SHEILA OLIVEIRA DE SOUZA SILVA

Padronização de uma reação em cadeia pela polimerase em *nested*
(nested-PCR) para detecção e diferenciação das espécies de *Cryptosporidium*
spp e caracterização molecular de *Cryptosporidium* isolados
de roedores sinantrópicos

SÃO PAULO
2011

SHEILA OLIVEIRA DE SOUZA SILVA

Padronização de uma reação em cadeia pela polimerase em *nested* (nested-PCR)
para detecção e diferenciação das espécies de *Cryptosporidium* spp e
caracterização molecular de *Cryptosporidium* isolados de roedores sinantrópicos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares

São Paulo

2011

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2475
FMVZ

Silva, Sheila Oliveira de Souza

Padronização de uma reação em cadeia pela polimerase em *nested* (nested-PCR) para detecção e diferenciação das espécies de *Cryptosporidium* spp e caracterização molecular de *Cryptosporidium* isolados de roedores sinantrópicos / Sheila Oliveira de Souza Silva. -- 2011.
62 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares.

1. *Cryptosporidium*. 2. PCR. 3. Roedores. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Padronização de uma reação em cadeia pela polimerase em nested (nPCR) para detecção e diferenciação das espécies de *Cryptosporidium* spp e caracterização molecular de *Cryptosporidium* isolados de roedores sinantrópicos", protocolado sob o nº 2166/2011, utilizando 45 (quarenta e cinco) ratos e camundongos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 04/5/2011.

We certify that the Research "Standardization of a polymerase chain reaction in the nested (nPCR) for detection and differentiation of species of *Cryptosporidium* spp and molecular characterization of *Cryptosporidium* isolated from rodents synantropic", protocol number 2166/2011, utilizing 45 (forty-five) rats and mice, under the responsibility Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethical Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/04/2011.

São Paulo, 05 de maio de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SILVA, Sheila Oliveira de Souza

Título: Padronização de uma reação em cadeia pela polimerase em *nested* (nested-PCR) para detecção e diferenciação das espécies de *Cryptosporidium* spp e caracterização molecular de *Cryptosporidium* isolados de roedores sinantrópicos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data_____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr.:_____Instituição:_____

Assinatura:_____Julgamento:_____

Prof. Dr.:_____Instituição:_____

Assinatura:_____Julgamento:_____

Prof. Dr.:_____Instituição:_____

Assinatura:_____Julgamento:_____

DEDICATÓRIA

A Jesus Eucarístico que me fortalece e ilumina o meu caminho e a Virgem Maria por sua interseção.

*Aos meus Pais (**Orlando e Nalva**), pelo apoio e confiança na minha capacidade, por estarem ao meu lado mesmo nos momentos mais difíceis pelo grande exemplo de vida me dado.*

*As minhas irmãs **Kátia e Gisele**, estrelas da minha vida! Pelos exemplos de vida e conquistas, por estarem ao meu lado incondicionalmente.*

*Aos meus sobrinhos **Leonardo , Larissa e BaBy** que fazem parte dos meus sonhos.*

*Ao meu esposo (**Ricardo**), pela sua importância imensurável, pela paciência, compreensão, amizade sincera alegria e palavras de incentivo.*

*Aos meus avós (**Anizia, José, Nair e Leonardo**) in memória por gerar as pessoas mais incríveis os meus pais.*

AGRADECIMENTO

Ao **Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares**, que desde o encerramento da graduação colaborou com a minha monografia, pela confiança, incentivo e principalmente pela amizade construída, o meu muito obrigado.

Aos Professores: **Leonardo José Richtzenhain e Paulo Eduardo Brandão** pelo incentivo no meu crescimento profissional.

As amigas **Alessandra Marnie Castro Gomes, Iracema Nunes Barros e Cintia Baldin** pela atenção, ajuda nos momentos difíceis, sugestões e amizade.

Aos meus cunhados **Fabio e José** pela amizade e força.

Ao **Dr. Aristeu Vieira da Silva**, da Universidade Paranaense – UNIPAR, pela coleta das amostras.

A todos os meus colegas de trabalho **Gisele, Bispo, Priscila, Renato, Pedrinho, Hilda, Jucélia, Alexandre, Rosana, Carol, Rose, Nilde, Antonio, Sandra, Washington, Danival, Cristina, Virginia, Paula e Zenaide** do VPS que de forma direta ou indiretamente utilizaram palavras de incentivo nesta nova jornada da minha vida.

As minhas amigas de graduação: **Vera, Joice e Kaline** por todo o divertimento, alegria em todos os momentos.

Às companheiras (os) dessa aventura singular do LABMAS: **Cintia Maria, Vanessa, Suely (Suelen), Karen Asano, Camila Oliveira, Gisele**

Ayres, Karen Ferrari , Carol, Cintia Mori, Juliana Nogueira, Camila, Sibeli, Aline, Bruna, Carlos, Leonardo, Thaisa, Andrea e Enio pelos momentos de diversão, estímulo e valiosa parceria, antes circunscrita aos questionamentos existenciais e teóricos nas longas e cúmplices conversas.

Aos agregados do LABMAS com muito carinho; **Nadia, Nelson, Estela Gallucci, Michelly, Mikaela, Juliana Martins, Marquinhos, Valdir, Malheiros e Juliana Castilho**, pelos momentos de alegria e apoio.

Aos demais amigos do VPS, **Bianca, Amane, Viviane, Cassia, Herbet, Aline, Iara, Fernanda, Jonas, Lara Borges, Adriana Cortez.**

À **Claudia Lima, Tânia Delonero, Daura, Carlos** , da Secretaria da Pós – graduação, por todo apoio e auxílio

À todos companheiros da Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em especial a **Elza** pela atenção e colaboração para finalizar a dissertação.

À comissão de Bioética e **Roseli da Costa Gomes**, Secretaria da Comissão.

A todos os **Mestres** do Programa de Pós – Graduação do VPS pelos ensinamentos adquiridos nas disciplinas.

A Coordenadora do Programa de PÓS-GRADUAÇÃO **Prof^a. Dra. Solange Maria Gennari**, e ao Departamento VPS por todo apoio e incentivo para o meu crescimento profissional.

*Não se acostume com o que não o faz feliz, revolte-se quando julgar necessário.
Alague seu coração de esperanças, mas não deixe que ele se afogue nelas.
Se achar que precisa voltar, volte!
Se perceber que precisa seguir, siga!
Se estiver tudo errado, comece novamente.
Se estiver tudo certo, continue.
Se sentir saudades, mate-a.
Se perder um amor, não se perca!
Se o achar, segure-o!*

(Fernando Pessoa)

RESUMO

SILVA, S. O. S. Padronização de uma reação em cadeia pela polimerase em *nested* (nested-PCR) para detecção e diferenciação das espécies de *Cryptosporidium* spp e caracterização molecular de *Cryptosporidium* isolados de roedores sinantrópicos. [Standardization of polymerase chain reaction in the nested (nested-PCR) for detection and differentiation of species of *Cryptosporidium* spp and molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from synanthropic rodents]. 2011. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Cryptosporidium spp são protozoários cosmopolita que acometem peixes, répteis, anfíbios, aves e mamíferos. Mais de 20 espécies são reconhecidas dentro deste gênero. Os roedores, grupos de organismos abundantes e ubíquos, têm sido considerados reservatórios de *Cryptosporidium* para humanos e animais de produção. As seqüências codificadoras da menor unidade ribossômica (18S rRNA) de *Cryptosporidium* spp caracterizam-se por intercalações entre regiões conservadas e polimórficas ao longo dos seus 1700 pares de bases. O objetivo deste estudo foi desenhar *primers* específicos para o gene 18S rRNA, potencialmente capazes de amplificar qualquer espécie ou genótipo de *Cryptosporidium* spp. e avaliar os atributos diagnósticos da *nested*-PCR baseadas em tais sondas. O desenho dos *primers* foi realizado de forma a amplificar um segmento de menor dimensão possível para se maximizar a sensibilidade do ensaio molecular e preservando o potencial discriminatório das seqüências amplificadas. A *nested*PCR padronizada neste estudo (nPCR-SH) foi comparada com outro ensaio similar que vem sendo largamente utilizado para detecção e identificação de *Cryptosporidium* spp. no mundo todo (nPCR-XIAO). Também se objetivou caracterizar molecularmente amostras de *Cryptosporidium* spp. isoladas de roedores sinantrópicos, empregando-se estas sondas e sondas moleculares direcionadas. Foram capturados 45 roedores em áreas públicas da região urbana da cidade de Umuarama, Paraná. As amostras foram submetidas a três provas moleculares, sendo duas direcionadas ao gene 18S rRNA (nPCR-SH e nPCR-XIAO) e outra, ao gene codificador da actina. A nPCR-SH foi testada com as amostras de *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium andersoni*, *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium canis*, *Cryptosporidium serpentis* e todas

foram positivas. Dezesesseis amostras de roedores foram positivas para a nPCR-SH, seis pela nPCR-XIAO e cinco pela nPCR dirigida ao gene codificador da actina. O sequenciamento dos fragmentos amplificados possibilitou a identificação de *Cryptosporidium muris* em três amostras de *Rattus rattus*, e dois novos genótipos de *Cryptosporidium*, os genótipos rato II e III. Genótipo rato II foi encontrado em uma amostra de *Mus musculus* e o genótipo III em doze amostras, sendo cinco *Rattus rattus* e sete *Mus musculus*. Os resultados deste estudo demonstraram que os *primers* desenhados para detecção do *Cryptosporidium* spp em amostras de fezes foram mais eficientes em amplificar regiões que permitem a distinção entre as espécies do parasito do que aqueles usados na PCR-XIAO. Nas amostras estudadas não foram encontrados genótipos ou espécies de *Cryptosporidium* que podem ser transmitidos a outras espécies como os zoonóticos, o que sugere que a importância destes animais na transmissão zoonótica de criptosporidiose é pouco relevante.

