UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA

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)

THEREZINHA TRAVASSOS CARVALHO DE ALMEIDA

**Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Saúde Pública
para obtenção do título de Doutor
em Saúde Pública**

**Área de concentração: Prática em Saúde Pública
Orientadora: Prof^a. Dr^a. MARIA HELENA MATTÉ**

**São Paulo
2004**

Padronização e avaliação de métodos moleculares para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) em amostras fecais: extração de DNA genômico e reação em cadeia pela polimerase (PCR)

THEREZINHA TRAVASSOS CARVALHO DE ALMEIDA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública para obtenção do título de Doutor em Saúde Pública

**çãçÁrea de concentração: Prática em Saúde Pública
Orientadora: Prof^a. Dr^a. MARIA HELENA MATTÉ**

**São Paulo
2004**

Dedico este trabalho

Ao meu amado filho Marcos, que desde pequeno sofreu minhas ausências durante a execução desta tese.

Ao meu querido pai Telmo, pelo seu exemplo vivo de honestidade, lisura, paciência, condescendência e amor pelo próximo, e também pela força e incentivo que sempre me deu.

À minha mãe Dilma, que certamente ficaria muito feliz ao ver sua filha tornando-se doutora.

Agradecimentos

Meus mais sinceros agradecimentos à minha orientadora, Profa. Dra. Maria Helena Matté, que, como eu, adora desafios! Profissional competente, incansável, sempre pronta para o trabalho, a qualquer hora! Professora nata, de memória invejável, consegue orientar e acompanhar todas suas alunas. Como mãe, sempre soube compreender minhas necessidades de dividir-me entre a maternidade e o laboratório. Como professora, sempre soube me orientar e estimular. Como pessoa, sabia escutar e tentar compreender minhas dificuldades. Muito obrigada!!! Espero que a amizade pessoal e a afinidade profissional advindas deste trabalho produzam muitos frutos.

Meu muito obrigada,

À Profa. Dra. Hermínia Yokho Kanamura, por ter me introduzido nesse campo de estudo e pelas sugestões.

Às amigas Angélica Maria Casimiro, por ceder-me as amostras do bezerro, e pela grande e inestimável ajuda na etapa de

preparação dessas amostras e à Aparecida Gomes, por ceder-me uma amostra clínica.

À colega Mônica Schuller, por gentilmente ceder-me as amostras de pombos.

À Profa. Dra. Solange Maria Gennaro, por providenciar as amostras clínicas dos animais.

A todo o pessoal do Laboratório de Práticas de Saúde Pública: à Milena Dropa, pelo apoio na parte experimental, sempre que precisei; à Mírian Lopes, que muito me ajudou na leitura dos géis; Suzete, Fernanda, Marisa, Thiago, Martha e Karla, e à Silvana Cutolo, do Laboratório de Saúde Ambiental, pelo entusiástico auxílio no início da parte experimental.

Aos membros da Banca Examinadora, Profa. Dra. Vera Lúcia Pereira Chioccola, Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, Prof. Dr. Pedro Paulo Chieffi e Prof. Dr. Delsio Natal, pelas sugestões para a elaboração da versão final do trabalho.

À Solange Martone, pela bonita amizade que construímos durante nossas jornadas como doutorandas e pelo auxílio na digitação da tese.

Ao Prof. Dr. Glavur Rogério Matté, pela colaboração no trabalho.

Aos colegas Ana Júlia Urias Araujo, Celma Quadros e Pedro Luís Pinto, pela troca de idéias.

À minha irmã Telma, e toda sua família, Fernando, Simone e Eduardo Henrique, que sempre acolheram com muito carinho meu filho e eu, nas horas em que eu precisava descansar longe de casa e aos amigos Cláudia e Fernando, quando eu podia descansar mais longe ainda.

Ao Instituto Adolfo Lutz, na figura de seus dirigentes, por ter possibilitado a realização desse sonho.

Ao CECOVisa (Centro Colaborador em Vigilância Sanitária da USP) pelo auxílio financeiro através do Convênio CA nº 06/99-44-ANVSMA - processo nº 2001.1.1048.6.9.

Ufa, consegui, terminei, acabei!

Parece um sonho que eu, finalmente, tenha chegado ao fim dessa etapa tão difícil, sofrida a cada momento, em muitos e variados sentidos. Foi uma jornada longa, durante a qual, inúmeras vezes, quis desistir. Mas havia uma estrela a seguir, longe, distante, ainda assim, brilhante. Ou seria um sonho, sonhado por tanto tempo, que não poderia deixar de ser realizado. Ou tão somente uma missão, que deveria ser cumprida a qualquer custos??!! Sim, os obstáculos e as vicissitudes estiveram presentes sempre, sem o menor sinal de arrefecimento.

Agora, trabalho pronto, fica a sensação de que os problemas técnicos, foram a parte boa e fácil desse processo de amadurecimento. Rompemos um paradigma, ao romper a parede dos oocistos desse "bichinho" que tanta dor de cabeça causou! Mas, e quanto aos outros tantos paradigmas?!...

Bem, cabeça no travesseiro, me ponho a conjecturar se, algum dia, conseguirei também, me livrar da imensa dor de cabeça causada pelas dificuldades existenciais, sentimentais, financeiras, econômicas, etc. Acho que não, mas uma coisa tenho certeza: não possuo conhecimentos psicológicos, antropológicos, espíritas ou religiosos para explicar, mas um depoimento posso dar. Ainda que parecesse

impossível, ainda que houvesse uma enorme força negativa me empurrando ladeira a baixo, a estrela, o sonho, a missão, ou seja lá qual definição possamos dar, estava lá, à minha frente, me enchendo de forças, de energia, de garra, para não esmorecer.

Estrela alcançada ou sonho realizado ou missão cumprida. Não sei! Porém sei que, vislumbro agora, outra estrela mais brilhante, mais alta e mais distante...

Não esmorecer frente às dificuldades, não desistir nunca dos sonhos. Tudo bem, já aprendi que nunca é tarde para aprender e que sempre é hora para começar, mas, certamente, uma "espaço-nave" para me levar rapidinho à nova estrela, seria ideal!!!

CARVALHO-ALMEIDA, Therezinha Travassos. **Standardization and evaluation of molecular methods to detect oocysts of *Cryptosporidium* spp (Apicomplexa: Cryptosporiidae) in faecal samples: extraction of genomic DNA and PCR (polymerase chain reaction).** São Paulo. 2004. [PhD Thesis – School of Public Health, University of São Paulo].

Abstract: The protozoan parasite *Cryptosporidium parvum* has become recognised as important emerging human pathogens. For molecular studies, most of the techniques to extract genomic DNA require the use of imported kits to concentrate, rupture the very resistant oocyst wall, and purify the DNA from the samples matrix. The aim of this study was to develop a simple and rapid method based on polymerase chain reaction (PCR) to detect *Cryptosporidium* in preserved faeces. Oocysts were concentrated from faecal specimens by flotation on sucrose gradient. Genomic DNA was prepared from purified oocysts by adding a lysis buffer containing 70 mM β -mercaptoethanol, digested with proteinase K and extracted with phenol-chlorophorm-isoamyl. The standardization was started by performing a one step PCR to detect *Cryptosporidium* spp using a generic set of primer (AWA). To detect *C. parvum* a one step PCR was assayed using the specific primer (LAX). To increase the sensitivity of the method, were tested nested-PCR assays, using an outer primer (XIA). Thirty nine DNA samples were analysed from the standard calf, 52 samples from 17 patients and 45 samples from 14 animals. The results were: 54.28% positive samples by single PCR AWA, 71.42% by nested-PCR, 67.74% by single PCR LAX and 44.44% by nested-PCR for the standard calf. The overall positivity for human and animal samples were: 34.48% by single PCR and 54.83% by nested-PCR for *Cryptosporidium* spp and 16.00% by single PCR and 50.00% by nested-PCR for *C. parvum*. Using Vistra Green for staining agarose gel, yielded the visualisation of the amplicons. These results show that this simple and cheap method could be improved to be used on the routine laboratory work

Key Words: *Cryptosporidium*. DNA extraction. PCR.

CARVALHO-ALMEIDA, Therezinha Travassos. **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).** São Paulo. 2004. [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública da USP].

Resumo: O protozoário parasita *Cryptosporidium parvum* tem sido reconhecido como um importante patógeno emergente. Para estudos moleculares, a maioria das técnicas para extração do DNA requer o uso de *kits* importados para concentrar, romper a parede muito resistente do oocisto e purificar o DNA das matrizes das amostras. O objetivo do estudo foi desenvolver um método simples e rápido, baseado na reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detectar *Cryptosporidium* em fezes preservadas. Oocistos foram concentrados das amostras fecais pela flutuação em gradiente de sacarose. Dos oocistos purificados foi extraído o DNA genômico através de incubação em tampão de lise contendo 70 mM β -mercaptoetanol, digerido com proteinase K e extraído com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. A padronização foi iniciada com a PCR única para detectar *Cryptosporidium* spp usando um par de *primer* genérico (AWA). Para identificar *C. parvum* foi realizada a PCR única com o par de *primer* específico (LAX). Para aumentar a sensibilidade do método, foi testada a *nested*-PCR, usando o *primer* externo XIA. Foram analisadas 39 amostras de DNA do bezerro padrão, 52 amostras de 17 pacientes e 45 amostras de 14 animais. Os resultados foram: 54,28% de positividade na PCR AWA, e 71,42% na *nested*-PCR XIA/AWA, 67,74% na PCR LAX e 44,44% na *nested*-PCR XIA/LAX das amostras do bezerro. A positividade geral nas amostras de pacientes e de animais foi: 34,48% pela PCR and 54,83% pela *nested*-PCR para *Cryptosporidium* spp e 16,00% pela PCR e 50,00% pela *nested*-PCR para *C. parvum*. O emprego do corante Vistra Green melhorou significativamente a visualização do gel. Os resultados mostram que este método simples e de baixo custo pode ser melhorado para aplicação na rotina do laboratório.

Palavras-chave: *Cryptosporidium*. Extração de DNA. PCR.

INDICE

	Pág
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspecto Históricos	1
1.2 Ciclo Biológico	5
1.3 Transmissão	6
1.4 Manifestações Clínicas	9
1.5 Epidemiologia	13
1.6 Taxonomia	17
1.7 Diagnóstico	20
1.8 Métodos Moleculares aplicados a <i>Cryptosporidium</i>	22
1.8.1 Hibridização de sondas de DNA	23
1.8.2 PCR (Polymerase Chain Reaction)	23
1.8.3 PCR Multiplex	25
1.7.4 Nested PCR	26
1.7.5 Real-Time PCR	27
1.7.6. PCR e Hibridização	29
1.7.7 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)	29
1.7.8. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)	30
1.7.9 PCR-SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism)	31
1.7.10. PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	32
1.7.11. Microsatélites	35
1.7.12. Heteroduplex	35
1.9 Epidemiologia Molecular	36
1.10 Estudos de <i>Cryptosporidium</i> e da criptosporidiose no Brasil	38
2. JUSTIFICATIVA	43

3. OBJETIVOS	46
3.1 Objetivo Geral	46
3.2 Objetivos Específicos	46
4. METODOLOGIA	47
4.1 Amostras	47
4.1.1 Fezes de Bezerro	47
4.1.2 Fezes Humanas	47
4.1.3 Fezes de Animais	47
4.2 Recuperação dos Oocistos	48
4.3 Extração do DNA Genômico	49
4.3.1 Extração do DNA genômico das amostras de fezes de bezerro	50
4.3.2 Extração do DNA genômico das amostras de fezes humanas	51
4.3.2.1 Extração do DNA genômico de amostras de fezes congeladas	52
4.3.3 Extração do DNA genômico das amostras de fezes animais	52
4.3.3.1 Extração do DNA genômico das amostras de fezes de pombos	52
4.3.4 Variação na quantidade de fezes processadas das diferentes amostras	54
4.4 Estimativa da concentração do DNA genômico	54
4.5 Reações de amplificação do ácido nucléico	54
4.5.1 PCR única para detecção de <i>Cryptosporidium</i> spp	55
4.5.2 PCR única para identificação de <i>Cryptosporidium parvum</i>	56
4.5.3 Nested-PCR (ou PCR dupla) para <i>Cryptosporidium</i> spp e <i>C. parvum</i>	56
4.6 Eletroforese em gel de agarose	58
4.6.1 Modificações na execução da eletroforese em gel de agarose	59
4.7 Análise Estatística dos Dados	59
5. RESULTADOS	60

5.1 Fezes de bezerro	60
5.2 Fezes humanas	63
5.3 Fezes de animais	66
6. DISCUSSÃO	71
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	95
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Históricos

O *Cryptosporidium* é um protozoário parasita intracelular, extracitoplasmático, do Phylum Apicomplexa (protozoários que possuem complexo apical); Classe Sporozoasida (que se reproduz por ciclo assexuado e sexuado, com formação de oocistos); Subclasse Coccidiasina (ciclo de vida envolvendo merogonia, gametogonia e esporogonia); Ordem Eucoccidiida (esquizogonia presente); Subordem Eimeriina (com desenvolvimento independente de micro e macrogametas); Família Cryptosporidiidae (monoxeno, com quatro esporozoítas dentro do oocisto, mas sem esporocisto), descrito primeiramente por Tyzzer em 1907 (SRÉTER e VARGA 2000; SODRÉ e FRANCO 2001; TZIPORI e WARD 2002; EGYED *et al.* 2003; RAMIREZ *et al.* 2004).

O protozoário foi isolado da mucosa gástrica de um camundongo de laboratório aparentemente sadio, recebendo a denominação de *Cryptosporidium muris*. Tyzzer descreveu ainda o ciclo de vida do parasita que, com pequenas modificações, mais tarde viria a ser confirmado por microscopia eletrônica. Em 1912, identificou o *C. parvum*, como uma espécie nova cujos oocistos eram menores do que os de *C. muris* (de CARLI 1994).

Até 1955 *Cryptosporidium* não despertara interesse maior dos cientistas até que uma nova espécie, *C. meleagridis* foi descrita e associada à infecções que causavam a morte em perus. Porém, o interesse veterinário nasce apenas em 1971 quando o *Cryptosporidium* é associado à diarreia bovina.

Os primeiros casos humanos de criptosporidiose foram descritos, separadamente, em 1976 nos Estados Unidos da América por NIME *et al.* e por MEISEL *et al.* O primeiro caso foi observado em uma criança de três anos de idade, com severa gastroenterite, que morava em zona rural e o outro em um paciente submetido à terapia imunossupressora. Seis anos após, em decorrência da síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids), passa a aumentar significativamente os casos

de criptosporidiose humana nos pacientes imunocomprometidos, causando quadros graves de diarreia crônica e de difícil tratamento (GUIZELINI 1991, SODRÉ e FRANCO 2001).

Resumidamente, é possível mencionar três momentos na história, entre 1980 e 1993, que ressaltam a importância desses microrganismos. O primeiro é em 1980 quando *Cryptosporidium* foi confirmado como sendo o agente etiológico de surtos bem como de casos esporádicos de diarreia em alguns mamíferos. Em 1983, com a epidemia de Aids a criptosporidiose emergiu como doença sem cura nessa subpopulação, e em 1993, alcançou conhecimento público com o surto de Milwaukee (TZIPORI e WARD 2002).

Inicialmente a incidência da criptosporidiose foi limitada aos indivíduos imunocomprometidos, porém, com o desenvolvimento de novas técnicas laboratoriais de diagnóstico, passam a ser relatados inúmeros surtos e infecções esporádicas em indivíduos imunocompetentes. *Cryptosporidium* pode ser responsável por 10 a 20% dos casos de diarreia em pacientes HIV positivos nos países desenvolvidos e até 50% nos países em desenvolvimento (MORGAN *et al.* 2000).

Após os surtos de criptosporidiose ocorridos no Texas (1985) e em Georgia (1987), a agência norte americana de proteção ambiental, USEPA (United States, Environmental Protection Agency), inclui a pesquisa de *Cryptosporidium* na lista de prioridade de água potável (DWPL – Drinking Water Priority List) em 1988 (HACHICH 2002). Contudo, o maior surto de criptosporidiose ocorreu em 1993, em Milwaukee, acometendo aproximadamente 403.000 pessoas, culminando com 4.000 hospitalizações e cerca de 100 óbitos (SODRÉ e FRANCO 2001).

Em 1994 a criptosporidiose tornou-se doença de notificação compulsória no Canadá (ISAAC-RENTON 1999).

No Brasil, em 29 de Dezembro de 2000, o Ministério da Saúde publica a Portaria nº 1469, revogada em 25 de março de 2004 pela Portaria nº 518, que em seu Cap. IV, Art. 11, § 8º, mantém a recomendação da inclusão de pesquisa de organismos patogênicos em águas de consumo humano, visando o padrão de ausência, dentre outros, de cistos de *Giardia* spp e oocistos de *Cryptosporidium* sp.

Atualmente, *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium parvum* destacam-se entre os agentes microbianos causadores de gastroenterites, pela elevada incidência de casos e pelo fato desses protozoários apresentarem resistência aos tratamentos convencionais da água para consumo humano e grande capacidade de permanência no ambiente (MULLER 2000, HACHICH 2002, LEMARCHAND e LEBARON 2003).

LEAV *et al.* (2003) citam que uma extensa revisão dos casos de diarreia demonstrou que a incidência da criptosporidiose nos pacientes imunocompetentes, nos países desenvolvidos, foi de 6,6% e ainda da SILVA *et al.* (1994), relatam que cerca de 10% dos episódios diarreicos agudos na infância estão associados com protozoários e, dentre estes, *Cryptosporidium* ocupa lugar de destaque.

Estudos demonstraram que a criptosporidiose é endêmica na maioria das regiões tropicais e que *Cryptosporidium* é um dos três principais agentes de diarreia infecciosa que constitui importante causa de morbimortalidade em crianças de 0 a 5 anos de idade no Brasil (OSHIRO *et al.* 2000, GATEI *et al.* 2003). Desta forma, assim como outros protozoários intestinais, *Cryptosporidium* sp. é cosmopolita, constituindo grande problema de saúde pública durante a infância, se forem considerados os danos que pode ocasionar ao desenvolvimento físico da criança. A exposição da criança ao agente ocorreria durante ou logo após o desmame, sendo as crianças menores de 3 anos de idade as mais suscetíveis a infecção (GRIFFITHS 1997, AGNEW *et al.* 1998, GUERRANT *et al.* 1999, NEWMAN *et al.* 1999, LIMA *et al.* 2000).

Recentemente, já foram relatados pelo menos 40 surtos de criptosporidiose envolvendo transmissão hídrica, principalmente nos EUA, Canadá, Reino Unido e Japão. Correntemente, a criptosporidiose representa a maior preocupação em Saúde Pública em relação à utilização da água nos países desenvolvidos (RYAN *et al.* 2003). Além da água, alguns alimentos vêm sendo descritos como possíveis fontes de infecção para o *C. parvum* (ORTEGA *et al.* 1997; FAYER *et al.* 1999, MEAD *et al.* 1999). Estudo realizado por CORSO *et al.* em 2003 estimou que o custo médio por pessoa infectada, durante o histórico surto de Milwaukee, de 1993, para indivíduos com doença leve foi de US\$ 116,00 enquanto que para os indivíduos com doença grave e internação hospitalar foi de US\$ 7.808,00 incluindo nesse cálculo os custos médicos e a perda de produtividade.

Porém, assim como ocorre com outras doenças diarréicas, as infecções causadas por *C. parvum* podem ser auto-limitadas e com sintomas brandos. Esta característica desfavorece a busca por atendimento médico e conseqüentemente leva a ausência de diagnóstico, gerando subnotificação da doença e falta de dados quanto à existência de surtos (PENG *et al.* 1997).

Essa situação pode ser confirmada se forem levados em consideração estudos de soroprevalência de *Cryptosporidium* spp realizados nos Estados Unidos que demonstram uma positividade na faixa de 25-35% (CHAPPELL e OKHUYSEN 2002). No Reino Unido através da sorologia foi estimado que aproximadamente 20% da população de adultos jovens tenham sido expostos a este protozoário (MILLAR *et al.* 2002).

Novos métodos de detecção de *Cryptosporidium* spp. têm sido desenvolvidos com finalidade diagnóstica, para uso em estudos epidemiológicos ou experimentais, e para monitoramento da água e avaliação da viabilidade dos oocistos. Uma revisão completa da literatura de cada uma dessas áreas resultaria em trabalho muito extenso. No entanto, far-se-á uma breve menção aos novos achados nas áreas clínicas e epidemiológicas no decorrer deste trabalho (CHAPPELL e OKHUYSEN 2002).

1.2 Ciclo Biológico

Todas as espécies do gênero *Cryptosporidium* são parasitas intracelulares obrigatórios, monoxênicos, com as fases assexuada e sexuada de reprodução no mesmo hospedeiro, cuja forma infectante é o oocisto que mede entre 4,5 e 6,0 μm de diâmetro e contém quatro esporozoítas. O oocisto, quando ingerido através da água ou alimentos contaminados, tem sua parede rompida no trato intestinal pelas enzimas proteolíticas e sais biliares. Liberam os esporozoítas que se transformam em trofozoítas e invadem a superfície do epitélio. Sofrem divisões formando esquizontes, contendo merozoítas filhas. O esquizonte forma oito merozoítas alongados (merozoítas tipo I) que liberados no intestino fixam-se a outras células e produzem cistos com uma segunda geração de quatro merozoítas cada (tipo II), capazes de repetir o ciclo assexuado ou de formar gametócitos. Os merozoítas de segunda geração desenvolvem-se primeiro em macro e microgametócitos e depois em macro e microgametas. Após a fertilização dos macrogametes (fêmeas) pelos microgametes (machos), forma-se o zigoto, desenvolvendo o oocisto, de parede espessa ou delgada. Os oocistos sofrem uma multiplicação assexuada, a esporulação, em que, dentro de cada oocisto formam-se quatro esporozoítas livres, isto é, que não estão contidos em esporocistos. Oocistos de parede cística dupla são eliminados infectantes juntamente com as fezes e são resistentes às condições do meio externo, garantido a continuidade do ciclo em novos hospedeiros. Vinte por cento dos oocistos são de parede delgada, que se rompe facilmente, e libera esporozoítas no tubo digestivo. O excistamento endógeno dos oocistos de parede delgada explica o mecanismo de infecções permanentes, principalmente em pacientes com Aids, na ausência de nova exposição.

As fases assexuada (esquizogonia ou merogonia) e sexuada (gametogonia) do ciclo ocorrem nas células epiteliais do trato gastro-intestinal (ou de outros tecidos, como por exemplo o trato respiratório), abaixo da membrana celular, mas extracitoplasmaticamente. O oocisto esporulado é o único estágio exógeno, contendo quatro esporozoítas móveis, envolvidos por uma parede dupla que confere resistência ao organismo.

A cada geração o parasita pode se desenvolver e amadurecer entre 12 e 14 horas, sendo que o período entre a ingestão dos oocistos e sua excreção nas fezes varia de hospedeiro para hospedeiro, bem como entre as várias espécies de *Cryptosporidium*. O rápido ciclo de vida e os ciclos auto-infectantes, contribuem para o baixo número de oocistos requeridos para causar infecção (FAYER 1997; CAREY *et al.* 2004).

1.3 Transmissão

Pode-se citar cinco fatores importantes na disseminação do *Cryptosporidium*: (i) a resistência do oocisto ao cloro e ácidos; (ii) seu pequeno tamanho; (iii) sua baixa dose de infecção; (iv) sua natureza esporulada infecciosa logo após eliminação e (v) seu potencial zoonótico (com exceção de *C. hominis*) (DILLINGHAM *et al.* 2002).

Oocistos de *Cryptosporidium* são eliminados em grande quantidade pelos indivíduos humanos e bovinos infectados, podendo chegar a mais de 10^{10} oocistos por grama de fezes durante a fase aguda da infecção (TZIPORI e WARD 2002). Estudo realizado por RIMHANEN-FINNE *et al.* 2002, demonstraram que indivíduos infectados excretam grande número de oocistos nas fezes durante a infecção sintomática, aproximadamente de 10^5 a 10^7 oocistos por grama de fezes. Nas fases iniciais e finais da infecção a eliminação é somente de até 1.000 oocistos nas fezes (WARD e WANG 2001).

Oocistos esporulados são abrigados nas fezes dos hospedeiros infectados ou expelidos na tosse diretamente do trato respiratório (SRÉTER e VARGA 2000). A criptosporidiose pode ser transmitida de um hospedeiro infectado, eliminando oocistos nas fezes, para um hospedeiro suscetível por via fecal-oral, através do contato pessoa a pessoa ou animal-pessoa. Um dos principais modos de transmissão é a transmissão pessoa a pessoa (ROY *et al.* 2004), que ocorre com mais frequência entre crianças com menos de cinco anos de idade, muitas vezes provocando surtos em creches. Profissionais e pacientes de hospitais também constituem grupos de risco para aquisição da infecção (SODRÉ e FRANCO

2001). A transmissão interpessoal possivelmente inclui as atividades sexuais sendo esse o principal modo de transmissão entre os indivíduos com Aids (FAYER *et al.* 2000, MORGAN *et al.* 2000, SODRÉ e FRANCO 2001).

Embora a transmissão zoonótica (animal-pessoa) não seja reconhecida como importante fonte de infecção, ressalta-se a transmissão através do gado leiteiro, uma vez que esses animais, principalmente os bezerros, eliminam grande número de oocistos nas fezes. Em animais de criação o parasita causa desordem nos sistemas digestivo e respiratório que provoca saúde deficiente dos animais infectados e, conseqüentemente, significantes perdas econômicas (XIAO *et al.* 1999a).

Em países como os EUA, Canadá, Reino Unido, Japão e Nova Zelândia a forma mais comum de transmissão de *Cryptosporidium* é a transmissão hídrica, tanto com água tratada (geralmente os surtos são transmitidos pelas águas de superfície) como pelos efluentes de esgoto, uma vez que o tratamento do esgoto usualmente não inativa o parasita. Nesses países, há ainda o relato de surtos associados à exposição de águas de piscinas, não obstante o tratamento que estas recebem. CHAURET *et al.* (1999) observaram que a redução na concentração de oocistos de *Cryptosporidium* foi insignificante após a digestão anaeróbica do lodo residual do sistema de tratamento de esgoto, detectando oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* tanto em água bruta quanto em água tratada. Porém, esta análise não diferencia entre oocistos viáveis e não viáveis.

Entre 1990 e 2000, pelo menos 10 surtos de criptosporidiose foram associados com água de beber nos Estados Unidos (CORSO *et al.* 2003).

