLAVIN, 1955), *Cryptosporidium baileyi* (CURRENT et al., 1986), *Cryptosporidium galli* (PAVLÁSEK, 1999; RYAN et al., 2003), *Cryptosporidium avium* (genótipo V de aves) (HOLUBOVÁ et al., 2016), *Cryptosporidium proventriculi* (HOLUBOVÁ et al., 2019) e *Cryptosporidium ornitophilus* (genótipo II de aves) (HOLUBOVÁ et al., 2020). Ainda foram descritos os genótipos I, III, IV, VI, VII, VIII e IX (SANTOS et al., 2005; MEIRELES et al., 2006; NG et al., 2006; ABE; MAKINO, 2010; HELMY et al., 2017).

Estudos realizados na Austrália, China e Nigéria, com diversas espécies de aves, relatam a prevalência da infecção por *Cryptosporidium* spp. de 4,9% (47/966) a 8,1% (35/434), além de relatarem a detecção das espécies *C. andersoni*, *C. avium*, *C. baileyi*, *C. galli*, *C. muris*, *C. meleagridis*, *C. proventriculi*, *C. parvum* e os genótipos I e II de *Cryptosporidium* em amostras fecais (NG et al., 2006; QI et al. 2011; BAMAIYI et al., 2013).

No Brasil, as primeiras descrições da presença de *Cryptosporidium* em aves foram feitas por Meireles et al. (1990) e Meireles e Figueiredo (1992). Posteriormente, foi relatada a ocorrência de *C. baileyi*, *C. galli*, *C. meleagridis* e dos genótipos I, II, III e V em aves domésticas e silvestres (SANTOS et al., 2005; MEIRELES et al., 2006; SEVÁ et al., 2011; GOMES et al., 2012; NAKAMURA et al., 2009; NAKAMURA et al., 2014; EWALD et al., 2017; SANTANA et al., 2018).

Infecções por *C. baileyi*, *C. galli*, *C. proventriculi*, *C. avium*, *C. ornitophilus* e pelos diversos genótipos de *Cryptosporidium* estão presentes em uma ampla variedade de espécies de aves, enquanto *C. meleagridis* apresenta um número mais restrito de hospedeiros aviários (SRÉTER; VARGA, 2000; NG et al., 2006; NAKAMURA et al., 2009; QI et al., 2011, HOLUBOVÁ et al., 2019; HOLUBOVÁ et al., 2020). Em relação a *C. parvum*, há um relato de infecção natural comprovada em aves em que havia presença de sinais clínicos (ZYLAN et al., 2008).

Quando o parasitismo é gastrintestinal (*C. meleagridis*, *C. galli* e *C. proventriculi*), os sintomas podem variar desde diarreia, anorexia, emagrecimento e vômito crônico (SRÉTER; VARGA, 2000; MAKINO et al., 2010; RAVICH et al., 2014).

A infecção por *C. baileyi* é considerada parte do complexo respiratório das aves, como uma enfermidade primária ou secundária (BLAGBURN et al., 1987). Em infecções respiratórias por *C. baileyi*, há acúmulo de muco na traqueia, nos pulmões e nos sacos aéreos, com presença de sinais clínicos caracterizados por dispneia, coriza e eventual mortalidade (NAKAMURA; MEIRELES, 2015).

O significado da infecção por *Cryptosporidium* spp. no intestino e/ou bursa de Fabricius permanece indefinido para a maioria das espécies aviárias, embora o parasitismo intestinal possa resultar em doença clínica e aumento de mortalidade em perus e codornas (HOERR et al., 1986) e a infecção na bursa de Fabricius possa resultar em imunossupressão (NACIRI et al., 1989; ELADL et al., 2014).

## **2.2 Aspectos zoonóticos da criptosporidiose aviária**

A infecção em seres humanos comumente é causada por *Cryptosporidium hominis* ou por *C. parvum*, sendo essa última espécie responsável por infecções zoonóticas (SULAIMAN et al., 1998; FAYER et al., 2000; THURSTON-ENRIQUEZ et al., 2002; PREISER et al., 2003).

*Cryptosporidium meleagridis* apresenta baixa especificidade por hospedeiros, pois apesar de ser considerado primariamente um parasito de várias espécies de aves, particularmente de perus (SLAVIN, 1955; SRÉTER; VARGA, 2000), *C. meleagridis* também infecta o homem (PEDRAZA-DIAS et al., 2020; TIANGTIP; JONGWUTIWES, 2002; CAMA et al., 2003; GATEI et al., 2003).

A prevalência da infecção em aves por *C. meleagridis* ainda é pouco conhecida, talvez pela necessidade do uso de técnicas de biologia molecular para sua detecção. No entanto, há relatos de prevalência, na Algéria, de 28,9% (26/90) em frangos e 43,9% (25/57) em perus (BAROUDI et al., 2013); na China, de 8,6% (3/35) em galinha doméstica (QI et al., 2011) e, no Brasil, em galinha doméstica, de 16,2% (57/351) (EWALD et al., 2017) e 0,5% (1/190) (SANTANA et al., 2018). Há outros trabalhos no Brasil com descrição da presença de *C. meleagridis* em amostras fecais de calopsita e de galinha doméstica (HUBER et al., 2007; NAKAMURA et al., 2009).

A infecção em humanos por *C. meleagridis* pode apresentar frequência semelhante ou maior que a infecção por *C. parvum* (XIAO et al., 2001; CAMA et al., 2003; CHALMERS; GILES, 2010). Estudos utilizando análise filogenética sugerem que há relação entre os isolados de seres humanos e de aves (STENSVOLD et al., 2014; WANG et al. 2014), demonstrando que *C. meleagridis* possui importância em saúde pública.

Santana et al. (2018) descreveram a ocorrência do subtipo zoonótico IIIgA23G3R1 de *C. meleagridis* em poedeiras comerciais no Brasil. Esse subtipo havia sido descrito anteriormente somente na espécie humana (ABAL-FABEIRO et al., 2013; STENSVOLD et al., 2014).

### **2.3 Diagnóstico da criptosporidiose**

A experiência é um fator fundamental para o diagnóstico da criptosporidiose, uma vez que os oocistos do gênero *Cryptosporidium* são pequenos, quando comparados a outros coccídios, não apresentam esporocistos, são difíceis de serem visualizados e são morfológicamente similares a esporos de fungos e leveduras (CASEMORE, 1991).

Em amostras com poucos oocistos, é preciso cautela para evitar resultados falso-positivos em amostras fecais examinadas pelos métodos de diagnóstico mais comuns, como a coloração de Kinyoun, coloração negativa com verde malaquita ou

por visualização em microscopia óptica após concentração com soluções saturadas de açúcar, sulfato de zinco ou cloreto de sódio.

Apesar dos oocistos de algumas espécies apresentarem morfologia e morfometria distintas, a análise microscópica não define a espécie, pelo fato de apresentarem pequena variação morfológica e morfométrica e, em muitos casos, serem idênticos entre diferentes espécies ou genótipos (RYAN, 2010). As técnicas imunológicas como ELISA de captura e imunofluorescência indireta apresentam maior sensibilidade que as técnicas de coloração, no entanto, os antígenos apresentam reatividade cruzada entre diferentes espécies de *Cryptosporidium*, não sendo possível o diagnóstico espécie-específico (JEX et al., 2008).

Para detecção e caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais, na maioria das situações é necessária a realização da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção do gênero e de sequenciamento genético para identificação da espécie. A técnica mais utilizada é a que utiliza a PCR em duas etapas (*nested* PCR), em decorrência de DNA de baixa qualidade ou em quantidade insuficiente, comumente encontrado nesse tipo de amostra (JEX et al., 2008). A *nested* PCR convencional (gene 18S rRNA) seguida de sequenciamento genético é a técnica mais utilizada para esse fim e permite a classificação de todas as espécies e genótipos de *Cryptosporidium* (RYAN et al., 2014). No entanto, é uma técnica que utiliza duas etapas de amplificação, o que demanda tempo, maior consumo de reagentes e, ainda, há maior possibilidade de contaminação em decorrência da utilização de material da primeira amplificação para realização da *nested* PCR. Outra desvantagem da *nested* PCR convencional é a necessidade de eletroforese em gel de agarose para visualização dos resultados, o que, além de demandar mais reagentes, aumenta a probabilidade de contaminação do ambiente com produtos da 1ª amplificação.

A PCR em tempo real é um método alternativo à PCR convencional. Essa técnica tem como características um diagnóstico mais rápido, diminuição de possíveis contaminantes no laboratório; visualização do resultado em tempo real, sem a realização de eletroforese e possibilidade de determinar o grau de infecção, a partir da quantificação absoluta do DNA amplificado (ARYA et al., 2005).

Os trabalhos relacionados à PCR em tempo real para diagnóstico de criptosporidiose indicam que essa técnica apresenta sensibilidade superior à *nested* PCR para detecção de DNA de *Cryptosporidium* em amostras fecais (SUNNOTEL et

al., 2006; YANG et al., 2009; DE WAELE et al., 2011). Na maioria dos estudos epidemiológicos relacionados à criptosporidiose, são necessárias técnicas para detecção e identificação de todas as espécies/genótipos de *Cryptosporidium* ou das espécies/genótipos mais frequentes no objeto da pesquisa, como amostras ambientais, amostras de diferentes fontes de água ou amostras fecais provenientes de hospedeiros específicos.

Três protocolos de PCR em tempo real foram desenvolvidos em nosso laboratório para diagnóstico de criptosporidiose: 1) detecção específica de *C. parvum* em bovinos (HOMEM et al., 2011); 2) reação duplex, para detecção específica de *C. galli* e *Cryptosporidium* genótipo III de aves (NAKAMURA et al., 2014); 3) detecção específica de *C. serpentis* em répteis (SILVA et al. 2014). Nos três protocolos, foi observada alta especificidade e sensibilidade superior à da *nested* PCR convencional. No entanto, esses protocolos são utilizados somente em situações específicas, nas quais o diagnóstico é limitado a uma situação clínica ou a um estudo epidemiológico restrito a determinadas espécies do parasito, já que eles permitem apenas a detecção espécie-específica e não podem ser utilizados em estudos epidemiológicos em que há necessidade de técnicas que visam à detecção gênero-específica e identificação da espécie de *Cryptosporidium* por sequenciamento genético.

A maioria dos protocolos de PCR em tempo real para detecção de *Cryptosporidium* disponíveis até o momento, para análise de amostras de diversas espécies de animais e do homem, visa à detecção espécie-específica (HOMEM et al., 2011; STAGGS et al., 2013; YANG et al., 2013; SILVA et al., 2014; NAKAMURA et al., 2014). O protocolo desenvolvido por Burnet et al. (2012) permite a detecção gênero-específica, no entanto, devido ao fato de o tamanho do fragmento amplificado ser pequeno (~107 pb), não há possibilidade de sequenciamento para identificação da espécie sem realização de clonagem molecular.

