

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO**

VAGNER RICARDO DA SILVA FIUZA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE
Cryptosporidium ISOLADAS DE FEZES DE ANIMAIS DE
PRODUÇÃO NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL**

Campos dos Goytacazes

2010

VAGNER RICARDO DA SILVA FIUZA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE *Cryptosporidium*
ISOLADAS DE FEZES DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO NO ESTADO DO
RIO DE JANEIRO, BRASIL

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal, na Área de Concentração de Sanidade Animal.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira

Campos dos Goytacazes

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 078/2010

Fiuza, Vagner Ricardo da Silva

Caracterização molecular de espécies de *Cryptosporidium* isoladas de fezes de animais de produção no Estado do Rio de Janeiro, Brasil / Vagner Ricardo da Silva Fiuza. – 2010.

98f. : il.

Orientador: Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira

Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2010.

Bibliografia: f. 68 – 85.

1. *Cryptosporidium* 2. Suíno 3. Ovino 4. Bovino 5. PCR I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD –
636.089

VAGNER RICARDO DA SILVA FIUZA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE *Cryptosporidium*
ISOLADAS DE FEZES DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO NO ESTADO DO
RIO DE JANEIRO, BRASIL

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal, na Área de Concentração de Sanidade Animal.

Aprovada em 30 de julho de 2010

BANCA EXAMINADORA

Prof. Carlos Wilson Gomes Lopes (Doutor, Patologia) - UFRRJ

Prof. Walter Flausino (Doutor, Parasitologia Veterinária) – UFRRJ

Prof. Walter Leira Teixeira Filho (Doutor, Parasitologia Veterinária) – UFRRJ

Prof. Olney Vieira da Motta (Doutor, Biociências e Biotecnologia) - UENF

Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira (Doutor, Ciências Veterinárias) - UENF
(orientador)

Aos meus pais,

Que um dia sonharam, e hoje compartilham este
importante momento comigo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela luz que ilumina meus horizontes;

Aos meus pais, JORGE PESSANHA FIUZA e ANA MARIA RICARDO DA SILVA, pelos exemplos de honestidade e caráter;

À minha namorada, LUCIANA SALLES VASCONCELOS HENRIQUES por fazer parte de minha vida, enchê-la de sonhos e alegrias;

Ao meu orientador Prof. Dr. FRANCISCO CARLOS RODRIGUES DE OLIVEIRA por todo o apoio, ensinamentos e amizade;

Ao Dr. RONALD FAYER, por ter me recebido tão bem em seu laboratório e por todos os valiosos ensinamentos que me foram passados durante a minha permanência no USDA;

À Dra. MÓNICA SANTÍN, pelo exemplo de determinação, talento e força de vontade;

Ao Dr. EDWARDS FRAZÃO TEIXEIRA, pela parceria e grande amizade, principalmente durante os quatro meses em terras estrangeiras;

À SAMIRA SALIM MELLO GALLO, pela disposição em trabalhar mesmo durante suas férias;

À professora LÍGIA VASCONCELOS HENRIQUES, fundamental no ensino da língua inglesa;

À professora Dra. ADRIANA JARDIM DE ALMEIDA, por todo o apoio prestado nesta pesquisa;

Aos colegas, DUMITRU MACARISIN, JULIE HEADLEY e MEGHAM HEFFRON pela harmoniosa e alegre convivência no dia-a-dia do USDA;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), por todas as oportunidades oferecidas;

A todos os meus amigos e familiares;

Aos colegas e professores do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da UENF;

Aos estagiários e funcionários da UENF;

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela bolsa de doutorado concedida;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
pela bolsa de doutorado-sanduíche que me foi concedida durante quatro meses;

À Banca Examinadora, pelas sugestões, conselhos e atenção dispensada.

*“Não tenhamos pressa,
mas não percamos tempo”*

José Saramago (1922-2010)

RESUMO

FIUZA, Vagner Ricardo da Silva, D.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Julho de 2010. Caracterização molecular de espécies de *Cryptosporidium* isoladas de fezes de animais de produção no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Professor orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira.

Este trabalho teve como objetivo determinar a sensibilidade da técnica de centrífugo-flutuação com sacarose no diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras fecais, além de realizar a caracterização molecular de espécies desta parasitose, a partir de oocistos obtidos de fezes de suínos, ovinos e bovinos criados no Estado do Rio de Janeiro. Para o teste de sensibilidade, foram coletadas fezes de animais livres de oocistos de *Cryptosporidium* mantidos no *Beltsville Agricultural Research Center* do USDA, que foram misturadas. Desta mistura, 40 amostras, cada uma contendo 15g de fezes, foram separadas em grupos de 10 recipientes. A cada um destes 10 recipientes foram adicionados oocistos de *C. parvum* em concentrações de 10, 100, e 1.000 oocistos por grama de fezes nos grupos 2, 3 e 4 respectivamente. O grupo 1 não foi contaminado com oocistos e serviu como grupo controle. Foi realizada a PCR do gene 18S rRNA de cada uma destas amostras e foi detectada a presença de oocistos em 0, 10, 40 e 80% nos grupos 1-4 respectivamente. Estes resultados são considerados satisfatórios, podendo, dessa forma ser utilizada com segurança no diagnóstico da criptosporidiose nas espécies deste estudo. Para a caracterização molecular das espécies encontradas nos animais de produção, foram coletadas amostras de fezes de suínos (91), ovinos (125) e bovinos (68) das regiões Norte e Noroeste Fluminense. As amostras foram submetidas à análise de biologia molecular, onde foi realizada a técnica de PCR do gene 18S rRNA, seguida de sequenciamento das amostras positivas. A PCR revelou a presença de 2,2 (2), 1,6 (2) e 4,54% (4), de amostras positivas nas espécies suína, ovina e bovina respectivamente. As seguintes espécies foram obtidas através do sequenciamento: *Cryptosporidium* genótipo suíno II, *C. ubiquitum* e *C. andersoni*, cujas sequências foram depositadas no GenBank. Estes resultados demonstram a presença enzoótica destas espécies e genótipos na região e a detecção de sequências de *Cryptosporidium* genótipo suíno II no Brasil, idênticas às de outros países, reforçando o caráter cosmopolita deste genótipo.

Palavras-chave: *Cryptosporidium*; suínos; ovinos, bovinos, PCR.

ABSTRACT

FIUZA, Vagner Ricardo da Silva, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. July; 2010. Molecular characterization of *Cryptosporidium* species in livestock of the State of Rio de Janeiro, Brazil. Prof. Advisor: Dr. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira.

The study aimed to determine the sensitivity of the flotation technique with sucrose in the diagnosis of *Cryptosporidium* in stool samples, in addition to perform molecular characterization of *Cryptosporidium* species, from oocysts obtained from fecal samples of pigs, sheep and cattle raised in the State of Rio de Janeiro. For the sensitivity test, feces were collected from *Cryptosporidium*-free animals kept in Beltsville Agricultural Research Center of the United States Department of Agriculture, and mixed to form a single pool. From this pool, 40 samples, each containing 15g of feces were separated into groups of 10 containers. Each of these 10 containers were spiked with *C. parvum* oocysts at concentrations of 10, 100 and 1,000 oocysts per gram of feces in Groups 2, 3 and 4 respectively. Group 1 was not contaminated with oocysts and served as control. PCR of 18S rRNA gene was performed in each of these samples and detected the presence of oocysts at 0, 10, 40 and 80% in groups 1-4 respectively. These results are considered satisfactory and, therefore, can be safely used in the diagnosis of cryptosporidiosis in animal species of this study. For the molecular characterization of the species found in farm animals, fecal samples were collected from pigs (91), sheep (125) and cattle (68) of the North and Northwest Regions from the State of Rio de Janeiro. The samples were analyzed with molecular biology technique, whereas the PCR of 18S rRNA gene was performed, followed by sequencing of all positive samples. The PCR revealed the presence of 2.2 (2), 1.6 (2) and 4.54% (4) of positive samples in pigs, sheep and cattle respectively. The following species were obtained by sequencing: *Cryptosporidium* pig genotype II, *C. ubiquitum* and *C. andersoni*, whose sequences were deposited in GenBank. These results demonstrate the presence of these species and genotypes in the region and the detection of sequences of *Cryptosporidium* pig genotype II in Brazil identical to those of other countries enhances the cosmopolitan character of this genotype.

Key words: *Cryptosporidium*; pigs; sheep; cattle, PCR.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Taxonomia do gênero <i>Cryptosporidium</i>	20
Quadro 2	Espécies válidas de <i>Cryptosporidium</i>	22
Quadro 3	Sequências dos iniciadores utilizados nas reações de nested PCR e seus tamanhos de fragmentos amplificados.....	42

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. As legendas de cada etapa são descritas no texto (Adaptado de CDC, 2010)..... 25
- Figura 2** Eletroforese em gel de agarose (1%) demonstrando os produtos da nested PCR do gene 18S rRNA de oocistos de *Cryptosporidium* spp. concentrados pela técnica de centrifugo-flutuação com sacarose. **1)** grupo controle; **2)** 10 oocistos por grama de fezes; **3)** 100 oocistos por grama de fezes e; **4)** 1.000 oocistos por grama de fezes. **M:** marcador molecular; **+**: controle positivo; **N:** controle negativo (*nested*); **-:** controle negativo..... 47
- Figura 3** Resultado da amplificação da subunidade 18S ribossomal visualizada em gel de agarose a 1%; **M:** Marcador de peso molecular; De **G7** a **H4:** Amostras de suínos testadas para *Cryptosporidium*; A seta indica a posição relativa de um produto de PCR de aproximadamente 800 pb, condizente com o produto esperado (a figura original encontra-se no Apêndice A)..... 48
- Figura 4** Resultado da amplificação da subunidade 18S ribossomal visualizada em gel de agarose a 1%; **M:** Marcador de peso molecular; **+**: Controle positivo; **N:** Controle negativo nested; **-:** Controle negativo; de **H11** a **I1:** Amostras de suínos testadas para *Cryptosporidium*; A seta indica a posição relativa de um produto de PCR de aproximadamente 800 pb, condizente com o produto esperado (a figura original encontra-se no Apêndice A)..... 49
- Figura 5** Resultado da amplificação da subunidade 18S ribossomal visualizada em gel de agarose a 1%; **M:** Marcador de peso molecular; **+**: Controle positivo; **N:** Controle negativo nested; **-:** Controle negativo; de **E6** a **F4:** Amostras de ovinos testadas para *Cryptosporidium*; A seta indica a posição relativa de um produto de PCR de aproximadamente 800 pb, condizente com o produto esperado (a figura original encontra-se no Apêndice B)..... 50
- Figura 6** Resultado da amplificação da subunidade 18S ribossomal visualizada em gel de agarose a 1%; **M:** Marcador de peso molecular; De **F10** a **H1:** Amostras de bovinos testadas para *Cryptosporidium*; A seta indica a posição relativa de um produto de PCR de aproximadamente 800 pb, condizente com o produto esperado (a figura original encontra-se no Apêndice C)..... 52

Figura 7 Resultado da amplificação da subunidade 18S ribossomal visualizada em gel de agarose a 1%; **M**: Marcador de peso molecular; De **J4** a **K3**: Amostras de bovinos testadas para *Cryptosporidium*; A seta indica a posição relativa de um produto de PCR de aproximadamente 800 pb, condizente com o produto esperado (a figura original encontra-se no Apêndice C)..... 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Diagnóstico de <i>Cryptosporidium parvum</i> , através do protocolo de Reação em Cadeia da Polimerase do gene 18S rRNA em duas etapas (XIAO et al, 1999) em recipientes contendo 15 g de fezes de suínos, contaminadas com oocistos e posterior concentração por centrífugo-flutuação em solução de sacarose..	46
Tabela 2	Análise molecular da SSU rRNA de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> em amostras fecais de suínos, coletadas no Estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	49
Tabela 3	Análise molecular da SSU rRNA de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> em amostras fecais de ovinos, coletadas no Estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	51
Tabela 4	Análise molecular da SSU rRNA de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> em amostras fecais de bovinos, coletadas no Estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	54

LISTA DE SIGLAS

BARC – Beltsville Agricultural Research Center

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

BSA – bovine serum albumine

CBB – Centro de Biociências e Biotecnologia

CCTA – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias

COWP – *Cryptosporidium* oocist wall protein

dNTP – desoxirribonucleotídeo trifosfato

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay

EMFSL – Environmental Microbial and Food Safety Laboratory

EUA – Estados Unidos da América

FDA – Food and Drug Administration

HSP70 - 70-kDa heat shock protein

ICZN – International Code of Zoological Nomenclature

IFAT – Indirect Fluorescent Antibody Test

IMS – Immunomagnetic Separation

LCCA – Laboratório de Clínica e Cirurgia Animal

OMS - Organização Mundial de Saúde

PCR – Polymerase Chain Reaction

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

rpm – rotações por minuto

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

UENF – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

USDA – United States Department of Agriculture

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	HISTÓRICO.....	18
2.2	TAXONOMIA.....	20
2.3	ESTRUTURA.....	23
2.4	TRANSMISSÃO.....	24
2.5	CICLO BIOLÓGICO.....	24
2.6	CRIPTOSPORIDIOSE.....	27
2.6.1	Em humanos	27
2.6.2	Em Suínos	28
2.6.3	Em Ovinos	29
2.6.4	Em Bovinos	30
2.7	MÉTODOS DE DETECÇÃO.....	31
2.8	PREVENÇÃO, CONTROLE E TRATAMENTO.....	36
3	OBJETIVOS	38
3.1	GERAL.....	38
3.2	ESPECÍFICOS.....	38
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	SENSIBILIDADE.....	39
4.1.1	Coleta das amostras e contaminação experimental	39
4.1.2	Concentração dos oocistos	39
4.1.3	Extração do DNA	40
4.1.4	Reação em Cadeia da Polimerase	41
4.1.5	Análise da PCR	42
4.2	DIAGNÓSTICO EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO.....	43
4.2.1	Coleta das amostras	43
4.2.1.1	Suínos.....	43
4.2.1.2	Ovinos.....	43

4.2.1.3	Bovinos.....	44
4.2.2	Locais de execução	44
4.2.3	Processamento do material fecal	44
4.2.4	Sequenciamento	45
5	RESULTADOS	46
5.1	SENSIBILIDADE.....	46
5.2	DIAGNÓSTICO EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO.....	48
5.2.1	Suínos	48
5.2.2	Ovinos	50
5.2.3	Bovinos	52
6	DISCUSSÃO	55
6.1	SENSIBILIDADE.....	55
6.2	DIAGNÓSTICO EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO.....	58
6.2.1	Suínos	58
6.2.2	Ovinos	61
6.2.3	Bovinos	63
7	CONCLUSÕES	65
8	CONSIDERAÇÕES GERAIS	66
9	REFERÊNCIAS	68
10	APÊNDICES	85

1 INTRODUÇÃO

Os protozoários do gênero *Cryptosporidium* são parasitos intracelulares, porém extracitoplasmáticos, que geralmente infectam as células epiteliais do trato gastrointestinal do homem e de uma ampla variedade de animais, tais como mamíferos, aves, peixes, répteis e anfíbios. Atualmente, 20 espécies são reconhecidas como válidas, além dos mais de 60 genótipos e subgenótipos já relatados em todo o mundo. Pertencem ao Filo Apicomplexa, com seu ciclo biológico constituído de estágios sexual e assexual, completados dentro de um único hospedeiro sendo considerados, portanto, parasitos monoxenos.

A transmissão ocorre pela via fecal-oral através da ingestão dos oocistos, que já são infectantes imediatamente após serem eliminados pelas fezes. Os meios de transmissão mais comuns são os alimentos e a água contaminados. A dose infectante é baixa, na qual a ingestão de 10 a 30 oocistos é suficiente para causar infecção em pacientes saudáveis.

Os oocistos de *Cryptosporidium* podem variar de tamanho e forma entre as espécies, mas, na maioria das vezes, estas medidas são semelhantes. Por este motivo, não é possível realizar a identificação da espécie envolvida na infecção através microscopia e sim, com métodos moleculares de diagnóstico. Estes estudos baseados em biologia molecular se tornam, portanto, imprescindíveis para definição do potencial zoonótico dos oocistos encontrados no ambiente e nas fezes dos hospedeiros.

Dependendo da espécie de *Cryptosporidium* envolvida na infecção, as características da doença podem ser variadas, tais como o sítio de infecção e o grau de severidade. Algumas espécies, inclusive, parecem ser restritas a apenas uma espécie de hospedeiro, enquanto outras podem ser encontradas em várias espécies diferentes. Tipicamente, a criptosporidiose, que é considerada uma doença emergente pela OMS, causa uma diarreia aguda e auto-limitante em indivíduos imunocompetentes enquanto que nos pacientes imunodeprimidos, a doença pode até mesmo ser fatal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

O primeiro relato de *Cryptosporidium* foi realizado em 1907 pelo parasitologista Ernest Edward Tyzzer, que descreveu de forma clara um parasito que ele frequentemente observava nas células gástricas de camundongos (*Mus musculus*). Em sua publicação, o autor evidenciou os estágios de desenvolvimento assexual e sexual através da morfologia, assim como a eliminação dos esporos (posteriormente identificados como oocistos) juntamente com as fezes do hospedeiro, o que ressaltava a possível transmissão da infecção através da ingestão de alimentos infectados (TYZZER, 1907). Como ainda não havia nome para este novo organismo, foi proposto o nome *Cryptosporidium muris*. Alguns anos depois, este protozoário foi descrito com grandes detalhes pelo mesmo autor, inclusive com a possibilidade da ocorrência de auto-infecção dos hospedeiros (TYZZER, 1910). A partir destes dados, *C. muris* passou a ser considerado como espécie, dentro de um novo gênero, *Cryptosporidium*. Devido aos seus limitados recursos de microscopia, pensava-se na época que os estádios de desenvolvimento eram extracelulares, o que, com o avanço da microscopia anos depois, não foi confirmado. No entanto, toda descrição original do ciclo biológico observada em 1910 foi comprovada posteriormente por microscopia eletrônica.

Uma nova espécie de *Cryptosporidium* foi descrita em 1912, dessa vez localizada no intestino delgado de camundongos infectados de forma experimental (TYZZER, 1912). Além do diferente sítio de infecção, os oocistos observados também eram menores. Dessa forma, uma nova espécie foi caracterizada, passando a ser conhecida como *C. parvum*, que também foi encontrada no intestino delgado de coelhos.

Apesar destas primeiras descobertas, *Cryptosporidium* não foi associado a nenhuma patologia. Como não havia, portanto, interesse médico, veterinário ou econômico, não foram observadas novas informações acerca deste gênero até 1955,

quando *C. meleagridis* foi descrito e apontado como causador de diarreia e de baixa taxa de mortalidade em perus entre 10 e 14 dias de vida (SLAVIN, 1955). Na década de 1970, *Cryptosporidium* foi associado à diarreia em bovinos (PANCIERA et al., 1971) e um pequeno interesse sobre este gênero aconteceu, mas ainda não foi o suficiente para implementar novos estudos.

Os primeiros casos humanos de criptosporidiose foram relatados ainda na década de 1970 por dois grupos de pesquisa independentes, após biópsia e microscopia dos pacientes. Nime et al. (1976) descreveram a doença em uma menina de 3 anos de idade, que apresentava diarreia aguda, severa e auto-limitante. Meisel et al. (1976), por sua vez, observaram a presença dos protozoários em um paciente imunodeprimido de 39 anos com diarreia aquosa severa. Ambos os pacientes viviam em ambiente rural, e em proximidade de animais. Os casos seguintes foram em pacientes que não haviam tido contato com animais: um garoto de 9 anos com hipogamaglobulinemia congênita (LASSER et al., 1979) e uma paciente de 52 anos que tinha sido submetida à transplante renal (WEISBURGER et al., 1979). Concomitantemente, vários casos de criptosporidiose vinham sendo descritos em animais.

O grande interesse no estudo da criptosporidiose aconteceu de fato, quando foram relatados vários casos da doença em humanos portadores do vírus da SIDA, que apresentavam diarreia severa e prolongada (CASEMORE et al., 1985). A partir deste fato, vários artigos científicos foram publicados, muitos deles com descrição da doença em humanos e animais, assim como os relacionados aos métodos de diagnóstico.

Em uma das epidemias mais marcantes de criptosporidiose humana até o momento, aproximadamente 403.000 pessoas (25% dos habitantes) foram contaminadas pelo protozoário em Milwaukee, Wisconsin, nos EUA em 1993, onde foram gastos 31,7 milhões de dólares em custos médicos, sendo que o prejuízo total ao país chegou aos 96,2 milhões (CORSO et al., 2003). A causa deste surto foi atribuída à contaminação de uma, das duas centrais de abastecimento de água, que era responsável pela distribuição a aproximadamente 800.000 habitantes da cidade (MackENZIE et al., 1994).

A partir de então, o público em geral, agências de saúde, grupos de agricultores e de meio ambiente, fornecedores de água potável e outros, demonstraram preocupação e buscaram ampliar os conhecimentos acerca da biologia básica de espécies do gênero *Cryptosporidium* com ênfase no desenvolvimento de métodos de recuperação e detecção de oocistos e na prevenção e tratamento da doença (YODER e BEACH, 2010).

Com o avanço dos métodos moleculares de diagnóstico e identificação das espécies e genótipos, os estudos acerca do agente etiológico, assim como dos aspectos epidemiológicos, genômicos e bioquímicos continuam.

2.2 TAXONOMIA

Cryptosporidium é um protozoário pertencente ao Filo Apicomplexa, Classe Coccidea, Ordem Eucoccidiorida, Família Cryptosporidiidae e Gênero *Cryptosporidium* (Quadro 1). Todos os membros deste gênero são parasitos intracelulares obrigatórios (FAYER, 2007).

Quadro 1. Taxonomia do gênero *Cryptosporidium*.

Reino	Protozoa	<i>Predominantemente unicelular; a maioria possui cristas mitocondriais, complexo de Golgi e peroxissomas.</i>
Filo	Apicomplexa	<i>Endosimbionte unicelular com complexo apical tipicamente composto por anéis polares, roptrias, micronemas e geralmente conóide; microtúbulos são comuns.</i>
Classe	Coccidea	<i>Oocistos geralmente contém esporozoítos formados por esporogonia. Reprodução tanto sexual quanto assexual.</i>
Ordem	Eucoccidiorida	<i>Merogonia; infecta vertebrados e invertebrados.</i>
Família	Cryptosporidiidae	<i>Desenvolvimento intracelular e extracitoplasmático; encontrado nas quatro classes de vertebrados; ciclo de vida monoxeno.</i>
Gênero	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Quatro esporozoítos e esporocisto ausente.</i>

Todos os organismos pertencentes ao Filo Apicomplexa são parasitos, sendo que alguns deles são causadores de doenças importantes tanto em humanos quanto em animais, tais como a toxoplasmose (*Toxoplasma gondii*), a malária (*Plasmodium* spp.), a eimeriose (*Eimeria* spp.), entre outras. A grande maioria possui um complexo ciclo biológico, com estágios sexuais e assexuais de acordo com cada uma das espécies (XIAO et al., 2004).

