

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARTHA DE PAULA SOARES GRECA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E FILOGENIA DE ESPÉCIES DE
Cryptosporidium EM CÃES E EM GATOS DE CURITIBA E
REGIÃO METROPOLITANA**

CURITIBA
2010

MARTHA DE PAULA SOARES GRECA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E FILOGENIA DE ESPÉCIES DE
Cryptosporidium EM CÃES E EM GATOS DE CURITIBA E
REGIÃO METROPOLITANA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, área de concentração Parasitologia, Setores de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profª Drª Vanete Thomaz Soccol

CURITIBA
2010

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Greca, Martha de Paula Soares

Identificação molecular e filogenia de espécies de *Cryptosporidium* em cães e em gatos de Curitiba e Região Metropolitana. / Martha de Paula Soares Greca. – Curitiba, 2010.

93 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Vanete Thomaz Soccol

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. *Cryptosporidium* 2. Cão 3. Gato I. Título II. Soccol, Vanete Thomaz III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 593.19



Ministério da Educação e Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETORES DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS e da SAÚDE
Departamentos de Patologia Básica e Patologia Médica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia

TERMO DE APROVAÇÃO

**"Identificação molecular de espécies de *Cryptosporidium*
sp. em cães e gatos em Curitiba e Mesorregião"**

por

MARTHA DE PAULA SOARES GRECA

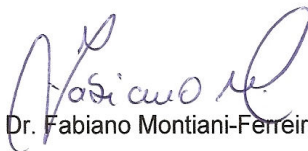
**Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia, pela Comissão formada pelos professores:**



Profa. Dra. Vanete Thomaz-Soccol



Profa. Dra. Daniela Pedrassani



Prof. Dr. Fabiano Montiani-Ferreira



Dra. Magda Clara Vieira da Costa Ribeiro

Curitiba, 28 de maio de 2010.

Dedico este trabalho

Ao meu pai, pelo exemplo de integridade e honestidade.

À minha mãe (*in memoriam*), pelo seu amor, alegria, dedicação, carinho, incentivo, conselhos e força, que infelizmente não pode ver o término deste trabalho.

Aos meus irmãos, por me darem força para não desistir.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado força e tranquilidade em vários momentos.

À Universidade Federal do Paraná, por permitir a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação de Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela oportunidade de realizar o mestrado.

Ao Corpo docente do Programa de Pós-graduação de Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pelos ensinamentos durante o curso.

À Professora Dra. Vanete Thomaz Soccol, pela orientação, conselhos, incentivo, oportunidade e ensinamentos. É um exemplo de dedicação e perseverança.

À Sílvia Osaki, pela amizade, dicas, apoio e auxílio no PCR, Nested-PCR e RFLP.

À Dra Magda Costa Ribeiro, pela amizade, conselhos, dicas, apoio e realização das análises das amostras sequenciadas.

À estagiária Luana Dalagrana, pela grande ajuda em realizar as reações de sequenciamento em um momento que precisei me ausentar por um tempo do laboratório.

À Professora Dra Rosângela C. Paulino, pelos conselhos, dicas e amizade.

À Juliana Tracz Pereira, técnica do Laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Patologia Básica da UFPR, pela amizade e auxílio na coloração de Ziehl-Neelsen e purificação dos oocistos em gradiente de sacarose.

À Luciane Hennig, pelo auxílio e amizade.

Ao Professor Dr. Fabiano Montiani Ferreira e à Dra Magda Costa Ribeiro, pelas correções sugeridas na dissertação que contribuíram para melhorar o trabalho.

Aos grandes amigos do mestrado do Programa de Pós-graduação de Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Juliana Duarte, André Gonçalves, Salô Bispo, Guilherme Garcia, Fabiana Tonial, Juliana Burjack, Eduardo Zardo, Samarina Braga, Angela Bozza, Patrícia Violeta Lopez, Giuseppe Batista, Paulo Roberto Marangoni, Ana Paula Percicote, pela amizade, pelas reuniões e bons momentos que passamos durante o curso que ficarão na lembrança.

Aos grandes amigos do Laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Patologia Básica da UFPR, Antônio Procópio, Jessé Trupel, Sílvia Osaki, Ellen Marques, Luana Dalagrana, Salô Bispo, Guilherme Garcia, Luciane

Hennig, Tatiana Gazda, Silvana Alban, Magda Ribeiro, André Melo, André Gonçalves, Giovana Boff, Juliana Tracz, Ricardo Fendrich, pela amizade, união, companheirismo, carinho, convivência harmoniosa, dicas, conselhos e pelos bons momentos que passamos durante estes anos que não esquecerei.

Ao meu irmão Prof. Dr. Cláudio de Paula Soares Greca, pelo incentivo em fazer o mestrado.

Ao Departamento de Genética, por permitir o uso do aparelho para quantificar o DNA.

Ao Departamento de Bioquímica, por sequenciar as amostras.

À Sociedade Protetora dos Animais e ao Centro de Zoonoses de Araucária, por permitirem a coleta das amostras de cães e gatos.

À amiga Clair Tasso, por enviar amostras de cães do município de São José dos Pinhais.

À Capes, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar a ocorrência de *Cryptosporidium* sp. em cães e em gatos da região metropolitana de Curitiba, Paraná. As técnicas utilizadas para detectar a presença do protozoário nas amostras fecais foram: coloração pelo método de Ziehl-Neelsen modificado para pesquisa de oocistos; PCR e Nested-PCR do gene 18SSU rDNA. Para conhecer os genótipos do parasito foram usadas como ferramentas as técnicas de RFLP e sequenciamento e, realizadas análises fenética e filogenética. Noventa e uma amostras de fezes de cães e 25 amostras de fezes de gatos foram colhidas e analisadas. Na pesquisa de oocistos por coloração específica não foi observado presença dos mesmos em nenhuma amostra. Quando foram empregadas as técnicas de PCR seguida de Nested-PCR observou-se uma taxa de positividade de 13,2% nas amostras fecais de cães e 4% nas amostras fecais de gato. A técnica de RFLP apresentou quatro padrões de bandas nos isolados de *Cryptosporidium* sp. de cão e o isolado de gato diferindo destes. O dendrograma construído a partir destes dados mostrou que três grupos foram formados. O primeiro grupo isolou *Cryptosporidium* sp. de gato. Outro foi formado pela cepa referência de *C. parvum* e dois isolados oriundos de cão. O último grupo foi composto por oito isolados de cães com 100% de similaridade e dois que formaram um subgrupo com 80% de similaridade em relação aos oito isolados. A análise dos produtos sequenciados e analisados pelos métodos de Neighbor-Joining e UPGMA mostrou que dos 12 isolados de *Cryptosporidium* sp. de cães 10 ficaram no mesmo grupo, enquanto dois isolados agruparam-se com a cepa referência de *C. parvum*. Um destes isolados apresentou 99% de similaridade com *C. parvum* genótipo humano e o outro 99% de similaridade com *C. parvum* genótipo bovino. Já o isolado de *Cryptosporidium* sp. de gato ao ser comparado com *C. felis* (Genbank) mostrou 98% de similaridade. Estes resultados indicam que há presença do protozoário em cães e gatos na região metropolitana de Curitiba, e que a maioria das espécies circulantes é espécie-específica ao hospedeiro. Entretanto, dois isolados diferiram deste padrão, apresentaram perfil similar a *C. parvum* e *C. hominis*, o que demonstra a possibilidade de infecção cruzada entre o cão e o homem.

Palavras-chave: *Cryptosporidium canis*, *C. felis*, *C. parvum*, análise fenética, análise filogenética, epidemiologia

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the occurrence of *Cryptosporidium* sp. in dogs and cats in the metropolitan region of Curitiba, Parana. The techniques used to detect the presence of the protozoa were: staining using the modified Ziehl-Neelsen method to detect oocysts; PCR and Nested-PCR gene 18SSU rDNA to determine the presence of parasite DNA in fecal samples. RFLP, sequencing as well as a phylogenetic analysis were performed. Ninety-one fecal samples from dogs and 25 from cats were collected and analyzed. Specific staining for oocysts did not reveal their presence in any sample. PCR followed by nested-PCR resulted in a positivity rate of 13.2% in fecal samples from dogs and 4% in fecal samples from cats. RFLP patterns showed a difference result in dogs and cats. The dendrogram constructed from these data showed that three groups were formed. The first group isolated *Cryptosporidium* sp. from cats. Another was formed by the strain of *C. parvum* and two isolates from dogs. The last group consisted of eight isolates from dogs with 100% similarity and two that formed a subgroup with 80% similarity to the eight isolates. Sequence analysis by Neighbor-Joining and UPGMA methods showed that of 12 isolates of dogs *Cryptosporidium* sp. 10 were in the same group, while two isolates clustered with the strain of *C. parvum*. One of these isolates showed 99% similarity with the *C. hominis* and the other 99% similarity with the bovine genotype of *C. parvum*. *Cryptosporidium* sp. isolated from cats were compared with *C. felis* (GenBank) and showed 98% similarity. These results indicate the presence of the protozoa in dogs and cats in the metropolitan region of Curitiba, and that most species circulating in the host are species-specific. However, two isolates showed a profile similar to *C. parvum* and *C. hominis* showing that there is possibility of cross infection between dog and man.

Key words: *Cryptosporidium canis*, *C. felis*, *C. parvum*, phenetic analysis, phylogenetic analysis, epidemiology

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - FLUXOGRAMA DA QUANTIDADE DE AMOSTRA COLHIDA E OS MÉTODOS EMPREGADOS PARA A REALIZAÇÃO DO PRESENTE TRABALHO 53
- FIGURA 2 - DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE DAS TÉCNICAS DE PCR E NESTED-PCR PARA O GENE 18SSU rDNA COM OS INICIADORES XIAO F/XIAO R (A) E XIAO 1/XIAO 2 (B). PARA AVALIAR A SENSIBILIDADE DAS TÉCNICAS FOI USADO DNA DE *C. parvum* (CEPA REFERÊNCIA) EXTRAÍDO COM O KIT CHARGESWITCH®. A SETA INDICA A POSIÇÃO DOS FRAGMENTOS ESPERADOS NA AMPLIFICAÇÃO. LINHA 1 - M: MARCADOR DE MASSA MOLECULAR PADRÃO (1KB); FIGURAS A E B: DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE OOCISTOS: LINHAS 3 A 8 (A): 5, 10, 50, 100, 500, 10³. LINHAS 2 A 10 (B): 10⁴, 10³, 500, 100, 50, 5, 4, 2; CN: CONTROLE NEGATIVO (SEM DNA) 64
- FIGURA 3 - PRODUTOS AMPLIFICADOS POR PCR COM OS INICIADORES XIAO F/XIAO R CONTENDO 1325 PARES DE BASE DE *Cryptosporidium* sp. DE AMOSTRAS FECAIS DE CÃO E DE GATO. M - MARCADOR DE MASSA MOLECULAR PADRÃO (1KB); CN: CONTROLE NEGATIVO, 1 A 3 AMOSTRAS DE *Cryptosporidium* sp. EM CÃES; 4 - AMOSTRA DE *Cryptosporidium* sp. EM GATO; CP: CONTROLE POSITIVO (CEPA REFERÊNCIA DE *C. parvum*)..... 66
- FIGURA 4 - PRODUTOS AMPLIFICADOS POR NESTED-PCR COM OS INICIADORES XIAO 1/XIAO 2 CONTENDO 826 A 864 PARES DE BASE DE *Cryptosporidium* sp. DE AMOSTRAS FECAIS DE CÃO E DE GATO. M: MARCADOR DE MASSA MOLECULAR PADRÃO (1KB); CN: CONTROLE NEGATIVO; 1 A 12 AMOSTRAS DE *Cryptosporidium* sp. EM CÃES; 13 - AMOSTRA DE *Cryptosporidium* sp. EM GATO; CP: CONTROLE POSITIVO (CEPA REFERÊNCIA DE *C. parvum*) 67

- FIGURA 5 - DIFERENCIAÇÃO DE *Cryptosporidium* sp. DE CÃES E DE GATOS PELA TÉCNICA DE RFLP DO FRAGMENTO GÊNICO 18SSU rDNA. O PRODUTO DE NESTED-PCR FOI DIGERIDO COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO *SspI*. M - MARCADOR DE MASSA MOLECULAR PADRÃO (100 pb); CN: CONTROLE NEGATIVO; 1 a 12 AMOSTRAS DE *Cryptosporidium* sp. EM CÃES: 1 - 34C; 2 - 35; 3 - 2C; 4 - 14; 5 - 13; 6 - 18C; 7 - 1B; 8 - 23C; 9 - 24C; 10 - 39C; 11- 46C; 12 - 48C; 13 - AMOSTRA DE *Cryptosporidium* sp. EM GATO: FEL 12; CP: CONTROLE POSITIVO (CEPA REFERÊNCIA DE *C. parvum*) 68
- FIGURA 6 - DIFERENCIAÇÃO DE *Cryptosporidium* sp. DE CÃES E DE GATOS PELA TÉCNICA DE RFLP DO FRAGMENTO GÊNICO 18SSU rDNA. O PRODUTO DE NESTED-PCR FOI DIGERIDO COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO *AseI*. M - MARCADOR DE MASSA MOLECULAR PADRÃO 100 pb; CN: CONTROLE NEGATIVO; 1 a 12 AMOSTRAS DE *Cryptosporidium* sp. EM CÃES: 1 - 34C; 2 - 35; 3 - 2C; 4 - 14; 5 - 13; 6 - 18C; 7 - 1B; 8 - 23C; 9 - 24C; 10 - 39C; 11- 46C; 12 - 48C; 13 - AMOSTRA DE *Cryptosporidium* sp. EM GATO: FEL 12; CP: CONTROLE POSITIVO (CEPA REFERÊNCIA DE *C. parvum*) 69
- FIGURA 7 - RELAÇÃO EVOLUTIVA DOS ISOLADOS DE *Cryptosporidium* sp. DE CÃES E DE GATOS, NO ESTADO DO PARANÁ CONSTRUÍDO COM MÉTODO DE GRUPO DE PAR NÃO PONDERADO COM MÉDIA ARITMÉTICA (UPGMA) E ÍNDICE DE JACCARD. AS COMPARAÇÕES FORAM REALIZADAS COM FRAGMENTOS OBTIDOS POR RFLP DO GENE 18SSU rDNA. AMOSTRAS DE *Cryptosporidium* sp. EM CÃES: 34C, 35, 2C, 14, 13, 18, 1B, 23C, 24, 39, 46, 48; AMOSTRA DE *Cryptosporidium* sp. EM GATO: FEL 12; CP: CONTROLE POSITIVO (CEPA REFERÊNCIA DE *C. parvum*) 70
- FIGURA 8 - RELAÇÃO EVOLUTIVA DOS ISOLADOS DE *Cryptosporidium* sp. DE CÃES E DE GATOS, NO ESTADO DO PARANÁ BASEADO NA ANÁLISE DE NEIGHBOR-JOINING DAS SEQUÊNCIAS DO GENE 18SSU rDNA. AMOSTRAS DE *Cryptosporidium* sp. EM CÃES: 34C, 35, 2C, 14, 13, 18C, 1B, 23C, 24C, 39C, 46C, 48C; AMOSTRA DE *Cryptosporidium* sp. EM GATO: FEL 12; CP: CONTROLE POSITIVO (CEPA REFERÊNCIA DE *C. parvum*); *C. canis* (GENBANK Nº EU754833.1); *C. felis* (GENBANK Nº FJ707310.1); *C. parvum* CEPA BOVINO (GENBANK Nº AF093490.1); *C. hominis* (GENBANK Nº GQ183505.1) 71

FIGURA 9 - RELAÇÃO EVOLUTIVA DOS ISOLADOS DE *Cryptosporidium* sp. DE CÃES E DE GATOS, NO ESTADO DO PARANÁ BASEADO NA ANÁLISE DO MÉTODO DE GRUPO DE PAR NÃO PONDERADO COM MÉDIA ARITMÉTICA (UPGMA) DAS SEQUÊNCIAS DO GENE 18SSU rDNA. AMOSTRAS DE *Cryptosporidium* sp. EM CÃES: 34C, 35, 2C, 14, 13, 18C, 1B, 23C, 24C, 39C, 46C, 48C; AMOSTRA DE *Cryptosporidium* sp. EM GATO: FEL 12; CP: CONTROLE POSITIVO (CEPA REFERÊNCIA DE *C. parvum*); *C. canis* (GENBANK Nº EU754833.1); *C. felis* (GENBANK Nº FJ707310.1); *C. parvum* CEPA BOVINO (GENBANK Nº AF093490.1); *C. hominis* (GENBANK Nº GQ183505.1) 72

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ESPÉCIES DE <i>Cryptosporidium</i> sp. E PRINCIPAIS HOSPEDEIROS	27
TABELA 2 - INICIADORES USADOS NA TÉCNICA DE PCR E DE NESTED-PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE DNA DE <i>Cryptosporidium</i> sp. NAS AMOSTRAS DE FEZES DE CÃO E DE GATO	57
TABELA 3 - COMPONENTES DA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA DE <i>Cryptosporidium</i> sp. EM FEZES DE CÃES E DE GATOS E RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS EM UMA TÉCNICA DE PCR	57
TABELA 4 - CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DOS INICIADORES DE XIAO F/ XIAO R USADOS NA TÉCNICA DE PCR PARA PESQUISA DE <i>Cryptosporidium</i> sp. EM FEZES DE CÃES E DE GATOS	57
TABELA 5 - COMPONENTES DA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA DE <i>Cryptosporidium</i> sp. EM FEZES DE CÃES E DE GATOS E RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS EM UMA TÉCNICA DE NESTED-PCR	59
TABELA 6 - CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DOS INICIADORES DE XIAO 1/ XIAO 2 USADOS NA TÉCNICA DE NESTED-PCR PARA PESQUISA DE <i>Cryptosporidium</i> sp. EM FEZES DE CÃES E DE GATOS	59
TABELA 7 - COMPONENTES USADOS NA REAÇÃO DE RFLP PARA UM VOLUME FINALDE 25 µl	60
TABELA 8 - RESULTADO DA PESQUISA DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium</i> sp. DAS AMOSTRAS DE FEZES DE CÃO DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA PELO MÉTODO DE COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN MODIFICADO	63
TABELA 9 - RESULTADO DA PESQUISA DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium</i> sp. DAS AMOSTRAS DE FEZES DE GATO DE CURITIBA PELO MÉTODO DE COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN MODIFICADO....	63
TABELA 10 - RESULTADO DA PESQUISA DE DNA DE <i>Cryptosporidium</i> sp. DAS AMOSTRAS DE FEZES DE CÃO E DE GATO PELA TÉCNICA DE PCR	65

TABELA 11 - RESULTADO DA PESQUISA DE DNA DE <i>Cryptosporidium</i> sp. DAS AMOSTRAS DE FEZES DE CÃO E DE GATO PELA TÉCNICA DE NESTED-PCR	65
TABELA 12 - RESULTADO DA PESQUISA DE DNA DE <i>Cryptosporidium</i> sp. DE AMOSTRAS DE FEZES DE CÃO PELA TÉCNICA DE NESTED-PCR – ANÁLISE DA TAXA DE PREVALÊNCIA POR REGIÃO	66

LISTA DE SIGLAS

AseI	- Enzima de restrição
COWP	- Proteína da parede do oocisto de <i>Cryptosporidium</i>
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
dNTP	- Deoxinucleotídeos trifosfato
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	- Ensaio de imunoadsorção enzimática
FDA	- Administração de alimentos e medicamentos
GP60	- Glicoproteína 60
HIV	- Vírus da Imunodeficiência Humana
Hsp70	- Proteína resistente ao calor 70
IF	- Imunofluorescência
M	- Molar
MgCl ₂	- Cloreto de magnésio
mL	- Mililitro
N-PCR	- NESTED-PCR
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
pmol	- Picomol
pmol/μL	- Picomol por microlitro
qsp	- Quantidade suficiente para
RFLP	- Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição
RNA	- Ácido ribonucléico
SIDA	- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SspI	- Enzima de restrição
SSU-rDNA	- DNA ribossômico da subunidade menor
SSU-rRNA	- RNA ribossômico da subunidade menor
TFPGA	- Ferramenta para análise genética de populações
U	- Unidade
U/μL	- Unidade por microlitro
UPGMA	- Método de grupo de par não ponderado com média aritmética
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
μL	- Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3 REVISÃO DE LITERATURA	25
3.1 HISTÓRICO	25
3.2 TAXONOMIA	26
3.3 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE <i>Cryptosporidium</i> sp. QUE INFECTA O SER HUMANO E OS ANIMAIS DE COMPANHIA	29
3.4 MORFOLOGIA	30
3.5 CICLO DE VIDA	31
3.6 EPIDEMIOLOGIA	32
3.6.1 Prevalência de infecção por <i>Cryptosporidium</i> sp. em seres humanos	32
3.6.2 Prevalência de <i>Cryptosporidium</i> sp. em animais de estimação	33
3.6.3 Transmissão de <i>Cryptosporidium</i> sp.	33
3.6.3.1 Transmissão de <i>Cryptosporidium</i> sp. por alimentos e água contaminados	33
3.6.3.1.1 Alimentos contaminados com oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp.	33
3.6.3.1.2 Água contaminada com oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp.	35
3.6.4 Infectividade dos oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp.	37
3.6.5 Resistência e viabilidade dos oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp.	37
3.6.6 Contaminação ambiental por oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp.	39
3.7 PATOGENIA	39
3.7.1 Criptosporidiose em seres humanos	41
3.7.1.1 Aspectos clínicos em pacientes imunocompetentes	41
3.7.1.2 Aspectos clínicos em pacientes imunocomprometidos	42
3.7.2 Criptosporidiose em cães e em gatos	43
3.8 DIAGNÓSTICO	44
3.8.1 Métodos microscópicos	44
3.8.2 Métodos imunológicos	45

3.8.3 Métodos moleculares	46
3.8.3.1 Técnicas de PCR e Nested-PCR	47
3.8.3.2 Técnica de Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP)	48
3.8.3.3 Sequenciamento	48
3.9 TRATAMENTO	49
3.10 PROFILAXIA	50
4 MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE FEZES DE CÃES E DE GATOS	53
4.2 DETECÇÃO DOS OOCISTOS PELO MÉTODO DE COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN MODIFICADO	54
4.3 PURIFICAÇÃO DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium</i> sp. EM GRADIENTE DE SACAROSE (PAULINO, 2005 - modificado)	55
4.4 DETECÇÃO MOLECULAR DE <i>Cryptosporidium</i> sp.	56
4.4.1 Extração de DNA	56
4.4.1.1 Extração de DNA com ChargeSwitch® gDNA Mini Tissue Kit (Invitrogen™)	56
4.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	56
4.4.2.1 Controles positivo e negativo	58
4.4.2.2 Sensibilidade da técnica de PCR	58
4.4.3 Nested-PCR (NPCR)	58
4.4.4 Eletroforese em gel de agarose	59
4.4.5 Técnica de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP)	60
4.4.6 Sequenciamento	60
4.4.7 Análise de dados	61
4.4.7.1 Análise dos dados de RFLP e construção do dendrograma	61
4.4.7.2 Análise do sequenciamento	61
4.4.7.3 Análise estatística	61
5 RESULTADOS	63

5.1 PESQUISA DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium</i> sp. DAS AMOSTRAS DE CÃO E DE GATO PELO MÉTODO DE COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN MODIFICADO	63
5.2 DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE DAS TÉCNICAS DE PCR E DE NESTED-PCR	63
5.3 PCR E NESTED-PCR DAS AMOSTRAS FECAIS DE CÃO E DE GATO ANALISADAS	65
5.4 TÉCNICA DE POLIMORFISMO DE COMPRIMENTO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO (RFLP)	67
5.5 SEQUENCIAMENTO DOS ISOLADOS DE <i>Cryptosporidium</i> sp. DE CÃES E DE GATO	70
6 DISCUSSÃO	74
7 CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS	84
DOCUMENTOS CONSULTADOS	93

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Cryptosporidium sp. é um protozoário coccídeo pertencente ao filo Apicomplexa. É encontrado em 90 países, seis continentes e em aproximadamente 170 espécies de animais silvestres, domésticos e o ser humano (O'DONOGHUE, 1995; FAYER *et al.*, 2000; MORGAN, 2000, JEX *et al.*, 2008a). É responsável pela criptosporidiose, doença comumente associada a enterites que são caracterizadas por diarreia aguda, aquosa ou esteatorréica e cólica. Embora que, infecções assintomáticas também são relatadas. Em indivíduos imunocompetentes a diarreia é autolimitante com duração de dias ou até duas semanas, enquanto em pessoas imunocomprometidas a criptosporidiose é mais grave, levando a desidratação intensa e má-absorção, sendo muitas vezes fatal (JEX *et al.*, 2008a).