Além das águas de abastecimento e águas recreacionais, oocistos de *Cryptosporidium* já foram observados na água de mar e em águas estuarinas (SLIFKO *et al.* 2000).

Oocistos são vulneráveis à alteração de temperatura, e a dessecação é letal (JONGWUTIWES *et al.* 2002). GALLAHER *et al.* (1989)

preconizam a fervura da água para consumo humano na ocorrência de casos de diarreia na população, uma vez que os oocistos de *Cryptosporidium* são destruídos pelo aquecimento a 65° C por 30 minutos.

Ainda existem poucos relatos na literatura sobre a veiculação através de alimentos, mas já foi observada a ocorrência de um surto de criptosporidiose pela ingestão de suco de maçã, e ainda relatos de criptosporidiose adquirida pela ingestão de leite cru, salada de frango, cebola crua, salsicha crua, miúdos de carne bovina e vegetais crus (FAYER *et al.* 2000, SLIFKO *et al.* 2000, SODRÉ e FRANCO 2001, DILLINGHAM *et al.* 2002) e ostra, mariscos e mexilhões (SLIFKO *et al.* 2000; FAYER *et al.* 2004).

Em um estudo para verificação da presença de oocistos de *Cryptosporidium* em verduras, realizado no Peru, ORTEGA *et al.* (1997) verificaram que houve contaminação em couve, alface, salsinha, cebolinha, e alho-poro. O estudo demonstrou também que a lavagem usual das verduras, experimentalmente contaminadas em laboratório, não eliminou os oocistos. Em trabalho de revisão realizado por MILLAR *et al.* (2002) os autores observaram relatos de contaminação de tomate, pepino, rabanete, alface, morango, marisco, mexilhão, ostra e carne e seus produtos derivados. Já no Brasil, estudos realizados em Ribeirão Preto, SP demonstraram a contaminação de rúcula e alface com oocistos de *Cryptosporidium* (CAPUANO *et al.* 2001) e em alface em Pernambuco (SILVA *et al.* 2003).

A infecção por *Cryptosporidium* através de alimentos é provavelmente subdetectada devido ao pequeno número de oocistos presentes, o tamanho limitado das amostras, as dificuldades encontradas na concentração dos oocistos e a falta de técnicas de cultivo *in vitro* para aumentar o número de oocistos (LABERGE *et al.* 1996).

Finalmente, apesar dos sintomas pulmonares frequentes em indivíduos imunocomprometidos com criptosporidiose e a aparente aquisição respiratória de espécies que afetam as aves, a transmissão aerógena para o homem

ainda não está bem documentada (FAYER *et al.* 2000, DILLINGHAM *et al.* 2002). AKIYOSHI *et al.* (2003) citam que ainda não está claro se infecções do trato respiratório por *C. meleagridis* ocorrem em humanos, mas esta espécie está associada a sintomas gastrintestinais. Transmissão de *Cryptosporidium* por aerossóis foi relatada por RAMIREZ *et al.* 2004.

Alguns grupos de insetos, como as baratas, moscas domésticas e alguns tipos de besouros, e rotíferos aquáticos, já foram incriminados como vetores mecânicos de *Cryptosporidium*. A barata *Periplaneta americana* foi encontrada contendo oocistos no trato intestinal e a mosca doméstica com oocistos nas fezes e na superfície do corpo (FAYER *et al.* 2000). Nos Estados Unidos, moscas sinantrópicas silvestres das famílias Muscidae, Calliphoridae, Lauxaniidae e Anthomyiidae foram encontradas naturalmente infectadas com oocistos viáveis de *C. parvum*, sendo 25,9% infectadas com oocistos viáveis no intestino e 14,2% no exoesqueleto (GRACZYK *et al.* 2003). Essas espécies de moscas não picam, mas podem ser vetoras mecânicas dos oocistos, contaminando alimentos. Dessa forma, casos isolados ou mesmo surtos de criptosporidiose por ingestão de alimentos poderiam ser causados por essas moscas (DILLINGHAM *et al.* 2002).

1.4 Manifestações Clínicas

A criptosporidiose se caracteriza pela diarreia, dor abdominal e náusea, não apenas em indivíduos imunocomprometidos, mas também nos imuno-competentes, sendo auto-limitada nos últimos (GUERRANT, 1997, BAKER *et al.* 1998).

A duração da infecção e a patogenicidade da criptosporidiose dependem da condição imunológica do hospedeiro, variando de uma diarreia severa, mas auto-limitada, nos indivíduos imunocompetentes, até uma prolongada infecção sem tratamento, nos pacientes com comprometimento imunológico (ABRAHAMSEN *et al.* 2004).

A susceptibilidade do hospedeiro humano à infecção ou

doença depende de uma série de fatores que predispõem, ou protegem, um indivíduo exposto da multiplicação do parasita. Dois fatores bem documentados são a idade e o estado imunológico. Estes fatores também dependem de outros parâmetros os quais são provavelmente mais difíceis de se caracterizar. Mais além, infecção e doença estão intimamente relacionadas, porém, devem ser vistas como situações distintas uma vez que a excreção de oocistos pode ocorrer no homem sem nenhum sintoma da doença (da Silva *et al.* 2003), e ainda isolados de *Cryptosporidium* dados em doses iguais a indivíduos normais variam em seu poder de causar diarreia (TEUNIS *et al.* 2002).

DILLINGHAM *et al.* (2002) descrevem que no surto de Milwaukee foram observadas doses infectantes muito baixas que variaram entre 1 e 10 oocistos. WIDMER (2004) cita que um único oocisto é suficiente para produzir infecção em hospedeiros suscetíveis. Em estudos realizados com voluntários sadios a dose média de infecção observada foi de 132 oocistos, mas apenas 30 oocistos podem desencadear a infecção (BALATBAT *et al.* 1996; ROCHELLE *et al.* 1997; FAYER *et al.* 2000; LOWERY *et al.* 2000; SODRÉ e FRANCO 2001).

As manifestações clínicas da infecção dependem da espécie do parasita, da carga parasitária e da idade do paciente, estado imunológico, estado nutricional e exposição prévia do hospedeiro, podendo a infecção variar de uma forma assintomática até uma sintomática grave (DUBEY *et al.* 1990, UNGAR 1995). Quanto à virulência das espécies, EGYED *et al.*, 2003 classificam *C. hominis* e *C. parvum* como organismos de alta virulência, *C. meleagridis* e *C. muris* organismos de baixa virulência, e *C. felis*, *C. canis*, *C. parvum* pig genotype (genótipo suíno), com virulência ainda desconhecida. Citam ainda que para diferentes isolados da espécie *C. parvum* têm sido demonstrada diversidade na virulência, patogênese, infectividade, sensibilidade a drogas e perfis antigênicos.

O potencial de cada genótipo de *C. parvum* em causar diferentes sintomas clínicos é desconhecido. Diferenças na infectividade de animais de laboratório e de pacientes com Aids já foram reportados (SPANO *et al.* 1998).

Para isolados dentro da espécie *C. parvum*, a diversidade na virulência, patogênese, infectividade, sensibilidade a drogas e perfis antigênicos já foram demonstrados. A prevalência e a significância das diferentes espécies e genótipos, tanto em indivíduos imunocompetentes quanto naqueles com comprometimento imunológico, também ainda não está clara (GATEI *et al.* 2003).

Em trabalho recente, HUNTER *et al.* (2004) relatam que a infecção com *C. hominis* é mais seguida de sintomas sistêmicos do que a infecção com *C. parvum*. Explicam que tem sido observado que patógenos especialistas como o *C. hominis* têm menor diversidade genética e são geralmente mais virulentos do que os patógenos generalistas mais próximos, como o *C. parvum*.

O período pré-patente, que é o intervalo entre a ingestão dos oocistos e o aparecimento dos oocistos nas fezes, apresenta discordância entre diferentes autores, que relatam ser de 3 a 7 dias (TZIPORI *et al.* 2002); de 4 a 6 dias (UPTON 2003); de 7 a 10 dias, podendo variar entre 5 e 28 dias (FAYER e UNGAR 1986); de 1 a 3 semanas com duração média dos sintomas de 9 a 15 dias, podendo a eliminação de oocistos persistir por meses ou anos (RAMIREZ *et al.* 2004).

O sintoma mais comum da doença, tanto em indivíduos imunocompetentes como em imunocomprometidos, é a diarreia aquosa e abundante, com coloração esverdeada ou incolor, sem muco ou sangue. Outros sintomas que podem ocorrer são cólicas abdominais, náusea, vômitos, dor de cabeça, febre baixa ($< 39^{\circ}\text{C}$), dores musculares, indisposição, fraqueza, fadiga, anorexia, perda de peso e uma variedade de problemas respiratórios (RAMIREZ *et al.* 2004).

Nos pacientes imunocompetentes a doença é auto-limitada, com duração de 7 a 14 dias, enquanto nos pacientes imunocomprometidos, principalmente aqueles com Aids, ela é crônica e com sintomas graves. A perda hídrica é avaliada em três litros por dia, podendo atingir até 17 L/dia (NAVIN e JURANEK 1984, FAYER e UNGAR 1986, UNGAR 1995). Nos pacientes com Aids pode ocorrer ainda a criptosporidiose respiratória, com tosse persistente e dispnéia

(JENSEN *et al.* 1990, BREA HERNANDO *et al.* 1993, SODRÉ e FRANCO 2001).

A criptosporidiose acomete mais severamente os indivíduos com sistema imune comprometido, embora não haja dados indicando que os mesmos sejam mais suscetíveis à infecção do que os indivíduos imunocompetentes (BUTLER e MAYFIELD 1996). A severidade da infecção em portadores do vírus HIV é proporcional ao grau de imunodeficiência, ou seja, quando a contagem de linfócitos CD4 está acima de 180 células/mm³, a diarreia geralmente é auto-limitada, e quando os indivíduos apresentam a contagem de CD4 abaixo de 140 células/mm³, tendem a apresentar a forma persistente da doença (BRANTLEY *et al.* 2003; LEAV *et al.* 2003).

O gênero *Cryptosporidium* é amplamente associado a grandes infecções entéricas em todas as classes de vertebrados. Os mamíferos são comumente infectados tanto por *C. parvum* (intestinal) quanto por *C. muris* (gástrica) (AKIYOSHI *et al.* 2003).

Cryptosporidium é um dos poucos protozoários entéricos contra o qual ainda não se descobriu uma terapia efetiva. A falta de uma droga específica reflete a singularidade desse parasita que inclui a sua localização intracelular e suas afinidades filogenéticas (THOMPSON e CHALMERS 2002).

Existem algumas evidências de que a virulência e a resposta ao tratamento dependem da espécie ou genótipo infectante (OKHUYSEN *et al.* 2002).

Apesar dos intensivos esforços dos últimos 20 anos, ainda não há uma terapia efetiva para tratar ou prevenir as infecções humanas por *Cryptosporidium* (ABRAHAMSEN *et al.* 2004) e vacinas são ainda objetivo distante (WIDMER 2004). A eficácia da nitazoxanida, um agente sintético antiprotozoário testado em crianças mostrou redução na duração da diarreia e na eliminação de oocistos (RAMIREZ *et al.* 2004). Os efeitos da paramomicina e azitromicina estão

sendo estudados (LEAV *et al.* 2003).

1.5 Epidemiologia

No estudo das parasitoses há que se considerar três fatores que, inter-relacionados, determinam a ocorrência da doença: o parasita, o hospedeiro e o ambiente.

Os oocistos de *Cryptosporidium* persistem no ambiente podendo permanecer viáveis na água por mais de 140 dias e são resistentes à desinfecção com cloro usado para a água de consumo humano. Por esta razão, faz-se necessária a remoção física por métodos de filtração e pré-tratamento químico, medidas que não são eficientes para a remoção completa dos oocistos deste protozoário, mas que são meios de se reduzir o número de oocistos nas fontes de água. Nos EUA, o parasita tem sido identificado em 80 a 97% das águas superficiais (rios, lagos, lagoas, etc), e em 54% das águas tratadas (filtrada ou clorada) (SIMMONS III *et al.* 2001; LUNA *et al.* 2002).

Na França, um estudo das águas superficiais revelou a presença de *Cryptosporidium* em 78% em água residual não tratada e 52% em efluentes de sistema de tratamento de esgoto por lodos ativados (LEMARCHAND e LEBARON 2003).

A disposição dos resíduos, de animais e de humanos, continua sendo um problema de saúde pública que ainda necessita ser avaliado ou controlado na maioria dos países (SLIFKO *et al.* 2000). O homem, os animais de criação, de estimação e silvestres foram propostos como fonte de contaminação de oocistos de *Cryptosporidium* no ambiente. A contribuição do homem e de espécies animais na contaminação de fontes de água com oocistos é difícil de ser avaliada, devido à falta de tecnologia laboratorial para diferenciar os oocistos de *Cryptosporidium* de diversas fontes (XIAO *et al.* 2000).

A presença de condições especiais (fatores de risco), quer de

origem biológica, social ou estado imunológico do indivíduo, atua sobre a relação parasita-hospedeiro. Os ambientes confinados, como creches e hospitais representam o elo entre ambos, favorecendo a transmissão das protozooses (FRANCO 1996).

ROY *et al.*, em 2004, estudando fatores de risco para casos isolados de criptosporidiose em indivíduos imunocompetentes nos EUA, constataram que o contato com crianças de 2 a 11 anos de idade com diarreia, o contato com bovinos, as viagens internacionais e o contato com águas recreacionais não cloradas, foram fatores de risco significantes para a infecção por *Cryptosporidium*. Já a presença de doença crônica e, surpreendentemente, o consumo de vegetais crus representaram fatores de proteção.

Vários estudos estão sendo realizados com o intuito de desenvolver um modelo preditivo do risco para criptosporidiose. Nos EUA, a cidade de Nova York tem a maior taxa de prevalência dentre os indivíduos com Aids em áreas metropolitanas com população de 500.000 ou mais habitantes. Esta prevalência é de 52% do total de casos, enquanto pacientes com outros tipos de imunocomprometimento representam apenas 2% do total (MAKRI *et al.* 2004).

C. hominis e *C. parvum* são responsáveis pela maioria das infecções humanas, no entanto, novos genótipos de *Cryptosporidium* têm sido identificados sugerindo que a dinâmica de transmissão da criptosporidiose pode ser mais complicada do que anteriormente relatado na literatura (CAMA *et al.* 2003; GIBBONS-MATTHEWS e PRESCOTT 2003; RYAN *et al.* 2003; KASSA *et al.* 2004).

Aspectos críticos na epidemiologia da criptosporidiose são as observações históricas de que 170 espécies de animais excretam em suas fezes oocistos que possuem similaridade morfológica com o *C. parvum* e ainda que a criptosporidiose já foi relatada em mais de 90 países em seis continentes tanto em pacientes imunocomprometidos como em indivíduos imunocompetentes (FAYER *et al.* 2000, MORGAN *et al.* 2000, XIAO *et al.* 2000, HIGGINS *et al.* 2001,

DILLINGHAM *et al.* 2002, GIBBONS-MATTHEWS e PRESCOTT 2003).

A criptosporidiose nos mamíferos já foi relatada em pelo menos 150 espécies (LEAV *et al.* 2003). À exceção das infecções em porquinho-da-índia (*C. wrairi*) e gatos (*C. felis*), a maioria das espécies identificadas em mamíferos apresenta características morfológicas similares ao *C. parvum*.

Até o presente, oito espécies de *Cryptosporidium* já foram identificadas como causadoras de infecção humana: *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. muris*, *C. canis*, *C. suis* e *Cryptosporidium* genótipo do cervo (CAMA *et al.* 2003; DALLE *et al.* 2003; GATEI *et al.* 2003; JIANG e XIAO 2003; FAYER *et al.* 2004).

Embora o homem seja susceptível a várias espécies de *Cryptosporidium*, surpreendentemente, apenas algumas infecções mistas foram relatadas (TANRIVERDI *et al.* 2003). Muito raramente têm sido identificadas infecções mistas em isolados humanos com *C. hominis* e *C. parvum* (GUK *et al.* 2004). Outros relatos são os de infecção mista com *C. parvum* e *C. meleagridis* observados por PEDRAZA-DÍAZ *et al.* em 2001; *C. hominis* e *C. canis*; *C. hominis* e *C. meleagridis* observado por CAMA *et al.* em 2003; *C. hominis* e *C. parvum* genótipo suíno, *C. hominis* e *C. felis*, *C. muris* e *C. meleagridis*, *C. parvum* e *C. muris* observados por JIANG e XIAO em 2003.

Estudos realizados por McLAUCHLIN *et al.* (2000) com base na epidemiologia de *C. hominis* e *C. parvum* demonstraram os ciclos de transmissão distintos dos dois parasitas. O trabalho teve como objetivo investigar os hospedeiros reservatórios e as rotas de transmissão através da aplicação de marcadores moleculares para esses parasitas. Os autores observaram que a ausência de recombinação entre os dois genótipos de *C. parvum* indica que estas são populações isoladas, que não se reproduzem entre si, fato que suporta a suposição de que sejam duas espécies distintas. Uma vez que a gama de hospedeiros de cada

espécie é diferente, a epidemiologia da doença em humanos pode também apresentar diferenças, embora este tópico seja ainda pouco investigado.

Estudando a variação do gene SSU rRNA em isolados humanos na Inglaterra, GIBBONS-MATTHEWS e PRESCOTT (2003) não encontraram evidências de infecções mistas de *C. hominis* e *C. parvum*.

O significado das espécies zoonóticas de *Cryptosporidium* para a criptosporidiose humana ainda não está claro. Devido à ocorrência ubíqua de oocistos de *Cryptosporidium* em animais e no ambiente, é possível que os parasitas de origem zoonótica desempenhem um importante papel na criptosporidiose humana (PEDRAZA-DÍAZ *et al.* 2001; CAMA *et al.* 2003; PENG *et al.* 2003). De maneira semelhante, *C. hominis* já foi detectado em alguns macacos, carneiros e em um mamífero marinho (FAYER *et al.* 2004).

Em experimento para testar a resistência dos oocistos de *C. parvum* ao calor, FUJINO *et al.* (2001) observaram que os mesmos perderam a infectividade quando expostos a 60°C por 15 segundos ou a 70°C por 5 segundos, concluindo que o sistema de aquecimento de água pode ser útil para desinfecção de abrigos de gado bovino, galinheiros e currais de ovelhas.

Outro aspecto importante a ser lembrado é que, no Brasil, os indivíduos com diarreia, raramente, procuram atendimento médico, implicando na conseqüente falta de informação dos casos de infecção por *Cryptosporidium*. Para ilustrar a insignificante notificação da criptosporidiose, pode-se citar a vigilância passiva em Milwaukee, EUA, e a vigilância ativa da FoodNet que indicam uma taxa de notificação de aproximadamente um em cada 22.000 casos (MAKRI *et al.* 2004).

Nos EUA são notificados anualmente 3.000 casos de criptosporidiose. Esses dados são provavelmente subestimados devido ao fato da criptosporidiose não ser uma doença de notificação compulsória em todos os estados Americanos; os laboratórios e os médicos não comunicam todos os casos

confirmados; nem todas as pessoas com diarreia procuram assistência médica; nem todos os assistentes requerem o exame de fezes e ainda, nem todos os laboratórios incluem o teste para *Cryptosporidium* (DIETZ *et al.* 2000).

1.6 Taxonomia

É difícil determinar a época de emergência do *Cryptosporidium* por falta de dados fósseis e pela controvérsia no uso do relógio molecular para obter o tempo dos eventos evolutivos (XIAO *et al.* 2002).

A história da taxonomia do gênero *Cryptosporidium* é confusa e a posição taxonômica de várias espécies continua indefinida. Uma das razões para a divergência na taxonomia de *Cryptosporidium* é a falta de consistência na classificação dos parasitas protozoários em geral. A definição clássica de espécie como um grupo de população natural com multiplicação independente de outros grupos é de difícil aplicação para os protozoários. Como resultado, diferenças na morfologia, especificidade de hospedeiro, comportamento e distribuição geográfica, são freqüentemente usados como bases para definir espécies desse grupo de microrganismos.

As abordagens históricas fundamentam-se nas diferenças morfológicas e biológicas. Com a aplicação das técnicas moleculares, a taxonomia poderia incorporar dados genéticos como um dos parâmetros para validar *Cryptosporidium* spp existentes. (XIAO *et al.* 2000).

Para a correta identificação, ou ainda, para a denominação de uma nova espécie, devem ser combinados diferentes métodos como o morfológico, biológico e genético, porém poucos isolados já foram examinados por mais de uma dessas metodologias. As espécies são aceitas como válidas com base na especificidade do hospedeiro, morfologia do oocisto e sítio de infecção. No entanto, essas abordagens tradicionais não fornecem métodos confiáveis para identificação de espécies, segundo diversos autores (FAYER *et al.* 2000, PEDRAZA-DÍAZ *et al.* 2001, THOMPSON 2002, EGYED *et al.* 2003).

Com os estudos de TZIPORI *et al.* (1980) sobre transmissão cruzada de *Cryptosporidium* os autores observaram se tratar de uma espécie única parasitando diferentes hospedeiros, e salientam a necessidade da revisão taxonômica desses organismos. Em 1984, LEVINE propõe a consolidação das vinte espécies até então aceitas em apenas quatro principais: *C. muris*, em mamíferos, *C. meleagridis*, em aves, *C. crotali*, em répteis e *C. nasorum* em peixes. Em 1985, UPTON e CURRENT propõem que sejam duas as espécies parasitas de mamíferos: o *C. muris*, causando diarreia principalmente em bovinos e o *C. parvum* infectando diversos mamíferos. Em 1995 MORGAN e colaboradores sugerem que são dois os genótipos de *C. parvum* que infectam os humanos.

A presença de dois tipos de *C. parvum*, um, de origem humana (genótipo 1 ou H) e outro de origem bovina (genótipo 2 ou C), que normalmente afetam o homem foi demonstrada através da utilização de métodos fenotípicos e genotípicos. Recentemente, o *C. parvum* genótipo humano foi descrito como uma espécie distinta, recebendo o nome de *C. hominis*, em referência ao seu único hospedeiro, o *Homo sapiens* (MORGAN-RYAN *et al.* 2002).

Entretanto, alguns relatos têm mostrado que outros animais e outras espécies de *Cryptosporidium* podem estar associados à doença humana. *C. meleagridis*, *C. felis* e *C. canis* têm sido observadas em indivíduos adultos HIV positivos bem como em crianças que residem em países em desenvolvimento (BORNAY-LLINARES *et al.* 1999; DILLINGHAM *et al.* 2002).

Mais de 20 espécies já foram descritas na literatura, mas a aceitação de todas ainda é controversa. Estudos biológicos, estudos do RNA ribossomal e genéticos sugerem que três grandes espécies gástricas (ou cloacal) – *C. muris*, *C. serpentis* e *C. baileyi* são espécies distintas das de menores dimensões e de localização intestinal como *C. parvum*, *C. hominis* e suas espécies próximas *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. wrairi* e possivelmente *C. saurophilum* e *C. nasorum* (DILLINGHAM *et al.* 2002). No entanto, RAMIREZ *et al.* (2004) classificam *C. baileyi* neste grupo.

Estudo recente, com base nas diferenças morfológicas dos oocistos, no local de infecção, na especificidade da classe de vertebrados e nas diferenças genéticas, considerou 13 espécies válidas: *C. muris* encontrado em roedores e ruminantes; *C. andersoni*, que infecta bovino; *C. parvum* que infecta bovino, homem e outros mamíferos; *C. meleagridis*, *C. baileyi* e *C. galli* em diferentes aves; *C. serpentis* e *C. saurophilum* em cobras e lagartos; *C. molnari* em peixes; *C. wrairi* em porquinho da índia; *C. felis* em gatos e *C. canis* em cães (RYAN *et al.* 2003). É interessante ressaltar que nesta lista não foi incluída a espécie *C. hominis*, que infecta o homem, embora a data de publicação seja posterior à data de publicação da descrição desta espécie, por alguns pesquisadores desse mesmo grupo.

A espécie *C. blagburni*, parasita de aves é proposta por causa de sua localização única no proventrículo de Fringiliidae e análises filogenéticas dos genes 18S rRNA e HSP70 (JELLISON *et al.* 2004).

Oocistos morfologicamente indistinguíveis de *C. parvum* têm sido relatados em várias espécies de primatas não humanos. Recentemente, a análise molecular baseada em regiões do genoma como o ssrRNA, COWP, TRAP-C e HSP70 permite aos pesquisadores identificar *Cryptosporidium* ao nível de espécies e genótipos. Como resultado é possível a caracterização de novas espécies que podem representar modos de transmissão epizootica (da SILVA *et al.* 2003).

Se os métodos moleculares suportam as observações e as propostas dos primeiros taxonomistas e biólogos, estas devem ser reconhecidas quanto sua contribuição para a taxonomia desses organismos e então revisar a terminologia de acordo com as recomendações originais (THOMPSON 2002).

MORGAN *et al.* (1997) usando dois marcadores genéticos diferentes para os genótipos 1 e 2 de *C. parvum* e associando-os às diferenças biológicas, sugeriram que esta não é uma espécie uniforme. Posteriormente, THOMPSON (2002) e BANKIER *et al.* (2003), com base em grande número de

regiões polimórficas do genoma, relataram que pelo menos oito genótipos diferentes de *C. parvum* já foram identificados.

1.7 Diagnóstico

São inúmeros os trabalhos que destacam a importância de *C. parvum* como agente causal de diarreia severa e prolongada, causando morbidade e mortalidade em crianças mal nutridas e nos indivíduos com imunodeficiência. No entanto, a frequência desta protozoose entre crianças normais no Brasil ainda é pouco conhecida (SAREDI e BAVA, 1998, BARALDI *et al.* 1999, CEGIELSKI *et al.* 1999, CIMERMAN *et al.* 1999).

Este fato está relacionado, principalmente, com a dificuldade de detecção desses parasitas pelos métodos de exame parasitológico de fezes rotineiramente empregados devido às dimensões muito pequenas desses protozoários. Os métodos especiais de coloração que permitem sua visualização e identificação nem sempre são solicitados pelo clínico diante de um caso de diarreia em crianças consideradas normais, deixando assim sem diagnóstico possíveis casos de infecção por *C. parvum* (SODRÉ e FRANCO 2001).