Mais de 150 espécies de mamíferos, incluindo humanos, assim como pássaros, répteis, anfíbios e peixes são parasitados por espécies do gênero *Cryptosporidium* (PLUTZER e KARANIS, 2009).

Até o presente momento, já foram relatadas 20 espécies (Quadro 2) e mais de 60 genótipos diferentes de *Cryptosporidium* (FAYER, 2010; FAYER e SANTÍN, 2009; FAYER et al., 2010). Para a nomeação de novas espécies, são necessários dados morfológicos e morfométricos; caracterização genética; demonstração de especificidade com hospedeiro natural ou experimental, e; estar de acordo com regras do ICZN (XIAO et al., 2004). Os genótipos, por sua vez, são nomeados após terem sido observadas diferenças substanciais na sequência de nucleotídeos de um gene, e a análise filogenética elimina a possibilidade de que estas diferenças sejam devido a heterogeneidade entre as cópias do gene ou por variações intragenotípicas (PLUTZER e KARANIS, 2009).

Quando mais dados forem disponibilizados sobre determinado genótipo, uma designação taxonômica poderá ser realizada com mais segurança. As espécies hoje conhecidas como *C. bovis* e *C. suis* originalmente não possuíam descrições adequadas e eram consideradas genótipos de *C. parvum* até que dados moleculares e informações morfológicas foram obtidas, assim como foram conduzidos estudos de transmissão com os hospedeiros (FAYER et al., 2005; RYAN et al., 2004). Mais recentemente, o genótipo cervídeo foi devidamente caracterizado e agora é conhecido como *C. ubiquitum* (FAYER et al., 2010).

Além das espécies reconhecidas nos dias de hoje, vários outros nomes para espécies de *Cryptosporidium* já foram propostos. Entretanto, a ausência de estudos de transmissão cruzada, dados morfológicos ou re-análise das descrições resultaram em

Quadro 2. Espécies válidas de *Cryptosporidium*.

Espécie	Hopedeiro principal	Local de infecção
<i>C. andersoni</i> (2000)	Bovinos domésticos	Abomaso
<i>C. baileyi</i> (1986)	Galinhas, codornas	Cloaca, bursa, traquéia
<i>C. bovis</i> (2005)	Bovinos domésticos	Intestino delgado
<i>C. canis</i> (2001)	Cães domésticos	Intestino delgado
<i>C. fayeri</i> (2008)	Marsupiais	Intestino delgado
<i>C. felis</i> (1979)	Gatos domésticos	Intestino delgado
<i>C. fragile</i> (2008)	Anfíbios	Estômago
<i>C. galli</i> (1999)	Galinhas	Proventrículo
<i>C. hominis</i> (2002)	Homem	Intestino delgado
<i>C. macropodum</i> (2008)	Canguru cinza	Intestino delgado
<i>C. meleagridis</i> (1955)	Perus	Intestino delgado
<i>C. muris</i> (1910)	Camundongos	Estômago
<i>C. parvum</i> (1912)	Camundongos	Intestino delgado
<i>C. ryanae</i> (2008)	Bovinos	Intestino delgado
<i>C. serpentis</i> (1977)	Cobras	Estômago
<i>C. suis</i> (2004)	Suínos domésticos	Intestino
<i>C. ubiquitum</i> (2010)	Bovinos	Intestino delgado
<i>C. varanii</i> (1995)	Lagartos	Estômago e intestino
<i>C. wrairi</i> (1971)	Cobaias	Intestino delgado
<i>C. xiaoi</i> (2009)	Ovinos	Intestino delgado

invalidação destes nomes, tais como *C. ameivae*, *C. anserinum*, *C. nasorum*, e *C. tyzzeri*. Outras espécies são inválidas, porque foram identificadas erroneamente e foi descoberto que possuem características de oocistos ou esporocistos de outros gêneros, como é o caso de *C. crotali*, *C. ctenosauris*, *C. lampropeltis* e *C. vulpis*, que são, na verdade, espécies de *Sarcocystis*. *Cryptosporidium agni*, *C. cuniculus*, *C. garnhami* e *C. rhesi* são sinônimos de *C. parvum*. *Cryptosporidium saurophilum*, atualmente é conhecido como *C. varanii*.

Cryptosporidium pestis, espécie descrita por Slapeta et al., 2006 em bovinos, foi nomeada fora das regras do ICZN e, portanto, também não é considerada como uma espécie válida.

2.3 ESTRUTURA

A forma infectante de *Cryptosporidium*, o oocisto, possui uma variação entre 3,3 a 8,4 μm de diâmetro e uma parede dupla com cerca de 49 nm de espessura (HARRIS e PETRY, 1999). Possui quatro esporozoítos no seu interior, sem a presença de esporocisto (TYZZER, 1907).

Em torno de um dos pólos é observada uma sutura, similar à observada na parede do oocisto de *Sarcocystis* e *Toxoplasma*. Esta sutura, que é sensível à tripsina e aos sais biliares, vai se romper durante o processo de desencistamento e é por onde os esporozoítos vão sair de seu interior (SMITH et al., 2005). Além dos esporozoítos, são encontrados também o corpo residual, que contém um grande corpo lipídeo, muitos grânulos de amilopectinas, inclusões de proteínas cristalinas e ribossomos (HARRIS et al., 2004).

Os esporozoítos são similares aos encontrados em outros coccídios. Possuem um formato de vírgula com duas extremidades claramente distintas, nas quais a apical é estreita e a posterior é arredondada (TYZZER, 1912). Em seu interior, são encontradas organelas típicas do filo. Os microtúbulos se originam no colar apical e têm fundamental importância no desencistamento e no ancoramento e invasão da célula alvo (SMITH et al., 2005). O complexo apical consiste nos anéis polares, os conóides, roptrias, micronemas e grânulos densos (SMITH et al., 2005). Possuem um único núcleo em sua porção posterior, onde também se localizam o complexo de Golgi, o retículo endoplasmático, os grânulos de amilopectina, os ribossomos e os corpos cristalóides, cuja origem ou função ainda não foram entendidos (TETLEY et al., 1998).

2.4 TRANSMISSÃO

A forma de transmissão deste agente etiológico ocorre pela via fecal-oral, através da ingestão do oocisto (TZIPORI e WARD, 2002). A água é o principal veículo de transmissão. Inclusive, as mais graves epidemias relacionadas à criptosporidiose descritas até o momento tiveram a água, seja ela de consumo ou de recreação, como o principal veículo de transmissão (SUNNOTEL et al., 2006). As infecções de origem alimentar são geralmente associadas à contaminação de alimentos com água de irrigação contaminada (SMITH et al., 2007). A possibilidade de infecção também aumenta com o contato próximo com animais infectados, ou mesmo durante o manejo de animais de produção (TZIPORI e WARD, 2002).

2.5 CICLO BIOLÓGICO

A fase endógena do ciclo biológico de *Cryptosporidium* se inicia após a ingestão do oocisto por um hospedeiro adequado e, uma vez dentro do organismo deste hospedeiro, os quatro esporozoítos vão se desencistar através da sutura do oocisto (SMITH et al., 2005) (Figura 1; **a**, **b**).

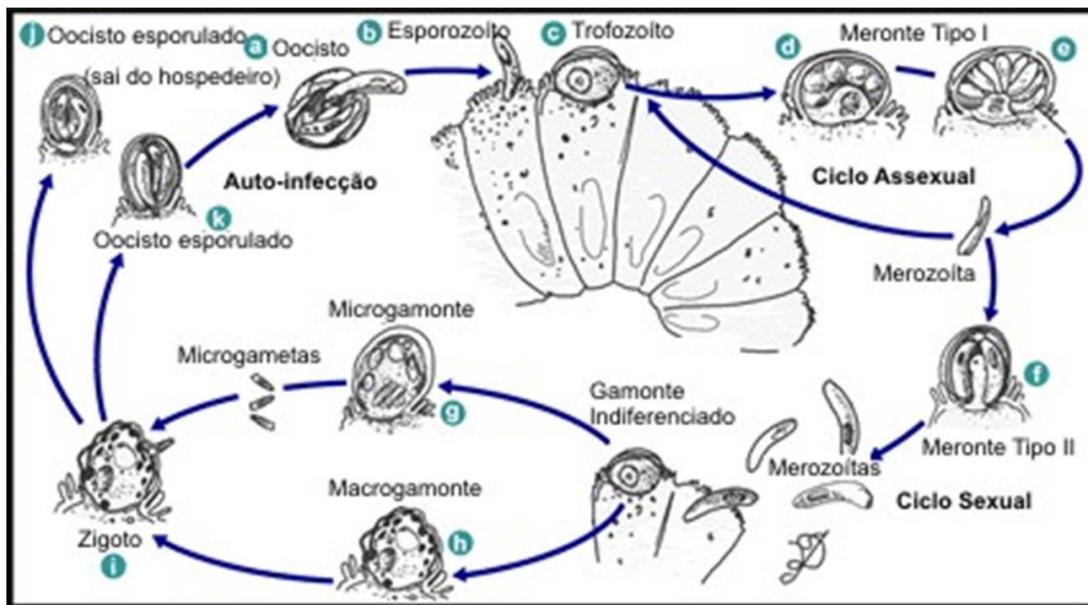


Figura 1. Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. As legendas de cada etapa são descritas no texto (Adaptado de CDC, 2010).

Foi demonstrado em condições experimentais, que estes esporozoítos podem se desencostar até mesmo em soluções de água morna (FAYER et al., 1990). Isto explica as incomuns infecções em sítios fora do trato gastrointestinal, tais como a conjuntiva ocular e o trato respiratório.

Após o desencistamento, os esporozoítos vão se aproximar da superfície da célula do hospedeiro e iniciam o processo de infecção de forma ativa (WETZEL et al., 2005). Os esporozoítos ligados à membrana, inicialmente em formato de vírgula, vão se tornando ovais ou esféricos e é observada a formação de vacúolos que se agrupam e circundam o parasito, formando o vacúolo pré-parasitóforo. Este se funde com a membrana da célula do hospedeiro, formando uma interface hospedeiro-parasito (HUANG et al., 2004). A membrana celular circunda este vacúolo, dando origem ao vacúolo parasitóforo (UMEMIYA, et al., 2005). Importante ressaltar que este vacúolo parasitóforo não está em contato direto com o citoplasma da célula; dessa forma ele é intracelular e extracitoplasmático. Durante este processo de infecção, que em cultura celular demora cerca de 15 minutos (LUMB et al., 1988), o esporozoíto vai se tornando esférico e passa a ser chamado de trofozoíto (Figura 1; c).

Os trofozoítos vão entrar em processo de multiplicação assexual, também chamado de esquizogonia, a partir da divisão nuclear, originando merontes do Tipo I com seis a oito merozoítos em seu interior (Figura 1; **d**, **e**). Estes merozoítos vão infectar novas células adjacentes e vão se desenvolver em novos merontes do Tipo I, ou em merontes do Tipo II (Figura 1; **f**), que por sua vez possuem apenas quatro merozoítos (SMITH et al., 2005).

Os merozoítos formados a partir dos merontes do Tipo II vão dar início ao estágio de reprodução sexual, ou gametogonia, ao infectar novas células hospedeiras, nas quais vão se diferenciar em microgamontes e macrogamontes (TYZZER, 1910). Os microgamontes (Figura 1; **g**) se tornam multinucleados e cada núcleo é incorporado a um microgameta, que é equivalente a uma célula espermatozóide. Os macrogamontes (Figura 1; **h**) continuam uninucleados e são equivalentes a um óvulo. Os microgametas liberados precisam se ligar e penetrar em um macrogametócito para dar início ao processo de fertilização (Figura 1; **i**) (TYZZER, 1910). Em seguida, uma parede vai se formar em torno do macrogametócito e o núcleo 2N deste entra em processo de meiose dando origem a quatro esporozoítos 1N (SMITH et al., 2005).

Os oocistos poderão ter parede espessa, que são eliminados para o meio externo juntamente com as fezes do hospedeiro reiniciando a fase exógena do ciclo (Figura 1; **j**), ou de parede delgada, que podem romper-se no próprio intestino do hospedeiro, causando uma auto-infecção (Figura 1; **k**) (FAYER et al., 2000; TYZZER, 1910). Dessa forma em pacientes imunossuprimidos, nos quais o sistema imunológico não tem mecanismos para combater a doença, o parasitismo pode permanecer por um longo período de tempo sem que o indivíduo precise ser exposto novamente a um oocisto (de GRAAF et al., 1999). Os oocistos formados no trato respiratório vão ser eliminados através da respiração ou nas secreções nasais (RYAN e XIAO, 2007).

Oocistos de outros coccídios, tais como os de *Eimeria*, *Hammondia*, *Isospora*, e *Toxoplasma* são eliminados na forma não esporulada e não se tornam infecciosos até a esporulação, formando esporozoítos já fora do corpo do hospedeiro. Como *Cryptosporidium*, a esporogonia de *Sarcocystis* acontece internamente. No entanto, o ciclo biológico se difere do ciclo de *Cryptosporidium*, pois *Sarcocystis* é obrigatoriamente heteroxeno, ou seja, a fase sexual e os oocistos se desenvolvem nos

hospedeiros definitivos, e os esporozoítos são infectivos apenas no hospedeiro intermediário, onde a multiplicação assexuada ocorre e os cistos de tecidos vão se desenvolver (DUBEY et al., 1988).

O período pré-patente, menor período de tempo após os oocistos infectantes terem sido ingeridos até os primeiros oocistos formados começarem a ser eliminados, varia entre as espécies de *Cryptosporidium*: para *C. parvum* varia entre 4 a 22 dias para humanos (DuPONT et al., 1995) e 2 a 7 dias em bezerros (TZIPORI et al., 1983), 2 a 9 dias para *C. suis* em suínos (ENEMARK et al., 2003), 6 a 7 dias para *C. ubiquitum* em ovinos (FAYER et al., 2010) e 10 a 12 dias para *C. bovis* em bovinos (FAYER et al., 2005). O período patente é a duração da infecção, que geralmente é caracterizada pelos dias enquanto o oocisto é eliminado. Períodos patentes experimentalmente determinados variam de 1 a 20 dias para *C. parvum* em humanos (DuPONT et al., 1995) e 1 a 12 dias para bezerros (TZIPORI et al., 1983), 9 a 15 dias para *C. suis* em suínos (ENEMARK et al., 2003), 11 a 12 dias para *C. ubiquitum* em ovinos (FAYER et al., 2010) e 18 dias para *C. bovis* em bovinos (FAYER et al., 2005).

2.6 CRIPTOSPORIDIOSE

2.6.1 Em humanos

A criptosporidiose é relatada tanto em pacientes imunocompetentes quanto em imunodeprimidos, porém as manifestações clínicas vão variar de acordo com o estado imunológico e nutricional do hospedeiro (LAURENT et al., 1999).

Em hospedeiros imunocompetentes, as infecções por *Cryptosporidium* são esporádicas podendo ocorrer com mais frequência em crianças e adultos. O principal sinal clínico observado é uma diarreia aguda auto-limitante (NAVIN, 1985), que se inicia após um período de incubação de 3 a 14 dias. Esta diarreia é aquosa, volumosa e com mau cheiro que dura cerca de 6 a 14 dias, embora alguns pacientes tenham uma

doença mais prolongada. Além disso, as infecções podem resultar em doença gastrointestinal caracterizada por mal-estar ou fadiga, anorexia, vômitos, dor abdominal e cólica. Outros sinais clínicos, tais como calafrios, sudorese, mialgia, dores de cabeça e febre baixa, ainda podem ser observados (MacKENZIE et al., 1994; BUSHEN et al., 2007).

Por outro lado, em pacientes imunocomprometidos, a criptosporidiose geralmente é mais grave, na qual a diarréia poderá ser muito mais severa ou até mesmo fulminante, principalmente em pacientes portadores do vírus da SIDA (HIV - positivos) (FAYER et al., 2000; SUNNOTEL et al., 2006). Nestes pacientes a doença é prevalente, particularmente naqueles com uma baixa contagem de linfócitos CD_4^+ (abaixo de 200 células/mm³) (POZIO et al., 1997; HUNTER e NICHOLS, 2002). Outros hospedeiros de risco são aqueles com neoplasias, transplantados e em tratamento com hemodiálise (GENTILE et al., 1991; SREEDHARAN et al., 1996; TANYUKSEL et al., 1995; TURKCAPAR et al., 2002). A perda de peso é comum na criptosporidiose crônica. Em uma epidemia em Nevada, EUA, 1994, em que foi associada à transmissão através do fornecimento de água, dois terços dos pacientes infectados com o vírus HIV desenvolveram doença crônica e tiveram perda de peso, em média, de 13.6kg (GOLDSTEIN et al., 1996). A maioria dos pacientes afetados morreu em seis meses do início da epidemia e 20, de 32 pacientes, tiveram a criptosporidiose apontada como a causa da morte em seus atestados de óbito.

2.6.2 Em Suínos

Os primeiros relatos de infecção por *Cryptosporidium* em suínos foram publicados em 1977 nos EUA (BERGELAND, 1977; KENNEDY et al., 1977). Em Dakota do Sul, exames histopatológicos de tecidos intestinais de leitões com enterite necrótica identificaram um leitão com *Cryptosporidium* em estágio de desenvolvimento nas superfícies vilosas (BERGELAND, 1977). Em Kansas, secções de tecidos de três suínos, inoculados com conteúdo de cólon de suínos com disenteria, também tinham

estádios de *Cryptosporidium* na borda microvilosa das células epiteliais (KENNEDY et al., 1977). Subsequentemente, a criptosporidiose tornou-se cosmopolita (ATWILL et al., 1997; BOMFIM e LOPES, 1998; GUSELLE et al. 2003; RYAN et al. 2003a; WIELER et al. 2001; YU e SEO, 2004; ZINTL et al. 2007). A criptosporidiose suína é geralmente assintomática, porém pode causar perda econômica significativa (BILIC; BILKEI, 2006), além de representar uma fonte de infecção para humanos e outros animais que tenham contato direto ou indireto com as fezes contaminadas de suínos (XIAO et al., 2002). Em média, o período pré-patente varia de 1 a 9 dias e o período patente de 4 a 29 dias. Os sinais clínicos, incluindo inapetência, depressão, vômitos e diarreia, foram observados após infecção experimental de leitões com oocistos derivados de bezerros (MOON e BEMRICK, 1981) Em cinco leitões com diarreia, *Cryptosporidium* foi o único enteropatógeno identificado (BERGELAND e HENRY, 1982).

A criptosporidiose pode ser oportunista e, em casos de imunossupressão causados por outros agentes patogênicos, tais como o Circovirus suíno do tipo 2, o quadro de infecção por *Cryptosporidium* poderá ser exacerbado (NÚÑEZ et al., 2003).

2.6.3 Em Ovinos

Nos ovinos, a criptosporidiose se apresenta como uma diarreia moderada a severa, com aparência líquida, amarelada e com forte odor, perda de peso, depressão, dor abdominal e mortes, acometendo geralmente animais jovens, com menos de um mês de idade (CASTRO-HERMIDA, et al., 2007; GEURDEN et al., 2008; QUÍLEZ et al., 2008; SANTÍN et al., 2007). Espécies de *Cryptosporidium* já foram identificadas em fezes de ovinos através de técnicas moleculares nos EUA, Reino Unido, Itália, Bélgica, Espanha, Tunísia, China, Austrália e Brasil (FAYER e SANTÍN, 2009; FÉRES et al., 2009; GEURDEN et al., 2008; MUELLER-DOBLIES et al., 2008; PAOLETTI et al., 2009; QUÍLEZ et al., 2008; SOLTANE et al., 2007; WANG et al., 2010; YANG et al., 2009).

As seguintes espécies e genótipos são atualmente reconhecidos em ovinos: *C. parvum*, *C. xiaoi*, *C. hominis*, *C. suis*, *C. andersoni*, *C. ubiquitum*, genótipo suíno tipo II e

C. fayeri (FAYER et al., 2010; FAYER e SANTÍN, 2009; MAJEWSKA et al., 2000; RYAN et al., 2005; RYAN et al., 2008), mas apenas *C. parvum*, *C. xiaoi* e *C. ubiquitum* são os principais responsáveis pelas infecções em ovinos. As outras espécies foram identificadas apenas em um número pequeno de animais (FAYER e SANTÍN, 2009).

Considerando que os ovinos albergam espécies zoonóticas já diagnosticadas em humanos com sintomatologia clínica da criptosporidiose (principalmente *C. parvum* e *C. hominis*), estes animais são considerados como uma potencial fonte de infecção de *Cryptosporidium* para a população humana tanto por transmissão direta, quanto por contaminação do ambiente (CASTRO-HERMIDA et al., 2007; GEURDEN et al., 2008; PAOLETTI et al., 2009).

2.6.4 Em Bovinos

O principal sinal clínico nos bovinos é uma diarreia aquosa profusa, que pode ainda ser acompanhada de anorexia, fraqueza, depressão e febre, que contribuem para significantes perdas econômicas para os produtores. Esta sintomatologia, no entanto, é observada principalmente em bezerros, que podem vir a eliminar até 10^7 oocistos por grama de fezes (FAYER et al., 1998), contaminando o meio-ambiente de forma significativa e representando, dessa forma, uma fonte de infecção para outros hospedeiros que entrem em contato com estas fezes direta ou indiretamente. A infecção nos adultos geralmente é assintomática, porém, já foram associados à gastrite e queda na produção de leite e redução no ganho de peso (ROBINSON et al., 2006).

Quatro espécies são consideradas comuns em bovinos: *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. bovis* e *C. ryanae*. Estudos demonstram haver uma relação entre a faixa etária do animal e a espécie envolvida na infecção. Animais jovens e em fase de amamentação são mais frequentemente acometidos pela espécie zoonótica *C. parvum*, enquanto que nos animais desmamados e em fase adulta, as espécies *C. bovis* e *C. andersoni* são as mais observadas respectivamente (SANTÍN et al., 2004) Além destas quatro espécies, outras espécies e genótipos de *Cryptosporidium* também já foram

relatadas em bovinos de forma esporádica, e ainda não são consideradas como de importância epidemiológica.

2.7 MÉTODOS DE DETECÇÃO

A detecção dos oocistos em águas pode ser realizada com grandes volumes (~1000 L) ou em volumes pequenos (10 - 50 L), e são baseados em filtração, IMS e detecção dos oocistos através de imunofluorescência (SMITH e NICHOLS, 2010). Entretanto, devido ao pequeno tamanho dos oocistos, os filtros utilizados devem ter porosidade de 1 a 2 μm , o que resulta em grande acúmulo de partículas, conseqüentemente dificultando o diagnóstico, principalmente em águas coletadas do ambiente.