Na última década, houve muito interesse a respeito dos riscos para a saúde pública em geral e de proprietários de animais de companhia (MCGLADE *et al.*, 2003). Os cães e os gatos são os únicos animais domésticos que ainda residem no mesmo domicílio que seus proprietários, e em várias regiões do mundo são citados como fontes potenciais de infecção de *Cryptosporidium* sp. tanto para pessoas imunocompetentes quanto imunocomprometidas (BOWMAN; LUCIO-FORSTER, 2010). Pois os animais de estimação raramente apresentam sinais clínicos de infecção, na maioria dos casos atuam como carreadores assintomáticos (GIANGASPERO *et al.*, 2006). Há diversos relatos de seres humanos tornando-se doentes após exposição a animais infectados por *Cryptosporidium* sp. (SANTÍN *et al.*, 2006).

Alguns autores afirmam que o risco de *C. canis* e *C. felis* para as pessoas é pequeno (PALMER *et al.*, 2008; OVERGAAUW, 2009; BOWMAN; LUCIO-FORSTER, 2010). Já que estes são os genótipos mais comuns do parasito encontrados em cães e gatos (BOWMAN; LUCIO-FORSTER, 2010). No entanto, recentes estudos de epidemiologia molecular da criptosporidiose têm ajudado os pesquisadores a entender melhor a transmissão do parasito em seres humanos e o significado para a saúde pública de *Cryptosporidium* sp. de animais (FENG *et al.*, 2009).

A caracterização genética de *Cryptosporidium* sp., a partir de oocistos recuperados de amostras fecais de gatos, cães e pessoas tem revelado que estes hospedeiros são infectados com genótipos espécie-específica. Os gatos são

geralmente infectados com *C. felis*, os cães com *C. canis* e o homem com *C. hominis* e *C. parvum*. *Cryptosporidium muris* também tem sido ocasionalmente relatado em cães e gatos (PALMER *et al.*, 2008; BOWMAN; LUCIO-FORSTER, 2010). Todavia, a genotipagem tem mostrado que, a maioria das infecções em humanos é causada por cinco espécies: *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, e *C. canis* (FENG *et al.*, 2009).

No Mundo, no Brasil e no Paraná existem alguns relatos de ocorrência do parasito, porém, poucos estudos realizaram a genotipagem de *Cryptosporidium* sp. em cães e gatos. Para conhecer melhor a(s) espécie(s) que parasita(m) determinada espécie é necessário que maior número de isolados de *Cryptosporidium* sp. seja obtido e que seja realizado genotipagem de maior número de isolados, pois, a somatória desses dados permitirá maiores esclarecimentos do papel dos animais de companhia na manutenção do ciclo deste protozoário.

Quando se analisa os estudos realizados em diferentes partes do Mundo encontra-se trabalhos da Austrália (SARGENT *et al.*, 1998), que analisaram 162 amostras de fezes de gatos, por microscopia, e detectaram duas (1,2%) amostras positivas para *Cryptosporidium* sp. Essas duas amostras foram submetidas à técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e posteriormente ao sequenciamento, que revelou que os isolados de *Cryptosporidium* sp. de gato são diferentes dos isolados do parasito de seres humanos. Os autores levantaram a hipótese de que existem cepas ou espécies de *Cryptosporidium* sp. adaptadas ao gato. Na Itália, Giangaspero *et al.* (2006), analisaram 240 amostras de fezes de cães pela técnica de PCR e detectaram uma prevalência de 3,3%. O sequenciamento das amostras permitiu a identificação de *C. parvum* em alguns animais e em outros *C. canis*. No Japão, Abe *et al.* (2002) analisaram 140 amostras fecais de cães e encontraram prevalência de 9,3% (13/140) usando a técnica de PCR. O sequenciamento dos isolados mostrou que as 13 amostras eram de *C. canis*.

No Brasil um estudo realizado em 269 amostras de fezes de cães saudáveis das cidades de Lavras e Viçosa, Minas Gerais, verificaram que cinco (1,85%) eram positivas. Neste estudo os autores usaram como ferramenta o teste imunoenzimático - ELISA (FIGUEIREDO *et al.*, 2004). No Estado de São Paulo, Thomaz *et al.* (2007) detectaram três (2,8%) amostras positivas para *C. tipo parvum* de 106 amostras fecais de gato e 15 (12,5%) amostras positivas para *C. tipo parvum* de 120 amostras fecais de cão, usando procedimento convencional de centrífugo-

flutuação em solução de sacarose. Mundim *et al.* (2007), estudaram a prevalência de *Cryptosporidium* sp. em cães que viviam sob diferentes condições de vida em Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. Os autores empregaram duas técnicas parasitológicas para detectar a presença de oocistos nas amostras fecais de cães: a de centrífugo-flutuação, em solução de sacarose, e a coloração com azul de metileno com safranina. Com auxílio destas metodologias detectaram a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 6 (1,4%) de 433 amostras fecais.

No Estado do Paraná único estudo, até o presente, foi realizado por Navarro *et al.* (1997) para detecção de *Cryptosporidium* sp. em amostras fecais de cães e gatos na cidade de Londrina. Nesta pesquisa foi observada a presença de 2,25% dos animais positivos em 133 amostras analisadas. No entanto, não foi realizado a genotipagem dos isolados.

Desta maneira há algumas questões que precisam ser respondidas especialmente na região metropolitana de Curitiba, como: *Cryptosporidium* sp. estaria parasitando cães e gatos desta região? Quais espécies de *Cryptosporidium* circulam em cães e gatos? Seria espécie-específicas, ou estes animais seriam parasitados também por *C. parvum* ou *C. hominis*? Qual a importância desta parasitose para os animais? Os cães e gatos apresentariam papel importante na transmissão de *Cryptosporidium* sp. ao ser humano? Os animais parasitados oferecem risco de infecção para as pessoas? Qual a importância para a saúde pública? Qual o risco de contaminação ambiental?

No presente trabalho foi realizada a pesquisa do parasito seguido da genotipagem visando responder as questões acima.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ocorrência da (s) espécie(s)/genótipo(s) de *Cryptosporidium* sp. circulantes em cães e em gatos da região metropolitana de Curitiba, Paraná.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Verificar a presença de oocistos de *Cryptosporidium* sp. nas amostras fecais de cães e de gatos empregando a técnica de coloração de ZIEHL-NEELSEN modificado;

b) Determinar a presença de DNA de *Cryptosporidium* sp. nas amostras fecais de cães e de gatos empregando as técnicas de PCR e Nested-PCR;

c) Determinar espécie(s)/genótipo(s) de *Cryptosporidium* sp. utilizando a técnica de RFLP e o sequenciamento.

REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 HISTÓRICO

A primeira descrição do gênero *Cryptosporidium* sp. e a denominação de uma espécie, *Cryptosporidium muris*, foi realizada por Ernest Edward Tyzzer em 1907. O parasito foi encontrado em glândulas gástricas de camundongos de laboratório e o autor publicou a descrição completa do ciclo biológico, incluindo desenhos e fotomicrografias, e relatou ter observado a presença de organismo similar fixado ao epitélio do intestino delgado de coelhos. Subsequentemente, em 1912, descreveu a segunda espécie observada em intestino de camundongos de laboratório, designando-a de *Cryptosporidium parvum* (AMARANTE, 1992; LALLO, 1996; XIAO *et al.*, 2004; FAYER, 2010). Este mesmo autor foi o primeiro a descrever criptosporidiose aviária em 1929, mas não foram observadas estruturas do parasita até que 35 anos mais tarde em 1955, Slavin encontrou no íleo de perus jovens com diarreia aguda estruturas similares ao *Cryptosporidium* sp. O parasito foi denominado de *Cryptosporidium meleagridis*, e associou-o como causa principal de morbidade e mortalidade em perus (AMARANTE, 1992; MARTINEZ, 1999; RYAN, 2010). Em 1971, este parasito foi encontrado pela primeira vez em bezerros com diarreia, despertando interesse pelo agente em medicina veterinária (LALLO, 1996).

Em seres humanos, os primeiros casos de infecção por *Cryptosporidium* sp. em pacientes imunocompetentes e imunodeprimidos foram registrados em 1976 nos Estados Unidos da América por Nime *et al.* e Meisel *et al.* Nos anos 80, em decorrência da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), passa a aumentar significativamente os casos de criptosporidiose em pacientes imunocomprometidos, causando quadros graves de diarreia crônica e de difícil tratamento (FAYER *et al.*, 2000; ALMEIDA, 2004; HUBER, 2007; ARAÚJO *et al.*, 2008).

O primeiro relato de criptosporidiose em gatos foi feito por Iseki em 1979, que descreveu presença de oocistos em fezes, fez observações em microscópio óptico e eletrônico dos estágios endógenos e fez tentativas de transmitir o parasito para outras espécies de hospedeiros. O autor denominou o parasito encontrado de *C. felis* (apud XIAO *et al.*, 2004; FAYER *et al.*, 2006). Sargent *et al.* em 1998, realizaram pela primeira vez análise da sequência do gene do *Cryptosporidium* sp. de gatos, que atribuíram como sendo *C. felis* (FAYER *et al.*, 2006).

A primeira evidência de criptosporidiose em cães foi relatada em 1981 por Tzipori e Campbell, que detectaram anticorpos em 16 de 20 amostras de soro canino. Wilson *et al.* (1983) relataram o primeiro caso clínico de criptosporidiose em cães, em um filhote de uma semana de vida sofrendo de diarreia aguda (apud MORGAN *et al.*, 2000).

3.2 TAXONOMIA

Depois da descoberta inicial de *Cryptosporidium* sp., os oocistos do parasito foram confundidos, por alguns pesquisadores, com os esporocistos de *Sarcocystis* sp. Contudo, estudos ultraestruturais subsequentes reafirmaram que os estágios endógenos de *Cryptosporidium* sp. possuíam única organela de fixação (XIAO *et al.*, 2004; HUBER, 2007).

Após o reconhecimento das diferenças entre *Cryptosporidium* sp. e *Sarcocystis* sp., o conceito de especificidade de hospedeiro foi aplicado ao *Cryptosporidium* sp. Isto levou ao surgimento de muitas novas espécies em função dos hospedeiros nos quais foram encontradas (XIAO *et al.*, 2004; HUBER, 2007). Assim como, a sinonimização de muitas destas espécies de *Cryptosporidium* sp. como *C. parvum*, resultando no uso difundido do nome *C. parvum* para *Cryptosporidium* sp. que parasitam todos os tipos de mamíferos, inclusive o ser humano (XIAO *et al.*, 2004).

Na última década, as caracterizações moleculares do parasito ajudaram a esclarecer a confusão na taxonomia e validar a existência de muitas espécies em cada classe de vertebrados. Como consequência, muitas novas espécies de *Cryptosporidium* sp. foram designadas (XIAO *et al.*, 2004).

Vinte e uma espécies são reconhecidas parasitando numerosos vertebrados tais como mamíferos, aves, répteis, peixes e anfíbios (TABELA 1).

No entanto, para considerar válida uma espécie de *Cryptosporidium* sp. são necessários seguir algumas normas como: informação dos dados morfométricos dos oocistos, dos estágios de desenvolvimento, da caracterização genética, da identificação de hospedeiros infectados natural e experimentalmente (XIAO *et al.*, 2000; FAYER, 2010).

TABELA 1 - ESPÉCIES DE *Cryptosporidium* sp. E PRINCIPAIS HOSPEDEIROS

Espécies de <i>Cryptosporidium</i> sp.	Principais hospedeiros	Autor e ano da descrição
<i>Cryptosporidium andersoni</i>	Bovinos, camelos	Lindsay <i>et al.</i> , 2000
<i>Cryptosporidium baileyi</i>	Aves	Current <i>et al.</i> , 1986
<i>Cryptosporidium bovis</i>	Bovinos	Fayer <i>et al.</i> , 2005
<i>Cryptosporidium canis</i>	Cães	Fayer <i>et al.</i> , 2001
<i>Cryptosporidium fayeri</i>	Canguru vermelho	Ryan <i>et al.</i> , 2008
<i>Cryptosporidium fragile</i>	Anfíbios	Jirku <i>et al.</i> , 2008
<i>Cryptosporidium felis</i>	Gatos	Iseki, 1979
<i>Cryptosporidium galli</i>	Aves	Pavleseck, 1999
<i>Cryptosporidium hominis</i>	Seres humanos, macacos	Morgan-Ryan <i>et al.</i> , 2002
<i>Cryptosporidium macropodum</i>	Canguru cinza	Power e Ryan, 2008
<i>Cryptosporidium meleagridis</i>	Perus, seres humanos	Slavin, 1955
<i>Cryptosporidium molnari</i>	Peixes	Alvarez-Pellitero e Sitjà-Bobadilla, 2002
<i>Cryptosporidium muris</i>	Roedores	Tyzzer, 1910
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Bovinos, outros ruminantes, seres humanos	Tyzzer, 1912
<i>Cryptosporidium ryanae</i>	Bovinos	Fayer <i>et al.</i> , 2008
<i>Cryptosporidium scophthalmi</i>	Peixes	Alvarez-Pellitero <i>et al.</i> , 2004
<i>Cryptosporidium serpentis</i>	Serpentes	Levine, 1980
<i>Cryptosporidium suis</i>	Suínos	Ryan <i>et al.</i> , 2004
<i>Cryptosporidium varanii</i>	Lagarto monitor	Pavleseck <i>et al.</i> , 1995
<i>Cryptosporidium xiaoi</i>	Ovinos	Fayer e Santín, 2009
<i>Cryptosporidium wrairi</i>	Porquinho da Índia	Vetterling <i>et al.</i> , 1971

As técnicas de biologia molecular e a análise filogenética do gene codificador do RNA ribossômico 18S (18S rRNA) de *C. parvum* têm permitido diferenciar 40 genótipos (humano, macaco, bovino, canino, camundongo, suíno, furão, equino, cervídeo, leporino, marsupial, entre outros) (FIGUEIREDO *et al.*, 2004; XIAO *et al.*, 2004; APPELBEE *et al.*, 2005; CHALMERS; DAVIES, 2010).

Baseados nas mesmas análises filogenéticas estes genótipos estão sendo claramente definidos como espécies distintas e incluem *C. hominis* (anteriormente designado *C. parvum* genótipo humano ou genótipo 1), *C. parvum* (também designado *C. parvum* genótipo bovino ou genótipo 2), *C. canis* (*C. parvum* genótipo

canino) (XIAO *et al.*, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2008) e *C. suis* (*C. parvum* genótipo 1 suíno) (RYAN *et al.*, 2004).

Taxonomicamente, o protozoário *Cryptosporidium* sp. é classificado segundo Levine *et al.* (1980) da seguinte maneira:

Reino Protista

Sub-reino Protozoa

Filo Apicomplexa Levine, 1970

Classe Sporozoea Leuckart, 1879

Subclasse Coccidia Leuckart, 1879

Ordem Eucoccidia Léger & Duboscq, 1910

Sub-ordem Eimeriina Léger, 1911

Família Cryptosporidiidae

Gênero *Cryptosporidium*

Uma nova proposição taxonômica, com base em estudos filogenéticos, além das informações obtidas pela microscopia eletrônica foi proposta por Adl *et al.* (2005). É uma proposta que difere da sistemática de Levine (1980), pois os autores adotaram um sistema hierárquico sem a designação formal em classe, subclasse, super-ordem ou ordem. Há supergrupos e grupos. A filogenia molecular agrupa os eucariontes em seis grupos: (1) Opisthokonta, agrupando os animais, fungos, coanoflagelados; (2) Amoebozoa, agrupando amebas, ameboflagelados e várias espécies sem mitocôndria; (3) Excavata, agrupando flagelados; (4) Rhizaria, agrupando foraminíferos, radiolária; (5) Archaeplastida, agrupando algas vermelhas, algas verdes e plantas; (6) Chromalveolata, agrupando ciliados, dinoflagelados, apicomplexa, algas pardas e fungos zoospóricos. Os autores acreditam que esta classificação seria mais útil e menos problemática que a tradicional. Como vantagens, os autores mencionam o número limitado de nomes classificados e também maior flexibilidade de modificação. No entanto, a classificação de Levine continua sendo oficialmente adotada.

Conforme Adl *et al.* (2005), *Cryptosporidium* sp. é assim classificado:

Chromalveolata Adl *et al.*, 2005

•Alveolata Cavalier-Smith, 1991

••Apicomplexa Levine, 1980, emend. Adl *et al.*, 2005

•••Conoidasida Levine, 1988

••••Coccidiasina Leuckart, 1879

Cryptosporidium

3.3 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE *Cryptosporidium* sp. QUE INFECTA O SER HUMANO E OS ANIMAIS DE COMPANHIA

A Biologia Molecular vem permitindo esclarecer a identificação específica de *Cryptosporidium* sp. bem como o conhecimento da população intraespecífica. Graças a esta ferramenta foi possível verificar que em seres humanos, tanto em surtos quanto em casos esporádicos de infecção, *C. hominis*, é quase que exclusivamente o agente etiológico, e *C. parvum*, uma espécie zoonótica com numerosos hospedeiros é encontrado principalmente em bovinos. Mas, com uma extensão menor, outras espécies e genótipos de *Cryptosporidium* sp. têm sido indentificados em infecções de seres humanos imunocompetentes e imunocomprometidos. Estes incluem *C. canis*, *C. felis*, *C. andersoni*, *C. meleagridis*, *C. muris* e *C. suis*, assim como *C. hominis* genótipo de macaco, e *Cryptosporidium* sp. genótipo cervino, genótipo I de esquilo, genótipos de gambá, cavalo e coelho (PEDRAZA-DÍAZ *et al.*, 2001; ABE *et al.*, 2002; GATEI *et al.*, 2003; APPELBEE *et al.*, 2005; FAYER *et al.*, 2006, GONÇALVES, *et al.*, 2006; SANTÍN *et al.*, 2006; ARAÚJO *et al.*, 2007; HUBER *et al.*, 2007; MEAMAR *et al.*, 2007; ARAÚJO *et al.*, 2008; ROBINSON *et al.*, 2008; BLANCO *et al.*, 2009; SMITH *et al.*, 2009; CHALMERS; DAVIES, 2010).

A caracterização genética de oocistos recuperados de amostras fecais de gatos e cães tem revelado que estes e outros hospedeiros são infectados com genótipos de *Cryptosporidium* sp. adaptados ao hospedeiro. Os gatos são geralmente infectados com *C. felis*, os cães com *C. canis* (BOWMAN; LUCIO-FORSTER, 2010).

Cryptosporidium canis, anteriormente identificado como *C. parvum* genótipo canino, foi nominado como espécie nova com base em experimentos de transmissão e análises dos locus SSU rRNA e HSP70. Bezerros contaminados com oocistos

tornaram-se infectados, mas não ratos. Porque oocistos de *C. canis* e *C. parvum* são indistinguíveis por microscopia, muitas infecções em canídeos foram relatadas como *C. parvum* (FAYER, 2010).

Todavia, outras espécies como *C. muris* podem ser detectadas em cães e em gatos; *C. parvum* e *C. meleagridis* foram encontradas infectando naturalmente cães (HAMNES *et al.*, 2007; HUBER *et al.*, 2002; HUBER *et al.*, 2007; BOWMAN; LUCIO-FORSTER, 2010). *Cryptosporidium parvum* foi capaz de infectar cães e gatos, durante estudos de infecção experimental (HUBER *et al.*, 2007).