Um protocolo de PCR em tempo real foi desenvolvido para o diagnóstico gênero-específico de *Cryptosporidium*, em amostras fecais humanas, com amplificação de um fragmento de ~300 pb do gene 18S rRNA e sequenciamento genético para identificação da espécie de *Cryptosporidium* (HADFIELD et al., 2011). No entanto, esse protocolo apresentou amplificação inespecífica em nosso laboratório, em amostras de diversos animais, e em amostras fecais humanas (STAGGS et al., 2013).

A sequência dos fragmentos amplificados pela PCR, visando ao diagnóstico espécie-específico de *Cryptosporidium*, deve conter regiões conservadas para anelamento de *primers* gênero-específicos e regiões internas polimórficas que permitam a diferenciação entre as diversas espécies e genótipos do parasito, pelo sequenciamento genético, o que só foi possível, até o momento, com a amplificação, por *nested* PCR convencional, de fragmentos contendo um tamanho aproximado de 400 pb, principalmente referentes ao gene 18S rRNA (CHALMERS; KATZER, 2013).

Para a realização da PCR em tempo real, é recomendado que o tamanho do fragmento amplificado seja de, no máximo, 300 pb (ARYA et al., 2005). Provavelmente, por esse motivo, todos os protocolos para detecção e identificação de *Cryptosporidium* spp. são relacionados à PCR ou *nested* PCR convencionais seguidas de sequenciamento genético de fragmento parcial do gene 18S rRNA. Esse gene é universalmente utilizado para esse fim devido à sua composição com sequências de nucleotídeos altamente conservadas para o todo o gênero *Cryptosporidium* intercaladas com regiões polimórficas, que permitem a identificação de espécies/genótipos do parasito por sequenciamento genético. Todas as regiões desse gene que apresentam essas características são equivalentes a fragmentos maiores que 300 pb.

Uma alternativa à *nested* PCR (convencional ou em tempo real), comumente realizada em duas etapas e em dois tubos, é a realização das duas etapas da reação em somente um tubo. Essa técnica é utilizada com menor frequência que a *nested* PCR em dois tubos, porém, ela apresenta sensibilidade semelhante à reação realizada em dois tubos, em protocolos de PCR convencional ou de PCR em tempo real, para detecção de DNA de bactérias (CHOY et al., 2014), fungos (THONGSRI et al., 2013), vírus (ATKINSON et al., 2014) ou de vegetais (COSTA et al., 2013). Em relação à criptosporidiose, Minarovičová et al. (2009) desenvolveram um trabalho com utilização da nPCR-TR-1T para detecção específica de *C. parvum* utilizando uma sonda espécie-específica.

Testes preliminares em nosso laboratório revelaram resultados promissores com o uso da *nested* PCR em tempo real com utilização do fluoróforo EvaGreen e análise da curva de dissociação para detecção do gênero *Cryptosporidium* utilizando *primers* que amplificam um fragmento de aproximadamente 434 pb do gene 18S rRNA e purificação do DNA amplificado diretamente da reação, visando ao sequenciamento genético. Esses resultados preliminares nos permitiram verificar a viabilidade de

validação de uma técnica que poderia ser utilizada para detecção e caracterização de *Cryptosporidium* spp., em substituição à *nested* PCR convencional, com todas as vantagens da PCR em tempo real.

A validação de um protocolo de nPCR-TR-1T resultaria na disponibilidade de um novo método de detecção de *Cryptosporidium* spp. em aves e posterior identificação da espécie por sequenciamento genético, fornecendo assim uma alternativa aos métodos atualmente disponíveis para esse objetivo, com alta sensibilidade, alta especificidade, com menor consumo de reagentes, menor possibilidade de contaminação e de realização mais rápida.

### 3 OBJETIVOS

Validar a nPCR-TR-1T com utilização de *primers* gênero-específicos, do fluoróforo EvaGreen e da curva de dissociação para detecção de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de aves.

Padronizar as condições ideais para sequenciamento genético do produto da nPCR-TR-1T, visando à identificação da espécie ou genótipo de *Cryptosporidium*.

Após a validação, utilizar a nPCR-TR-1T para determinar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de frangos de corte na região oeste do estado de Santa Catarina.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP (Processos FOA nº 280-2018 e nº 790-2019).

Foram realizadas as etapas para validação de protocolos de PCR em tempo real preconizadas por Toohey-Kurth et al. (2020), na seguinte sequência: estudos de viabilidade, desenvolvimento e padronização da reação, determinação da sensibilidade e especificidade analíticas, da sensibilidade e especificidade diagnósticas, da repetibilidade e da reprodutibilidade.

### 4.1 *Nested* PCR em tempo real em um tubo para amplificação de fragmento do gene da subunidade 18S do rRNA

A nPCR-TR-1T tem como objetivo a amplificação de um fragmento parcial do gene 18S rRNA de *Cryptosporidium* spp. em duas etapas e em um único tubo. O DNA amplificado na 1ª etapa foi utilizado como molde para amplificação, por *primers* internos, na 2ª etapa, com visualização da amplificação em tempo real.

Com auxílio do *Primer Blast* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), os *primers* da 1ª etapa foram definidos com a adição de uma sequência de 15 e 14 nucleotídeos na extremidade 5' dos *primers* senso e antisenso, respectivamente, que foram originalmente desenvolvidos por Johnson et al. (1995) (Quadro 1), de modo a permitir o anelamento dos *primers* a uma temperatura de aproximadamente 10°C acima da temperatura de anelamento dos *primers* da 2ª etapa (MINAROVÍČOVÁ et al., 2009; ATKINSON et al., 2014; SUN et al., 2017; SHEN et al., 2018). Na 2ª etapa, foram utilizados os *primers* CPB-DIAGF e CPB-DIAGR (Quadro 1), previamente desenvolvidos por Johnson et al. (1995) para realização de um protocolo de *nested* PCR convencional para detecção de *Cryptosporidium* spp.

Foram realizados testes para a padronização das duas etapas da nPCR-TR-1T. Cada reação consistiu em um volume total de 20 µl, com 10 µl de SsoFast® EvaGreen Supermix (Bio-Rad), 2 microlitros de DNA alvo (DNA genômico de *C. parvum*), 10 a 100 nM de *primers* (1ª etapa) e 100 a 500 nM de *primers* (2ª etapa) (Quadro 2) e água ultrapura. As reações foram realizadas no sistema para PCR em

tempo real CFX96 (Bio-Rad), em microplacas para PCR em tempo real (Axygen). A leitura da fluorescência emitida foi realizada a partir da 2ª etapa. Foram realizados também testes com variação na temperatura e tempo de extensão e no número de ciclos de cada etapa. O número de ciclos analisados na 1ª e na 2ª etapa foi de 10 a 20 e de 30 a 40, respectivamente.

Após a 2ª etapa de amplificação, a temperatura de dissociação do fragmento amplificado foi determinada pela análise de curva de dissociação, com temperatura variando de 65°C a 95°C, incremento de 0,5° C e leitura por 5s.

Os produtos da nPCR-TR-1T foram submetidos à eletroforese em gel de agarose para confirmar o tamanho do fragmento amplificado e verificar a presença de amplificação inespecífica.

Como não é possível estabelecer critérios de eficiência da reação por meio de análise de curva padrão, pelo fato dela ser realizada em duas etapas e em um mesmo tubo, a escolha das melhores condições da nPCR-TR-1T teve como critério a avaliação da curva de amplificação (fases exponencial, linear e platô) e da observação de formação de picos de temperatura formados por dímeros de *primers*, na análise da curva de dissociação.

Quadro 1 - *Primers* utilizados na *nested* PCR em tempo real em um tubo para amplificação de fragmento parcial do gene 18S rRNA de *Cryptosporidium* spp.

Gênero	<i>Primers</i>	Posição*	Sequência 5' - 3'	Produto amplificado (pb)	Referência
<i>Cryptosporidium</i> spp.	nPCRTR1	584-616	GTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTT	~457	Este trabalho
	nPCRTR2	1010-1040	ACTTTGATTTCTCATAAGGTGCTGAAGGAGT		
	CPB-DIAGF	599-619	AAGCTCGTAGTTGGATTTCTG	~428	Johnson et al. (1995)
	CPB-DIAGR	1006-1026	TAAGGTGCTGAAGGAGTAAGG		

\*Posição de anelamento no gene 18S rRNA de *Cryptosporidium baileyi* (GenBank AF093495).

Quadro 2 - Concentrações dos *primers* senso e antisenso utilizadas para a padronização da PCR em tempo real.

<b>Primers senso/antisenso</b>	<b>500nM</b>	<b>400nM</b>	<b>300nM</b>	<b>200nM</b>	<b>100nM</b>
<b>500nM</b>	500/500	400/500	300/500	200/500	100/500
<b>400nM</b>	500/400	400/400	300/400	200/400	100/400
<b>300nM</b>	500/300	400/300	300/300	200/300	100/300
<b>200nM</b>	500/200	400/200	300/200	200/200	100/200
<b>100nM</b>	500/100	400/100	300/100	200/100	100/100

Após a etapa de padronização, a nPCR-TR-1T foi realizada em um volume total de 20 µl, com 10 µl de SsoFast® EvaGreen Supermix (Bio-Rad), 0,6 µg/µl de albumina sérica bovina não acetilada (Sigma-Aldrich), 50 nM e 400 nM de cada *primer* na 1ª e 2ª etapas, respectivamente, 2 µl de DNA alvo e água ultrapura. As reações foram realizadas no sistema para PCR em tempo real CFX96 (Bio-Rad), em microtubos para PCR em tempo real de 0,1 ml (Scientific Specialties). A leitura da fluorescência emitida foi realizada a partir da 2ª etapa. A 1ª etapa da reação consistiu em desnaturação inicial a 98° C por dois minutos, seguida de 20 ciclos com desnaturação a 98° C por cinco segundos e anelamento e extensão simultâneos a 70° C por 30 segundos. A 2ª etapa de amplificação consistiu em 35 ciclos de 98° C por cinco segundos, anelamento a 63° C por 30 segundos e extensão a 72° C por 20 segundos, seguidos da análise da curva de dissociação do fragmento amplificado, com temperatura variando de 65°C a 95°C, incremento de 0,5° C e leitura por cinco segundos.