O diagnóstico da criptosporidiose é realizado principalmente através do exame fecal (YODER e BEACH, 2010). A princípio, utilizavam-se apenas técnicas de microscopia, nas quais eram realizados esfregaços diretos com coloração (SMITH, 2008). Com o avanço dos métodos de diagnóstico, as amostras eram submetidas a técnicas de concentração de oocistos com soluções hiper concentradas, com a finalidade de aumentar a sensibilidade de detecção. Tempos depois, técnicas de IFAT se tornaram o método de escolha e eram mais sensíveis que os métodos tradicionais, além de facilitar a visualização do oocisto (QUÍLEZ et al., 1996). Entretanto, os métodos baseados em microscopia necessitam treinamento, são tediosos e têm sensibilidade geralmente baixa (SANTÍN et al., 2004). Além disso, a identificação da espécie se torna impossível devido ao reduzido tamanho dos oocistos, além da grande semelhança morfométrica entre oocistos de espécies diferentes (SUNNOTEL et al., 2006).

Os testes sorológicos para detecção de anticorpos, tais como ELISA e Western Blot, além de também não possibilitarem a identificação das espécies envolvidas na infecção, indicam apenas exposições passadas. O teste de ELISA em amostras fecais também pode ser utilizado para identificar infecções correntes sem, no entanto, realizar a identificação da espécie (SANTÍN e TROUT, 2007)

Apesar de restritos a laboratórios especializados, os atuais métodos de diagnóstico baseados em técnicas moleculares são altamente sensíveis, apresentando resultados com alta confiabilidade (SANTÍN et al., 2004). São capazes de detectar oocistos de *Cryptosporidium* em amostras em que normalmente seriam perdidos pelos métodos tradicionais de microscopia (SCORZA et al., 2003; McGLADE et al., 2003; SANTÍN et al., 2004).

A primeira PCR realizada para o diagnóstico da criptosporidiose foi realizada por Laxer et al., (1991), e desde então muitas técnicas baseadas em biologia molecular foram descritas, entre elas a nested PCR, Multiplex PCR, PCR-RFLP e o sequenciamento de DNA (SMITH, 2007). Todas estas técnicas têm como alvo amplificar genes específicos na cadeia de DNA de *Cryptosporidium*. Os genes alvo mais comumente utilizados nas pesquisas acerca do diagnóstico do parasito são: 18S rRNA, HSP70, COWP e o gene da actina (SULAIMAN et al., 2000; 2002; XIAO et al., 1999). Entretanto, os genes HSP70, COWP e da actina apresentam uma grande diversidade na sequência de nucleotídeos entre as muitas espécies de *Cryptosporidium*, o que torna difícil o desenho de iniciadores de PCR específicos baseado nestes genes, limitando, portanto, seu uso no diagnóstico molecular da criptosporidiose (SMITH, 2007). O gene 18S rRNA, por sua vez, tem como vantagem o grande número de cópias no DNA de *Cryptosporidium* e a presença de sequências de nucleotídeos que se mantém conservadas mesmo em espécies diferentes. Isso facilita o desenho de iniciadores, e conseqüentemente, a própria PCR (XIAO et al., 1999).

A técnica da PCR consiste basicamente em fazer cópias de uma sequência específica do DNA de um organismo *in vitro*, utilizando para isso, os elementos básicos de replicação natural do DNA (POWLEDGE, 2004). O resultado desta amplificação é facilmente visualizado através da eletroforese em gel de agarose (BRODY e KERN, 2004).

Para a realização da PCR são necessários sete componentes essenciais: (1) uma enzima DNA polimerase termoestável, na qual a *Taq* polimerase é a enzima de escolha na PCR de rotina; (2) iniciadores de oligonucleotídeos, que garantem a eficiência e especificidade da reação; (3) desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs); (4)

cátions divalentes, geralmente o Mg^{2+} ; (5) uma solução tampão, para a manutenção do pH; (6) cátions monovalentes; e (7) DNA molde (SAMBROOK et al., 2001).

Cada ciclo da reação consiste em três etapas: desnaturação do DNA molde pelo aquecimento, pareamento (ou anelamento) dos iniciadores à seqüência alvo de fita simples e extensão dos iniciadores pela DNA polimerase termoestável. A desnaturação separa a fita dupla do DNA em duas fitas simples e, quando em reações catalizadas pela *Taq* polimerase para *Cryptosporidium*, ela ocorre a 95°C, que é a mais alta temperatura que esta enzima pode suportar sem sofrer prejuízos em sua estrutura (POWLEDGE, 2004; SANTÍN et al., 2004). A temperatura da fase seguinte, de pareamento, é considerada crítica para a reação. Se esta for muito alta, os iniciadores vão se ligar de forma errônea e o rendimento do DNA amplificado será baixo e, caso seja muito baixa, podem ocorrer pareamentos não-específicos, resultando em amplificação de segmentos não desejados (POWLEDGE, 2004). A temperatura ideal no diagnóstico de *Cryptosporidium* geralmente está em torno de 59°C (SANTÍN et al., 2004). Dois iniciadores são utilizados simultaneamente na reação: um tem a finalidade de sintetizar a seqüência alvo em uma direção (fita 5' → 3') e outro para o sentido contrário (fita complementar – 3' → 5'). Com os iniciadores ligados às fitas simples de DNA, a temperatura é elevada a 72°C, e a DNA polimerase termoestável vai então se ligar aos iniciadores, começando o processo de extensão da cadeia. Após esta etapa o ciclo é reiniciado e, do terceiro ciclo em diante, o segmento de DNA desejado (chamado também de *amplicon*) é amplificado em progressão geométrica (POWLEDGE, 2004).

A contaminação é um problema sério durante a reação da PCR, pois diversas substâncias utilizadas durante a extração do DNA são inibitórias ao funcionamento da DNA polimerase e à ligação do iniciador. Além disso, a contaminação com DNA exógeno pode acarretar o surgimento de bandas não desejadas no gel de agarose (ALLISON, 2006). Como o diagnóstico da criptosoridiose é realizado principalmente a partir de amostras fecais, este problema é ainda mais grave. O ideal é realizar o diagnóstico em laboratórios voltados somente para a execução da PCR, porém, normalmente, apenas uma parte dos laboratórios é separada para a execução da PCR (POWLEDGE, 2004). Ao se constatar a contaminação, como o aparecimento de uma banda de DNA amplificado na coluna correspondente ao controle negativo, deve-se

descartar e descontaminar os equipamentos, utilizando-se luz ultravioleta, por exemplo. Além da contaminação, outro problema que afeta o rendimento da técnica de PCR são as ligações inespecíficas entre o iniciador e o DNA molde (ALLISON, 2006).

A técnica de Nested PCR consiste em utilizar os produtos da reação da PCR em uma segunda reação de PCR (SAMBROOK et al., 2001). Dessa forma, são utilizados os produtos da amplificação realizada pelos primeiros iniciadores, como um molde para uma segunda amplificação, realizado com outro par de iniciadores que se anelam com seqüências internas ao primeiro amplificado. A utilização desta técnica no diagnóstico de *Cryptosporidium* é recomendada, pois aumenta ainda mais a sensibilidade da PCR, conseguindo detectar oocistos mesmo em amostras que contém quantidade muito pequena destes (SANTÍN et al., 2004). Utilizando-se os iniciadores descritos por Xiao et al. (1999) para o gene 18S rRNA, a primeira amplificação gera um produto de 1325pb, enquanto que os iniciadores internos amplificam um produto de cerca de 826pb.

Pensa-se que as infecções mistas por *Cryptosporidium* são incomuns, devido aos poucos relatos existentes. Entretanto, é de conhecimento que esse fato ocorre (CAMA et al., 2006; TANRIVERDI et al., 2003). O método de diagnóstico tradicional da PCR normalmente não detecta a presença de infecções mistas, pois a amplificação vai acontecer preferencialmente no gene da espécie ou genótipo de *Cryptosporidium* predominante na infecção, o que pode até mesmo comprometer o entendimento da epidemiologia da doença em humanos e animais (SANTÍN e ZARLENGA, 2009). Em áreas endêmicas e nos imunodeprimidos, as infecções mistas podem ser mais comuns do que se imagina (McLAUHLIN et al., 2000).

Para contornar este problema, a *Multiplex* PCR pode ser utilizada. Esta técnica consiste na utilização de mais de um par de iniciadores em uma mesma PCR. Desta forma, vários segmentos de DNA alvo são amplificados simultaneamente, economizando tempo, diminuindo gastos e sendo capaz de detectar mais de uma espécie no caso de infecções mistas, pois cada par de iniciador vai amplificar uma sequência específica de cada espécie (SAMBROOK et al., 2001). Entretanto, esta técnica ainda está sendo aperfeiçoada no diagnóstico de *Cryptosporidium* devido a sua dificuldade de aplicação, uma vez que exige que todos os iniciadores tenham

temperaturas de anelamento aproximadas, não interajam entre si e que os fragmentos amplificados tenham tamanhos próximos (SANTÍN e ZARLENGA, 2009).

A PCR-RFLP utiliza enzimas específicas na reação da PCR, que são capazes de clivar uma sequência de nucleotídeos em determinados pontos e, a partir destas clivagens, a espécie de *Cryptosporidium* pode ser identificada em eletroforese em gel de agarose (SAMBROOK et al., 2001; SPANO et al., 1997). Uma das grandes vantagens da PCR-RFLP, é a capacidade de diferenciar espécies sem a necessidade do sequenciamento (SPANO et al., 1997). Por outro lado, ainda é incapaz de diferenciar algumas espécies, tais como *C. felis* e *C. ubiquitum*, por possuírem o mesmo sítio de restrição e permanecendo, portanto, com o mesmo padrão no gel (TROTZ-WILLIAMS et al., 2006).

O sequenciamento tem como objetivo determinar a ordem exata dos nucleotídeos de um determinado segmento de DNA e vem sendo utilizado no diagnóstico da espécie envolvida na infecção por *Cryptosporidium* (SMITH e NICHOLS, 2010). Antes de iniciar as etapas do sequenciamento, as amostras, que já foram previamente submetidas à PCR, deverão ser purificadas. Este procedimento é de extrema importância, pois remove os dNTPs e iniciadores que restaram das reações anteriores, e que poderiam causar interferência nas reações seguintes (SAMBROOK et al., 2001). As amostras são então submetidas a uma nova PCR com formulação específica, sendo que os iniciadores são utilizados em reações independentes para que as duas sequências obtidas possam ser posteriormente alinhadas, visto que são complementares, aumentando dessa forma a acurácia do resultado final (SAMBROOK et al., 2001). A partir da sequência obtida, esta poderá ser submetida ao GenBank pelo BLAST e a identificação da espécie em questão é realizada em apenas alguns segundos (ALTSCHUL et al., 1997).

2.8 PREVENÇÃO, CONTROLE E TRATAMENTO

Os oocistos de *Cryptosporidium* são altamente resistentes aos estresses naturais e a muitos desinfetantes sintéticos e, portanto, são de difícil eliminação do ambiente (YODER e BEACH, 2010). A prevenção deve ser realizada com base no conhecimento da biologia, do ciclo biológico e dos métodos de transmissão da criptosporidiose. Os animais sabidamente infectados devem ser mantidos em locais afastados dos demais, e estas instalações devem ser de fácil desinfecção; os fômites utilizados nestes animais devem ser completamente higienizados ou até mesmo descartados; os tratadores de animais devem ter bons hábitos de higiene e utilizar roupas que possam ser limpas de forma regular, e; cuidados no fornecimento de comida e de água limpas são de fundamental importância, uma vez que a transmissão pela via alimentar ou hídrica é considerada como uma das principais na transmissão da criptosporidiose (CHALMERS e DAVIES, 2010). O acesso de animais selvagens ou de roedores no alojamento dos animais deve ser restringido e mamíferos neonatais devem receber quantidade adequada de colostro ainda cedo em sua vida (YODER e BEACH, 2010).

O tratamento deverá ser de suporte, tanto em humanos quanto em animais, com reidratação e reposição de eletrólitos oral ou parenteral, além de administração de anti-diarréicos. Esta reidratação é ainda mais importante em pacientes jovens ou imunodeprimidos. Em casos de doenças concomitantes, o tratamento específico da doença também deve ser realizado (CHALMERS e DAVIES, 2010).

Atualmente ainda não existem drogas completamente efetivas para o tratamento da criptosporidiose nem em humanos nem em animais (CHALMERS e DAVIES, 2010). Um dos objetivos atuais no tratamento da criptosporidiose é identificar alvos moleculares que possam ser explorados para o combate às infecções. O mapeamento do genoma de *C. parvum* revelou que existe uma grande divergência bioquímica evolucionária entre o gênero *Cryptosporidium* quando comparado aos outros apicomplexas. Muitos alvos de drogas encontrados nestes outros organismos, não são observados em *Cryptosporidium*, tais como o ciclo do manitol, ODC e HXGPRT, o que

ajuda a explicar o porquê destes parasitos serem insensíveis a várias drogas efetivas contra outros coccídios (XIAO e RYAN, 2007).

Desde 2002 a Nitazoxanida, composto benzamida nitrotiazole com amplo espectro de atividade contra patógenos protozoários, helmintos e bacterianos, incluindo flagelados, coccidianos, amebas, nematóides, cestóides e trematódeos, é aprovada pela FDA para o tratamento de infecções por *Cryptosporidium* e *Giardia intestinalis* em crianças e, desde 2004, é utilizada no tratamento de *Giardia* em adultos (FOX e SARAVOLATZ, 2005). No Brasil, é comercializada com o nome Annita[®] (Farmoquímica[®]), e disponibilizada em formulação oral e em comprimidos.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

- Determinar a sensibilidade da técnica de concentração de oocistos utilizada.
- Caracterização molecular das espécies de *Cryptosporidium* encontradas em animais de produção no Estado do Rio de Janeiro.

3.2 ESPECÍFICOS

- Determinar a sensibilidade da técnica de centrífugo-flutuação com sacarose, na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp.
- Diagnosticar oocistos de *Cryptosporidium* spp. através da técnica da nested PCR do gene 18S rRNA, a partir de amostras fecais de suínos, ovinos e bovinos das regiões Norte e Noroeste Fluminense.
- Realizar o sequenciamento de todas as amostras positivas na PCR, para identificação das espécies de *Cryptosporidium*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SENSIBILIDADE

4.1.1 Coleta das amostras e contaminação experimental

Com o objetivo de obter amostras fecais isentas de *Cryptosporidium* spp., foram coletadas amostras de fezes de suínos em baias de uma criação experimental do BARC, da USDA, Beltsville, Maryland, EUA. As fezes foram coletadas diretamente do piso, tomando-se o cuidado de coletar apenas as partes que não estavam em contato com o solo (VÍTOVEC et al., 2006; SUÁREZ-LUENGAS et al., 2007) e, em seguida, foram acondicionadas em recipientes plásticos previamente identificados e transportados ao EMFSL, da mesma instituição, para o processamento. Após a confirmação, através da PCR, da ausência de *Cryptosporidium* spp. em amostras de cada baia, todas as amostras foram misturadas com a finalidade de formar uma mistura. Desta mistura, 40 amostras, cada uma contendo 15 gramas de fezes foram separadas em quatro grupos de 10 recipientes. A cada um destes recipientes foram adicionados oocistos de *C. parvum*, obtidos de um bezerro previamente infectado, em concentrações de 10, 100 e 1.000 oocistos por grama de fezes nos grupos 2 a 4, respectivamente. O grupo 1 não foi contaminado com oocistos e serviu como o grupo controle.

4.1.2 Concentração dos oocistos

Para cada repetição foram adicionados 50 mL de água destilada e, após homogeneização, foram filtradas em tamises com telas de aço com 44 µm de

porosidade. O filtrado foi centrifugado por 10 minutos a $1800 \times g$ (2.500 rpm) em tubos cônicos de 50 mL com tampa rosquiável. Após esta etapa o sobrenadante foi descartado, e o sedimento ressuspenso em água destilada até alcançar um volume de 25 mL; em seguida adicionou-se 12,5 mL de éter para uma nova centrifugação a $1800 \times g$ por 10 minutos. Novamente o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em água destilada até 25 mL e adicionados 25 mL de solução de sacarose (1,1 g/mL). Após homogeneização, os tubos foram centrifugados a $1800 \times g$ por 20 minutos a 4°C . Foram então aspirados 4 mL do sobrenadante e transferidos para tubos cônicos de 15 mL, onde foi adicionada água destilada até completar os tubos e então esta solução foi novamente centrifugada a $1800 \times g$ por 10 minutos e o sobrenadante descartado logo em seguida. O sedimento foi então ressuspenso em 500 μL de água destilada para extração do DNA.

4.1.3 Extração do DNA

Para a extração do DNA foi utilizado o DNeasy Tissue Kit (Qiagen[®]), com algumas modificações em relação ao protocolo sugerido pelo fabricante (SANTÍN et al., 2004). Para cada amostra (50-100 μL) foram adicionados 180 μl de Tampão ATL e 20 μL de proteinase K e, após homogeneização em vortex, foram incubadas a 55°C *overnight*. Após esta etapa as amostras foram novamente homogeneizadas em vortex durante 15s e, em seguida, foram adicionados 200 μl de Tampão AL. Cada amostra foi submetida a uma nova homogeneização e incubada a 70°C por 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 200 μl de etanol (96–100%) em cada tubo de amostra, que foram homogeneizados e o conteúdo transferido para uma coluna DNeasy Mini spin, colocada em tubo de 2 mL. Cada coluna foi centrifugada a $6.000 \times g$ (8.000 rpm) por 1 min e logo após todo o conteúdo do tubo de 2 mL foi descartado. As colunas DNeasy Mini spin foram então colocadas em um novo tubo de 2 mL, adicionados 500 μL de Tampão AW1, e submetidas a nova centrifugação por 1 min a $6.000 \times g$ (8.000 rpm), tendo o conteúdo do tubo de 2 mL novamente descartado. Cada

coluna foi colocada em um novo tubo de 2 mL, adicionados 500 μ L de Tampão AW2, e centrifugados dessa vez por 3 min a 20.000 x *g* (14.000 rpm) com a finalidade de secar a membrana da coluna DNeasy. O conteúdo do tubo de 2 mL foi então descartado.

As colunas DNeasy Mini spin foram colocadas em um novo tubo de 1,5 mL, e foram adicionados 100 μ L de Tampão AE diretamente da membrana da coluna DNeasy com a finalidade de aumentar a concentração de DNA. Após 1 min de incubação em temperatura ambiente, foram então centrifugadas por 1 min a 6000 x *g* (8.000 rpm) para eluição.

4.1.4 Reação em Cadeia da Polimerase

Foi utilizada a técnica de nested PCR, com amplificação em duas etapas de um fragmento de 830 pb do gene 18S rRNA. As sequencias de iniciadores utilizadas estão representadas no Quadro 3.

Quadro 3. Sequencias dos iniciadores utilizados nas reações de nested PCR e seus tamanhos de fragmentos amplificados.

	Iniciadores	Sequências*	Tamanho dos fragmentos (pb)
1ª PCR	CRYPTOF	5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3'	~1300
	CRYPTOR	5'-CCCATTTCTTCGAAACAGGA-3'	
2ª PCR	AL1598	5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3'	~800
	AL3032	5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3'	

* (XIAO et al., 1999)

O procedimento de amplificação foi realizado com os seguintes componentes para a amplificação primária: tampão PCR 1x; $MgCl_2$ (3 mM); dNTP (0,2 mM), Taq (2,5 U) (Qbiogene[®]), BSA (2,5 μ l - 0,1 g/10 mL) e 1 mM de cada um dos iniciadores, em um volume final de 50 μ l. A amplificação secundária continha: tampão PCR 1x; $MgCl_2$ (1,5 mM); dNTP (0,2 mM); Taq (2,5 U), BSA (2,5 μ l - 0,1 g/10 mL) e 1 μ M de cada um dos iniciadores, em um volume final de 50 μ l.

Para a amplificação primária foram realizados os seguintes ciclos no termociclador: 94 °C/3 min; 35 ciclos de 94 °C/45 s, 59 °C/45 s e 72 °C/1 min; e uma extensão final de 72 °C/7 min. Para a amplificação secundária: 94 °C/3 min; 40 ciclos de 94 °C/30 s, 58 °C/90 s e 72 °C/2 min; e uma extensão final de 72 °C/7 min.

4.1.5 Análise da PCR

Os produtos da nested PCR foram analisados em eletroforese de gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio e imerso em tampão TAE 10X em cuba horizontal.

A visualização das bandas foi realizada sob transiluminação ultravioleta em fotodocumentadora (Kodak EDAS 290[®]) após a corrida eletroforética, e os tamanhos dos fragmentos comparados com marcador molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen[®]) e com controles positivo e negativo.

4.2 DIAGNÓSTICO EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO

4.2.1 Coleta das amostras

4.2.1.1 Suínos

Noventa e uma amostras fecais de suínos foram coletadas por conveniência, de criações peri-domiciliares nos municípios de Campos dos Goytacazes (65) e Itaperuna (26), localizados nas regiões norte e noroeste do Estado do Rio de Janeiro respectivamente. As fezes foram coletadas do solo, imediatamente após a defecação (VÍTOVEC et al., 2006; SUÁREZ-LUENGAS et al., 2007), com o cuidado de coletar apenas as porções que não tivesse tido contato direto com o solo. As amostras foram coletadas de suínos entre um e doze meses de idade. Para cada amostra foram utilizados sacos plásticos individuais, que foram identificadas, acondicionadas em caixas isotérmicas (8-10°C) e imediatamente transportadas ao laboratório.

4.2.1.2 Ovinos

Cento e vinte e cinco amostras fecais de ovinos foram coletadas por conveniência, na região norte do Estado do Rio de Janeiro. Os animais da raça Santa Inês foram selecionados por conveniência de 10 propriedades, localizadas nos municípios de Carapebus (6), São João da Barra (2) e São Francisco de Itabapoana (2). As amostras foram coletadas diretamente da ampola retal dos animais e individualmente acondicionadas em sacos plásticos. Após a identificação, foram transportadas ao laboratório em caixas isotérmicas (8-10°C), onde o processamento das mesmas foi realizado em até 24 horas após a coleta.

Todas as amostras foram divididas em dois grupos de acordo com a idade: cordeiros entre 2 a 6 meses de idade (90 animais) e ovelhas acima de 12 meses de idade (35 animais).

4.2.1.3 Bovinos

Sessenta e oito amostras fecais foram obtidas por conveniência de bezerros entre 1 a 12 meses de idade, independentemente da presença de sinais de diarreia, em 12 propriedades localizadas no município de Campos dos Goytacazes. As fezes foram coletadas diretamente da ampola retal com o auxílio de sacos plásticos. Após a identificação, foram então transportadas ao laboratório em caixas isotérmicas (8-10°C), onde o processamento das mesmas foi realizado em até 24 horas após a coleta.

4.2.2 Locais de execução

As técnicas de centrífugo-flutuação com sacarose e a extração do DNA foram realizadas no LCCA do Hospital Veterinário da UENF, pertencente ao CCTA.

As etapas da PCR e o sequenciamento foram realizadas no EMFSL, no BARC, da USDA.

4.2.3 Processamento do material fecal

De cada amostra coletada, foram pesados 15 g para a etapa de concentração dos oocistos. Todas foram processadas de acordo com as técnicas de centrífugo-

flutuação com sacarose, extração do DNA e nested PCR, conforme previamente demonstrado (itens 4.1.2 a 4.1.5).