Em um estudo, realizado por SANTÍN *et al.* (2006), para determinar espécies e genótipos de *Cryptosporidium* sp. em gatos, notaram que de 46 gatos estudados, cinco foram infectados com *C. felis* e um com *C. muris*, sendo o primeiro relato de *C. muris* em gatos. Neste caso, não é possível determinar se o gato simplesmente abrigou os oocistos de um roedor infectado que tinha ingerido ou se ele tinha uma infecção ativa.

Todos estes relatos indicam a importância de duas ou mais ferramentas no estudo etiológico e epidemiológico de várias doenças, especialmente em *Cryptosporidium* sp.

3.4 MORFOLOGIA

Todos os estágios de desenvolvimento de *Cryptosporidium* sp. são microscópicos em comparação a outros esporozoários entéricos. Os estágios endógenos estão localizados em estreita associação com a superfície luminal das células epiteliais intestinais do hospedeiro, predominantemente no intestino delgado, embora infecções tenham sido encontradas em outros órgãos e tecidos. Em cortes histológicos, os parasitos aparecem como pequenos corpos basofílicos aparentemente aderidos à superfície das células, algumas vezes dando à borda dos microvilos uma aparência granulada. A microscopia eletrônica tem confirmado que a sua localização é intracelular, porém extracitoplasmática (O'DONOGHUE, 1995). As formas endógenas correspondem aos: trofozoítos, merontes contendo merozoítos, macrogametócitos e microgametócitos (PEREIRA, 2007).

O desenvolvimento endógeno culmina na formação de um oocisto que é eliminado nas fezes do hospedeiro como estágio infectante exógeno. Os oocistos maduros contêm quatro esporozoítos não inclusos em um esporocisto e esta

configuração estrutural única estabelece a principal característica taxonômica para identificação do gênero. Os oocistos recuperados de diferentes espécies hospedeiras podem variar na forma e tamanho, os quais apresentam formato esférico ou oval com parede lisa, e medem aproximadamente 4 a 7 μm , chegando a 2 μm quando comprimido (O'DONOGHUE, 1995; PEREIRA, 2007).

Há produção de dois tipos de oocistos. Os primeiros, aproximadamente 80%, têm paredes espessas e resistentes e são eliminados nas fezes, sendo responsáveis pela transmissão entre hospedeiros. Os outros, em torno de 20%, têm paredes delgadas e liberam os seus esporozoítos no intestino, causando auto-infecção interna (AMARANTE, 1992; LALLO, 1996).

3.5 CICLO DE VIDA

O protozoário *Cryptosporidium* sp. tem ciclo biológico monoxeno, onde todos os estágios de desenvolvimento (assexual e sexual) ocorrem em único hospedeiro, o que diferencia este protozoário dos demais coccídeos (AMARANTE, 1992; O'DONOGHUE, 1995).

O ciclo biológico inicia-se com a ingestão dos oocistos viáveis presentes na água ou alimentos contaminados, bem como nas fezes de animais e pessoas infectadas. No trato gastrointestinal, os oocistos são desencistados pela ação de vários fatores incluindo condições redutoras, dióxido de carbono, temperatura, enzimas pancreáticas e sais biliares. Desta maneira, os esporozoítos infectantes são liberados. Estes ativamente procuram, fixam-se, invadem e tornam-se englobados pelas células epiteliais do hospedeiro na superfície luminal, formando um vacúolo parasitóforo de localização intracelular extracitoplasmática (LAURENT *et al.* 1999; PEREIRA, 2007; CHALMERS; DAVIES, 2010). Uma organela de fixação ou de nutrição se desenvolve, e o esporozoíto torna-se mais esférico e diferencia-se em trofozoíto. Durante a maturação do trofozoíto ocorre a multiplicação assexual (esquizogonia ou merogonia) e resulta na formação de esquizonte ou meronte tipo 1 que contém 6 a 8 merozoítos. A ruptura do esquizonte resulta na liberação dos merozoítos que invadem as células epiteliais adjacentes, onde eles se desenvolvem subsequentemente em esquizonte tipo 2 que contém 4 merozoítos. Segue-se a reprodução sexual (gametogonia) pela diferenciação em microgamontes masculinos e macrogamontes femininos. Os microgamontes tornam-se multinucleados e liberam

os microgametas maduros que fertilizam os macrogametas dentro do macrogamonte feminino, produzindo um zigoto. Os zigotos resultantes passam por desenvolvimento assexuado adicional (esporogonia), levando a produção de oocistos esporulados que contêm quatro esporozoítos (DAVIES, 2010). Assim, o oocisto esporulado é liberado do vacúolo parasitóforo e eliminado nas fezes, constituindo a forma exógena infectante (AMARANTE, 1992; LALLO, 1996).

3.6 EPIDEMIOLOGIA

3.6.1 Prevalência de infecção por *Cryptosporidium* sp. em seres humanos

As pesquisas epidemiológicas indicam que a infecção em seres humanos por *Cryptosporidium* sp. é distribuída mundialmente nas populações urbana e rural tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (MEINHARDT *et al.*, 1996).

Nos anos 80, as taxas de prevalência de infecção de *Cryptosporidium* sp. em seres humanos abrangeram em torno de 1% a 30% no mundo todo. Algumas dessas variações podem ser atribuídas a diferenças geográficas. Fatores demográficos, temporais e metodológicos podem também desempenhar um papel importante nestas diferenças (MEINHARDT *et al.*, 1996). Nos anos 90, as taxas de prevalência de pacientes com diarreia em países desenvolvidos abrangeram de 0,6% a 20%, enquanto em países em desenvolvimento de 4 a 30%. Avaliação de dados laboratoriais em países desenvolvidos sugeriu uma taxa média de 2% para a população geral e de 4% para crianças. As taxas médias de prevalência de infecção de *Cryptosporidium* sp. para a população geral nas principais regiões do mundo foram tão altas quanto 4,9% na Ásia e 10,4% na África (O'DONOGHUE, 1995; MEINHARDT *et al.*, 1996).

As taxas de prevalência em indivíduos assintomáticos variaram de 0 a 2% em países desenvolvidos e em países em desenvolvimento de 0 a 9,8%. A alta prevalência de infecção em países menos desenvolvidos pode ser devida à falta de saneamento, fontes de água contaminadas, superpopulação ou muito contato com animais domésticos (O'DONOGHUE, 1995).

3.6.2 Prevalência de *Cryptosporidium* sp. em animais de estimação

A taxa real de prevalência do parasito em cães e gatos não é bem conhecida. Os estudos limitados a publicações de infecção de *Cryptosporidium* sp. em cães e gatos no mundo relatam taxas de prevalência em cães de 0 a 44,8% e em gatos de 0,6 a 15,4% (BOWMAN; LUCIO-FORSTER, 2010).

3.6.3 Transmissão de *Cryptosporidium* sp.

A transmissão de *Cryptosporidium* sp. ocorre pela propagação fecal-oral de oocistos por contato direto com pessoas ou animais infectados e ou indireto pela ingestão de alimento e água contaminados. Pode também ocorrer transmissão pelo ar (AMARANTE, 1992; O'DONOGHUE, 1995; MEINHARDT *et al.*, 1996 ; LAURENT *et al.*, 1999 ; FAYER *et al.*, 2000 ; FIGUEIREDO *et al.*, 2004 ; OVERGAAUW *et al.*, 2009; BOWMAN; LUCIO-FORSTER, 2010.; XIAO, 2010).

Muitos casos de transmissão de *Cryptosporidium* sp. de ser humano para ser humano foram relatados entre membros da mesma residência ou família, parceiros sexuais (tanto heterossexuais como homossexuais), funcionários e pacientes de hospital e crianças atendidas em creches (O'DONOGHUE, 1995).

Numerosos casos de transmissão zoonótica de *Cryptosporidium* sp. de animais para o ser humano foram também inferidos em estudos epidemiológicos, a maioria envolvendo pessoas que cuidavam de animais de estimação ou de fazenda, especialmente bovinos. A transmissão zoonótica foi confirmada várias vezes por infecção acidental de atendentes de animais, estudantes ou pesquisadores que manipulavam isolados veterinários (O'DONOGHUE, 1995).

3.6.3.1 Transmissão de *Cryptosporidium* sp. por alimentos e água contaminados

3.6.3.1.1 Alimentos contaminados com oocistos de *Cryptosporidium* sp.

Os alimentos não processados ou preservados impropriamente, particularmente preparados com água não tratada ou germinados em solo fertilizado com resíduos do ser humano ou animal, deveriam ser considerados como fontes potenciais de infecção (O'DONOGHUE, 1995).

Embora os oocistos não tenham sido recuperados de alimentos suspeitos (O'DONOGHUE, 1995), a contaminação dos alimentos por *Cryptosporidium* sp. é provavelmente subdetectada devido ao pequeno número de oocistos presentes, o tamanho limitado das amostras, as dificuldades na concentração dos oocistos e a falta de técnicas de cultivo *in vitro* para aumentar o número de oocistos (ALMEIDA, 2004).

Apesar disso, muitos estudos epidemiológicos têm envolvido os alimentos contaminados na transmissão das infecções, especialmente leite não pasteurizado, miúdos e linguiças (O'DONOGHUE, 1995; SLIFKO *et al.*, 2000; ALMEIDA, 2004).

Há diversos alimentos em que o protozoário *Cryptosporidium* sp. já foi detectado, como os de origem marinha e vegetal. Os oocistos de *C. parvum* foram detectados em ostras, mariscos e mexilhões da costa da Irlanda e em ostras da Galícia, na Espanha. Embora nenhum destes achados fossem associados com surtos de criptosporidiose (FAYER *et al.*, 2000). No Brasil, os oocistos de *Cryptosporidium* sp. foram encontrados em ostras e vôngoles do Litoral Norte de São Paulo. A concentração de oocistos detectada por animal foi de 12 oocistos/ostra o que é suficiente para causar infecção no ser humano, caso esse marisco seja ingerido cru ou mal cozido (FRANCO, 2008).

Os moluscos filtram grande quantidade de água, extraem partículas minúsculas que permanecem nas brânquias. Desta maneira, as ostras e os mexilhões albergam alta concentração de oocistos viáveis de *Cryptosporidium* sp., podendo atuar como hospedeiros transportadores. São considerados como reservatórios para transmissão zoonótica, e a criptosporidiose pode resultar de consumo de ostras e mariscos crus ou mal-cozidos (SLIFKO *et al.*, 2000; CAREY *et al.*, 2004; APPELBEE *et al.*, 2005). Estes moluscos funcionam como indicadores biológicos excelentes de patógenos de água. Com isso, surtos repetidos de doenças virais e bacterianas associados com ingestão de moluscos crus deveriam servir como uma advertência, e que cozinhá-los reduzirá o risco de doenças de todos estes patógenos (FAYER *et al.*, 2000).

Também já foram encontrados os oocistos na superfície de vegetais crus. Na Costa Rica, os oocistos foram detectados nas raízes e folhas de coentro, alface, rabanete, tomate, pepino e cenouras (FAYER *et al.*, 2000). Em um estudo realizado em vários mercados no Peru, foi detectada a presença de oocistos de *C. parvum* em diversos vegetais como manjeriço, repolho, aipo, coentro, cebolinha, pimentão

verde, alho-poro, alface e salsa (FAYER *et al.*, 2000; ALMEIDA, 2004). No Brasil, uma pesquisa realizada em Recife por Silva *et al.* (2005), detectou a presença de oocistos na alface lisa.

Os vegetais podem ser contaminados quando se utiliza fezes de animais ou de seres humanos como fertilizantes; água contaminada usada para irrigar; quando os agricultores, os manipuladores de produtos agrícolas ou os cozinheiros manipulam os vegetais com mãos sujas e quando os vegetais são embalados, estocados, vendidos ou preparados em superfícies contaminadas (FAYER *et al.*, 2000; FRANCO, 2008).

Surtos de criptosporidiose com outros tipos de alimentos já foram relatados. Um surto envolvendo 50 crianças de escola no Reino Unido foi associado com leite não pasteurizado adequadamente. No estado de Maine, Estados Unidos, 160 pessoas desenvolveram criptosporidiose após consumo de suco de maçã não pasteurizado em uma feira agrícola (FAYER *et al.*, 2000; GARRIDO, 2005). As maçãs utilizadas ficavam próximas do pasto para bovino (FAYER *et al.*, 2000; SLIFKO *et al.*, 2000). No estado de Minnesota, uma salada de frango foi associada com surto entre 50 pessoas que compareceram em um evento social. O fornecedor trocou uma fralda de criança e mais tarde preparou a salada para o evento. Já na cidade de Spokane, Washington, 54 de 62 pessoas que compareceram em um banquete tornaram-se doentes. Os alimentos ingeridos por 51 pessoas afetadas continham cebolinha não cozida. Entre três semanas após o banquete dois dos 14 preparadores dos alimentos foram positivos para *Cryptosporidium* sp. Outro caso ocorreu em uma universidade em Washington, onde 88 estudantes e quatro empregados de cafeteria foram diagnosticados com criptosporidiose (FAYER *et al.*, 2000).

Há também alguns relatos de surtos de criptosporidiose em viajantes após visita ao México, Reino Unido e Austrália, que consumiram alimentos suspeitos de estarem contaminados com *Cryptosporidium* sp. como saladas, leite cru, salsichas e linguiças (SLIFKO *et al.*, 2000).

3.6.3.1.2 Água contaminada com oocistos de *Cryptosporidium* sp.

A água contaminada foi sugerida como fonte de infecção entre viajantes. Muitos surtos da doença têm sido associados com a contaminação de água de poço,

águas de superfície, piscinas e suprimentos de água pública. Os oocistos de *Cryptosporidium* sp. têm sido recuperados de águas de superfície (rios, córregos e reservatórios), efluentes de esgoto tratados e não tratados, água de piscina filtrada, e mais importante, de suprimentos de água potável tratada em várias regiões do mundo como na América do Norte, América do Sul, Reino Unido e Europa, e na antiga URSS (O'DONOGHUE, 1995; MEINHARDT et al., 1996). A contaminação de águas de superfície tem sido ligada a várias práticas agrícolas, em particular fazenda leiteira (O'DONOGHUE, 1995). Também foram isolados os oocistos de *Cryptosporidium* sp. na água do mar perto de uma saída de esgoto em Honolulu, Havaí e em águas de estuários na cidade de Chesapeake Bay (FAYER et al., 2000). Os surtos epidêmicos relacionados à transmissão por água têm sido registrados nos Estados Unidos (EUA), Canadá, Reino Unido e Japão (SLIFKO et al., 2000; LIMA; STAMFORD, 2003).

O primeiro surto de criptosporidiose relacionado à água foi descrito em 1984, em Braun Station, Texas, que foi confirmado através de exames de fezes e sorológicos de pessoas infectadas. Em 1987, outro surto afetou 13.000 de 64.900 residentes em Carrol County, Geórgia, Estados Unidos (FAYER et al., 2000). Os oocistos foram detectados em água tratada, em esgoto e rios acima da estação de tratamento de água. Em 1993, 403.000 pessoas de 1.610.000 foram afetadas por *Cryptosporidium* sp. em Milwaukee, Wisconsin, em um dos maiores surtos de criptosporidiose cuja transmissão se deu pela água. Este foi o maior surto documentado na história dos Estados Unidos. Os oocistos foram identificados nas fezes dos habitantes comprovando ser o agente etiológico da doença (MAC KENZIE et al., 1994).

A presença de oocistos nos mananciais aumenta a preocupação com a transmissão do parasito, porque enquanto ocorre por contato com fômites contaminados, de pessoa a pessoa, animal a pessoa, restringe-se o número de pessoas infectadas. No entanto, quando ocorre veiculação hídrica de oocistos pode atingir facilmente uma grande parte da população (LIMA; STAMFORD, 2003). Além disso a transmissão pela água é difícil de controlar, pois os oocistos não são eliminados com a cloração e podem persistir em suprimentos de água mesmo após o tratamento (PEREIRA et al., 2008).

3.6.4 Infectividade dos oocistos de *Cryptosporidium* sp.

A dose infectante de *Cryptosporidium* sp. em seres humanos não é conhecida, mas acredita-se que deve ser muito pequena, provavelmente de 10 – 100 oocistos. Porém, a dose infectante deve variar dependendo da fonte, subtipo ou cepa do parasito, umidade, viabilidade dos oocistos, exposição dos oocistos ao estresse ambiental, e outros fatores pobremente compreendidos tais como virulência (MEINHARDT *et al.*, 1996).

Em estudo experimental foram infectados 29 animais adultos saudáveis com nenhuma evidência sorológica prévia de infecção por *Cryptosporidium* sp. Foram utilizadas doses de 30 a 1 milhão de oocistos isolados de bovinos e observou-se que a dose infectante média era de 132 oocistos e dose mínima infectante menos que 30 oocistos (MEINHARDT *et al.*, 1996; FAYER *et al.*, 2000). Com dados adicionais a dose média infectante (ID50) foi recalculada para 87 oocistos e foi observado que diferentes isolados de *C. parvum* tiveram valores de ID50 muito diferentes. Portanto, a dose infectante depende da cepa do protozoário e pode variar de 9 a 1042 oocistos (FAYER *et al.*, 2000).

A doença ocorre em função tanto das características do parasita quanto do tamanho da dose e a imunidade das pessoas expostas. Adicionalmente, a dose infectante baixa pode resultar em período de incubação prolongada ou pode reduzir a probabilidade de manifestação de sintomas (MEINHARDT *et al.*, 1996).

3.6.5 Resistência e viabilidade dos oocistos de *Cryptosporidium* sp.

Como muitos outros oocistos de coccídeos, os de *Cryptosporidium* sp. mostram resistência à desinfecção química. Os estudos laboratoriais comprovam que muitos desinfetantes comerciais (a base de aldeído, amônia, álcool, cloro ou compostos alcalinos) são ineficazes quando usados de acordo com as instruções do fabricante (O'DONOGHUE, 1995, PEREIRA *et al.*, 2008). O cloro em concentrações excessivas, como ocorre em tratamento de água, não inviabiliza os oocistos (MEINHARDT *et al.*, 1996). Dos vários agentes químicos analisados para uso em ambientes veterinários, domésticos e hospitalares, certos desinfetantes tais como formaldeído a 10%, amônia a 5 – 10%, água sanitária comercial não diluída a 70%, peróxido de hidrogênio 10 volumes (3%) inviabilizam os oocistos (O'DONOGHUE,

1995; MEINHARDT *et al.*, 1996; FALCHI, 2006). Porém, muitos destes desinfetantes não são apropriados para a finalidade médica, doméstica ou tratamento de água em concentrações tão altas (MEINHARDT *et al.*, 1996). Outro desinfetante com bons resultados é o ozônio que vem sendo usado inclusive no tratamento de água (PEREIRA *et al.*, 2008).

Os oocistos são muito resistentes a uma variedade de condições ambientais, permanecem viáveis por aproximadamente 18 meses em ambiente úmido e fresco. Sobrevivem em média 176 dias na água doce e 35 dias em água do mar. Conforme a salinidade e temperatura marinha, os oocistos permanecem infectantes por quatro a doze semanas (O'DONOGHUE, 1995; CAREY, 2004; FALCHI, 2006).

Com relação à temperatura, estudos laboratoriais mostraram que oocistos mantidos a 20°C por seis meses, continuaram infectantes para rato. Temperaturas mais altas resultaram em perda mais rápida de viabilidade (FAYER *et al.*, 2000). Desta maneira, quando mantidos entre 25 e 30°C, permaneceram infectantes por três meses (O'DONOGHUE, 1995; FAYER *et al.*, 2000; CAREY, 2004; FALCHI, 2006). Quando refrigerados de 4 a 6°C continuaram viáveis por um ano (O'DONOGHUE, 1995). Já aquecer os oocistos a 55°C aproximadamente 20 minutos resultou em perda de infectividade para ratos. Os oocistos mantidos a 59,7°C por cinco minutos tiveram a infectividade reduzida e outros mantidos a 71,7°C por somente cinco segundos foram inativados (FAYER *et al.*, 2000). Em outro estudo mais recente, foram usadas temperaturas a 75°C por 20 minutos e 100°C por no mínimo um minuto. O aquecimento a 75°C por 20 minutos não inativou os oocistos. Já a temperatura de 100°C por no mínimo um minuto mostrou inativar os oocistos (FRANCO, 2008).

O congelamento rápido e programado a -70°C resultou em morte imediata dos oocistos de *C. parvum* mesmo na presença de uma variedade de crioprotetores. Em temperaturas mais altas os oocistos sobrevivem por mais tempo, alguns oocistos mantidos em -20°C foram viáveis por oito horas, mas não em 24 horas. Alguns oocistos mantidos em -10°C foram infectantes para ratos por uma semana após armazenamento (FAYER *et al.*, 2000), enquanto aqueles mantidos em -5°C permaneceram viáveis por dois meses (FAYER *et al.*, 2000; CAREY, 2004; FALCHI, 2006). Estes achados sugerem que os fluidos dentro dos oocistos oferecem crioproteção mínima aos esporozoítos (FAYER *et al.*, 2000).

A dessecação é letal para os oocistos. Somente 3% dos oocistos permaneceram viáveis após duas horas de dessecação e 100% de morte foi observada em quatro horas (O'DONOGHUE, 1995; FAYER *et al.*, 2000; FALCHI, 2006).

3.6.6 Contaminação ambiental por oocistos de *Cryptosporidium* sp.

O potencial para contaminação ambiental por oocistos de *Cryptosporidium* sp. depende de uma variedade de fatores, incluindo o número de animais infectados, o número de oocistos excretados, as práticas agrícolas, a conduta e atividade do hospedeiro, as diferenças sócio-econômicas e étnicas nas ações humanas, a distribuição geográfica, o saneamento, a proteção de fontes e suprimentos de água potável e alimento, e o clima e hidrogeologia da área (SLIFKO, 2000).

A contaminação ambiental e transmissão de *Cryptosporidium* sp. não são realizadas apenas pelos animais domésticos, marinhos, de criação e silvestres. O ser humano também está ajudando no processo de dispersão dos oocistos ao usar as fezes de animais ou próprias como adubo orgânico; ao realizar o lançamento indevido de resíduos agrícolas e de esgoto não tratado ou tratado inadequadamente nos rios e mares.