Palavras-chave: *Cryptosporidium*. PCR. Roedores

ABSTRACT

SILVA, S.O.S. Standardization of polymerase chain reaction in the nested (nested-PCR) for detection and differentiation of species of *Cryptosporidium* spp and molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from synanthropic rodents [Padronização de uma reação em cadeia pela polimerase em *nested* (nested-PCR) para detecção e diferenciação das espécies de *Cryptosporidium* spp e caracterização molecular de *Cryptosporidium* isolados de roedores sinantrópicos.]. 2011. 62 f . Dissertação. (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Cryptosporidium spp are cosmopolitan protozoan that infect fish, reptiles, amphibians, birds and mammals. More than 20 species are recognized within this genus. Rodents are groups of abundant and ubiquitous organisms that have been considered reservoirs of *Cryptosporidium* for infection of humans and livestock. The coding sequences of the smallest unit ribosomal (18S rRNA) of *Cryptosporidium* spp are characterized by intercalations amongst polymorphic and conserved regions along its 1700 base pairs. The aim of this study was to design primers specific for the 18S rRNA gene, potentially capable of amplifying any species or genotype of *Cryptosporidium* spp., and evaluate the attributes of the nested-PCR diagnosis based on such probes. The design of *primers* was performed to amplify a smaller segment as possible to maximize the sensitivity of molecular testing and preserving the discriminatory potential of the sequences amplified. The nested-PCR standardized in this study (nPCR-SH) was compared with another similar assay that has been widely used for detection and identification of *Cryptosporidium* spp. worldwide (nPCR-XIAO). It also aimed to characterize molecularly *Cryptosporidium* spp. isolated from synanthropic rodents, using these probes and targeted molecular probes. Forty five rodents were captured in public areas of the urban area of Umuarama, Paraná. The samples were subjected to three molecular tests, two targeted to gene 18S rRNA (nPCR-SH and nPCR-XIAO) and another targeted to the gene encoding actin. The nPCR-SH was tested with strains of *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium andersoni*, *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium canis*, *Cryptosporidium serpentis* and all were positive. Sixteen samples of rodents were positive by nPCR-SH, six by nPCR-

XIAO and five by nPCR targeted to the gene encoding actin. The sequencing of the amplified fragments allowed the identification of *Cryptosporidium Muris* in three samples of *Rattus rattus*, and two new genotypes of *Cryptosporidium* rat genotype II and III. It was found rat genotype II in a sample of *Mus musculus* and genotype III in twelve samples, five from *Rattus rattus* and seven from *Mus Musculus*. The results showed that the primers designed for detection of *Cryptosporidium* spp in fecal samples were more efficient in amplifying regions that allow the distinction amongst the parasite species than those used in the PCR-XIAO. *Cryptosporidium* species or genotypes transmitted to other species such as zoonotic were not found in the studied samples, which suggest that the importance of these animals in the zoonotic transmission of cryptosporidiosis is very limited.

Keywords: *Cryptosporidium*. PCR. Rodents.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos amplificados por *nested* PCR-SH e PCR-XIAO. Os valores são referentes ao número estimado de oocisto na amostra de *Cryptosporidium parvum*. L: peso molecular múltiplos de 100 pares de bases.....47
- Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos *nPCR-SH*, resultante da amplificação de DNA das espécies: 1) *C. andersoni*; 2) *C. canis*; 3) *C. hominis*; 4) *C. serpentis*; 5) *C. baileyi*; 6) Controle negativo; 7) *C. galli*; 8) *C. parvum*; 9) *C. felis*. L: peso molecular múltiplos de 100 pares de base.....48
- Figura 3 - Reconstrução filogenética de *Cryptosporidium* spp. com 9 táxons, inferida por método *Neighbor joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos Kimura dois parâmetros e 482 nucleotídeos do gene codificador de 18SrRNA. Árvore enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4.....51
- Figura 4 – Reconstrução filogenética de *Cryptosporidium* spp. com 19 táxons, inferida por método *Neighbor joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos Kimura dois parâmetros e 493 nucleotídeos do gene codificador de actina. Árvore enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4.....52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – <i>Cryptosporidium</i> spp. em seus respectivos hospedeiros.....	24
Quadro 2 – Espécies de <i>Cryptosporidium</i> spp. descritas com base em dados fenotípicos e genotípicos e seus principais sítios de infecção.....	25
Quadro 3 – Espécies e genótipos de <i>Cryptosporidium</i> spp. em diferentes espécies de roedores.....	27
Quadro 4 – Relação de <i>primers</i> utilizados para amplificação de seqüências parciais do gene codificador da subunidade menor do rRNA (SSU rRNA) 18S de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	35
Quadro 5 - Espécies de roedores utilizadas para avaliar a sensibilidade diagnóstica de duas nPCRs, utilizando os pares de primers denominados nPCR-SH e nPCR-XIAO.....	36
Quadro 6 - Seqüências dos <i>primers</i> preconizados por Xiao et al. (1999 e 2000).....	41
Quadro 7 - <i>Primers</i> para amplificação do gene codificador de actina (SULAIMAN et al., 2002).....	42
Quadro 8 - Amplificações em nested PCR para os genes da subunidade do 18S rDNA e da actina.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação dos resultados das amostras testadas pelas amplificações nPCR-SH e nPCR-XIAO.....	49
--	----

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcento
°C	graus Celsius
®	marca registrada

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desorribonucleotídeo trifosfatado
et al.	colaboradores
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g	gramas
HCl	ácido clorídrico
LABMAS	Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia
M	molar
mg	miligrama
Mgcl ₂	Cloreto de magnésio
mL	mililitro
mM	milimolar
NaCl	cloreto de sódio
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia pela polimerase
pH	concentração de hidrogênio iônico
Pk	proteínase K
SDS	dodecil sulfato de sódio
TBE	tris borato EDTA
TE	TRIS EDTA
TRIS	hidroximetil aminometanoS
U	unidades
µL	microlitros

μg microgramas

Xg vezes aceleração da gravidade terrestre ($9,8 \text{ m s}^{-2}$)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
1.1	TAXONOMIA E HOSPEDEIROS.....	23
1.2	CRYPTOSPORIDIUM EM ROEDORES.....	26
1.3	CICLO DE VIDA DO <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> SPP.....	27
1.4	TRANSMISSÃO E SINTOMAS CLÍNICOS.....	28
1.5	TÉCNICAS UTILIZADAS PARA DETECÇÃO DE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> ...30	
2	JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS.....	32
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1	EXPERIMENTO 1: PADRONIZAÇÃO DA <i>NESTED</i> -PCR DIRECIONADA A 18S rDNA.....	34
3.1.1	Delineamento experimental.....	34
3.1.1.1	<i>Primers</i>	34
3.1.1.2	Avaliação da Sensibilidade Analítica	35
3.1.1.3	Avaliação da especificidade analítica.....	35
3.1.1.4	Avaliação da sensibilidade diagnóstica.....	36
3.1.2	Métodos Laboratoriais	37
3.1.2.1	Pesquisa de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. método <i>Sheather</i> Modificado.....	37
3.1.2.2	Purificação de oocistos de <i>Cryptosporidium</i>	37
3.1.2.3	Extração de DNA de oocistos purificados.....	39
3.1.2.4	Amostras fecais de roedores	40
3.1.2.5	Reação em cadeia pela polimerase.....	40
3.2	EXPERIMENTO 2: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AMOSTRAS DE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> DE ROEDORES.....	41

3.2.1	Reação de <i>nested</i> PCR para amplificação do fragmento do gene da actina.....	42
3.2.2	Análise dos produtos amplificados.....	43
3.2.3	Purificação das amostras amplificadas para seqüenciamento.....	43
3.2.4	Reação de seqüenciamento.....	43
3.2.5	Precipitação da reação de seqüenciamento.....	44
3.2.6	Eletroforese de seqüenciamento.....	45
3.2.7	Análises das seqüências e filogenias moleculares	45
4	RESULTADOS.....	47
4.1	RESULTADO EXPERIMENTO 1.....	47
4.1.1	Avaliação da sensibilidade analítica.....	47
4.1.2	Avaliação da Especificidade analítica	48
4.1.3	Avaliação da sensibilidade diagnóstica	48
4.1.3.1	Comparação entre nPCR-SH e nPCR-XIAO	49
4.2	RESULTADO EXPERIMENTO 2.....	50
4.2.1	Reações de nested PCRs actina.....	50
4.2.2	Análise Filogenética.....	50
5	DISCUSSÃO.....	53
6	CONCLUSÕES.....	56
	REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

Cryptosporidium é um gênero de protozoário cosmopolita pertencente ao filo Apicomplexa, que se caracterizam por possuírem um complexo apical, classe Esporozoasida (reprodução por ciclo assexuado e sexuado, com formação de oocisto), subclasse Coccidiasida, ordem Eucoccidida, subordem Eimeriorina, família Cryptosporidiidae (RAMIREZ; WAR; SREEVATSAN, 2004). Diversas espécies são descritas dentro deste gênero.

O protozoário, um parasito intracelular, foi primeiramente detectado e descrito em 1907 por Ernest Edward Tyzzer em mucosa gástrica de camundongo assintomático e recebeu a denominação de *Cryptosporidium muris*. Posteriormente, em 1912, o mesmo autor identificou uma nova espécie de *Cryptosporidium* em mucosa intestinal de camundongos, cujos oocistos eram menores que os de *C. muris* denominando-a *Cryptosporidium parvum* (FAYER; SPEER; DUBEY, 1997). Apenas nos anos 70, *Cryptosporidium* tornou-se de interesse veterinário, quando Pansiera, Thomassen e Game verificaram que este protozoário estava associado à diarreia em bezerros (FAYER; SPEER; DUBEY, 1997). Atualmente, se sabe que *Cryptosporidium* ocorre em diferentes animais vertebrados, como peixes, répteis, anfíbios, aves e mamíferos (DILLINGHAN; LIMA; GUERRANT, 2002).

Estudos realizados por Fayer, Morgan e Upton (2000), demonstraram que a maior prevalência de infecção em seres humanos acontece em países desenvolvidos. Dentro desta população os indivíduos sob maior risco são idosos, crianças, pessoas mal nutridas e imunocomprometidos incluindo pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e idosos. O *Cryptosporidium* pode ser responsável por 10 a 20% dos casos de diarreia em pacientes vírus da imunodeficiência humana (HIV) positivo nos países desenvolvidos e até 50 % nos países em desenvolvimento (MORGAN et al., 2000; CAREY; LEE; TREVORS, 2003). A infecção pelo HIV determina alterações imunológicas nas mucosas gastrointestinais que suprimem os mecanismos inespecíficos de defesa dos

hospedeiros, predispondo a ocorrência de inúmeras alterações do aparelho digestivo.

O maior surto de criptosporidiose já registrado em populações humanas ocorreu em Milwaukee, Wisconsin, EUA em 1993, com a transmissão do *Cryptosporidium* por via hídrica quando foram afetadas 403.000 pessoas (DILLINGHAN; LIMA; GUERRANT, 2002).

No Brasil, 2.842 casos de criptosporidiose foram detectados no período de 1980 a 1997 entre pacientes imunocomprometidos, particularmente nos portadores de HIV sendo as regiões Nordeste e Sudeste as áreas mais afetadas (LIMA; STAMFORD, 2003).

1.1 TAXONOMIA E HOSPEDEIROS

O gênero *Cryptosporidium* é formado por múltiplas espécies. Filogeneticamente, as espécies e os genótipos de *Cryptosporidium* formam dois grupos. Um dos grupos contém organismo cujo sítio primário de replicação é o epitélio intestinal, enquanto o outro contém organismos que se replicam, predominantemente, em epitélio gástrico. Cada grupo contém parasitas de mamíferos, aves e reptéis (XIAO; FAYER, 2008).