4.2.4 Sequenciamento

Antes do sequenciamento, o produto da PCR obtido foi purificado com duas enzimas hidrolíticas: Exonuclease I e Shrimp Alkaline Phosphatase, em um tampão especialmente formulado (ExoSAP-IT, USB Corporation). Após a purificação, o produto foi sequenciado em ambas as direções utilizando-se os mesmos iniciadores da segunda PCR em reações de 10 µl contendo Big Dye[®], e analisado pelo aparelho sequenciador ABI 3100 (Applied Biosystems). As sequências foram então alinhadas e examinadas com o software Lasergene (DNASTAR).

As sequências obtidas foram submetidas ao BLAST, para identificação das similaridades com as amostras presentes no GenBank (ALTSCHUL et al., 1997).

5 RESULTADOS

5.1 SENSIBILIDADE

O resultado obtido da PCR das amostras concentradas com sacarose pode ser observado na tabela 1 e figura 2.

Tabela 1. Diagnóstico de *Cryptosporidium parvum*, através do protocolo de Reação em Cadeia da Polimerase do gene 18S rRNA em duas etapas (XIAO et al, 1999) em recipientes contendo 15 g de fezes de suínos, contaminadas com oocistos e posterior concentração por centrífugo-flutuação em solução de sacarose.

REPETIÇÃO	OOCISTOS POR GRAMA DE FEZES			
	0 ^a	10	100	1000
1	-	+	-	+
2	-	-	+	+
3	-	-	-	+
4	-	-	-	-
5	-	-	-	+
6	-	-	+	-
7	-	-	-	+
8	-	-	-	+
9	-	-	+	+
10	-	-	+	+
TOTAL	0%	10%	40%	80%

^a: grupo controle

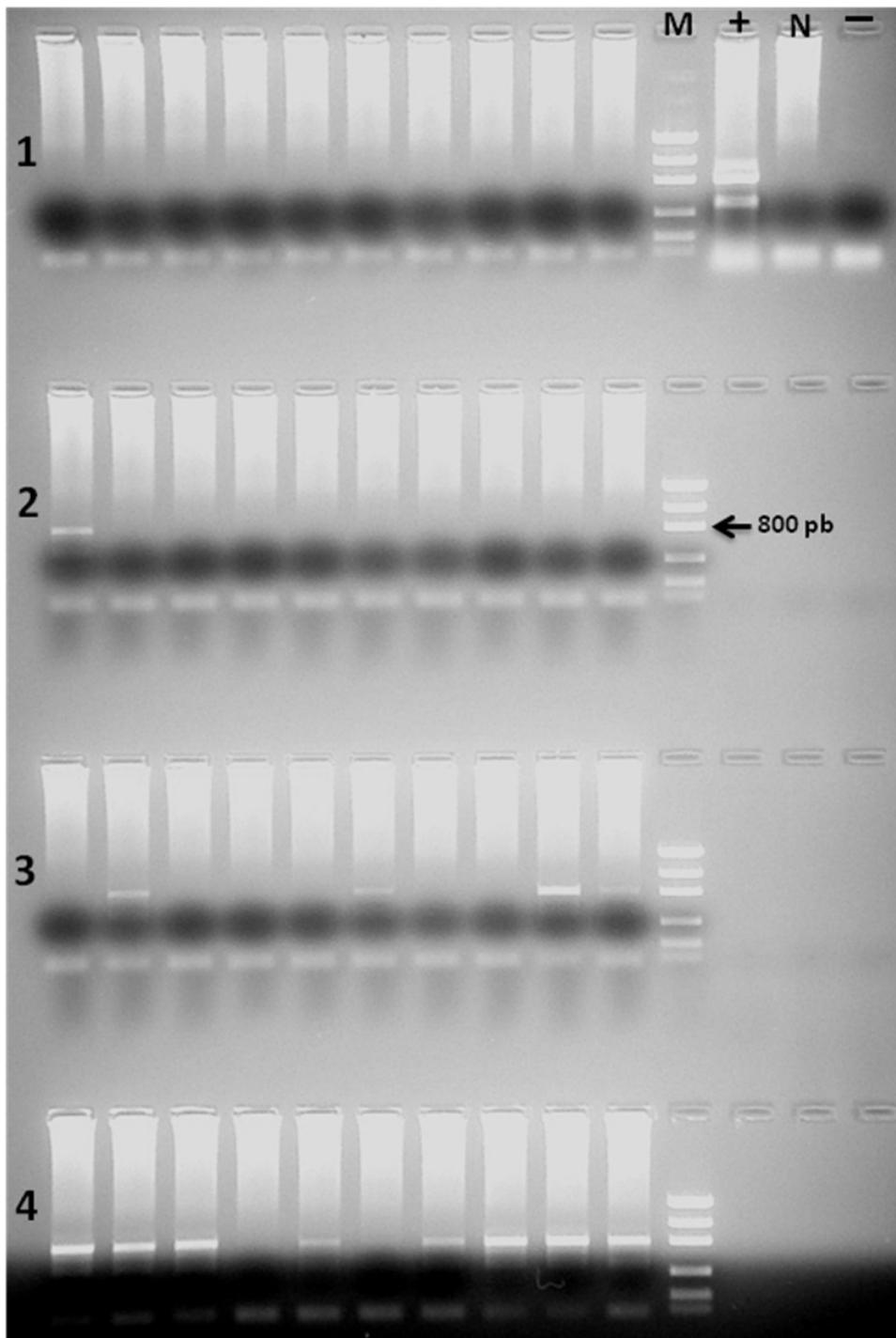


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose (1%) demonstrando os produtos da nested PCR do gene 18S rRNA de oocistos de *Cryptosporidium* spp. concentrados pela técnica de centrifugo-flutuação com sacarose. **1)** grupo controle; **2)** 10 oocistos por grama de fezes; **3)** 100 oocistos por grama de fezes e **4)** 1.000 oocistos por grama de fezes. **M:** marcador molecular; **+**: controle positivo; **N:** controle negativo (*nested*); **-:** controle negativo.

5.2 DIAGNÓSTICO EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO

5.2.1 Suínos

Duas amostras (2,2%) foram diagnosticadas como positivas para *Cryptosporidium* através da PCR (Figuras 3 e 4; Tabela 2). Ambas foram identificadas como o genótipo suíno do tipo II pela análise das sequências (Números de Acesso no GenBank EU331243 e DQ182600).

Os números de acesso designados para as sequências de nucleotídeos determinados neste estudo no GenBank, foram GQ924104 e GQ924105.

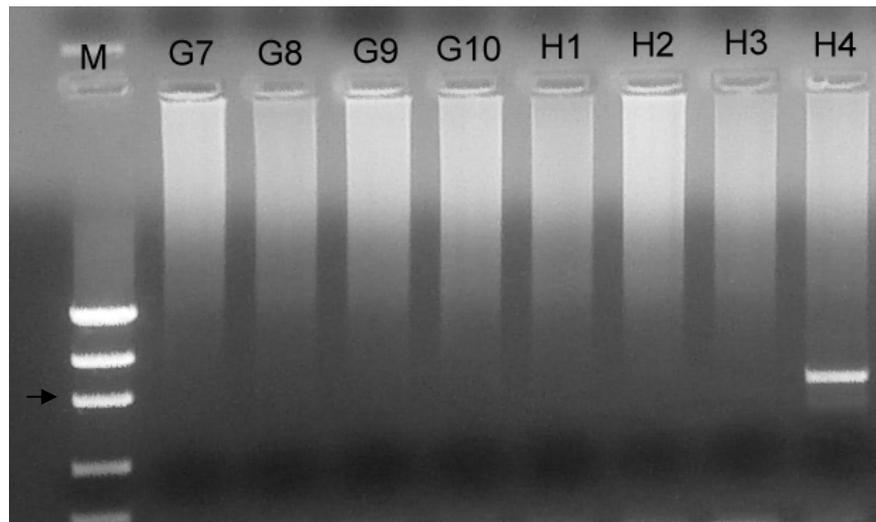


Figura 3. Resultado da amplificação da subunidade 18S ribossomal visualizada em gel de agarose a 1%; **M:** Marcador de peso molecular; De **G7** a **H4:** Amostras de suínos testadas para *Cryptosporidium*; A seta indica a posição relativa de um produto de PCR de aproximadamente 800 pb, condizente com o produto esperado (a figura original encontra-se no Apêndice A).

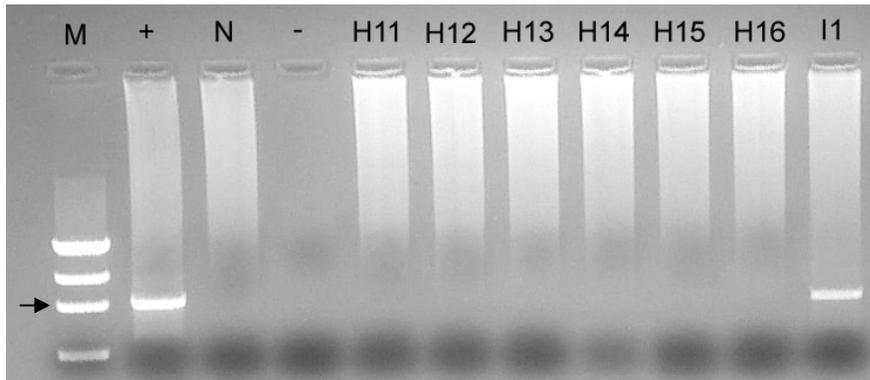


Figura 4. Resultado da amplificação da subunidade 18S ribossomal visualizada em gel de agarose a 1%; **M:** Marcador de peso molecular; **+**: Controle positivo; **N:** Controle negativo nested; **-:** Controle negativo; de **H11** a **I1:** Amostras de suínos testadas para *Cryptosporidium*; A seta indica a posição relativa de um produto de PCR de aproximadamente 800 pb, condizente com o produto esperado (a figura original encontra-se no Apêndice A).

Tabela 2. Análise molecular da 18S rRNA de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras fecais de suínos, coletadas no Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Amostra	Origem	Idade	No. de nucleotídeos sequenciados	Identificação molecular dos oocistos
H4	Itaperuna	< 12 meses	775	99,9% id. com o genótipo suíno tipo II (EU331243 e DQ182600)*
I1	Itaperuna	< 12 meses	772	100,0% id. com o genótipo suíno tipo II (EU331243 e DQ182600)*

* Números de acesso no GenBank.

5.2.2 Ovinos

Foram diagnosticadas duas amostras positivas para *Cryptosporidium* (1,6%), ambas provenientes do grupo de até seis meses de idade. Estas duas amostras foram sequenciadas com sucesso e, após comparação com o banco de dados do Genbank, foi observada homologia com *C. ubiquitum* (Figura 5; Tabela 3). As sequências deste estudo podem ser acessadas no GenBank através do número de acesso HM772993.

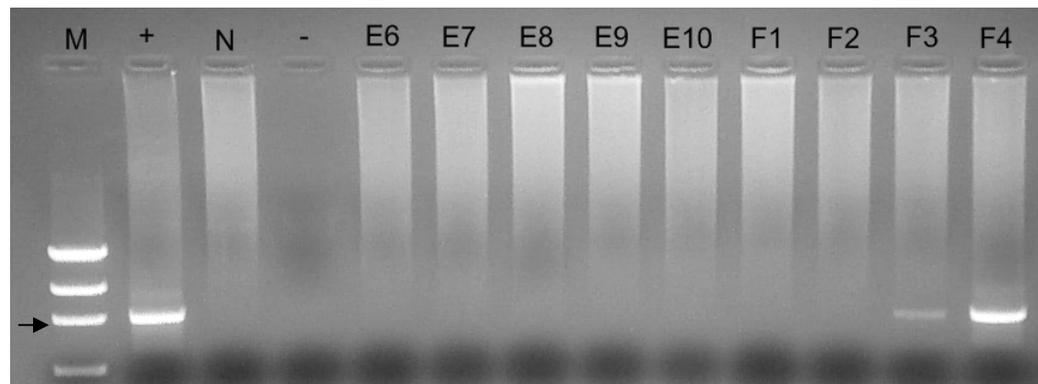


Figura 5. Resultado da amplificação da subunidade 18S ribossomal visualizada em gel de agarose a 1%; **M**: Marcador de peso molecular; **+**: Controle positivo; **N**: Controle negativo nested; **-**: Controle negativo; de **E6** a **F4**: Amostras de ovinos testadas para *Cryptosporidium*; A seta indica a posição relativa de um produto de PCR de aproximadamente 800 pb, condizente com o produto esperado (a figura original encontra-se no Apêndice B).

Tabela 3. Análise molecular da 18S rRNA de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras fecais de ovinos, coletadas no Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Amostra	Origem	Idade	Nº de nucleotídeos sequenciados	Identificação molecular dos oocistos
F3	Carapebus	< 6 meses	645	98,4% id. com <i>C. ubiquitum</i> (EF362479)*
F4	Carapebus	< 6 meses	663	99,1% id. com <i>C. ubiquitum</i> (EF362480)*

* Números de acesso no GenBank.

5.2.3 Bovinos

Das 68 amostras coletadas e analisadas pela técnica da PCR, 4,54% (4 amostras) foram diagnosticadas como positivas e, após o sequenciamento, todas foram identificadas como *C. andersoni* (Figuras 6 e 7; Tabela 4). As sequências de nucleotídeos foram submetidas ao GenBank e são acessadas através do número HQ007049.

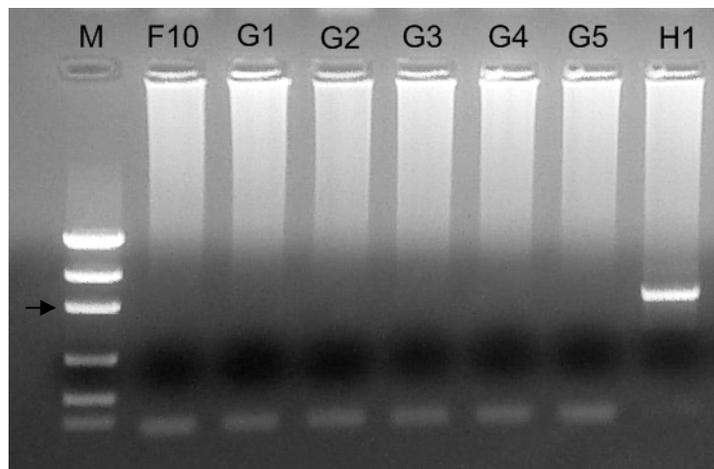


Figura 6. Resultado da amplificação da subunidade 18S ribossomal visualizada em gel de agarose a 1%; **M:** Marcador de peso molecular; De **F10** a **H1:** Amostras de bovinos testadas para *Cryptosporidium*; A seta indica a posição relativa de um produto de PCR de aproximadamente 800 pb, condizente com o produto esperado (a figura original encontra-se no Apêndice C).

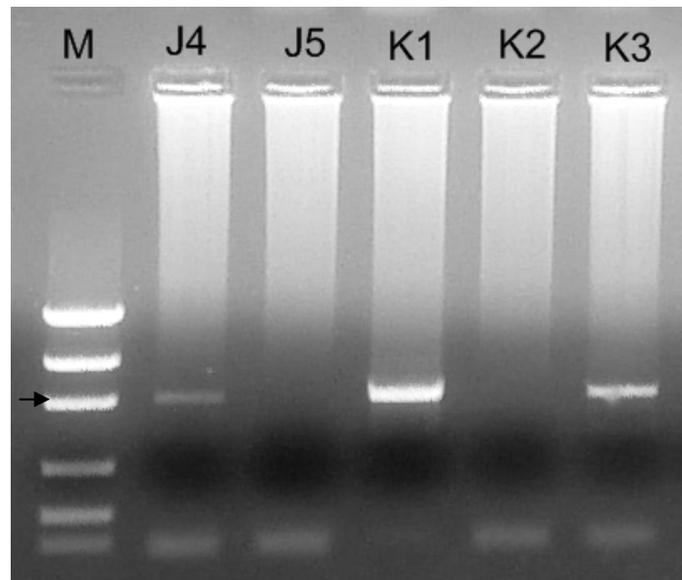


Figura 7. Resultado da amplificação da subunidade 18S ribossomal visualizada em gel de agarose a 1%; **M:** Marcador de peso molecular; De **J4** a **K3:** Amostras de bovinos testadas para *Cryptosporidium*; A seta indica a posição relativa de um produto de PCR de aproximadamente 800 pb, condizente com o produto esperado (a figura original encontra-se no Apêndice C).

Tabela 4. Análise molecular da 18S rRNA de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras fecais de bovinos, coletadas no Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Amostra	Origem	Idade	No. de nucleotídeos sequenciados	Identificação molecular dos oocistos
H1	Campos	< 12 meses	716	100% id. com <i>C. andersoni</i> , (GU831569)
J4	Campos	< 12 meses	635	96,2% id. com <i>C. andersoni</i> , (GU831569)
K1	Campos	< 12 meses	734	99,6% id. com <i>C. andersoni</i> , (GU831569)
K3	Campos	< 12 meses	738	99,2% id. com <i>C. andersoni</i> , (HM002493)

* Números de acesso no GenBank.

6 DISCUSSÃO

6.1 SENSIBILIDADE

O princípio básico da técnica de centrífugo-flutuação é a utilização de um meio que possua densidade específica maior do que o material a ser concentrado, fazendo com que este migre para a superfície e possa ser então aspirado. Importante ressaltar que este meio utilizado não deve deformar o material a ser concentrado que, no caso do diagnóstico da criptosporidiose, são os oocistos (SMITH, 2007).

Os oocistos de *Cryptosporidium* possuem densidade específica de aproximadamente $1,05 \text{ g/m}^3$ e os meios mais comumente utilizados para concentração na rotina de diagnóstico - soluções saturadas de sacarose e sal, possuem densidade específica em média de 1,18 e 1,12 respectivamente. Entre estas duas substâncias, a sacarose geralmente é a mais utilizada pelos laboratórios de pesquisa pois, além de possuir uma maior densidade específica que o sal, tem menor probabilidade de causar efeitos deletérios à parede dos oocistos (ROBERTSON et al., 1993).

Xiao e Herd, (1993) testaram a sensibilidade da técnica de centrífugo-flutuação com sacarose juntamente com microscopia de imunofluorescência para detecção de oocistos de *Cryptosporidium*. Em amostras de 2g experimentalmente contaminadas com 1.000, 10.000, 100.000 e 1.000.000 de oocistos por grama de fezes, foi obtido 14,8; 40,8; 84,2 e 78,2% de sensibilidade respectivamente. Também utilizando solução concentrada de sacarose, Hamnes et al. (2007) observaram uma sensibilidade consideravelmente alta quando comparado com os resultados do presente estudo: utilizando 3 g de fezes de suínos em amostras contendo 100, 1.000 e 5.000 oocistos por grama de fezes, a sensibilidade encontrada foi de 70, 100 e 100%, respectivamente. Estes resultados, a princípio, demonstram uma técnica capaz de diagnosticar oocistos com mais eficiência do que a apresentada nesta pesquisa. No entanto, estes resultados devem ser interpretados com cautela, uma vez que a técnica de diagnóstico escolhida pelos autores para o teste de sensibilidade foi uma técnica

baseada em microscopia. Sabe-se que o diagnóstico realizado pela PCR possui uma maior confiabilidade (RYAN et al., 2005) não havendo possibilidade de resultados falso-positivos, ao contrário dos resultados baseados em microscopia, onde até mesmo lâminas consideradas positivas podem ser comprovadas como negativas após a realização da PCR nestas mesmas amostras (MORGAN et al., 1998). Isso pôde ser constatado na própria pesquisa citada, na qual de 57 amostras positivas para *Cryptosporidium* em microscopia, apenas nove foram comprovadas na PCR (HAMNES et al., 2007). No presente estudo, por outro lado, todas as amostras foram diagnosticadas somente pela técnica da PCR.

A importância do diagnóstico realizado pela PCR em estudo de sensibilidade foi demonstrado por Webster et al. (1996). Os autores testaram a sensibilidade do diagnóstico em amostras experimentalmente contaminadas com oocistos de *Cryptosporidium*, utilizando solução de sacarose e posterior diagnóstico com microscopia e PCR. Na microscopia, o limite mínimo de detecção de oocistos foi observado em amostras contendo pelo menos 4.000 oocistos por grama de fezes, enquanto que pela PCR foi possível detectar amostras com 80 a 90 oocistos por grama de fezes.

Uma pesquisa de prevalência da criptosporidiose suína nas diversas faixas-etárias constatou a eliminação de cerca de 200 à 1×10^6 oocistos por grama de fezes (KVÁČ et al., 2009a). Ainda neste mesmo estudo, foi verificado que animais jovens eliminam uma quantidade maior de oocistos por grama de fezes em média: 215.159 em leitões em fase de amamentação (menos de um mês); 25.620 em animais desmamados (até dois meses). Ao compararmos os nossos resultados com estas informações, verificamos que a técnica descrita nesta pesquisa apresenta resultados muito satisfatórios em suínos com até dois meses de idade, pois foi capaz de detectar 80% das amostras contaminadas com 1.000 oocistos por grama de fezes, onde a menor média de eliminação de oocistos por grama nas fezes dessa faixa-etária segundo Kváč et al. (2009a) foi de 25.620.

Da mesma forma, os resultados obtidos no presente teste de sensibilidade também são considerados satisfatórios para estudos da criptosporidiose em ovinos e bovinos: ovinos jovens infectados eliminam, em média, $2,4 \times 10^6$ de oocistos viáveis por

grama de fezes (BUKHARI e SMITH, 1997) e os ovinos adultos de 9 a 1067 oocistos por grama (CASTRO-HERMIDA et al., 2007); bezerros infectados eliminam até 10^7 oocistos por grama de fezes (FAYER et al., 1998), enquanto que adultos parasitados podem eliminar de 25 a 18.000 oocistos por grama de fezes (SCOTT et al., 1994). Com base nestes dados e de acordo com os resultados da sensibilidade da técnica de concentração com sacarose, o diagnóstico poderá ser realizado com segurança em ovinos e bovinos jovens, enquanto que nos adultos existe a possibilidade de obtenção de alguns resultados falso negativos, oriundos de animais que eliminem uma quantidade muito pequena de oocistos em suas fezes.

Outro fator que pode influenciar a sensibilidade da técnica de diagnóstico é a consistência das amostras fecais utilizadas (SMITH, 2007). Os oocistos oriundos de fezes com consistência aquosa ou diarréica são mais facilmente detectados pois há menor probabilidade destes estarem presos à partículas maiores sendo, portanto, concentrados mais rapidamente, ao contrário do que ocorre nas amostras de fezes mais consistentes. Como todas as amostras de fezes utilizadas neste experimento de sensibilidade possuíam consistência sólida, a sensibilidade desta técnica de centrífugo-flutuação com sacarose poderá ser maior do que a estimada quando utilizadas fezes com consistência diarréicas.