3.7 PATOGENIA

A patogenicidade depende de vários fatores, incluindo o tamanho do inóculo, a virulência das diferentes espécies e cepas do parasito e a suscetibilidade do hospedeiro. A criptosporidiose instala-se no organismo através da ingestão dos oocistos e tem período médio de incubação de aproximadamente quatro dias (AMARANTE, 1992).

O local principal de instalação é o intestino delgado, embora o parasito possa ser difundido por todo o trato gastrintestinal e locais extra-intestinais. A invasão de células do hospedeiro é restrita ao bordo luminal dos enterócitos e leva ao deslocamento da borda dos microvilos e perda de epitélio de superfície, causando mudanças na arquitetura dos vilos, com atrofia vilosa, destruição e hiperplasia das células da cripta, e infiltração de célula mononuclear na lâmina própria (CHALMERS; DAVIES, 2010).

Os aspectos osmóticos, inflamatórios e secretórios da diarreia têm sido investigados para criptosporidiose, ainda que os mecanismos causadores não tenham sido totalmente elucidados. Estes mecanismos são multifatoriais, que estão relacionados à ação do parasito e seus produtos na camada epitelial e a respostas imunológica e inflamatória do hospedeiro (CHALMERS; DAVIES, 2010).

Em pacientes com diarreia volumosa e aquosa, o processo secretório parece ser importante. Uma atividade enterotóxica liberada pelo parasito tem sido descrita como mecanismo de ação (LAURENT *et al.*, 1999). Isto foi indicado por análises das fezes de crianças infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), mas não foi confirmado em estudos de perfusão em caso-controle. Apesar da evidência de atividade parecida com enterotoxina *in vitro*, uma toxina de *Cryptosporidium* sp. não foi isolada (AMARANTE, 1992; LAURENT *et al.*, 1999; CHALMERS; DAVIES, 2010).

As alterações em permeabilidade intestinal, como aumento da permeabilidade intracelular e inflamação na lâmina própria, poderiam contribuir para diarreia secretória via citocinas e neuropeptídeos em indivíduos infectados com *C. parvum*. A este respeito, níveis aumentados de interferon gama produzido durante a infecção poderia aumentar a permeabilidade intestinal e diminuir a função e barreira epitelial (LAURENT *et al.*, 1999). Porém, os leucócitos fecais estão geralmente ausentes, embora em estudos em crianças mal-nutridas a presença de citocinas ou lactoferrina nas fezes seja indicativa de inflamação intestinal (na ausência de amamentação), e a infecção por *Cryptosporidium* sp. tem sido associado com uma resposta inflamatória sistêmica persistente (CHALMERS; DAVIES, 2010).

Em adição, a produção aumentada de prostaglandina de mucosa que pode inibir a absorção de cloreto de sódio (NaCl) e resultar em diarreia secretória tem sido demonstrado em suíno. Tais efeitos podem ser devidos, em parte, pela ação da prostaglandina nos componentes do sistema nervoso entérico e uma ação direta nos enterócitos. Os mecanismos que levam a produção aumentada de prostaglandina e a fonte celular da mesma não são conhecidos, embora a última possa incluir as células mesenquimais e/ou epiteliais. Em adição, os leucócitos residentes e recrutados na mucosa (ex. macrófagos) têm potencial de produzir níveis altos de prostaglandinas, e podem também ser uma fonte de produção de prostaglandinas durante a infecção por *C. parvum* (LAURENT *et al.*, 1999).

Os aspectos osmóticos da diarreia, devido ao mau funcionamento dos enterócitos, foram demonstrados em suínos pela absorção diminuída de sódio (Na⁺)

por causa da ineficiência dos vilos e pela secreção aumentada de cloro (Cl⁻) devido à hiperplasia das células da cripta. Mudanças na borda dos microvilos também levam a perda de enzimas digestivas e redução na superfície absorptiva diminuindo a absorção de fluidos, eletrólitos e nutrientes. Com isso a presença da diarreia pode estar associada com má-absorção (CHALMERS; DAVIES, 2010).

3.7.1 Criptosporidiose em seres humanos

A criptosporidiose é uma gastroenterite aguda autolimitada em seres humanos imunocompetentes e crônica e fatal em pessoas imunocomprometidas. Ocorre em todo o mundo, e em grupos de todas as idades, embora crianças especialmente as de dois anos sejam mais frequente e gravemente afetadas (LALLO, 1996; LAURENT *et al.*, 1999; BOWMAN; FORSTER, 2010).

As manifestações clínicas em seres humanos infectados seguem um período de incubação que geralmente varia de dois a 14 dias (LAURENT *et al.*, 1999). A doença no homem pode evoluir de quatro formas: assintomática, aguda, crônica ou fulgurante (intensa e rápida) (PEREIRA, 2007).

3.7.1.1 Aspectos clínicos em pacientes imunocompetentes

A diarreia é o principal sintoma da criptosporidiose em pacientes imunocompetentes. Ela pode iniciar subitamente, geralmente é aquosa e volumosa, pode conter muco, mas raramente sangue ou leucócitos. A frequência das evacuações pode variar de três a seis vezes ao dia ou mais. Outros sintomas agudos são dor abdominal, náusea ou vômito, febre baixa, anorexia, indisposição, dor de cabeça, mialgia e fraqueza. A perda de peso pode ser considerável. Distensão abdominal, produção de gases e tosse podem ser relatados (SMYTH, 1994; O'DONOGHUE, 1995; WIDMER, 1998; LAURENT *et al.*, 1999; SANTOS *et al.*, 2005; LALLO; BONDAN, 2006; BOWMAN; LUCIO-FORSTER, 2010; CHALMERS; DAVIES, 2010). Os sintomas geralmente duram três semanas, e são resolvidos através da estimulação da resposta imune, mas em geral ocorre a resolução espontânea dos sintomas. Alguns pacientes experimentam a diarreia crônica por um mês ou mais. Nesses pacientes a eliminação dos oocistos pode continuar por um período médio de sete dias (varia de 1 – 15 dias) após os sintomas terem cessado, embora

excepcionalmente possam ser eliminados por dois meses (O'DONOGHUE, 1995; BOWMAN; LUCIO-FORSTER, 2010; CHALMERS; DAVIES, 2010).

3.7.1.2 Aspectos clínicos em pacientes imunocomprometidos

Os pacientes imunocomprometidos podem apresentar diarreia prolongada, crônica, incessante e grave que se resolve lentamente ou persiste com efeitos devastadores (O'DONOGHUE, 1995; BOWMAN; LUCIO-FORSTER, 2010; CHALMERS; DAVIES, 2010). As infecções de intestino delgado proximal geralmente causam diarreia mais severa e reduz as taxas de sobrevivência, comparado a infecção intensa do cólon que, na ausência de infecção de intestino delgado, pode causar diarreia intermitente ou mesmo infecção assintomática (CHALMERS; DAVIES, 2010).

Na infecção grave, a má-absorção pode estar presente devido à superfície absorptiva diminuída e isto pode contribuir para a síndrome do definhamento em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (LAURENT *et al.*, 1999).

Os indivíduos com deficiência imune de célula T são o maior risco, incluindo aqueles com neoplasias hematológicas (particularmente crianças), deficiências primárias de células T e pacientes HIV com contagens de linfócitos CD4+ < 50/mm³. Estes grupos de pacientes de alto-riscos frequentemente experimentam a doença crônica ou intratável. Em tais pacientes as doenças atípicas e extra-intestinal podem se desenvolver, em adição a típica doença intestinal. Todo o trato gastrintestinal e os brônquios podem ser afetados. Na infecção de duto biliar pode ocorrer icterícia secundária à obstrução do trato biliar ou pancreatite (CHALMERS; DAVIES, 2010). A inflamação da mucosa entérica duodenal pode levar à obstrução da papila duodenal maior e menor causando colestase e pancreatite, o que poderia explicar a formação de icterícia e pancreatite em pacientes com criptosporidiose (ETTINGER; FELDMAN, 2004). Há também relatos de envolvimento gástrico neste grupo de pacientes, assim como traqueo-bronquial que não é comum, mas pode ocorrer. Sinusite também foi descrita (CHALMERS; DAVIES, 2010).

As pessoas imunocomprometidas parecem ter uma prevalência mais alta de infecções com espécies atípicas ao ser humano do que pessoas imunocompetentes (BOWMAN; LUCIO-FORSTER, 2010).

3.7.2 Criptosporidiose em cães e em gatos

A infecção por *Cryptosporidium* sp. em cães e em gatos não parece ser comum. A eliminação de oocistos é mais frequente em animais mais jovens, e o estresse pode induzir a eliminação de oocistos em animais adultos, sugerindo que infecções crônicas e subclínicas possam ser mais frequentes do que as pesquisas indicam. A infecção por *Cryptosporidium* sp. está associada com atrofia e fusão de vilos e inflamação, que resulta em perda da área de superfície absorviva e prejudica o transporte de nutrientes (PALMER *et al.*, 2008).

Há uma série de controvérsias na literatura com autores afirmando que as infecções por *C. canis* geralmente são assintomáticas, no entanto outros afirmam que as mesmas podem ser sintomáticas (HAMNES *et al.*, 2007; SMITH, 2009).

O mesmo ocorre em gatos onde a infecção por *Cryptosporidium felis* também pode ser assintomática ou apresentar diarreia (SMITH, 2009). Os filhotes parecem ser mais suscetíveis ao parasitismo, provavelmente devido à imaturidade do seu sistema imune (HUBER *et al.*, 2002).

O aspecto mais comum de criptosporidiose em mamíferos é a diarreia aquosa profusa que algumas vezes parece amarelo-palha na coloração e pode ter um odor ofensivo (O'DONOGHUE, 1995). Outros sinais clínicos observados incluem desidratação, má-absorção, febre, anorexia, perda de peso, fraqueza, depressão, sonolência e algumas vezes distensão abdominal (O'DONOGHUE, 1995; MORGAN, 2000; HAMNES *et al.*, 2007). A maioria dos animais exibe recuperação espontânea dentro de uma a duas semanas de infecção, mas mortalidades significativas podem ocorrer em animais jovens. Em animais imunossuprimidos ou imunodeficientes infecções graves têm sido detectadas, podendo ocorrer definhamento e morte (O'DONOGHUE, 1995; MORGAN, 2000).

3.8 DIAGNÓSTICO

Para o diagnóstico de criptosporidiose métodos microscópicos, imunológicos e moleculares são utilizados na atualidade. Cada método apresenta uma finalidade no seu uso, assim como vantagens e desvantagens.

Se a intenção é saber se há o parasitismo por *Cryptosporidium* sp., então métodos de exame parasitológico de fezes rotineiros e colorações especiais de esfregaços de fezes podem ser suficientes. Para determinar a espécie de *Cryptosporidium* sp. envolvida, o uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) torna-se necessária. Se o objetivo é saber se o hospedeiro alguma vez foi exposto ao protozoário, então métodos sorológicos podem ser empregados (HUBER, 2007).

3.8.1 Métodos microscópicos

A maioria das infecções é diagnosticada por exame microscópico do material fecal para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* sp. (O'DONOGHUE, 1995; JEX *et al.*, 2008b), após métodos de concentração baseados em princípios de flutuação ou centrífugo sedimentação (ALMEIDA, 2004). Para a visualização dos oocistos, após concentração, são utilizadas técnicas de coloração especiais, como: Ziehl-Neelsen modificado (ácido-resistente), dimetil sulfóxido (DMSO) com carbol-fucsina, Kinyoun, coloração a quente de safranina com azul de metileno, coloração modificada de Kohn, coloração modificada de Koster e auramina que coram os oocistos em vermelho e o corante de contraste ao fundo (O'DONOGHUE, 1995; FAYER *et al.*, 2000; ALMEIDA, 2004; JEX *et al.*, 2008b).

Em adição a estas técnicas de coloração direta, há métodos de coloração negativa, que usam produtos químicos tais como negrosina, verde brilhante, mebromide e verde malaquita que coram o material de fundo nas lâminas e deixam os oocistos de *Cryptosporidium* sp. sem corar. Porém, coloração diferencial tem sensibilidade e especificidade variável (FAYER *et al.*, 2000; JEX *et al.*, 2008b). Uma variedade de corantes fluorocromos foram testados, embora sensíveis, são complexos e estruturas parecidas com oocistos nos debrís fecais frequentemente absorvem o corante, que precisam ser verificados por outras técnicas de coloração (O'DONOGHUE, 1995; FAYER *et al.*, 2000).

Realizar o diagnóstico de criptosporidiose por meio da microscopia não é simples, pois depende de um microscopista bem treinado, é um método trabalhoso, cansativo e relativamente demorado. O profissional pode às vezes diagnosticar infecções equivocadamente ou não diagnosticá-la, pois a morfologia do oocisto é incerta. Este método não é útil para avaliar amostras submetidas a condições desfavoráveis, como as amostras ambientais, que podem modificar a morfologia do parasito (ALMEIDA, 2004; JEX *et al.*, 2008b).

Outro exame que utiliza a microscopia é o histopatológico, que pode ser realizado de material de autópsia ou biópsia. Nos cortes histológicos, estágios endógenos podem ser visualizados pela coloração de hematoxilina-eosina ou Giemsa. Os parasitos podem ser prontamente identificados por suas características ultraestruturais únicas e localização dentro de vacúolos parasitóforos (O'DONOGHUE, 1995; CHALMERS; DAVIES, 2010).

Todavia, embora úteis para detecção de oocistos, os métodos parasitológicos têm a desvantagem que não permitem a identificação de espécies de *Cryptosporidium* sp. (JEX *et al.*, 2008b).

3.8.2 Métodos imunológicos

As técnicas imunológicas utilizadas incluem testes com anticorpo policlonal fluorescente, reações de aglutinação com látex, imunofluorescência com anticorpos monoclonais (IF), hemoaglutinação passiva reversa, imunoserologia usando detecção de imunoglobulinas por IF ou ELISA e ensaios imunocromatográficos qualitativos de fase sólida (FAYER *et al.*, 2000).

Estas técnicas podem oferecer algumas vantagens sobre a microscopia para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* sp. e diagnóstico de criptosporidiose. Por exemplo, o uso de imunofluorescência direta usando um anticorpo monoclonal anti-*Cryptosporidium* sp. apresenta alta especificidade (96 – 100%) e sensibilidade (98,5 – 100%) para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* sp. em esfregaços fecais e amostras ambientais (MILLER *et al.*, 1994, JEX *et al.*, 2008b).

A detecção de antígenos nas amostras fecais (coproantígenos) é realizada por imunoensaios (ELISA) ou ensaios imunocromatográficos. A especificidade destes também é alta (98 – 100%), porém a sensibilidade para detecção de coproantígenos pode ser mais baixa do que a maioria dos exames microscópicos. As vantagens que

a pesquisa de coproantígenos têm sobre microscopia é que eles podem detectar infecções pré-patentes em animais que não estejam excretando oocistos nas fezes e podem ser empregados para triagem rápida e são eficazes para trabalhar com grande quantidade de amostras fecais (JEX *et al.*, 2008b).

Já os testes imunológicos para detecção de anticorpos contra *Cryptosporidium* sp. como IFI são simples, rápidos e específicos, porém geralmente apresentam baixa sensibilidade e problemas como dificuldade em diferenciar entre uma infecção ativa ou prévia (O'DONOGHUE, 1995; ALMEIDA, 2004; HUBER, 2007). Títulos de anticorpos significativos foram mostrados persistirem em muitos indivíduos por 12 meses após a infecção. Os testes imunossorológicos parecem ser inadequados para uso em diagnóstico de rotina, mas eles fornecem ferramentas valiosas para estudos imunológicos e soropidemiológicos (O'DONOGHUE, 1995). No entanto, os métodos imunológicos não permitem que espécies ou genótipos de *Cryptosporidium* sp. envolvidos na infecção sejam determinados (JEX *et al.*, 2008b).

3.8.3 Métodos moleculares

Os métodos moleculares foram desenvolvidos para detecção dos parasitas, visando superar as dificuldades encontradas nos métodos parasitológicos e imunológicos.

Estas técnicas são aplicadas no estudo da sistemática, em particular na resolução do problema taxonômico, em ecologia dos parasitos, evolução biológica, genética de população, estrutura de comunidades, epidemiologia e interação com seus hospedeiros, melhorando o entendimento da relação parasito hospedeiro. Outras aplicações destes métodos são a identificação de espécies, presentes em amostras ambientais (água e lodo) (ALMEIDA, 2004; THOMAZ, 2006; JEX *et al.*, 2008b). Graças a elas pode-se traçar estratégias para prevenção, levantamento e controle de criptosporidiose em humanos e outros animais (JEX *et al.*, 2008b). Dentre os métodos moleculares estão as técnicas de reação em cadeia pela polimerase (PCR), nested-PCR (NPCR), polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP), sequenciamento, entre outras (ALMEIDA, 2004).

3.8.3.1 Técnicas de PCR e Nested-PCR

A PCR é aplicável quando há baixa quantidade de oocistos, como: amostras de fezes, tecidos e outros tipos de materiais (por exemplo, bile) colhidos durante endoscopia. A PCR melhora a sensibilidade de detecção, e permite diferenciar espécies e genótipos de *Cryptosporidium* sp. (CHALMERS; DAVIES, 2010). A técnica permite amplificar milhares de vezes uma única molécula de DNA alvo. Devido à grande sensibilidade e especificidade da PCR, ela tem sido usada em amostras clínicas e ambientais (ALMEIDA, 2004).

Alguns marcadores (loci) usados incluem: genes e espaçadores RNA ribossômico, proteína de parede do oocisto de *Cryptosporidium* sp. (COWP), proteína resistente ao calor de 70 kDa (hsp 70), gene de glicoproteína de 60 kDa (GP60) entre outros. O gene RNA ribossômico da subunidade menor (18SSU rRNA) é um marcador genético útil para identificação específica de *Cryptosporidium* sp., tendo uma variação de sequência relativamente baixa intraespecífica e alta interespecífica. O gene actina e hsp 70 permitem a identificação em nível de espécie. Ambos marcadores têm sido utilizados juntos com o 18SSU rRNA nas investigações sistemáticas (filogenéticas) de *Cryptosporidium* sp., fornecendo a base para a classificação atual dos membros dentro do gênero (JEX *et al.*, 2008b).

Embora a PCR seja rápida, altamente sensível, e acurada, tem muitas limitações. Falso-positivos podem resultar de detecção de ácidos nucleicos livres de microrganismos não viáveis ou de contaminação laboratorial. Alguns contaminantes ambientais interferem com os ensaios qualitativos e/ou quantitativos (FAYER *et al.*, 2000).

Já a Nested-PCR é um método sensível no qual o produto amplificado (amplicon) na primeira PCR, é submetido a um segundo processo de amplificação utilizando um conjunto de iniciadores homólogos a sequências internas do segmento já amplificado. O segundo par de iniciadores usados sempre amplifica uma sequência menor que o primeiro par. Este procedimento torna a reação da PCR mais específica e sensível (ALMEIDA, 2004; HUBER, 2007; OSAKI, 2009).

O uso desta técnica torna-se especialmente importante quando é necessário detectar poucos organismos contidos numa microflora diversa, como ocorre na extração de DNA a partir de material fecal (HUBER, 2007).

3.8.3.2 Técnica de Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP)

A técnica de RFLP é atualmente um dos métodos mais empregados para a determinação de espécies e genótipos de *Cryptosporidium* sp. (HUBER, 2000; JEX *et al.*, 2008b). Seu princípio é a digestão dos produtos da PCR ou da Nested-PCR por enzimas específicas. Estas enzimas clivam o DNA em fragmentos de determinados tamanhos, cuja análise no gel de agarose ou poliacrilamida, resulta em diferentes padrões de tamanhos de fragmentos, de acordo com a espécie de *Cryptosporidium* sp. examinada, possibilitando a identificação. Este método detecta variações mínimas num gene onde uma única substituição de base pode criar um sítio capaz de ser digerido pelas endonucleases, ou abolir o sítio de restrição (ALMEIDA, 2000; HUBER, 2007).

Embora útil, o método de RFLP não detecta todas as variações de comprimento e sequência dentro ou entre amplicons durante as análises, porque as endonucleases usadas somente reconhecem uma pequena quantidade de locais variáveis potencialmente (JEX *et al.*, 2008b).

3.8.3.3 Sequenciamento

A maioria das técnicas de biologia molecular aplicada ao diagnóstico para *Cryptosporidium* sp. inclui uma etapa final de sequenciamento, para a identificação da espécie estudada (HUBER, 2007). O sequenciamento direto do DNA continua sendo o padrão-ouro para detectar variação genética ou polimorfismo e pode ser aplicado para genes de única cópia ou múltiplas cópias (JEX *et al.*, 2008b). O sequenciamento também é de fundamental importância, quando as demais técnicas deixarem dúvidas quanto à identificação correta da espécie envolvida. Outra importância do sequenciamento é analisar genes indefinidos para verificar diferenças genéticas entre as espécies (XIAO *et al.*, 2000). Vários autores realizaram o sequenciamento de *Cryptosporidium* sp. em amostras fecais de cão e gato, sendo identificados *C. canis*, *C. felis*, *C. parvum* e *C. muris* (SARGENT *et al.*, 1998; MORGAN *et al.*, 2000; ABE *et al.*, 2002; FAYER *et al.*, 2006; GIANGASPERO *et al.*, 2006; SANTÍN *et al.*, 2006; PALMER *et al.*, 2008). Geralmente o

sequenciamento é realizado a partir dos produtos amplificados da PCR ou Nested-PCR.