Aves podem apresentar sintomatologia respiratória ou do trato digestivo (XIAO et al., 2004). Manifestação respiratória pode aparecer de duas maneiras: uma envolvendo o sistema superior, que inclui sinusite (cabeça inchada); e outra envolvendo as vias aéreas incluindo traquéia, brônquios e sacos aéreos (SRÉTER et al., 1997).

Segundo Xiao et al. (2004) diferenças moleculares tem sido um elemento essencial para definir novas espécies de *Cryptosporidium*. Até o momento, a diversidade genética encontrada nas espécies de *Cryptosporidium* correlaciona-se bem com outras características biológicas como o espectro de hospedeiros naturais e a infectividade nos estudos de transmissão cruzada. Características genéticas

podem auxiliar no delineamento e definição do gênero *Cryptosporidium*, entretanto, é necessário distinguir diferenças interespecíes, de diversidade alélica intraespecífica e o modo como muitas ênfases podem ser colocadas em resultados de análises moleculares (Quadros 1 e 2).

Hospedeiros	Parasitas principais	Parasitas secundários
Humanos	<i>C. hominis</i> , <i>C. parvum</i>	<i>C. meleagridis</i> , <i>C. felis</i> , <i>C. canis</i> , <i>C. muris</i> , Genótipo de cervo, Genótipo de porco I.
Bovino	<i>C. parvum</i> , <i>C. andersoni</i>	Genótipo de bovino B, Genótipo de veado, <i>C. felis</i>
Ovelha	<i>C. parvum</i> , <i>C. andersoni</i>	Genótipo de bovino B, Genótipo de cervo, <i>C. andersoni</i> , <i>C. hominis</i>
Cabra	<i>C. parvum</i> , <i>C. andersoni</i>	<i>C. muris</i>
Camelo	<i>C. parvum</i> , <i>C. andersoni</i>	Genótipo de porco II
Porco	<i>C. suis</i>	<i>C. parvum</i>
Cavalo	Genótipo do cavalo	
Cão	<i>C. canis</i>	
Gato	<i>C. felis</i>	
Rato	<i>C. muris</i> , genótipo do rato	
Esquilo	<i>C. muris</i> , genótipo de esquilo	
Cervo	<i>C. ryanaea</i>	Genótipo de cervo
Gambá	Genótipo do gambá I e II	
Raposa	<i>C. canis</i> , genótipo de raposa	Genótipo de raposa II, <i>C. canis</i> , genótipo de cão
Galinha	<i>C. baileyi</i>	<i>C. meleagridis</i> , <i>C. galli</i>
Peru	<i>C. baileyi</i> , <i>C. meleagridis</i>	
Ganso e pato	Genótipo de ganso I e II	<i>C. baileyi</i> , genótipo de pato
Cobra	<i>C. serpentis</i>	<i>C. saurophilum</i> , Genótipo de cobra (w11)
Lagarto	<i>C. serpentis</i> , <i>C. saurophilum</i>	Genótipo de lagarto
Tartaruga	Genótipo de tartaruga	

Fonte: (XIAO et al., 2004)

Quadro 1 – *Cryptosporidium* spp. em seus respectivos hospedeiros

Seqüenciamento de genes e regiões não codificadoras do genoma do *Cryptosporidium* vêm sendo amplamente aplicado como ferramenta para estudos taxonômicos e de diversidade molecular. Os genes codificantes do RNA da menor unidade ribossômica (18S rDNA), gene codificador de proteína de choque térmico 70 kDa (HSP70), proteína de parede do oocisto de *Cryptosporidium* (COWP), o gene codificador de trombospondinas (TRAPC-1 e TRAPC) proteínas relacionadas com proteínas adesivas), glicoproteína 60-kDa (GP60), espaçador interno transcrito do locus ribossômico (ITS) estão entre os marcadores mais empregados para este fim (BLACK et al., 1996; BONNIN; FOURMAUX; DUBREMETZ, 1996; SPANO et al., 1997; GIBBONS; RIGI; AWAD-EL-KARIEM, 1998; XIAO et al., 2002).

O quadro 1 apresenta alguns dos diversos hospedeiros de *Cryptosporidium* e os respectivos genótipos e espécies de parasitos que mais os acometem. O quadro 2 descreve os genótipos e espécies de *Cryptosporidium* até então reconhecidos, com seus sítios primários de replicação e hospedeiros que mais acometem

Espécie	Hospedeiro	Autor
<i>C. andersoni</i>	Bovino (A)	LINDSAY et al., 2000
<i>C. bovis</i>	Bovino (ID)	FAYER et al., 2005
<i>C. canis</i>	Canino (ID)	FAYER et al., 2001
<i>C. felis</i>	Felino (ID)	ISEKi, 1979
<i>C. hominis</i>	Humanos (ID)	MORGAN-RYAN et al., 2002
<i>C. muris</i>	Roedores (E)	TYZZER, 1910
<i>C. parvum</i>	Camundongo, Bovino, Humano (ID)	TYZZER, 1912
<i>C. suis</i>	Suíno (ID, IG)	RYAN et al., 2004
<i>C. wairi</i>	Cobaio (<i>Cavia porcellus</i>) (ID)	VETTERLING et al., 1991
<i>C. serpentis</i>	Lagarto, Serpente (E)	LEVINE, 1980; BROWNSTEIN et al., 1977
<i>C. saurophilum</i>	Lagarto (E, ID)	KOUDELA & MOUDRI, 1998
<i>C. baileyi</i>	Galinha (B, C)	CURRENT et al., 1986
<i>C. Meleagridis</i>	Perú, Humano (ID)	SLAVIN, 1955
<i>C. galli</i>	Varias espécies de aves (P)	PAVLASEC, 1999; RYAN, 2003
<i>C. molnari</i>	Peixe (E)	ALVAREZ-PELLIETRO & SITJA-BOBADILHA, 2002
<i>C. ryanae</i>	Bovino (D)	FAYER et al., 2008
<i>C. macropodum</i>	Canguru gigante (<i>Macropus giganteus</i>) (D)	POWER & RYAN, 2008
<i>C. varanii</i>	Monitor esmeralda (<i>Varanus prasinus</i>) (D)	PLAVASEK et al., 1995
<i>C. fayeri</i>	Canguru vermelho (<i>Macropus rufus</i>) (D)	RYAN et al., 2008

Baseado em FAYER et al., 1997, 2000, 2001, 2004, 2006), Monis e Thompson (2003), Morgan et al., (1999), Xiao et al., (2000).

(A) Abomaso, (ID) Intestino Delgado, (E) Estômago, (IG) Intestino grosso, (B) Bursa de Fabrício, (C) Cloaca, (P) Pró-ventrículo, (D) Desconhecido.

Quadro 2 – Espécies de *Cryptosporidium* spp. descritas com base em dados fenotípicos e genotípicos e seus principais sítios de infecção

1.2 CRYPTOSPORIDIUM EM ROEDORES

Bajer et al. (2002) apontam que os roedores, classe de organismos abundantes e ubíquos, têm sido considerados reservatórios de *Cryptosporidium* para humanos e animais de produção. Estudos prévios com base apenas na morfologia de oocistos mostraram que muitos roedores silvestres podem servir como hospedeiros de *Cryptosporidium parvum-simile* e *C. muris*.

Cerca de 40 espécies de roedores pertencentes a 11 famílias (Sciuridae, Muridae, Cricetidae, Castoridae, Geomyidae, Hystriidae, Erethizontidae, Myocastoridae, cavídeos Hydrochoeridae e Chinchilidae) já foram relatadas como hospedeiros de *Cryptosporidium* spp. (FENG, 2008).

Segundo Xiao e Fayer (2008) cinco espécies de *Cryptosporidium* e cerca de 20 genótipos de *Cryptosporidium* de status incerto de espécies foram identificadas em roedores. Entre elas, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *Cryptosporidium* genótipo cervídeo, *C. muris*, *C. andersoni*, *Cryptosporidium* genótipo *chipmunk* I e *Cryptosporidium* genótipo *skunk*. Estas espécies têm sido associadas com infecção em humanos, embora as últimas quatro tenham sido responsável por apenas um ou poucos casos.

Em inquérito mais recente foram identificadas em roedores como camundongos, rato, cobaias, esquilo, *chipmunk* e *hamster*, as espécies *C. parvum*, *C. muris*, *C. andersoni*, *C. wairi*, *Cryptosporidium* genótipo furão, *Cryptosporidium* genótipo rato I e quatro novos genótipos de *Cryptosporidium* incluindo o *Cryptosporidium* genótipo *hamster*, *Cryptosporidium* esquilo genótipo III, e os genótipos II e III de ratos (CHAOCHAO et al., 2009). No Brasil foi relatado em capivara (*Hydrochoerus hydrochoeris*) um subtipo de *C. parvum* (sub-tipo IIaA15G2R1) (MEIRELES et al., 2007).

O quadro 3 resume os achados das diversas espécies e genótipos de *Cryptosporidium* em roedores.

Hospedeiro	Especie/Genótipo de <i>Cryptosporidium</i>
<i>Cavia porcellus</i> (cobaia)	<i>C. wrairi</i>
<i>Chinchilla laniger</i> (Chinchila)	Genótipo <i>chipmunk</i> III
<i>Hydrochoerus hydrochoeris</i> (Capivara)	<i>C. parvum</i> (sub-tipo IIaA15G2R1)
<i>Hystrix hodgsoni</i> (porco espinho)	<i>Cryptosporidium</i> spp
<i>Mesocricetus auratus</i> (hamster dourado)	<i>C. muris</i> , <i>C. andersoni</i> , <i>C. parvum</i>
<i>Mus musculus</i> (camundongo)	Genótipo rato I, II e III e <i>C. muris</i>
<i>Phodopus campbelli</i> (Hamster)	<i>C. muris</i> , <i>C. andersoni</i> , <i>C. parvum</i>
<i>Phodopus sungorus</i> (Hamster siberiano)	<i>C. muris</i> , <i>C. andersoni</i> , <i>C. parvum</i>
<i>Rattus norvegicus</i> (rato marrom)	Genótipo rato I e II
<i>Rattus tanezumi</i> (Rato da Ásia)	Genótipo rato I, II e III
<i>Sciurus vulgaris</i> (Esquilo vermelho)	Genótipo do furão e genótipo do gambá
<i>Tamias sibiricus</i> (Chipmunk siberiano)	<i>C. muris</i> , <i>C. parvum</i> e genótipo do furão

Fonte: ChaoCaho et al. (2009) e Ziegler et al. (2007).