A microscopia continua sendo o padrão ouro para o diagnóstico de parasitas, embora vários problemas estejam associados a esta técnica como método diagnóstico. Alguns parasitas, como *Cryptosporidium*, são semelhantes, muito pequenos, difíceis de corar e de serem detectados (SINGH 1997, PATEL *et al.* 1999; RIMHANEN-FINNE *et al.* 2001).

O diagnóstico laboratorial da criptosporidiose é feito pela demonstração de oocistos de *Cryptosporidium* sp nas fezes, após métodos de concentração baseados em princípios de flutuação ou centrifugo sedimentação. Após concentração, para permitir a visualização dos oocistos, são utilizadas técnicas de coloração especiais, como: Ziehl-Neelsen (a quente), Kinyoun (a frio), coloração negativa, coloração a quente de safranina-azul de metileno, coloração modificada de

Kohn, coloração modificada de Koster, auramina, entre outras (GARCIA e BRUCKNER 1997; de CARLI e SARAIVA 2001; MARTINEZ e BELDA NETO 2001). Porém, os oocistos de *Cryptosporidium* estão entre os menores estágios exógenos dos apicomplexos e algumas diferenças morfológicas não são visíveis na microscopia óptica (MORGAN *et al.* 1999).

Uma identificação acurada só pode ser feita por microscopistas bem treinados sendo que o diagnóstico microscópico é trabalhoso, cansativo e às vezes demorado (MORGAN *et al.* 1996, SINGH 1997). Em adição, a habilidade dos microscopistas pode variar grandemente entre os laboratórios, resultando em algumas infecções diagnosticadas equivocadamente ou mesmo não diagnosticadas. Mas, devido à dependência da morfologia do oocisto, estas metodologias são pouco úteis para avaliar amostras submetidas a condições desfavoráveis, como as amostras ambientais, que podem modificar sua morfologia (WARD e WANG 2001).

Os testes imunológicos para detecção de anticorpos são simples, rápidos e específicos, porém geralmente apresentam baixa sensibilidade e baixo valor preditivo negativo. Vários *kits* comerciais de testes imunoenzimáticos para detecção do antígeno específico, e que não são baseados na morfologia do oocisto, estão disponíveis. Por sua vez, os métodos sorológicos apresentam problemas como a dificuldade em diferenciar entre uma infecção corrente ou prévia, e ainda, os testes sorológicos têm valor limitado quando se examina indivíduos de áreas endêmicas com alta circulação de anticorpos. Pesquisa sorológica em uma favela na cidade de Fortaleza revelou mais de 90% de soropositividade em crianças, no seu primeiro ano de vida (DILLINGHAM *et al.* 2002). Em adição, o custo de produzir antígenos específicos purificados é alto (SINGH 1997).

É possível a detecção de antígenos do parasita nas fezes (coproantígenos), utilizando para tal o ensaio imunoenzimático ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) e imunofluorescência que emprega anticorpos policlonais ou monoclonais produzidos contra o *C. parvum* (GARCIA e SHIMIZU

1997, MAYER et al 1998). Entretanto, o limiar de detecção em fezes formadas pode ser tão alto como 50.000 a 500.000 oocistos por grama de fezes nos métodos microscópico e imunológico (GOBET *et al.* 1997; SCORZA *et al.* 2003). Uma das maiores desvantagens do método ELISA direto é o seu alto custo (FEITOSA *et al.* 2004).

O fator limitante das técnicas convencionais é que nenhuma é específica para o *C. parvum*, sendo ainda que todos os métodos citados requerem uma grande quantidade de oocistos para sua detecção positiva (STURBAUM *et al.* 2001).

O processamento das amostras de água requer a filtragem de grandes volumes de água, e todos os protocolos seguem o fluxo básico que é a concentração da água contendo oocistos, seguido da etapa de purificação e detecção com anticorpo monoclonal marcado com isotiocianato de fluoresceína, perdendo a especificidade para *C. parvum*. Isto é importante, pois nem todas as espécies de *Cryptosporidium* são infectantes para o ser humano, mas muitas têm tamanho e forma dos oocistos semelhantes ao do *C. parvum* (STURBAUM *et al.* 2001; LEMARCHAND e LEBARON 2003).

Portanto, métodos moleculares mais sensíveis, como a PCR são requeridos para detecção de pequeno número de oocistos (< 10.000) (JOHNSON *et al.* 1995, BALATBAT *et al.* 1996, MORGAN *et al.* 1998, ZHU *et al.* 1998, da SILVA *et al.* 1999). A biologia molecular pode fornecer aos epidemiologistas informações muito além das oferecidas pela microscopia tradicional, pela cultura e imunologia, auxiliando na vigilância de agentes infecciosos e na determinação das fontes de infecção (THOMPSON *et al.* 1998; MORGAN 2000).

1.8 Métodos Moleculares

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

microscópicos. De acordo com os objetivos do trabalho, em se tratando de pesquisa clínica ou ambiental, ou se diagnóstico clínico, ambiental ou epidemiológico, as técnicas moleculares são aplicadas no estudo da sistemática e ecologia dos parasitas, em particular sua taxonomia, evolução biológica, genética de populações, estrutura de comunidades, epidemiologia e interação com seus hospedeiros. Serão mencionadas aqui apenas as técnicas moleculares que são mais freqüentemente empregadas nos vários estudos de *Cryptosporidium*.

1.8.1 Hidridização de sondas de DNA

A hidridação de DNA ou sondas de DNA foram os primeiros métodos biológicos moleculares a serem desenvolvidos para diagnóstico. A sonda de DNA reconhece e hidridiza com a sequência alvo, que deve ser espécie-específica ou gênero-específica. A fim de aumentar a sensibilidade de detecção, a sequência alvo precisa estar presente em cópias múltiplas e pode ser de DNA ou RNA. Devido à existência de maior número de cópias de RNA por célula, a sensibilidade de detecção é maior com as sequências de RNA (SINGH 1997).

Para detectar a presença da sonda, isto é, quando a reação é positiva, esta é usualmente marcada antes de ser usada na hibridização. As primeiras sondas eram marcadas com P^{32} e detectadas pela exposição em filmes de raio-X. Atualmente, as sondas podem ser marcadas com biotina e detectadas pela avidina ou streptoavidina conjugadas às enzimas como fosfatase alcalina. As sondas também podem ser ligadas diretamente à enzima, sendo sua presença detectada com o uso de substrato cromogênico, o qual a enzima converte em produtos corados insolúveis (SINGH 1997). A especificidade e sensibilidade do método têm que ser avaliadas utilizando amostras clínicas provenientes de diferentes localizações geográficas para se ter certeza de que a sonda é capaz de detectar todas as cepas da espécie do parasita em questão.

1.8.2 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

O problema da baixa sensibilidade das reações de

hibridização de DNA ou a baixa quantidade de DNA do parasita presente na amostra, foi melhorado por um método capaz de amplificar milhares de vezes uma molécula de DNA alvo, com o uso de uma enzima, a Reação em Cadeia pela Polimerase. Na PCR, regiões específicas do DNA de interesse são amplificadas enzimaticamente. Durante a PCR, um segmento específico de ácido desoxiribonucleico (DNA) de fita dupla (ds, *double strand*) ou de fita simples (ss, *single strand*), pode ser amplificado, através de sucessivos ciclos. Com a utilização da transcriptase reversa o ácido ribonucleico (RNA) também pode ser amplificado.

Devido à grande sensibilidade e especificidade da PCR, ela tem sido usada para aumentar a detecção de *C. parvum* em amostras clínicas e ambientais (MONIS *et al.* 2002).

Com o intuito de investigar a aplicação do método molecular combinado com métodos convencionais, em programas de monitoramento de águas superficiais, LOWERY *et al.* (2001) demonstraram que a realização da PCR utilizando como iniciadores seqüências que amplificam uma proteína da parede do oocisto, COWP (*Cryptosporidium oocyst wall protein*) e SSU (*small subunit*) rRNA do genoma detectaram todas as espécies de *Cryptosporidium*. Mostraram-se também específicas pois foram incapazes de detectar outros protozoários. Todas as amostras positivas foram genotipadas pela amplificação e análise da seqüência do gene TRAP-C2 (que é *C. parvum* específica e detectados os genótipos 1 e 2 com sensibilidade de 5 oocistos por PCR) (PENG *et al.* 1997).

Durante investigação de infecção em gado numa fazenda na Polônia, usando a PCR seguida de seqüenciamento do gene SSU rRNA, BORNAY-LLINARES *et al.* (1999), puderam identificar a presença de *C. felis*.

Recentemente, a análise de isolados de *Cryptosporidium* infectando lêmures foi realizada pela PCR seguida de seqüenciamento, levantando o questionamento se a infecção foi causada pelos tratadores dos animais. (da SILVA *et al.* 2003).

Alguns trabalhos que utilizaram a PCR para estudo de *Cryptosporidium* são: KHUN *et al.* 2002, que estudaram fezes de gansos migratórios para verificar sua importância na disseminação de *Cryptosporidium* sp; SCORZA *et al.* 2003 que compararam a PCR e a IFA em amostras de fezes de gatos para testar a sensibilidade de cada uma das técnicas

Em pesquisa nas amostras de lodo de esgoto na Finlândia, RIMHANEN-FINNE *et al.* (2001) constataram que entre 44 amostras, nove foram positivas para *Giardia* e três (7%) para *C. parvum*. Concluíram que a PCR associada à captura imunomagnética (IC-PCR) e hibridação podem ser usadas para monitorar a ocorrência de criptosporidiose e giardiose em uma comunidade, bem como determinar a contaminação do lodo usado para melhoria do solo. Resultados semelhantes foram obtidos por DENG *et al.* (1997), que também recomendam a técnica para monitoramento ambiental desses organismos.

1.8.3 PCR Multiplex

Na PCR multiplex são utilizados dois ou mais pares de iniciadores, para identificação de espécies ou gêneros diferentes de organismos presentes em uma única amostra, realizando apenas uma única reação de PCR.

PATEL *et al.* (1999), estudando amostras de fezes humanas e de boi, descreveram um método de PCR multiplex que discrimina as espécies *C. parvum*, *C. wrairi*, *C. muris* e *C. baileyi*.

ORLANDI e LAMPEL (2000) desenvolveram uma PCR multiplex para detectar simultaneamente, *Cyclospora cayetanensis*, *C. parvum* e *Microsporidium spp.*

ROCHELLE *et al.* (1997a,b) utilizaram PCR e RT-PCR (*reverse transcriptase*) combinadas com a cultura de células para detectar e determinar a infectividade de *C. parvum* em água. Os autores verificaram que os iniciadores detectaram 10 oocistos usados para contaminar amostras ambientais e

foram compatíveis com PCR multiplex para detecção simultânea de *C. parvum* e *Giardia duodenalis*.

1.7.4 Nested-PCR (PCR dupla)

A *nested*-PCR é um método sensível de PCR no qual o produto amplificado (*amplicon*) é submetido a um segundo processo de amplificação utilizando um conjunto de iniciadores homólogos a seqüências internas do segmento já amplificado. Este procedimento torna a reação da PCR mais específica e sensível. Geralmente, na primeira PCR é utilizado um iniciador gênero-específico, e na segunda PCR um iniciador espécie-específico do parasita em estudo.

HIGGINS *et al.* (2001a) estudando a sensibilidade das técnicas de PCR para *Cryptosporidium*, verificaram que as amostras contendo até 200 oocistos eram positivas em uma única reação de PCR, enquanto que aquelas com 100 oocistos ou menos, requerem a utilização da *nested*-PCR.

Outro estudo para avaliar a sensibilidade da *nested*-PCR para subgenotipagem, utilizou oocistos de *Cryptosporidium* isolados de amostras de água. Os autores observaram 100% de amplificação nos tubos com 10 oocistos e 38% nos tubos com apenas um oocisto de *C. parvum*. (STURBAUM *et al.* 2001).

BALATBAT *et al.* (1996), utilizaram fezes humanas para desenvolver um método rápido e simples para investigação epidemiológica e clínica.

MAYER e PALMER em 1996 compararam as técnicas de PCR única e hibridação, e a *nested*-PCR, para detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia* em esgoto.

PERZ e Le BLANCQ (2001) e SULAIMAN *et al.* em 2000 utilizaram esta técnica para análise filogenética de *Cryptosporidium* em amostras de fezes humanas e de diversos animais, provenientes de diferentes regiões geográficas.

SULAIMAN *et al.* (1999) e WARD (2002) empregaram a *nested*-PCR em vários tipos de amostras de água em um estudo realizado na Europa.

TIANGTIP e JONGWUTIWES (2001) realizando *nested*-PCR seguida de seqüenciamento, do gene 18S rRNA, em pacientes na Tailândia, encontraram *C. hominis* mais prevalente, com ocorrência apenas nos indivíduos adultos. Três outros isolados eram idênticos a *C. meleagridis* e os outros dois isolados, um era idêntico a *C. felis* e o outro a *C. muris*. Nas crianças HIV positivas foram encontradas apenas *C. meleagridis* e *C. muris*.

1.7.5 Real Time PCR (PCR em tempo real)

Uma inovação na tecnologia da PCR foi o desenvolvimento de equipamentos e técnicas que permitem o monitoramento da PCR em tempo real. Ao princípio da técnica original foi incluída uma coloração intercalada, específica de dsDNA (brometo de etídio) na PCR para monitorar as mudanças na fluorescência ao final de cada ciclo usando uma câmera digital e um fluorômetro ligados ao tubo da reação. A técnica foi modificada para usar o SYBR Green 1 (que é o corante de escolha atual) em um termociclador/fluorômetro de capilar de vidro especialmente desenhado. O monitoramento em tempo real elimina a necessidade da detecção dos produtos amplificados por eletroforese e simplifica a PCR quantitativa pela possibilidade de identificação do ciclo no qual a amplificação inicia (valor Ct). O padrão de concentração conhecida do DNA do organismo (*template*) e amostras desconhecidas são amplificadas ao mesmo tempo e seus valores de Ct determinados e comparados. Uma curva padrão pode ser construída com esses dados e calculado o número dos moldes iniciais desconhecidos nas amostras.

Quanto maior o número de cópias do alvo inicial do ácido nucléico, mais rápido um significativo aumento na fluorescência é observado. Essa quantidade da seqüência alvo é automaticamente calculada pelo programa (FONTAINE e GUILLOT 2002).

O desenvolvimento dos sistemas de sonda baseados na

fluorescência tem aumentado a sensibilidade e especificidade do real-time PCR e tem fornecido ferramentas para discriminação de alelos e monitoramento da PCR multiplex. O primeiro deles a ser usado no real time PCR foi a sonda fluorogênica duplamente marcada, que efetivamente produz sinal de amplificação em adição à amplificação do DNA pela PCR.

Estudos recentes mostram o avanço do uso da metodologia de Taq-Man™ PCR para identificar espécies particulares de *Cryptosporidium* em teste em apenas um tubo, sem a necessidade de restrição por digestão. Além disso, o teste com sonda fluorogênica permite a quantificação dos produtos do real-time PCR, sem a necessidade de eletroforese e densitometria (HIGGINS *et al.* 2001b).

LIMOR *et al.* (2002) desenvolveram uma técnica de PCR em tempo real e prova de hibridação, capaz de detectar e diferenciar os cinco *Cryptosporidium* que são patogênicos para o homem: *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis* e *C. canis*.

TANRIVERDI *et al.* (2002) padronizaram uma técnica de PCR em tempo real para detectar e genotipar *C. parvum* presente em amostras fecais humana e de animais.

FONTAINE e GUILLOT (2002) desenvolveram um teste de PCR em tempo real com a tecnologia Taq-Man™ para quantificar os oocistos de *C. parvum* e *C. hominis*, quando detectaram também *C. meleagridis*. Posteriormente, empregaram a metodologia para testar sua estabilidade em oocistos inativados pelo calor (FONTAINE e GUILLOT 2003).

AMAR *et al.* (2004) padronizaram uma técnica de PCR em tempo real seguida de RFLP para detectar, principalmente, *C. hominis* e *C. parvum* em amostras fecais.

1.8.6 PCR e Hibridização

As técnicas de PCR e hibridização foram utilizadas por LAXER *et al.* (1991) no estudo de fezes de bovino, para desenhar um par de iniciadores específico para *C. parvum*, o qual foi utilizado no presente trabalho.

JOHNSON *et al.* (1995) desenvolveram um protocolo para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de água, testando a metodologia em amostras de fezes bovina e amostras de água. Analisaram, também, os efeitos inibidores da formalina.

LABERGE *et al.* (1996) empregaram a PCR seguida de hibridização para a análise de *Cryptosporidium* presente em amostras de leite cru e ROCHELLE *et al.* 1997 em um estudo para comparação de sensibilidade de *primers*.

MORGAN *et al.* (1997) usaram as técnicas de PCR e hibridização para diferenciar entre os genótipos humano e animal de *C. parvum*, em amostras de fezes humanas e de animais.

RIMHANEN-FINNE e HÄNNINEN (2001) fizeram uso da hibridização após a PCR para confirmar a presença de *C. parvum* em lodo de esgoto na Finlândia.

LAXER *et al.* (1991) utilizaram a PCR seguida de hibridização para aumentar a sensibilidade e confirmar a especificidade dos *primers* que eles construíram.

1.8.7 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

A amplificação randômica do DNA polimórfico (RAPD) também conhecida como AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR) tem sido utilizada extensivamente para delineamento de cepas em estudos de epidemiologia. Na RAPD não é necessário o conhecimento da sequência de DNA. Em contraste com as outras técnicas de genotipagem, a RAPD faz uso de amplificações randômicas do genoma.

Os fragmentos são separados em gel de eletroforese e o padrão de bandas resultante é usado como perfil genômico (*fingerprint*) para comparação das cepas (MONIS e ANDREWS 1998).

Em geral, a RAPD é o método mais usado para delineamento das cepas de micro-organismos. No entanto, a natureza da técnica limita sua aplicação. A validade do uso da RAPD para inferir a filogenia tem sido questionada por vários pesquisadores (MONIS e ANDREWS 1998). A aplicação prática da RAPD como método diagnóstico tem algumas limitações (SINGH 1997). Deve-se ter cuidado ao usar a RAPD, pois a reprodutibilidade da técnica pode ser afetada por muitos fatores incluindo a qualidade da amostra de DNA (presença de DNA estranho, o que pode ser esperado em amostras ambientais e fecais).

A reprodutibilidade dos padrões de bandas é muito sensível às condições da reação empregada e pode ser afetada pela variação de equipamentos e reagentes usados entre os laboratórios. Além disso, a RAPD não pode ser usada para a caracterização das amostras de campo porque não permite a detecção de cepas múltiplas dentro de uma amostragem e os padrões de bandas são afetados pela concentração de DNA usado na reação (MONIS e ANDREWS 1998, THOMPSON *et al.* 1998).

A técnica da RAPD usa um iniciador único ou, ocasionalmente, uma combinação de iniciadores e condições de baixa estringência para permitir a amplificação de segmentos randômicos do genoma. (MONIS *et al.* 2002).

A RAPD foi utilizada para o desenho de *primers* por MORGAN *et al.* 1996 e WU *et al.* 2000.

1.8.8 AFLP (*A m p l i f i e d F r a g m e n t L e n g t h P o l y m o r p h i s m*)

É uma técnica de *fingerprint* que permite a detecção de polimorfismo no DNA sem informação prévia da sequência. Na análise da AFLP, o DNA genômico é digerido com enzimas de restrição, ligadas a adaptadores e um

SUBSET dos fragmentos de DNA são amplificados.

A AFLP é uma técnica que emprega a PCR para amplificar, seletivamente, os grupos de fragmentos de restrição de um DNA genômico total, digerido. São quatro etapas: digestão do DNA, ligação, amplificação e análise do gel. Os polimorfismos são identificados pela presença ou ausência dos fragmentos de DNA, através da análise em gel de poliacrilamida. Algumas vantagens dessa técnica são a capacidade de investigar um genoma inteiro para polimorfismo e a reprodutibilidade do método (BLEARS *et al.* 2000).

BLEARS *et al.* (2000) empregaram a AFLP para realizar o *fingerprint* de várias cepas de *C. parvum* isoladas de diferentes mamíferos obtidos de várias localizações geográficas.

1.8.9 PCR-SSCP (*Single-Strand Conformation Polymorphism*)

Os sistemas baseados na PCR, desenhados para amplificar, especificamente, uma região definida do genoma, não sofrem as mesmas limitações que a RAPD. As seqüências de nucleotídeos obtidas dos fragmentos amplificados podem ser usadas para reconstruir a filogenia e o método SSCP pode ser usado para detectar a presença de múltiplas cepas numa amostra.

A PCR-SSCP explora o fato de que a conformação do ssDNA é determinado pela seqüência de DNA e de que as diferenças nas conformações podem ser prontamente identificadas pela eletroforese em gel.

GASSER *et al.* (2003) estudando isolados humanos no Reino Unido, detectaram uma significativa variação na população dentre cada um dos dois genótipos de *C. parvum*.

WU *et al.* (2003) empregaram a PCR-SSCP para análise do

polimorfismo dos genótipos de *Cryptosporidium* em isolados humanos do Japão, da Itália e do Nepal; de bovinos do Japão e da Itália e de cabras da Itália.

1.8.10 PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

A PCR-RFLP é um método que detecta variações mínimas num gene onde uma única substituição de base pode criar um sítio capaz de ser digerido pela enzima de restrição endonuclease, ou abolir o sítio de restrição. As endonucleases são enzimas provenientes de bactérias que cortam ou digerem nucleotídeos específicos da dsDNA. Na PCR-RFLP, a PCR é usada para amplificar a região do gene de interesse e os produtos da amplificação (*amplicons*) são digeridos pelas enzimas e analisados em gel de agarose ou de poliacrilamida por eletroforese.

Marcadores moleculares provêm ferramentas valiosas para a epidemiologia, especialmente para identificação de vias de transmissão, fontes de infecção e para diagnóstico. Os métodos com base na reação de polimerase em cadeia, como o PCR-RFLP ou PCR-SSCP são particularmente adequados para amostras ambientais porque eles permitem a detecção de múltiplos genótipos em uma mesma amostra (MONIS e ANDREWS 1998; THOMPSON *et al.* 1998).

A PCR-RFLP tem sido utilizada com objetivos diversos (GOBET 1997, GUYOT 2002, MCLAUCHLIN *et al.* 1999, 2000, WIDMER *et al.* 1998). No Peru, XIAO *et al.* (2001) utilizaram PCR-RFLP para estudo e verificaram que, de 85 episódios de infecção por *Cryptosporidium* em crianças, 79% eram por *C. parvum* genótipo humano; oito *C. parvum* genótipo bovino; sete *C. meleagridis*; duas *C. parvum dog genotype* e uma *C. felis*.

Um estudo de 29 amostras de águas pluviais de enxurrada em Nova York, USA, 27 foram positivas. Os autores utilizaram PCR-RFLP nos estudos e identificaram 12 genótipos de *Cryptosporidium*, sendo que nenhum era genótipo humano, e nem genótipo animal (de fazenda ou de estimação) (XIAO *et al.*

2000b).

Usando *nested*-PCR e RFLP, XIAO *et al.* (2001) digeriram o produto da segunda PCR com as enzimas de restrição SspI e VspI e verificaram que nas águas de superfície estavam presentes *C. parvum* genótipos humano e bovino, *C. baileyi* e *C. andersoni*-*C. muris* e nas águas servidas (usadas) *C. parvum dog genotype*, *C. andersoni*-*C. muris*, *C. felis* e *Cryptosporidium sp*, sendo que o *C. parvum* foi a espécie predominante nas águas superficiais

Na Irlanda do Norte GLABERMAN *et al.* (2002), com o objetivo de relacionar três surtos ocorridos, determinaram que os surtos eram independentes, ao utilizarem a técnica de RFLP.

Usando amostras de fezes de homem, boi, cobra, lagarto, porquinho-da-índia, camelo e galinha, para estudos filogenéticos, XIAO *et al.* (1999b), após a PCR, clonaram o fragmento amplificado para sequenciamento e paralelamente usaram uma *nested*-PCR e RFLP e identificaram duas linhagens: (i) *C. parvum*, *C. wrairi* e *C. baileyi* e (ii) *C. muris* e *C. serpentis*.

Em outro estudo, XIAO *et al.* (1999a) para verificar a diversidade genética dentre *C. parvum* e espécies relacionadas em fezes de humanos, bovino, cão, gato, porco, peru, furão e macaco, aplicaram a *nested*-PCR seguida de digestão por SspI para diagnóstico da espécie ou VspI para genotipar o *C. parvum*.

KIMBELL III *et al* (1999) usaram a *nested*-PCR e RFLP do gene 18S rRNA para diferenciar *C. serpentis* de *C. parvum* e *C. wrairi*.

Em estudo sobre a adaptação do *Cryptosporidium* aos hospedeiros, XIAO *et al.* (2002) utilizaram a *nested*-PCR para diversas regiões do DNA (ssRNA, HSP70 e o gene actina), seguida de sequenciamento e análise filogenética. Ressaltam que os achados recentes de *C. meleagridis* em humanos, o qual é responsável por tantos casos de infecção quanto o *C. parvum* genótipo bovino

em algumas áreas, indica que a expansão do hospedeiro também é significativa para a saúde pública. Deve-se ainda estar atento para o fato de que outras espécies também podem possuir uma gama maior de hospedeiros podendo emergir como novo parasita humano quando as condições ambientais e sócio-econômicas favorecerem sua transmissão.

Na Columbia Britânica, Canadá, entre casos isolados e de surtos de criptosporidiose, 50% eram *C. parvum* genótipo humano e 50% genótipo animal (ONG *et al.* 1999).

ELWIN *et al* (2001) descreveram uma metodologia de PCR dupla e RFLP para identificar polimorfismos de *C. parvum* usando o gene TRAP-C2, com o objetivo de aplicação da técnica na investigação de fontes de infecção da doença.

Na Tailândia, de 24 isolados de pacientes adultos HIV positivos, três eram idênticos ao *C. meleagridis*, e outros dois eram *C. felis* e *C. muris*. Entre as quatro crianças HIV positivas, foram identificadas *C. meleagridis* e *C. muris* (TIANGTIP e JONGWUTIWES 2002).

GIBBONS-MATTHEUS e PRESCOTT (2003) fizeram uso da PCR dupla e RFLP para verificar as variações no gene SSU rRNA de *C. parvum* de humanos e verificaram que não ocorreu a existência de *C. hominis* e *C. parvum* num mesmo isolado. No entanto, observaram significativa variação entre os clones, indicativo de que populações mistas dentro de cada genótipo possa existir.