O Cloreto de Césio é uma substância que vem sendo utilizada na concentração de oocistos em grandes centros de pesquisa internacionais, e possui um excelente poder de concentração de oocistos: em concentrações de 10 e 100 oocistos de *Cryptosporidium* por grama de fezes, 24 e 84% de oocistos são detectados respectivamente, contra os 10 e 40% detectados com sacarose observados nesta pesquisa (SANTÍN et al., 2004). Além disso, é capaz de limpar as amostras de debris orgânicos com mais eficiência, o que facilita até mesmo o diagnóstico por microscopia (CARPENTER et al., 1999). Por outro lado, seu altíssimo custo inviabiliza sua utilização em estudos epidemiológicos na maioria dos laboratórios, principalmente naqueles localizados em países em desenvolvimento. Em um único diagnóstico, por exemplo, utilizando-se a concentração de 1,4g/ml em 15 g de fezes (SANTÍN et al., 2004), o custo pode chegar a cerca de R\$240,00 para cada amostra.

6.2 DIAGNÓSTICO EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO

6.2.1 Suínos

Até o presente momento ainda não existem dados de prevalência do parasito em suínos baseados em técnicas moleculares no Brasil. Utilizando técnicas de microscopia, Nishi et al. (2000) realizaram um trabalho de identificação de parasitos intestinais de suínos nos estados de MG e de SP, no qual foram identificados oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 1,7% e 7,6% das amostras respectivamente. Em outra pesquisa realizada em SP, de 174 leitões lactentes que apresentavam casos de diarreia, apenas duas (1,2%) amostras foram positivas para criptosporidiose. Como outros agentes patogênicos também foram encontrados nestas fezes, a diarreia não pôde ser atribuída à criptosporidiose (CALDERARO et al., 2001). Martins et al. (1993), no RS, analisaram somente fezes diarreicas de leitões, e encontraram 2,1% de positividade. Outro estudo analisou 750 amostras de fezes de leitões, também de SP, das quais 77 (10,27%) foram positivas, contendo oocistos de *Cryptosporidium* spp. (COUTINHO et al., 2003).

FIUZA et al. (2008) observaram 32% de positividade em criações de suínos no Estado do Rio de Janeiro através da técnica de Ziehl-Neelsen modificada. Estes resultados vão de encontro aos observados neste estudo, onde a frequência foi consideravelmente menor, de apenas 2,2%. De acordo com Morgan et al. (1998) podem ocorrer resultados falso positivos quando o diagnóstico é realizado por técnicas de microscopia, sem confirmação também de um diagnóstico molecular.

Em diversos países a criptosporidiose suína é relatada com diversas taxas de prevalência através de técnicas microscópicas e moleculares, com positividade variando de 1,4% a 100% (ATWILL et al., 1997; GUSELLE et al., 2003; JOHNSON et al., 2008; RYAN et al., 2003a; WIELER et al., 2001; YU e SEO, 2004; ZINTL et al., 2007), onde os animais desmamados, com mais de quatro semanas de vida, são os

mais frequentemente acometidos (MADDOX-HYTTEL et al., 2006; VÍTOVEC et al., 2006).

Dentre as espécies já relatadas em suínos, *C. suis* e o Genótipo suíno do tipo II são as mais prevalentes (JOHNSON et al., 2008). Pesquisas demonstram haver relação entre a idade do animal e a espécie detectada: *C. suis* é demonstrado como a espécie que parasita animais mais jovens, geralmente os que ainda estão em fase de amamentação (mais jovens que quatro semanas de idade), enquanto o Genótipo suíno Tipo II parasita os animais desmamados com mais frequência (RYAN et al., 2005; ZINTL et al., 2007; JOHNSON et al., 2008). Em um estudo de prevalência das espécies de *Cryptosporidium* que acometiam porcos de criações intensivas na Irlanda, Zintl et al. (2007) observaram 2,9% de animais entre 4 e 24 semanas de idade, parasitados com o Genótipo II, resultado semelhante ao encontrado em suínos do Brasil desta pesquisa (2,2%). Além disso, a seqüência de nucleotídeos observada na Irlanda foi idêntica a uma das encontradas neste estudo (número de acesso DQ182600).

Outras pesquisas ao redor do mundo demonstraram uma maior prevalência do genótipo suíno tipo II nos mais variados tipos de criações. Na Austrália, 11,7% dos 289 animais estudados com idades a partir de 11 dias até a fase adulta, eliminavam nas fezes o genótipo suíno tipo II (nº de acesso AY271721) (JOHNSON et al., 2008). Na Espanha, 142 animais de 24 propriedades foram divididos em desmamados (1 a 2 meses de idade), de engorda (2 a 6 meses) e adultos (SUÁREZ-LUENGAS et al., 2007). As fezes foram analisadas através por método de sedimentação e coloração por Ziehl-Neelsen modificado, das quais as positivas foram então selecionadas para estudo molecular. O Genótipo Suíno tipo II foi observado em 3 e 13 animais dos grupos da fase de engorda e desmamados respectivamente, totalizando 11,2% de prevalência deste genótipo nestas criações (nº de acesso AY271721 e DQ978998). Na República Tcheca, após uma triagem das amostras positivas por método de coloração, este Genótipo foi observado em 36 (25%) de um total de 144 amostras coletadas, todas pertencentes a animais na fase de terminação (5,5 a 6 meses) (KVÁČ et al., 2009b); destas, 15 apresentavam infecção mista com *C. suis*. Assim como em nosso estudo, a seqüência observada foi 100% idêntica ao DQ182600 do GenBank. Em propriedades localizadas na Dinamarca, ao contrário destas pesquisas citadas, o Genótipo suíno tipo II foi

observado em leitões em fase de amamentação com uma alta prevalência (13,8%). Porém, uma prevalência ainda maior (36,2%) foi identificada nos animais de 8 a 30 kg neste mesmo estudo (LANGKJÆR et al., 2007). No entanto, com exceção do estudo realizado na Austrália, os estudos anteriormente descritos podem estar subestimando a real prevalência deste genótipo, pelo fato de ter sido realizado estudo molecular apenas nas amostras positivas por técnicas de microscopia. Como as técnicas moleculares possuem um maior poder de diagnóstico (RYAN et al., 2005), recomenda-se a sua utilização em todas as amostras em estudo para uma real estimativa dos dados de prevalência das espécies de *Cryptosporidium* em uma determinada região.

O Genótipo suíno do tipo II encontrado neste estudo (GQ924104) foi recentemente relatado em um homem imunocompetente de 29 anos (nº de acesso no GenBank: EU331243) como o primeiro diagnóstico deste genótipo em humanos (KVÁČ et al., 2009c).

Apesar deste primeiro relato em humanos, a detecção apenas do Genótipo suíno do tipo II não aparenta ser um risco para saúde pública, pelo fato deste genótipo ter sido relatado quase em sua totalidade em suínos. Entretanto, Langkjær et al., (2007) observaram este genótipo em um bezerro de uma propriedade na Dinamarca, onde não havia criação de suínos nas proximidades. Este fato, aliado à detecção deste genótipo em águas de tratamento (RYAN et al., 2005), deve ser encarado com atenção devido à possibilidade de transmissão e disseminação deste genótipo para outras criações e águas recreacionais (LANGKJÆR et al., 2007). Dessa forma, segundo Ryan et al., 2005, o potencial zoonótico de transmissão deste genótipo deve ser minuciosamente estudado pois foi detectado a partir de uma fonte de origem humana.

A confirmação da presença do Genótipo Suíno tipo II EU331243 e DQ182600 em países geograficamente distantes reforça o caráter cosmopolita do mesmo.

6.2.2 Ovinos

Cryptosporidium ubiquitum (anteriormente conhecido como genótipo cervídeo) já foi relatado em uma ampla variedade de hospedeiros (da SILVA et al., 2003; FAYER et al., 2010; ONG et al., 2002; RYAN et al., 2003b; XIAO et al., 2002), mas são mais frequentemente relatados em ovinos jovens (RYAN et al., 2005; SANTÍN et al., 2007). Importante ressaltar que o diagnóstico desta espécie deve ser interpretado com cautela na PCR-RFLP, quando a enzima de restrição *RsaI* for utilizada em genes COWP amplificados, pois *C. ubiquitum* e *C. hominis* possuem o mesmo sítio de restrição (ONG et al., 2002; SANTÍN e FAYER, 2007).

Em um estudo realizado na Austrália, 447 amostras de fezes de ovinos não desmamados, de até oito semanas de idade, foram analisados por nested PCR da 18S rRNA, seguido de sequenciamento das amostras positivas (YANG et al., 2009). *Cryptosporidium ubiquitum* foi observado em 2,2% do total de amostras (10/447), prevalência semelhante ao descrito no Brasil por este estudo, que foi de 1,6% (2/125). Geurden et al., 2008 observaram uma prevalência um pouco mais elevada em pesquisa realizada em dez propriedades localizadas na Bélgica, na qual 6,5% (9/137) das amostras de fezes de cordeiros de até 10 semanas de idade foram diagnosticadas positivas para *C. ubiquitum*. Em estudo nos EUA realizado por Santín et al. (2007), amostras fecais foram coletadas aos 7, 14 e 21 dias de idade de 32 ovinos e analisadas por Nested PCR, apresentaram alta prevalência de *C. ubiquitum* nestes cordeiros com menos de um mês de vida. Destes, 22 estavam eliminando esta espécie em suas fezes. A sequência observada no presente estudo (HM772993) têm 99,8% de homologia (656/657) com *C. ubiquitum* descrito por Santín et al., (2007) (EF362480) em seis dos 22 animais. Esta mesma sequência também já havia sido relatada no Reino Unido (ELWIN e CHALMERS, 2008).

No Brasil, diagnósticos baseados em microscopia em fezes de ovinos revelaram prevalências variando entre 3,7 a 55,4% (COSENDEY et al., 2008a; COSENDEY et al., 2008b; GREEN et al., 2004; TEMBUE et al., 2006). Baseados em biologia molecular, Féres et al., 2009, coletaram 460 amostras de fezes de cordeiros de 21 propriedades

rurais do Estado de São Paulo e, após uma triagem com técnica de coloração, 31 amostras positivas foram analisadas pela PCR da subunidade 18S rRNA. Após o sequenciamento realizado em uma amostra de cada propriedade utilizada no estudo, três amostras foram sequenciadas com sucesso: *C. parvum* tipo A, *C. parvum* tipo B e *C. ubiquitum*. Como não foram fornecidos os números de acesso do Genbank destas sequencias, não foi possível comparar as sequencias obtidas por estes autores com as obtidas no presente estudo. Ainda no Estado de SP (PAZ E SILVA, 2007), 100 amostras de ovinos de diferentes idades foram coletadas e analisadas pela técnica de PCR-RFLP. Duas amostras apresentaram padrões de restrição compatíveis com *C. parvum*, duas com *C. bovis* e 19 compatíveis com *C. felis* ou *C. ubiquitum*. Tanto *C. felis* quanto *C. ubiquitum* apresentam os mesmos sítios de restrição (TROTZ-WILLIAMS et al., 2006). Por este motivo, o autor não pôde concluir qual destas espécies estava, de fato, parasitando estes ovinos, uma vez que não foi realizado o seqüenciamento das amostras positivas na PCR.

Os primeiros relatos de *C. ubiquitum* em humanos foi realizado por Ong et al. (2002) em amostras fecais de pacientes apresentando sintomatologia clínica compatível com criptosporidiose, e por Trotz-Williams et al. (2006), em uma amostra fecal após amplificação do 18S rRNA pela PCR. Desde então, outros autores têm descrito casos esporádicos desta espécie acometendo os seres humanos (DAVIES et al., 2009; LEONI et al., 2006; SOBA et al., 2006; FELTUS et al., 2006) e, portanto, esta espécie deve ser considerada como um potencial patógeno emergente e zoonótico (SANTÍN e FAYER, 2007)

No presente estudo, *C. ubiquitum* foi observado apenas em cordeiros, ao contrário do que foi observado na Austrália, onde *C. ubiquitum* foi mais prevalente em animais desmamados e foi, inclusive, a mais prevalente entre oito espécies e genótipos diagnosticados (RYAN et al., 2005). Nos EUA e na Bélgica, é mais prevalente em cordeiros (GEURDEN et al., 2008; SANTÍN et al., 2007).

6.2.3 Bovinos

Os resultados do sequenciamento deste estudo revelaram a presença de *C. andersoni*, espécie que comumente parasita as glândulas gástricas do abomaso e anteriormente conhecida como *C. muris* nos bovinos (LINDSAY et al., 2000). Comparando-se com *C. parvum*, principal espécie causadora dos sintomas clínicos em bovinos jovens, infecções por *C. andersoni* possuem um caráter crônico e assintomático, que pode durar de meses a anos. Além disso, há menor eliminação de oocistos por grama de fezes (ANDERSON, 1991). Os quatro animais positivos desta pesquisa estavam com aparência saudável, com fezes de consistência normal e sem qualquer sinal clínico que pudesse ser relacionado à criptosporidiose no momento da coleta.

A maioria das pesquisas da criptosporidiose bovina no Brasil ainda é realizada apenas por microscopia. Cardoso et al., 2008, identificaram a presença de oocistos que julgaram ser de *C. andersoni* em apenas um (0,1%) bovino adulto no Estado de São Paulo, através de técnicas de microscopia. Pena et al. (1997) neste mesmo Estado, também afirmaram ter encontrado oocistos desta espécie baseando-se apenas em microscopia. Apesar dos oocistos de *C. andersoni* serem grandes e facilmente observados por técnicas convencionais de coloração em microscopia óptica, a identificação correta e segura da espécie de *Cryptosporidium* só poderá ser confirmada através de estudos moleculares, tais como a PCR seguida de sequenciamento ou RFLP, devido à grande semelhança morfológica existente entre as espécies (SANTÍN e TROUT, 2007). Na Região Norte do Estado do Rio de Janeiro, a criptosporidiose bovina foi observada com uma prevalência de 43,6% em 211 animais (EDERLI et al., 2004), e de 61% em 100 amostras coletadas (ALMEIDA et al., 2008) em bezerros de até 12 meses de vida. Na Região Sul deste mesmo Estado, 61,02% dos bezerros com idade inferior a 30 dias e 82,54% dos animais com mais de 30 dias foram diagnosticados como positivos pra *Cryptosporidium* (SOUZA e LOPES, 1995). Em Minas Gerais, 19,5% dos bezerros estavam parasitados (GARCIA e LIMA, 1994).

Através de biologia molecular no Brasil, uma pesquisa com nove bovinos no Estado de São Paulo, revelou a presença de *C. parvum* em oito amostras e *C. bovis* em uma, através da técnica de Nested-PCR seguida de sequenciamento (THOMAZ et al., 2007). Cinquenta e seis bezerros de 1 a 14 dias de idade, oriundos de fazendas localizadas na cidade do Rio de Janeiro, tiveram suas fezes examinadas pela técnica de PCR-RFLP, e os padrões observados, utilizando-se *Sspl* e *Vspl*, eram compatíveis com *C. parvum* e sua sequência foi depositada no GenBank (HUBER et al., 2007).

Em outros países ao redor do mundo, o diagnóstico de *C. andersoni* foi realizado em 19% dos 142 bovinos estudados na Dinamarca (ENEMARK et al., 2002), e foi diagnosticado por PCR-RFLP e sequenciamento em um bezerro desmamado de 62 dias de idade na Geórgia, EUA (FENG et al., 2007). Ainda nos EUA, de 571 bovinos com idades entre um e dois anos, 29 (5,1%) tiveram *C. andersoni* detectado em suas amostras fecais (FAYER et al., 2006).

Baseado nos resultados obtidos por Santín, et al. (2004), Fayer et al. (2006) e Fayer et al. (2007), *C. andersoni* é observado com mais frequência em bovinos adultos quando comparado com as outras espécies de *Cryptosporidium* em bezerros não desmamados e desmamados, nos quais *C. parvum* e *C. bovis* são as mais frequentes, respectivamente.

Com este relato de diagnóstico molecular de *C. andersoni* no Brasil, fica evidenciado o risco de disseminação de oocistos através das águas para outras regiões e conseqüentemente, disseminação da parasitose para outros animais, visto que esta espécie já foi encontrada em águas de rios e lagos, inclusive até com maior concentração de oocistos que *C. parvum* (PENG et al., 2003). A perda econômica associada a infecção por *C. andersoni* também já foi comprovadamente verificada na produção leiteira, na qual vacas infectadas por *C. andersoni* produzem significativamente menos leite do que as vacas não infectadas (ESTEBAN e ANDERSON, 1995)

O risco da transmissão zoonótica desta espécie não deve ser negligenciado, uma vez que existem relatos de diagnóstico molecular a partir de fezes de pacientes humanos (LEONI et al., 2006).

7 CONCLUSÕES

- Foram obtidos resultados satisfatórios quanto a técnica de centrífugo-flutuação com sacarose nos animais de produção estudados, podendo, dessa forma ser utilizada com segurança no diagnóstico da criptosporidiose nestas espécies.
- *Cryptosporidium* genótipo suíno II, *C. ubiquitum* e *C. andersoni* estão presentes nos suínos, ovinos e bovinos do Estado do Rio de Janeiro de forma enzoótica.
- A detecção de *Cryptosporidium* genótipo suíno II no Brasil, não só reforça o aspecto cosmopolita deste genótipo, como também está associado à introdução de raças de suínos originários da Europa e dos Estados Unidos.

8 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Para a realização do diagnóstico do parasito, recomenda-se a utilização de técnicas moleculares que, além de ser a única forma de identificação das espécies e genótipos de *Cryptosporidium*, seus resultados apresentam comprovadamente uma maior confiabilidade quando comparadas com técnicas de microscopia. Estas técnicas moleculares possuem um custo operacional relativamente alto; por esta razão, principalmente países em desenvolvimento ainda utilizam soluções hiper-concentradas de baixo custo para concentração de oocistos, tais como a sacarose e o sal, tanto no diagnóstico de rotina quanto em estudos epidemiológicos da criptosporidiose com finalidade de redução de gastos.

Independente da substância utilizada na concentração dos oocistos, informações quanto à sensibilidade da técnica devem ser sempre fornecidas, uma vez que somente através desses dados poderemos ter conhecimento de quantos oocistos por grama de fezes esta técnica é capaz de diagnosticar e se esta técnica poderia estar ou não subestimando o resultado real de casos da doença.

Sabe-se que as técnicas moleculares de diagnóstico são comprovadamente mais sensíveis que às de microscopia, o que minimiza, portanto, as chances de ocorrência de resultados falso-negativos em amostras com pouca quantidade de oocistos. Em pesquisas que realizam análise molecular apenas de amostras previamente consideradas como positivas em microscopia, além de existir a probabilidade de apresentar resultados falso-negativos, correm ainda o risco de condicionar os resultados a espécies e genótipos que produzem elevada quantidade de oocistos. Portanto, para a obtenção de resultados fidedignos e confiáveis, é essencial a utilização de uma análise molecular em todas as amostras fecais utilizadas no experimento

O Brasil é o quarto maior produtor e exportador de carne suína do mundo, com um rebanho estimado em 35 milhões de animais. As principais regiões de produção industrial estão localizadas nas regiões Sul e Sudeste, onde altos níveis de produção estão sendo alcançados através de avanços em genética, nutrição, reprodução, manejo e sanidade. A produção em um sistema intensivo pode favorecer a proliferação e

manutenção de agentes patógenos se técnicas de manejo inadequadas forem empregadas. Parasitos intestinais, tais como *Cryptosporidium*, estão entre estes patógenos causando diarreia e perda no desenvolvimento, especialmente em leitões, resultando em perda na produtividade.

No Estado do Rio de Janeiro, foram verificadas várias propriedades de suínos que apresentavam uma baixa qualidade de higiene e que eram situadas perto de residências e rios. Por meio de técnicas de microscopia, espécies de *Cryptosporidium* já foram diagnosticadas na região. Até o presente estudo, entretanto, não existiam informações acerca das espécies do agente etiológico nos suínos deste Estado.

A produção de ovinos no Brasil é estimada em 15,5 milhões de cabeças, concentrando-se principalmente nas regiões sul (produção de carne e lã) e nordeste (produção de carne e pele). No Estado do Rio de Janeiro, a região norte se destaca na criação de ovinos de corte, onde a raça Santa Inês criada a pasto é a mais frequentemente utilizada.

Assim como nos suínos, oocistos de *Cryptosporidium* spp. já foram previamente diagnosticados nesta região em ovinos e bovinos, porém sem informações quanto às espécies.

9. REFERÊNCIAS

ALLISON, L.A. **Fundamental Molecular Biology**. 1^a ed. Blackwell Publishing, 2006.

ALMEIDA, A.J.; OLIVEIRA, F.C.R.; TEIXEIRA, C.S. Risco relativo da infecção por parasitos do gênero *Cryptosporidium* em bezerros bovinos no norte do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 243-248, 2008.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ANDERSON, B.C. *Cryptosporidium muris* in cattles. **The Veterinary Record**, v. 129, p. 20, 1991.

ATWILL, E.R.; SWEITZER, R.A.; PEREIRA, M.G.C.; GARDNER, I.A.; VAN VUREN, D.; BOYCE, W.M. Prevalence of and associated risk factors for shedding *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* cysts within feral pig populations in California. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, n. 10, p. 3946–3949, 1997.

BERGELAND, M.E. Necrotic enteritis in nursing piglets. **American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians**, v. 20, p.151-158, 1977.

BERGELAND, M.E.; HENRY, S.C. Infectious diarrheas of young pigs. **The Veterinary Clinics of North America. Large Animal Practice**, v. 4, p. 389-399, 1982.

BILIC, H.R.; BILKEI, G. *Balantidium*, *Cryptosporidium* and *Giardia* species infections in indoor and outdoor pig production units in Croatia. **Veterinary Record**, v. 158, n. 2, p. 61, 2006.

BOMFIM, T.C.B.; LOPES, C.W.G. Comparative aspects of *Cryptosporidium muris*, Tyzzer, 1907 (Apicomplexa: cryptosporidiidae) oocysts on *Rattus norvegicus* from two different habitats. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 7, n.2, p. 129-136, 1998.

BRODY, J.R.; KERN, S.E. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 333, p. 1-13, 2004.

BUKHARI, Z.; SMITH, H.V. *Cryptosporidium parvum*: oocyst excretion and viability patterns in experimentally infected lambs. **Epidemiology and Infection**, v. 119, p. 105-108, 1997.

BUSHEN, O.Y.; KOHLI, A.; PINKERTON, R.C.; DUPNIK, K.; NEWMAN, R.D.; SEARS, C.L.; FAYER, R.; LIMA, A.A.; GUERRANT, R.L. Heavy cryptosporidial infections in children in northeast Brazil: Comparison of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, p. 378-384, 2007.

CALDERARO, F.F., BACCARO, M.R., MORENO, A.M., FERREIRA, A.J.P., JEREZ, A.J., PENA, H.J.F. Frequência dos agentes causadores de enterites em leitões lactentes provenientes de sistemas de produção de suínos do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, p. 29-34, 2001.