Quadro 3 - Espécies e genótipos de *Cryptosporidium* spp. em diferentes espécies de roedores

1.3 CICLO DE VIDA DO *CRYPTOSPORIDIUM* SPP.

O oocisto esporulado é o único estágio exógeno deste parasito, que consiste em quatro esporozoítos móveis envolvidos por uma dupla camada de paredes dando resistência ao organismo. Os oocistos são excretados nas fezes de um hospedeiro infectado e a fase endógena começa após estes serem ingeridos por um hospedeiro susceptível. Os esporozoítos são liberados após a ruptura da parede do oocisto quando exposto as temperaturas corporais, ácido, tripsina e sais biliares. Estes estágios aderem às células epiteliais do trato gastrointestinal ou, no caso particular de algumas aves, às células do trato respiratório (FAYER; SPEER; DUBEY, 1997).

Os esporozoítos penetram nas microvilosidades das células epiteliais, formando um vacúolo parasitóforo, sendo envolvido por membranas das células hospedeiras e do próprio parasita. Os esporozoítos diferenciam-se em trofozoítos esféricos, invadem a superfície do epitélio e multiplicam-se assexuadamente. Este processo é denominado esquizogonia, resultando na formação de dois tipos de merontes, tipo I e tipo II. Os merontes tipo I liberam de seis a oito merozoítos que podem infectar células vizinhas, ocorrendo novo ciclo assexuado com formação de merontes do tipo II que contém quatro merozoítos em seu interior. Somente merozoítos de merontes tipo II iniciam o ciclo sexuado, diferenciando-se em microgametócitos e macrogametócitos.

A divisão nuclear no microgametócitos leva a formação de numerosos microgametas os quais são liberados do vacúolo parasitóforo e cada macrogametócito é fertilizado por um microgameta. O produto da fertilização é um zigoto, que se desenvolve dentro de um oocisto, sofrendo meiose e originando quatro esporozoítos. Os oocistos são liberados no lúmen do intestino e excretados nas fezes podendo infectar outro hospedeiro susceptível, reiniciando o ciclo e/ou causar autoinfecção no mesmo hospedeiro infectado (SMITH; ROSE, 1998).

A cada geração o parasita pode se desenvolver e maturar em 12 a 14 horas, sendo que o período entre a ingestão dos oocistos e sua excreção nas fezes pode variar de hospedeiro para hospedeiro, assim como entre as diferentes espécies de *Cryptosporidium* (CAREY; LEE; TREVORS, 2004).

1.4 TRANSMISSÃO E SINTOMAS CLÍNICOS

O estágio infectante do *Cryptosporidium* é o oocisto, eliminado nas fezes do indivíduo infectado. Os oocistos apresentam três características que contribuem para sobrevivência e dispersão no organismo. Primeiro, os oocistos são imediatamente infectantes para o próximo hospedeiro quando eliminado nas fezes (FAYER; SPEER; DUBEY, 1997), caracterizando a transmissão fecal-oral. Segundo, os oocistos são bastante resistentes no meio ambiente e podem manter-se infectantes por vários meses dependendo das condições apropriadas (SMITH;

ROSE, 1998). Finalmente, os oocistos apresentam um tamanho pequeno (4 a 6 μm de diâmetro) e resistem à desinfecção com níveis normais de cloro utilizados em água tratada para plantas e sistemas de distribuição, conseqüentemente seguem para infecção em água de bebida (SMITH; ROSE, 1998). Oocistos de *Cryptosporidium* spp. resistem aos mais variados métodos usados em tratamentos de água (KORISH; MEAD; MADORE, 1990), seja cloração, ozonização, ou filtração.

A transmissão através do ambiente tem aumentado, especialmente com ocorrência de surtos de criptosporidiose de veiculação hídrica resultante da poluição ambiental com dejetos de origem humana e animal, pois os oocistos de *Cryptosporidium* são eliminados em grande quantidade pelos humanos e bovinos infectados, podendo chegar 10^{10} oocistos por grama de fezes (TZIPORI; WARD, 2002).

Segundo Fayer, Speer e Dubey (1997), alguns fatores biológicos e características próprias do *Cryptosporidium* facilitam a transmissão da doença através da água, pois a ausência de um tratamento específico e o alto número de oocisto excretado por hospedeiros infectados, assim como a ampla variedade de hospedeiros que atuam como reservatórios da infecção aumentam o potencial de disseminação da criptosporidiose.

A patogenia do *Cryptosporidium* está relacionada com inflamação e atrofia das vilosidades, devido à destruição dos enterócitos e hiperplasia das células da cripta intestinal com subsequente má-absorção. Em altos graus de inflamação o nível de eliminação oocistos também é alto (GUERRANT et al., 1999). A presença do parasito no trato digestivo provoca diarreia que pode ser branda ou severa, causando desidratação, anorexia, letargia e em infecção severa, morte por desidratação e colapso cardiovascular (OLSON et al., 2004).

Em humanos a criptosporidiose, têm o potencial de atingir indivíduos de todas as idades, desde três dias de vida até pacientes de 95 anos de idade. Os sintomas clínicos se caracterizam pela diarreia aquosa e abundante, com coloração esverdeada ou incolor, sem muco ou sangue, dor abdominal e náusea, vômito, dor de cabeça, febre baixa, dores musculares, indisposição, fraqueza tanto em indivíduos imunocomprometidos como em imunocompetentes (RAMIREZ; WAR; SREEVATSANS, 2004).

De acordo com Widmer (2004), um único oocisto é suficiente para produzir infecção em hospedeiros suscetíveis. Em estudos realizados com voluntários sadios a dose média de infecção foi de 132 oocistos, mas apenas 30 oocistos podem desencadear a infecção (FAYER et al., 2000).

A manifestação clínica da infecção ocorrerá de acordo com a carga parasitária, com a idade do indivíduo, estado imunológico, nutricional, podendo a infecção variar desde assintomática até sintomática grave (UNGAR, 1995).

A virulência do *Cryptosporidium* é dependente da espécie envolvida. Por exemplo, enquanto as espécies *C. hominis* e *C. parvum* são classificadas como organismos de alta virulência, *C. meleagridis* e *C. muris* são organismos de baixa virulência e *C. canis* e *C. felis* ainda não possuem virulência conhecida (EGYED et al., 2003). Observa-se que patógenos especialistas como o *C. hominis* têm menor diversidade genética e são geralmente mais virulentos do que os patógenos generalistas como o *C. parvum* (HUNTER et al., 2005).

Em indivíduos imunocompetentes a doença é autolimitada, com duração de 7 a 14 dias, enquanto em imunocomprometidos, principalmente em indivíduos com AIDS. Nestes a infecção é crônica e com sintomas graves com intensa perda hídrica. Em alguns casos relata-se a criptosporidiose respiratória, como tosse persistente e dispnéia (FRANCO; ROCHA-EBERHARDT; CANTUSIO, 2001).

1.5 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA DETECÇÃO DE *CRYPTOSPORIDIUM*

A investigação laboratorial da criptosporidiose é realizada pela pesquisa de oocistos nas fezes ou em outros substratos biológicos, como aspirados duodenal ou jejunais, escarros e lavado bronco-alveolar, utilizando-se métodos de concentração e coloração especial, como os procedimentos álcool - ácido resistentes (XIAO et al., 2004).

A concentração dos oocistos é obtida com técnicas baseadas em princípios de centrífugo-flutuação. Para facilitar a visualização dos oocistos, podem ser utilizadas técnicas de coloração de *Ziehl-Neelsen* e *Kinyoun*, porém, os oocistos de

Cryptosporidium estão entre menores estágios exógenos dos apicomplexas e algumas diferenças morfológicas não são visíveis por microscopia óptica (MORGAN et al., 1999).

A detecção de *Cryptosporidium* spp., também, pode ser realizada por identificação sorológica, empregando teste policlonal de anticorpo fluorescente (STIBBS; ONGERTH, 1986), imunofluorescência com anticorpos monoclonais (XIAO et al., 1993; CHAN et al., 2000) e ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*).

Caracterização molecular é um dos critérios empregados para a nomeação de novas espécies de *Cryptosporidium* (MORGAN et al., 1999). Diferenças desta natureza só são possíveis de serem identificadas com métodos laboratoriais, entre os quais a reação em cadeia pela polimerase (PCR), associadas a métodos de identificação de variabilidade genotípica como a RFLP ou o sequenciamento automático de ácidos nucleicos. A especificidade e sensibilidade destes métodos os tornam uma ferramenta útil para detecção e caracterização de grande variedade de patógenos (MONIS; THOMPSON, 2003). Com efeito, o emprego destas ferramentas de epidemiologia molecular vem trazendo significativa mudança na compreensão da transmissão zoonótica do parasita (XIAO; FAYER, 2008).

A detecção e identificação de *Cryptosporidium* spp. vem sendo feita por métodos moleculares empregando-se diversas sequências gênicas do parasito como alvo. Entre estes alvos destacam-se a região codificadora do RNA da menor unidade ribossômica (18S rDNA) (BLACK et al., 1996; MORGAN et al., 2000; XIAO et al., 2000; FAYER et al., 2001), o espaçador interno transcrito (ITS) do locus ribossômico, o gene codificador de Acetil-CoA (BLACK et al., 1996), o gene codificador de proteína de parede de oocisto (COWP) (SPANIO et al., 1997), o gene codificador de produtos para a síntese de dihidrofolato timidilato-redutase (GIBBOS; RIGI; AWA-EL-KARIEM, 1998), o gene codificador de proteína de choque térmico 70 kDa (HSP70), o gene da Tomboespondina relacionada com aderência de proteínas, o gene codificador de actina e fragmentos de genoma não identificados (BONNIN; FOURMAUX; DUBREMETZ, 1996).

2 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

Como mencionado antes, técnicas moleculares têm grande aplicabilidade para estudos de diferenciação de espécies de *Cryptosporidium*. Porém, uma das maiores desvantagens da PCR para a detecção e identificação de *Cryptosporidium* spp. diz respeito aos efeitos deletérios de inibidores de polimerização que podem interferir negativamente no sucesso da PCR e, conseqüentemente, em sua sensibilidade, particularmente no caso de amostras fecais.

Assim, a otimização de técnicas moleculares com vistas a diminuir o efeito da inibição de polimerização é uma iniciativa importante. Nesse sentido, o trabalho a seguir teve como proposta atender as necessidades diagnósticas desenvolvendo novos *primers* baseados em seqüências codificadoras de 18S rDNA, mas que foram direcionados a domínios distintos daqueles dos *primers* correntemente utilizados por vários outros autores.