PALMER *et al.* (2003) registraram pela primeira vez a ocorrência de *C. muris* no Hemisfério Oeste, de um isolado de um paciente HIV positivo, no Peru.

Para elucidar a dinâmica de transmissão da criptosporidiose em Milwaukee, ZHOU *et al.* (2003) observaram a presença de seis tipos do parasita

presentes no esgoto doméstico: *C. hominis*, *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. muris*, *C. mouse* genotype, *C. cervide* genotype.

1.8.11 Microsatélites

Devido ao alto grau de variação entre indivíduos, os *loci* hipervariáveis também são úteis como ferramentas de *fingerprint*, para fornecer marcadores para identificação de cepas. Os microsatélites ou SSR (Simple Sequence Repeat), de dois a quatro nucleotídeos de tamanho, estão dispersos através do genoma da maioria dos organismos, estando presentes em todos os organismos eucariotos.

Os microsatélites têm sido usados para examinar a variação genética ao nível de cepas de *Cryptosporidium* (THOMPSON *et al.* 1998; CHAPPELL e OKHUYSEN 2002; ENEMARK *et al.* 2002; WIDMER 2004).

Microsatélites são marcadores muito polimórficos que podem ser úteis em estudos epidemiológicos e investigação de surtos, como genotipagem para identificação das fontes de infecção e rotas de transmissão da criptosporidiose (ALVES *et al.* 2003). Estes pesquisadores fizeram uso do microsatélite ML2 para genotipar os isolados de pacientes HIV positivos em Lisboa.

GUK *et al.* (2004) empregaram microsatélites para verificar a infecção mista de *C. hominis* e *C. parvum* em uma criança de oito anos de idade da República da Coreia.

1.8.12 Heteroduplex

O teste de mobilidade do heteroduplex (HMA) é uma técnica que tem sido usada para a caracterização rápida da heterogeneidade entre dois segmentos de DNA, geralmente, produtos da amplificação da PCR. A técnica compreende misturar junto o DNA de referência de uma sequência conhecida com a amostra teste, aquecendo para denaturar e resfriando lentamente. Durante o re-

anelamento, a fita simples reconstitui as duas originais homoduplex mais a heteroduplex composta de uma fita de cada *amplicon* presente na mistura. As bandas homoduplex e heteroduplex podem ser caracterizadas em eletroforese de gel de poliacrilamida: heteroduplex com bases misturadas migram mais vagarosamente do que as homoduplex (LEONI *et al.* 2003 a,2003b).

O método do HMA é uma ferramenta útil para a análise de subgenótipos de amostras de surtos e um método rápido de *screening* para distinguir a diversidade em amostras de casos esporádicos de criptosporidiose. Pode ser usado para caracterizar seqüências de DNA como um método alternativo para o seqüenciamento (LEONI *et al.* 2003a, 2003b).

1.9 Epidemiologia Molecular

Discussões semânticas e de orientação disciplinar obscurecem o valor da epidemiologia molecular em entender a causa da doença. (THOMPSON *et al.* 1998)

A epidemiologia molecular combina as disciplinas de biologia molecular, epidemiologia e bioestatística (MONIS e ANDREWS 1998). A epidemiologia molecular, seja de doenças infecciosas ou outras, ainda é extremamente fundamentada nos estudos descritivos das técnicas de tipagem de cepas, marcadores biológicos, genética de populações e análise filogenética dos organismos (THOMPSON 2001; CONSTANTINE 2003). Marcadores moleculares têm sido utilizados para identificar o agente etiológico da doença, para diagnosticar o estado da doença e estudar os padrões de transmissão da doença.

A epidemiologia molecular envolve a aplicação de técnicas para diferenciar agentes infecciosos muito próximos ou para documentar modos de transmissão de cepas e espécies de uma população (THOMPSON *et al.* 1998). Os métodos da PCR têm produzido bons marcadores para o estudo da epidemiologia parasitária (MONIS e ANDREWS 1998).

A análise filogenética dos dados moleculares talvez seja o requerimento mais fundamental para a identificação do parasita e o estudo da ecologia do parasita é a disponibilidade de uma estrutura sistemática sólida. Pode-se utilizar como exemplo *G. duodenalis* (sinonímia: *G. lamblia*, *G. intestinalis*) que compreende pelo menos sete linhagens distintas. A identificação dessas linhagens é importante porque apenas duas são conhecidas como infectantes para o homem, enquanto as demais parecem ser parasitas de animais.

O método molecular tem sido muito usada para caracterizar os genótipos de *Cryptosporidium parvum* isolados de vários surtos, em diferentes localizações geográficas na Europa, Américas e Austrália, com o intuito de associar o genótipo do parasito com o ciclo de transmissão da doença. É importante se determinar a causa da infecção para uma rápida aplicação das estratégias de intervenção (ONG *et al.* 1999).

Embora a grande maioria das infecções clínicas humanas seja com *C. parvum* genótipo 1 (atualmente, *C. hominis*) e genótipo 2, a gama de espécies e genótipos que infectam o homem e outros animais é maior do que se pensava. Portanto, o desafio para a epidemiologia molecular é desenvolver boas técnicas reprodutíveis para a caracterização subgenotípica com a finalidade de determinar a fonte de infecção durante os surtos e para que a dinâmica de transmissão possa ser estudada nos focos endêmicos.

A identificação e caracterização genotípica, por técnica de biologia molecular, das amostras de *Cryptosporidium sp*, isoladas a partir de material fecal, é ferramenta fundamental para se entender melhor o papel do homem e dos animais como reservatórios e fontes de infecção humana, bem como identificar outras fontes de infecção, como a hídrica, por exemplo.

Pode-se ilustrar a importância da biologia molecular na elucidação da epidemiologia de *C. meleagridis* que tem transmissão cruzada e parece infectar uma grande variedade de hospedeiros que incluem aves (galinha e peru) e

mamíferos (homem, bezerro, suínos e camundongos). A habilidade de um isolado de *Cryptosporidium* de aves infectar mamífero tem implicações epidemiológicas significantes em relação à saúde pública humana em termos de transmissão e de risco associado com a exposição a aves e possivelmente a outros mamíferos. E é somente com o emprego de técnicas moleculares, como por exemplo, PCR-RFLP ou PCR dupla e sequenciamento que se faz a distinção entre *C. hominis*, *C. parvum* e *C. meleagridis*.

Epidemiologia molecular tem impacto direto na pesquisa das doenças infecciosas em todos os níveis: investigação de surtos, vigilância e estratégias de intervenção, com finalidade de prevenir morbidade e mortalidade. (HASNAIN 2003).

1.10 Estudos de *Cryptosporidium* e da criptosporidiose no Brasil

Não é a intenção desse item esgotar o assunto sobre *Cryptosporidium* e criptosporidiose no Brasil. Em nosso país, esses estudos ainda são muito escassos. O motivo dessa escassez pode ser bem entendido na pesquisa que WIEBBELLING et al. (2002) realizaram sobre o conhecimento de criptosporidiose em uma amostra de médicos de Porto Alegre, na qual concluem que esta é uma doença pouco conhecida, inclusive pelos médicos. Esses dados corroboram o resultado obtido anteriormente por SODRÉ e FRANCO (2001), que, ao aplicar uma pesquisa dentre os laboratórios, verificaram que poucos são aqueles que fazem o diagnóstico laboratorial de *Cryptosporidium* rotineiramente, só realizando o teste mediante solicitação médica. Outro exemplo que ilustra esse desconhecimento é um inquérito coproparasitológico, realizado em pré-escolares residentes em áreas de baixa renda, na cidade do Rio de Janeiro. A prevalência geral para o parasitismo intestinal encontrada foi de 54,5%, não tendo sido incluída a pesquisa específica para oocistos de *Cryptosporidium* (COSTA-MACEDO et al. 1998);

LIMA e STAMFORD (2003) citam que no Brasil foram

detectados 2.842 casos da doença no período de 1980 a 1997 entre os pacientes imunodeprimidos, particularmente, aqueles portadores de Aids, sendo que as regiões Nordeste e Sudeste são as mais afetadas do país. Os autores chamam a atenção para o fato de que nem todos os indivíduos infectados apresentam sintomas, mas eliminam oocistos, fato de grande importância para a saúde pública.

Foi na década de 1980 que, de maneira semelhante ao que ocorreu em outros países, iniciam-se os estudos de *Cryptosporidium* no Brasil, que acometia os pacientes HIV-positivos, causando quadros graves de diarreia. Os trabalhos realizados em São Paulo, entre pacientes com Aids, registram as seguintes taxas de prevalência da criptosporidiose: 12,1% (DIAS *et al.* 1988); 14,3% (RODRIGUES *et al.* 1991), 19,1% (SAUDA *et al.* 1993), 7% (CIMERMAN *et al.* 1999), 6,4% (CAPUANO *et al.* 2001). JABUR *et al.* (1996) estudaram um grupo de pacientes submetidos a transplante renal e sugerindo que, devido ao encontro de número significativamente maior de amostras fecais com a presença de oocistos neste grupo, o mesmo deva ser considerado como grupo de risco para criptosporidiose. Também estudando um grupo de pacientes submetidos a transplante renal, um grupo de pacientes portadores de insuficiência renal crônica (que fazem hemodiálise) e um grupo de pacientes com hipertensão arterial sistêmica, não imunossuprimidos, CHIEFFI *et al.* (1998) obtiveram resultado semelhante ressaltando que a maioria dos pacientes transplantados não tinha diarreia quando estava eliminando oocistos. E em 2002, FERREIRA e BORGES publicaram uma revisão sobre as infecções que afetam os indivíduos imunocomprometidos, submetidos a transplante de rins, medula óssea, fígado, coração, etc, e, principalmente os indivíduos com Aids e nomearam o *C. parvum* como o segundo protozoário que causa mais infecções oportunistas nesses pacientes.

O outro grupo de maior incidência de infecção com *Cryptosporidium* é o de crianças até cinco anos de idade. Estudando a incidência das diarreias infantis agudas, em Belém, LINHARES *et al.* (1990) observaram 2,7% enquanto LOUREIRO *et al.* (1989) obtiveram 5,2% de crianças infectadas com *Cryptosporidium*. Num estudo de crianças com diarreia aguda atendidas em

hospital, na cidade de São Paulo, foi observado 14,43% de infecção, com tendência ao predomínio na faixa etária de 6 a 12 meses de idade (MANGINI *et al.* 1992). O trabalho de GUIZELINI e AMATO NETO (1992), de pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* em fezes diarréicas de aidéticos e de crianças imunocompetentes, registrou a prevalência de 10,4% de criptosporidiose, com porcentagens mais elevadas entre os indivíduos com Aids e crianças freqüentadoras de creches, na cidade de São Paulo. Em Recife, num estudo transversal entre lactentes com quadro de diarréia aguda atendidos em hospital, a incidência foi de 6,4%, de criptosporidiose, enquanto no grupo controle, ou seja, entre os lactentes sem diarréia, não houve caso (da SILVA *et al.* 1994). Em Uberlândia, Minas Gerais, a maior positividade ocorreu entre as crianças de 0 a 36 meses de idade (GENNARI-CARDOSO *et al.* 1996). Na cidade de Campinas, São Paulo, foram colhidas três amostras de fezes, em dias alternados, de crianças com ou sem diarréia, de oito creches. Do total de crianças, 6,4%, apresentaram oocistos nas fezes, sendo que apenas uma criança não estava na faixa etária de 0 a 12 meses de idade (FRANCO e CORDEIRO 1996). O estudo retrospectivo de dois anos realizados com as crianças de 0 a 24 meses de idade, com diarréia, atendidas em hospitais em Porto Alegre, revelou 20% de infecção (CANTALICE NETO *et al.* 1998). Em Maringá, Paraná, o *Cryptosporidium* foi o segundo parasita mais freqüente, ocorrendo em 6,6% das crianças com diarréia (MOITINHO *et al.* 1999), principalmente entre aquelas de 12 a 24 meses de idade. O estudo transversal com inquérito domiciliar na zona urbana de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, revelou a prevalência de 1,1% de infecção entre as crianças de 0 a 59 meses de idade (OSHIRO *et al.* 2000). No estudo de crianças de 2 semanas a 10 anos de idade, hospitalizadas com diarréia e desidratação, em seis hospitais de Goiânia, foi observada a prevalência de 14,4% de infecção (PEREIRA *et al.* 2002). No Rio de Janeiro, um estudo entre crianças menores de 10 anos de idade, com indicação clínica de rotavírus, detectou 3,3% das crianças infectadas com *Cryptosporidium*, cujos oocistos foram encontrados, indistintamente, em fezes diarréicas e pastosas (da SILVA *et al.* 2003). Em Criciúma, Santa Catarina, foi observada a alta prevalência de 85,1% (SCHNACK *et al.* 2003), nunca antes registrada.

Um estudo sorológico entre crianças de Fortaleza, no Ceará, e de Anhui, na China, verificou que a maioria das crianças brasileiras adquiriu anticorpos no primeiro ano de vida, com muito mais frequência do que as crianças chinesas de área rural. O estudo de coorte dessas crianças revelou que 29,8% das crianças da favela de Fortaleza tiveram infecção nos primeiros dois anos de vida (ZU *et al.* 1994; NEWMAN *et al.* 1998). Há ainda outros estudos dessa mesma localidade (WEIKEL *et al.* 1985; LIMA *et al.* 1992; AGNEW *et al.* 1998).

Quanto à presença de *Cryptosporidium* no ambiente aquático, em estudo realizado em Itaquaquecetuba, São Paulo, GAMBA *et al.* (2000) amostraram 10 pontos, e oito revelaram a presença de oocistos de *Cryptosporidium*, e ressaltam que no Brasil, a água de superfície é uma importante fonte natural e deve ser protegida das diversas formas de contaminação. No rio Atibaia, também no estado de São Paulo, FRANCO *et al.* (2001) observaram que todas as amostras de águas superficiais, apesar da alta turbidez, coletadas em três semanas consecutivas, foram positivas para oocistos de *Cryptosporidium*. Em um estudo realizado entre pacientes imunodeficientes de Fortaleza, analisando os fatores de risco, WUHIB *et al.* (1994) sugerem que a transmissão pela água deve ser um fator importante a ser estudado.

Além das águas de consumo, duas amostras de água mineral, comercializadas em Campinas, São Paulo, foram encontradas contendo oocistos de *Cryptosporidium* (FRANCO e CANTUSIO NETO 2002). Na região de Ribeirão Preto, São Paulo, foi detectada a presença de oocistos em alface e rúcula (CAPUANO *et al.* 2001), posteriormente, em Pernambuco, também foi registrada a contaminação de alface (SILVA *et al.* 2003).

O Estado de São Paulo contribui ainda com várias pesquisas acadêmicas, como a avaliação da eficácia do colostro bovino (ABREU 2001), métodos parasitológicos e imunológicos de diagnóstico (GUIZELINI 1991; BRAZ 1997; CASIMIRO 2003), presença de oocistos em águas COUTINHO-FARIAS 2000, MULLER 2000; ESPINDOLA 2001; HACHICH 2002), e estudos

epidemiológicos (GRISI 1993; LALLO 1993; FRANCO 1996; TOMPS 1998), comparação de métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares (GONÇALVES 2002; GOMES 2003) e epidemiológicos e genotipagem (ARAUJO 2004) não havendo, até o momento, qualquer estudo de padronização de técnicas moleculares adequadas à realidade dos laboratórios brasileiros.

Nos estudos de GONÇALVES 2002, GOMES 2003, e ARAUJO 2004, foi seguida a mesma metodologia descrita por da SILVA et al. 1999, para concentração, extração e purificação do DNA genômico, através do uso de kits importados, empregando o FastDNA[®] kit (BIO 101, Inc., Vista, CA) para extração do DNA e o QIAquick PCR purification kit (Qiagen Inc., Santa Clarita, CA) para remoção dos inibidores de PCR.

Além das pesquisas citadas, há ainda três outros estudos de genotipagem de isolados de pacientes brasileiros, que foram realizados no exterior (ORTEGA *et al.* 1991). Uma pesquisa encontrou quatro isolados de *C. hominis*, dois de *C. parvum* e dois não-*C. parvum*, isolados de pacientes HIV positivos da cidade de Fortaleza (BRANTLEY *et al.* 2003). Outra pesquisa revelou resultados bem diferentes, registrando a ocorrência apenas de *C. hominis*, isolados de sete crianças brasileiras da cidade de Aracaju (GATEI *et al.* 2003).

2. JUSTIFICATIVA

Desde que os exames microscópicos estão em um dos procedimentos mais demorados num laboratório clínico, o uso de testes moleculares pode significar um diagnóstico mais efetivo. Entretanto, os métodos de PCR precisam ser aperfeiçoados antes dos métodos diagnósticos se tornarem disponíveis. A aplicação clínica vai depender da disponibilidade de sistemas de detecção altamente padronizados, incluindo métodos de coleta, processamento da amostra, detecção e identificação dos produtos de PCR (MORGAN 2000).

A PCR foi um dos primeiros sistemas de amplificação do ácido nucléico, desenvolvido e é, talvez, a técnica de amplificação mais usada atualmente na pesquisa. A especificidade e sensibilidade as tornam uma ferramenta útil para detecção e caracterização de grande variedade de patógenos. Em termos práticos, essas técnicas podem ser usadas como simples testes de “presença/ausência”. Em adição à detecção do parasita, a PCR pode ser usada para determinação da estrutura populacional e na caracterização de organismos que não podem ser cultivados ou purificados, como é o caso dos parasitas intracelulares (MONIS *et al.* 2002).

Em amostras ambientais, a separação imunomagnética seguida pela PCR (ou IC-PCR) é pelo menos 100 vezes mais sensível do que a microscopia de imunofluorescência (RIMHANEN-FINNE e HÄNNINEN 2001).

Os carboidratos e muitos outros componentes químicos presentes nas amostras fecais são sabidamente fortes inibidores de PCR. Uma vez que a composição e concentração (fezes diarréicas ou fezes formadas) dos espécimes fecais enviados ao laboratório diferem grandemente, e que inibidores ubíquos de PCR em espécimes fecais podem causar problemas, tanto o protocolo de extração de DNA quanto o protocolo de PCR têm que ser desenvolvidos para contemplar todas essas dificuldades. Há que se atentar para o fato de que a sensibilidade da detecção de parasitas, nas fezes e nas amostras ambientais, por PCR, depende muito do

método usado para a extração do DNA da amostra (da SILVA *et al.* 1999; BIALEK *et al.* 2002).

Vários protocolos têm sido descritos no processamento dos parasitas para obtenção de amostra de DNA apropriada para a PCR. O processo inicial geralmente envolve a lise do parasita por choque térmico (congelamento/aquecimento), por fervura ou por meios químicos. O passo seguinte consiste na remoção dos inibidores da PCR (SINGH 1997). Os métodos de PCR podem não somente ser aplicados a pequeno número de oocistos como também a extração de DNA de amostra fecal e ambiental podem ser analisadas diretamente sem a necessidade de isolar oocistos intactos (WIDMER *et al.* 2002)

Métodos moleculares têm sido cada vez mais usados para proporcionar detecção sensível e específica dos oocistos em amostras clínicas e ambientais, para definir a posição taxonômica das várias espécies de *Cryptosporidium* e para delinear os principais genótipos de *C. parvum* (HIGGINS *et al.* 2001; THOMPSON e CHALMERS 2002).

Os testes de PCR têm sido introduzidos como um método sensível para detecção de vários patógenos em amostras clínicas. Entretanto, ainda não há padronização de uma metodologia simples para extração de DNA de *Cryptosporidium* em fezes.

Em geral, as vantagens das técnicas moleculares, especialmente aquelas baseadas na amplificação dos ácidos nucléicos, são que elas possibilitam uma identificação rápida e acurada de espécies e cepas dos organismos, usando muito pouco material da amostra (MONIS *et al.* 2002).

As vantagens da PCR incluem alta sensibilidade, análise rápida de grande número de amostras, relativamente baixo custo, detecção de múltiplos patógenos, e capacidade de discriminar entre espécie e cepa, se houver *primers* específicos (ROCHELLE *et al.* 1997).

Até o presente, os únicos estudos de detecção molecular de isolados de *Cryptosporidium* em humanos, realizados no Brasil, são os referidos no item anterior (1.10), de GOMES (2003) e ARAUJO (2004). Porém, o processamento das amostras de fezes só foi possível com a importação de *kits* específicos, o que é justificável em trabalho de pesquisa, mas torna inviável o seu uso na rotina

.

O estudo ora apresentado trata-se da primeira metodologia molecular *in-house*, sem utilização de *kits*, descrita no Brasil, para detecção de *Cryptosporidium* spp e identificação de *C. parvum* ou *C. hominis*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

O projeto teve como objetivo padronizar a técnica de extração de DNA genômico de oocistos de *Cryptosporidium sp*, em amostras fecais de bovino experimentalmente infectado, sem a utilização de *kits* importados de concentração, extração e purificação de DNA, bem como padronizar testes de detecção e identificação de *Cryptosporidium* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR), como primeiro passo para futura padronização de amostras clínicas e ambientais.

3.2 Objetivos Específicos:

- Padronizar uma técnica de extração de DNA genômico de oocistos de *Cryptosporidium sp* em fezes de bovino experimentalmente infectado, conservadas em dicromato de potássio 5% a 4°C, por 10 meses, rápida, eficiente e de baixo custo.
- Padronizar técnicas de reações de PCR em etapa única e *nested*-PCR para detecção de *Cryptosporidium spp* e identificação de *C. parvum* em fezes preservadas de bovino.
- Aplicar as técnicas padronizadas para diagnóstico de *Cryptosporidium* em amostras fecais humanas e animais, conservadas por longos períodos, de maneira diversa: em dicromato de potássio 2,5%, ou em formalina 10% a 4°C ou congeladas puras a -20°C.
- Comparar a sensibilidade entre as técnicas de PCR padronizadas.

4 METODOLOGIA

4.1 Amostras

4.1.1 Fezes de bezerro

Para a padronização da técnica de extração do DNA genômico foram utilizadas amostras de fezes de um bezerro, experimentalmente infectado com uma suspensão aquosa contendo 5×10^6 oocistos de *Cryptosporidium parvum*, gentilmente cedidas pela pesquisadora Angélica Maria Casimiro, mestrande do Departamento de Análises Clínicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (projeto FAPESP). Estas amostras consistiam em um *pool* de fezes diarréicas, que foram colhidas em dias consecutivos e conservadas em solução de dicromato de potássio 5%, mantidas em geladeira a 4°C, durante 10 meses.

4.1.2 Fezes humanas

A maioria das amostras fecais de pacientes foi proveniente da rotina de exames parasitológicos de fezes realizados na Seção de Enteroparasitoses, do Serviço de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz. Neste laboratório, a partir do ano de 2000, quando o resultado do exame microscópico é positivo para *Cryptosporidium sp.*, as fezes são conservadas em dicromato de potássio a 2,5% ou em formalina tamponada 10%, e estocadas em geladeira a 4°C.

Do Laboratório Regional de Sorocaba, do Instituto Adolfo Lutz, foi cedida amostra fecal de um paciente com Aids, que estava dividida em três alíquotas: um tubo com formalina tamponada 10%, outro tubo com dicromato de potássio a 2,5%, e um terceiro tubo com as fezes puras, congeladas a -20°C.

4.1.3 Fezes de animais

Fezes conservadas em dicromato de potássio 2,5% de três gatos, dois bezerros, um cão e um equino foram cedidas pelo Departamento de

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Uma amostra de fezes de bovino preservada em dicromato de potássio 5% foi cedida pelo Laboratório de Parasitologia, da Faculdade de Biologia da Universidade de Taubaté.

Excretas de seis pombos domésticos, *Columba livia domestica*, foram cedidos pela pesquisadora Mônica Schüller, mestrande do Departamento de Práticas de Saúde Pública, da Faculdade de Saúde Pública da USP.

4.2 Recuperação dos oocistos

Para a recuperação dos oocistos foram utilizadas fezes do bezerro experimentalmente infectado, que estavam conservadas em dicromato de potássio a 5% e mantidas em geladeira, a 4°C por aproximadamente 10 meses. As amostras foram processadas em dias diferentes, como modo de se avaliar a eficiência e reprodutibilidade das metodologias empregadas.

Para recuperar os oocistos presentes nas fezes foi utilizada a técnica de centrífugo-flutuação em gradiente de sacarose, de acordo com a técnica de Sheather descrita por de CARLI e SARAIVA (1991) e modificada por CASIMIRO (2003).

As fezes do bezerro contendo oocistos de *C. parvum* foram inicialmente tamisadas em peneira de malha grossa (poros de cerca de 850 µm), lavadas com água destilada e estocadas a 4°C em solução de dicromato de potássio a 5%.

A primeira etapa para recuperação dos oocistos consistiu na lavagem do material fecal para remoção do dicromato de potássio. Em um tubo de centrífuga com 50 mL de capacidade foram adicionados 20 mL do material fecal e

30 mL de água destilada, homogeneizado e centrifugado a 5000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o procedimento repetido por três vezes.

Os oocistos foram concentrados por flutuação utilizando-se o gradiente de sacarose com densidade 1,2 g/mL. Em um tubo cônico com 15 mL de capacidade adicionou-se 2 mL do sedimento lavado e 10 mL da solução de sacarose, homogeneizou-se e centrifugou-se a 3000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, adicionou-se 2 mL de água destilada e com auxílio de uma pipeta Pasteur realizou-se movimentos circulares para suspender os oocistos. Essa suspensão foi cuidadosamente aspirada e transferida para um tubo limpo com 15 mL de capacidade, acrescentada água destilada na proporção 1:3 e centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos. O procedimento de lavagem foi repetido duas ou três vezes, até a remoção total da sacarose. O sedimento resultante foi transferido para microtubos (tipo Eppendorf), de 1,5 mL de capacidade, e foram realizadas mais duas lavagens com água destilada, centrifugando-se a suspensão a 10000 rpm durante 3 minutos. O sedimento limpo resultante foi ressuspenso em 1 mL de solução salina tamponada com fosfatos (PBS) e estocado a -20°C até sua utilização para extração do DNA.

Desse procedimento obteve-se 14 microtubos contendo os oocistos purificados.

Para estimar a quantidade de oocistos presentes em cada tubo contendo a amostra purificada foi feito um esfregaço corado pela técnica de Kinyoun (de CARLI 2000, HUBER *et al.* 2004). Uma alíquota de 10 µL da solução contendo os oocistos purificados era acrescentada a 90µL de água destilada, homogeneizada e então, retirados 10 µL dessa solução para contagem em câmara de Neubauer, em microscópio óptico, com aumento de 400 e 1000 vezes.