#### 4.1.1 Sensibilidade analítica

A amostra de *C. baileyi* utilizada para determinação da sensibilidade e especificidade analíticas da PCR em tempo real e da nPCR-TR-1T foi isolada de amostras fecais de galinhas domésticas comercializadas em uma loja de produtos veterinários da cidade de Araçatuba, Estado de São Paulo.

Os oocistos foram purificados por centrífugo-flutuação em solução de Sheather e multiplicados por inoculação via oral em pintos de corte de dois dias de idade. As fezes dessas aves foram colhidas do 10° ao 13° dia após a inoculação, coadas em peneiras descartáveis e armazenadas em bicromato de potássio 2,5% a 4°C

(MEIRELES; FIGUEIREDO, 1992). Posteriormente, os oocistos foram purificados por centrífugo-flutuação em solução de Sheather e em solução de cloreto de céσιο (ARROWOOD; DONALDSON, 1996), tratados com solução de hipoclorito de sódio 2% por 10 minutos a 4° C, seguindo-se cinco etapas de diluição em PBS 7,4 e centrifugação a 12.000 g por cinco minutos para retirada de resíduos de hipoclorito de sódio. Os oocistos purificados foram ressuspensos em PBS pH 7,4 e armazenados a 4° C.

#### **4.1.1.1 Sensibilidade analítica em amostras de fezes adicionadas com oocistos**

A sensibilidade analítica da nPCR-TR-1T foi determinada utilizando DNA extraído de oocistos de *C. baileyi*, que foram adicionados em amostras fecais de galinhas negativas para *Cryptosporidium* spp. (por microscopia e *nested* PCR convencional), na quantidade de  $10^5$  a  $10^0$  por grama de fezes. A quantificação dos oocistos foi realizada em câmara de Neubauer.

A extração de DNA a partir das fezes das aves foi realizada com o ZR Fecal DNA MiniPrep® (Zymo Research), de acordo com o protocolo do fabricante. As reações foram realizadas em quintuplicata.

#### **4.1.1.2 Sensibilidade analítica em DNA extraído de oocistos purificados**

A sensibilidade analítica da PCR em tempo real e da nPCR-TR-1T foi determinada a partir de DNA extraído de diluições contendo  $10^5$  a  $10^0$  oocistos de *C. baileyi* quantificados em câmara de Neubauer.

Para extração do DNA, os oocistos foram diluídos em solução de Chelex 100® (Bio-Rad) e submetidos a cinco etapas de congelamento em nitrogênio líquido por um minuto e descongelamento a 99° C, em um termomixer, por três minutos (DI GIOVANNI; LE CHEVALLIER, 2005). As reações foram realizadas em quintuplicata.

#### **4.1.2 Especificidade analítica**

A especificidade analítica da nPCR-TR-1T foi determinada utilizando DNA genômico de microrganismos que comumente apresentam amplificação inespecífica com *primers* utilizados para diagnóstico de *Cryptosporidium* spp., incluindo *Candida*

sp., *Isospora* sp. de curios (*Sporophila angolensis*) e diversas espécies de *Eimeria* que infectam a galinha doméstica (*E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*, *E. mitis* e *E. praecox*). As reações foram realizadas em duplicata.

#### 4.1.3 Repetibilidade e reprodutibilidade

A determinação da repetibilidade da nPCR-TR-1T foi realizada utilizando 30 amostras de DNA previamente diagnosticadas como positivas pela nPCR-TR-1T, que foram testadas três vezes, pela mesma pessoa, nas mesmas condições. Para avaliar a reprodutibilidade do teste, 30 amostras foram examinadas por três pessoas diferentes, todas com experiência em PCR em tempo real, em dois laboratórios e com equipamentos distintos (Sistema para PCR em tempo real CFX96, marca Biorad e Mastercycler RealPlex, marca Eppendorf).

#### 4.1.4 Sensibilidade e especificidade diagnósticas

Para determinação da sensibilidade e especificidade diagnósticas da nPCR-TR-1T, amostras de DNA genômico extraído de amostras fecais individuais de 443 aves das ordens Psittaciformes, Passeriformes e Galliformes (Tabela 1) foram analisadas pela nPCR-TR-1T e pela a *nested* PCR convencional para amplificação de fragmentos do gene 18S rRNA, que é reação considerada como padrão ouro para detecção de *Cryptosporidium* spp. As amostras de DNA estavam armazenadas a -20° C, no laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, há aproximadamente três a cinco anos, e são originadas de pesquisas anteriores (CAMARGO et al., 2018; FERRARI et al., 2018; SANTANA et al., 2018).

##### 4.1.4.1 NESTED PCR convencional para amplificação de fragmento da subunidade 18S do gene do RNA ribossômico

Para amplificação de um fragmento parcial do gene 18S rRNA foram utilizados os *primers* 5´ TTCTAGAGCTAATACATGCG3´ e 5´ CCCATTTCTTCGAAACAGGA 3´, para a reação primária (1325 bp), e 5´ GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG3´ e 5´ AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA 3´ para a reação secundária (826-840 bp) (XIAO et al., 2000). Cada reação consistiu

em 22,5 µl de Platinum™ PCR Supermix (Invitrogen), 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 nM de cada *primer*, 2,0 µl de DNA alvo e 0,6 µg/µl de albumina sérica bovina não acetilada (Sigma-Aldrich). As amostras foram submetidas à desnaturação inicial do DNA a 94° C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos, cada um consistindo em desnaturação a 94° C por 45 s, 45 s de anelamento a 55° C e 60 s de extensão a 72° C, com extensão final a 72° C por 7 min.

Como controles positivo e negativo da reação foram utilizados DNA genômico de *C. parvum* e água ultrapura, respectivamente.

## **4.2 Sequenciamento dos fragmentos amplificados pela *nested* PCR em tempo real em um tubo e pela *nested* PCR convencional**

As amostras submetidas à nPCR-TR-1T foram examinadas por eletroforese em gel de agarose para verificar se havia amplificação de fragmentos com tamanho distinto do esperado para *Cryptosporidium* spp.

Os produtos da nPCR-TR-1T e da *nested* PCR convencional foram purificados com utilização do ExoSAP-IT® PCR *Product Cleanup Reagent* (Termofisher Scientific).

O sequenciamento dos fragmentos amplificados foi realizado com uso do ABI Prism® Dye Terminator 3.1, em sequenciador automático ABI 3730XL (Applied Biosystems) pelo Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) da UNESP, Campus de Jaboticabal. As reações de sequenciamento foram realizadas nas duas direções utilizando os *primers* CPB-DIAGF e CPB-DIAGR, para a nPCR-TR-1T e os *primers* da reação secundária da *nested* PCR convencional.

### **4.2.1 Análise filogenética**

As seqüências consenso foram determinadas utilizando o software CodonCode Aligner v. 8.0.1 (CodonCode Corporation), considerando somente os nucleotídeos com qualidade acima de 20, alinhadas com o auxílio dos programas Clustal W (THOMPSON et al., 1997) e BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999) e comparadas com seqüências homólogas disponíveis no *GenBank* utilizando o *Basic Local Alignment Search Tool* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

A análise filogenética foi realizada com auxílio do software MEGA X (KUMAR et al., 2018), pelo método de máxima verossimilhança e utilizando o modelo de substituição de Tamura-Nei (TAMURA; NEI, 1993).

### **4.3 Determinação da ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em amostras de campo**

Após a validação, nPCR-TR-1T foi utilizada para determinação da ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em amostras de núcleos comerciais de frangos de corte (NCFC). Um NCFC corresponde a uma unidade física de produção avícola, composta por um ou mais galpões que alojam aves da mesma espécie e idade (BRASIL, 2017). Os NCFC pesquisados estão localizados na região oeste do estado de Santa Catarina.

Inicialmente foi determinado o número mínimo de NCFC a serem pesquisados que sejam representativos da região para o cálculo da prevalência. Como não há dados referentes à prevalência de *Cryptosporidium* spp. em frangos de corte no Brasil, a taxa de prevalência estimada utilizada para o cálculo do número mínimo de NCFC pesquisados foi de 50%. Os outros critérios utilizados para o cálculo foram o número de NCFC na região (4.857), margem de erro de 10% e nível de confiança de 95%, de acordo com os critérios preconizados para calcular o tamanho da amostra com o objetivo de estimar uma proporção simples - prevalência aparente (SERGEANT, 2018). Dessa forma, foi definido o número mínimo de 96 NCFC. Como foi possível a colheita em somente 64 NCFC, não foi possível determinar a prevalência de *Cryptosporidium* spp. e os resultados serão considerados somente para a determinação da ocorrência de *Cryptosporidium* spp. na região.

O número de galpões a serem pesquisados em cada NCFC foi definido de acordo com Brasil (2016), que estabelece o monitoramento de *Salmonella* em estabelecimentos comerciais de aves comerciais, de acordo com a seguinte estratificação: de 1 a 3 galpões: colheita em 3 galpões; 4 galpões: colheita em 3 galpões; 5 a 10 galpões: colheita em 4 galpões; 11 ou mais galpões: colheita em 5 galpões. A média de galpões por NCFC na região oeste de Santa Catarina é de um galpão. Portanto, foram colhidas amostras em 64 galpões localizados em 64 NCFC.

Em cada galpão dos NCFC são alojadas de 20.000 a 40.000 aves. Dessa forma, após a definição do número mínimo de NCFC e de galpões por NCFC, foi realizado o cálculo para determinação do número de amostras a serem colhidas em cada galpão para detecção da presença de *Cryptosporidium* spp. no galpão. Esse cálculo foi realizado considerando uma prevalência estimada no galpão de 10% (GOODWIN et al., 1996), sensibilidade do teste de diagnóstico de 70% e nível de confiança de 95%, de acordo com critérios preconizados para determinar o tamanho de amostras visando à detecção da presença de um agente no galpão e considerando amostras colhidas como *pools* em uma população com um número grande de aves (SERGEANT, 2018).

Para o cálculo do número de amostras em cada galpão, é necessária a determinação da sensibilidade do teste diagnóstico a ser utilizado. Mesmo que técnicas de biologia molecular, entre elas a nPCR-RT-1T, apresentem taxas de sensibilidade muito superiores às de técnicas de diagnóstico microscópico (JEX et al., 2008), com o objetivo de aumentar a confiabilidade da amostragem, a taxa de 70% de sensibilidade do teste diagnóstico foi adotada para o efetuar o cálculo do número mínimo de amostras para detecção de *Cryptosporidium* em cada galpão. Essa taxa de sensibilidade se aproxima daquela do método de Ziehl-Neelsen modificado (JOHNSTON et al., 2003; CHALMERS et al., 2011), que é o mais utilizado para pesquisa de *Cryptosporidium* em amostras fecais por microscopia.