CAMA, V.; GILMAN, R.H.; VIVAR, A.; TICONA, E.; ORTEGA, Y.; BERN, C.; XIAO, L. Mixed *Cryptosporidium* infections and HIV. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 1025-1028, 2006.

CARDOSO, J.M.S.; SILVEIRA, F.L.; ARAÚJO, A.J.U.S.; CARVALHO, J.C.C.; KANAMURA, H.Y. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em um rebanho bovino leiteiro no município de Caçapava, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 239-242, 2008.

CARPENTER, C.; FAYER, R.; TROUT, J.; BEACH, M.J. Chlorine disinfection of recreational water for *Cryptosporidium parvum*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, n. 4, p. 579-584, 1999.

CASEMORE, D.P.; SANDS, R.L.; CURRY, A. *Cryptosporidium* species a "new" human pathogen. **Journal of Clinical Pathology**, v. 38, p. 1321-1336, 1985.

CASTRO-HERMIDA, J.A.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; MEZO, M. Natural infection by *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in sheep and goats in Galacia (NW Spain). **Small Ruminant Research**, v. 72, p. 96-100, 2007.

CDC-Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, EUA. ***Cryptosporidium* infection**. Disponível em: < <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Cryptosporidiosis.htm>>. Acesso em: 2 jun. 2010.

CHALMERS, R.M.; DAVIES, A.P.; Minireview: Clinical cryptosporidiosis. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 138-146, 2010.

CORSO, P.S.; KRAMER, M.H.; BLAIR, K.A.; ADDISS, D.G.; DAVIS, J.P.; HADDIX, A.C. Cost of illness in the 1993 waterborne *Cryptosporidium* outbreak, Milwaukee, Wisconsin. **Emerging Infection Diseases**, v. 9, n. 4, p. 426-431, 2003.

COSENDEY, R.I.J.; FIUZA, V.R.S.; TEIXEIRA, C.S.; OLIVEIRA, F.C.R. Frequência de oocistos de coccídios do gênero *Cryptosporidium* em ovinos no estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, p. 687-695, 2008a.

COSENDEY, R.I.J.; FIUZA, V.R.S.; OLIVEIRA, F.C.R. Importância do manejo na criptosporidiose em criações de ovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 209-214, 2008b.

COUTINHO, T.A.; MODOLO, J.R.; PADOVANI, C.R.; FREITAS, E.P. Correlação entre a ocorrência de *Cryptosporidium*, em leitões não desmamados, e o manejo sanitário na maternidade. **Concórdia: Embrapa Suínos e Aves**, v. 2, p. 149-150, 2003.

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

DAVIES, A.P.; CAMPBELL, B.; EVANS, M.R.; BONE, A.; ROCHE, A.; CHALMERS, R.M. Asymptomatic carriage of protozoan parasites in children in day care centers in the United Kingdom. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 28, p. 838-840, 2009.

de GRAAF, D.C.; VANOPDENBOSCH, E.; ORTEGA-MORA, L.M.; ABBASSI, H.; PEETERS, J.E. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1269-1287, 1999.

DUBEY J.P.; LINDSAY D.S.; SPEER C.A.; FAYER R.; LIVINGSTON C.W. JR. *Sarcocystis arieticanis* and other *Sarcocystis* species in sheep in the United States. **The Journal of Parasitology**, v. 74, n. 6, p. 1033-1038, 1988.

DuPONT, H.; CHAPPEL, C.; STERLING, C.R.; OKHUYSEN, P.C.; ROSE, J.B.; JAKOBOWSKI, W. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. **The New England Journal of Medicine**, v. 332, p. 855-859, 1995.

EDERLI, B.B.; CARVALHO, C.B.; SALES, L.G. Ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* em bezerros na microrregião de Campos dos Goytacazes no norte do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 2, p. 45-48, 2004.

ELWIN, K.; CHALMERS, R.M. Contemporary identification of previously reported novel *Cryptosporidium* isolates reveals *Cryptosporidium bovis* and the cervine genotype in sheep (*Ovis aries*). **Parasitology Research**, v. 102, p. 1103-1105, 2008.

ENEMARK, H.L.; AHRENS, P.; LOWERY, C.J.; THAMSBORG, S.M.; ENEMARK, J.M.D.; BILLE-HANSEN, V.; LIND, P. *Cryptosporidium andersoni* from a Danish cattle herd: identification and preliminary characterisation. **Veterinary Parasitology**, v. 107, p. 37-49, 2002.

ENEMARK, H.L.; AHRENS, P.; BILLE-HANSEN, V.; HEEGAARD, P.M.H.; VIGRE, H.; THAMSBORG, S.M.; LIND, P. *Cryptosporidium parvum*: infectivity and pathogenicity of the "porcine" genotype. **Parasitology**, v. 126, p. 407-416, 2003.

ESTEBAN, E.; ANDERSON, B.C. *Cryptosporidium muris*: prevalence, persistency, and detrimental effect on milk production in a drylot dairy. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 1068-1072, 1995.

FAYER, R. General biology. In: FAYER, R.; XIAO, L. **Cryptosporidium and cryptosporidiosis**. 2. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2007. cap. 1, p. 1-42.

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

FAYER, R.; SANTÍN, M. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). **Veterinary Parasitology**, v. 164, n.2-4, p. 192-200, 2009.

FAYER, R.; SPEER, C.A.; DUBEY, J.P. General biology of *Cryptosporidium*. In: DUBEY, J.P.; SPEER, C.A.; FAYER, R. **Cryptosporidiosis of Man and Animals**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990. p. 1-29.

FAYER, R.; GASBARRE, L.; PASQUALI, P.; CANALS, A.; ALMERIA, S.; ZARLENGA, D. *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 49-56, 1998.

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

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

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

FAYER, R.; SANTÍN, M.; MACARISIN, D. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. **Veterinary Parasitology**, doi: 10.1016/j.vetpar.2010.04.028, 2010.

FELTUS, D.C.; GIDDINGS, C.W.; SCHNECK, B.L.; MONSON, T.; WARSHAUER, D.; MCEVOY, J.M. Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* spp. in Wisconsin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 4303-4308, 2006.

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

FÉRES, F.C.; LOMBARDI, A.L.; CARVALHO, M.P.P.; MENDES, L.C.N.; PEIRÓ, J.R.; CADIOLI, F.A.; MEIRELES, M.V.; PERRI, S.H.V.; FEITOSA, F.L.F. Ocorrência e caracterização molecular de *Cryptosporidium* em cordeiros. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 1002-1005, 2009.

FIUZA, V.R.S.; COSENDEY, R.I.J.; OLIVEIRA, F.C.R. Criptosporidiose suína associada aos sistemas de produção no Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 224-229, 2008.

FOX, L.M.; SARAVOLATZ, L.D. Nitazoxanide: A new thiazolide antiparasitic agent. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, p. 1173-1180, 2005.

GARCIA, A.M.; LIMA, J.D. Prevalência de *Cryptosporidium* spp. em rebanhos leiteiros de Pará de Minas (MG) e sua relação com práticas de manejo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 3, n. 3, p. 23-28, 1994.

GENTILE, G.; VENDITTI, M.; MICOZZI, A.; CAPRIOLI, A.; DONELLI, G.; TIRINDELLI, C.; MELONI, G.; ARCESE, W.; MARTINO, P. Cryptosporidiosis in patients with hematologic malignancies. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 13, p. 842-846, 1991.

GEURDEN, T.; THOMAS, P.; CASAERT, S.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOUT, E. Prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* in lambs and goat kids in Belgium. **Veterinary Parasitology**, v. 155, p. 142-145, 2008.

GOLDSTEIN, S.T.; JURANEK, D.D.; RAVENHOLT, O.; HIGHTOWER, A.W.; MARTIN, D.G.; MESNIK, J.L.; GRIFFITHS, S.D.; BRYANT, A.J.; REICH, R.R.; HERWALDT, B.L. Cryptosporidiosis: An outbreak associated with drinking water despite state-of-the-art water treatment. **Annals of Internal Medicine**, v.124, p. 459-468, 1996.

GREEN, R.E.; AMARANTE, A.F.T.; MASCARINI, L.M. The seasonal distribution of *Cryptosporidium* oocysts in sheep raised in the State of São Paulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 3, p. 125-127, 2004.

GUSELLE, N.J.; APPELBEE, A.J.; OLSON, M.E. Biology of *Cryptosporidium parvum* in pigs: from weaning to market. **Veterinary Parasitology**, v. 113, p. 7-18, 2003.

HAMNES, I.S.; BJØRN, K.G.; FORBERG, T.; ROBERTSON, L.J. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in suckling piglets in Norway. **Veterinary Parasitology**, v. 144, p. 222-233, 2007.

HARRIS, J.R.; PETRY, F. *Cryptosporidium parvum*, structural components of the oocysts wall. **The Journal of Parasitology**, v. 85, p. 839-849, 1999.

HARRIS, J.R.; ADRIAN, M.; PETRY, F. Amylopectin, a major constituent of the residual body in *Cryptosporidium* oocysts. **Parasitology**, v. 128, p. 269-282, 2004.

HUANG, B.Q.; CHEN, X.M.; LaRUSSO, N.F. *Cryptosporidium parvum* attachment to and internalization by human biliary epithelia in vitro, a morphological study. **The Journal of Parasitology**, v. 90, p. 212-221, 2004.

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. **Veterinary Parasitology**, v. 150, p. 65-74, 2007.

HUNTER, P.R.; NICHOLS, G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, p. 145-154, 2002.

JOHNSON, J.; BUDDLE, R.; REID, S.; ARMSON, A.; RYAN, U.M. Prevalence of *Cryptosporidium* genotypes in pre and post-weaned pigs in Australia. **Experimental Parasitology**, v. 119, p. 418-421, 2008.

KENNEDY, G.A.; KREITNER, G.L.; STRAFUSS, A.C. Cryptosporidiosis in three pigs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 170, p. 348-350, 1977.

KVÁČ, M.; HANZLÍKOVÁ, D.; SAK, B.; KVĚTOŇOVÁ, D. Prevalence and age-related infection of *Cryptosporidium suis*, *C. muris* and *Cryptosporidium* pig genotype II in pigs on a farm complex in the Czech Republic. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 3-4, p. 319-322, 2009a.

KVÁČ, M.; SAK, B.; HANZLÍKOVÁ, D.; KOTILOVÁ, J.; KVĚTOŇOVÁ, D. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs at slaughterhouses in South Bohemia, Czech Republic. **Parasitology Research**, v. 104, p. 425-428, 2009b.

KVÁČ, M.; KVĚTOŇOVÁ, D.; SAK, B.; DITRICH, O. *Cryptosporidium* pig genotype II in immunocompetent man. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, p. 982-983, 2009c.

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

LASSER, K.H.; LEWIN, K.J.; RYNING, F.W. Cryptosporidial enteritis in a patient with congenital hypogammaglobulinemia. **Human Pathology**, v. 10, p. 234-240, 1979.

LAURENT, F.; McCOLE, D.; ECKMANN, L.; KAGNOFF, M.F. Pathogenesis of *Cryptosporidium parvum* infection. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 141-148, 1999.

LAXER, M.A.; TIMBLIN, B.K. PATEL, R.J. DNA sequences for the specific detection of *Cryptosporidium parvum* by the polymerase chain reaction. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 45, p. 688-694, 1991.

LEONI, F., AMAR, C., NICHOLS, G., PEDRAZA-DIAZ, S., MCLAUCHLIN, J. Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 703-707, 2006.

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

LUMB, R.; SMITH, K.; O'DONOGHUE, P.J.; LANSER, J.A. Ultrastructure of the attachment of *Cryptosporidium* sporozoites to tissue culture cells. **Parasitology Research**, v. 74, p. 531-536, 1988.

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

MADDOX-HYTTEL, C.; LANGKJÆR, R.B.; ENEMARK, H.L.; VIGRE, H. *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs – Occurrence and management associated risk factors. **Veterinary Parasitology**, v. 141, p. 48-59, 2006.

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

MARTINS, J.R.; BARCELLOS, D.E.S.N.; CORREA, B.L.; STEPAN, A.L.; SCAINI, C.J. Associação de *Cryptosporidium* sp com diarreia em suínos recentemente desmamados. **Arquivos da Faculdade de Veterinária, UFRGS**, v. 21, p.32-36, 1993.

McGLADE, T.R.; ROBERTSON, I.D.; ELLIOT, A.D.; READ, C.; THOMPSON, R.C.A. Gastrointestinal parasites of domestic cats in Perth, Western Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 251-262, 2003.

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

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

MOON, H.V.; BEMRICK, W.J. Fecal transmission of calf cryptosporidia between calves and pigs. **Veterinary Pathology**, v. 18, p. 248-255, 1981.

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

MUELLER-DOBLIES, D.; GILES, M.; ELWIN, K.; SMITH, R.P.; CLIFTON-HADLEY, F.A.; CHALMERS R.M. Distribution of *Cryptosporidium* species in sheep in the UK. **Veterinary Parasitology**, v. 154, p. 214-219, 2008.

NAVIN, T.R. Cryptosporidiosis in humans: Review of recent epidemiologic studies. **European Journal of Epidemiology**, v. 1, p. 77, 1985.

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

NISHI, S.M., GENNARI, S.M., LISBOA, M.N.T.S., SILVESTRIM, A., CAPRONI JUNIOR, L., UMEHARA, O. Parasitas intestinais em suínos confinados nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 67, p. 199-203, 2000.

NÚÑEZ, A.; MCNEILLY, F.; PEREA, A.; SÁNCHEZ-CORDÓN, P.J.; HUERTA, B.; ALLAN, G.; CARRASCO, L. Coinfection by *Cryptosporidium parvum* and Porcine Circovirus Type 2 in Weaned Pigs. **Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 50, p. 255-258, 2003.

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

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

PAOLETTI, B.; GIANGASPERO, A.; GATTI, A.; IORIO, R.; CEMBALO, D.; MILILLO, P.; TRAVERSA, D. Immunoenzymatic analysis and genetic detection of *Cryptosporidium parvum* in lambs from Italy. **Experimental Parasitology**, v. 122, p. 349-352, 2009.

PAZ E SILVA, F.M. **Diagnóstico e caracterização molecular de Giardia duodenalis e Cryptosporidium spp. em amostras fecais de bovinos e ovinos**. Dissertação (mestrado), Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, 2007.

PENA, H.F.; KASAIM, N.; GENNARI, S.M. *Cryptosporidium muris* in dairy cattle in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 73, p. 353-355, 1997.

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

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

POWLEDGE T.M. The polymerase chain reaction. **Advances in Physiology Education**, v. 28, p. 44-50, 2004.

POZIO, E.; REZZA, G.; BOSCHINI, A.; PEZZOTI, P.; TAMBURRINI, A.; ROSSI, P.; DI FINE, M.; SMACCHIA, C.; SCHIESARI, A.; GATTEI, E.; ZUCCONI, R.; BALLARINI, P. Clinical cryptosporidiosis and human immunodeficiency virus (HIV)-induced immunosuppression: findings from a longitudinal study of HIV-positive and HIV-negative former injection drug users. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 176, p. 969-975, 1997.

QUÍLEZ, J.; SANCHEZ-ACEDO, C.; CLAVEL, A.; del CACHO, E.; LOPEZ-BERNAD, F. Prevalence of *Cryptosporidium* infections in pigs in Aragón (northeastern Spain). **Veterinary Parasitology**, v. 67, p. 83-88, 1996.

QUÍLEZ, J.; TORRES, E.; CHALMERS, R.M.; HADFIELD, S.J.; DEL CACHO E.; SÁNCHEZ-ACEDO, C. *Cryptosporidium* genotypes and subtypes in lambs and goat kids in Spain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 6026-6031, 2008.

ROBERTSON, L.J.; CAMPBELL, A.T.; SMITH, H.V. Infection of folds or sutures on the walls of *Cryptosporidium parvum* oocysts and their importance as a diagnostic feature. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 2638-2641, 1993.

ROBINSON, G.; THOMAS, A.L.; DANIEL, R.G.; HADFIELD, S.J.; ELWIN, K.; CHALMERS, R.M. Sample prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium andersoni* within a dairy herd in the United Kingdom. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 163-167, 2006.

RYAN, U.M.; XIAO, L. Birds. In: FAYER, R.; XIAO, L. **Cryptosporidium and cryptosporidiosis**. 2. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2007. cap. 15, p. 395-418.

RYAN, U.M.; SAMARASINGHE, B.; READ, C.; BUDDLE, J.R.; ROBERTSON, I.D.; THOMPSON, R.C.A. Identification of a Novel *Cryptosporidium* Genotype in Pigs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 3970-3970, 2003a.

RYAN, U.M.; XIAO, L.; READ, C.; ZHOU, L.; LAL, A.A.; PAVLASEK, I. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 4302-4307, 2003b.

RYAN, U.M.; MONIS, P.; ENEMARK, H.L.; SULAIMAN, I.; SAMARASINGHE, B.; READ, C.; BUDDLE, R.; ROBERTSON, I.; ZHOU, L.; THOMPSON, R.C.A.; XIAO, L. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). **The Journal of Parasitology**, v. 90, n. 4, p. 769-773, 2004.

RYAN, U.M.; BATH, C.; ROBERTSON, I.; READ, C.; ELLIOT, A.; MCINNES, L.; TRAUB, R.; BESIER, B. Sheep may not be an important zoonotic reservoir for *Cryptosporidium* and *Giardia* parasites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 4992-4997, 2005.

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

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova York, Vol. 1 e 2, 2001.

SANTÍN, M.; FAYER, R. Intragenotypic variations in the *Cryptosporidium* sp. cervine genotype from sheep with implications for public health. **The Journal of Parasitology**, v. 93, p. 668-672, 2007.

SANTÍN, M.; TROUT, J.M. Livestock. In: FAYER, R.; XIAO, L. **Cryptosporidium and cryptosporidiosis**. 2. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2007. cap. 18, p. 451-483.

SANTÍN, M.; ZARLENGA, D.S. A multiplex polymerase chain reaction assay to simultaneously distinguish *Cryptosporidium* species of veterinary and public health concern in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 166, p. 32-37, 2009.

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

SANTÍN, M.; TROUT, J.M.; FAYER, R. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species and genotypes in sheep in Maryland. **Veterinary Parasitology**, v. 146, p. 17-24, 2007.

SCORZA, A.V.; BREWER, M.M.; LAPPIN, M.R. Polymerase chain reaction for the detection of *Cryptosporidium* in cat feces. **The Journal of Parasitology**, v. 89, p. 423-426, 2003.

SCOTT, C.A.; SMITH, H.V.; GIBBS, H.A. Excretion of *Cryptosporidium parvum* oocysts by a herd of beef suckler cows. **The Veterinary Record**, v. 134, n. 7, p. 172, 1994.

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

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

SMITH, H. Diagnostics. In: FAYER, R.; XIAO, L. **Cryptosporidium and cryptosporidiosis**. 2. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2007. cap. 6, p. 173-208.

SMITH, H.V.; NICHOLS, R.A.B. *Cryptosporidium*: Detection in water and food. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 61-79, 2010.

SMITH, H.V.; NICHOLS, R.A.B.; GRIMASON, A.M. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 3, p. 133-142, 2005.

SMITH, H.V.; CACCIÒ, S.M.; COOK, N.; NICHOLS, R.A.; TAIT, A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 1-2, p. 29-40, 2007.

SOBA, B.; PETROVEC, M.; MIOC, V.; LOGAR, J. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans in Slovenia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, p. 918-921, 2006.

SOLTANE, R.; GUYOT, K.; DEI-CAS, E.; AYADI, A. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. (Eucoccidiorida: Cryptosporiidae) in seven species of farm animals in Tunisia. **Parasite**, v. 14, p. 335-338, 2007.

SOUZA, J.C.P.; LOPES, C.W.G. Criptosporidiose em bezerros de rebanhos da bacia leiteira Sul-Fluminense, Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 4, n. 1, p. 33-36, 1995.

SPANO, F.; PUTIGNANI, L.; McLAUCHLIN, J.; CASEMORE, D.P.; CRISANTI, A. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. **FEMS Microbiology Letters**, v. 150, n. 2, p. 209-217, 1997.

SREEDHARAN, A.; JAYSCHREE, R.S.; SRIDHAR, H. Cryptosporidiosis among cancer patients: An observation. **Journal of Diarrhoeal Diseases Research**, v. 14, p. 211-213, 1996.

SUÁREZ-LUENGAS, L.; CLAVEL, A.; QUÍLEZ, J.; GOÑI-CEPERO, M.P.; TORRES, E.; SÁNCHEZ-ACEDO, C.; DEL CACHO, E. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs in Zaragoza (northeastern Spain). **Veterinary Parasitology**, v. 148, p. 231-235, 2007.

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

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

SUNNOTEL, O.; LOWERY, C.J.; MOORE, J.E.; DOOLEY, J.S.G.; XIAO, L.; MILLAR, B.C.; ROONEY, P.J. SNELLING, W.J. *Cryptosporidium*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, p. 7-16, 2006.

TANRIVERDI, S.; ARSLAN, M.O.; AKIYOSHI, D.E.; TZIPORI, S.; WIDMER, G. Identification of genotypically mixed *Cryptosporidium parvum* populations in humans and calves. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 130, p. 12-22, 2003.

TANYUKSEL, M.; GUN, H.; DOGANCI, L. Prevalence of *Cryptosporidium* sp. in patients with neoplasia and diarrhea. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 27, p. 69-70, 1995.

TEMBUE, A.A.M.; ALVES, L.C.; BORGES, J.C.; FAUSTINO, M.A.G.; MACHADO, E.C.L. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em ovinos no Município de Ibimirim, Estado de Pernambuco. **Ciência Veterinária nos Trópicos, Recife-PE**, v. 9, p. 41-43, 2006.

TETLEY, L.; BROWN, S.M.; McDONALD, V.; COOMBS, G.H. Ultrastructural analysis of the sporozoite of *Cryptosporidium parvum*. **Microbiology**, v.144, p. 3249-3255, 1998.

THOMAZ, A.; MEIRELES, M.V.; SOARES, R.M.; PENA, H.F.J.; GENNARI, S.M. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of felines, canines and bovines in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 150, p. 291-296, 2007.

TROTZ-WILLIAMS, L.A.; MARTIN, D.; GATEI, W.; CAMA, V.; PEREGRINE, A.S.; MARTIN, S.W.; NYDAM, D.V.; JAMIESON, F.; XIAO, L. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. **Parasitology Research**, v. 99, n. 4, p. 346-352, 2006.

TURKCAPAR, N.; KUTLAY, S.; NERGIZOGLU, G.; ATLI, T.; DUMAN, N. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in hemodialysis patients. **Nephron**, v. 90, p. 344-346, 2002.

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

TYZZER, E.E. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse. **The Journal of Medical Research**, v. 23, p. 487-511, 1910.

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

TZIPORI, S. Cryptosporidiosis in animals and humans. **Microbiological Reviews**, v. 47, p.84-96, 1983.

TZIPORI, S; WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 10, p. 1047-58, 2002.