4.3 Extração do DNA genômico

Para isolamento do DNA genômico dos oocistos de *C. parvum* foram testados diversos protocolos descritos na literatura, eliminando-se, sempre, o uso de *kits* para qualquer etapa da extração. Aqui será apresentado apenas

aquele com o qual obtivemos resultados positivos. No item 6. Discussão, menciona-se os outros protocolos testados.

O protocolo descrito neste trabalho foi baseado em RAMACHANDRAN *et al.* 1997, que o utilizaram para extração de DNA de larvas de nematódeos do gênero *Strongyloides*.

4.3.1 Extração do DNA genômico das amostras de fezes de bezerro

O procedimento de recuperação dos oocistos (item 4.2) das fezes do bezerro gerou 14 tubos de microcentrífuga, contendo os oocistos purificados. Cada microtubo foi processado repetidas vezes, em dias diferentes. Estas extrações múltiplas geraram um total de 44 tubos contendo amostras de DNA.

Os tubos contendo os oocistos purificados e conservados a -20°C foram retirados do *freezer* e colocados em banho-maria a 65°C por 5 minutos.

Após o descongelamento, foram retirados 200 µL da suspensão de oocistos, colocados em um tubo de 1,5 mL, acrescentados 1000 µL de solução fisiológica 0,85% e homogeneizada. Essa solução foi centrifugada a 10000 rpm por 5 minutos, a temperatura de 24°C e descartado todo o sobrenadante. O sedimento resultante foi ressuspensão novamente em 1000 µL de solução fisiológica 0,85% e esta lavagem foi repetida por duas ou três vezes, até que o sobrenadante estivesse claro.

O sedimento limpo era ressuspensão em 500 µL da solução de lise contendo β-mercaptoetanol [50 µL de 100 mM Tris-HCL (pH 8.0) + 50 µL 50 mM EDTA (pH 8.0) + 50 µL SDS 10% + 3,5 µL 70 mM β-mercaptoetanol + 346,5 µL de água Milli-Q] e incubado em banho-maria a 65°C por 1 hora e 30 minutos. Após essa incubação inicial, acrescentava-se 20 µL de Proteinase K e incubava-se novamente em banho-maria a 65°C por mais 2 h e 30 minutos. Para parar a reação o

tubo era colocado em banho de gelo a 0°C por 10 minutos e deixado a temperatura ambiente por 15 minutos.

Para a extração de DNA acrescentava-se 500 µL da solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugava-se a 12000 rpm por 15 minutos (AUSUBEL *et al.* 1995). Com o auxílio de pipeta automática, o sobrenadante era transferido para um novo tubo e acrescentado 500 µL de clorofórmio puro, e centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos. Cuidadosamente, com a pipeta automática, o sobrenadante era novamente transferido para outro tubo limpo e acrescentado 500 µL de isopropanol gelado e centrifugado a 12000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante era descartado e acrescentado 500µL de etanol gelado e centrifugado a 12000 rpm por 3 minutos. Descartado o sobrenadante, o tubo era secado a vácuo por 12 horas. O DNA era eluído com 50µL do tampão TEII (Tris-EDTA) e armazenado a 4°C até o momento de ser utilizado na amplificação pela reação em cadeia pela polimerase.

Foi extraído o DNA de oocistos purificados preservados em PBS a -20°C, por aproximadamente 15 meses, que haviam sido recuperados das fezes de dois bezerros infectados experimentalmente, cedidos pela pesquisadora Angélica Casimiro. Desse procedimento obteve-se cinco frascos com amostra de DNA.

4.3.2 Extração do DNA genômico das amostras de fezes humanas

As amostras fecais de pacientes, provenientes da coleção da Seção de Enteroparasitoses do Instituto Adolfo Lutz, estavam conservadas em dicromato de potássio a 2,5% ou em formalina tamponada 10%. O volume da solução de fezes utilizado para seguir-se o protocolo de extração de DNA, descrito para fezes de bezerro no item 4.3.1, encontra-se relacionado no Quadro 1.

Os frascos contendo grande quantidade de solução fecal foram processados várias vezes, em diversos dias. Essas 16 amostras fecais, de pacientes HIV positivos e de crianças, resultaram em 45 amostras de DNA.

4.3.2.1 Extração do DNA genômico de amostras de fezes congeladas

A amostra fecal congelada, de um paciente com Aids, foi processada quatro vezes, em dias diferentes, da seguinte forma: as fezes foram retiradas do *freezer* -20°C e colocadas em banho-maria a 65°C por 10 minutos, para descongelar. Em seguida foi retirada uma pequena alíquota das fezes, transferiu-se para microtubo com capacidade de 1,5mL, diluiu-se com 1000µL de PBS, homogeneizou-se e centrifugou-se a 10000 rpm por 5 minutos. Repetiu-se a lavagem mais duas vezes e depois foi realizada a extração de DNA como descrito anteriormente (item 4.3).

4.3.3 Extração do DNA genômico das amostras de fezes animais

As amostras fecais dos animais, conservadas em dicromato de potássio, foram processadas como descrito no item 4.3.1 resultando em 33 amostras de DNA (Quadro 1).

4.3.3.1 Extração do DNA genômico das amostras de fezes de pombos

Foi extraído o DNA das fezes de pombo doméstico *Columba livia domestica*, da seguinte maneira: retirou-se um grama dos excretas secos, eluiu-se em solução salina 0,85%, homogeneizou-se, centrifugou-se em tubo tipo Falcon de 50mL, a 2000 rpm por 5 minutos, e descartou-se o sobrenadante. A lavagem foi repetida até que o sobrenadante estivesse claro, após o que, transferiu-se o sedimento resultante para tubo tipo Eppendorf e procedeu-se o protocolo de extração de DNA descrito no item 4.3.1.

Quadro 1. Caracterização das amostras de DNA de *Cryptosporidium* spp extraído dos oocistos presentes nas diferentes amostras fecais.

INDIVÍDUO	Número das amostras de DNA	Volume da solução fecal usado para extração de DNA			
		200 µL	400 µL	1 mL	5 mL a 20 mL
paciente A	A .1, A .2, A .3, A .4, A .5	todas	—	—	—
paciente B	B.1, B.2, B.3, B.4	todas	—	—	—
paciente C	C.1, C.2, C.3, C.4	C.1	C.3	C.2	C.4
paciente D	D.1, D.2	—	D.1	—	D.2
paciente E	E.1, E.2, E.3	—	E.1, E.2	—	E.3
paciente F	F.1, F.2, F.3	—	F.1	F.2	F.3
paciente G	G.1, G.2, G.3	—	G.1	G.2	G.3
paciente H	H.1, H.2, H.3, H.4	H.1	H.2	H.3	H.4
paciente I	I.1, I.2, I.3	—	I.1	I.2	I.3
paciente J	J.1, J.2, J.3, J.4	J.1	J.2	J.3	J.4
paciente L	L.1, L.2	L.1	—	L.2	—
paciente M	M.1, M.2	—	—	M.1	M.2
paciente N	N	N	—	—	—
paciente O	O	O	—	—	—
paciente P	P	P	—	—	—
paciente Q	Q.1, Q.2, Q.3	—	Q.1	Q.2	Q.3
paciente R	R.1, R.2, R.3, R.4, R.5, R.6, R.7	—	R.4, R.6	—	R.5, R.7
felino A	FA.1, FA.2, FA.3, FA.4	FA.1, FA.2	FA.3	—	FA.4
felino B	FB.1, FB.2, FB.3, FB.4	FB.1, FB.2	FB.3	—	FB.4
felino C	FC.1, FC.2, FC.3, FC.4, FC.5	FC.1, FC.2	FC.3, FC.4	—	FC.5
canino	CA.1, CA.2, CA.3, CA.4, CA.5, CA.6	CA.1, CA.2	CA.3, CA.4, CA.5	—	CA.6
eqüino	EQ.1, EQ.2, EQ.3, EQ.4, EQ.5	EQ.1, EQ.2	EQ.3, EQ.4	—	EQ.5
pombo A	PA.1, PA.2	PA.1	PA.2	—	—
pombo B	PB.1, PB.2	PB.1	PB.2	—	—
pombo C	PC.1, PC.2	PC.1	PC.2	—	—
pombo D	PD.1, PD.2	PD.1	PD.2	—	—
pombo E	PE.1, PE.2	PE.1	PE.2	—	—
pombo F	PF.1, PF.2	PF.1	PF.2	—	—
bezerro A	BA.1, BA.2, BA.3	BA.1, BA.2	BA.3	—	—
bezerro B	BB.1, BB.2, BB.3	BB.1	BB.2, BB.3	—	—
bezerro C	BC.1, BC.2, BC.3	BC.1	BC.2, BC.3	—	—

4.3.4 Variação na quantidade de fezes processadas das diferentes amostras

Para a extração do DNA genômico foram utilizados 200 µL da solução fecal do bezerro experimentalmente infectado.

Para as amostras de fezes de pacientes e de animais, foram utilizadas diferentes alíquotas, conforme descrito no Quadro 1.

Nas amostras fecais em que utilizou-se de 5mL a 20mL da solução, cada alíquota foi diluída em aproximadamente 20 mL de solução salina 0,85%, homogeneizada e centrifugada em tubo cônico de centrífuga com capacidade de 50 mL a 10000 rpm por 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante. O sedimento resultante foi lavado até ficar sem resíduo do conservante. O sedimento limpo foi transferido para microtubo de centrífuga de 1,5 mL de capacidade e seguido o protocolo de extração de DNA (item 4.3).

4.4 Estimativa da concentração do DNA genômico

A concentração do DNA genômico foi estimada por espectrofotometria de luz ultravioleta nos comprimentos de onda 260 e 280nm (1 unidade de absorbância 260 nm equivale a 50 µg/mL de DNA) (SAMBROOK *et al.* 1989). A qualidade do DNA extraído foi verificada através da razão da absorbância a A_{260}/A_{280} , que é o fator entre 1,8 e 2,0 para preparações puras (LOWERY *et al.* 2000), utilizando o Biofotômetro Eppendorf tipo 6131. Foi preparada uma diluição do DNA da amostra (10µL de DNA + 40µL de tampão TEII) na cubeta do próprio aparelho.

4.5 Reações de amplificação do ácido nucléico para detecção de *Cryptosporidium* spp

Para padronização das reações em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção de *C. parvum* foi utilizada amostra fecal de bezerro experimentalmente infectado (item 4.1.1). Os oocistos foram isolados das fezes como descrito no item 4.2 e o DNA extraído de acordo com item 4.3.1. Na etapa de padronização da metodologia, o DNA extraído foi submetido a diversos ensaios para definir as quantidades dos reagentes e as condições ideais dos ciclos para amplificação do DNA para cada par de iniciadores.

4.5.1 PCR em etapa única para detecção de *Cryptosporidium* spp.

Para realizar a detecção de *Cryptosporidium* spp com uma etapa única de PCR, foi selecionado o par de iniciadores desenhado por AWAD-EL-KARIEM et al. (1994), de amplo uso na literatura, o qual será referido no presente trabalho apenas como iniciador AWA.

Este par de iniciadores tem como alvo a região hipervariável do gene 18SSU rRNA de *Cryptosporidium* spp. Esses *primers* gênero-específico são: AWA995F (5'- TAG AGA TTG GAG GTT GTT CCT-3') e AWA1206R (5'- CTC CAC CAA CTA AGA ACG GCC-3') que amplificam a região conservada de aproximadamente 211 bp (pares de base) do 18S rRNA e não é usada para diferenciação de espécies.

Para cada reação usou-se uma mistura de PCR (*master mix*) para um volume final de 25 µL: 5 µL de DNA; 2,5 µL de tampão 10X; 2 mM de cloreto de magnésio; 200 µM de deoxinucleosídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 0,5 µM de cada *primer* e 1,25 U de polimerase termoestável (Taq-polimerase, Invitrogen) diluídos em 14,05 µL de água Milli-Q.

Para amplificação do DNA alvo, a reação de PCR foi realizada da seguinte maneira: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 7 minutos seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 54°C por 1 min e extensão a 72°C por 3 minutos, terminando com uma extensão final a 72°C por

7 minutos, mantido a 4°C até ser retirada do termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf).

4.5.2 PCR em etapa única para identificação de *C. parvum*

Os iniciadores específicos para *C. parvum* e *C. hominis* (MORGAN-RYAN et al. 2002) dirigidos para uma região indefinida do DNA cromossômico que produzem um fragmento de aproximadamente 451 bp, foram construídos por LAXER et al. (1991). Aqui serão referidos simplesmente como iniciadores LAX. São os seguintes: LAX469F (5'- CCG AGT TTG ATC CAA AAA GTT ACG AA-3') e LAX869R (5'- TAG CTC CTC ATA TGC CTT ATT GAG TA-3').

Para cada amostra usou-se 25 µL da *máster mix* contendo: 5 µL de DNA; 2,5 µL de tampão 10X; 3 mM de cloreto de magnésio; 200 µM de deoxinucleosídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (25 mM); 0,5 µM de cada *primer* e 1,25 U de polimerase termoestável (Taq-polimerase, Invitrogen) diluídos em 13,55 µL de água Milli-Q.

Para amplificação do DNA alvo, a reação de PCR foi realizada da seguinte maneira: desnaturação inicial a 95°C por 7 minutos seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 52°C por 1 min, extensão a 72°C por 3 minutos e extensão final a 72°C por 7 minutos, mantida a 4°C até ser retirada do termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf).

4.5.3 Nested-PCR para *Cryptosporidium* spp e *C. parvum*

Durante o processo de avaliação da metodologia para detecção molecular de *Cryptosporidium* spp e *C. parvum*, visando-se o aumento da sensibilidade do método, padronizou-se uma reação de Nested-PCR, a PCR dupla.

Para a primeira reação de PCR foi utilizado um par de

iniciadores externos tendo como alvo uma região altamente polimórfica do gene 18SSU rRNA construído por XIAO et al. (1999b), que a partir desse ponto será designado por iniciador XIA. Estes iniciadores são: XIAF (5'-TTC TAG AGC TAA TAC ATC CG-3') e XIAR (5'-CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA-3') que amplificam um produto de aproximadamente 1325 bp, comum a todas as espécies de *Cryptosporidium*. A área amplificada inclui uma região variável que pode ser utilizada para distinguir entre espécies e genótipos de *Cryptosporidium*, por RFLP (ABE e ISEKI 2004).

As reações foram realizadas utilizando-se uma mistura contendo 5 µL de DNA; 2,5 µL de tampão 10X; 3 mM de cloreto de magnésio; 200 µM de dNTP; 0,5 µM de cada *primer* e 1,25 U de Taq-polimerase diluídos em 13,55 µL de água Milli-Q, para um volume final de 25 µL.

Para amplificação do DNA alvo, a reação de PCR foi realizada da seguinte maneira: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos; 35 ciclos de 94°C para desnaturação por 45 segundos; 55°C para anelamento por 45 segundos e 72°C para extensão por 1 minuto e extensão final a 72°C por 7 minutos, mantido a 4°C até ser retirada do termociclador.

Para realização da segunda etapa da PCR (nested-PCR) utilizou-se uma alíquota de 5µL do produto amplificado (*amplicon*), e os iniciadores AWA995F/AWA1206R internos ao gene 18 SSU rRNA, para identificação genérica de *Cryptosporidium* spp, ou os iniciadores LAX469F/LAX869R para identificação específica de *C. parvum*, de acordo com as metodologias descritas nos itens 4.5.2 e 4.5.3, respectivamente.

Figura 1. Representação esquemática da sequência parcial do gene 18S de *Cryptosporidium parvum* com os respectivos tamanhos dos produtos amplificados por cada par de *primer* (XIAO *et al.* 1999; AWAD-EL-KARIEN *et al.* 1994; LAXER *et al.* 1991). As setas indicam o sentido dos *primers*.

4.5.4 Modificações na execução das reações de PCR

Para algumas amostras foi realizada a centrifugação do DNA, antes de separar a alíquota a ser utilizada na PCR.

Como controle positivo foram utilizadas amostras de DNA extraído das fezes de bezerro, que havia sido positiva, anteriormente, para a reação de PCR que estava sendo testada. Estas foram as amostras **III.1**, **III.4**, **V.4**, **VI.2**, **VII.2** e **VIII.2** (Tabela 1). O controle negativo constituía-se de um tubo no qual coloca-se a solução *master mix* sem a adição de DNA. No caso da PCR dupla, para realização da segunda reação de PCR, o controle negativo constituía-se de 5 µL do *amplicon* resultante da primeira reação de PCR do controle negativo e 20 µL da solução *master mix*.

4.6 Eletroforese em gel de agarose

Após a PCR, foram adicionados 5 µL de azul de bromofenol em cada tubo contendo o produto amplificado. Os produtos da PCR

foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,8%, corado com 50µL de solução de brometo de etídio, imerso em tampão TAE 1X, aplicando-se 10µL do produto de PCR em cada poço do gel. Em cada corrida de gel, de uma hora, a 153V, foram adicionados 5µL de marcador de peso molecular (1 Kb DNA *ladder*; 1µg/µl, Invitrogen, USA).

O gel foi visualizado em fonte de luz ultravioleta a 365 nm e fotodocumentado. A imagem foi obtida através do sistema de aquisição de imagens Epi Chemi II Darkroom (UVP) e o software Labworks (UVP).

4.6.1 Modificações na eletroforese em gel de agarose

Os produtos de PCR das amostras **C.4, D.2, E.3, G.3, H.4, I.3, J.4, Q.3, R.5, R.7, FA.4, FB.4, FC.5, CA.6 e EQ.5** foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,8%, corados com 0,5µL do corante Vistra Green, imerso em tampão TAE 1X. O gel foi visualizado em fonte de luz de 302 nm no transiluminador.

4.7 Análise Estatística dos dados

O tratamento estatístico dos dados foi realizado com a utilização do programa SPSS for Windows 8.0 para o coeficiente de correlação de Spearman e coeficiente de correlação de Pearson com nível de significância $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Padronização da extração de DNA e das reações em cadeia pela polimerase, utilizando fezes de bezerro

Após a concentração e purificação das fezes diarréicas do bezerro (item 4.2), cada tubo contendo os oocistos purificados em PBS e acondicionados a -20°C , foi processado diversas vezes, ou seja, cada um teve seu conteúdo separado em alíquotas em dias diferentes. Assim, as múltiplas extrações (item 4.3) da mesma amostra de oocistos geraram 39 microtubos com amostras de DNA. Na Tabela 1 encontra-se o resumo dessas extrações.

Como controle positivo das reações de PCR, usou-se sempre alguma amostra que havia sido positiva anteriormente. Estas amostras foram as de números **II.4**, **III.1**, **III.4**, **V.4**, **VI.2**, **VII.2** e **VIII.2**. Devido à boa qualidade das bandas obtidas com as amostras **III.4**, **V.4**, **VI.2** e **VII.2** estas foram diluídas com mais 50 μL do tampão TEII.

Fragmentos de DNA de *Cryptosporidium* spp foram amplificados em 57,57% da amostra de fezes de bezerro (19/33), através da amplificação pela PCR única usando-se os iniciadores AWA995F e AWA1206R (Figura 2); e em 83,33% das amostras (10/12), quando submetidas á PCR dupla com os iniciadores XIA e AWA. Para a PCR única com os iniciadores LAX469F e LAX869R, foram amplificados fragmentos de DNA de *C. parvum* de 70% das amostras (21/30) (Figura 3) e para a PCR dupla com os iniciadores XIA e LAX, 66,66% das amostras (4/6).

Após a realização das PCRs modificadas (item 4.5.4) e da eletroforese modificada (item 4.6.1), obteve-se mais cinco amostras positivas na PCR AWA, duas amostras na PCR dupla XIA/AWA, uma amostra na PCR LAX e três amostras na PCR dupla XIA/LAX. Dessa forma, passa-se a ter 68,57% (24/35) de

Tabela 1: Resultado das PCRs testadas para cada amostra de DNA extraído das fezes do bezerro experimentalmente infectado, com indicação do número de cada tubo de solução fecal e as respectivas amostras de DNA geradas após extrações múltiplas, realizadas em dias diferentes.

Concentração de oocistos	Tubo	Amostra	Fator	Concentração de DNA	<i>Cryptosporidium sp.</i>		<i>C. parvum</i>	
					AWA	XIAAWA	LAX	XIALAX
1,2 x 10 ⁶	I	I.1	2,32	21,8	P	—	—	—
		I.2	1,61	26,7	P	—	—	—
		I.3	1,03	7	P	—	—	—
		I.4	1,66	484,4	N	—	N	—
		I.5	1,48	57,7	N	—	N	—
1,2 x 10 ⁶	II	II.1	1,92	174,2	P	—	P	—
		II.2	1,83	157	P	—	P	—
		II.3	1,32	16,4	P	—	P	—
		II.4	1,73	1466	N	—	P	—
		II.5	1,53	272	N	P	P	—
3,0 x 10 ⁷	III	III.1	1,67	96,3	P	—	P	—
		III.2	1,57	93	P	—	P	—
		III.3	1,69	406	N/P**	—	N	—
		III.4	1,87	12,8	P	—	P	—
1,2 x 10 ⁷	IV	IV.1	1,68	143	N/P**	—	—	—
		IV.2	1,66	864	N/P**	—	N	—
		IV.3	1,26	192	—	—	N	—
NR	V	V.1	1,09	97,7	P**	—	P	—
		V.2	1,44	293	—	—	N	—
		V.3	SL	55,5	N	N	N	N
		V.4	1,22	137	P	P	P	P
2,3 x 10 ⁶	VI	VI.1	1,22	137	P**	—	—	P**
		VI.2	1,17	57,4	P	P	P	P
		VI.3	1,65	112	N	P	P	—
1,3 x 10 ⁶	VII	VII.1	1,04	43,3	—	—	P	—
		VII.2	1,03	41,1	P	P	P	P
		VII.3	1,23	117	P	—	P	—
5,8 x 10 ⁶	VIII	VIII.1	1,37	68,2	N	—	—	—
		VIII.2	3,26	430	P	P	P	P
		VIII.3	SL	145	P	P	P	—
0,6 x 10 ⁶	IX	IX	1,6	114,2	P	—	P	—
NR	X	X	1,63	474,6	N	N	—	—
NR	XI	XI	1,61	344,2	N	—	P	—
NR	XII	XII	2,19	693,4	N	—	N	—
NR	XIII	XIII	0,93	9,9	P	P	P	N/P**
NR	XIV	XIV.1	1,93	180	N	P	—	—
		XIV.2	—	—	P	P	P	P**
		XIV.3	—	—	—	P**	P**	P**
		XIV.4	—	—	P	P**	N	—

Legenda: AWA = PCR para *Cryptosporidium sp* e XIA/AWA = *nested*-PCR; LAX = PCR para *C. parvum* e XIA/LAX = *nested*-PCR; Concentração de DNA em µg/mL; Fator = razão A₂₆₀/A₂₈₀; sl = leitura não realizada pelo espectrofotômetro; N = negativo; P = positivo; P* = reação positiva após a segunda corrida eletroforética em gel de agarose corado com Vista Green; P** = reação positiva após realização de PCR modificada.

Figura 2. Resultado da amplificação dos produtos da PCR única AWA. Coluna 1, peso molecular (1Kb DNA ladder; $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$); coluna 3, branco, colunas 2 e de 4 a 10, amostras padrão de fezes do bezerro e coluna 11, paciente R.1. Eletroforese em gel de agarose 1,8% corado com brometo de etídeo.

Figura 3. Resultado da amplificação dos produtos da PCR única LAX. Coluna 1 peso molecular (1Kb DNA ladder; $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$); colunas 2, de 4 a 10 e 12, amostras padrão de fezes do bezerro, coluna 3, paciente R.1 e coluna 11, branco. Eletroforese em gel de agarose 1,8% corado com brometo de etídeo.

positividade para a PCR AWA e 80% (12/15) para a PCR dupla XIA/AWA. Para a identificação de *C. parvum* pela PCR LAX obteve-se 70,96% (22/31) e 88,88% (8/9) para a PCR dupla XIA/LAX.

5.2 Fezes humanas

Após a padronização das técnicas de extração de DNA genômico de oocistos nas fezes do bezerro padrão e de detecção de *Cryptosporidium* spp e *C. parvum*, pelas diferentes reações em cadeia da polimerase, foram ensaiadas algumas amostras de fezes humanas (4.3.2), obtidas nos trabalhos de diagnóstico microscópico de rotina e estocadas na biblioteca da Seção de Enteroparasitoses, do Serviço de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz.

Na Tabela 2 encontram-se os resultados obtidos com essas amostras clínicas. Foram obtidas 43 amostras de DNA extraídas das amostras de fezes de 16 pacientes. Para a PCR AWA foram positivas as amostras **D.1** e **F.1** (2/31 = 6,45%). Na reação da PCR dupla XIA/AWA as amostras **B.4**, **G.2**, **H.3**, **N**, **O** e **P** (6/33 = 18,19%) amplificaram a banda para *Cryptosporidium* spp. A PCR única para *C. parvum* não revelou positividade entre as 35 amostras ensaiadas. Na PCR dupla XIA/LAX apenas a amostra **O** produziu a banda esperada (1/6 = 16,66%).

Quando da realização das PCRs modificadas de acordo com os itens 4.5.4 e 4.6.1, as amostras **C.4**, **M.1** e **O** revelaram-se positivas para a PCR AWA; a amostra **I.4** para a PCR LAX e as amostras **B.1**, **B.2**, **G.1** e **H.3** para a PCR dupla XIA/LAX (Tabela 2).

Tabela 2: Resultado das PCRs testadas para cada amostra de DNA, com indicação de cada tubo de solução fecal do paciente e as respectivas amostras de DNA geradas após extrações múltiplas, realizadas em dias diferentes.