As amostras foram colhidas em 64 galpões presentes em 64 NCFC e foram constituídas por cinco *pools* por galpão, cada *pool* com amostras de fezes recém-eliminadas por 10 aves de 28 a 35 dias de idade (GOORHAM et al., 1987; GOODWIN et al., 1996), totalizando 320 *pools* e 3.200 amostras fecais de aves. As amostras foram preservadas em solução de bicromato de potássio 2,5% a 4° C.

As amostras correspondentes aos cinco *pools* de cada galpão foram processadas separadamente. Elas foram homogeneizadas com água deionizada/tween 20 0,1%, coadas em tamis de metal com porosidade de 300 µm e centrifugadas a 2.000 g por 10 minutos, seguindo-se a purificação e concentração de oocistos por centrífugo-flutuação em solução de Sheather.

Os sedimentos resultantes da purificação de cada um dos cinco *pools* foram submetidos à extração de DNA (150 mg) utilizando o FastDNA *Spin Kit for Soil*® (MP Biomedicals), para realização da nPCR-TR-1T e da PCR convencional para o gene 18S rRNA (item 4.1.4.1), seguidas de sequenciamento genético, e à pesquisa de

ocistos de *Cryptosporidium* spp. usando a coloração negativa com verde malaquita (ELLIOT et al., 1999).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 *nested* PCR em tempo real em um tubo para amplificação de fragmento do gene da subunidade 18S do rRNA

Na primeira etapa da nPCR-TR-1T, o melhor resultado foi observado com as etapas de anelamento e extensão sendo realizadas de forma simultânea e na temperatura de 70°C. Na segunda etapa, a temperatura de anelamento de 62°C associada à extensão a 72°C foi a que resultou em melhor amplificação (Figura 1). Dentre todas as combinações de concentrações de *primers*, variando entre 40nM e 50nM na 1ª etapa e 100nM, 200nM, 300nM e 400nM na 2ª etapa, as concentrações ideais foram 50nM e 400nM na 1ª e 2ª etapas, respectivamente, para ambos os conjuntos de *primers* de cada etapa (Figuras 2 e 3).

A temperatura de dissociação observada para as espécies e genótipos aviários pesquisados foram: 79,6°C, 79,6°C, 79,4°C, 80,2°C e 80,0°C para *C. baileyi*, *C. meleagridis*, *Cryptosporidium* genótipo I de aves, *C. proventriculi* e *C. galli*, respectivamente (Figura 4).

#### 5.1.1 Determinação da sensibilidade e especificidade analíticas

O teste de sensibilidade analítica mostrou que a nPCR-TR-1T detectou aproximadamente 0,5 oocisto por reação (2 esporozoítos) (Figura 5). Não houve amplificação de DNA de microrganismos que comumente apresentam amplificação inespecífica com os *primers* utilizados para diagnóstico de *Cryptosporidium* spp., incluindo *Candida* sp., *Isospora* sp. e diversas espécies de *Eimeria*.

#### 5.1.2 Repetibilidade e reprodutibilidade

O cálculo da repetibilidade realizado pela mesma pessoa, por três vezes, no mesmo equipamento, em amostras de DNA proveniente de amostras fecais de aves, evidenciou o mesmo resultado em 27 de 30 amostras (90%). Em relação à reprodutibilidade da nPCR-TR-1T, a análise de 30 amostras examinadas por três pessoas diferentes, todas com experiência em PCR em tempo real, em dois laboratórios e com equipamentos distintos (Sistema para PCR em tempo real CFX96,

marca Biorad, e Mastercycler RealPlex, marca Eppendorf), mostrou o mesmo resultado em 24 amostras dentre 30 examinadas (80%).

### 5.1.3 Sensibilidade e especificidade diagnósticas

Pela *nested* PCR convencional, foi observada positividade para *Cryptosporidium* spp. em 8,1% (36/443) das amostras. As amostras examinadas pela nPCR-TR-1T apresentaram positividade em 90/443 (20,3%) amostras (Tabela 1).

Figura 1 - Teste de temperaturas de anelamento dos *primers* da *nested* PCR em tempo real em um tubo, com utilização do fluoróforo EvaGreen, realizado em duplicata, nas temperaturas de 64°C (azul), 62°C (vermelho) e controle negativo (laranja).

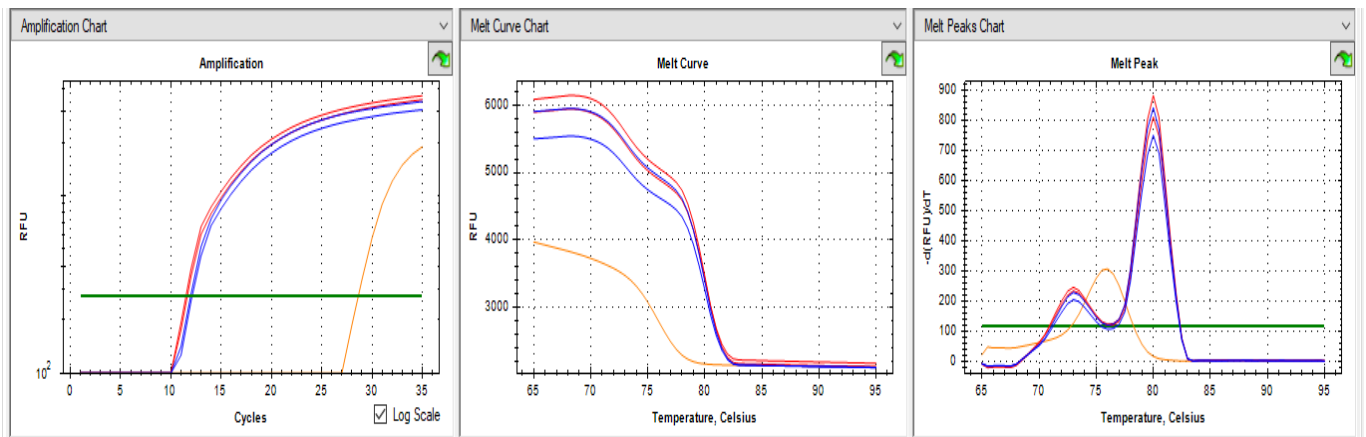


Figura 2 - Teste de concentração de *primers* da *nested* em PCR em tempo real em um tubo, com utilização do fluoróforo EvaGreen, realizado em duplicata, na temperatura de anelamento de 62°C, com concentrações de cada *primer* da 2ª etapa de (300nM – *primers* senso e antisenso - preto) e 400nM (*primers* senso e antisenso - vermelho). Concentração fixa dos *primers* da 1ª etapa (50nM) e controle negativo(azul).

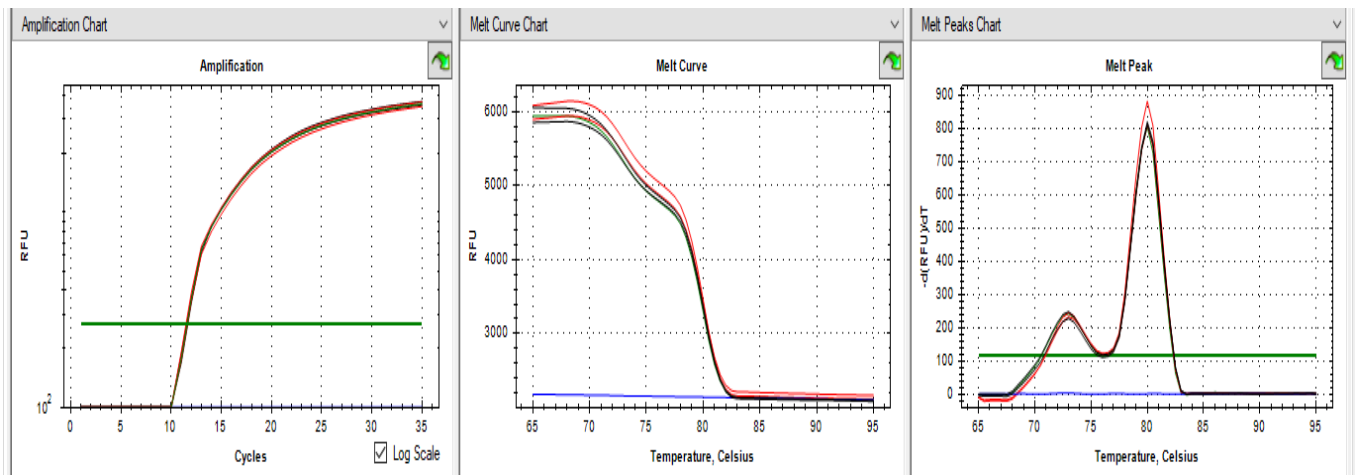
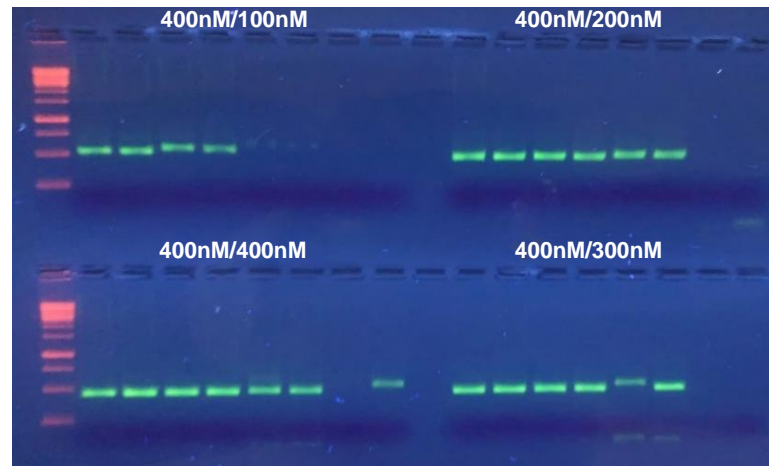


Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose. Teste de concentração de *primers* da PCR em tempo real, com utilização do fluoróforo EvaGreen, realizado em octoplicata na temperatura de 62°C, com combinações de concentrações de *primers* 100nM, 200nM, 300nM e 400nM, (C-): controle negativo.



## 5.2 Sequenciamento do fragmento amplificado pela *nested* PCR em tempo real em um tubo e pela *nested* PCR convencional

Foi possível realizar o sequenciamento em todas as 90 amostras amplificadas pela nPCR-TR-1T. As seguintes espécies foram identificadas: *C. baileyi*, *C. galli*, *C. meleagridis*, *C. proventriculi* e *Cryptosporidium* genótipo I em aves. O sequenciamento dos fragmentos amplificados pela *nested* PCR convencional foi possível em 10/38 (26,3%) das amostras positivas, com identificação das mesmas espécies identificadas pela nPCR-TR-1T (Tabela 1).