UMEMIYA, R.; FUKUDA, M.; FUJISAKI, K.; MATSUI, T. Electron microscopic observation of the invasion process of *Cryptosporidium parvum* in severe combined immunodeficiency mice. **The Journal of Parasitology**, v. 91, p. 1034-1039, 2005.

VÍTOVEC, J.; HAMADEJOVÁ, K.; LANDOVÁ, L.; KVÁC, M.; KVETONOVÁ, D.; SAK, B. Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium suis* in pre- and post-weaned pigs. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 53, p. 239-243, 2006.

WANG, Y.; FENG, Y.; CUI, B.; JIAN, F.; NING, C.; WANG, R.; ZHANG, L.; XIAO, L.; Cervine genotype is the major *Cryptosporidium* genotype in sheep in China. **Parasitology Research**, v. 106, p. 341-347, 2010.

WEBSTER, K.A.; SMITH, H.V.; GILES, M.; DAWSON, L.; ROBERTSON, L.J. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in faeces: Comparison of conventional coproscopical methods and the polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**, v. 61, n. 1-2, p. 5-13, 1996.

WEISBURGER, W.R.; HUTCHEON, D.F.; YARDLEY, J.H.; ROCHE, J.C.; HILLIS, W.D.; CHARACHE, P. Cryptosporidiosis in an immunosuppressed renal-transplant recipient with IgA deficiency. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 72, p. 473-478, 1979.

WETZEL, D.M.; SCHMIDT, J.; KUHLENSCHMIDT, M.S.; DUBEY, J.P.; SIBLEY, L.D. Gliding motility leads to active cellular invasion by *Cryptosporidium parvum* sporozoites. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 5379-5387, 2005.

WIELER, L.H.; ILIEFF, A.; HERBST, W.; BAUER, C.; VIELER, E.; BAUERFEIND, R.; FAILING, K.; KLÖS, H.; WENGERT, D.; BALJER, G.; ZAHNER, H. Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in Southern Germany. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 48, p. 151-159, 2001.

XIAO, L.; HERD, R.P. Quantitation of *Giardia* Cysts and *Cryptosporidium* oocysts in fecal samples by direct immunofluorescence assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 11, p. 2944-2946, 1993.

XIAO, L.; RYAN, U. Molecular epidemiology. In: FAYER, R.; XIAO, L. **Cryptosporidium and cryptosporidiosis**. 2. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2007. cap. 5, p. 119-172.

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

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

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

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

YODER, J.S.; BEACH, M.J. *Cryptosporidium* surveillance and risk factors in the United States. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 31-39, 2010.

YU, J.R.; SEO, M. Infection status of pigs with *Cryptosporidium parvum*. **Korean Journal of Parasitology**, v. 42, p. 45-47, 2004.

ZINTL, A.; NEVILLE, D.; MAGUIRE, D.; FANNING, S.; MULCAHY, G.; SMITH, H.V. Prevalence of *Cryptosporidium* species in intensively farmed pigs in Ireland. **Parasitology**, v. 134, p. 1575-1582, 2007.

10 APÊNDICE

Fotografias dos géis de agarose (1%) utilizados nesta pesquisa.

APÊNDICE A: Suínos

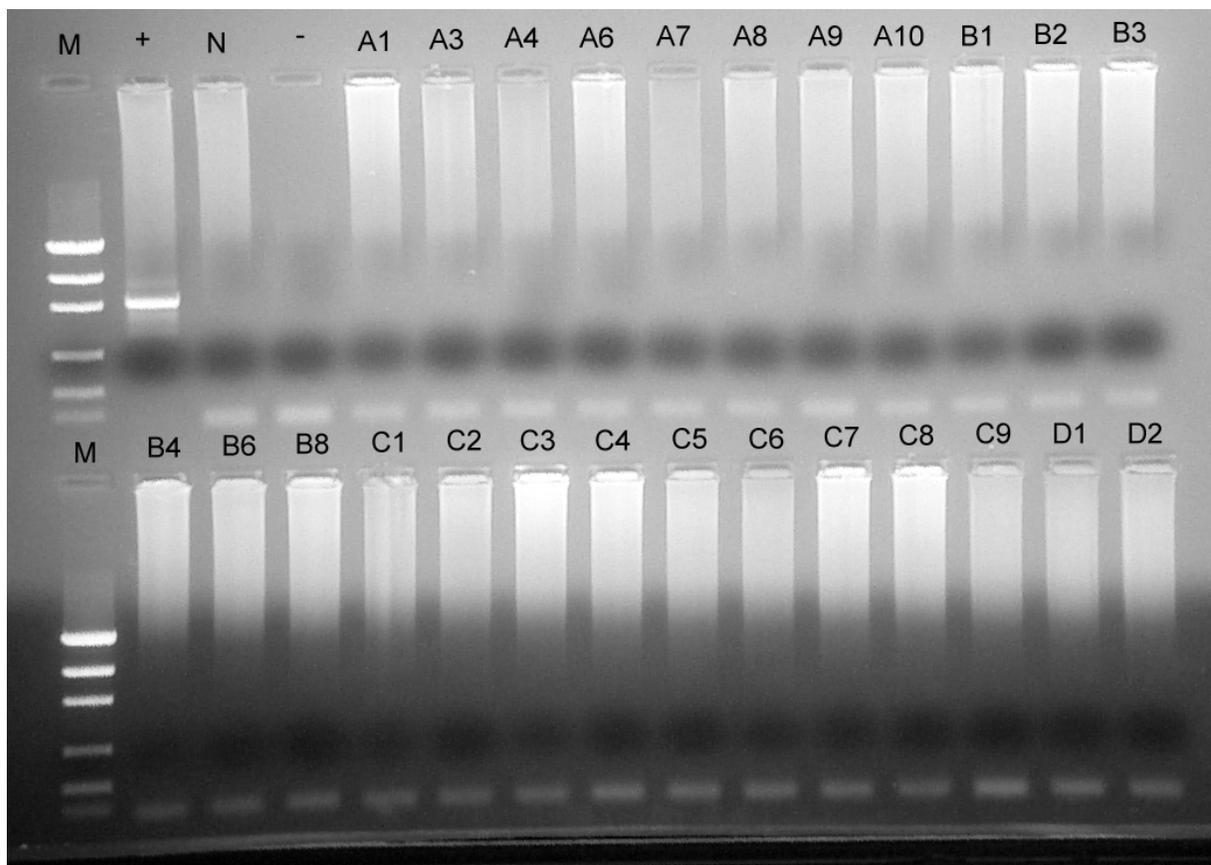


Figura I. Resultado da amplificação da subunidade 18S ribossomal de *Cryptosporidium* spp. visualizado em gel de agarose a 1%; **M**: Marcador de peso molecular; **+**: Controle positivo; **N**: Controle negativo nested; **-**: Controle negativo; de **A1** a **D2**: Amostras de suínos utilizadas.

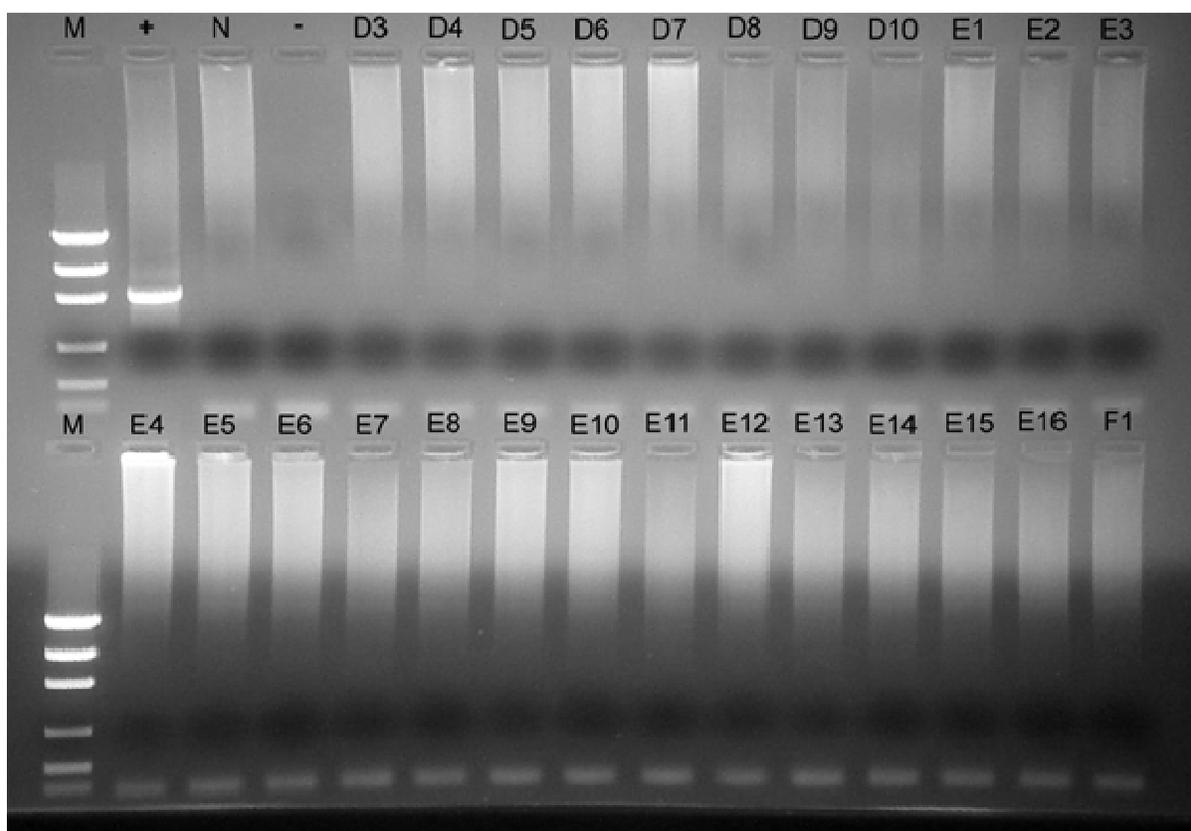


Figura II. Resultado da amplificação da subunidade 18S ribossomal de *Cryptosporidium* spp. visualizado em gel de agarose a 1%; **M**: Marcador de peso molecular; **+**: Controle positivo; **N**: Controle negativo nested; **-**: Controle negativo; de **D3** a **F1**: Amostras de suínos utilizadas.

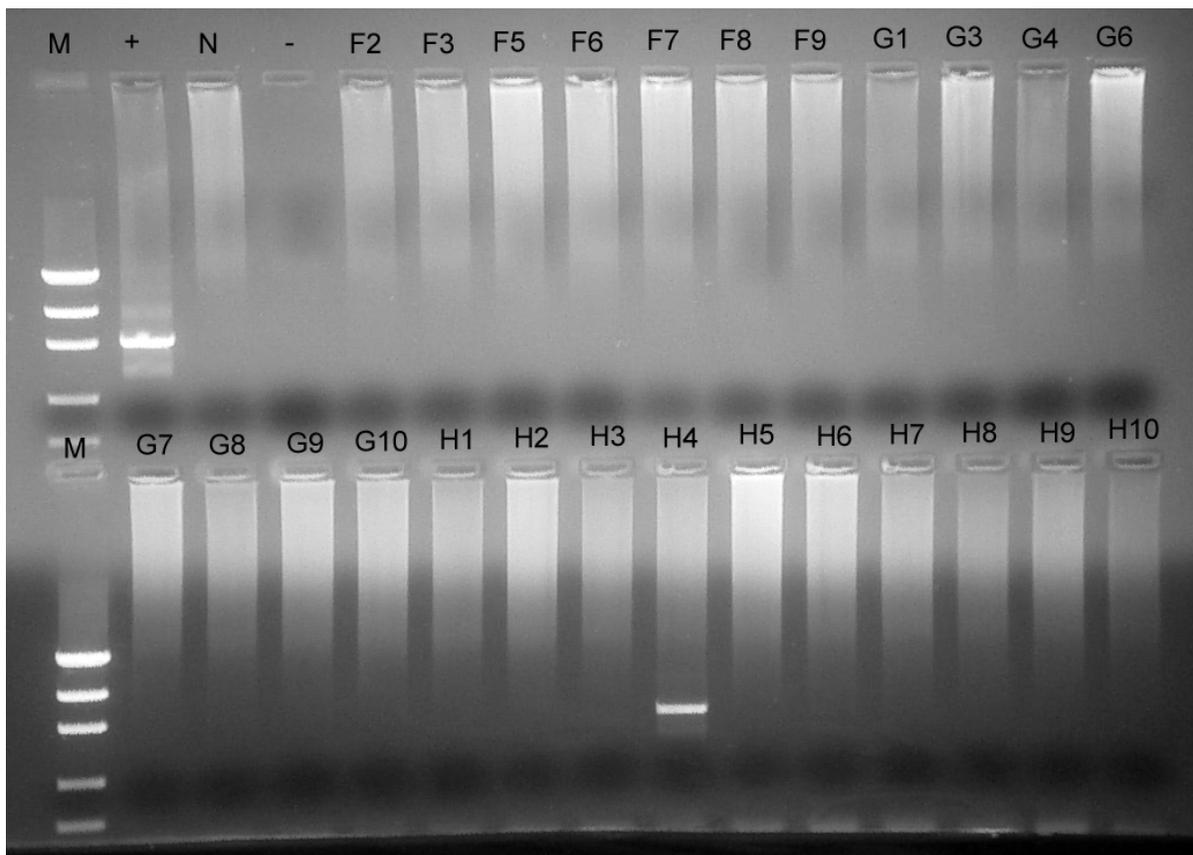


Figura III. Resultado da amplificação da subunidade 18S ribossomal de *Cryptosporidium* spp. visualizado em gel de agarose a 1%; **M**: Marcador de peso molecular; **+**: Controle positivo; **N**: Controle negativo nested; **-**: Controle negativo; de **F2** a **H10**: Amostras de suínos utilizadas.

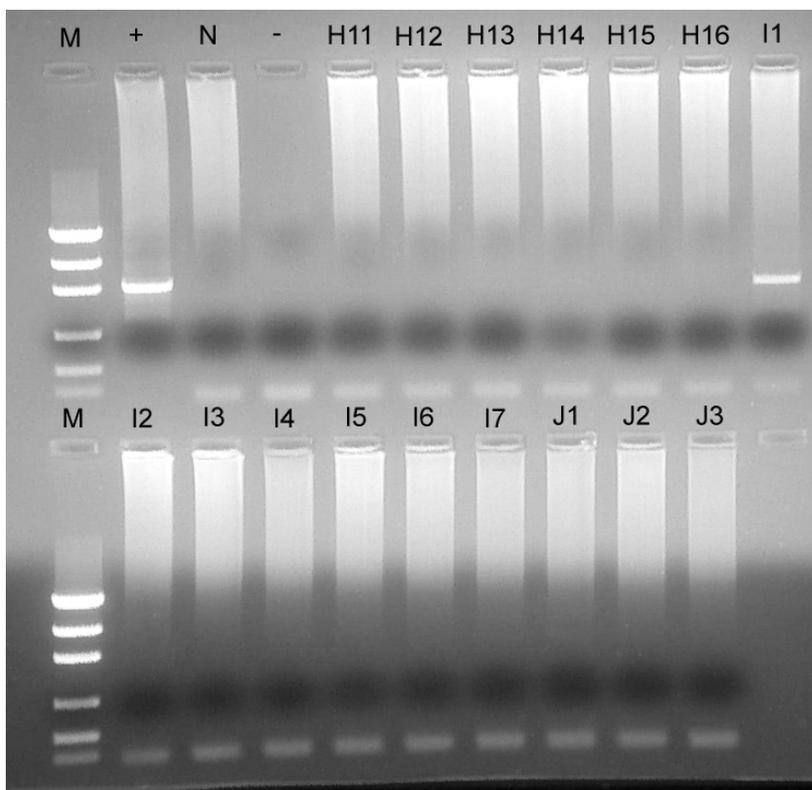


Figura IV. Resultado da amplificação da subunidade 18S ribossomal de *Cryptosporidium* spp. visualizado em gel de agarose a 1%; **M**: Marcador de peso molecular; **+**: Controle positivo; **N**: Controle negativo nested; **-**: Controle negativo; de **H11** a **J3**: Amostras de suínos utilizadas.

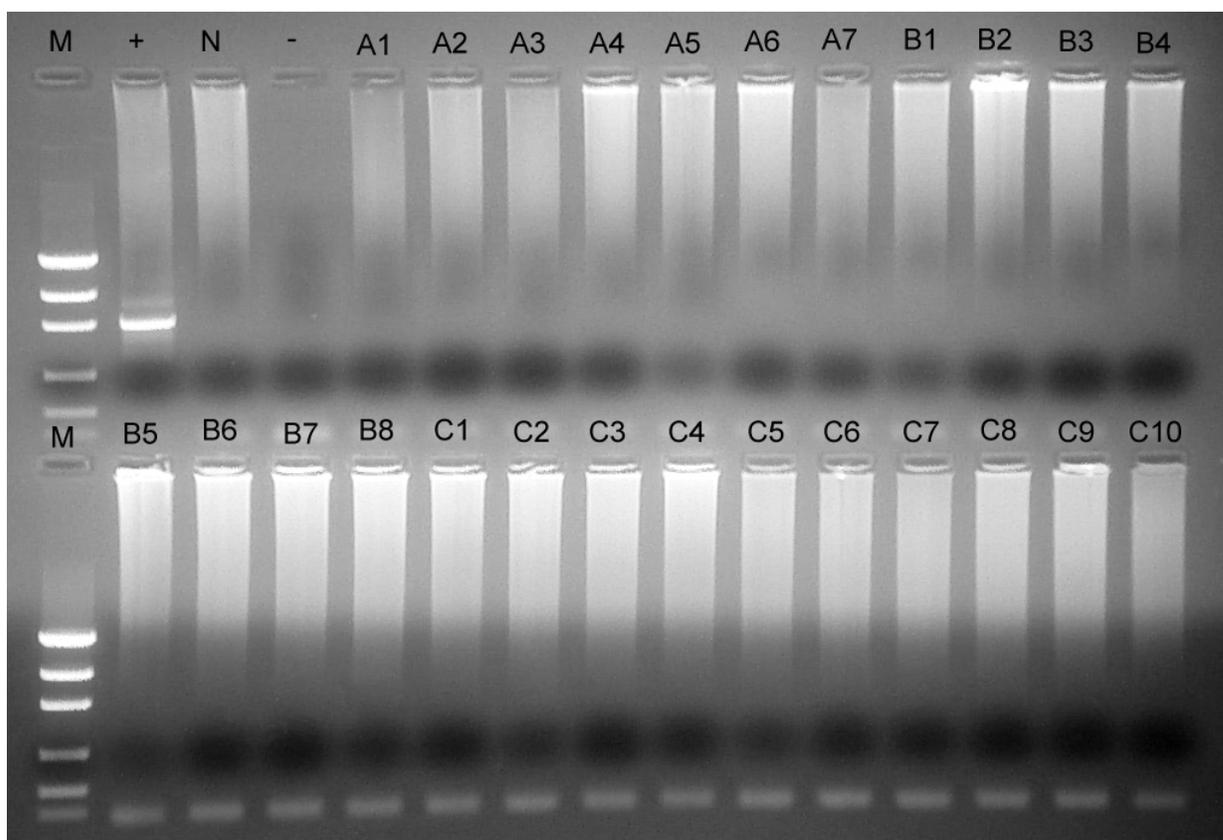
APÊNDICE B: Ovinos

Figura V. Resultado da amplificação da subunidade 18S ribossomal de *Cryptosporidium* spp. visualizado em gel de agarose a 1%; **M**: Marcador de peso molecular; **+**: Controle positivo; **N**: Controle negativo nested; **-**: Controle negativo; de **A1** a **C10**: Amostras de ovinos utilizadas.

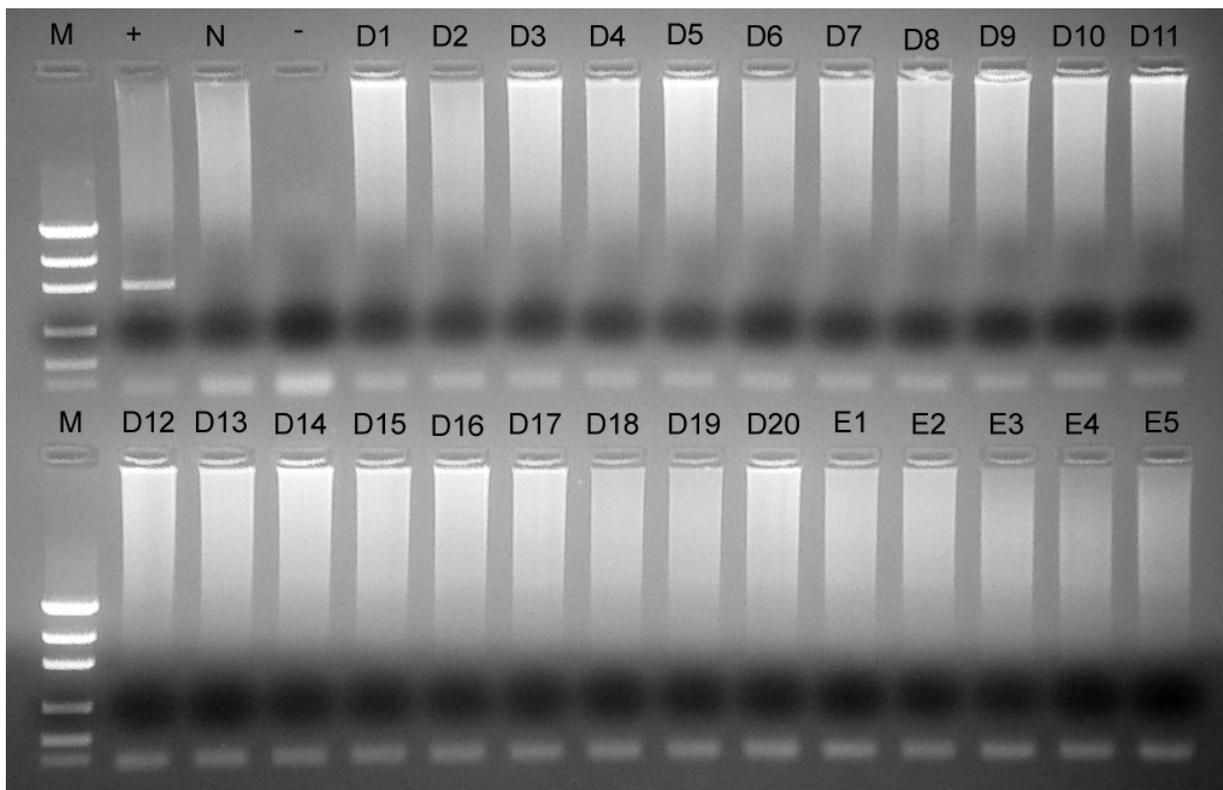


Figura VI. Resultado da amplificação da subunidade 18S ribossomal de *Cryptosporidium* spp. visualizado em gel de agarose a 1%; **M**: Marcador de peso molecular; **+**: Controle positivo; **N**: Controle negativo nested; **-**: Controle negativo; de **D1** a **E5**: Amostras de ovinos utilizadas.