Paciente	Ano	Conservação	Amostra	Concentração de DNA	Fator	<i>Cryptosporidium</i> sp		<i>C. parvum</i>	
						AWA	XIA/AWA	LAX	XIA/LAX
A	2002	dicromato	A .1	419	1,23	N	–	N	–
			A .2	201	1,24	N/P*	–	N	–
			A .3	137	1,55	–	N/P*	N	–
			A .4	288	2,88	–	P	N	–
			A .5	789	1,94	N	N	N	–
B	2003	dicromato	B.1	328	1,87	–	–	N	P**
			B.2	112	1,16	–	N	N	P**
			B.3	207	1,22	–	–	N	–
			B.4	188	1,53	N	P	N	–
C		dicromato	C.1	223	2,14	N	–	N	–
			C.2	–	–	N	N	–	–
			C.3	–	–	–	N	–	–
			C.4	–	–	P**	N	N	N
D	2003	dicromato	D.1	–	–	P	N/P*	N	–
			D.2	–	–	N	N	N	–
E	2001	dicromato	E.1	–	–	N	N/P*	N	N
			E.2	–	–	N	N	–	–
			E.3	–	–	–	–	N	–
F	2001	dicromato	F.1	–	–	P	N	–	–
			F.2	–	–	N	N/P*	N	–
			F.3	–	–	N	N	N	N
G	s/d	dicromato	G.1	–	–	N	N	N	P**
			G.2	–	–	N	P	–	–
			G.3	–	–	N	N	N	–
H	2001	dicromato	H.1	638	2,43	N	–	N	N
			H.2	–	–	–	N	N	–
			H.3	–	–	–	P	N	–
			H.4	–	–	N	N	–	–
I	2001	dicromato	I.1	–	–	N	–	P**	–
			I.2	–	–	N	–	N/P*	–
			I.3	–	–	–	N	–	–
J	2002	dicromato	J.1	198	2,64	N	–	N	N
			J.2	–	–	–	N	–	–
			J.3	–	–	N	N	–	–
			J.4	–	–	N	–	N	–
L	s/d	formalina	L.1	-3,2	0	N	N	N	–
			L.2	–	–	N	N	N	–
M	2003	formalina	M.1	–	–	P**	N	N	–
			M.2	–	–	–	N	N	–
N	s/d	dicromato	N	318,2	1,5	–	P	N	–
O	s/d	dicromato	O	197,6	1,62	P**	P	N	P
P	s/d	dicromato	P	288	2,88	–	P	N	–
Q	2002	dicromato	Q.1	–	–	N	N	–	–
			Q.2	–	–	N	N	N	–
			Q.3	–	–	N	–	N	–
R	2003	congelada	R.1	227	1,52	P	N/P*	N	P**
			R.2	311,3	1,98	N	P	–	P
			R.3	771,5	2,05	N	P	–	–
		formalina	R.4	–	–	N	N	N	N/P*
			R.5	–	–	N	P**	N	–
		dicromato	R.6	–	–	N	N	P**	–
			R.7	–	–	–	P**	N	–

Legenda: AWA = PCR para *Cryptosporidium* sp e XIA/AWA = *nested*-PCR; LAX = PCR para *C. parvum*; XIA/LAX = *nested*-PCR; Concentração de DNA em µg/mL; Fator = razão A_{260}/A_{280} ; S/d = sem data; N = negativo; P = positivo; P* = reação positiva após a segunda corrida eletroforética em gel de agarose corado com Vistra Green; P** = reação positiva após realização da PCR modificada.

Ao realizar uma segunda eletroforese, conforme descrito no item 4.6.1, conseguiu-se a visualização das bandas de *Cryptosporidium* spp pela PCR AWA na amostra **A .2** e pela PCR dupla XIA/AWA nas amostras **A .3, D.1, E.1 e 1F.2**. Para *C. parvum*, a amostra **I.2** revelou a banda esperada pela PCR LAX (Tabela 2).

No diagnóstico microscópico foi detectada a co-infecção com *Isospora* nas fezes dos pacientes **E, H, I, J e Q**. A amostra fecal do paciente **F** era muito pobre em oocistos de *Cryptosporidium*.

O paciente **D** foi positivo para *Cryptosporidium* sp na PCR AWA e na PCR dupla XIA/AWA. O paciente **E** foi positivo na PCR XIA/AWA; o paciente **F** apresentou uma fraca banda na PCR AWA e uma banda mais acentuada na PCR dupla XIA/AWA; o paciente **H** apresentou banda fraca para a PCR dupla XIA/AWA; o paciente **I** foi positivo na PCR LAX enquanto os pacientes **J e Q** foram negativos (Tabela 4).

A amostra fecal do paciente com Aids (paciente **R**), de janeiro de 2003, teve o seguinte resultado: das amostras congeladas, a **R.1** foi positiva para *Cryptosporidium* sp pela PCR AWA e para *C. parvum* pela PCR dupla XIA/LAX; a amostra **R.2** produziu banda fraca para a PCR dupla XIA/AWA e PCR dupla XIA/LAX e a amostra **R.3** também produziu uma banda fraca para a PCR dupla XIA/AWA. As amostras **R.5** (conservada em formalina) e **R.7** (preservada em dicromato de potássio) amplificaram a banda esperada para *Cryptosporidium* spp com o uso dos iniciadores XIA/AWA. e a amostra **R.6** (conservada em dicromato de potássio) na PCR LAX (Tabela 2).

Quando foi realizada uma nova corrida do gel, de acordo com o item 4.6.1., foi possível visualizar a banda esperada de *Cryptosporidium* obtida pela PCR dupla XIA/AWA na amostra **R.1** e a banda de *C. parvum* pela PCR dupla XIA/LAX na amostra **R.4** (Tabela 2). Dessa forma, para o resultado geral,

tem-se o paciente **R** positivo em todas as quatro metodologias de PCRs ensaiadas (Tabela 4).

A realização da modificação na eletroforese aumentou significativamente o número de resultados positivos ($p < 0,05$).

5.3 Fezes de animais

As amostras de DNA extraídas das amostras fecais dos animais, conservadas em dicromato de potássio (4.3.3), têm seus resultados apresentados na Tabela 3. Do bezerro **BA**, a amostra **BA.1** foi positiva para *Cryptosporidium* spp pela PCR AWA e PCR dupla XIA/AWA e para *C. parvum* pela PCR LAX. O bezerro **BB** teve a amostra **BB.1** positiva na PCR dupla XIA/AWA e a amostra **BB.2** positiva a para PCR LAX. O felino **FC** teve a amostra **FC.2** positiva pela PCR dupla XIA/AWA. O pombo **PF** teve positiva a amostra **PF.1** na PCR dupla XIA/AWA.

Após a realização das PCRs modificadas (itens 4.5.4 e 4.6.1) as amostras **FA.3** e **PF.2** amplificaram a banda de *Cryptosporidium* pela PCR dupla XIA/AWA e as amostras **BA.2**, **BB.1**, **BB.2** e **FB.1** revelaram a banda para *C. parvum* pela PCR dupla XIA/LAX.

A realização de nova corrida eletroforética conforme o item 4.6.1. revelou positivas as amostras **PC.1**, **PC.2** e **BB.2** pela PCR AWA; a amostra **BC.3** pela PCR dupla XIA/AWA e a amostra **BB.3** pela PCR LAX (Tabela 3.). Foi observada uma diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o coeficiente de correlação de Pearson.

O exame microscópico revelou que as amostras dos bezerros **BA** e **BB** e do felino **FA** eram positivas para oocistos de *Cryptosporidium* spp, enquanto as demais amostras, felinos **FB** e **FC**, canino e equino, eram muito

pobres em oocistos. O bezerro **BC**, na microscopia óptica, revelou infecção mista, com predominância de *C. andersoni*.

Algumas amostras foram processadas repetidamente para as várias reações de PCR mas não apresentam resultados, pois houve problema com um dos reagentes, como ficou comprovado no experimento que realizou-se para verificar esta possibilidade.

Para cálculo da positividade geral do teste para *Cryptosporidium* spp, tem-se 24,13% (7/29) de positividade para a PCR AWA e 41,93% (13/31) para a PCR dupla XIA/AWA (Tabela 4)

Para o cálculo da positividade geral do teste para *C. parvum*, subtraindo-se ainda as amostras de pombo, que não é hospedeiro dessa espécie, tem-se 16,00% (4/25) de positividade para a PCR LAX e 43,75% (7/16) para a PCR dupla XIA/LAX (Tabela 4).

Após esses ensaios, realizou-se uma nova corrida eletroforética com algumas amostras, centrifugando-se os produtos amplificados (*amplicons*) a 10000 rpm por 10 minutos a 4° C, antes de serem dispostos nos poços do gel e corando-se o gel de agarose com Vista Green. Obteve-se a amplificação de bandas em três amostras para a PCR AWA, elevando-se assim a positividade para 34,48% (10/29); mais quatro amostras positivas na PCR XIA/AWA, 54,83% (17/31) (Tabela 4).

As amostras que tiveram o DNA extraído a partir de maior quantidade da solução fecal, descritas no Quadro 1, têm seus resultados resumidos na Tabela 5. Verifica-se que não houve melhora na positividade das reações de PCR.

Tabela 3. Resultado das PCRs testadas para cada amostra de DNA extraído das fezes clínicas de animais, com indicação de cada tubo de solução fecal do animal e as respectivas amostras de DNA geradas após extrações múltiplas, realizadas em dias diferentes.

Animal	Ano	Amostra	Concentração		<i>Cryptosporidium</i>		<i>C. parvum</i>	
			de DNA	Fator	AWA	XIA/AWA	LAX	XIA/LAX
Felino A	2003	FA.1	285	2,14	N	N	N	—
		FA.2	60,2	0	N	—	—	—
		FA.3	—	—	N	P**	N	—
		FA.4	—	—	N	—	N	—
Felino B	2002	FB.1	—	—	N	N	N	P**
		FB.2	235	3,19	N	—	—	—
		FB.3	—	—	—	N	—	—
		FB.4	—	—	—	N	N	—
Felino C	2001	FC.1	—	—	N	—	—	—
		FC.2	182	1,57	N	P	—	—
		FC.3	—	—	N	—	—	—
		FC.4	—	—	N	N	—	N
		FC.5	—	—	—	N	N	N
Canino	2001	CA.1	—	—	N	—	N	—
		CA.2	100	0	N	N	—	—
		CA.3	—	—	N	—	—	—
		CA.4	—	—	N	—	—	—
		CA.5	—	—	N	N	—	—
		CA.6	—	—	—	N	N	—
Equino	2003	EQ.1	—	—	N	—	N	—
		EQ.2	287	1,77	—	N	—	—
		EQ.3	—	—	—	N	—	—
		EQ.4	—	—	N	N	—	—
		EQ.5	—	—	N	—	N	—
Pombo A	2002	PA.1	91,2	1,22	N	N	—	—
		PA.2	—	—	N	N	—	N
Pombo B	2002	PB.1	166	2,05	N	N	—	—
		PB.2	—	—	—	N	—	—
Pombo C	2002	PC.1	192	1,56	N/P*	N	—	—
		PC.2	—	—	N/P*	N	—	N
Pombo D	2002	PD.1	220	1,55	—	—	N	N
		PD.2	—	—	N	N	—	—
Pombo E	2002	PE.1	1047	1,96	—	N	N	—
		PE.2	—	—	N	N	—	—
Pombo F	2002	PF.1	47	1,73	—	P	N	—
		PF.2	—	—	N	P**	—	—
Bezerro A	2000	BA.1	237	1,36	P	P	P	—
		BA.2	832	1,74	N	N	—	—
		BA.3	—	—	—	N	—	—
Bezerro B	2000	BB.1	196	0	N	P	—	—
		BB.2	—	—	N	—	P	—
		BB.3	—	—	—	—	N	—
Bezerro C	S/D	BC.1	182	2,2	N	N	N	N
		BC.2	—	—	N	N	—	—
		BC.3	—	—	N	N	—	—

Legenda: AWA = PCR única e XIA/AWA = *nested*-PCR para *Cryptosporidium* sp; LAX = PCR única e XIA/LAX = *nested*-PCR para *C. parvum*; S/d = sem data; Concentração de DNA em µg/mL; Fator: razão A_{260}/A_{280} ; sl = leitura não realizada pelo espectrofotômetro; N = negativo; P = positivo; P* = reação positiva após a segunda corrida eletroforética em gel de agarose corado com Vistra Green; P** = reação positiva após PCR modificada.

Tabela 4: Resultado de todos os tipos de PCR testadas (PCR para *Cryptosporidium* spp única e dupla, PCR para *C. parvum*, única e dupla) para cada indivíduo, paciente humano e animal, para todas as suas diferentes amostras de DNA ensaiadas.

INDIVÍDUO	<i>Cryptosporidium</i> spp		<i>C. parvum</i>	
	PCR AWA	PCR XIA/AWA	PCR LAX	PCR XIA/LAX
paciente A	P*	P	N	—
paciente B	N	P	N	P**
paciente C	P**	N	N	N
paciente D	P	P*	N	—
paciente E	N	P*	N	N
paciente F	P	P*	N	N
paciente G	N	P	N	P**
paciente H	N	P	N	P**
paciente I	N	N	P*/P**	—
paciente J	N	N	N	N
paciente L	N	N	N	—
paciente M	P**	N	N	—
paciente N	—	P	N	—
paciente O	P**	P	N	P
paciente P	—	P	N	—
paciente Q	N	N	N	—
paciente R	P	P*/P**	P**	P*/P**
pombo A	N	N	—	—
pombo B	N	N	—	—
pombo C	P*	N	—	N
pombo D	N	N	N	N
pombo E	N	N	N	—
pombo F	N	P	N	—
felino A	N	P**	N	—
felino B	N	N	N	P**
felino C	N	P	N	N
canino	N	N	N	—
eqüino	N	N	N	—
bezerro A	P	P	P	P**
bezerro B	P*	P	P	P**
bezerro C	N	P*	N	N

Legenda: AWA = PCR única e XIA/AWA = *nested*-PCR para *Cryptosporidium* spp; LAX = PCR única e XIA/LAX = *nested*-PCR para *C. parvum*; N = negativo; P = positivo; P* = positivo na segunda corrida eletroforética com gel corado com Vistra Green; P** = positivo após PRC modificada

Tabela 5. Resultados obtidos em cada tipo de PCR, com extração de DNA realizada a partir de diferentes volumes de amostra fecal, de pacientes e de animais.

volume de solução fecal	<i>Cryptosporidium</i> spp				<i>C. parvum</i>			
	PCR AWA		PCR XIA/AWA		PCR LAX		PCR XIA/LAX	
	amostras	%	amostras	%	amostras	%	amostras	%
400µL	24	12,5	23	21,73	6	66,66	7	42,85
1000µL	8	12,5	8	37,5	6	16,66	1	100
5 a 20 mL	10	10	11	18,8	14	0	3	0

Legenda:

Amostras = número de amostras ensaiadas em cada tipo de PCR.

% = percentagem de amostras positivas em cada tipo de PCR

6. DISCUSSÃO

Os parasitos protozoários, em particular os coccídios, apresentam como desafio fornecer, consistentemente, amostras de DNA limpas e confiáveis. Isto está diretamente relacionado à natureza do organismo, sua resistência ao rompimento e lise e a matriz onde o parasita está presente. Um procedimento eficiente para extração de DNA dos espécimes fecais deve liberar o DNA do parasito dos esporos, oocistos ou cistos; prevenir a adsorção do DNA aos constituintes fecais e remover os inibidores de PCR. Outro fator que dificulta todos os procedimentos de extração do DNA é a não uniformidade dos espécimes fecais, que podem variar grandemente em sua composição dependendo da dieta, das condições de saúde e da flora intestinal do paciente. Portanto, os fatores derivados da matriz que são carregados durante os procedimentos de isolamento e purificação do DNA, podem inibir, significativamente, a amplificação pela PCR, o que limita a sensibilidade e acarreta resultados falso-negativos (da SILVA *et al.* 1999; ORLANDI e LAMPEL 2000; HIGGINS *et al.* 2001).

Os carboidratos e muitos outros produtos químicos presentes nas amostras fecais são sabidamente fortes inibidores de PCR, e a sensibilidade da detecção de parasitas pela PCR, nas fezes e nas amostras ambientais, depende muito do método empregado para a extração do DNA da amostra (da SILVA *et al.* 1999; BIALEK *et al.* 2002).

Algumas etapas são críticas no desenvolvimento de um método de PCR para identificar *Cryptosporidium* em fezes: uma eficiente recuperação dos oocistos para assegurar a sensibilidade do diagnóstico, a lise da parede do oocisto e a incorporação de um protocolo para prevenir contaminantes (GOBET *et al.* 1997). Os inibidores copurificados com o DNA previnem uma detecção confiável pela PCR (ZHU *et al.* 1998).

Numerosas pesquisas demonstram que as amostras orgânicas, como fezes, água e solo, contêm “inibidores” os quais podem reduzir a

sensibilidade da PCR em até 1000 vezes. Abordagens básicas que têm sido usadas para eliminar os inibidores de PCR nos estudos de *Cryptosporidium* incluem a remoção e purificação dos oocistos antes da extração de DNA, empregando-se métodos de purificação através do uso de gradientes de densidade de sacarose, de Percoll, a tecnologia de pérolas imunomagnéticas e remoção dos inibidores durante a extração/purificação direta do DNA, como por exemplo, *spin columns*, e o congelamento/descongelamento, procedimentos que quebram a parede do oocisto e liberam uma pequena quantidade de DNA dos esporozoítos “livres” nos materiais do conteúdo fecal. O calor é aplicado para auxiliar a lise dos esporozoítos fixados. O PVP (polivinilpirrolidone) é usado para coprecipitar o DNA, que posteriormente deve ser tratado com uma solução de lise para assegurar a remoção eficiente dos inibidores (JOHNSON *et al.* 1995; ZHU *et al.* 1998; HIGGINS *et al.* 2001; WARD e WANG 2001).

Alguns fatores que podem resultar em PCR negativo são a degradação do DNA durante a estocagem, a copurificação de inibidores de PCR, a extração de DNA insuficiente ou de nenhum DNA, a ausência do DNA alvo, ou a presença de outros corpos morfológicamente similares ao oocisto de *Cryptosporidium* e que também reagem com o *primer* usado (McLAUHLIN *et al.* 1999). Ou ainda, se os oocistos não estiverem uniformemente distribuídos na amostra fecal, a alíquota separada para a PCR pode não conter oocistos ou ter oocistos em número muito baixo para ser detectado. Oocistos de *Cryptosporidium* spp têm uma parede muito robusta que precisa ser rompida para liberar o DNA do parasita. Resultados falso-negativos também podem ser causados pela presença de inibidores como sais biliares, bilirrubina, compostos fenólicos, proteínas e complexos polissacarídes que são substâncias comumente encontradas em fezes. A concentração dos inibidores é extremamente variável e depende de muitos fatores, incluindo a dieta, condições de saúde e flora intestinal do paciente (SCORZA *et al.* 2003).

Um procedimento para diminuir o efeito dos inibidores da PCR, é diluir a amostra, potencialmente, sem mascarar o DNA pela diluição das substâncias inibidoras. Porém, ao mesmo tempo, a sensibilidade do teste pode ser

comprometida por causa dos efeitos da diluição na concentração dos oocistos (SCORZA *et al.* 2003).

Quanto à conservação das amostras clínicas de fezes, para o exame pela PCR, já está estabelecido que deve ser feita em dicromato de potássio 2,5% a 4°C, ou congelada pura a -20°C. Deve-se evitar a preservação em formalina que reduz drasticamente a detecção, após alguns dias. Cite-se o trabalho de JOHNSON *et al.* (1995), quando da padronização de teste de PCR para amostras ambientais, no qual os autores verificaram que a sensibilidade do teste variou de 1 a 200 oocistos, dependendo da fonte e da idade da amostra. Foi observado um forte efeito inibidor do formaldeído (de 5 a 50 ppm) e do dicromato de potássio (de 1,25% a 12,5% ppm) na PCR, porém, o efeito inibidor do dicromato pode ser removido pela lavagem da amostra antes do procedimento de lise por congelamento/descongelamento, o mesmo não ocorrendo com o formaldeído.

Da mesma forma, JONGWUTIWES *et al.* (2002), não obtiveram resultados positivos com material fixado em formalina.

Opinião divergente é a de ZHU *et al.* (1998), quando afirmam que a falta de sensibilidade relatada na PCR para oocistos de *Cryptosporidium* fixados em formalina não é causada pela inibição da formalina, mas sim, pela extração inadequada do DNA. Em seu método de extração colocaram a suspensão de fezes no agitador vortex com Hemo-De para extrair lipídios e polissacarídeos. Depois era acrescentado DNazol e pérolas de vidro e aquecido. Essa técnica permitiu a realização de nested-PCR diretamente das fezes formadas ou fixadas em formalina.

Métodos mais simplificados de conservação, visando atender qualquer laboratório, foram relatados por JONGWUTIWES *et al.* (2002), que conservaram fezes diarréicas em etanol, na proporção de uma parte de fezes para três partes de etanol absoluto, à temperatura ambiente (de 22°C a 38°C), por um período

de 1 a 2 anos. Há ainda um estudo no qual fezes diarréicas foram mantidas refrigeradas a 4° C sem preservativos, por PEDRAZA-DÍAS *et al.* (2001).

Face às dificuldades na obtenção de DNA, em amostras fecais, em quantidade suficiente e de boa qualidade para amplificação pela PCR e metodologia derivada, vários protocolos de extração vêm sendo testados por diversos pesquisadores. Os protocolos mais simples utilizam apenas incubações como: ressuspender o sedimento em Tris-HCL e EDTA, incubar e depois acrescentar SDS e proteinase K (LAXER *et al.* 1991); apenas o uso de Proteinase K e SDS (AWAD-EL-KARIEM *et al.* 1994) ou incubação com Proteinase K, SDS e CTAB (ROCHELLE *et al.* 1997). Outros protocolos empregam a fervura dos oocistos a 100°C por 20 minutos em tampão de lise, (WU *et al.* 2000) ou por 60 minutos (GLABERMAN *et al.* 2002).

Um procedimento muito utilizado é a quebra mecânica da parede do oocisto através do choque térmico. Em média, são aplicados de 3 a 5 ciclos, geralmente, utilizando-se o nitrogênio líquido ou o banho de etanol gelado para o congelamento e o banho-maria para o descongelamento. Pode-se citar como poucos exemplos o congelamento e descongelamento em tampão de lise, depois acrescentando-se PBS e proteinase K (BLEARS *et al.* 2000); ou em tampão de lise com proteinase K e sarkosyl (PENG *et al.* 1997); ou a digestão dos contaminantes com RQ1 Dnase (WIDMER *et al.* 1999); ou a suspensão em Chelex-100 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a 20% (w/v) (ONG *et al.* 1999) ou Chelex-100 a 25% (FONTAINE e GUILLOT 2002); ou ainda com o uso de Nanosep® GHP MF (FONTAINE e GUILLOT 2003).

Depois do choque térmico vários autores fazem uso de *kits* para purificação dos oocistos: congelamento e descongelamento, seguido do uso da Instagene matrix e Xtra Amp. (HIGGINS *et al.* 2001); ou purificação com High Pure PCR template kit (TANRIVERDI *et al.* 2002); ou com MagExtractor-Genome (TOYOBO, Osaka, Japan) (SATO *et al.* 2003).

Há ainda vários outros protocolos que lançam mão de diferentes metodologias, geralmente, utilizando *kits* para as etapas de lise da parede do oocisto e purificação do DNA obtido. Entre tantos protocolos, pode-se exemplificar alguns como os de: TES, sarkosyl e proteinase K (BALATBAT *et al.* 1996); QIAmp tissue purification kit (MORGAN *et al.* 1997); PVP (polivinilpirrolidone) em água destilada e depois fervida, Al buffer com glassmilk, AW buffer e AE elution buffer (MORGAN *et al.* 1998); incubação *overnight* em SDS e proteinase K, depois da extração e purificação com glass milk (GeneClean, Bio 101) (SPANO *et al.* 1998); pérolas de zirconia (Stratech Scientific) com sílica ativada e purificação do DNA com PVP (McLAUCHLIN *et al.* 1999); TritonX-100 com pérolas de zirconia e tiocianato de guanidina (PATEL *et al.* 1999); tiocianato de guanidina, EDTA, TritonX-100, pérolas de zirconia (McLAUCHLIN *et al.* 1999); isotiocianato de guanidina, TritonX-100, pérolas de vidro (Stratech Scientific, Luton, UK) e após ruptura acréscimo de sílica *Coarse activated* (ENEMARK *et al.* 2002); PBS-EDTA e extração com FastPrep e FastDNA kit (BORNAY-LLINARES *et al.* 1999); FastDNA kit (Bio 101 Inc., Vista, CA) e QIAquick PCR purification kit (Qiagen Inc., Santa Clarita, CA) (da SILVA *et al.* 1999 e 2003; RYAN *et al.* 2003; SCORZA *et al.* 2003); Fast Prep e Mini-BeadBeater (SCORZA *et al.* 2003); QIAmp DNA Mini isolate columns (XIAO *et al.* 2001; ELWIN *et al.* 2001; LIMOR *et al.* 2002; GATEI *et al.* 2003); extração do DNA por digestão alcalina e fenol-clorofórmio, seguida de QIAmp DNA Stool Mini kit (Qiagen, Valencia, Calif.) (XIAO *et al.* 2002; ALVES *et al.* 2003; DALLE *et al.* 2003; JIANG e XIAO 2003; PENG *et al.* 2003; ZHOU *et al.* 2003); Qiagen, hipoclorito de sódio, Chelex-100 a 20% e congelamento e descongelamento (WARD *et al.* 2002); Qiagen QIAamp e o Mo Bio UltraClean Soil (LAXER *et al.* 1991; Mo Bio kit (HIGGINS *et al.* 2001); *kit* para separação imunomagnética (Dynabeads anti-*Cryptosporidium*, Dynal A.S., Oslo, Norway) para remover microorganismos contaminantes e depois incubação em tampão com proteinase K (WU *et al.* 2000); Wisard Genomic DNA Purification kit, posteriormente pérolas de vidro na solução de lise; High Pure Template Preparation kit (TANRIVERDI *et al.* 2003); separação imunomagnética e depois incubação *overnight* com proteinase K (JELLISON *et al.* 2004); separação imunomagnética e

incubação em tampão de lise contendo sarkosyl e proteinase K (BALATBAT *et al.* 1996).

No Brasil há três pesquisas acadêmicas que fizeram uso da metodologia descrita por da SILVA *et al.* (1999), empregando o FastDNA[®] kit (BIO 101, Inc., Vista, CA) para extração do DNA e o QIAquick PCR purification kit (Qiagen Inc., Santa Clarita, CA) para remoção dos inibidores de PCR (GONÇALVES 2002; GOMES 2003; ARAUJO 2004).