Figura 4 - Temperatura de dissociação observada na *nested* PCR em tempo real em um tubo para as espécies e genótipos aviários pesquisados: 79,6°C, 79,6°C, 79,4°C, 80,2°C, 80°C para *Cryptosporidium baileyi*, *Cryptosporidium parvum*, genótipo I de aves, *Cryptosporidium proventriculi*, *Cryptosporidium galli*, respectivamente.

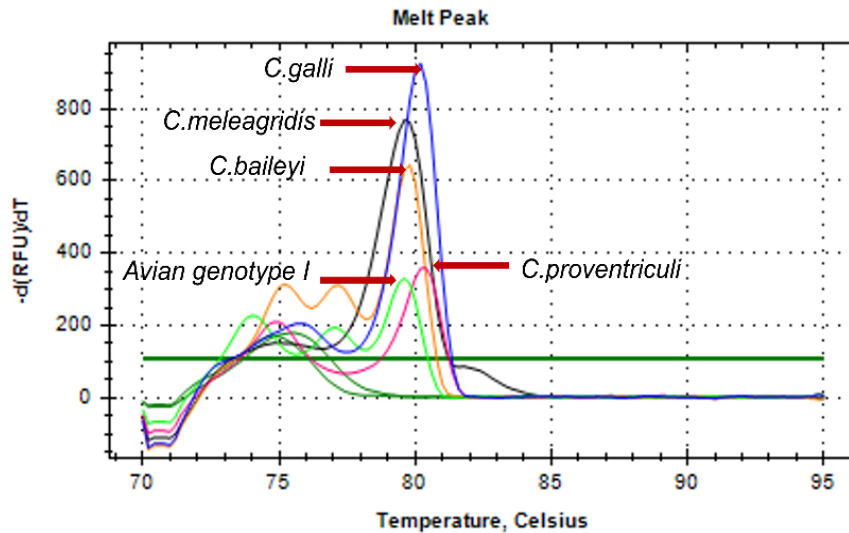
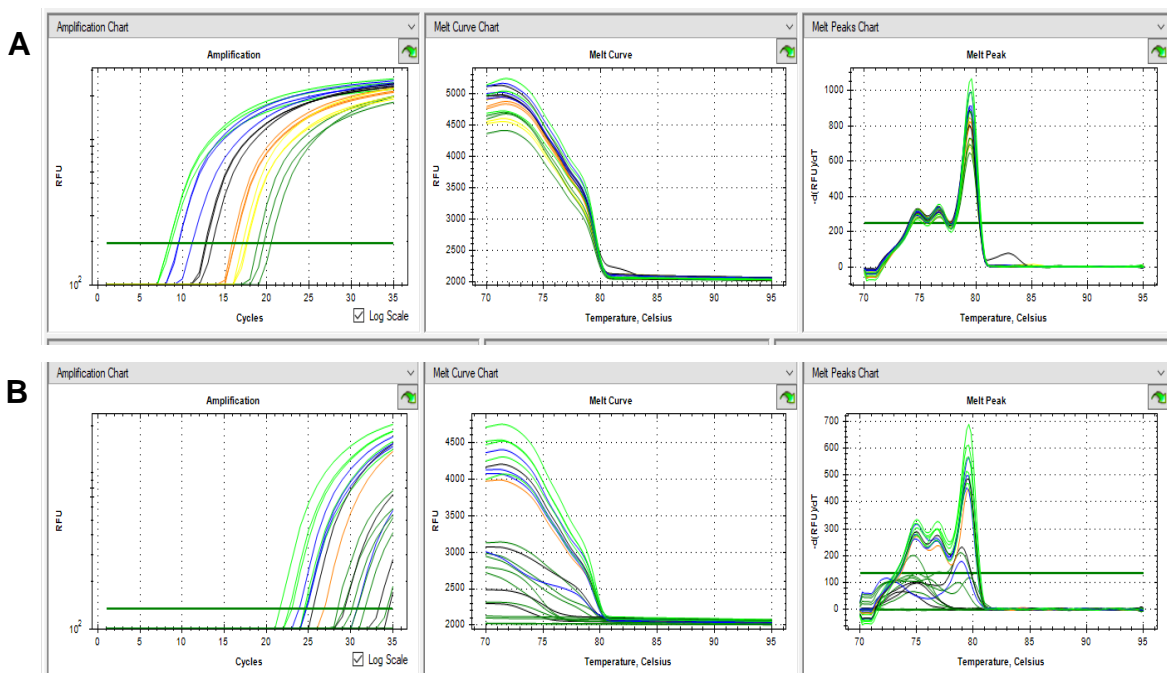


Figura 5 - Sensibilidade analítica da *nested* PCR em tempo real em um tubo. DNA extraído de oocistos purificados (A). DNA extraído de fezes adicionadas com oocistos purificados (B).  $10^5$  oocistos (verde claro),  $10^4$  oocistos (azul),  $10^3$  oocistos (preto),  $10^2$  oocistos (laranja),  $10^1$  oocistos (verde escuro),  $10^0$  oocisto (amarelo).



### 5.2.1 Análise filogenética

As amostras identificadas como *C. baileyi*, *C. galli*, *C. proventriculi* e *Cryptosporidium* genótipo I de aves apresentaram sequências com 100% de similaridade genética com as sequências AJ276096, MN410725, MK311118 e MG832883, respectivamente; por esse motivo, uma sequência representativa de cada espécie/genótipo de *Cryptosporidium* foi selecionada para confecção da árvore filogenética (Figura 7).

Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose de produtos amplificados pela *nested* PCR em tempo real em um tubo. Amostras positivas para *Cryptosporidium parvum* (1) *Cryptosporidium baileyi* (2), *Cryptosporidium* genótipo I de aves (3), *Cryptosporidium proventriculi* (4), *Cryptosporidium galli* (5) e controle negativo (6).

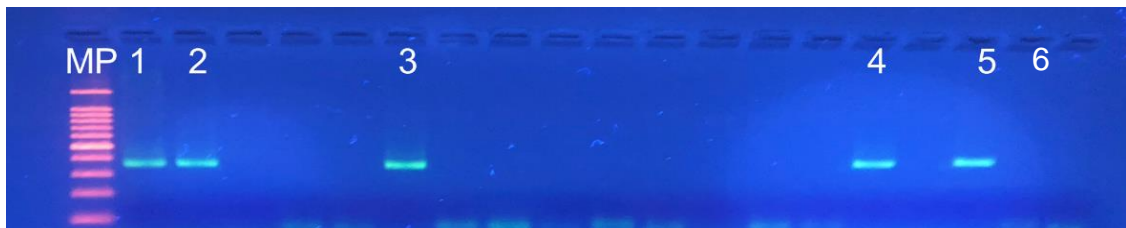


Figura 7 - Árvore filogenética das sequências do gene 18S rRNA (271 posições de base no conjunto de dados final) de *Cryptosporidium* spp. de aves deste trabalho (triângulo verde) e de espécies selecionadas de *Cryptosporidium*, de acordo com a análise de máxima verossimilhança e o modelo de substituição de Tamura-Nei, com *bootstrap* de 1.000 repetições. A árvore foi enraizada com a sequência AF457127 de *Monocysts agilis*.

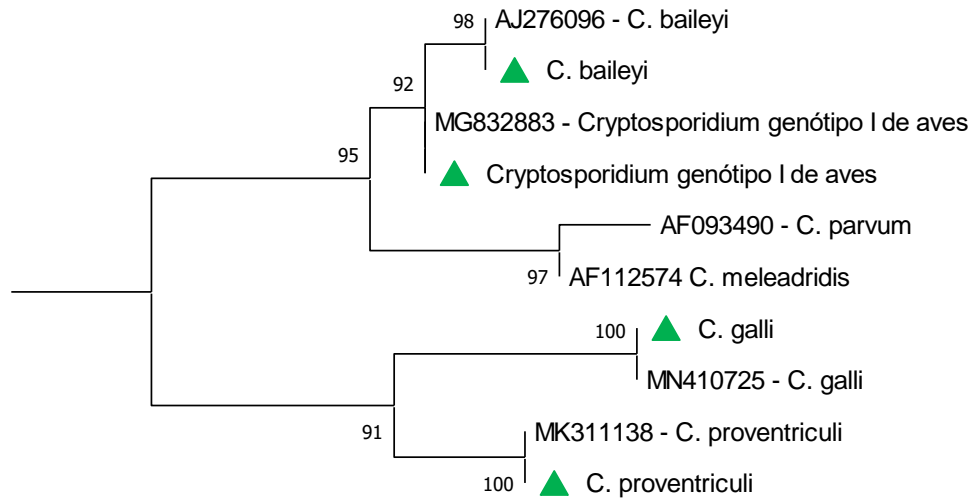


Tabela 1 - Amostras fecais de aves positivas para *Cryptosporidium* spp. pela *nested* PCR ou pela *nested* PCR em tempo real em um tubo e identificação molecular da espécie ou genótipo de *Cryptosporidium*.

Espécie ou Ordem	Número de amostras positivas/total de amostras colhidas por espécie de ave (%)	Detecção de <i>Cryptosporidium</i> spp.		Sequenciamento genético	
		<i>Nested</i> PCR convencional	<i>Nested</i> PCR em tempo real	<i>Nested</i> PCR convencional	<i>Nested</i> PCR em tempo real
Psittaciformes	15/109 (13,8)	-	+	-	<i>C. proventriculi</i> 13/20 (65%) <i>C. galli</i> 2/20 (10%)
	2/109 (2)	+	+	<i>C. proventriculi</i> 2/2 (100%)	<i>C. proventriculi</i> 2/2 (100%)
Passeriformes	40/253 (16)	-	+	-	<i>C. baileyi</i> 7/40 (17,5%) <i>C. galli</i> 31/40 (77,5%) <i>C. genótipo I de aves</i> 2/40 (5%)
	17/253 (6,7)	+	+	<i>C. galli</i> 6/17 (35,3%) nd 11/17 (64,7%)	<i>C. galli</i> 17/17 (100%)
	14/253 (5,5)	+	-	nd	-
<i>Gallus domesticus</i>	12/81 (14,8)	-	+	-	<i>C. baileyi</i> 12/12 (100%)
	3/81 (3,7)	+	+	<i>C. baileyi</i> 2/3 (66,7%)	<i>C. baileyi</i> 3/3 (100%)
	1/81 (1,2)	-	+	-	<i>C. meleagridis</i> 1/1 (100%)
<b>Total</b>	<b>104/443 (23,5)</b>	<b>36/443 (8,4)</b>	<b>90/443 (20,3)</b>		

nd: amostra não identificada por sequenciamento devido à pequena quantidade de DNA amplificado.