3.9 TRATAMENTO

Mais de 200 substâncias terapêuticas têm sido testadas contra *Cryptosporidium* sp. (SCHNYDER *et al.*, 2009), incluindo antibióticos, antimaláricos, antiparasitários, antifúngicos e antivirais, sendo que algumas não têm tido sucesso na terapia (AMARANTE, 1992; O'DONOGHUE, 1995). Porém, algumas drogas como halofuginona e decoquinato apresentaram efeitos promissores. Em alguns estudos, bezerros mostraram significativa redução na excreção de oocisto e diminuição na diarreia, prevenindo a mortalidade. Tratamentos com halofuginona ou decoquinato não apresentaram efeitos nos níveis de diarreia ou desidratação, mas a halofuginona reduziu significativamente a excreção de oocistos e o decoquinato aumentou a média de ganho de peso diário de bezerros. (SCHNYDER *et al.*, 2009).

A paromomicina e depois nitazoxanida emergiram como candidatas promissoras para o tratamento de criptosporidiose. A paromomicina foi a primeira droga testada em humanos para tratar diarreia por *Cryptosporidium* sp., mas ainda não foi eficaz e não foi aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA). Embora paramomicina tenha bom desempenho contra *Cryptosporidium* sp. em modelos animais e de cultura de células, os resultados de ensaios clínicos em humanos desta droga têm sido confusos. Alguns estudos em pacientes com AIDS com criptosporidiose mostraram que a paromomicina melhorou tanto os parâmetros clínicos quanto parasitológicos (DOWNEY *et al.*, 2008; ROSSIGNOL, 2010).

A nitazoxanida foi desenvolvida para tratar criptosporidiose em crianças e adultos imunocompetentes, por ter demonstrado atividade em reduzir a duração da diarreia e eliminação de oocistos em vários estudos (ROSSIGNOL, 2010). No entanto, a eficácia de nitaxozanida para tratamento de infecção por *Cryptosporidium* sp. em pacientes imunocomprometidos não foi demonstrada (DOWNEY *et al.*, 2008). Boehmer *et al.* (2009) utilizaram a nitazoxanida como agente terapêutico em pessoas com criptosporidiose e evidenciaram uma resposta clínica em 67% dos pacientes.

Outra droga estudada, atualmente, é o pamoato de pirvinium que inibiu crescimento de *C. parvum* tanto em sistema de cultura de células *in vitro* quanto em

ratos recém-nascidos. Os autores acreditam que o pamoato de pirvinium é uma droga candidata para o tratamento de criptosporidiose em pacientes imunocompetentes e também indivíduos imunocomprometidos, para quem nenhuma terapia eficaz é atualmente aprovada (DOWNEY *et al.*, 2008).

Shahiduzzaman *et al.* (2009), avaliaram a eficácia de monensina, halofuginona e miltefosina no crescimento de *C. parvum*, utilizando a combinação *in vitro* de cultura e PCR quantitativo. Os autores relatam que a monensina e a halofuginona mostraram-se eficazes contra *C. parvum*, já a miltefosina mostrou atividade inibitória sob condições *in vitro*, embora com menor eficácia que as demais.

A terapia com antiretroviral provou ser mais eficaz na terapia por reduzir a frequência e severidade desta doença em pacientes com HIV. Estes efeitos foram atribuídos a recuperação da imunidade do hospedeiro como demonstrado em outros casos de criptosporidiose associado com outras causas de imunodeficiência tais como imunodeficiência primária, transplante de órgãos, câncer, diabetes e má-nutrição para os quais a terapia antiretroviral não é indicada (ROSSIGNOL, 2010).

Em animais já foram usadas diversas drogas terapêuticas, como: cloranfenicol, lincomicina, neomicina, nistatina, gentamicina, sulfametoxazol-trimetoprim, estreptomicina, metronidazol, ivermectin, entre outras, porém sem sucesso (AMARANTE, 1992).

3.10 PROFILAXIA

Na literatura pesquisada as medidas preventivas são dirigidas ao ser humano preocupando-se principalmente com pessoas aidéticas e com outras imunodeficiências. Não há medidas preventivas relacionadas aos animais. Como as modalidades de tratamento para *Cryptosporidium* sp. são limitadas, prevenção e redução de risco são as intervenções mais importantes, como: lavagem das mãos antes de comer ou preparar alimentos, após usar ou limpar o banheiro, trocar fraldas, cuidar de uma pessoa com diarreia, após contato com animais, e lavagem de materiais sujos (roupas ou roupas de cama). Deve-se também realizar adequado tratamento de água não potável, e lavagem completa de frutas e vegetais antes do consumo. As pessoas com criptosporidiose deveriam ser afastadas do local de trabalho, escola ou outros locais institucionais, por 48 horas após o último episódio

de diarreia, particularmente manipuladores de alimentos e pessoal de serviço de saúde. O tratamento de piscina geralmente não elimina adequadamente oocistos, assim recomenda-se que indivíduos parasitados não frequentem as mesmas por duas semanas, todavia, tal conduta é difícil de conseguir (CHALMERS; DAVIES, 2010).

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE FEZES DE CÃES E DE GATOS

Foram colhidas e analisadas 91 amostras de fezes de cães e 25 de gatos provenientes de abrigos e clínicas veterinárias de Curitiba e região metropolitana. Das 91 amostras fecais de cães, 62 eram provenientes de Curitiba, 10 do município de São José dos Pinhais e 19 de Araucária. Todas as amostras fecais de gatos eram procedentes de Curitiba. Todos os animais apresentavam-se assintomáticos no momento da colheita das amostras.

O fluxograma (FIGURA 1) abaixo mostra a sequência do material e métodos, que inclui a quantidade de amostra colhida e os métodos empregados para a realização do presente trabalho.

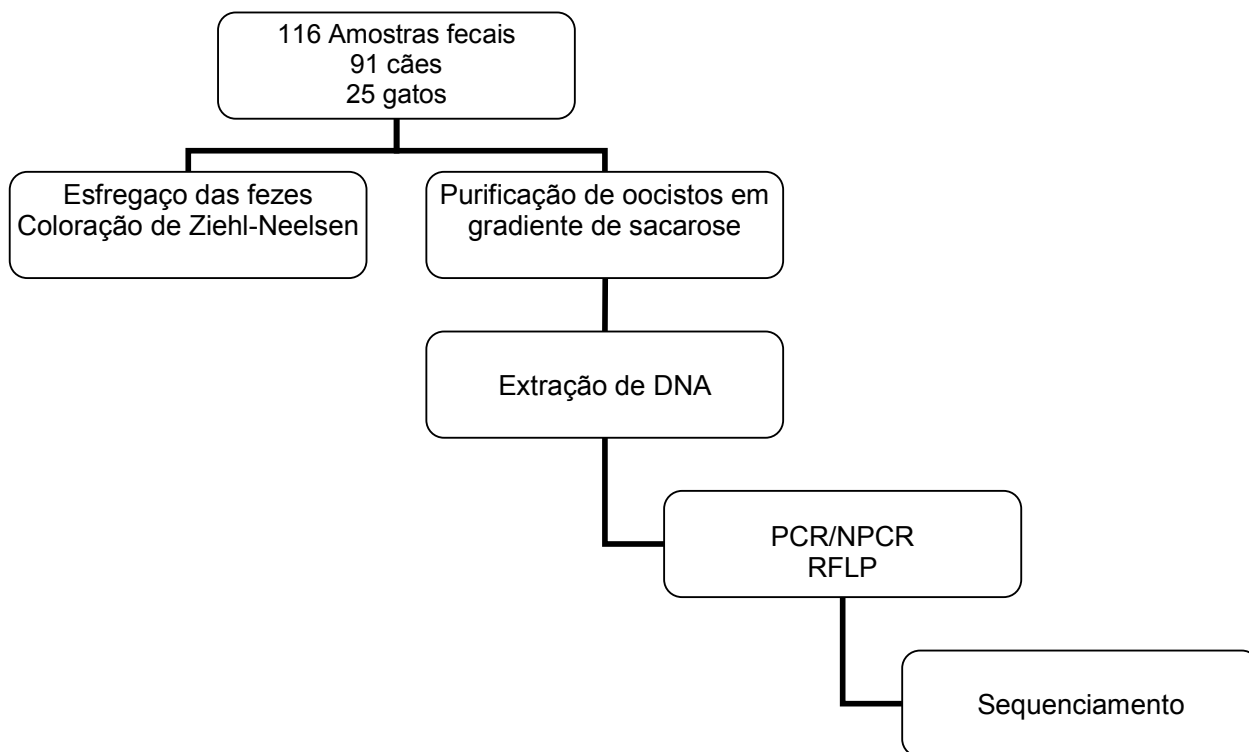


FIGURA 1 - FLUXOGRAMA DA QUANTIDADE DE AMOSTRA COLHIDA E OS MÉTODOS EMPREGADOS PARA A REALIZAÇÃO DO PRESENTE TRABALHO

4.2 DETECÇÃO DOS OOCISTOS PELO MÉTODO DE COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN MODIFICADO

Para a detecção dos oocistos foi utilizada a técnica de coloração ácido-resistente (Método de Ziehl-Neelsen modificado), que é o método mais recomendado para a demonstração dos oocistos de *Cryptosporidium* sp. em fezes (RIGO; FRANCO, 2002). Para realizar este método foram confeccionados esfregaços finos das fezes e posteriormente corados. As lâminas feitas foram observadas em microscópio óptico (Olympus BX41) em aumento de 400 vezes. Ao observar alguma estrutura similar ao oocisto de *Cryptosporidium* sp. passava-se para o aumento de 1000 vezes para confirmação ou não.

A seguir é descrito o procedimento de coloração:

- a) fazer um esfregaço fino do material;
- b) fixar o esfregaço ao ar seco ou em metanol concentrado por minutos;
- c) imergir a lâmina em carbol-fucsina e corar por 15 minutos;
- d) enxaguar bem a lâmina em água de torneira;
- e) descorar em metanol ácido 1% por 10 a 15 segundos (evitar descorar em excesso);
- f) enxaguar a lâmina em água de torneira;
- g) contracorar com verde malaquita 0,4 % por 30 segundos;
- h) enxaguar a lâmina em água de torneira;
- i) secar a lâmina ao ar seco;
- j) examinar a presença de oocistos pela observação da lâmina (com ou sem lamínula) em objetiva de 40X. Confirmar em objetiva de 100X;
- k) medir o tamanho e comparar os oocistos.

Como os oocistos são parecidos, morfometricamente não é possível identificar espécie e genótipo assim foram escolhidas como ferramentas a reação em cadeia da polimerase (PCR), Nested-PCR, polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) e sequenciamento.

4.3 PURIFICAÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* sp. EM GRADIENTE DE SACAROSE (PAULINO, 2005 - modificado)

Todas as fezes colhidas, positivas ou não para oocistos de *Cryptosporidium* sp. pelo método de coloração específica, foram submetidas à técnica de HOFFMAN, PONS e JANER e em seguida à técnica de gradiente de sacarose para a purificação e o isolamento dos oocistos de *Cryptosporidium* sp.

O protocolo teve as seguintes etapas:

- a) preparar uma suspensão de fezes em água destilada na proporção de 1:5;
- b) filtrar em gaze dobrada em quatro para o cálice de sedimentação e transferir o filtrado para tubos de 15 mL;
- c) centrifugar a 453,91 x g por cinco minutos;
- d) desprezar o sobrenadante e lavar o sedimento quatro vezes centrifugando a 453,91 x g por cinco minutos;
- e) ressuspender o sedimento em 3 mL de água ultrapura;
- f) fazer o fracionamento colocando em tubos cônicos de 15 mL: 5 mL de solução de sacarose 1 M (densidade específica 1,11) e sobre esta depositar lentamente, com uma pipeta os 3 mL de suspensão de fezes (deslizar pela parede do tubo);
- g) centrifugar a 163,40 x g por 20 minutos;
- h) remover os oocistos da interface transferindo para tubos de 15 mL;
- i) ressuspender os oocistos em água ultrapura (12 mL) e centrifugar a 453,91 x g por 10 minutos;
- j) desprezar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em água ultrapura, transferindo para tubos tipo eppendorf;
- k) centrifugar a 12.000 g por cinco minutos;
- l) desprezar o sobrenadante e lavar três vezes em água ultrapura centrifugando a 12.000 g por cinco minutos;
- m) ao sedimento final acrescentar tampão de lise e congelar a -20°C para posterior extração de DNA.

4.4 DETECÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium* sp.

Foi realizado a reação em cadeia da polimerase (PCR) e Nested-PCR (NPCR) do gene 18SSU rDNA, para determinar a presença de ácido desoxirribonucléico (DNA) do parasito nas amostras fecais após purificação dos oocistos em gradiente de sacarose. Estes métodos moleculares são rápidos, sensíveis e específicos, permitindo ampliar e identificar seletivamente sequências de DNA do parasito (LIMA; STAMFORD, 2003; GARCIA; MARCONDES, 2007).

4.4.1 Extração de DNA

Três métodos de extração de DNA de oocistos já foram estudados no Laboratório de Parasitologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (UFPR), departamento de Patologia Básica. Os métodos avaliados foram o do fenol-clorofórmio (SAMBROOK *et al.*, 1989); salting-out (MILLER *et al.*, 1988) e com o uso de Kit de extração de DNA ChargeSwitch® gDNA Mini Tissue Kit (Invitrogen™). Como a extração pelo Kit teve um melhor desempenho, optou-se em extrair o DNA das amostras por esta técnica.

4.4.1.1 Extração de DNA com ChargeSwitch® gDNA Mini Tissue Kit (Invitrogen™)

O material purificado das fezes contendo tampão de lise (500µL) foi submetido a 15 ciclos de congelamento e descongelamento (-70°C e 56°C). Em seguida, o DNA foi extraído com ChargeSwitch® gDNA Mini Tissue Kit (Invitrogen™) conforme os procedimentos recomendados pelo fabricante do produto.

4.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR foi realizada utilizando-se um par de iniciadores genérico para *Cryptosporidium* sp. (XIAO *et al.*, 1999b) da região hiper-variada do gene 18SSU rDNA. Este conjunto de iniciadores amplifica uma região de 1325 pares de base (TABELA 2).

Os componentes utilizados na técnica de PCR e as condições de amplificação são mostrados nas tabelas 3 e 4.

TABELA 2 - INICIADORES USADOS NA TÉCNICA DE PCR E DE NPCR PARA IDENTIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE DNA DE *Cryptosporidium* sp. NAS AMOSTRAS DE FEZES DE CÃO E DE GATO

INICIADORES	REGIÃO GÊNICA	SEQUENCIA 5'-3'	FRAGMENTO AMPLIFICADO
Xiao F PCR	18SSU rDNA	5' TTCTAGAGCTAA TACATCCG 3'	1325 bp
Xiao R PCR		5' CCCATTTCTTCGAAACAGGA 3'	
Xiao 1 (R) NPCR	18SSU rDNA	5'AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA 3'	826 a 864 bp
Xiao 2 (F) NPCR		5'GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG 3'	

TABELA 3 - COMPONENTES DA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA DE *Cryptosporidium* sp. EM FEZES DE CÃES E DE GATOS E RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS EM UMA TÉCNICA DE PCR

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO ESTOQUE	CONCENTRAÇÃO DE USO	VOLUME POR REAÇÃO (µL)
Tampão	10X	1X	2,5
MgCl ₂	50 mM	3 mM	1,5
dNTP	10 mM	0,2 mM	0,5
Primer F	10 pmol/µL	20 pmol	2,0
Primer R	10 pmol/µL	20 pmol	2,0
Taq Platinum Polimerase	5 U/µL	1,25 U	0,25
Triton	100%	0,1%	0,25
DNA	----	----	5,0
Água ultrapura	qsp*	qsp*	11,0
Volume total	----	----	25

* quantidade suficiente para

TABELA 4 - CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DOS INICIADORES DE XIAO F/ XIAO R USADOS NA TÉCNICA DE PCR PARA PESQUISA DE *Cryptosporidium* sp. EM FEZES DE CÃES E DE GATOS

NÚMERO DE CICLOS	TEMPERATURA/TEMPO
1 ciclo	94°C / 3 min.
35 ciclos	94°C / 45 seg.
	55°C / 45 seg.
	72°C / 1 min.
1 ciclo	72°C / 7 min.

A amplificação foi realizada no termociclador (Bio-Rad®) e os produtos da amplificação foram armazenados a 4°C até a realização da eletroforese em gel de agarose a 1,6%.

4.4.2.1 Controles positivo e negativo

Para avaliar os riscos de falso-positivos, falso-negativos ou contaminações foram usados controles. Para controle positivo utilizou-se amostra que continha DNA de 10^4 oocistos de *Cryptosporidium parvum* (cepa referência) e controle negativo em que foram usadas as mesmas condições, porém sem DNA.

4.4.2.2 Sensibilidade das técnica de PCR

A sensibilidade da técnica de PCR foi padronizada previamente no laboratório e para determinar a sensibilidade utilizou-se contaminações experimentais de água com oocistos de *Cryptosporidium* sp. nas concentrações de 10^4 , 10^3 , 500, 100, 50, 10, 5.

4.4.3 Nested-PCR (NPCR)

Para melhorar a sensibilidade da PCR, foi realizado Nested-PCR. Esta técnica amplifica um fragmento interno ao que foi amplificado na primeira PCR, usando par de iniciadores diferente do primeiro. O segundo par de iniciadores amplifica uma sequência menor que o primeiro par.

A Nested-PCR foi feita utilizando-se um segundo par de iniciadores (XIAO *et al.*, 1999b) da região hiper-variada do gene 18SSU rRNA. Este conjunto de iniciadores amplifica uma região de 826 a 864 pares de base (TABELA 2).

Os componentes utilizados na técnica de NPCR e as condições de amplificação são mostrados nas tabelas 5 e 6.

TABELA 5 - COMPONENTES DA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA DE *Cryptosporidium* sp. EM FEZES DE CÃES E DE GATOS E RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS EM UMA TÉCNICA DE NESTED-PCR

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO ESTOQUE	CONCENTRAÇÃO DE USO	VOLUME POR REAÇÃO (µL)
Tampão	10X	1X	2,5
MgCl ₂	50 mM	3 mM	1,5
dNTP	10 mM	0,2 mM	0,5
Primer F	10 pmol/µL	20 pmol	2,0
Primer R	10 pmol/µL	20 pmol	2,0
Taq Platinum Polimerase	5 U/µL	1,25 U	0,25
Triton	100%	0,1%	0,25
DNA	----	----	3,0
Água ultrapura	qsp*	qsp*	13,0
Volume total	----	----	25

* quantidade suficiente para

TABELA 6 - CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DOS INICIADORES DE XIAO 1/ XIAO 2 USADOS NA TÉCNICA DE NESTED-PCR PARA PESQUISA DE *Cryptosporidium* sp. EM FEZES DE CÃES E DE GATOS

NÚMERO DE CICLOS	TEMPERATURA/TEMPO
1 ciclo	94°C / 3 min.
35 ciclos	94°C / 45 seg.
	55°C / 45 seg.
	72°C / 1 min.
1 ciclo	72°C / 7 min.

4.4.4 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados de PCR e NPCR foram detectados por meio de eletroforese em gel de agarose preparado a 1,6% em tampão TBE 1X (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM). 5 µL dos produtos de amplificação foram aplicados no gel, acrescido de 2 µL de bromofenol, e submetidos a corrente elétrica de 60V (fonte de eletroforese VWR 105) numa cuba de eletroforese, onde realizava-se a corrida eletroforética para a separação das bandas. Após a separação dos produtos de PCR e NPCR por eletroforese, o DNA foi corado com brometo de etídio e visualizado em fonte ultravioleta (Life Technologies™), em seguida o gel foi fotodocumentado. Para avaliar os tamanhos dos fragmentos foi usado marcador de massa molecular de DNA de 1 kb (Invitrogen™).

4.4.5 Técnica de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP)

Para a identificação a nível específico ou de genótipos foi realizada a técnica de RFLP. Os produtos da nested-PCR foram digeridos com as enzimas de restrição *Sspl* (Invitrogen™) e *AseI* (BioLabs®). As sequencias reconhecidas de cada enzima são: 5'-AAT↓ATT-3' e 3'-TTA↓TAA-5' para a enzima *Sspl*; 5'-AT↓TAAT-3' e 3'TAAT↓TA-5' para a enzima *AseI*. Usou-se 10U/μL de cada enzima e incubou-se a 37°C por duas horas, em volume final de 25 μL. Após a realização da digestão foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1,6% e fotodocumentado o gel. O marcador de peso molecular utilizado foi de 100 pb (Invitrogen™). Na tabela 7 segue os componentes utilizados na reação de RFLP.

TABELA 7 - COMPONENTES USADOS NA REAÇÃO DE RFLP PARA UM VOLUME FINAL DE 25 μL

COMPONENTES	QUANTIDADE POR REAÇÃO (μL)
Amplicon do NPCR	10
Tampão 10X	2,5
Enzimas (10U/μL) <i>Sspl</i> ou <i>AseI</i>	1
Água ultrapura (qsp*)	11,5

* quantidade suficiente para

4.4.6 Sequenciamento

As amostras de *C. parvum* e *Cryptosporidium* sp. encontrados em cães e em gatos foram submetidas à amplificação por PCR seguida de Nested-PCR e ao sequenciamento utilizando o Dyanamic ET para MegaBACE (GE Healthcare Life Sciences do Brasil). Para a reação de sequenciamento utilizou-se 4 μL do produto de NPCR [25 ng/μL], 2 μL de dyanamic et, 2 μL do primer [10pmol/ μL] e 2 μL de água ultrapura. Foram utilizados 25 ciclos de 95°C por 20 segundos; 55°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Em seguida foi realizada a precipitação e purificação segundo Costa-Ribeiro (2006).

4.4.7 Análise de dados

4.4.7.1 Análise dos dados de RFLP e construção do dendrograma

Para tabulação de dados de RFLP e construção do dendrograma para análise da relação fenética dos isolados optou-se pela leitura automatizada do padrão de bandas dos géis usando o software Gel-Pro Analyzer (Media Cybernetics). Foram consideradas apenas bandas que apresentavam repetibilidade. Um cálculo de distância genética foi realizada com o software NTSYSpc (v.2.10), utilizando o Método de grupo de par não ponderado com média aritmética (UPGMA) e a Ferramenta para análise genética de populações (TFPGA) (v. 1,3) (MILLER, 1997). O mesmo cálculo foi confirmado no PAUP * B4 (v.10) (SWOFFORD, 2002) sob os mesmos critérios. A distância entre as amostras foi avaliada através do coeficiente de Jaccard.