O desenvolvimento dos novos *primers* visou amplificar, seletivamente, uma região polimórfica de 18S rDNA, cujas diferenças de nucleotídeos permitam identificar as espécies e genótipos até então conhecidos de *Cryptosporidium* spp. A vantagem deste procedimento está em amplificar um fragmento menor que aqueles correntemente produzidos com *primers* desenhados por outros autores, de forma a gerar uma *nested-PCR* potencialmente mais sensível. Atualmente, a *nested-PCR* baseada em 18S rDNA mais empregada em todo o mundo prevê uma amplificação primária de um fragmento de cerca de 1000 pares de nucleotídeos e uma amplificação secundária de cerca de 800 pares de bases. Com esta proposta, padronizou-se uma reação cujo produto final é cerca de 30 % menor, mas com a mesma capacidade de discriminação entre as diferentes espécies e genótipos conhecidos de *Cryptosporidium* spp.

Até o momento não se tem registro no país sobre a caracterização molecular de *Cryptosporidium* em infecções naturais de roedores em especial as espécies sinantrópicas como *Mus musculus* e *Ratus rattus*. Assim, este trabalho teve como fulcro também avaliar a *nested-PCR* padronizada usando amostras de roedores

como modelo, tanto em relação a seus atributos diagnósticos quanto em relação a identificação molecular e registro das amostras detectadas.

Então, os objetivos propostos neste trabalho resumem-se a dois tópicos, tratados em diferentes capítulos, a saber:

- Desenhar *primers* específicos para o gene 18S rDNA, potencialmente, capazes de amplificar qualquer espécie ou genótipo de *Cryptosporidium* spp. e avaliar os atributos diagnósticos da *nested*-PCR baseadas em tais sondas.
- Caracterizar, molecularmente, amostras de *Cryptosporidium* spp. isoladas de roedores sinantrópicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais e a metodologia utilizada neste trabalho estão descritos nos itens a seguir. Como os dois objetivos propostos embora relacionados tenham metodologias distintas, optou-se por apresentar esta seção em duas partes para cada um dos objetivos propostos.

3.1 EXPERIMENTO 1: PADRONIZAÇÃO DA *NESTED*-PCR DIRECIONADA A 18S rDNA

Nesta seção será apresentado o delineamento experimental para padronização da nPCR direcionada para o gene 18S rDNA.

3.1.1 Delineamento experimental

3.1.1.1 *Primers*

Os procedimentos relacionados à amplificação de um segmento do gene 18S rDNA foram estabelecidos utilizando o *primer* SSU-R3 preconizado por XIAO et. al. (1999) associado a um conjunto de novos *primers* desenvolvidos neste trabalho, os *primers* SHP1, SHP2 e SHP3. A sequência e a posição dos *primers* empregados na reação de amplificação estão descritas no quadro 4.

Primers		Sequência 5' – 3'	Posição no gene *	Tamanho do fragmento pb
PCR	SHP1	ACCTATAGCTTTAGACGGTAGGGT AT	311-337	~ 781
	SHP2	TTCTCATAAGGTGCTGAAGGAGTAAGG	1061-1092	
Nested PCR	SHP3	ACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACA	456-482	~ 620
	SSU-R3	AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA	1050-1076	

*baseada na sequência *C. felis* (GenBank AF108862).

pb – pares de base.

Quadro 4 - Relação de *primers* utilizados para amplificação de seqüências parciais do gene codificador da subunidade menor do rRNA (SSU rRNA) 18S de *Cryptosporidium* spp.

3.1.1.2 Avaliação da Sensibilidade Analítica

Foram realizadas diluições seriadas na base 10 (10^3 a 10^{-2} oocistos/mL) dos oocistos purificados de *Cryptosporidium parvum* de acordo com item (3.1.2.2) em tampão TE (10 mM Tris-HCl pH8,0; 1 mM EDTA pH 8,0). As diluições foram submetidas à extração de DNA (item 3.1.2.3) e amplificações por duas *nested*-PCRs (nPCR). A primeira baseada no oligonucleotídeos desenhados no presente trabalho (nPCR-SH) (item 3.1.2.5) e a segunda baseada em *primers* descritos por Xiao et al. 1999 (nPCR-XIAO) (item 3.1.2.5).

3.1.1.3 Avaliação da especificidade analítica

Avaliou-se o desempenho da nPCR-SH com as seguintes espécies: *Cryptosporidium andersoni*, *C. canis*, *C. parvum*, *C. serpentis*, *C. baileyi*, *C. galli*, *C. felis* e *C. hominis*. Os oocistos destas espécies tiveram o DNA extraído conforme o item 3.1.2.3.

3.1.1.4 Avaliação da sensibilidade diagnóstica

As duas nPCRs, nPCR-SH e nPCR-XIAO foram aplicadas em 45 amostras fecais de roedores (Quadro 5) cedidas pelo Dr. Aristeu Vieira da Silva, da Universidade Paranaense - UNIPAR. Estas amostras foram submetidas ao método de extração de DNA descrito no item 3.1.2.3.

Amostra	Espécie	Amostra	Espécie
1	<i>Mus musculus</i>	24	<i>Mus musculus</i>
2	<i>Mus musculus</i>	25	<i>Mus musculus</i>
3	<i>Mus musculus</i>	26	<i>Mus musculus</i>
4	<i>Mus musculus</i>	27	<i>Mus musculus</i>
5	<i>Rattus rattus</i>	28	<i>Mus musculus</i>
6	<i>Mus musculus</i>	29	<i>Rattus rattus</i>
7	<i>Rattus rattus</i>	30	<i>Rattus rattus</i>
8	<i>Rattus rattus</i>	31	<i>Rattus rattus</i>
9	<i>Rattus rattus</i>	32	<i>Rattus rattus</i>
10	<i>Rattus rattus</i>	33	<i>Rattus rattus</i>
11	<i>Rattus rattus</i>	34	<i>Rattus rattus</i>
12	<i>Rattus rattus</i>	35	<i>Rattus rattus</i>
13	<i>Rattus rattus</i>	36	<i>Mus musculus</i>
14	<i>Rattus rattus</i>	37	<i>Rattus rattus</i>
15	<i>Rattus rattus</i>	38	<i>Mus musculus</i>
16	<i>Mus musculus</i>	39	<i>Rattus rattus</i>
17	<i>Rattus rattus</i>	40	<i>Mus musculus</i>
18	<i>Rattus rattus</i>	41	<i>Rattus rattus</i>
19	<i>Mus musculus</i>	42	<i>Rattus rattus</i>
20	<i>Mus musculus</i>	43	<i>Rattus rattus</i>
21	<i>Mus musculus</i>	44	<i>Rattus rattus</i>
22	<i>Mus musculus</i>	45	<i>Rattus rattus</i>
23	<i>Mus musculus</i>		

Quadro 5 - Espécies de roedores utilizadas para avaliar a sensibilidade diagnóstica de duas nPCRs, utilizando os pares de primers denominados nPCR-SH e nPCR-XIAO

3.1.2 Métodos Laboratoriais

Nesta seção foram desenvolvidas técnicas para avaliação da sensibilidade analítica dos primers desenhados no presente trabalho.

3.1.2.1 Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. método *Sheather* modificado

Oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram obtidos a partir de amostras fecais de bovinos, detectados durante a rotina do Laboratório de doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (USP).

As amostras fecais foram submetidas ao exame de centrifugo-flutuação em sacarose (OGASSAWARA; BENASSI, 1980) que consistiu na diluição de aproximadamente 2 mL de fezes em 11 mL de solução de sacarose ($d=1,203 \text{ gcm}^3$), filtração em uma camada de gaze e centrifugação em tubos cônicos a 1.500 rpm por 10 minutos. Em seguida, uma alíquota da película superficial foi recuperada com auxílio de uma alça bacteriológica e disposta em lâmina. Cobriu-se a preparação com uma lamínula (1x1 cm) para observação em microscópio óptico (aumento de 400 x) e avaliação da quantidade de oocistos.

3.1.2.2 Purificação de oocistos de *Cryptosporidium*

A amostra fecal que apresentou previamente a maior quantidade de oocistos pelo exame microscópico (item 3.1.2.1) foi submetida à purificação e concentração de oocistos de acordo com método descrito por Brien e Jenkins (2007) modificado, conforme descrito a seguir;

- Peneirou-se 50 g de fezes em tamises de 0,5 mm, 150 μ m e 45 μ m, sendo diluídas ao poucos com 350 mL de água destilada.
- Fracionou-se a suspensão em oito tubos cônicos de 50 mL.
- Centrifugou-se a 1.500 g por 15 minutos a 4°C.
- Descartou-se o sobrenadante com pipeta Pasteur, o restante foi homogeneizado.
- Suspensão foi diluída (1:4) em NaCl (360 g/L, $d=1,21 \text{ g/cm}^3$) e centrifugada a 720 g por 20 minutos.
- As amostras ficaram 10 minutos em repouso e aproximadamente 20 mL do sobrenadante foram transferidos para outro tubo de 50 mL.
- Suspensão foi diluída em 1:4 com água destilada e centrifugada a 1.500 g por 20 minutos.
- Descartou-se sobrenadante e o mesmo foi diluído com volume final de 40 mL e 8 mL de éter.
- Centrifugou-se a 1.200 g por 10 minutos.
- Observou-se a formação de três camadas: a superior contendo o solvente, a intermediária com debris fecais e a camada aquosa inferior. As três camadas foram descartadas com pipeta Pasteur.
- O sedimento contendo oocistos foi lavado três vezes com 50 mL de água destilada e centrifugações a 1.200 g por 10 minutos.
- As suspensões restantes foram transferidas para único tubo de 15 mL.

A estimativa da quantidade de oocistos presentes na amostra purificada foi realizada com auxílio de uma câmara de Neubauer. Foram realizadas cinco contagens de oocistos, sendo que se considerou a média dos valores obtidos.

3.1.2.3 Extração de DNA de oocistos purificados

As amostras de oocistos foram homogeneizadas com 500 µL de 10 mM Tris HCl 1 M (pH 8,0); 25 mM EDTA 0,5 M (pH 8,0); 100 mM NaCl 5 M e 1 % SDS (Dodecil Sulfato de Sódio); 400 µL de H₂O ultrapura, e submetidas ao choque térmico. Este procedimento consiste na ruptura dos oocistos, portanto foram realizados cinco ciclos de congelamento em gelo seco por 5 minutos e descongelamento em banho-seco a 65 °C por 10 minutos. Ao final, adicionou-se 10 µL de proteinase K (20 mg/mL) com incubação a 37 °C por 24 h, a 1.000 rpm com agitação de 15 s a cada 5 minutos. Após a incubação foram adicionados 250 µL de fenol e 250 µL de clorofórmio as amostras, que foram então homogeneizadas e centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos à 4°C. Foram retirados 400 µL de sobrenadante e transferidos a outro microtubo, no qual foram adicionados 400 µL de propanol absoluto. Após a homogeneização, as amostras foram mantidas a -20 °C por 2 horas. Em seguida, foi realizada a centrifugação a 12.000 g por 30 minutos a 4 °C. Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi suspenso em 1 mL de etanol 70 %. Uma nova centrifugação foi realizada a 12.000 g por 30 minutos a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e os microtubos foram deixados em posição invertida por 10 minutos e depois colocados em banho-seco a 56 °C até a secagem completa. As amostras foram homogeneizadas com 30 µL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) e incubadas em banho-seco a 56 °C por 20 minutos. Após a homogeneização, as amostras foram armazenadas a -20 °C até o momento de amplificação.