### 5.3 Determinação da ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em amostras de campo

Todas as amostras fecais provenientes dos NCFC foram negativas para *Cryptosporidium* spp. pela *nested* PCR convencional e pelo exame microscópico. Um NCFC dentre os 64 examinados (2%) foi positivo pela nPCR-TR-1T e a amostra foi identificada como *C. baileyi* pelo sequenciamento genético.

## 6 DISCUSSÃO

A nPCR-TR-1T apresentou maior sensibilidade que a *nested* PCR convencional, que é o teste considerado como padrão-ouro para detecção de *Cryptosporidium* spp. Maior sensibilidade de protocolos de PCR em tempo real quando comparados à *nested* PCR convencional já foi descrita por diversos autores (YANG et al., 2013; DE WAELE et al., 2011; HOMEM et al., 2011; NAKAMURA et al., 2014; SILVA et al., 2014).

Neste estudo, grande parte das amostras teve amplificação próxima a 30 CT, provavelmente pela pequena quantidade de oocistos presentes nas amostras. Os resultados encontrados estão de acordo com Yang et al. (2013), que encontraram positividade pela PCR em tempo real somente com amplificação em altos valores de CT, em amostras onde não houve detecção pela *nested* PCR convencional, devido à pequena quantidade de oocistos presentes. Essa mesma correlação entre altos valores de CT e pequena quantidade do microrganismo alvo em amostras fecais foi observada por Fillaux et al. (2008), ao utilizarem a PCR em tempo real para o diagnóstico de *Pneumocystis jirovecii* em humanos.

Pela análise das curvas de dissociação nPCR-TR-1T (Figura 4), é possível observar a presença de picos duplos observados; esses picos são referentes a regiões nos fragmentos amplificados que apresentam dissociação em diferentes temperaturas (<https://www.dna.utah.edu/umelt/umelt.html>) e não caracterizam amplificação inespecífica, como pode ser evidenciado pela eletroforese em gel de agarose (Figura 6).

O protocolo desenvolvido neste trabalho, além de se basear na PCR em tempo real, ainda apresenta a vantagem de ser realizado no formato *nested*, que acrescenta

ainda mais sensibilidade ao diagnóstico, como destacado em trabalhos anteriores (BALATBAT et al., 1996; JEX et al., 2008; MORGAN; THOMPSON, 1998).

Para a validação de um protocolo de diagnóstico, também devem ser determinados a especificidade e sensibilidade diagnósticas e os valores preditivos positivo e negativo da reação. Como a sensibilidade da nPCR-TR-1T foi superior à da *nested* PCR convencional (padrão ouro), não foi possível a realização desses cálculos, pois o resultado indicaria baixa especificidade da nPCR-TR-1T, já que todos os resultados positivos pela nPCR-TR-1T e negativos pela *nested* PCR convencional seriam considerados como falso-positivos, como observado em outros trabalhos relacionados à validação de protocolos de PCR em tempo real (DE WAELE et al., 2011; HOMEM et al., 2012; NAKAMURA et al., 2014; SILVA et al., 2014). A possibilidade de resultados falso-positivos foi descartada pelo sequenciamento dos fragmentos amplificados pela *nested* nPCR-TR-1T, que comprovou que não houve amplificação inespecífica.

Amostras submetidas a protocolos de PCR convencional são examinadas por eletroforese em gel de agarose. Na ausência de amplificação inespecífica, o produto da PCR pode ser purificado diretamente com utilização de reagentes enzimáticos, como ExoSAP-IT® PCR *Product Cleanup Reagent* (Termofisher Scientific), que geralmente resulta em DNA em qualidade e quantidade suficiente para sequenciamento, mesmo em amostras com pequena quantidade de DNA amplificado. Quando há amplificação inespecífica, que é frequente em protocolos de *nested* PCR convencionais que amplificam fragmentos do gene 18S rRNA para detecção de *Cryptosporidium* spp., ou DNA em baixa quantidade (nesse caso as amostras devem ser reamplificadas em triplicata para aumentar a quantidade de DNA), o produto é purificado a partir do gel de agarose, o que sempre resulta em baixo rendimento de DNA, que pode inviabilizar o sequenciamento genético.

Neste projeto, foi determinada a viabilidade do sequenciamento a partir do produto da nPCR-TR-1T, sem eletroforese em gel de agarose e sem necessidade de reamplificação, relacionando o resultado do sequenciamento com o CT da reação. Essa análise forneceu informações sobre a quantidade de DNA amplificado e, indiretamente, sobre a viabilidade de sequenciamento do produto amplificado. Como o protocolo de nPCR-TR-1T não amplifica fragmentos inespecíficos, os fragmentos resultantes dessa reação foram purificados diretamente do produto da reação utilizando o kit ExoSAP-IT® PCR *Product Cleanup Reagent* (Termofisher Scientific).

As variações entre os resultados de repetibilidade e reprodutibilidade muito provavelmente estão relacionadas não somente à variabilidade da reação/pessoas/equipamentos, mas também à distribuição desuniforme do DNA na amostra (efeito Monte Carlo) (BUSTIN; NOLAN, 2004), que é decorrente da pequena quantidade de DNA presente em amostras de aves infectadas por algumas espécies de *Cryptosporidium*, particularmente as espécies gástricas em aves (NAKAMURA; MEIRELES, 2015).

O protocolo padronizado neste trabalho utiliza *primers* para amplificar um fragmento de aproximadamente 432 pb, que é maior do que o recomendado para protocolos de PCR em tempo real. Essa característica da nPCR-RT-1T certamente interferiu na eficiência da reação (ARYA et al., 2005), no entanto, mesmo com essa limitação, a nPCR-RT-1T apresentou maior sensibilidade que o teste padrão-ouro. A opção pela utilização desses *primers* se deve a uma particularidade do gene 18S rRNA de *Cryptosporidium*, que é a existência de uma região em particular com uma sequência de nucleotídeos altamente conservada em todas as espécies e genótipos, contendo em seu interior sequências polimórficas que permitem a diferenciação entre gêneros/espécies (XIAO et al., 1999). Essa região foi selecionada neste projeto para amplificação pela nPCR-RT-1T pelo fato de que não havia alternativa para a seleção de *primers* que anelassem em outra região do gene 18S rRNA, que fossem gênero-específicos e que permitissem a diferenciação das espécies/genótipos por sequenciamento genético. Essa limitação impediu, neste projeto, a otimização da reação com utilização de *primers* direcionados a outras regiões do gene.

Foi encontrada baixa ocorrência (0,2%; 1/64) de *Cryptosporidium* nos NCFC pesquisados na região oeste do estado de Santa Catarina. Em estudo anterior realizado em galinhas de criações comerciais e de fundo de quintal em 20 municípios do estado de São Paulo, Santana et al. (2018) utilizou a *nested* PCR convencional e detectou a ocorrência de *C. baileyi* (9.5%; 18/190), *C. meleagridis* (0.5%; 1/190), *C. parvum* (2.1%; 4/190) e *Cryptosporidium* sp. (0,5%; 1/190). Foi relatada ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em 25% (6/24) das criações de sistemas extensivos, 25% (2/8) em sistemas semiextensivos, 60% (15/25) em sistemas intensivos de poedeiras comerciais e 25% (1/4) em criações comerciais intensivas de frangos de corte. As amostras deste trabalho, assim como algumas das amostras examinadas por Santana et al. (2018), foram obtidas de criatórios comerciais de frangos de corte e examinadas com métodos de detecção molecular, no entanto, devido à baixa amostragem obtida

de criatórios comerciais de frangos de corte examinada por esses autores, não foi possível comparar os resultados com os deste trabalho.

Dentre os estudos realizados com amostras de galinha doméstica de criatórios comerciais, em que um número maior de amostras foi analisado, a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. na galinha doméstica, em diversos trabalhos realizados em vários países, varia de 3,4 a 34,4%, com identificação de *C. baileyi*, *C. meleagridis* e *Cryptosporidium* genótipo II de aves, conforme revisão de literatura feita por Nakamura e Meireles (2015). Também não é possível comparar nossos resultados aos destes trabalhos, devido a diferenças nos métodos de diagnóstico, técnicas de manejo e métodos de coleta das amostras.

Neste trabalho, não foi detectada a presença de *C. meleagridis*. No Brasil, *C. meleagridis* foi descrito em galinhas domésticas (HUBER et al., 2007; SANTANA et al., 2018; NAKAMURA et al., 2009). Em trabalhos que analisaram um número maior de amostras provenientes da galinha doméstica, baixa positividade para *C. meleagridis* também foi descrita por Wang et al. (2014) e Santana et al. (2018), que relataram ocorrência de 5,36% (2/38) 1,6% (1/61) para infecção por essa espécie em galinhas domésticas na China e no Brasil, respectivamente.

A realização deste projeto possibilitou a validação de um protocolo de diagnóstico que apresenta alta sensibilidade e alta especificidade para detecção do gênero *Cryptosporidium* em amostras fecais, além de viabilizar a purificação e o sequenciamento diretamente do produto amplificado. Como vantagens desse protocolo, em relação à *nested* PCR convencional, podemos citar a realização em somente uma etapa e sem a necessidade eletroforese para visualização do produto amplificado, a alta especificidade e a sensibilidade superior à *nested* PCR convencional. Essas características resultam em menor possibilidade de contaminação, maior rapidez para obtenção dos resultados, economia de reagentes e maior confiabilidade nos resultados.

## 7 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi validada um protocolo de nPCR-RT-1T para detecção de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de aves. A nPCR-RT-1T apresentou mais sensibilidade que o protocolo considerado como padrão outro para detecção de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais, a *nested* PCR convencional. O sequenciamento genético do amplicon da nPCR-RT-1T pode ser realizado após purificação por protocolos enzimáticos, mesmo em amostras com altos valores de CT. A ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp. em NCFC na região oeste do Estado de Santa Catarina é de 0,2% (1/64). A infecção por *C. baileyi* apresenta baixa ocorrência na região oeste do Estado de Santa Catarina.