4.4.7.2 Análise do sequenciamento

Quanto à análise do sequenciamento, quatorze sequências consensos de 630bp do gene 18SSU rDNA foram geradas a partir do programa EMBOSS GUI (<http://bips.u-strasbg.fr/EMBOSS>) e submetidas ao programa *Blast* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para confirmação dos resultados.

As sequências foram manualmente alinhadas no programa CLUSTAL W (THOMPSON *et al.*, 1994) e analisadas no programa MEGA “Molecular Evolutionary Genetics” versão 4.1 (TAMURA *et al.*, 2007) para a construção da árvore filogenética.

4.4.7.3 Análise estatística

Foi realizado o teste do qui-quadrado em tabela 3 x 2 considerando a proporção de casos positivos vs negativos em 3 populações diferentes (São José dos Pinhais, Curitiba e Araucária), os valores de $p=0,7$ foram considerados significativos. O tamanho amostral foi de 91 dados.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 PESQUISA DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* sp. EM AMOSTRAS DE FEZES DE CÃO E DE GATO PELO MÉTODO DE COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN MODIFICADO

Para as 91 amostras fecais de cão, foram realizados esfregaços em lâmina e coloração para 48 amostras. Destas 29 eram de animais procedentes de dois municípios da região metropolitana de Curitiba (TABELAS 8 e 9). Das 25 amostras fecais coletadas de gatos foram feitos esfregaços em lâmina e coloração em duas amostras.

A avaliação em microscopia óptica, nos aumentos de 400 e 1000 X, para as 48 amostras foi negativa, ou seja, nenhum oocisto foi detectado apesar da insistente pesquisa.

TABELA 8 - RESULTADO DA PESQUISA DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* sp. EM AMOSTRAS DE FEZES DE CÃO DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA, PELO MÉTODO DE COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN MODIFICADO

REGIÕES AVALIADAS	QUANTIDADE DE AMOSTRAS COLHIDAS	QUANTIDADE DE LÂMINAS CONFECCIONADAS	RESULTADO	%
Curitiba	62	19	0	0
São José dos Pinhais	10	10	0	0
Araucária	19	19	0	0
Total	91	48	0	0

TABELA 9 - RESULTADO DA PESQUISA DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* sp. EM AMOSTRAS DE FEZES DE GATO DE CURITIBA PELO MÉTODO DE COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN MODIFICADO

REGIÃO AVALIADA	QUANTIDADE DE AMOSTRAS COLHIDAS	QUANTIDADE DE LÂMINAS CONFECCIONADAS	RESULTADO	%
Curitiba	25	2	0	0
Total	25	2	0	0

5.2 DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE DAS TÉCNICAS DE PCR e DE NESTED-PCR

As técnicas de PCR e de NESTED-PCR para detecção de *Cryptosporidium* sp. foram previamente padronizadas no Laboratório de Parasitologia Molecular da Universidade Federal do Paraná – UFPR (OSAKI, 2009). Porém, as mesmas foram

padronizadas para pesquisa de DNA do protozoário em amostras ambientais (água e lodo de água).

Assim, para a realização da pesquisa de DNA de *Cryptosporidium* sp. em amostras fecais foi necessário confirmar a sensibilidade da técnica. Manteve-se o processo de extração do DNA de oocistos pelo Kit ChargeSwitch® gDNA Mini Tissue Kit (Invitrogen™).

A avaliação da sensibilidade das técnicas mostrou que as mesmas mantinham bom desempenho para amostras fecais com sensibilidade para detectar DNA de dois e de cinco oocistos (FIGURA 2).

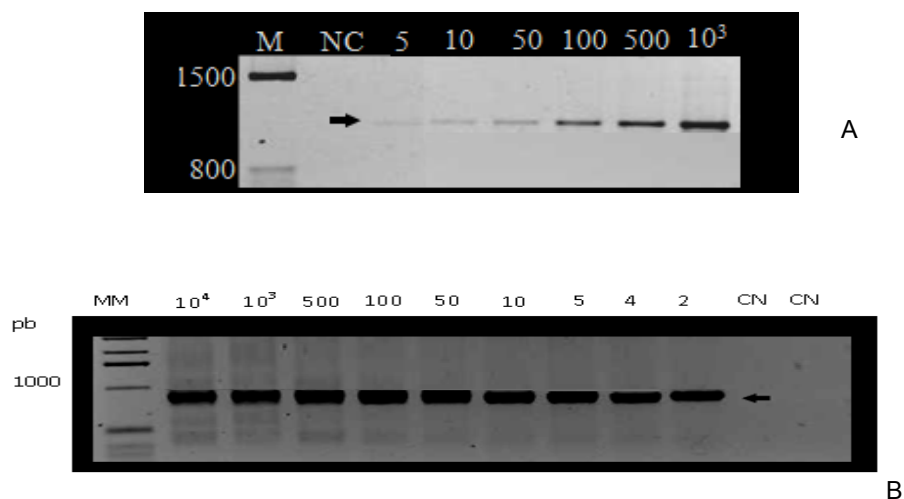


FIGURA 2 - DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE DAS TÉCNICAS DE PCR E NESTED-PCR PARA O GENE 18SSU rDNA COM OS INICIADORES XIAO F/XIAO R (A) E XIAO 1/XIAO 2 (B) RESPECTIVAMENTE. PARA AVALIAR A SENSIBILIDADE DAS TÉCNICAS FOI USADO DNA DE *C. parvum* (CEPA REFERÊNCIA) EXTRAÍDO COM O KIT CHARGESWITCH®. A SETA INDICA A POSIÇÃO DOS FRAGMENTOS ESPERADOS NA AMPLIFICAÇÃO. LINHA 1 - M: MARCADOR DE MASSA MOLECULAR PADRÃO (1KB). FIGURAS A E B: DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE OOCISTOS: LINHAS 3 A 8 (A): 5, 10, 50, 100, 500, 10³. LINHAS 2 A 10 (B): 10⁴, 10³, 500, 100, 50, 5, 4, 2; CN: CONTROLE NEGATIVO (SEM DNA)

5.3 PCR E NESTED-PCR DAS AMOSTRAS FECAIS DE CÃO E DE GATO ANALISADAS

A técnica de PCR permitiu a amplificação do fragmento esperado (1325 pares de base) de DNA de *Cryptosporidium* sp. para três amostras fecais (3,3%) das 91 amostras analisadas de cães (TABELA 10). Das 25 amostras fecais de gato analisadas foi detectado DNA em uma amostra (4%).

Ao realizar a Nested-PCR pós PCR, observou-se taxa de positividade de 13,2% nas 91 amostras fecais de cão e de 4% nas 25 amostras fecais de gato (TABELA 11). Esta técnica amplificou o fragmento esperado (826 a 864 pares de base) de DNA de *Cryptosporidium* sp.

A taxa de positividade das amostras fecais de cão, por região, variou de 11,3% a 20% dependendo da região em análise (TABELA 12). O resultado da análise estatística indicou que não há diferenças entre as percentagens de 11,3; 20 e 15,8% respectivamente nos três municípios analisados.

As técnicas moleculares mostraram ser mais sensíveis do que a coloração pelo método de Ziehl-Neelsen modificado. Das 48 amostras fecais de cães negativas em lâmina, três (6,2%) foram positivas pela técnica de PCR e nove (18,7%) pelo método de NPCR.

TABELA 10 - RESULTADO DA PESQUISA DE DNA DE *Cryptosporidium* sp. DAS AMOSTRAS DE FEZES DE CÃO E DE GATO PELA TÉCNICA DE PCR

ESPÉCIE ANIMAL	QUANTIDADE DE AMOSTRAS COLHIDAS E ANALISADAS	RESULTADO POSITIVO	%
Cão	91	3	3,3
Gato	25	1	4
Total	116	4	3,4

TABELA 11 - RESULTADO DA PESQUISA DE DNA DE *Cryptosporidium* sp. DAS AMOSTRAS DE FEZES DE CÃO E DE GATO PELA TÉCNICA DE NESTED-PCR

ESPÉCIE ANIMAL	QUANTIDADE DE AMOSTRAS COLHIDAS E ANALISADAS	RESULTADO POSITIVO	%
Cão	91	12	13,2
Gato	25	1	4
Total	116	13	11,2

TABELA 12 - RESULTADO DA PESQUISA DE DNA DE *Cryptosporidium* sp. DE AMOSTRAS DE FEZES DE CÃO PELA TÉCNICA DE NESTED-PCR – ANÁLISE DA TAXA DE PREVALÊNCIA POR REGIÃO

REGIÕES AVALIADAS	QUANTIDADE DE AMOSTRAS COLHIDAS E ANALISADAS	RESULTADO POSITIVO	%
Curitiba	62	7	11,3a
São José dos Pinhais	10	2	20,0a
Araucária	19	3	15,8a
Total	91	12	13,2

Foi realizado teste de qui-quadrado com valores de $p=0,7$ considerados significativos

* letras iguais não diferem estatisticamente

As figuras 3 e 4 mostram as bandas obtidas para PCR e Nested-PCR com pares de iniciadores XiaoF/XiaoR e Xiao1/Xiao2 respectivamente de amostras fecais de cão e de gato.

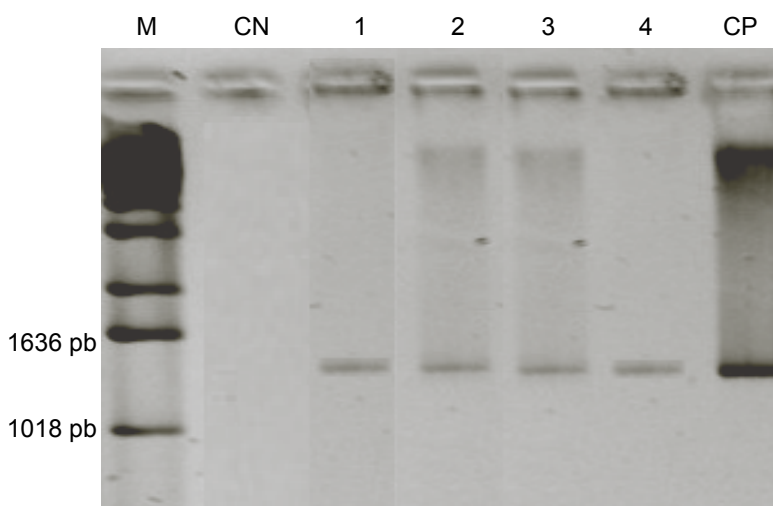


FIGURA 3 - PRODUTOS AMPLIFICADOS POR PCR COM OS INICIADORES XIAO F/XIAO R CONTENDO 1325 PARES DE BASE DE *Cryptosporidium* sp. DE AMOSTRAS FECAIS DE CÃO E DE GATO. M - MARCADOR DE MASSA MOLECULAR PADRÃO (1KB); CN: CONTROLE NEGATIVO, 1 A 3 AMOSTRAS DE *Cryptosporidium* sp. EM CÃES; 4 - AMOSTRA DE *Cryptosporidium* sp. EM GATO; CP: CONTROLE POSITIVO (CEPA REFERÊNCIA DE *C. parvum*)

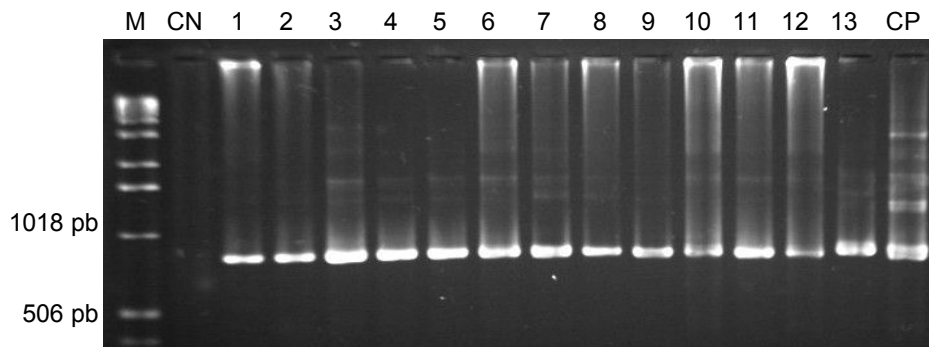


FIGURA 4 - PRODUTOS AMPLIFICADOS POR NESTED-PCR COM OS INICIADORES XIAO 1/XIAO 2 CONTENDO 826 A 864 PARES DE BASE DE *Cryptosporidium* sp. DE AMOSTRAS FECAIS DE CÃO E DE GATO. M: MARCADOR DE MASSA MOLECULAR PADRÃO (1KB); CN: CONTROLE NEGATIVO; 1 A 12 AMOSTRAS DE *Cryptosporidium* sp. EM CÃES; 13 - AMOSTRA DE *Cryptosporidium* sp. EM GATO; CP: CONTROLE POSITIVO (CEPA REFERÊNCIA DE *C. parvum*)

5.4 TÉCNICA DE POLIMORFISMO DE COMPRIMENTO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO (RFLP)

Os resultados da digestão dos produtos de Nested-PCR com as enzimas *Sspl* e *Asel* são mostrados nas Figuras 5 e 6 respectivamente. A digestão dos fragmentos obtidos na Nested-PCR com a enzima de restrição *Sspl* mostrou diferenças no padrão de corte. Em amostras de *Cryptosporidium* sp. de cão verificou-se que há quatro padrões de bandas. As amostras do parasito obtidas de gato apresentaram dois fragmentos e o controle positivo (*C. parvum*) seis fragmentos (FIGURA 5).

Ao cortar os amplicons com a enzima de restrição *Asel*, verificou-se que o padrão de restrição foi igual para todas as amostras de *Cryptosporidium* sp. de cães. Para amostra do parasito obtida de gato e o controle positivo (*Cryptosporidium parvum*) o padrão de restrição foi diferente (FIGURA 6).

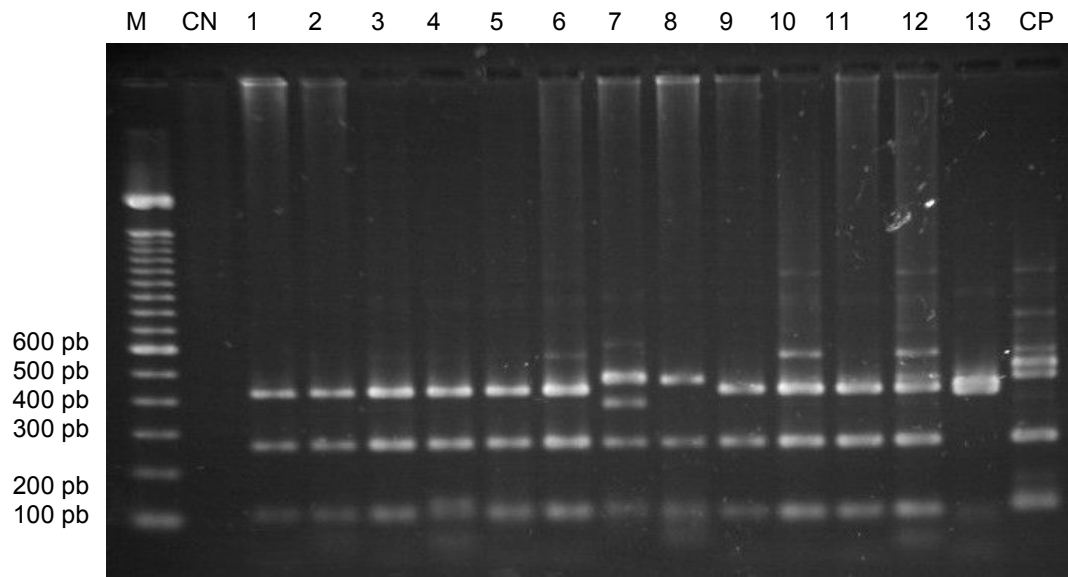


FIGURA 5 - DIFERENCIAÇÃO DE *Cryptosporidium* sp. DE CÃES E DE GATOS PELA TÉCNICA DE RFLP DO FRAGMENTO GÊNICO 18SSU rDNA. O PRODUTO DE NESTED-PCR FOI DIGERIDO COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Sspl*. M - MARCADOR DE MASSA MOLECULAR PADRÃO (100 pb); CN: CONTROLE NEGATIVO; 1 a 12 AMOSTRAS DE *Cryptosporidium* sp. EM CÃES: 1 - 34C; 2 - 35; 3 - 2C; 4 - 14; 5 - 13; 6 - 18C; 7 - 1B; 8 - 23C; 9 - 24C; 10 - 39C; 11 - 46C; 12 - 48C; 13 - AMOSTRA DE *Cryptosporidium* sp. EM GATO: FEL 12; CP: CONTROLE POSITIVO (CEPA REFERÊNCIA DE *C. parvum*)

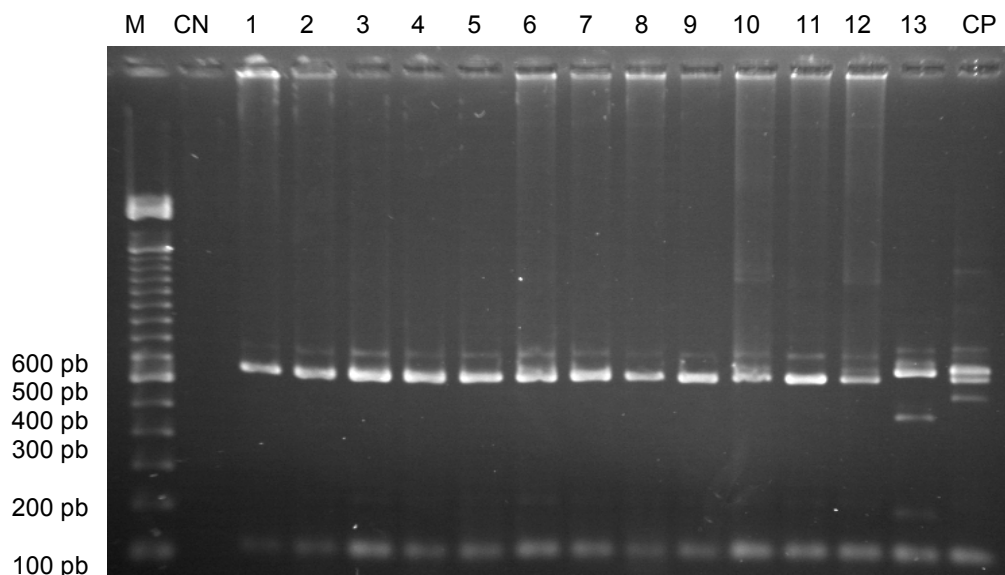


FIGURA 6 - DIFERENCIAÇÃO DE *Cryptosporidium* sp. DE CÃES E DE GATOS PELA TÉCNICA DE RFLP DO FRAGMENTO GÊNICO 18SSU rDNA. O PRODUTO DE NESTED-PCR FOI DIGERIDO COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO *AseI*. M - MARCADOR DE MASSA MOLECULAR PADRÃO (100 pb); CN: CONTROLE NEGATIVO; 1 a 12 AMOSTRAS DE *Cryptosporidium* sp. EM CÃES: 1 - 34C; 2 - 35; 3 - 2C; 4 - 14; 5 - 13; 6 - 18C; 7 - 1B; 8 - 23C; 9 - 24C; 10 - 39C; 11 - 46C; 12 - 48C; 13 - AMOSTRA DE *Cryptosporidium* sp. EM GATO: FEL 12; CP: CONTROLE POSITIVO (CEPA REFERÊNCIA DE *C. parvum*)

A construção do dendrograma com os dados obtidos pela técnica de RFLP mostrou três grupos.

O primeiro grupo é formado por 10 isolados com 100% de similaridade e dois se distanciam 20% do grupo maior.

O segundo grupo é formado pela cepa referência de *C. parvum* e dois isolados do parasito de cães.

O terceiro grupo isola *Cryptosporidium* sp. de gato com apenas 60% de similaridade (FIGURA 7).

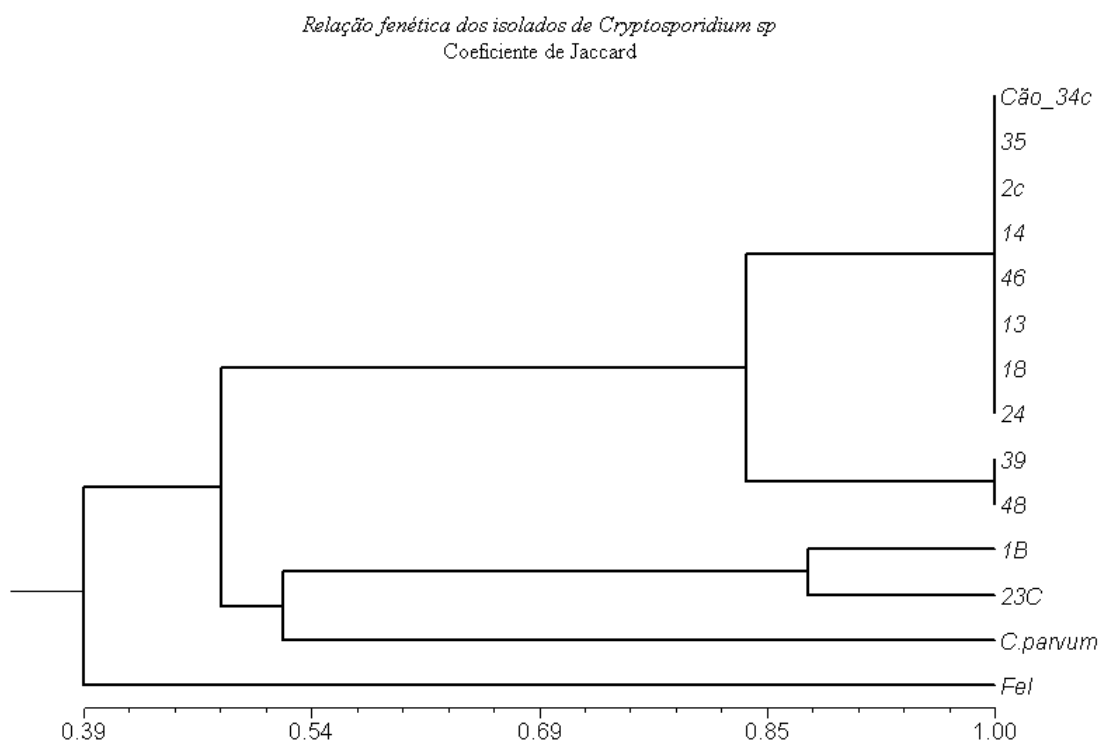


FIGURA 7 - RELAÇÃO EVOLUTIVA DOS ISOLADOS DE *Cryptosporidium* sp. DE CÃES E DE GATOS, NO ESTADO DO PARANÁ CONSTRUÍDO COM MÉTODO DE GRUPO DE PAR NÃO PONDERADO COM MÉDIA ARITMÉTICA (UPGMA) E ÍNDICE DE JACCARD. AS COMPARAÇÕES FORAM REALIZADAS COM FRAGMENTOS OBTIDOS POR RFLP DO GENE 18SSU rDNA. AMOSTRAS DE *Cryptosporidium* sp. EM CÃES: 34C, 35, 2C, 14, 13, 18, 1B, 23C, 24, 39, 46, 48; AMOSTRA DE *Cryptosporidium* sp. EM GATO: FEL 12; CP: CONTROLE POSITIVO (CEPA REFERÊNCIA DE *C. parvum*)

5.5 SEQUENCIAMENTO DOS ISOLADOS DE *Cryptosporidium* sp. DE CÃES E DE GATO

Todos os isolados de *Cryptosporidium* sp. de cães e de gatos foram sequenciados, sendo 12 amostras de *Cryptosporidium* sp. de cães e uma de gato. A análise genotípica de 10 isolados de *Cryptosporidium* sp. de cães mostraram ser compatíveis com *C. canis* e dois isolados foram diferentes (1B e 23C). O isolado de gato revelou identidade genotípica compatível com *C. felis*. O controle positivo confirmou ser *C. parvum*.