Não obstante tamanha diversidade de técnicas usadas para a lise da parede celular dos oocistos de *Cryptosporidium* e liberação do DNA, fomos encontrar uma metodologia simples, viável, reprodutível e de baixo custo, empregada para *Strongyloides stercoralis*, um helminto intestinal (RAMACHANDRAN *et al.* 1997). Testamos também alguns protocolos de extração de DNA de outros parasitas como larvas de *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus* (HAWDON 1996) e trofozoítas e cistos de *Entamoeba histolytica* (HAQUE *et al.* 1998). No protocolo de HAWDON (1996) os oocistos foram congelados a -70°C por 15 minutos, incubados em tampão de lise (10 mM Tris, pH 8.0/100 mM NaCl/25 mM EDTA) contendo 250 $\mu\text{g/mL}$ de proteinase K a 50°C por 3 horas.

Quanto ao procedimento de lise da parede celular do oocisto de *Cryptosporidium*, fez-se algumas modificações no protocolo descrito por RAMACHANDRAN *et al.* (1997). Em nosso trabalho, as amostras purificadas de oocistos e as amostras puras de fezes, encontravam-se congeladas a -20°C , e não a -70°C . Quando da extração de DNA direto das amostras fecais preservadas, as mesmas encontravam-se armazenadas a 4°C e não sofreram a etapa de descongelamento. Aumentamos o tempo de incubação na solução de lise (Tris-HCL + EDTA + SDS 10% + 70 mM β -mercaptoetanol), de cinco minutos para uma hora. No presente protocolo, não foi realizada a etapa de purificação com CTAB (*cetyl trimethyl ammonium bromide*) após a extração do DNA, bem como a precipitação com glicogênio do DNA purificado, o que significa redução de tempo e no custo de processamento das amostras (RAMACHANDRAN *et al.* 1997).

De acordo com HARRI e PETRY (1999), a parede do oocisto tem estrutura trilaminar, com espessura de aproximadamente 40 nm e não é totalmente solúvel em SDS 2% com 10% de β -mercaptoetanol. No entanto, nossos resultados mostram que a solução de lise utilizada neste estudo foi suficientemente eficaz no rompimento da parede do oocisto para liberação do DNA.

Como visto anteriormente, inúmeros autores referem-se aos inibidores de PCR presentes nas amostras fecais e ambientais, mas apenas um trabalho, na literatura consultada, mostra a relação dos resultados obtidos na PCR com a quantidade e qualidade do DNA extraído. WARD e WANG (2001) compararam duas técnicas para extração de DNA diretamente de fezes congeladas. Na primeira, realizaram incubação numa solução de ácido taurocólico e posterior digestão com proteinase K e na outra, usaram três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento, seguido de digestão. O DNA do sobrenadante foi extraído de três maneiras diferentes: i) usando *spin columns*, ii) usando o GeneClean® glassmilk e iii) realizando duas extrações de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (24:24:1). O DNA obtido em cada uma das metodologias foi precipitado com 2 volumes de etanol gelado e dissolvido em 50 μ L de água com DEPC (dietil pirocarbonato). Constataram que a maior variabilidade, em termos de pureza e concentração de DNA, foi observada nas amostras submetidas à extração com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, com a concentração de DNA variando de 2,5 a 171 μ g/mL e a pureza de 1,3 a 1,78. A extração com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, semelhante à empregada nesse trabalho, necessitou uma grande quantidade de oocistos presente na amostra (mais de 10000) para obter detecção consistente pela PCR.

No presente trabalho, realizou-se a incubação dos oocistos em solução de lise contendo β -mercaptoetanol para romper a parede celular dos oocistos e outra incubação, acrescentando-se proteinase K, para digestão da parede celular. A extração do DNA foi realizada com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). O fenol-clorofórmio denatura as proteínas que subsequentemente formam a camada de interface entre as fases orgânica e aquosa, enquanto a massa de DNA é

retida na fase aquosa. A precipitação com álcool auxilia na remoção dos resíduos orgânicos e ajuda a concentrar o DNA na solução aquosa (WARD e WANG 2001).

Em nosso estudo, nas amostras de DNA extraídas das fezes do bezerro padrão, a concentração de DNA variou de 7,0µg/mL (amostra **I.3**) a 1466µg/mL (amostra **II.4**), variação maior do que a obtida por WARD e WANG (2001), que obtiveram uma variação entre 2,5 e 171µg/mL de DNA, quando usaram a extração com fenol-clorofórmio semelhante à nossa. Em relação à qualidade do DNA A_{260}/A_{280} ratio, obtivemos algumas amostras nas quais o fator não pode ser lido pelo espectrofotômetro (amostras **V.3**, **VIII.3**, **FA.2**, **BB.1** e **CA.2**) até o fator 3,19 na amostra **FB.2**. Destas, a amostra **VIII.3**, com concentração de DNA de 145 µg/mL foi positiva nas três reações de PCRs testadas: PCR AWA e PCR XIA/AWA para *Cryptosporidium sp* e PCR única para *C. parvum* (Tabela 1) e a amostra **BB.1** com concentração de DNA de 196,0µg/mL foi positiva para a PCR XIA/AWA (Tabela 3). Considerando-se que em uma amostra de DNA de boa qualidade o fator A_{260}/A_{280} ratio é de 1,8 a 2,0, (LOWERY *et al.* 2000), a concentração e a qualidade do DNA que se obteve com a metodologia padronizada, encontra-se fora desses padrões. Ou seja, foram utilizadas amostras contendo grande quantidade de impurezas

A quantidade de DNA extraído não teve influência nos resultados obtidos. Pequenas quantidades de DNA, como 7,0 µg/mL (amostra **I.3**) e 9,9 µg/mL (amostra **XIII**) foram positivas, enquanto grandes quantidades de DNA como 789 µg/mL; (amostra **A.5**) e 693,4 µg/mL (amostra **XII**) foram negativas (Tabelas 1 e 2). A amostra **XIII**, que continha uma das menores quantidades de DNA (9,9 µg/mL e 0,93 de fator), foi positiva na *nested*-PCR para *Cryptosporidium sp* e na PCR única para *C. parvum*, enquanto a amostra **II.4**, contendo a maior quantidade de DNA (1466 µg/mL de DNA e 1,73 de fator), produziu apenas uma fraca banda para *C. parvum* (Tabela 1). Fatos como estes comprovam que a elevada quantidade de DNA obtida estava relacionada ao DNA de outros organismos, diferentes do parasita alvo, presentes na amostra.

Embora sem referência ao fator de qualidade do DNA, MORGAN *et al.* (1998) citam que todas as amostras de fezes, experimentalmente infectadas com o DNA do controle positivo amplificaram a banda correta, indicando que a inibição de PCR não foi um fator negativo em seu trabalho.

A grande maioria dos trabalhos de pesquisa lança mão do uso de cepas-padrão, adquirindo-as de laboratórios. Pode-se citar alguns exemplos dessas cepas: isolado da Parasitology Research Laboratories (Phoenix, Arizona) (MAYER e PALMER 1996; ROCHELLE *et al.* 1997a,1997b); cepa IOWA da Waterborne Inc (New Orleans, LA, USA) (ROCHELLE *et al.* 1997a,1997b; RIMHANEN-FINNE e HÄNNINEN 2001; FONTAINE e GUILLOT 2003); isolado UCP ImmuCell Corp. (Portland, Maine) (SPANNO *et al.* 1998); isolado de R. Fayer (U.S. Department of Agriculture, Beltsville, Md) (ORLANDI e LAMPEL 2000); isolado de Moredun Scientific (Pentlands Science Park, Scotland) (LOWERY *et al.* 2000) e cepa Ohio (Pleasantville Farms, Troy, Idaho), (SCORZA *et al.* 2003).

Diferentemente dessas pesquisas, não possuíamos uma cepa padrão. Portanto, em se tratando de um trabalho de padronização de técnicas e na impossibilidade de se adquirir uma cepa padrão para ser usada como controle positivo das reações de PCR, utilizou-se como controles positivos, nossas próprias amostras. Observou-se que as amostras que produziram bandas fortes e foram empregadas como controles positivos, não possuíam grande quantidade de DNA quando analisadas no espectrofotômetro.

As amostras que foram utilizadas como controle positivo são as seguintes: amostra **III.1**, com concentração de DNA de 96,3 µg/mL e fator 1,67 e a amostra **III.4**, cuja concentração de DNA era apenas de 12,8 µg/mL e fator 1,87, do tubo III, com concentração de 3×10^7 oocistos; a amostra **V.4**, com concentração de DNA de 137 µg/mL e fator 1,22, do tubo V, cuja concentração de oocistos era de $1,2 \times 10^7$; amostra **VI.2**, com concentração de DNA de 57,4 µg/mL e fator 1,17 do tubo VI, com $2,3 \times 10^6$ oocistos/mL; a amostra **VII.2**, com concentração de DNA de 41,1 µg/mL e fator 1,03 do tubo VII cuja concentração de oocistos era de $1,29 \times 10^6$

oocistos/mL; a amostra **VIII.2** cuja concentração de DNA era de 429,5 µg/mL e fator 3,26 do tubo VIII, com $5,8 \times 10^6$ oocistos/mL (Tabela 1).

Para testar a reprodutibilidade da técnica de extração de DNA dos oocistos de *Cryptosporidium* spp, as amostras de fezes foram processadas em diversos dias (item 4.2). Após a concentração e purificação dos oocistos presentes nas fezes do bezerro, o concentrado de oocistos sofreu vários choques térmicos (congelamento/descongelamento) na ocasião do processamento de cada extração do DNA (item 4.3.1). Procedendo de maneira semelhante, PENG *et al.* (2003) relatam que este procedimento pode ter resultado na degradação do DNA e tornou impossível remover os inibidores de PCR das amostras, pela lavagem das fezes antes da extração do DNA. Citam ainda que, surpreendentemente, a análise repetitiva da PCR de extrações múltiplas da mesma amostra e o uso de soroalbumina bovina falharam na produção de mais amplificações do SSU rRNA nas amostras negativas pela microscopia, tendo encontrado 62,3% de positividade (43/69). JONGWUTIWES *et al.* (2002) também citam que os oocistos parecem ser vulneráveis a estas alterações de temperatura e que a preservação em dicromato de potássio por mais de um ano pode não conservar os oocistos para futuros estudos moleculares posteriores.

Neste trabalho foram utilizadas amostras de fezes com tempo de conservação bastante superior ao citado na literatura. As fezes das amostras de pacientes encontravam-se conservadas em dicromato de potássio 2,5% e em formalina 10%, entre seis meses e dois anos. Contudo, ainda que essas amostras fossem antigas, e que não tivesse sido usado qualquer artifício para purificação do DNA, foi obtida a amplificação dos fragmentos de DNA em 17,24% (5/29) com a PCR AWA; 38,7% (12/31) para a PCR XIA/AWA; 9,09% (3/33) para a PCR LAX e 44,44% (4/9) para a PCR XIA/LAX nas amostras conservadas em dicromato. Mesmo para as amostras preservadas em formalina, foi possível a amplificação em 20,00% (1/5) na PCR AWA; 16,66% (1/6) na PCR XIA/AWA; e na única amostra testada na PCR XIA/LAX. Quanto à amostra fecal congelada a -20°C por seis meses, que resultou nas amostras **R.1**, **R.2** e **R.3**, os resultados obtidos foram excelentes:

33,33% (1/3) na PCR AWA; 100% (3/3) na PCR XIA/AWA e 100% (2/2) na PCR XIA/LAX (Tabela 1).

Em pesquisa para diagnóstico de crianças no Peru, XIAO *et al.* (2001) realizaram extração direta com formol-clorofórmio (0,5 g/amostra) de fezes congeladas a -20°C . Para remover os inibidores de PCR algumas amostras foram submetidas ao QIAmp DNA Mini isolate columns.

Para realização de PCR em tempo real, LIMOR *et al.* (2002) utilizaram fezes naturalmente infectadas de animais ou humanos preservadas em dicromato de potássio por no máximo 12 meses, e identificaram todas as cinco espécies patogênicas para o homem (*C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis* e *C. canis*). Também realizando PCR em tempo real, HIGGINS *et al.* (2001) testaram amostras de fezes humanas conservadas em dicromato de potássio ou formalina por no máximo três meses de preservação, e constataram que as amostras fecais preservadas em formalina foram mais refratárias à amplificação tanto com o gene 18S rRNA, quanto para os genes Cp41 e o TRAP C-1, mesmo tendo usado o Mo Bio kit para extração.

Os genes rDNA têm sido um alvo muito usado para desenvolver diagnóstico através de PCR e metodologia derivada. Isto é devido à disponibilidade de dados das seqüências e a habilidade de desenhar *primers* para a região variável desses genes, fornecendo especificidade (PRICHARD e TAIT 2001).

Foi selecionado o gene 18SSU rDNA como região alvo para a padronização de nossas PCRs, baseado em suas características. O gene 18SSU rDNA é uma região altamente conservada. O alto grau de homologia na seqüência presente no gene 18S rRNA entre diferentes isolados e espécies de *Cryptosporidium* permite o uso de iniciadores específicos para amplificar uma ampla faixa de *Cryptosporidium* spp. A região hipervariável do gene 18S rRNA discrimina entre todas as espécies de *Cryptosporidium* assim como entre múltiplos genótipos de *C. parvum*. Essa região é flanqueada pelas seqüências de anelamento com o iniciador

que são comuns a todos os genes 18S rRNA conhecidos de *Cryptosporidium*. Concomitantemente, a análise por RFLP é capaz de evidenciar qualquer diferença encontrada nesses nucleotídeos de uma área altamente homóloga, criando os sítios de restrição o que torna esse *locus* o mais apropriado para triagem, nas regiões onde as espécies e tipos de *Cryptosporidium* são desconhecidas. (THOMPSON *et al.* 1998; CARRENO *et al.* 1999; KIMBELL III *et al.* 1999; XIAO *et al.* 1999; GLABERMAN *et al.* 2002; DALLE *et al.* 2003; GATEI *et al.* 2003).

Em anos recentes, a sequência de DNA tem sido amplamente usada nas análises filogenéticas. Em particular, o gene da subunidade do RNA ribossômico tem certas propriedades que o tornam altamente informativo na indicação de afinidades filogenéticas cruzadas nos níveis de taxon (CARRENO *et al.* 1999). McLAUCHLIN *et al.* (1999) citam que no geral, comparando-se a sensibilidade dos métodos de detecção dos fragmentos dos genes 18S rRNA, COWP e TRAP-C1 foi de 97, 91 e 66%, respectivamente. Os genes 18S rRNA ocorrem como cinco cópias no genoma inteiro do *Cryptosporidium*, enquanto os genes TRAP-C1 e COWP estão presentes como cópias simples. Uma vez que o limite real de detecção do sistema de PCR varia dependendo do número de cópias do DNA alvo por célula do microorganismo (McLAUCHLIN *et al.* 1999; WU *et al.* 2000) e dependendo da especificidade do iniciador e das condições usadas na reação (MONIS e ANDREWS 1998), o número de cópias do DNA é provavelmente refletido no aumento da sensibilidade dos procedimentos de PCR para o gene 18S rRNA se comparados às metodologias de PCR para os genes TRAP C-1 ou COWP.

Os genes rRNA de *Cryptosporidium* são ricos em AT, com A+T contendo de 57,74 a 61,03% dos nucleotídeos. Entretanto, dentro de cada espécie, o conteúdo A+T de diferentes isolados é semelhante (XIAO *et al.* 1999).

O gene 18S rRNA é amplamente usado em trabalhos que empregam técnicas de PCR e metodologias derivadas com diferentes objetivos. Pode-se citar alguns dos trabalhos consultados: JOHNSON *et al.* 1995; LABERGE *et al.* 1996; BALATBAT *et al.* 1996; ROCHELLE *et al.* 1997; MORGAN *et al.*

1997; THOMPSON *et al.* 1998; ZHU *et al.* 1998; BORNAY-LLINARES *et al.* 1999; PATEL *et al.* 1999; SULAIMAN *et al.* 1999; XIAO *et al.* 1999, 2000, 2002; BLEARS *et al.* 2000; MORGAN *et al.* 2000; MORGAN *et al.* 2000; HIGGINS *et al.* 2001; LOWERY *et al.* 2001; PERZ e LE BLANCQ 2001; STURBAUM *et al.* 2001; BIALEK *et al.* 2002; GATEI *et al.* 2002, 2003; GLABERMAN *et al.* 2002; JONGWUTIWES *et al.* 2002; SCORZA *et al.* 2003; AKIYOSHI *et al.* 2003; ALVES *et al.* 2003; CAMA *et al.* 2003; DALLE *et al.* 2003; da SILVA *et al.* 2003; FONTAINE e GUILLOT 2003; GIBBONS-MATTHEWS e PRESCOTT 2003; NAVARRO-i-MARTINEZ *et al.* 2003; RYAN *et al.* 2003; SATOH *et al.* 2003; ZHOU *et al.* 2003.

Quando os iniciadores usados nesse trabalho foram construídos por LAXER *et al.* (1991), (aqui denominado apenas LAX), a espécie *Cryptosporidium parvum* dividia-se apenas em dois genótipos, o genótipo 1 ou genótipo humano, de circulação exclusiva entre humanos e o genótipo 2 ou genótipo animal, de circulação entre mamíferos. Posteriormente, com os avanços dos estudos taxonômicos e filogenéticos, foram sendo descritos novos genótipos de *C. parvum*. Atualmente, o genótipo 1 ou genótipo humano passou à categoria de espécie, sendo denominado *C. hominis* (MORGAN-RYAN *et al.* 2002) e o genótipo 2 ou animal divide-se agora em aproximadamente oito genótipos, de acordo com os autores, sendo que outros genótipos já foram reconhecidos como espécies válidas, como é o caso de *C. felis* e *C. canis*. Em sendo assim, este trabalho refere-se apenas aos resultados de *C. parvum*, uma vez que seria necessário realizar a restrição por digestão enzimática (PCR-RFLP) para diferenciar-se as espécies.

De acordo com LOWERY *et al.* (2000), o desenho do *primer* de LAXER *et al.* 1991 levou em consideração a localização dos sítios de restrição com endonucleases espécie-específicas. O produto de 552 bp gerado pela PCR contém sítios de restrição que, com digestão pelas enzimas MaeI e VspI diferenciam quatro espécies: *C. parvum*, *C. muris*, *C. wrairi* e *C. baileyi*.

Usando o *primer* LAX, LABERGE *et al.* (1996) verificaram a amplificação do DNA de *Eimeria acervulina* e *Giardia intestinalis*, salientando que o gênero *Eimeria* também pertence à subclasse Coccidiasina e deve apresentar homologia de DNA na região amplificada. BALATBAT *et al.* (1996), constataram que foi necessário 500 oocistos por grama de fezes para detectar *C. parvum* em reação de PCR dupla e não observaram reação cruzada com *Giardia lamblia*, *B. hominis*, *E. histolytica* e *S. intestinalis*, *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas vaginalis* e nem *Plasmodium falciparum*. Para o diagnóstico de fezes não diarreicas de pacientes HIV positivos, GOBET *et al.* (1997) explicam que a estratégia usada por Laxer na seleção da sequência de DNA a ser amplificada, foi desenhada para clonar um gene de *C. parvum* específico e realmente não mostrou reação cruzada com *C. baileyi*, *Giardia lamblia*, *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica*, *Plasmodium falciparum* e *Trichomonas vaginalis* e outras bactérias e fungos em sua pesquisa. WU *et al.*, 2000, relatam que esses iniciadores são muito sensíveis, necessitando apenas de 0,625 pg de DNA, ou um oocisto, resultado semelhante aos de ROCHELLE *et al.* (1997). Já KHUN *et al.* (2002) encontraram sensibilidade de 10 oocistos. GUYOT *et al.*, 2002 relatam que esses iniciadores já mostraram sua utilidade na rotina de detecção de *C. parvum* em humanos e animais, e que não amplificam *C. muris* e *C. baileyi*. Porém chamam a atenção para a utilidade desses métodos que agora parece limitada, desde que *C. meleagridis*, *C. felis* e *C. muris* têm sido reconhecidos na infecção humana. A aplicação da RFLP conseguiu separar *C. hominis*, dois genótipos de *C. parvum*, *C. meleagridis* e *C. wairi*. Quando utilizaram a RFLP, JIANG e XIAO (2003) não conseguiram a amplificação de *C. canis*, *C. genótipo suíno I*, *C. muris* e *C. felis*, o que denotaria a especificidade para a atual espécie *C. hominis* e outros genótipos de *C. parvum*.

O par de iniciadores de Laxer foi usado por FONTAINE e GUILLOT (2002) num protocolo de PCR em tempo real para amostras de água.

WARD e WANG, 2001 constataram que na metodologia de extração de DNA diretamente das fezes congeladas com *spin columns* ou *glass milk*, foi necessário 100 oocistos para detecção consistente. Porém, para a extração com

fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, semelhante a utilizada neste trabalho, este número de oocistos saltou para 10.000, para que fosse consistentemente detectado.

Em estudo no qual compararam a sensibilidade de vários pares de *primers* tendo como alvo diferentes regiões do gene de *C. parvum*, SULAIMAN *et al.* (1999), observaram que o *primer* construído por XIAO *et al.*, 1999b, usado neste trabalho, foi o mais sensível, detectando entre 10000 e 1 oocisto, em reação de PCR dupla e que o *primer* desenhado por AWAD-EL-KARIEM *et al.*, 1994 (AWA) apresentou reação cruzada com *Eimeria neischulzi* e *E. papillata*, sugerindo que a principal razão para a inespecificidade é que foram usados dados da sequência da região conservada do 18S rRNA para o desenho do *primer*. No presente trabalho usou-se apenas o *primer* externo XIA para a primeira reação de PCR, sendo a segunda PCR realizada com outros pares de *primers* internos, o AWA e o LAX, que haviam sido selecionados para realização de PCRs em etapa única para *Cryptosporidium* spp e *C. parvum*, respectivamente. Outras pesquisas que se referem à sensibilidade dos iniciadores AWA, apresentam resultados divergentes. ROCHELLE *et al.* (1997), conseguiram amplificação com apenas um oocisto por reação. KHUN *et al.* (2002), referem-se à sensibilidade de 10 oocistos, WU *et al.* (2000) e SCORZA *et al.* (2003) determinaram a sensibilidade de 80 pg de DNA ou 80 oocistos, sendo que os últimos pesquisadores obtiveram 100% de positividade quando as amostras apresentavam 10^4 oocistos por grama de fezes.

Durante o processo de avaliação da metodologia para detecção molecular de *C. parvum* através de uma única reação de PCR, selecionou-se um outro par de *primers* para a realização de PCR dupla, pois nossas amostras clínicas, humanas e animais, não eram ricas em oocistos. A vantagem de realizar a PCR dupla é que a especificidade e sensibilidade das reações são muito aumentadas. Este procedimento é especialmente útil quando se precisa detectar um pequeno número do organismo alvo numa microflora diversa como a descrita aqui para extrair DNA diretamente de fezes totais ou amostras fecais conservadas (AMAR *et al.* 2004).

Comparando metodologias de PCR, HIGGINS *et al.* (2001) observaram que uma grande quantidade de oocistos (> 200) resultou em PCR positiva com apenas uma amplificação, mas para obter uma banda forte nas amostras com 100 ou menos oocistos foi necessário realizar a *nested*-PCR.

Uma vez que não há padronização das técnicas de extração de DNA e nem das reações de PCR, é muito difícil comparar-se os resultados obtidos nas diferentes pesquisas publicadas em todo o mundo. Em sendo assim, referir-se-á, principalmente, aos trabalhos de pesquisadores brasileiros. Em suas pesquisas, GONÇALVES (2002), GOMES (2003) e ARAUJO (2004), usaram a mesma metodologia para a concentração, extração e purificação do DNA, fazendo uso de *kits* importados, partindo de uma alíquota de cerca de 300 µL (GONÇALVES 2002) ou 400 µL (GOMES 2003; URIAS 2004) da suspensão fecal conservada em dicromato de potássio 2,5%. Os *kits* utilizados nessas pesquisas foram o FastDNA[®] kit (BIO 101, Inc., Vista, CA) para extração do DNA e o QIAquick PCR purification kit (Qiagen Inc., Santa Clarita, CA) para purificação do DNA extraído, de acordo com da SILVA *et al.* (1999). Para a amplificação do DNA, essas pesquisas utilizaram dois pares de *primers* para o gene COWP e um par de *primer* para o gene 18S rRNA, diferente do aqui empregado. GOMES (2003) e ARAÚJO (2004), encontraram dificuldades na obtenção de resultados satisfatórios quando empregaram uma reação única de PCR e tiveram que empregar a *nested*-PCR para aumentar a sensibilidade de seus testes. É interessante ressaltar que os estudos de biologia molecular do trabalho de GONÇALVES (2002) não foram realizados no Brasil, mas sim, no Centers for Disease Control and Prevention (CDC) de Atlanta, Estados Unidos, cujo protocolo de extração do DNA foi o mesmo empregado nas duas outras pesquisas citadas.

No presente trabalho, para o protocolo de padronização inicial de extração de DNA foi empregado apenas 200 µL da solução fecal do bezerro, do qual foi obtido 67,64% (23/34) das amostras positivas para *Cryptosporidium* spp, através da PCR AWA e 84,61% (11/13) quando da realização

da PCR XIA/AWA. A positividade para *C. parvum* pela PCR LAX foi de 73,33% (22/30) e de 88,88% (8/9) na PCR XIA/LAX.

Partindo de 200 µL da solução fecal de pacientes, foi possível obter 22,22% (2/9) de positividade na PCR AWA; 66,66% (6/9) na PCR XIA/AWA e 60,0% (3/5) na PCR XIA/LAX (Tabela 2). Empregando-se 200 µL da solução fecal dos animais, 13,33% (2/16) na PCR AWA; 33,33% (3/9) e 75,00% (3/4) na PCR XIA/LAX (Tabela 3).

Somados os resultados dos três grupos tem-se: 44,06% (26/59) de positividade para a PCR AWA; 58,06% (18/31) para a PCR XIA/AWA; 41,50% (22/53) para a PCR LAX e 87,50% (14/16) para a PCR XIA/LAX.

Os resultados obtidos são melhores do que os apresentados por ARAUJO (2004) que obteve 43,75% somando-se as três metodologias de PCR em etapa única utilizadas e de GONÇALVES (2002) que obteve 45%, igualmente, quando empregadas três reações distintas de PCR. Quanto à *nested*-PCR, nossos resultados são inferiores aos 73,33% de positividade para *Cryptosporidium* spp obtidos por GOMES (2003) e os 64% obtidos por ARAUJO (2004). No entanto, a positividade de 87,50% obtida no presente estudo na *nested*-PCR para *C. parvum* foi superior. Se comparado apenas o resultado obtido com as amostras do bezerro, a sensibilidade obtida no presente trabalho é superior àquelas apresentadas nos estudos descritos na literatura.