## REFERÊNCIAS

- ABAL-FABEIRO, J.L.; MASIDE, X.; BELLO, X.; LLOVO, J.; BARTOLOMÉ, C. Multilocus patterns of genetic variation across *Cryptosporidium* species suggest balancing selection at the gp60 locus. **Mol. Ecol.**, v. 22, 4723-4732, 2013.
- ABE, N.; MAKINO, I. Multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium* isolates from cockatiels, Japan. **Parasitol. Res.**, v. 106, p. 1491-1497, 2010.
- ARROWOOD, M.J.; DONALDSON, K. Improved purification methods for calf-derived *Cryptosporidium parvum* oocysts using discontinuous sucrose and cesium chloride gradients. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 43, p. 89S, 1996.
- ARYA, M.; SHERGILL, I.S.; WILLIAMSON, M.; GOMMERSALL, L.; ARYA, N.; PATEL, H.R. Basic principles of real-time quantitative PCR. **Expert. Rev. Mol. Diagn.**, v. 5, p. 209-219, 2005.
- ATKINSON, C.; EMERYA, V.C.; GRIFFITHS, P.D. Development of a novel single tube *nested* PCR for enhanced detection of cytomegalovirus DNA from dried blood spots. **J. Virol. Methods**, v. 196, 40-44, 2014.
- BALATBAT, A.B.; JORDAN, G.W.; TANG, Y.J.; SILVA, Jr., J. Detection of *Cryptosporidium parvum* DNA in human feces by nested PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 1769-1772, 1996.
- BAROUDI, D.; KHELEF, D.; GOUCEM, R.; ADJOU, K.T.; ADAMU, H.; ZHANG, H.; XIAO, L. Common occurrence of zoonotic pathogen *Cryptosporidium meleagridis* in broiler chickens and turkeys in Algeria. **Vet. Parasitol.**, v. 196, p. 334-340, 2013.
- BAMAIYI, P.H.; UMOH, J.U.; ABDU, P.A.; LAWAL, I.A. The prevalence of *Cryptosporidium* oocysts in birds in Zaria, Nigeria. **Borneo J. Resource Sci. Technol.**, v. 2, p. 52-59, 2013.
- BARTA, J.R.; THOMPSON, A.R.C. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. **Trends Parasitol.**, v. 2, p. 463-468, 2006.

BLAGBURN, B.L.; LINDSAY, D.S.; GIAMBRONE, J.; SUNDERMANN, C.A.; HOERR, F.J. Experimental cryptosporidiosis in broiler chickens. **Poult. Sci.**, v. 66, p. 22 442-449, 1987.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). o controle e o monitoramento de *Salmonella* spp. nos estabelecimentos avícolas comerciais de frangos e perus de corte e nos estabelecimentos de abate de frangos, galinhas, perus de corte e reprodução, registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF. Brasil: Ministério da Saúde, Pecuária e Abastecimento, 2016. In: <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/instrucao-normativa-sda-20-de-21-10-2016,1085.html>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Procedimentos para registro, fiscalização e controle de estabelecimentos avícolas de reprodução, comerciais e de ensino ou pesquisas. Brasil: Ministério da Saúde, Pecuária e Abastecimento, 2017. In: <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/instrucao-normativa-n-18-de-25-de-maio-de-2017,1133.html>.

BURNET, J.B.; OGORZALY, L.; TISSIER, A.; PENNY, C.; CAUCHIE, H.M. Novel quantitative TaqMan real-time PCR assays for detection of *Cryptosporidium* at the genus level and genotyping of major human and cattle-infecting species. **J. Appl. Microbiol.**, v. 114, p. 1211-1222, 2012.

BUSTIN, S.A.; NOLAN, T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. **J. Biomol. Techn.**, v. 15, p. 155-166, 2004.

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

CAMARGO, V.S.; SANTANA, B.N.; FERRARI, E.D.; NAKAMURA, A.A.; NAGATA, W.B.; NARDI, A.R.M.; MEIRELES, M.V. Detection and molecular characterization of

*Cryptosporidium* spp. in captive canaries (*Serinus canaria*) using different diagnostic methods. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 27, p. 60-65, 2018.

CASEMORE, D.P. Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. **J. Clin. Pathol.**, v. 44, p. 445-451, 1991.

CHALMERS, R.M.; GILES, M. Zoonotic cryptosporidiosis in the UK - challenges for control. **J. Appl. Microbiol.**, v. 109, p. 1487-1497, 2010.

CHALMERS, R.M.; KATZER, F. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. **Trends Parasitol.**, v. 29, p. 237-251, 2013.

CHALMERS, R.M.; CAMPBELL, B.M.; CROUCH, N.; CHARLETT, A.; DAVIES, A.P. Comparison of diagnostic sensitivity and specificity of seven *Cryptosporidium* assays used in the UK., **J. Med. Microbiol.**, v. 60, p. 1598-1604, 2011.

CHOI, Y.; JEON, B.Y.; SHIM, T.S.; JIN, H.; CHO, S.N.; LEE, H. Development of a highly sensitive one-tube *nested* real-time PCR for detecting *Mycobacterium tuberculosis*. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 80, p. 299-303, 2014.

COSTA, J.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; MAFRA, I. Novel approach based on single-tube *nested* real-time PCR to detect almond allergens in foods. **Food Res. Int.**, v. 51, p. 228- 235, 2013.

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

DE WAELE, V.; BERZANO, M.; BERKVEN, D.; SPEYBROECK, N.; LOWERY, C.; MULCAHY, G.M.; MURPHY, T.M. Age-stratified Bayesian analysis to estimate sensitivity and specificity of four diagnostic tests for detection of *Cryptosporidium* oocysts in neonatal calves. **J. Clin. Microbiol.**, v. 49, p. 76-84, 2011.

DI GIOVANNI, G.D.; LECHEVALLIER, M.W. Quantitative-PCR assessment of *Cryptosporidium parvum* cell culture infection. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.71, p.1495- 1500, 2005.

ELADL, A.H.; HAMED, H.R.; KHALIL, M.R. Consequence of cryptosporidiosis on the immune response of vaccinated broiler chickens against Newcastle disease and/or avian influenza. **Vet. Res. Commun.**, v. 38, p. 237-247, 2014.

ELLIOT, A.; MORGAN, U.M.; THOMPSON, R.C.A. Improved staining method for detecting *Cryptosporidium* oocysts in stools using malachite green. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v. 45, p. 139-142, 1999.

EWALD, M.P.C.; MARTINS, F.D.C.; CALDART, E.T.; VIEIRA, F.E.G.; YAMAMURA, M.H. SASSE, J.P. BARROS, L.D. FREIRE, R.L. NAVARRO, I.T.; GARCIA, J.L. The first study of molecular prevalence and species characterization of *Cryptosporidium* in free-range chicken (*Gallus gallus domesticus*) from Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 26, p. 472-478, 2017.

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

FENG, Y.; RYAN, U.M.; XIAO, L. Genetic diversity and population structure of *Cryptosporidium*. **Trends Parasitol.**, v. 34, p. 997-1011, 2018.

FERRARI, E.D.; NAKAMURA, A.A.; NARDI, A.R.M.; SANTANA, B.N.; CAMARGO, V.S.; NAGATA, W.B.; BRESCIANI, K.D.S.; MEIRELES, M.V. *Cryptosporidium* spp. in caged exotic psittacines from Brazil: evaluation of diagnostic methods and molecular characterization. **Exp. Parasitol.**, v. 184, p. 109-114, 2018.

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

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

GOMES, R.S.; HUBER, F.; DA SILVA, S.; DO BOMFIM, T.C.B. *Cryptosporidium* spp. parasitize exotic birds that are commercialized in markets, commercial aviaries, and pet shops. **Parasitol. Res.**, v. 110, p. 1363- 1370, 2012.

GOODWIN, M.A.; BROWN, J.; RESURRECCION, R.S.; SMITH, J.A. Respiratory coccidiosis (*Cryptosporidium baileyi*) among northern Georgia broilers in one company. **Avian Dis.**, v. 40, p. 572-575, 1996.

GORHAM, S.L.; MALLINSON, E.T.; SYNDER, D.B.; ODOR, E.M. Cryptosporidia in the bursa of Fabricius - a correlation with mortality rates in broiler chickens. **Avian Pathol.**, v. 16, p. 205-211, 1987.

HADFIELD, S.; ROBINSON, G.; ELWIN, K.; CHALMERS, R.M. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp. in human clinical samples by use of real-time PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 49, p. 918-924, 2011.

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

HELMY, Y.A.; KRÜCKEN, J.; ABDELWHAB, E.S.M.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.V.; HAFEZ, H.M. Molecular diagnosis and characterization of *Cryptosporidium* spp. in turkeys and chickens in Germany reveals evidence for previously undetected parasite species. **PLoS One**. 12 (6): e0177150, 2017.

HOERR, F.J., CURRENT, W.L., HAYNES, T.B. Fatal cryptosporidiosis in a quail. **Avian Dis.**, v. 30, p. 421-425, 1986.

HOLUBOVÁ, N.; SAK, B.; HORČIČKOVÁ, M.; HLÁSKOVÁ, L.; KVĚTOŇOVÁ, D.; MENCHACA, S.; McEVOY, J.; KVÁČ, M. *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa Cryptosporidiidae) in birds. **Parasitol. Res.**, v. 115, p. 2243-2251, 2016.

HOLUBOVÁ, N. ZIKMUNDOVÁ, V.; LIMPOUCHOVÁ, Z.; SAK, B.; KONEČNÝ, R.; HLÁSKOVÁ, L.; RAJSKÝ, D.; KOPACZ, Z.; McEVOY, J.; KVÁČ, M. *Cryptosporidium proventriculi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Psittaciformes birds. **Eur. J. Protistol.**, v. 69, p. 70-87, 2019.

HOLUBOVÁ, N.; TŮMOVÁ, L.; SAK, B.; HEJZLAROVÁ, A.; KONEČNÝ, R.; McEVOY, J.; KVÁČ, M. Description of *Cryptosporidium ornithophilus* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in farmed ostriches. **Parasit. Vectors**, v. 13, 340, 2020.

HOMEM, C.G.; NAKAMURA, A.A.; SILVA, D.C.; TEIXEIRA, W.F.P.; COELHO, W.M.D.; MEIRELES, M.V. Real-time PCR assay targeting the actin gene for the detection of *Cryptosporidium parvum* in calf fecal samples. **Parasitol. Res.**, v.110, p. 1741-1745, 2011.

HUBER, F.; DA SILVA, S.; BOMFIM, T.C.B.; TEIXEIRA, K.R.S.; BELLO, A.R. Genotypic characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 150, p. 65-74, 2007.

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

JOHNSON, D.W., PIENIAZEK, N.J., GRIFFIN, D.W., MISENER, L., ROSE, J.B. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 3849-3855, 1995.

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

KUMAR, S.; STECHER, G; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Mol. Biol. Evol.** . 35, p. 1547-1549, 2018.