A construção filogenética (Neighbor-Joining) dos 12 isolados de *Cryptosporidium* sp. de cães mostrou que 10 isolados agruparam-se no mesmo

grupo com 100% de similaridade. As amostras 1B e 23C mostraram-se geneticamente afastadas das demais (FIGURA 8) agrupando-se com *C. parvum*. A amostra de *Cryptosporidium* sp. de gato mostrou ser uma espécie distinta. Ao comparar esta sequência no *blast* ela apresentou 98% de similaridade com o *C. felis* (nº *GenBank* FJ707310.1).

O fenograma construído utilizando o Método de grupo de par não ponderado com média aritmética (UPGMA) igualmente comprovou-se que dos 12 isolados 10 ficaram agrupados num único grupo com 100% de similaridade. As amostras 1B e 23C agruparam-se com *C. parvum* (FIGURA 9). O isolado de gato permaneceu como grupo independente.

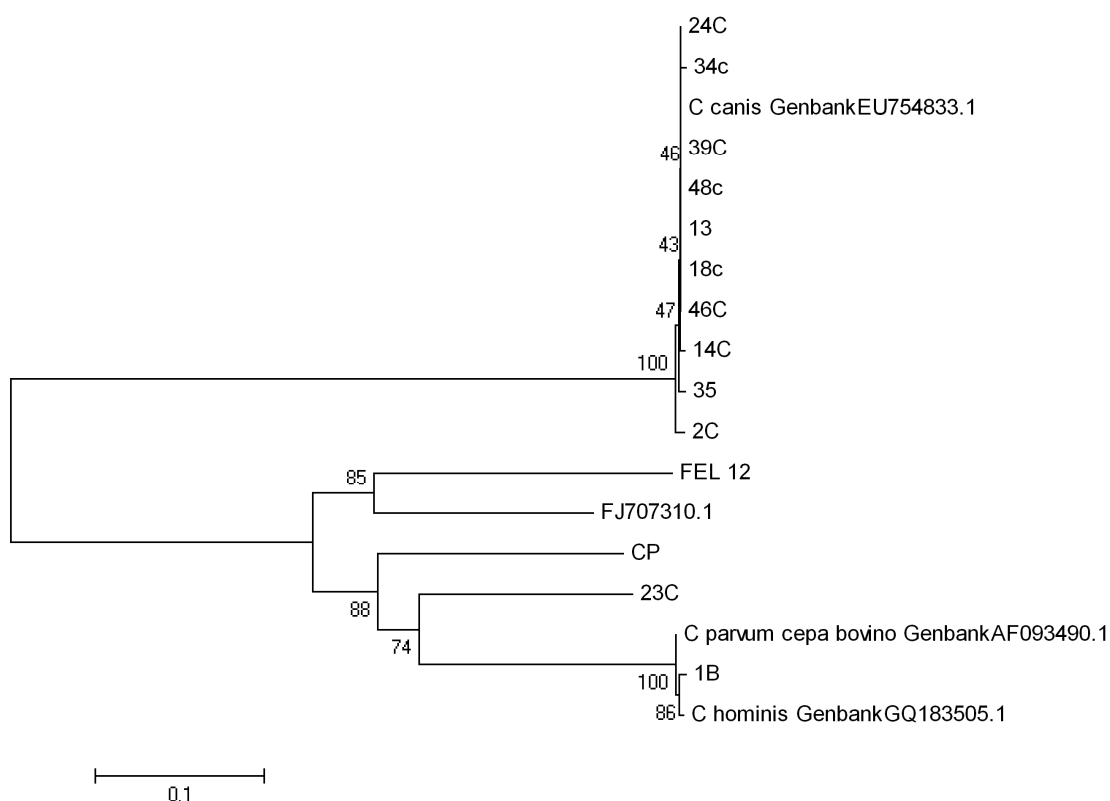


FIGURA 8 - RELAÇÃO EVOLUTIVA DOS ISOLADOS DE *Cryptosporidium* sp. DE CÃES E DE GATOS, NO ESTADO DO PARANÁ BASEADO NA ANÁLISE DE NEIGHBOR-JOINING DAS SEQUÊNCIAS DO GENE 18SSU rDNA. AMOSTRAS DE *Cryptosporidium* sp. EM CÃES: 34C, 35, 2C, 14, 13, 18C, 1B, 23C, 24C, 39C, 46C, 48C; AMOSTRA DE *Cryptosporidium* sp. EM GATO: FEL 12; CP: CONTROLE POSITIVO (CEPA REFERÊNCIA DE *C. parvum*); *C. canis* (GENBANK Nº EU754833.1); *C. felis* (GENBANK Nº FJ707310.1); *C. parvum* CEPA BOVINO (GENBANK Nº AF093490.1); *C. hominis* (GENBANK Nº GQ183505.1)

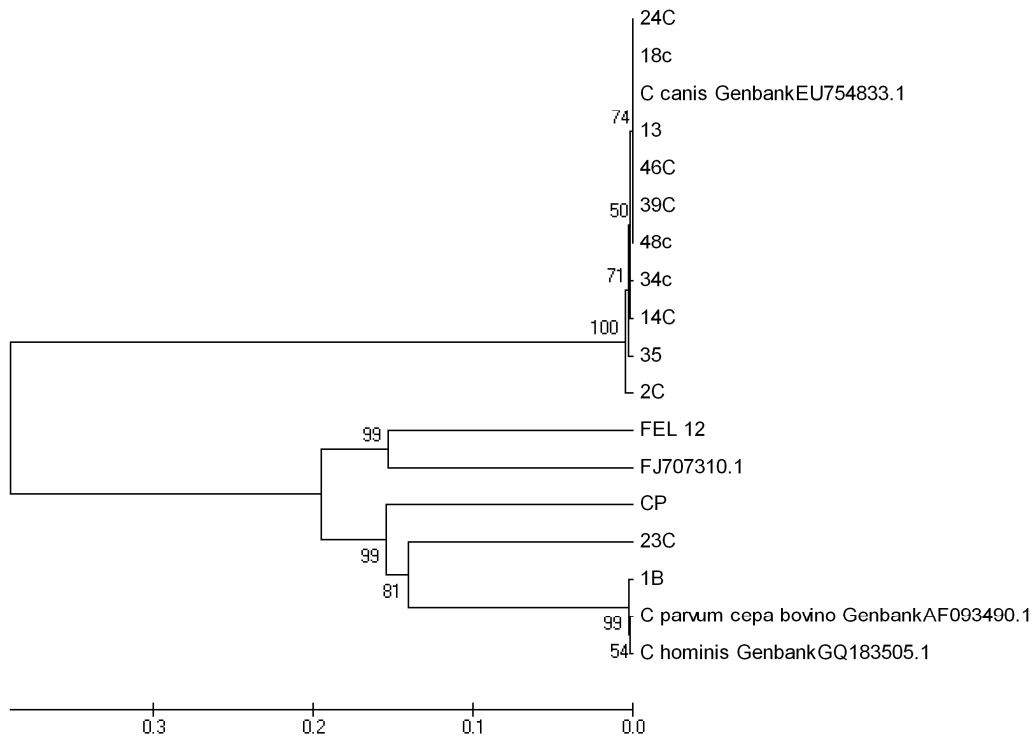


FIGURA 9 - RELAÇÃO EVOLUTIVA DOS ISOLADOS DE *Cryptosporidium* sp. DE CÃES E DE GATOS, NO ESTADO DO PARANÁ BASEADO NA ANÁLISE DO MÉTODO DE GRUPO DE PAR NÃO PONDERADO COM MÉDIA ARITMÉTICA (UPGMA) DAS SEQUÊNCIAS DO GENE 18SSU rDNA. AMOSTRAS DE *Cryptosporidium* sp. EM CÃES: 34C, 35, 2C, 14, 13, 18C, 1B, 23C, 24C, 39C, 46C, 48C; AMOSTRA DE *Cryptosporidium* sp. EM GATO: FEL 12; CP: CONTROLE POSITIVO (CEPA REFERÊNCIA DE *C. parvum*); *C. canis* (GENBANK N° EU754833.1); *C. felis* (GENBANK N° FJ707310.1); *C. parvum* CEPA BOVINO (GENBANK N° AF093490.1); *C. hominis* (GENBANK N° GQ183505.1)

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, o método parasitológico utilizado para a pesquisa de oocistos foi a coloração de Ziehl-Neelsen modificada, que é um método fácil e rápido para detectar os oocistos eliminados nas fezes. Com este método, os oocistos coram-se em vermelho ou róseo, enquanto as outras estruturas fecais coram-se em verde ou azul de acordo com o corante usado para contracorar (HUBER, 2007). Todavia, não foi detectada a presença de oocistos nas 48 amostras fecais de cão e em duas de gatos analisadas. O resultado negativo possivelmente se explica pela quantidade de oocistos eliminados e também pela pouca amostragem para a realização do esfregaço. Segundo Pereira (2007), para detectar *Cryptosporidium* sp. pela coloração de Ziehl-Neelsen são necessários 50.000 a 500.000 oocistos por grama de fezes. E como os animais não apresentavam sinais clínicos possivelmente se oocistos estivessem sendo eliminados, a quantidade deveria ser pequena, não sendo passível de detecção. Segundo Huber *et al.* (2002), na técnica de esfregaço de fezes é examinada uma quantidade reduzida de amostra fecal, e o exame de apenas uma lâmina corada seria insuficiente para detectar oocistos de *Cryptosporidium* sp. Provavelmente esta metodologia pode ser útil para animais sintomáticos. Em animais aparentemente saudáveis que estão eliminando poucos oocistos nas fezes esta metodologia não seria indicada e além do mais a excreção de oocistos é intermitente em indivíduos sintomáticos e assintomáticos, o que poderia justificar os resultados negativos do presente estudo.

Lallo e Bondan (2006) analisaram 450 amostras fecais de cães coradas pelo método de Ziehl-Neelsen e observaram 40 cães positivos (8,8%) na Cidade de São Paulo. Ederli *et al.* (2005) analisaram 100 amostras de fezes de cães na cidade de Campos dos Goytacazes no Estado do Rio de Janeiro, através de esfregaços com o sedimento após centrifugação e coraram pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada, detectando 40 amostras com oocistos de *Cryptosporidium* sp. (40%). Esta alta ocorrência poderia estar relacionada com a técnica de concentração por centrifugação usada pelos autores. No presente trabalho não foi realizado o método de concentração o que também pode ter contribuído para o resultado negativo. Todavia, segundo Nieminski *et al.* (1995), a técnica de concentração por sacarose tem a desvantagem de levar a perdas de mais de 50% do número de oocistos. Esses autores verificaram que ao reduzir o número de etapas no procedimento

houve diminuição de perdas de oocistos. Segundo Kuczynska e Shelton (1999), outra desvantagem ao usar solução de sacarose, é o seu baixo peso específico e alta viscosidade, que diminuem a recuperação de oocistos.

A recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* sp. em fezes pode ter também a interferência da densidade do oocisto, pois oocistos com baixa densidade terão recuperação menor por técnicas de sedimentação enquanto os de alta densidade serão menos eficientemente recuperados por técnicas de flutuação. Também a aderência dos oocistos em sólidos fecais reduz o número de oocistos recuperados (MACHADO, 2006). É importante salientar que as substâncias utilizadas para a concentração de oocistos com densidades entre 1,050 e 1,300 são empregadas para a flutuação e clarificação das amostras (MACHADO, 2006).

Durante muito tempo foi considerado que a principal espécie que tem grande potencial zoonótico era *C. parvum*. Todavia qualquer oocisto detectado em fezes era designado de *C. parvum*, pois os oocistos são muito parecidos morfometricamente. Mais recentemente, pode-se diferenciar genótipos dependendo do hospedeiro encontrado, por exemplo *C. parvum* genótipo canino, *C. parvum* genótipo bovino, *C. parvum* genótipo humano. Com os avanços da pesquisa, estes genótipos foram considerados como espécies específicas *C. canis*, *C. parvum* e *C. hominis* respectivamente (XIAO *et al.*, 2004; FAYER, 2010).

Assim, além da técnica de Ziehl-Neelsen modificada, no presente trabalho foram empregadas as técnicas moleculares para a pesquisa de DNA e identificação da espécie do parasito. Nas diferentes etapas procurou-se trabalhar com metodologias que tivessem o máximo de eficiência, como, por exemplo, para a extração de DNA que foi realizada com Kit ChargeSwitch® (Invitrogen™). A técnica demonstrou melhorar o desempenho e aumentar a sensibilidade da PCR (OSAKI, 2009), pois foi possível detectar DNA de até cinco oocistos, quando aplicado a técnica de PCR em controles positivos com concentrações de oocistos conhecidas. Quando o DNA foi amplificado com PCR seguido de uma Nested-PCR foi possível detectar quantidades inferiores a cinco oocistos. O que se mostrava promissora para o trabalho aqui realizado.

O gene utilizado para a realização da PCR, NPCR, RFLP e sequenciamento foi o 18SSU rDNA. Este gene é o mais amplamente caracterizado e descrito em espécies conhecidas de *Cryptosporidium* sp.. Várias sequências completas estão disponíveis nos bancos de dados, assim como pelo seu uso difundido em

genotipagem de *Cryptosporidium* sp. graças à natureza de muitas cópias do gene e da presença de regiões semiconservadas e hipervariáveis (COUPE *et al.*, 2005; XIAO, 2009). Ele apresenta uma região hipervariável localizada entre os nucleotídeos 615 – 850 e três regiões polimórficas entre os nucleotídeos 179 – 271 (COUPE *et al.*, 2005) o que lhe confere maior sensibilidade e especificidade.

Quando foi realizada a técnica de PCR em etapa única, das 91 amostras fecais de cão foram detectados três animais positivos (3,3%). Enquanto nas 25 amostras fecais de gato, uma amostra foi positiva (4%). Como a técnica tinha sensibilidade para detectar DNA de até cinco oocistos por amostra possivelmente nas amostras que foram amplificados fragmentos de 1375 pares de base havia quantidade de oocisto superior. Em gatos duas pesquisas utilizaram a PCR simples (gene 18SSU rDNA) e os mesmos iniciadores do presente trabalho. A primeira foi realizada por Fayer *et al.* (2006), os quais estudaram 18 amostras fecais de gato de abrigo nos Estados Unidos (EUA) e detectaram DNA de *Cryptosporidium* sp. em todas amostras. A segunda pesquisa foi conduzida por Santín *et al.* (2006), que detectaram prevalência de 13% em 46 amostras fecais de gatos de Bogotá (Colômbia). Há outros estudos em amostras fecais de gato em que foi utilizada a técnica de PCR com iniciadores diferentes, apesar do gene ser o 18SSU rDNA. Um destes estudos foi feito na Austrália, McGlade *et al.* (2003) pesquisaram DNA de *Cryptosporidium* sp. em amostras fecais de 40 gatos e detectaram taxa de prevalência de 10%. Segundo Huber (2007), a detecção do DNA pela técnica de PCR é considerada inviável, devido à baixa quantidade de DNA ou inibidores enzimáticos presentes na amostra fecal. Os inibidores de PCR presentes na amostra de fezes são sais biliares, compostos fenólicos, proteínas e polissacarídeos (SCORZA *et al.*, 2003). Todavia, no presente trabalho a técnica de PCR mostrou-se melhor que o exame parasitológico principalmente para cães.

A técnica de Nested-PCR melhorou a sensibilidade de detecção pois das 91 amostras fecais de cão 12 (13,2%) foram positivas para *Cryptosporidium* sp. enquanto das 25 amostras de gato uma foi positiva (4%). O uso do NPCR torna-se importante quando é necessário detectar poucos organismos contidos numa microflora diversa, como ocorre na extração de DNA a partir de material fecal (HUBER, 2007). O encontro de DNA em amostras fecais indica que os animais possuem baixa carga parasitária. Pode ser pelo fato de que, na presente pesquisa,

foi trabalhado com amostras aleatórias, e não animais jovens e com diarreia. Porém, o objetivo deste trabalho era conhecer a taxa de prevalência na população.

Para melhor conhecer a(s) espécie(s) em causa usou-se num primeiro tempo a técnica de RFLP utilizando-se os produtos da Nested-PCR e digeridos com as enzimas de restrição *Sspl* e *Asel* pois segundo Xiao *et al.* (1999a) esta metodologia permitiria chegar a espécie. O que se observou foi que a enzima *Asel* teve um mesmo padrão de corte para todas as amostras de *Cryptosporidium* sp. de cão, corroborando com o estudo de Huber (2007), diferindo para a cepa isolada de gato e a cepa referência de *C. parvum*. Já a enzima *Sspl* mostrou diferenças nas sequências para algumas amostras de *Cryptosporidium* sp. de cão. Sugerindo que a *Asel* para as amostras de *Cryptosporidium* sp. de cão conseguiu identificar a espécie e não genótipo, enquanto a *Sspl* identificou genótipos e não espécie.

Já para a amostra de *Cryptosporidium* sp. de gato o padrão de corte com a *Sspl* corroborou com a pesquisa de Huber (2007), pois segundo o autor *C. felis* pode ser seguramente diagnosticado com a digestão pela enzima *Sspl*, possuindo esta espécie padrão de corte que a diferencia das demais.

O dendrograma construído com os resultados obtidos pela técnica de RFLP, mostrou que o isolado de *Cryptosporidium* sp. de gato é diferente de *C. canis*, *C. parvum* e que tratava-se de uma espécie específica. Quanto aos isolados de *Cryptosporidium* sp. de cão observaram-se três genótipos do parasito, sendo que das doze amostras analisadas dez agruparam-se num mesmo grupo e outras duas ao grupo formado por *C. parvum*, porém com 50% de dissimilaridade.

Na literatura, há relatos da existência de três genótipos de *C. canis*, que são os genótipos: canino, raposa e coiole. Trout *et al.* (2006) realizaram um estudo em coioles da região nordeste da Pensilvânia para determinar espécies e genótipos de *Cryptosporidium* sp., seis coioles de 22 estudados foram positivos para *Cryptosporidium* sp. sendo que em cinco foi detectado *C. canis* genótipo coiole. Em outro estudo envolvendo coioles no Canadá, Thompson *et al.* (2009) detectaram uma variante de *C. canis* da espécie canina. Zhou *et al.* (2004) detectaram em raposas *C. canis* genótipos canino e raposa.

Para melhorar a resolução das espécies encontradas nestes animais de companhia partiu-se para o sequenciamento e análise filogenética. As análises filogenéticas do gene 18SSU rDNA usando as técnicas de Neighbor-Joining e de UPGMA, para as sequências de *Cryptosporidium* sp. de cão e de gato, mostraram

três agrupamentos sendo que dez sequências de *Cryptosporidium* sp. de cão agruparam-se com *C. canis*, duas sequências agruparam-se com *C. parvum* e a sequência de *Cryptosporidium* sp. de gato agrupou-se com *C. felis*. Ao colocar a sequência da amostra 1B de *Cryptosporidium* sp. isolado de cão no *blast*, verificou-se similaridade genética de 99% com *C. parvum* genótipo bovino (*GenBank* nº AF093490.1) e *C. hominis* (*GenBank* nº GQ183507.1) respectivamente. Ao passo que o isolado 23C de *Cryptosporidium* sp. de cão apresentou 99% de similaridade com *C. parvum* genótipo o bovino (*GenBank* nº AF093490.1).

Ao analisar a árvore de Neighbor-Joining, observou-se que o isolado 1B de *Cryptosporidium* sp. de cão ficou próximo geneticamente de *C. parvum* genótipo bovino e *C. hominis*, no entanto tendo uma maior proximidade com *C. hominis*. Enquanto a árvore de UPGMA mostrou que este isolado foi similar 99% com as duas espécies, corroborando com o observado no *blast*. Provavelmente a região analisada do isolado 1B de *Cryptosporidium* sp. de cão, foi utilizada a sequência parcial de 630 pares de base, seja parecida com *C. parvum* genótipo bovino e *C. hominis*. Para confirmação teria que alinhar o gene ribossomal inteiro de *C. parvum* genótipo bovino e de *C. hominis* com o isolado 1B de *Cryptosporidium* sp. de cão para verificar regiões que variem, assim determinar com qual espécie ou genótipo se assemelha.