3.1.2.4 Amostras fecais de roedores

Foram 45 empregadas amostras de suspensão de fezes de roedores diluídas em água destilada na proporção de uma parte de material fecal e nove partes de água. Os roedores foram capturados em áreas públicas da região urbana da cidade de Umuarama, Paraná. A descrição dos roedores amostrados encontra-se no quadro 5.

3.1.2.5 Reação em cadeia pela polimerase

Para nPCR-SH foi utilizada a seguinte reação primária: preparação de 25 μ L de solução contendo 2 μ L da solução de DNA, preparada anteriormente, 2,5 μ L de solução tampão para PCR (20 mM de Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM de KCl), 200 μ M de dNTP (0,25 mM de cada base), 0,75 μ L de $MgCl_2$, 0,625 μ L de cada *primer* (10 pmol) (Quadro 4), 1,25 unidade da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, Cat # 18038-42) e de água ultra pura autoclavada.

As condições utilizadas na amplificação primária foram: 94 °C por 3 minutos, 39 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 56 °C por 45 segundos e 72 °C por 60 segundos, seguidos de uma extensão final de 72 °C por sete minutos.

A amplificação secundária foi realizada nas mesmas condições da primária, utilizando o par de *primers* SHP3 - SSU-R3 (1,25 μ L de cada *Primer* 10 pmol) e 2,0 μ L do produto da primeira amplificação.

Para nPCR-XIAO (Quadro 6) foi utilizada a reação primária: para um volume final contendo 50 μ L de solução e 5 μ L de DNA, 5 μ L de solução tampão para PCR (20 mM de Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM de KCl), 200 μ M de dNTP (0,25 mM de cada base), 2,0 μ L de $MgCl_2$, 1,25 μ L (10 pmol) de cada *primer* da reação primária (Quadro 6), 1,25 unidade da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, Cat # 18038-42) e água ultra pura autoclavada.

	Primers	Sequências 5'- 3'	Tamanhos dos fragmentos (pb)	Referências
PCR	SSU-F2	TTCTAGAGCTAATACATGCG	~1300	Xiao et al. (1999)
	SSU-R2	CCCATTTCCTTCGAAACAGGA		Xiao et al. (2000)
Nested PCR	SSU-F3	GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG	~800	Xiao et al. (1999)
	SSU-R3	AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA		Xiao et al. (1999)

pb – pares de base

Quadro 6 - Sequências dos *primers* preconizados por Xiao et al. (1999 e 2000)

As condições utilizadas na amplificação pela PCR foram de 94 °C por 3 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 55 °C por 45 segundos e 72 °C por 60 segundos, seguidos de uma extensão final de 72 °C por 7 minutos.

A *nested* PCR foi realizada nas mesmas condições da PCR, mas com emprego do par *primers* (Quadro 6) e 5 µL do produto da primeira amplificação.

A comparação desempenho das reações moleculares entre nPCR-SH e nPCR-XIAO foi realizada aplicando-se o teste de concordância Kappa de acordo com a função sugerida por Thrusfield (2004), no programa Minitab.

3.2 EXPERIMENTO 2: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AMOSTRAS DE *CRYPTOSPORIDIUM* DE ROEDORES

No intuito de avaliar de avaliar amostras de roedores para obtenção de *Cryptosporidium* spp. foram desenvolvidas atividades destinadas à obtenção e preparação das amostras fecais, bem como os procedimentos relacionados às reações moleculares para análise das amostras.

3.2.1 Reação de *nested* PCR para amplificação do fragmento do gene da actina

As amostras de DNA de *Cryptosporidium* spp. obtidas de roedores que apresentaram-se positivas pelas nPCR-SH e/ou nPCR-XIAO foram submetidas a nPCR direcionada ao gene da actina demonstrada no quadro 7.

	Seqüências dos Primers 5'-3'	Tamanho do fragmento pb
PCR	ATGRGWGAAGAAGWARYWCAAGC AGAARCAYTTTCTGTGKACAAT CAAGCWTTTRGTTGTTGAYAA	~1095
<i>nested</i> PCR	TTTCTGTGKACAATWSWTGG	~1066

pb – pares de base

Quadro 7 - *Primers* para amplificação do gene codificador de actina (SULAIMAN et al., 2002)

As seguintes condições de reação foram empregadas: preparação de 25 µL de solução contendo 2,5 µL de tampão para PCR 10x, 3,0 mM MgCl₂, 1 unidades de Taq DNA polimerase, 200 µM de cada dNTP (desoxiribonucleotídeo 0,25 mM de cada base), 200 nM de cada par de *primer* (Quadro 7), 5 µL de DNA alvo na reação primária e 2,5 µL de DNA amplificado na reação secundária.

As amostras foram submetidas à desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos, cada um consistindo em desnaturação a 94 °C por 45 segundos, hibridização a 45 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 60 segundos, com extensão final a 72 °C por 10 minutos.

3.2.2 Análise dos produtos amplificados

Os fragmentos amplificados pelas provas moleculares mais o marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases (GeneRuler™ 100 pb DNA ladder) foram analisados através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 2 % em cuba horizontal imerso em tampão Tris-Borato-EDTA (0,045 M Tris-Borato, 0,5 M EDTA), em voltagem de 1-10 V/cm de gel).

Para cada poço no gel foi alíquotadas 10 µL de amplificado mistura a 2 µL de corante por amostra (30 % de glicerol; 0,25 g de azul de bromofenol). Após a corrida eletroforética o gel foi imerso numa solução de brometo de etídeo a 0,5 µg/mL durante 15 minutos e em seguida observado em transluminador ultravioleta para visualização dos produtos amplificados.

3.2.3 Purificação das amostras amplificadas para seqüenciamento

Os produtos amplificados foram purificados com auxílio do Kit Spin-X (Corning Life Sciences, Pittston cat# 8160) conforme instruções do fabricante.

3.2.4 Reação de sequenciamento

As amostras purificadas foram submetidas à reação de sequenciamento automático onde foi utilizado o Kit comercial *ABI Prism BigDye TM terminador - Cycle sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems, CA, USA). As quantidades de reagentes foram determinadas a partir da concentração das amostras de DNA

purificado. Para uma reação de 10 μL de volume final, foram utilizados 0,5 μL de primer (10 pM), 2 μL de BigDye terminator v.3.1, 2 μL de *Tampão Save Money* 5x (200 mM de Tris, 5 mM de MgCl_2 ; pH 9,0) e 24 ng de DNA purificada.

Cada produto de *nested* PCR foi sequenciado pelo menos com quatro réplicas, sendo duas com o *primer* senso e duas com o anti-senso, para aumentar a confiabilidade dos resultados. Em amostras com concentrações de DNA abaixo de 4 ng/ μL , o volume final da reação foi dobrado, assim como as concentrações dos reagentes, exceto a do *primer* utilizado.

O ciclo de sequenciamento foi efetuado no Termociclador Mastercycler Gradient Eppendorf com o seguinte ciclo:

Desnaturação inicial de: 96 $^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto, seguida de 39 ciclos de 96 $^{\circ}\text{C}$ por 15 segundos, 50 $^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos 60 $^{\circ}\text{C}$ por 4 minutos. Em seguida, as amostras foram mantidas a 4 $^{\circ}\text{C}$ até a precipitação.

3.2.5 Precipitação da reação de seqüenciamento

Os produtos da reação sequenciamento foram purificados por precipitação com EDTA-ETANOL conforme descrito seguir:

- Adicionou-se 5 μL de EDTA 125 mM e 60 μL etanol 100 %.
- Homogeneizou-se.
- Incubou-se em temperatura ambiente por 30 minutos.
- Centrifugou-se em 14.000 x g por 30 minutos 12 $^{\circ}\text{C}$.
- Descartou-se o sobrenadante por inversão.
- Adicionou-se 60 μL etanol absoluto.
- Centrifugou-se 14.000 x g por 30 minutos 12 $^{\circ}\text{C}$.
- Descartou-se sobrenadante por inversão

- O sedimento foi mantido à 95°C por 5 minutos num termobloco.

A reação precipitada foi armazenada a -20°C até a eletroforese de seqüenciamento.

3.2.6 Eletroforese de sequenciamento

As amostras foram homogeneizadas com formamida e Blue Dextran-EDTA (Applied Biosystems, USA) na proporção de 5:1 e colocadas em banho-seco por dois minutos a 95 °C para desnaturação e em gelo por dois minutos. Posteriormente, foram submetidas à eletroforese em seqüenciador automático modelos ABI Prism 377 DNA Sequences (Applied Biosystems, CA, USA).

3.2.7 Análises das seqüências e filogenias moleculares

As seqüências geradas no seqüenciador foram editadas com auxílio do programa Codoncode Aligner v. 1.5.2. (CodonCode Corp. Dedham, MA, USA) para a montagem final de cada seqüência.

Após a obtenção das seqüências de nucleotídeos dos fragmentos amplificados, as mesmas foram alinhadas manualmente com o auxílio dos programas ClustalW (THOMPSON et al., 1997) e BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999), sendo comparadas com seqüências homólogas disponíveis no GenBank ([HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)). As seqüências obtidas foram também submetidas à busca BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), para comparação de identidade.

A reconstrução filogenética das espécies e genótipos de *Cryptosporidium* foi inferida a partir da matriz de alinhamento por método de distância *Neighbor-Joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos

Kimura dois parâmetros. Árvores foram construídas com auxílio do programa MEGA, versão 4.

4 RESULTADOS

Nesse tópico serão descritos os resultados obtidos neste estudo.

4.1 RESULTADO EXPERIMENTO 1

Nesse tópico serão descritos os resultados obtidos no experimento 1.

4.1.1 Avaliação da sensibilidade analítica

A nPCR-SH apresentou uma sensibilidade analítica superior a nPCR-XIAO. A primeira nPCR foi capaz de detectar até 10^{-1} oocistos/mL, enquanto que a segunda só detectou oocistos em concentrações (igual ou acima de 10 oocistos/mL), conforme pode ser observado na (Figura 1).

Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos amplificados por *nested* PCR-SH e PCR-XIAO. Os valores são referentes ao número estimado de oocisto na amostra de *Cryptosporidium parvum*. L: peso molecular múltiplos de 100 pares de bases

4.1.2 Avaliação da Especificidade analítica

As espécies *C. andersoni*, *C. Canis*, *C. hominis*, *C. serpentis*, *C. baileyi*, *C. galli*, *C. parvum* e *C. felis* foram utilizadas para verificar a especificidade analítica da reação de amplificação com o par de *primers* nPCR-SH e apresentaram resultados positivos como demonstra na figura 2.

Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos nPCR-SH, resultante da amplificação de DNA das espécies: 1) *C. andersoni*; 2) *C. canis*; 3) *C. hominis*; 4) *C. serpentis*; 5) *C. baileyi*; 6) Controle negativo; 7) *C. galli*, 8) *C. parvum*; 9) *C. felis*. L: peso molecular múltiplos de 100 pares de base

4.1.3 Avaliação da sensibilidade diagnóstica

Para avaliar a sensibilidade dos primers testados (nPCR-SH e nPCR-XIAO), 45 amostras fecais de roedores foram testadas. A reação que utilizou o par de *primers* nPCR-SH resultou em 35,5 % (16/45) de amostras positivas, enquanto que utilizando o par de primers nPCR-XIAO, detectou 13,3 % (6/45) de amostras positivas.

4.1.3.1 Comparação entre nPCR-SH e nPCR-XIAO

O teste de Kappa foi utilizado para avaliar a concordância global entre a nPCR-SH e nPCR-XIAO, resultando em um valor de 0,436 indicando concordância moderada (Tabela 1).

Tabela 1 - Comparação dos resultados das amostras testadas pelas amplificações nPCR-SH e nPCR-XIAO

		nPCR-SH		
		Positivo	Negativo	Total
nPCR-XIAO	Positivo	6	0	6
	Negativo	10	29	39
	Total	16	29	45

4.2 RESULTADO EXPERIMENTO 2

Nesse tópico serão descritos os resultados obtidos no experimento 2.

4.2.1 Reações de nested PCRs actina

As amostras positivas pelas nPCR-SH e nPCR-XIAO foram submetidas a PCR com *primers* direcionados ao gene codificador da actina (nPCR-Actina) com resultados positivos em apenas cinco amostras (Quadro 8).

Amostras	nPCR-SH	nPCR-XIAO	nPCR-Actina
15	P	N	P
19	P	N	N
20	P	N	N
21	P	N	N
22	P	P	N
23	P	P	P
27	P	N	P
28	P	P	N
32	P	N	N
33	P	N	P
34	P	N	N
35	P	P	P
36	P	N	N
37	P	P	N
42	P	N	N
43	P	P	N

(P) positivo; (N) negativo

Quadro 8- Amplificações em nested PCR para os genes da subunidade do 18S rDNA e da actina

4.2.2 Análise Filogenética

Os produtos de amplificação gerados pela nPCR-SH a partir das amostras 37, 42 e 43 sendo todas da espécie *Rattus rattus* foram submetidos ao sítio de busca por similaridade BLAST que gerou resultados com 100 % de identidade com sequência de *C. muris*.

Os produtos gerados a partir da amostra 23 apresentaram, após busca pelo BLAST, resultados de 99 % de identidade contra a amostra *Cryptosporidium* sp. rat genotype II (GQ121025), enquanto todas as demais amostras apresentaram 99 % de identidade com *Cryptosporidium* sp. rat genotype III (GQ121026) como demonstra a figura 3. As seqüências derivadas das amostras 15, 19, 20, 21, 22, 27, 28, 32, 33, 34, 35 e 36 foram idênticas entre si. As diferenças entre a seqüência 23 em relação à *Cryptosporidium* sp. rat genotype II resumem-se a uma substituição G-A e um *indel* TT. De maneira similar, as seqüências similares a de *Cryptosporidium* sp. rat genotype III diferem desta em uma substituição C-T e dois indels TT.

Figura 3 - Reconstrução filogenética de *Cryptosporidium* spp. com 9 táxons, inferida por método *Neighbor joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos Kimura dois parâmetros e 482 nucleotídeos do gene codificador de 18SrRNA. Árvore enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4

Todas as seqüências geradas a partir da nPCR-Actina foram idênticas entre si e com 88,9 % de identidade com seqüências de *C. canis*. Tanto a seqüência oriunda da amostra 23 (similar a genótipo II de rato) e as demais amostras representadas pela A35(similares a genótipo III de rato) foram idênticas entre si pelo gene da actina. A filogenia molecular com dados de genes codificadores de actina é mostrada na figura 4.

Figura 4 - Reconstrução filogenética de *Cryptosporidium* spp. com 19 táxons, inferida por método *Neighbor joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos Kimura dois parâmetros e 493 nucleotídeos do gene codificador de actina. Árvore enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi avaliado o desempenho de *nested*-PCR baseada em *primers* direcionados a região codificadora de 18S rDNA para a detecção de DNA de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em fezes de roedores, bem como foram utilizados os produtos gerados pela *nested*-PCR para identificação molecular dos mesmos.

Métodos para detecção e identificação molecular de *Cryptosporidium* spp. direcionados ao gene codificador de 18S rDNA vêm sendo amplamente empregados por diversos autores para diagnóstico deste parasito em muitas espécies de hospedeiro (BLACK et al., 1996; MORGAN et al., 2000; XIAO et al., 2000; FAYER et al., 2001; MORGAN-RYAN et al., 2002). As seqüências codificadoras de 18S rDNA são consideradas marcadores evolutivos com poder de resolução para resolução de questões filogenéticas para diversos níveis taxonômicos de organismos, incluindo o gênero *Cryptosporidium* (XIAO; FAYER, 2008). Neste gênero, o alinhamento entre seqüências homólogas de 18S rDNA caracterizam-se por intercalações de regiões conservadas e polimórficas ao longo dos seus de 1700 pares de bases. Uma destas regiões (650-750 pares de bases) cujo polimorfismo permite a discriminação entre as diversas espécies reconhecidas entre o gênero *Cryptosporidium* (SEVÁ, 2009) é a que foi empregada como alvo para a *nested*-PCR descrita no presente trabalho.

Nesse sentido, buscou-se desenhar *primers* que intercalassem esta região polimórfica, mas que fossem ancorados em regiões de alta similaridade entre as diversas espécies e genótipos de *Cryptosporidium* conhecidos até o momento e cujas seqüências de 18S rDNA estivessem disponíveis no GenBank.

O desempenho da nPCR-SH, a *nested*-PCR que foi desenvolvida neste trabalho foi superior, em termos de sensibilidade analítica a nPCR-XIAO, esta última uma das mais empregadas para detecção e identificação de *Cryptosporidium* spp. por autores no mundo todo (XIAO et al., 1999; LIMOR; LAL; XIAO, 2002). Pelos resultados, este incremento de sensibilidade analítica permitiu a amplificação de material nucléico a partir de amostras de oocistos com diluição até 100 vezes superior a ultima diluição em que a nPCR-XIAO gerou sinal positivo.

A superioridade da nPCR-SH em relação a nPCR-XIAO em termos analíticos foi acompanhada pela superioridade em termos diagnósticos, visto que a primeira reação detectou DNA de *Cryptosporidium* spp em 16 amostras de campo dentre 45 amostras testadas, enquanto somente seis amostras foram detectadas pela nPCR-XIAO.

Esta diferença de sensibilidade provavelmente deve ser devido à diferença de dimensões de produtos gerados pelas duas PCRs, cerca de 620 pares de pares para a n-PCR-SH e de 800 pares de bases para a n-PCR-XIAO. É sabido que o desempenho de uma PCR é tanto melhor quanto menor for o produto amplificado.

Em relação à especificidade analítica, a nPCR-SH revelou-se adequada para estudos de identificação molecular, pois foi capaz de detectar isolados de diferentes espécies de *Cryptosporidium* spp com elevado grau de divergência evolutiva. DNA de *Cryptosporidium* de diversas espécies foram amplificados com sucesso pela nPCR-SH.

Nem todas as amostras detectadas pela nPCR-SH foram identificadas, pois em duas delas a seqüência de nucleotídeos não foi determinada com qualidade suficiente para análise. A identificação molecular dos 16 isolados para o gene 18S rDNA mostrou que *Cryptosporidium* sp. genótipo rato III é mais freqüente, ocorrendo em 71,4 % (10/16) das amostras, sendo que o *Cryptosporidium* sp. genótipo rato II foi identificado em 7,1 % (1/16). Três isolados (21,4 %) foram identificados como *Cryptosporidium muris*. Espécies e genótipos normalmente prevalentes em roedores como *C. wrairi*, *Cryptosporidium* genótipo camundongo, bem como aqueles de perfil zoonótico ou de especificidade para hospedeiros não roedores e bastante comuns em meio urbano como *C. parvum*, *C. canis* e *C. felis*, (GONÇALVES et al., 2006; XIAO et al., 2008; LUCCA et al., 2009) não foram encontrados na população pesquisada.

Os isolados pertencentes ao genótipo rato II foram quase idênticos a um genótipo de *Cryptosporidium* detectado em ovinos na Austrália (AY898790) (RYAN et al., 2005). Estas seqüências diferem em apenas uma transição A-G. Este genótipo foi encontrado por outros autores (CHAOCHAO et al., 2009) em roedores de vida livre da espécie *Rattus tanezumi*, na China. Quanto ao genótipo rato III estes mesmos autores encontraram-no em roedores das espécies *Rattus tanezumi* e *Rattus norvegicus*. Pelos nossos resultados, genótipo III pode ocorrer tanto em

Rattus rattus quanto em *Mus musculus*, enquanto genótipo II pode acontecer em *Mus musculus*.

Os genótipos rato I, rato II e rato III de *Cryptosporidium* formam um clado bem suportado estatisticamente e diferem marcadamente de outras espécies de *Cryptosporidium* intestinais (CHAOCHAO et al., 2009) na filogenia realizada com dados de 18S rDNA. Porém, análise de seqüências codificadora de actina para as amostras de genótipo rato II e III revelaram que estes dois genótipos são idênticos. Dentre as seqüências codificadoras de actina disponíveis no GenBank, as amostras de genótipo II e III revelaram maior similaridade (89 %) com *Cryptosporidium canis*. Esta similaridade é corroborada pela reconstrução filogenética onde estes genótipos formam um clado com elevado suporte estatístico com *C. canis*. Por estas características, é possível inferir que os genótipos rato II e rato III devem pertencer a um grupo diferenciado de *Cryptosporidium* que poderia ser classificado como duas espécies novas. É possível, ainda, que as diferenças encontradas entre os genótipos II e III não seja indicativo que estes dois genótipos são duas espécies distintas, mas sejam na verdade formas alélicas de 18S rDNA distintas de uma mesma espécie, assim como ocorre com outras espécies de *Cryptosporidium* como *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium galli* (LE BLANQ et al., 1997; SEVA, 2009).