MAKINO, I.; ABE, N.; REAVILL, D.R. *Cryptosporidium* avian genotype III as a possible causative agent of chronic vomiting in peach-faced lovebirds (*Agapornis roseicollis*). **Avian Dis.**, 54, p. 1102-1107, 2010.

MEIRELES, M.V., FIGUEIREDO, P.C. Isolamento e identificação do *Cryptosporidium baileyi*, Current et al., (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em frangos de corte. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 1,2, p. 125-130, 1992.

MEIRELES M.V., RODRIGUES, R.L., CARVALHO, E.C.Q. Criptosporidiose em frangos de corte no município de Bom Jardim, RJ. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v.12, p. 41-42, 1990.

MEIRELES, M.V.; SOARES, M.R.; SANTOS, M.M.A.B.; GENNARI, S.M. Biological studies and molecular characterization of a *Cryptosporidium* isolate from ostrich (*Struthio camelus*). **J. Parasitol.**, v. 92, p. 623-626, 2006.

MINAROVÍČOVÁ, J.; KACLÍKOVÁ, E.; KRASCSENICSOVÁ, K.; SIEKEL, P.; KUČHTA, T. A single-tube *nested* real-time polymerase chain reaction for sensitive contained detection of *Cryptosporidium parvum*. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 49, p. 568-572, 2009.

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

NACIRI, M.; MAZZELLA, O.; COUDERT, F. Interactions cryptosporidies-virus sauvage ou vaccinal de la maladie de Marek chez le poulet. **Rec. Méd. Vét.**, v. 165, p. 383-387, 1989.

NAKAMURA, A.A.; MEIRELES, M.V. *Cryptosporidium* infections in birds - a review. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 24, p. 253-267, 2015.

NAKAMURA, A.A.; SIMÕES, D.C.; ANTUNES, R.G.; DA SILVA, D.C.; MEIRELES, M.V. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of birds kept in captivity in Brazil. **Vet Parasitol.**, v. 166, p. 47-51, 2009.

NAKAMURA, A.A.; HOMEM, C.G.; DA SILVA, A.M.J.; MEIRELES, M.V. Diagnosis of gastric cryptosporidiosis in birds using a duplex real-time PCR assay. **Vet Parasitol.**, 26 v. 205, p. 7-13, 2014.

NG, J.; PAVLASEK, I.; RYAN, U. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, p. 7548-7553, 2006.

PAVLÁSEK, I. Cryptosporidia: Biology, diagnosis, host spectrum, specificity, and the environment. **Remed. Klinicka Mikrobiol.**, v. 3, p. 290-301, 1999.

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

PREISER, G.; PREISER, L.; MADEO, L. An outbreak of cryptosporidiosis among veterinary science students who work with calves. **J. Am. Coll. Health**, v. 51, p. 213-215, 2003.

QI, M.; WANG, R.; NING, C.; LI, X.; ZHANG, L.; JIAN, F.; SUN, Y.; XIAO, L. *Cryptosporidium* spp. in pet birds: Genetic diversity and potential public health significance., **Exp. Parasitol.**, v. 128, p. 336-340, 2011.

RAVICH, M.L.; REAVILL, D.R.; HESS, L.; CHILDRESS, A.L.; WELLEHAN Jr, J.F.X. Gastrointestinal cryptosporidiosis in captive psittacine birds in the United States: A case review. **J. Avian Med. Surg.**, v. 28, p. 297-303, 2014.

RYAN, U. *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. **Exp. Parasitol.**, v. 124, p. 113- 120, 2010.

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

RYAN, U.; FAYER, R.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. **Parasitology**, v. 141, p. 1667-1685, 2014.

RYAN, U.; PAPANINI, A.; MONIS, P.; HIJJAWI, N. It's official – *Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry? **Water Res.**, v. 105, p. 305-313, 2016.

SANTANA, B.N.; KURAHARA, B.; NAKAMURA, A.A.; CAMARGO, V.S.; FERRARI, E.D.; SILVA, G.S.; NAGATA, W.B.; MEIRELES, M.V. Detection and characterization of *Cryptosporidium* species and genotypes in three chicken production systems in Brazil using different molecular diagnosis protocols. **Prev. Vet. Med.**, v. 151, p. 73-78, 2018.

SANTIN, M. Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals. **N. Z. Vet. J.**, v. 61, p. 1-10, 2013.

SANTOS, M.M.A.B.; PEIRÓ, J.R.; MEIRELES, M.V. *Cryptosporidium* infection in ostriches (*Struthio camelus*) in Brazil: clinical, morphological and molecular studies. **Braz. J. Poult. Sci.**, v. 7, p. 113-117, 2005.

SERGEANT, E.S.G. EpiTools Epidemiological Calculators. Ausvet. 2018. Available at: <http://epitools.ausvet.com.au>.

SEVÁ, A.P.; FUNADA, M.R.; RICHTZENHAIN, L.; GUIMARÃES, M.B.; SOUZA, S.O.; ALLEGRETTI, L.; SINHORINI, J.A.; DUARTE, V.V.; SOARES, R.M. Genotyping of *Cryptosporidium* spp. from free-living wild birds from Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 175, p. 27-32, 2011.

SHEN, X.X.; QIU, F.Z.; ZHAO, H.L.; YANG, M.J.; HONG, L.; XU, S.T.; ZHOU, S.F.; LI, G.X.; FENG, Z.S.; MA, X.J. A novel and highly sensitive real-time *nested* RT-PCR assay in a single closed tube for detection of enterovirus. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 90, p. 181-185, 2018.

SILVA, D.C.; PAIVA, P.R.S.O.; NAKAMURA, A.A.; HOMEM, C.G.; SOUZA, C.G.; GREGO, K.F.; MEIRELES, M.V. The detection of *Cryptosporidium serpentis* in snake fecal samples by real-time PCR. **Vet. Parasitol.**, v. 204, p. 134-138, 2014.

SLAVIN, D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). **J. Comp. Pathol.**, v. 65, p. 262-266, 1955.

SRÉTER, T.; VARGA, I. Cryptosporidiosis in birds – a review. **Vet. Parasitol.**, v. 87, p. 261-279, 2000.

STAGGS, S.E.; BECKMAN, E.M.; KEELY, S.P.; MACKWAN, R.; WARE, M.W.; MOYER, A.P.; FERRETTI, J.A.; SAYED, A.; XIAO, L.; VILLEGAS, E.C. The applicability of TaqMan-based quantitative real-time PCR assays for detecting and enumerating *Cryptosporidium* spp. oocysts in the environment. **Plos One**, v. 8, e66562, 2013.

STENSVOLD, C.R.; BESER, J.; AXEN, C.; LEBBAD, M. High applicability of a novel method for gp60-based subtyping of *Cryptosporidium meleagridis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 52, p. 2311-2319, 2014.

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.

SUN, Y.; CHEN, J.; LI, J.; XU, Y.; JIN, H.; XU, N.; YIN, R.; HU, G. Novel approach based on one-tube *nested* PCR and a lateral flow strip for highly sensitive diagnosis of tuberculous meningitis. **PLoS ONE**, v. 2: e0186985, 2017.

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

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Mol. Biol. Evol.**, v. 10, p. 512-526, 1993.

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

THONGSRI, Y.; WONGLAKORN, L.; CHAIPRASERT, A.; SVOBODOVA, L.; HAMAL, P.; PAKARASANG, M.; PRARIYACHATIGUL, C. Evaluation for the clinical diagnosis of *Pythium insidiosum* using a single-tube *nested* PCR. **Mycopathologia**, v. 176, p. 369-376, 2013.

THURSTON-ENRIQUEZ, J.A.; WATT, P.; DOWD, S.E.; ENRIQUEZ, R.; PEPPER, I.L.; GERBA, C.P. Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production. **J. Food Prot.**, v. 65, p. 378-382, 2002.

TIANGTIP, R.; JONGWUTIWES, S. Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV-infected patients in Thailand. **Trop. Med. Int. Health.**, v. 7, p. 357-364, 2002.

TOOHEY-KURTH, K.; REISING, M.M.; TALMADGE, R.L.; GOODMAN, L.B.; BAI, J.; BOLIN, S.R.; PEDERSEN, J.C.; BOUNPHENG, M.A.; POGRANICHNIY, R.M.; CHRISTOPHER-HENNINGS, J.; KILLIAN, M.L.; MULROONEY, D.M.; MAES, R.; SINGH, S.; CROSSLEY, B.M. Suggested guidelines for validation of real-time PCR assays in veterinary diagnostic laboratories. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 32, p. 802-814, 2020.

TRAMPEL, D. W.; PEPPER, T. M.; BLAGBURN, B.L. Urinary tract cryptosporidiosis in commercial laying hens. **Avian Dis.** v. 44, p. 479-484, 2000.

VALIGUROVÁ, A.; JIRKŮ, M.; KOUDELA, B.; GELNAR, M.; MODRY, D.; ŠLAPETA, J. Cryptosporidia: Epicellular parasites embraced by the host cell membrane. **Int. J. Parasitol.**, v. 38, p. 913-922, 2008.

WANG, Y.; YANG, W.; CAMA, V.; WANG, L.; CABRERA, L.; ORTEGA, Y.; BERN, C.; FENG, Y.; GILMAN, R.; XIAO, L. Population genetics of *Cryptosporidium meleagridis* in humans and birds: evidence for cross-species transmission. **Int. J. Parasitol.**, v. 44, p. 515-521, 2014.

XIAO, I.; ESCALANTE, I.; 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. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 1578-1583, 1999.

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, 5492-5498, 2000.

XIAO, L.; BERN, C.; LIMOR, J.; SULAIMAN, I.; ROBERTS, J.; CHEKLEY, W.; CABRERA, L.; GILMAN, A.A. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p. 492-497, 2001.

YANG, R.; MURPHY, C.; SONG, Y.; NG-HUBLIN, J.; ESTCOURT, A.; HIJJAWI, N.; CHALMERS, R.; HADFIELD, S.; BATH, A.; GORDON, D.; RYAN, U. Specific and

quantitative detection and identification of *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* in clinical and environmental samples, **Exp. Parasitol.**, 135, p. 142-147, 2013.

ZAHEDI, R.; RYAN, U. *Cryptosporidium* – an update with an emphasis on foodborne and waterborne transmission. **Res. Vet. Sci.**, v, 132, p. 500-512, 2020.

ZYLAN, K.; BAILEY, T.; SMITH, H.V; SILVANOSE, C.; KINNE, J.; SCHUSTER, R.K.; HYLAND, K. An outbreak of cryptosporidiosis in a collection of Stone curlews (*Burhinus oedicephalus*) in Dubai. **Avian Pathol.**, v. 37, p. 521-526, 2008.