Já ao analisar as árvores de Neighbor-Joining e de UPGMA para a isolado 23C de *Cryptosporidium* sp. de cão notou-se proximidade genética e similaridade com *C. parvum* genótipo bovino.

Conforme Xiao *et al.* (2004) e Fayer (2010) experimentalmente *C. parvum* genótipo humano não foi infectante para cães, gatos, ratos, camundongos e bovinos. No entanto, foi infectante para bezerros em altas doses. Também houve relatos de infecção natural em bovino. Giangaspero *et al.* (2006), identificaram *C. parvum* em sete de oito amostras de *Cryptosporidium* sp de cães, sendo que em uma amostra foi encontrada *C. canis*. No presente trabalho é provável que um dos isolados de *Cryptosporidium* sp. de cão seja *C. hominis*, o que indicaria que o cão pode se infectar com a espécie de *Cryptosporidium* sp. específica do ser humano.

Estudos conduzidos por Palmer *et al.* (2008) revelaram que quatro de oito amostras fecais de cães positivas para *Cryptosporidium* sp. e sequenciadas eram de *C. canis*. Miller *et al.* (2003), realizaram o sequenciamento do gene actina de uma

amostra de *Cryptosporidium* sp. de cão de oito semanas de idade e detectaram *C. canis*.

No presente trabalho tanto a árvore de Neighbor-Joining como a UPGMA mostraram que o isolado de *Cryptosporidium* sp. de gato é uma espécie totalmente diferente não se agrupando com os isolados de *Cryptosporidium* sp. de cão nem com *C. parvum*. O isolado de *Cryptosporidium* sp. de gato agrupou com o *C. felis* quando comparada a sequência do *GenBank* nº FJ707310.1, provando que de fato a espécie da amostra de gato sequenciada é *C. felis*. Todos os isolados de *Cryptosporidium* sp. de gatos caracterizados têm mostrado diferenças de sequência significativas comparadas com outros *Cryptosporidium* spp. e genótipos conhecidos (XIAO *et al.*, 2004).

Pesquisas conduzidas por Palmer *et al.* (2008) revelaram que 18 de 26 isolados de *Cryptosporidium* sp. de gato sequenciados foram identificados como *C. felis*. Fayer *et al.* (2006) realizaram o sequenciamento do gene 18SSU rDNA de *Cryptosporidium* sp. de 18 amostras de *Cryptosporidium* sp. de gato e todas foram identificadas como *C. felis*. Estudo conduzido por Santín *et al.* (2006), mostrou que as análises de sequência de cinco de seis isolados de *Cryptosporidium* sp. de gatos de Bogotá eram *C. felis* e um era *C. muris*, sendo que este foi o primeiro relato de *C. muris* em gatos.

O presente estudo revelou que os cães eliminam 83,33% de oocistos de *C. canis* e 16,67% de *C. parvum* e os gatos eliminam oocistos de *C. felis*. Isso indica que a maioria das espécies de *Cryptosporidium* sp. eliminadas são específicas do hospedeiro. No entanto, espécie com grande potencial zoonótico (*C. parvum*) e espécie-específica do ser humano (*C. hominis*) podem infectar o cão, isso mostra que o ser humano pode transmitir a outras espécies animais *C. hominis*. O lançamento de esgoto não tratado nos rios contamina a água com oocistos de *Cryptosporidium* sp., que pode conter espécies zoonóticas e específicas de *Cryptosporidium* sp. como *C. hominis*, assim os animais podem se tornar suscetível a se infectar com outras espécies de *Cryptosporidium* sp., pois a água ingerida é a mesma consumida pelo ser humano.

Estes achados também mostram que os animais de companhia representam risco para a saúde pública, assim como para transmissão e contaminação ambiental de *Cryptosporidium* sp., mesmo que a maioria das espécies de *Cryptosporidium* sp. eliminadas sejam espécie-específicas do hospedeiro, há relatos de infecção em

seres humanos por *C. canis* e *C. felis* independente da imunidade (PEDRAZA-DÍAZ *et al.*, 2001; ABE *et al.*, 2002; FAYER *et al.*, 2006; HUBER *et al.*, 2007).

Cryptosporidium sp. ainda é pouco conhecido pelos clínicos de pequenos animais e este trabalho poderá permitir alertar os clínicos e que estes comecem a incluir a criptosporidose na sua lista de diagnóstico diferencial ao atender animais com problemas gastrintestinais.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

A técnica de ZIEHL-NEELSEN não se mostrou uma boa metodologia para pesquisa epidemiológica de *Cryptosporidium* sp. em cães e em gatos, especialmente para animais assintomáticos como os usados no presente trabalho.

O uso dos métodos moleculares possibilitou detectar a presença de *Cryptosporidium* sp. em amostras fecais de cães e de gatos de Curitiba e região metropolitana.

A técnica de RFLP permitiu verificar que três genótipos do parasito circulam em cães, indicando diversidade genética nos isolados de *Cryptosporidium* sp. nesta espécie animal. Dez isolados de *Cryptosporidium* sp. de cão agruparam-se num mesmo grupo, diferenciando-se em dois genótipos e dois outros agruparam-se ao grupo de *C. parvum*.

O isolado de *Cryptosporidium* sp. obtido em gato mostrou-se diferente dos isolados de *Cryptosporidium* sp. de cães e da cepa referência de *C. parvum*.

Através do sequenciamento do gene 18SSU rDNA, foi possível determinar que *Cryptosporidium* sp. de cães eram 83,33% *C. canis* e 16,67% *C. parvum* e um destes mostrou proximidade genética com *C. hominis*. Isso mostra que pode haver infecção natural por *C. hominis* em cães e que pode haver infecção cruzada entre cães/homem. Nossos resultados corroboram com as informações que espécies consideradas específicas para um hospedeiro podem acometer outras, o que leva a acreditar que não existe especificidade de hospedeiros. Já a espécie detectada em gatos foi espécie específica, ou seja, *C. felis*.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABE, N. *et al.* *Cryptosporidium* infection in dogs in Osaka, Japan. **Veterinary Parasitology**, v. 108, n. 3, p. 185-193, 2002.
- ADL, S. M. *et al.* The new higher level classification of eucaryotes with emphasis on the taxonomy of Protists. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 399-451, 2005.
- ALMEIDA, T. T. C. Padronização e avaliação de métodos moleculares para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp (Apicomplexa: Cryptosporiidae) em amostras fecais: extração de DNA genômico e PCR (reação em cadeia pela polimerase). 130 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública), Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2004.
- AMARANTE, H. M. B. **Ocorrência do *Cryptosporidium* sp. em indivíduos imunocompetentes e imunodeficientes em Curitiba**. 122 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1992.
- APPELBEE, A. J. *et al.* *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife – current status and future needs. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 8, p. 370-376, 2005.
- ARAÚJO, A. J. U. dos S. *et al.* Detecção de *Cryptosporidium meleagridis* em amostras fecais de pacientes HIV positivos no Brasil. **Revista Panamericana de Infectologia**, v. 9, n. 2, p. 38-40, 2007.
- ARAÚJO, A. J. U. dos S. *et al.* Genotypic identification of *Cryptosporidium* spp. isolated from hiv-infected patients and immunocompetent children of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 3, 2008.
- BLANCO, M. A. *et al.* Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans in Equatorial Guinea. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 12, p. 1282-1284, 2009.
- BOEHMER, T. K. *et al.* Cryptosporidiosis from a community swimming pool: outbreak investigation and follow-up study. **Epidemiology and Infection**, v. 137, p. 1651-1654, 2009.
- BOWMAN, D. D.; LUCIO-FORSTER, A. Cryptosporidiosis and giardiasis in dogs and cats: Veterinary and public health importance. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 121-127, 2010.
- CAREY, C. M. *et al.* Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. **Water Research**, v. 38, p. 818-862, 2004.
- CHALMERS, R. M.; DAVIES, A. P. Minireview: Clinical cryptosporidiosis. **Experimental Parasitology**, v.124, p. 138-146, 2010.

COSTA-RIBEIRO, M. C. V. **Variabilidade genética de *Aedes (Stegomyia) aegypti* no Brasil**. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.

COUPE, S. *et al.* Detection of *Cryptosporidium* and Identification to the Species Level by Nested PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1017-1023, 2005.

DOWNEY, A. S. *et al.* Efficacy of Pyrvinium Pamoate against *Cryptosporidium parvum* Infection In Vitro and in a Neonatal Mouse Model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 9, p. 3106-3112, 2008.

EDERLI, B. B.; RODRIGUES, M. F. G.; CARVALHO, C. B. de. Oocistos do gênero *Cryptosporidium* em cães domiciliados na cidade de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 14, n. 3, p. 129-131, 2005.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária: doenças do cão e do gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

FALCHI, R. L. R. **Contaminação por protozoários potencialmente patogênicos ao homem na água de diferentes pontos da Laguna dos Patos, Rio Grande, RS**. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

FAYER, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 90-97, 2010.

FAYER, R. *et al.* Detection of *Cryptosporidium felis* and *Giardia duodenalis* Assemblage F in a cat colony. **Veterinary Parasitology**, v. 140, p. 44-53, 2006.

FAYER, R. *et al.* Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1305-1322, 2000.

FENG, Y. *et al.* *Cryptosporidium* Genotype and Subtype Distribution in Raw Wastewater in Shanghai, China: Evidence for Possible Unique *Cryptosporidium hominis* Transmission. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 153-157, 2009.

FIGUEIREDO, H. C. P. *et al.* Excreção de oocistos de *Cryptosporidium parvum* em cães saudáveis das cidades de Lavras e Viçosa, Estado de Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1625-1627, 2004.

FRANCO, R. M. B. **Epidemiologia Ambiental de *Cryptosporidium* e *Giardia***. Palestra apresentada no 15. Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Curitiba, 2008.

GARCIA, F. A. I.; MARCONDES, M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, ano XII, n. 71, p. 36, 2007.

GARRIDO, L. E. M. ***Cryptosporidium parvum*: patógeno emergente de veiculação hídrica: desafios metodológicos de detecção ambiental.** 97 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública), Fundação Oswaldo Cruz Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro, 2005.

GATEI, W. *et al.* Molecular Analysis of the 18S rRNA Gene of *Cryptosporidium* Parasites from Patients with or without Human Immunodeficiency Virus Infections Living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1458-1462, 2003.

GIANGASPERO, A. *et al.* Molecular evidence for *Cryptosporidium* infection in dogs in Central Italy. **Parasitology Research**, v. 99, n. 3, p. 297-299, 2006.

GONÇALVES, E. M. do N. *et al.* Multilocus genotyping of *Cryptosporidium hominis* associated with diarrhea outbreak in a day care unit in São Paulo. **Clinics**, v. 61, n. 2, p. 119-126, 2006.

HAMNES, I. S. *et al.* A longitudinal study on the occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in dogs during their first year of life. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 49, n. 22, 2007.

HUBER, F. **Caracterização genotípica e estudo filogenético de *Cryptosporidium* spp. obtidos de diferentes hospedeiros.** 60 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

HUBER, F. *et al.* Genotypic characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 150, p. 65-74, 2007.

HUBER, F. *et al.* Comparação entre infecção por *Cryptosporidium* sp. e por *Giardia* sp. em gatos sob dois sistemas de criação. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 11, n. 1, p. 7-12, 2002.

ISEKI, M. *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. **Journal of Parasitology**, v. 28, p. 285-307, 1979.

JEX, A. R. *et al.* Classification of *Cryptosporidium* Species from Patients with Sporadic Cryptosporidiosis by Use of Sequence-Based Multilocus Analysis following Mutation Scanning. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 7, p. 2252-2262, 2008a.

JEX, A. R. *et al.* *Cryptosporidium* — Biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 304-317, 2008b.

KUVZYNSKA, E.; SHELTON, D. R. Method for detection and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts in feces, manures, and soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 2820-2826, 1999.

LALLO, M. A. Criptosporidiose canina. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 1, n. 2, p. 20 - 22, 1996.

LALLO, M. A.; BONDAN, E. F. Prevalência de *Cryptosporidium* sp. em cães de instituições da cidade de São Paulo. **Revista da Saúde Pública**, São Paulo, v. 40, n. 1, . 2006.

LAURENT, F. *et al.* Pathogenesis of *Cryptosporidium parvum* infection. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 141-148, 1999.

LEVINE, N. D. *et al.* A newly revised classification of the Protozoa. **Journal of protozoology**, v. 27, n. 1, p. 37-58, 1980.

LIMA, E. de C.; STAMFORD, T. L. M. *Cryptosporidium* spp. no ambiente aquático: aspectos relevantes da disseminação e diagnóstico. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.8, n.3, 2003.

MACHADO, E. de C. L.. **Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais na região metropolitana de Recife/PE.** 141 f. Tese (Doutorado em Nutrição) - Departamento de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

MAC KENZIE, W. R. A Massive Outbreak In Milwaukee Of *Cryptosporidium* Infection Transmitted Through The Public Water Supply. **The New England Journal of Medicine**, v. 331, n. 3, p. 161-167, 1994.

MARTINEZ, I. **Contribuição ao diagnóstico laboratorial da criptosporidiose humana e levantamento da prevalência de oocistos de *Cryptosporidium* spp nas fezes e em secreção brônquica de pacientes HIV positivos.** 80 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas), Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho "Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 1999.

MCGLADE, T. R. *et al.* Gastrointestinal parasites of domestic cats in Perth, Western Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 4, p. 251-262, 2003.

MEAMAR, I. A. R. *et al.* Molecular Characterization of *Cryptosporidium* Isolates from Humans and Animals in Iran. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 1033-1035, 2007.

MEINHARDT, P. L. *et al.* Epidemiologic Aspects of Human Cryptosporidiosis and the Role of Waterborne Transmission. **Epidemiologic Reviews**, v. 18, n. 2, p. 118-136, 1996.

MEISEL, J. L. *et al.* Overwhelming water diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. **Gastroenterology**, v. 70, p. 1156-1160, 1976.

MILLER, D. L. *et al.* Gastrointestinal cryptosporidiosis in a puppy. **Veterinary Parasitology**, v. 115, p. 199-204, 2003.

MILLER, K. *et al.* *Cryptosporidium parvum* in children with diarrhea in Mexico. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, p. 322-325, 1994.

MILLER, M.P. 1997. *Tools For Population genetic Analyses – TFPGA*, 1.3v, Department of Biological Sciences, **Northern Arizona University, UFA**.

MILLER, S. A. *et al.* A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**. v. 16, p. 1215, 1988.

MORGAN, U. M. *et al.* *Cryptosporidium* spp. in Domestic Dogs: the “Dog” Genotype. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 2220-2223, 2000.

MUNDIM, M. J. S. Prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dogs from different living conditions in Uberlândia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.144, p. 356-359, 2007.

NAVARRO, I. T. *et al.* Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em cães com diarréia atendidos no hospital veterinário da Universidade Estadual de Londrina - PR, Brasil. **Semina**, v.18, p. 23-25, 1997.

NIEMINSKY, E. C. *et al.* Comparison of two methods of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* spp. in water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1714-1719, 1995.

NIME, F. A. *et al.* Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. **Gastroenterology**, v. 70, p. 592-598, 1976.

O'DONOGHUE, P. J. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis in Man and Animals. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 2, p. 139-195, 1995.

OSAKI, S.C. ***Cryptosporidium* spp.: desenvolvimento de técnicas moleculares e imunoquímicas para a detecção de oocistos em água e avaliação da sua remoção pelos métodos convencionais de tratamento da água.** 176 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos), Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

OVERGAAUW, P. A. M. Zoonotic parasites in fecal samples and fur from dogs and cats in The Netherlands. **Veterinary Parasitology**, v. 163, p. 115–122, 2009.

PALMER, C. S. *et al.* Determining the zoonotic significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Australian dogs and cats. **Veterinary Parasitology**, v. 154, p. 142–147, 2008.

PAULINO, R. C. **Detecção molecular de *Giardia* sp em amostras fecais e água: extração de DNA genômico, PCR e RFLP.** 107 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos), Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

PEDRAZA-DÍAZ, S. *et al.* Unusual *Cryptosporidium* species recovered from human faeces: first description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium* 'dog type' from patients in England. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, p. 293-296, 2001.

PEREIRA, J. T., **Métodos de desinfecção em água contendo *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) e sua detecção por técnica de biologia molecular**. 92 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia, Patologia) - Setores de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br:8080/dspace/handle/1884/13537>> Acesso em: 13 jul 2008.

PEREIRA, J.T., COSTA, A.O., OLIVEIRA SILVA, M.B., SCHUCHARD, W., OSAKI, S.C., CASTRO, E.A., PAULINO, R.C., THOMAZ SOCCOL, V. Comparing the efficacy of chlorine, chlorine dioxide, and ozone in the inactivation of *Cryptosporidium parvum* in water from Parana state, Southern Brazil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v 151, (2-3), p. 464-473, 2008

RYAN, U. *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. **Experimental Parasitology**, v.124, n.1, p. 113-120, 2010.

RYAN, U. M. *et al.*, *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). **Journal of Parasitology**, v. 90, n.4, p. 769-773, 2004.

RIGO, C. R.; FRANCO, R. M. B. Comparação entre os métodos de Ziehl-Neelsen modificado e Acid Fast-Trichrome para a pesquisa fecal de *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 35, n. 3, 2002.

ROBINSON, G. *et al.* Unusual *Cryptosporidium* Genotypes in Human Cases of Diarrhea. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 11, 2008.

ROSSIGNOL, J. F. *Cryptosporidium* and *Giardia*: Treatment Options and Prospects for New Drugs Jean-François. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 45-43, 2010.

SAMBROOK, J. *et al.* **Molecular Cloning – A Laboratory Manual**, 2 ed., New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.

SANTÍN, M. *et al.* *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bienersi* in cats from Bogota (Colombia) and genotyping of isolates. **Veterinary Parasitology**, v. 141, n. 3-4, p. 334-339, 2006.

SANTOS, M. M. A. B. *et al.* *Cryptosporidium* infection in ostriches (*Struthio camelus*) in Brazil: clinical, morphological and molecular studies. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 7, n. 2, 2005.

SARGENT, K. D. *et al.* Morphological and genetic characterization of *Cryptosporidium* oocysts from domestic cats. **Veterinary Parasitology**, v. 77, n. 4, p. 221-227, 1998.

SAVIOLI, L. *et al.* *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 5, 2006.

SCHNYDER, M. *et al.* Prophylactic and therapeutic efficacy of nitazoxanide against *Cryptosporidium parvum* in experimentally challenged neonatal calves. **Veterinary Parasitology**, v. 160, p. 149-154, 2009.

SCORZA, A. V. *et al.* Polymerase chain reaction for the detection of *Cryptosporidium* spp. in cat feces. **The Journal of Parasitology**, v. 89, n. 2, p. 423-426, 2003.

SHAHIDUZZAMAN, M. *et al.* Combination of cell culture and quantitative PCR for screening of drugs against *Cryptosporidium parvum*. **Veterinary Parasitology**, v.162, n. 3-4, p. 271-277, 2010.

SILVA, C. G. M. da *et al.* Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e outros parasitas em hortaliças consumidas *in natura*, no Recife. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 10, p. 63-69, 2005.

SLIFKO, T. R. *et al.* Emerging parasite zoonoses associated with water and food. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1379-1393, 2000.

SMITH, R. P *et al.* Investigation of the Role of Companion Animals in the Zoonotic Transmission of Cryptosporidiosis. **Zoonoses Public Health**, v. 56, p. 24-33, 2009.

SWOFFORD, D.L. 2002 *PAUP**. *Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods)* Version 4. **Sinauer Associates: Sunderland, MA, USA**.

TAMURA, K. *et al.* MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.24, p. 1596-1599, 2007.

THOMAZ, A. **Caracterização genotípica de *Cryptosporidium* spp. Isolados de amostras de felinos, caninos e bovinos no Estado de São Paulo**. 55 f. Dissertação (mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e de Saúde Animal, Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2006.

THOMAZ, A. *et al.* Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of felines, canines and bovines in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 150, n. 4, p. 291-296, 2007.

THOMPSON, J. D. *et al.* CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, 11: 4673-4680, 1994.

THOMPSON, R. C. *et al.* The molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in coyotes from Alberta, Canada, and observations on some cohabiting parasites. **Veterinary Parasitology**, v. 159, n. 2, p. 167-170, 2009.

TROTZ-WILLIAMS, L. A. *et al.* Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. **Parasitology Research**, v. 99, p. 346-352, 2006.

TROUT, J.M. *et al.* *Giardia* and *Cryptosporidium* species and genotypes in coyotes (*Canis latrans*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 37, n. 2, p. 141-144, 2006.

WIDMER, G. *et al.* A Study of *Cryptosporidium parvum* Genotypes and Population Structure. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 5, 1998.

XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 80-89, 2010.

XIAO, L. *et al.* *Cryptosporidium* Systematics and Implications for Public Health. **Parasitology Today**, v. 16, n. 7, p. 287-292, 2000.

XIAO, L. *et al.* *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 1, p. 72–97, Jan. 2004.

XIAO, L. *et al.* Genetic Diversity within *Cryptosporidium parvum* and Related *Cryptosporidium* Species. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3386-3391, 1999a.

XIAO, L. *et al.* Phylogenetic Analysis of *Cryptosporidium* Parasites Based on the Small-Subunit rRNA Gene Locus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 1578-1583, 1999b.

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

ZHOU, L. *et al.* Genotypes of *Cryptosporidium* Species Infecting Fur-Bearing Mammals Differ from Those of Species Infecting Humans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 12, p. 7574-7577, 2004.

DOCUMENTOS CONSULTADOS

DOCUMENTOS CONSULTADOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Teses, dissertações, monografias e trabalhos acadêmicos**. Curitiba: Editora UFPR, 2007. (Normas para apresentação de documentos científicos, 2).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Referências**. Curitiba: Editora UFPR, 2007. (Normas para apresentação de documentos científicos, 4).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Redação e editoração**. Curitiba: Editora UFPR, 2007. (Normas para apresentação de documentos científicos, 9).