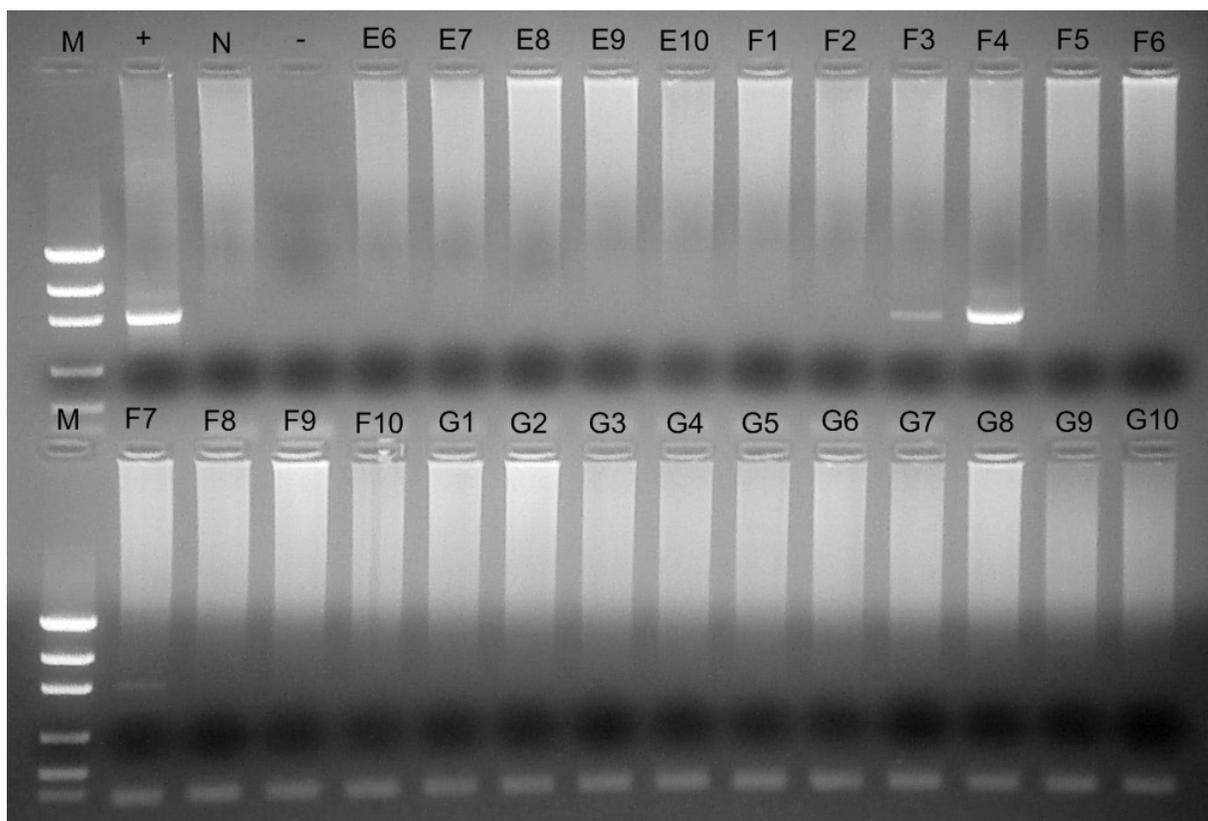


Figura VII. Resultado da amplificação da subunidade 18S ribossomal de *Cryptosporidium* spp. visualizado em gel de agarose a 1%; **M**: Marcador de peso molecular; **+**: Controle positivo; **N**: Controle negativo nested; **-**: Controle negativo; de **E6** a **G10**: Amostras de ovinos utilizadas.

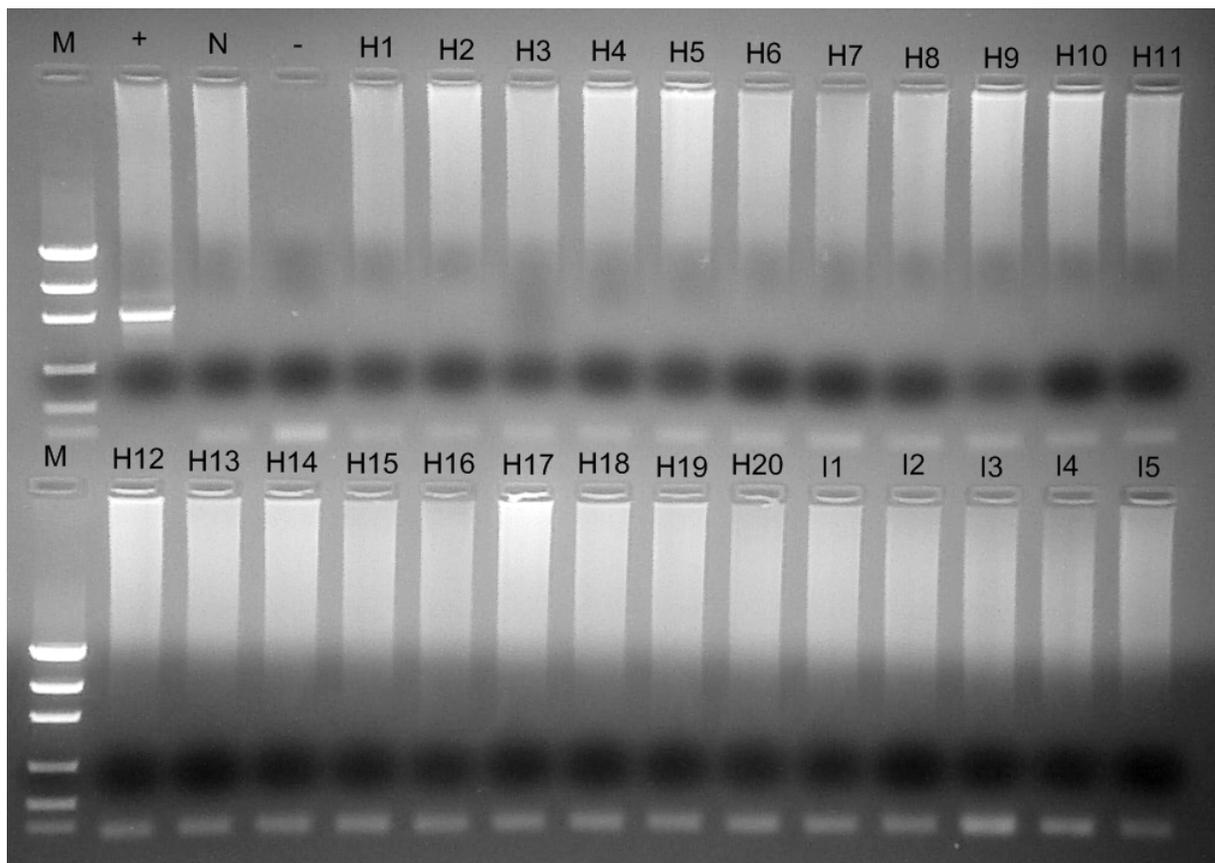


Figura VIII. Resultado da amplificação da subunidade 18S ribossomal de *Cryptosporidium* spp. visualizado em gel de agarose a 1%; **M**: Marcador de peso molecular; **+**: Controle positivo; **N**: Controle negativo nested; **-**: Controle negativo; de **H1** a **I5**: Amostras de ovinos utilizadas.

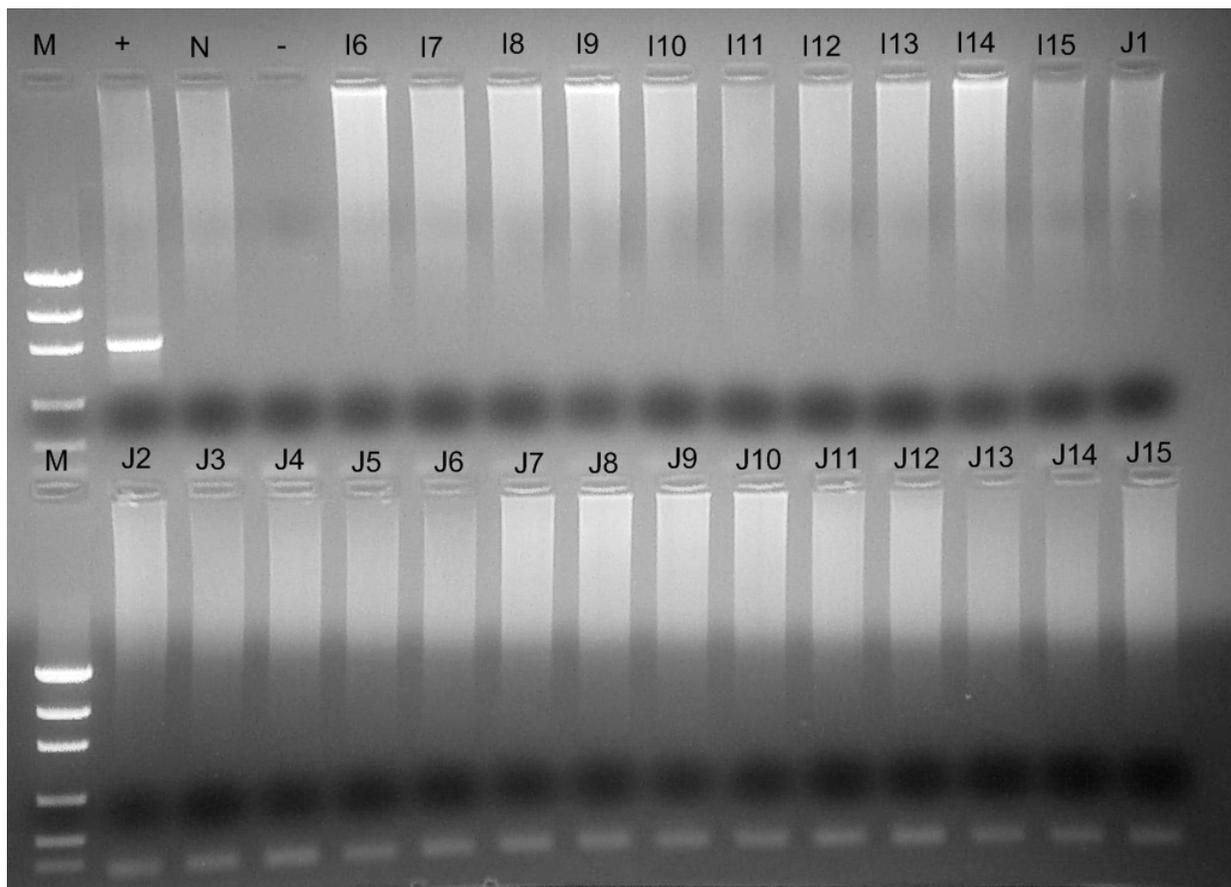


Figura IX. Resultado da amplificação da subunidade 18S ribossomal de *Cryptosporidium* spp. visualizado em gel de agarose a 1%; **M**: Marcador de peso molecular; **+**: Controle positivo; **N**: Controle negativo nested; **-**: Controle negativo; de **I6** a **J15**: Amostras de ovinos utilizadas.

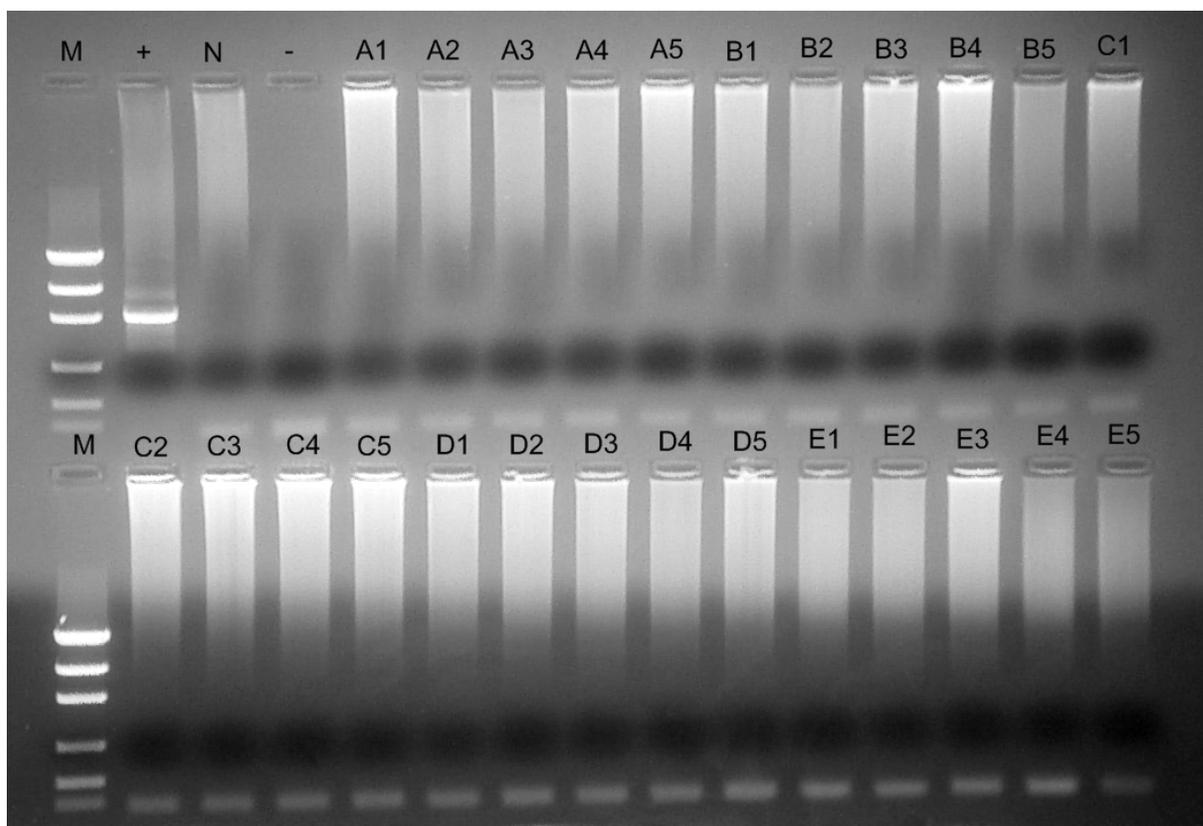
APÊNDICE C: Bovinos

Figura X. Resultado da amplificação da subunidade 18S ribossomal de *Cryptosporidium* spp. visualizado em gel de agarose a 1%; **M**: Marcador de peso molecular; **+**: Controle positivo; **N**: Controle negativo nested; **-**: Controle negativo; de **A1** a **E5**: Amostras de bovinos utilizadas.

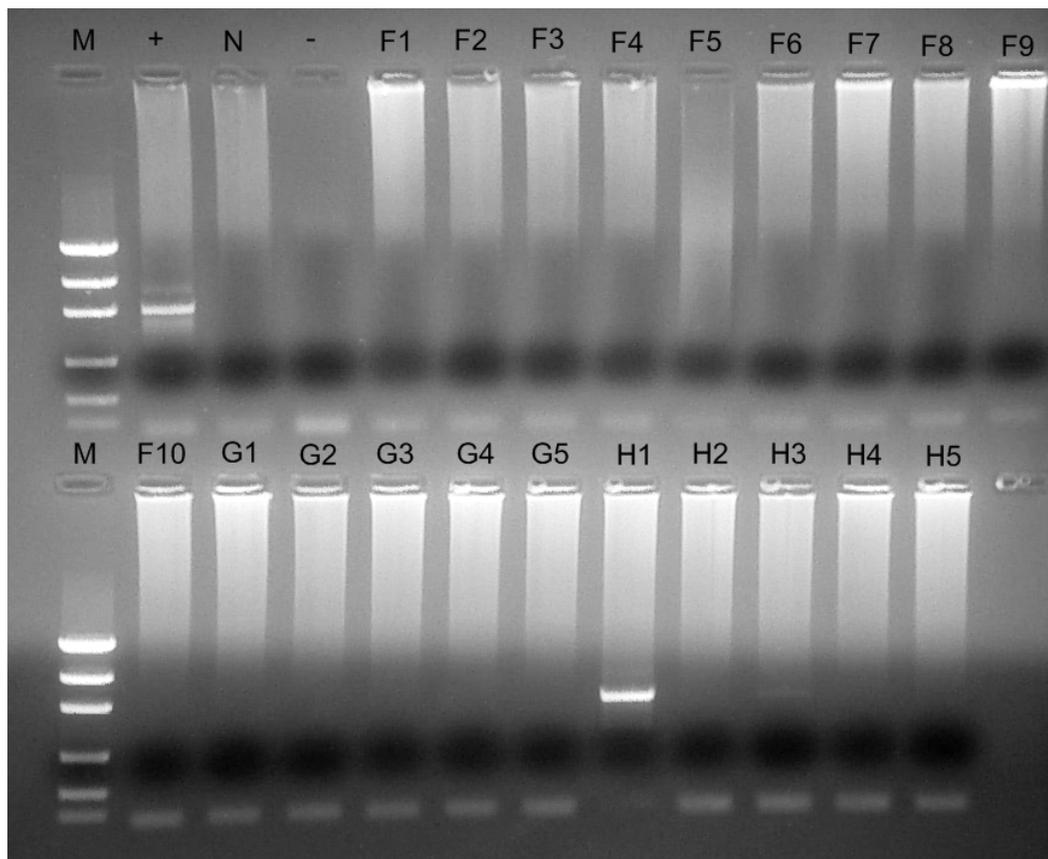


Figura XI. Resultado da amplificação da subunidade 18S ribossomal de *Cryptosporidium* spp. visualizado em gel de agarose a 1%; **M**: Marcador de peso molecular; **+**: Controle positivo; **N**: Controle negativo nested; **-**: Controle negativo; de **F1** a **H5**: Amostras de bovinos utilizadas.

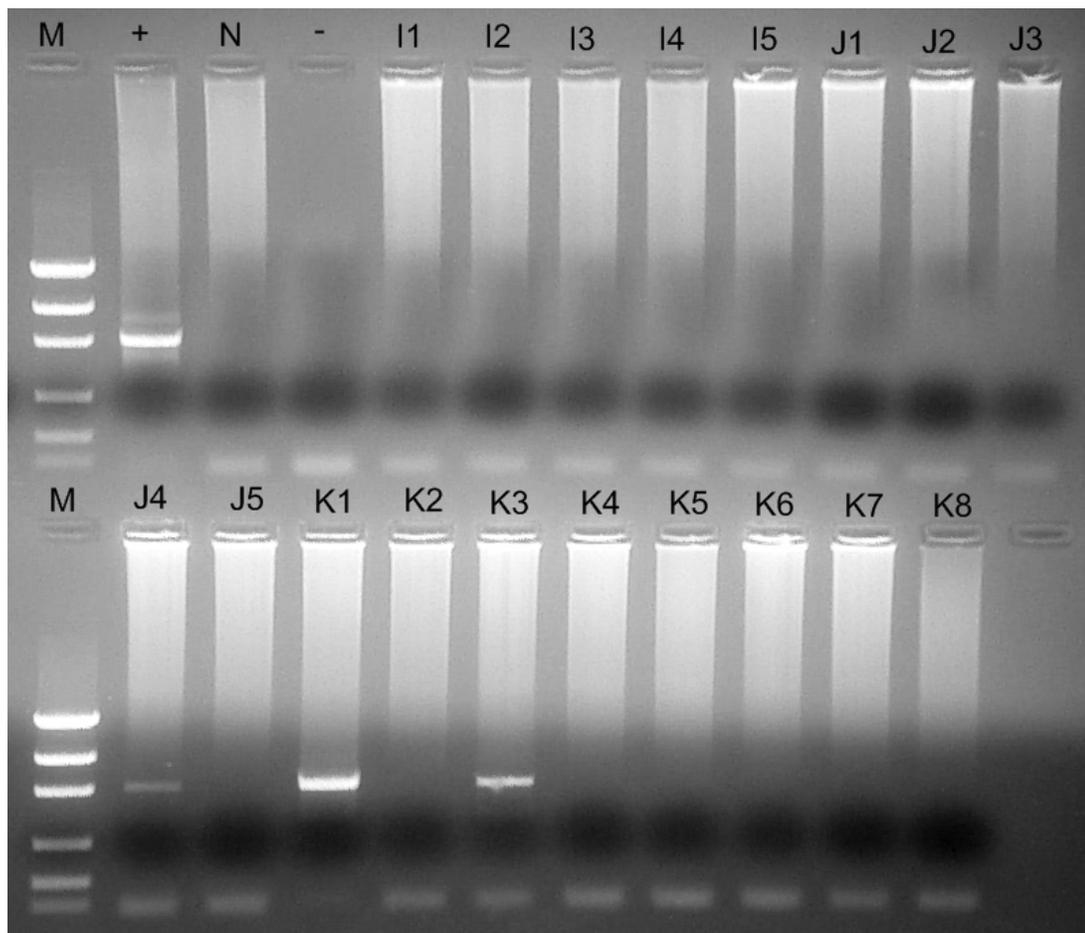


Figura XII. Resultado da amplificação da subunidade 18S ribossomal de *Cryptosporidium* spp. visualizado em gel de agarose a 1%; **M**: Marcador de peso molecular; **+**: Controle positivo; **N**: Controle negativo nested; **-**: Controle negativo; de **I1** a **K8**: Amostras de bovinos utilizadas.

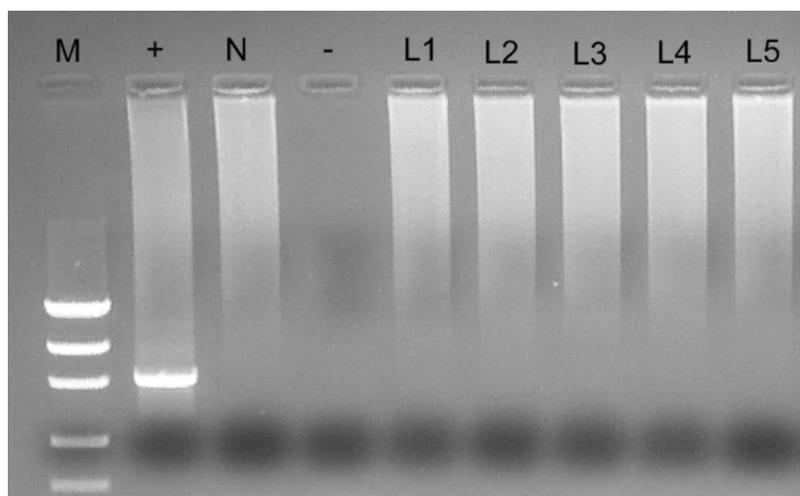


Figura XIII. Resultado da amplificação da subunidade 18S ribossomal de *Cryptosporidium* spp. visualizado em gel de agarose a 1%; **M:** Marcador de peso molecular; **+**: Controle positivo; **N:** Controle negativo nested; **-:** Controle negativo; de **L1** a **L5:** Amostras de bovinos utilizadas.