Em relação a ocorrência de *Cryptosporidium muris*, este parasito tem sido encontrado em diversas espécies de roedores sinantrópicos ou de vida livre (*Mus musculus*, *Rattus rattus*, *Rattus norvegicus*, *Hamster*, *Sciurus vulgaris*), em alguns marsupiais (*Macrotis lagotis*), além de outros mamíferos como camelos, cabras, girafas, focas, gatos, macacos, cachorro e suínos. Foi identificado, também, em alguns indivíduos humanos em países em desenvolvimento (WARREN et al., 2003; MUTHUSAMY et al., 2006; Ng; PAVLASCK; RYAN, 2006; FENG, 2008). Chachao et al. 2009 encontrou *C. muris* em animais domésticos como hamsters (6,6 %) e esquilo da Siberia (5%). No inquérito presente, *C. muris* foi encontrado apenas em três amostras de *Rattus rattus*.

6 CONCLUSÕES

- A nPCR-SH padronizada neste trabalho é superior em termos de atributos diagnósticos a nPCR-XIAO e pode ser usada como método para detecção e identificação de seqüências 18S-rDNA de *Cryptosporidium* spp.
- Isolados de *Cryptosporidium* genótipo rato II e III possuem diferenças moleculares em relação a outros isolados de *Cryptosporidium* intestinais que permitem classificá-los como uma espécie nova para o gênero.

REFERÊNCIAS

- BAJER, A.; BEDNARSKA, M.; PAWEELCZYK, A.; BEHNKE, J. M.; GILBERT, F. S.; SINSKI, E. Prevalence and abundance of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* spp. in wild rural rodent from the Mazury Lake District region of Poland. **Parasitology**, v. 125, p. 21-34, 2002.
- BONNIN, A. M.; FOURMAUX, M. N.; DUBREMETZ, J. F. Genotyping human and bovine isolates of *Cryptosporidium parvum* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a repetitive DNA sequence. **Microbiology Letters**, v. 137, p. 207-211, 1996.
- BLACK, E. K.; FINCH, G. R.; TAGHIKILANI, R.; BELOSEVIC, M. Comparison of assays for *Cryptosporidium parvum* oocysts viability after chemical disinfection. **Microbiology Letters**, v. 135, p. 187-189, 1996.
- BRIEN, C. N.; JENKINS, M. C. A rapid method for producing highly purified *Cryptosporidium parvum* oocysts. **The Journal of Parasitology**, v. 93, n. 2, p. 434-436, 2007.
- CHAN, R.; CHEN, J.; YORK, M. K.; SETIJONO, N.; KAPLAN, R. L.; GRAHAM, F.; TANOWITZ, H. B. Evaluation of a combination rapid immunoassay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* antigens. **Jornal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 393-394, 2000.
- CHAOCHAO, L. V.; ZHANG, L.; WANG, R.; JIAN, F.; ZHANG, S.; NING, C.; WANG, H.; FENG, Y.; WANG, X.; REN, X.; QI, M.; XIAO, L. *Cryptosporidium* spp. em roedores silvestres, laboratorial e pet na china: caracterização molecular e prevalência. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 24, p. 7692-7699, 2009.
- CAREY, C. M.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. **Water Research**, v. 38, p. 818-862, 2003.
- DILLINGHAN, R. A.; LIMA, A. A.; GUERRANT, R. L. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 1059-1066, 2002.
- EGYED, Z.; SRETER, T.; SZELL, Z.; VARGA, I. Characterization of *Cryptosporidium* spp. – recent developments and future needs. **Veterinary Parasitology**, v. 111, p. 103-114, 2003.

FAYER, R.; SPEER, C. A.; DUBEY, J. P. The general biology of *Cryptosporidium*. In: FAYER, R. ***Cryptosporidium and Cryptosporidiosis***. Boca Raton: CRC Press, p1-41, 1997.

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

FAYER, R.; TROUT, J. M.; XIAO, L.; MORGAN, U. M.; LAI, A. A.; DUBEY, J. P. *Cryptosporidium canis* sp. from domestic dogs. **The Journal of Parasitology**, v. 87, p. 1415-1422, 2001.

FAYER, R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite (Review). **Veterinary Parasitology**, v. 126, p. 37-56, 2004.

FENG, Y. *Cryptosporidium* in wild placental mammals. **Parasitology**, v. 124, p. 128-137, 2008.

FRANCO, R. M. B.; ROCHA-EBERHARDT, R.; CANTUSIO, N. R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocyst and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia River. Campinas, Brazil. **Revista Instituto Medicina Tropical de São Paulo**. v. 43, p. 109-111, 2001.

GIBBONS, C.L.; RIGI, F. M.; AWAD-EL-KARIEM, F. M. Detection of *Cryptosporidium parvum* and *C. Muris* oocysts in spiked backwash water using there PCR- based protocols. **Protist**, v. 149, p. 127-134, 1998.

GONÇALVES, E. M. N.; DA SILVA, A. J.; EDUARDO, M. B. P.; UEMURA, I. H.; MOURA, I. N. S.; CASTILHO, V. L. P.; CORBETT, C. E. P. 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.

GUERRANT, D. I.; MOORE, S. R.; LIMA, A. A.; PATRICK, P. D.; SCHARLING, J. B.; GUERRANT, R. L. Association of early childhood diarrhea and Cryptosporidiosis with impaired physical fitness and cognitive function four-seven years later in a poor urban community in northeast Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, p. 707-713, 1999.

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

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

KORISH, D. G.; MEAD, J. R.; MADORE, M. S. Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1423-1428, 1990.

LE BLANCQ, S. M.; KHRAMTSOV, N. V.; ZAMANI, F.; UPTON, S. J.; WU, T. W. Ribosomal RNA gene organization in *Cryptosporidium parvum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 90, p. 463-478, 1997.

LIMA, E. C.; STAMFORD, T. L. M. *Cryptosporidium* spp. No ambiente aquático: aspectos relevantes da disseminação e diagnóstico. **Ciência Saúde Coletiva**, v. 8, p. 791-800, 2003.

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

LUCCA, P.; GASPARINI, E. N.; BOZZOLI, L. M.; FUNADA, M. R.; SILVA, S. O. S.; JULIANO, W.; SOARES, R. M. Caracterização Molecular de *Cryptosporidium* spp. em pacientes infectados com HIV da região urbana do Brasil. **Revista Instituto Medicina Tropical, São Paulo**, v. 51, p. 341-343, 2009.

MEIRELES, M. V.; SOARES, R. M.; BONELLO, F. GENNARI, S. M. Natural infection with zoonotic subtype of *Cryptosporidium parvum* in capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 166-170, 2007.

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

MORGAN, U. M.; MONIS, P. T.; FAYER, R.; DEPLAZES, P.; THOMPSON, R. C. A. Phylogenetic relationships among isolates of *Cryptosporidium*: evidence for several new species. **Journal Parasitology**, v. 85, p 1126-1133, 1999.

MORGAN, U.; XIAO, L.; MONIS, P.; SULAIMAN, I.; PAVLASEK, I.; BLAGBURN, B.; OLSON, M.; UPTON, S. J.; KHRAMTSOV, N. V.; LAL, A.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R.C. Molecular and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium muris* from various hosts. **Parasitology**, v. 120, p. 457-464, 2000.

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

MUTHUSAMY, D.; RAO, S.; S., RAMANI, S.; MONICA, B.; BANERJEE, I.; ABRAHAM, D.; MATHAI, C.; PRIMROSE, B.; MULIYIL, J.; WANKE, C. A.; WARD, H. D.; KANG, G. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* sp. Isolates from human immunodeficiency virus-infected individuals in Shouth India. **Journal Clinical Microbiol**, v. 44, p. 632-634, 2006.

NG, J.; PAVLASCK, I.; RYAN, U. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 12, p. 7548-7553, 2006.

OLSON, M. E.; O' HANDLEY, R. M.; RALSTON, B. J.; MCALLISTER, T. A.; THOMPSON, R. C. A. Update, on *Cryptosporidium* and *Giardia* Infections in Cattle. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 4, p. 185-191, 2004.

RAMIREZ, N. E.; WAR, L. A.; SREEVATSAN, S. A review of the biology and epidemiology of criptosporidiosis in humans and animals. **Microbes Infection**, v. 6, p. 773-785, 2004.

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

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

SEVÁ, A. P. **Identificação de assinaturas genéticas em região codificada menor unidade ribossômica de *Cryptosporidium spp.*** : caracterização molecular de amostras de mamíferos e aves. 2009. 95 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

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

SMITH, H. V.; ROSE, J. B. Waterborne Cryptosporidiosis: current status. **Parasitology**, v. 14, p. 14-22, 1998.

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

SRÉTER, T.; HORNOK, S.; VARGA, I.; BÉKÉSI, L.; SZÉLL, Z. Attempts to immunize chicken against *Cryptosporidium bailey* with *C. parvum* oocysts and Paracox vaccine. **Folia Parasitology**, v. 44, p. 77-80, 1997.

STIBBS, H. H.; ONGERTH, J. E. Immunofluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal smears. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 24, p. 517-521, 1986.

THOMPSON, R. C. A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infection. **Journal Paratology**, v. 89, p. S134-S140, 2003.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The Clustal_x window interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Researchs**, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997.

THRUSFIELD, M. **Epidemiologia veterinaria**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2004. 556 p.

TZIPORI, S.; WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 1047-1058, 2002.

UNGAR, B. L. P. Cryptosporidiosis in humans (*Homo sapiens*). In: DUBEY JP,; SPEER, C. A.; FAYER, R. (Ed.). **Cryptosporidiosis of man and animals**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990. p. 59-82.

WARREN, K. S.; SWAN, R. A.; MORGAN-RYAN, U. M.; FRIEND, J. A.; ELLIOT, A. *Cryptosporidium muris* infection in bilbies (*Macrotis lagotis*). **Journal Veterinary Australia**, v. 81, p. 739-741. 2003.

WIDMER, G. Genetic heterogeneity and PCR detection of *Cryptosporidium parvum*. **Advances in Parasitology**, v. 40, p. 223-239, 1998.

XIAO, L.; HERD, R. P.; RINGS, D. M. Diagnosis of *Cryptosporidium* on a sheep farm with neonatal diarrhea by immunofluorescence assays. **Veterinary Parasitology**, v. 47, p. 17-23, 1993.

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

XIAO, L.; ALDERISIO, K.; LIMOR, J.; RAYER, M.; LAL, A. A. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA – based diagnostic and genotyping tool. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5492-5498, 2000.

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

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

XIAO, L.; 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.

ZIEGLER, P. E.; WADE, S. E.; SCHAAF, S. L.; STERN, D. A.; NADARESKEI, C. A.; MOHAMMED, H. O. Prevalence of *Cryptosporidium* species in wildlife populations within a watershed landscape in southeastern New York State. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 176-184, 2007.