Os referidos autores partiram de 300µL de solução fecal para extração de DNA com dois *kits*. Com base nessa observação, amostras 400µL e 1000µL. foram empregadas na padronização da extração. de A fim de verificar se a positividade das reações de PCR se elevaria proporcionalmente ao aumento da quantidade inicial de fezes utilizada para a extração de DNA, para algumas amostras foram empregadas quantidades entre 5mL e 20mL (Quadro 1).

A utilização de maior quantidade de amostra de fezes para extração do DNA não se traduziu na elevação da sensibilidade dos testes, ao contrário, todos os índices de positividade foram inferiores, conforme observa-se na Tabela 5. Nesses experimentos utilizou-se apenas as amostras clínicas, humanas e de animais, fato que, por si só, diminuiu a positividade dos testes, devido à má qualidade das amostras.

Os resultados obtidos indicam que não é necessário utilizar uma quantidade maior do que 400µL da solução fecal, o que torna o procedimento de extração mais simples e rápido, sendo efetuado diretamente nos microtubos de centrífuga de 1,5mL. A macro-extração, tem que ser realizada nos tubos tipo Falcon de 50mL, exigindo maior número de lavagens para a remoção do conservante, antes da amostra ser transferida para os microtubos, aumentando o tempo dispendido no preparo das amostras e a perda de oocistos.

WARD *et al.* (2002), analisando amostras de água (n = 68), observaram 30,8% de positividade para *Cryptosporidium* na PCR, e 45,58% na *nested*-PCR. WARD e WANG (2001) usando os iniciadores LAX após extração com fenol-clorofórmio, obtiveram 28% (5/18) de positividade nas fezes inoculadas com 10² a 10⁴ oocistos, e nenhuma amplificação nas fezes contendo de 1 a 10 oocistos por grama (n = 12). HIGGINS *et al.* (2001) comparando seis amostras fecais conservadas em dicromato de potássio e três amostras em formalina, por no máximo três meses, usaram o Mo Bio Kit para realizar uma PCR em tempo real. Conseguiram 94,44% (17/18) nas amostras conservadas em dicromato e apenas 11,11% (1/9) nas amostras com formalina. GOBET *et al.* (1997) testando fezes pastosas e formadas inoculadas com oocistos, usando os iniciadores LAX obtiveram 100% de positividade nas fezes contendo 1000 oocistos/grama e 80%, com 100 oocistos/grama.

Em se tratando de um trabalho de padronização de técnicas, algumas amostras de DNA foram testadas repetidas vezes até que se padronizasse as condições ideais de cada reação de PCR, tendo assim, se esgotado. Outras amostras foram submetidas a várias PCRs, até que fosse detectado que havia problema em um

dos reagentes. Portanto, essas amostras foram excluídas da tabela que resume os resultados por indivíduo, aparecendo como “não realizada” (Tabela 4).

O β -mercaptoetanol deve ser preparado e acrescentado ao tampão de lise no momento do uso, pois observou-se melhora nos resultados das reações de amplificação.

Uma modificação introduzida foi a centrifugação das amostras de DNA para realização das reações de PCR. Para a corrida eletroforética, além da centrifugação dos produtos amplificados, passou-se a usar 0,5 μ L do corante Vistra Green. Com este procedimento conseguiu-se a visualização dos fragmentos de DNA de *Cryptosporidium* spp de mais oito amostras pela PCR única AWA e seis amostras pela PCR dupla XIA/AWA. Para *C. parvum*, foram mais três amostras pela PCR única LAX e 13 amostras pela PCR dupla XIA/LAX.

Algumas amostras, processadas antes das modificações nas reações de amplificação, e que haviam sido diagnosticadas como negativas, foram submetidas a uma segunda corrida eletroforética. Centrifugou-se os produtos amplificados e usou-se o corante Vistra Green. Dessa forma, conseguiu-se a visualização das bandas de *Cryptosporidium* spp em mais quatro amostras pela PCR única AWA e seis amostras pela PCR dupla XIA/AWA. Para *C. parvum*, mais duas amostras tiveram suas bandas visualizadas pela PCR única LAX e uma amostra, pela PCR dupla XIA/LAX.

Embora com objetivo diferente, LAXER *et al.* (1991), para demonstrar a especificidade do *primer* que haviam desenhado, realizaram hibridização após a PCR e puderam observar a amplificação de um isolado que não havia sido aparente na eletroforese com gel corado com brometo de etídeo.

Em nenhum dos trabalhos consultados encontrou-se referência à utilização de corante que não o brometo de etídeo, para realização da eletroforese. Apenas LABERGE *et al.* (1996) comparando duas técnicas de PCR,

verificaram que em ambas metodologias, a concentração do produto de PCR, frequentemente, foi insuficiente para sua detecção em gel de agarose corado com brometo de etídeo. Para solucionar esse problema os pesquisadores realizaram a hibridização com sondas internas de oligonucleotídeos. Com esse procedimento, conseguiram detectar fragmentos amplificados que, anteriormente, haviam sido invisíveis no gel. Assim como os autores conseguiram elevar a sensibilidade de sua metodologia, também conseguimos fazê-lo em nosso trabalho, de forma mais simples e rápida, apenas com a substituição do brometo de etídeo pelo Vistra Green, como corante do gel de agarose. A busca na literatura geral revelou um trabalho que compara a sensibilidade do dois corantes. Os autores verificaram que a coloração com Vistra Green era mais sensível do que o brometo de etídeo, para visualização do gel em testes para purificação de proteínas (PASTWA *et al.* 2001).

As amostras de fezes de pombos, utilizadas neste trabalho, constituíram-se de material excedente de outro projeto, que seria descartado. Cada amostra, que aqui é referida como amostra de pombo, na verdade, trata-se dos excretas de vários pombos coletados em um único ponto de coleta, em um único dia. Os excretas foram coletados nos seguintes locais: pombo **A**, centro de abastecimento de frutas, verduras e legumes; pombo **B**, centro de armazenamento de grãos; pombo **C**, lanchonete *fast food*; pombos **D** e **E**, em duas praças públicas e pombo **F**, em um cemitério (SCHULLER 2004). Dentre as amostras de excretas de pombos domésticos coletadas nessas seis localidades, duas encontraram-se positivas para *Cryptosporidium* spp. A amostra que foi coletada no *Fast Food* (pombo **C**) e aquela coletada no cemitério (pombo **F**), em 2002, sendo ambos os pontos localizados na cidade de São Paulo (Tabela 3).

Os excretas do pombo **C**, encontravam-se infectados com os protozoários *Entamoeba coli*, *Giardia* spp e *Iodameba* spp e as amostras do pombo **F**, apresentavam diversidade ainda maior de parasitas: *E. coli*, *Endolimax nana*, *Entamoeba histolytica*, *Isospora* spp, *Giardia* spp, ovos de *Ascaris* spp e de *Trichuris* spp (SCHULLER 2004). Além dessas amostras que foram positivas para *Cryptosporidium* spp, as demais amostras de excretas de pombos também

encontravam-se infectadas com outras espécies de parasitas, portanto, a ausência de bandas inespecíficas, principalmente na *nested*-PCR, demonstra a especificidade dos *primers* utilizados em nosso estudo.

As amostras de fezes dos animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP apresentaram divergência entre os resultados obtidos com o padrão ouro de diagnóstico de *Cryptosporidium*, que é a microscopia e a PCR. O exame microscópico foi realizado por um técnico experiente, repetido duas vezes, em dias diferentes, a fim de se confirmar o primeiro diagnóstico. O resultado da primeira microscopia foi: bezerro **A**, bezerro **B** e felino **A** com poucos oocistos de *Cryptosporidium* e os demais animais com lâminas inconclusivas. A repetição da microscopia revelou os felino **B**, felino **C** e canino como negativos e o equino muito pobres em oocistos. O bezerro **A** e o bezerro **B** foram positivos em todas as quatro metodologias de PCRs testadas, apesar de suas fezes se encontrarem preservadas por mais de três anos em dicromato de potássio 2,5%. O bezerro **C**, com escassa infecção mista de *C. andersoni* e *C. parvum*, com predominância da primeira, só produziu banda para *Cryptosporidium* spp na PCR dupla XIA/AWA corada com Vistra Green. Todos os felinos foram positivos apenas em uma reação de PCR, dentre as várias repetições ensaiadas. Das amostras do canino e do equino não obteve-se amplificação em nenhuma reação de PCR. (Tabela 3). Estes são resultados alentadores, pois, apesar da má qualidade das amostras fecais, tanto em número de oocistos como no tempo de preservação, nossa metodologia foi capaz de detectar a presença do parasita.

Do material fecal de pacientes processados neste estudo, 15 amostras estavam preservadas em dicromato 2,5%, três em formalina 10% e uma amostra pura congelada a -20°C . No geral, considerando-se cada paciente individualmente, obteve-se 59,09% (13/22) de positividade para *Cryptosporidium* spp e 27,27% (6/22) para *C. parvum* (Tabela 4), resultados em concordância com os 35,3% obtidos por PENG *et al.* (2003), analisando fezes humanas conservadas em formalina, ressaltando que a preservação prolongada provavelmente reduziu a sensibilidade da detecção pela PCR.

Durante a realização do trabalho, infelizmente, não conseguiu-se amostras fecais recém emitidas, para comparação com os resultados obtidos com as amostras de fezes mantidas em conservantes, por longos períodos. Em sendo assim, é lícito supor que os resultados obtidos com amostras frescas, sem conservantes, possa apresentar maior sensibilidade, uma vez que não há a interferência ou inibição desses reagentes químicos. Em nossa pesquisa, todas as amostras de DNA extraídas das fezes pura e congeladas do paciente **R** (amostras **R.1**, **R.2** e **R.3**) foram positivas em várias reações de PCR.

A consulta da literatura internacional sobre surtos de criptosporidiose revela inúmeros surtos ocorridos principalmente nos Estados Unidos da América, Reino Unido e Canadá, tendo como principal via de transmissão a água. Nos Estados Unidos a espécie mais frequentemente detectada é a *C. hominis*, enquanto que no Reino Unido é a *C. parvum*. Além dos muitos surtos de veiculação hídrica relatados nesses países há também a ocorrência de surtos em locais confinados, como creches.

Até o presente, no Brasil, não há relato de surtos de veiculação hídrica, o que nos leva a pensar na causa dessa ausência de surtos. Em nosso país, tem-se apenas breves relatos de pequenos surtos em creches. No município de São Paulo, no ano de 2001, foram detectados dois surtos de criptosporidiose em creches, localizadas na Administração Regional da Sé (AR-Sé). Do primeiro surto, ocorrido no mês de Abril, tem-se os dados pelo diagnóstico molecular de GONÇALVES (2002) e o segundo surto, ocorrido no mês Agosto, teve apenas o diagnóstico realizado por microscopia.

Na genotipagem realizada por GONÇALVES (2002) nas 25 amostras provenientes de crianças e funcionárias de uma creche da cidade de São Paulo, quando da ocorrência de um surto, a única espécie identificada foi *C. hominis*. Resultado semelhante foi encontrado por GATEI *et al.* (2003) quando do sequenciamento de sete amostras de crianças brasileiras de Aracaju, Sergipe. Resultados diferentes foram obtidos em São Paulo, por ARAÚJO (2004), que,

analisando amostras de crianças do município de Taubaté, encontrou uma infectada com *C. hominis* e outra com *C. parvum*. Entre os isolados de *Cryptosporidium* provenientes de amostras de crianças e de pacientes com Aids, do município de São Paulo, encontrou quatro casos de *C. hominis*, e um de *C. parvum*. No município de Sorocaba um caso de *C. hominis* e dois de *C. meleagridis*. De forma semelhante, estudando população de indivíduos com Aids em Fortaleza, Ceará, BRANTLEY *et al.* (2003) encontraram quatro isolados de *C. hominis*, dois isolados de *C. parvum* e dois isolados de *Cryptosporidium sp.*

Dados sobre as espécies de *Cryptosporidium* parasitas de aves ainda são escassos, principalmente, sobre pombos. O fato de termos detectado *Cryptosporidium spp* em pombos domésticos, no Estado de São Paulo, somado à detecção de infecção humana por *C. meleagridis*, espécie primariamente parasita de aves, reitera a importância do estudo da epidemiologia molecular da criptosporidiose.

C. meleagridis é uma espécie muito próxima a *C. parvum* (WIDMER 2004). Os achados recentes de *C. meleagridis* infectando uma ampla gama de mamíferos, como o homem, roedores, ruminantes e porco gnotobiótico suportam a hipótese de que esta espécie foi parasita de mamíferos e foi se estabelecendo subsequentemente em aves (XIAO *et al.* 2002).

No Estado de São Paulo, estudos realizados em Itaquaquecetuba, por GAMBA *et al.* (2000) revelaram a presença de oocistos de *Cryptosporidium* na água de superfície. No rio Atibaia, FRANCO *et al.* (2001) observaram que todas as amostras de águas superficiais, apesar da alta turbidez, coletadas em três semanas consecutivas, foram positivas para oocistos de *Cryptosporidium*. Além das águas de consumo, duas amostras de água mineral, comercializadas em Campinas foram encontradas contendo oocistos de *Cryptosporidium* (FRANCO e CANTUSIO NETO 2002). Na região de Ribeirão Preto, foi detectada a presença de oocistos em alface e rúcula (CAPUANO *et al.* 2001).

Os fatos acima nos levam a questionar o que estaria acontecendo, em nosso país, e principalmente, no Estado de São Paulo, com relação à transmissão de oocistos, não apenas de *C. hominis* e *C. parvum*, mas também de outras espécies de coccídios, seja por via hídrica, através dos alimentos, por contato direto pessoa a pessoa ou por contato animal-pessoa. Certamente, necessitamos de técnicas moleculares simples e de baixo custo, como ferramenta fundamental para respondermos esses questionamentos. Esperamos assim, que as técnicas padronizadas em nosso estudo, possam contribuir para essa missão.

7. CONCLUSÕES

A metodologia desenvolvida para extração de DNA genômico de oocistos de *Cryptosporidium parvum*, em amostras fecais de bovino experimentalmente infectado, conservadas em dicromato de potássio 5% a 4°C por 10 meses, sem a utilização de *kits* importados de concentração, extração e purificação de DNA, mostrou ser viável.

As metodologias padronizadas da reação em cadeia pela polimerase (PCR) amplificaram as bandas esperadas de *Cryptosporidium* sp e de *C. parvum* em fezes preservadas de bovino.

As metodologias padronizadas, de extração de DNA e as reações de PCR em etapa única e *nested*-PCR, quando testadas para diagnóstico de vários tipos de amostras de fezes de crianças imunocompetentes, adultos HIV positivos, felinos, canino, eqüino, pombos domésticos e bezerros, preservadas por longos períodos, em dicromato de potássio 2,5%, ou em formalina 10% a 4°C ou congeladas puras a -20°C, apresentaram resultados compatíveis com os da literatura. A *nested*-PCR aumentou significativamente a positividade do diagnóstico dessas amostras clínicas testadas ($p < 0,05$).

O emprego do corante Vistra Green na eletroforese do gel de agarose aumentou a sensibilidade da visualização das bandas dos produtos amplificados pela PCR, com resultados estatisticamente significantes, de acordo com o coeficiente de Pearson, ao nível de significância de $p < 0,05$.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Abe N, Iseki M. Identification of *Cryptosporidium* isolates from cockatiels by direct sequencing of the PCR-amplified small subunit ribosomal RNA gene. **Parasitol Res** 2004; 92: 523-526.

Abrahamsen MS, Templeton TJ, Enomoto S, Abrante JE, Zhu G, Lancto CA, et al. Complete genome sequence of the Apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. **Science** 2004; 304:441-445.

Abreu VJS. **Avaliação da eficácia do colostro bovino hiperimune na infecção experimental de roedores com *Cryptosporidium parvum***. São Paulo; 2001. [Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina – USP].

Agnew DG; Lima AA, Newman RD, Wuhib T, Moore RD, Guerrant RL, Sears CL. Cryptosporidiosis in northeastern Brazilian children: association with increases diarrhea morbidity. **J Infect Dis** 1998; 177(3):754-760.

Akiyoshi DE, Dilo J, Pearson C, Chapman S, Tumwine J, Tzipori S. Characterization of *Cryptosporidium meleagridis* of human origin passaged through different host species. **Infect Immun** 2003; 71(4): 1828-32.

Alves M, Xiao L, Sulaiman, Lal AA, Matos O, Antunes F. Subgenotype Analysis of *Cryptosporidium* Isolates from Humans, Cattle, and Zoo Ruminants in Portugal. **J Clin Microbiol** 2003; 41(6):2744-2747.

* De acordo com o Guia de Apresentação de Teses. USP. Faculdade de Saúde Pública. Biblioteca/CIR. 1998.

Alves M, Matos O, Antunes F. Microsatellite analysis of *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* in Portugal: a preliminary study. **J Eukaryot Microbiol** 2003; 529-530.

Amar CF, Dear PH, McLauchlin J. Detection and identification by real time PCR/RFLP analyses of *Cryptosporidium* species from human faeces. **Lett Appl Microbiol** 2004; 38(3): 217-22.

Araujo AJUS. **Estudo da ocorrência de infecção por *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) entre crianças do município de Taubaté-SP e caracterização genotípica de isolados clínicos do parasita.** São Paulo, 2004. [Tese de doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP].

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JÁ, Struhl K. **Short protocols in Molecular Biology.** 1995; John Wiley & Sons, USA.

Awad-el-Kariem FM, Warhurst DC, McDonald V. Detection and species identification of *Cryptosporidium* oocysts using a system based on PCR and endonuclease restriction. **Parasitol** 1994; 109: 19-22.

Balatbat AB, Jordan GW, Tang YJ, Silva Jr J. Detection of *Cryptosporidium parvum* DNA in human feces by Nested PCR. **J Clin Microbiol** 1996. 34(7): 1769-1772.

Baraldi SR, Marque EGL, Dias RMDS. Ocorrência de *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli* na região de CAMPINAS, sp. **Rev Inst Adolfo Lutz** 1999; 58: 97-103.

Bankier AT, Spriggs HF, Fartmann B, Konfortov BA, Madera M, Vogel C, Teichmann SA, Ivens A, Dear PH. Integrated mapping, chromosomal sequencing and sequence analysis of *Cryptosporidium parvum*. **Genome Res** 2003; 13(8): 1787-1799.

Bialek R, Binder N, Dietz K, Joachim A, Knobloch J, Zelck EU. Comparison of fluorescence, antigen and PCR assays to detect *Cryptosporidium parvum* in fecal specimens. **Diag Microbiol Infect Dis** 2002; 43: 283-288.

Bleas MJ, Pokorny J, Carreno RA, Chen S, De Grandis AS, Lee H, Trevors JT. DNA fingerprint of *Cryptosporidium parvum* isolates using amplified fragment length polymorphism (AFLP). **J Parasitol** 2000; 86(4): 838-841.

Bornay-Llinares FJ, da Silva AJ, Moura INS, Myjak P, Pietkiewicz H, Kruminis-Lozowska W, et alli. Identification of *Cryptosporidium felis* in a cow by morphologic and molecular methods. **Appl Environ Microbiol** 1999; 65:1455-1458.

Brantley RK, Williams KR, Silva TMJ, Thielman NM, Ward H, Lima AAM, Guerrant RL. AIDS-associated diarrhea and wasting in northeast Brazil is associated with subtherapeutic plasma levels of antiretroviral medications and with bovine and human subtypes of *Cryptosporidium parvum*. **Braz J Infect Dis** 2003; 7(1): 16-22.

Braz LMA. **Aplicação da técnica de imunofluorescência indireta na detecção de anticorpos específicos do tipo IgG e IgM, contra o *Cryptosporidium parvum*, no soro de indivíduos imunocompetentes e imunodeficientes (HIV).** São Paulo; 1997. [Dissertação de Mestrado – Instituto de Biociências – USP].

Brea Hernando AJ, Bandres FE, Mosquera LJD, Lantero BM, Ezquerra LM. Cryptosporidiasis pulmonary SIDA. Presentación de un caso y revisión de la literatura. **Ann Inter Med** 1993; 10: 232-236.

Cacció S, Pinter E, Fantini R, Mezzaroma I, Pozio E. Human infection with *Cryptosporidium felis*: case report and literature review. **EMERGING INFECT DIS** 2002; 8(1):85-86.

Cama VA, Bern C, Sulaiman IM, Gilman RH, Ticona E, Vivar A, Kawai V, Vargas D, Zhou L, Xiao L. *Cryptosporidium* species and genotypes in HIV-positive patients in Lima, Peru. **J Eukaryot Microbiol** 2003; 531-533.

Cantalice Neto AF, Zim MCA, Machado RS, Fratini FG, Silva APP. Criptosporidiose e diarreia persistente. **J Pediatría** 1998; 74(2): 143-147.

Capuano DM, Okino MHT, Bettini MJCB, Mangini ACS. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em hortaliças comercializadas no município de Ribeirão Preto, SP – Brasil. **Rev Inst Adolfo Lutz** 2001; 60(1): 89-91.

Carey CM, Lee H, Trevors JT. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. **Water Res** 2004; 38(4): 818-862.

Carreno RA, Martin DS, Barta JR. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. **Parasitol Res** 1999; 85: 899-904.

Carvalho-Almeida TT, Pinto PLS; Quadros CMS; Torres DMAGV; Kanamura HY, Casimiro AM. Detection of *Cryptosporidium* sp in non diarrhoeal faeces from children, in a day care center in the city of São Paulo, Brazil (submitted).

Casimiro AM. **Padronização e avaliação de método sorológico ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*Cryptosporidium* sp.** São Paulo; 2003. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

Champlaud D, Gobet P, Naciri M, Vagner O, Lopez J, Buisson JC, et al. Failure to differentiate *Cryptosporidium parvum* from *C. meleagridis* based on PCR amplification of eight DNA sequences. **Appl Env Microbiol** 1998; 64(4): 1454-1458.

Chappell CL, Okhuysen PC. Cryptosporidiosis. **Curr Opin Infect Dis** 2002; 15: 523-527.

Chauret C, Springthorpe S, Sattar S. Fate of *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts and microbial indicators during wastewater treatment and anaerobic sludge digestion. **Can J Microbiol** 1999; 45: 257-262.

Cegielski JP, Ortega YR, McKee S, Madden JF, Gaido L, Schwartz DA, Manji K, Jorgensen AF, Miller SE, Pulipaka UP, Msengi AE, Mwakyusa DH, Sterling CR, Reller LB. *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon*, and *Cyclospora* infections in pediatric and adult patients with diarrhea in Tanzania. **Clin Infect Dis** 1999; 28(2): 314-21.

Chieffi PP, Sens YAS, Paschoalotti MA, Miorin LA, Silva HG, Jabur P. Infection by *Cryptosporidium parvum* in renal patients submitted to renal transplant or hemodialysis. **Rev Soc Bras Med Trop** 1998; 31: 333-337.

Cimerman S, Cimerman B, Lewi DS. An evaluation of the relationship between intestinal parasitosis and the risk factors for HIV in AIDS patients. **Rev Soc Bras Med Trop** 1999; 32(2): 181-185.

Cimerman S, Cimerman B, Lewi DS. Prevalence of intestinal parasitic infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome in Brazil. **Int J Infect Dis** 1999; 3(4): 203-206.

Constantine CC. Importance and pitfalls of molecular analysis to parasite epidemiology. **TRENDS Parasitol** 2003; 19(8): 346-348.

Coutinho-Farias EW. **Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp e *Salmonella* spp em amostras de águas de esgoto e águas de córrego da cidade de São Paulo.** São Paulo; 2000. [Dissertação de Mestrado – Instituto de Biociências – USP].

Corso PS, Kramer MH, Blair KA, Addiss DG, Davis JP, Haddix AC. Cost of illness in the 1993 waterborne *Cryptosporidium* outbreak, Milwaukee, Wisconsin. **Emerging Infect Dis** 2003; 9(4): 426-431.

Costa-Macedo LM da, Machado-Silva JR, Rodrigues-Silva R, Oliveira LM, Vianna MSR. Enteroparasitoses em pré-escolares de comunidades favelizadas da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **Cad Saúde Pública** 1998; 14(4): 851-855.

da Silva AJ, Cacciò S, Williams C, Won KY, Nace EK, Whittier C, et al. Molecular and morphologic characterization of a *Cryptosporidium* genotype identified in lemurs. **Vet Parasitol** 2003; 111: 297-307.

da Silva AJ, Bornay-Llinares FJ, Moura INS, Slemenda SB, Tuttle JL, Pieniazek NJ. Fast and reliable extraction of protozoan parasite DNA from fecal specimens. **Mol Diag** 1999; 4(1): 57-64.

da Silva GAP, Magalhães M, de Oliveira AMA, Melo VM. Diarréia aguda do lactente associada ao *Cryptosporidium sp.*, na cidade de Recife. **J Pediatría** 1994; 70(1): 44-47.

Dalle F, Roz P, Dautin G, Di-Palma M, Kohli E, Sire-Bidault C, Fleischmann MG, Gallay A, Carbonet S, Bom F, Tillier C, Beaudeau P, Bonnin A. Molecular characterization of isolates of waterborne *Cryptosporidium* spp. collected during an outbreak of gastroenteritis in South Burgundy, France. **J Clin Microbiol** 2003; 41(6): 2690-2693.

Dawson DJ, Samuel CM, Scrannage V, Atherton CJ. Survival of *Cryptosporidium* species in environments relevant to foods and beverages. **J Appl Microbiol** 2004; 96: 1222-1229.

de Carli GA, Moura H. Métodos de coloração para coccídios intestinais. In: De Carli GA. **Parasitologia Clínica**. Atheneu. São Paulo, 2001. P.223-263.

Deng MQ, Cliver DO, Marian TW. Immunomagnetic capture PCR to detect viable *Cryptosporidium parvum* oocysts from environmental samples. **Appl Environ Microbiol** 1997; 63(8): 3134-3138.

Desquesnes M, Dávila AMR. Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. **Vet Parasitol** 2002; 109: 213-231.

Dias RMDS, Mangini ACS, Torres DMAGV, Corrêa MOA, Lupetti N, Corrêa FMA, Chieffi PP. Cryptosporidiosis among patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in the county of São Paulo, Brazil. **Rev Inst Med trop S Paulo** 1988; 30:310-312.

Dietz V, Vugia D, Nelson R, Wicklund J, Nadle J, McCombs JG, Reddy S and The Foodnet Working Group. Active, multisite, laboratory-based surveillance for *Cryptosporidium parvum*. **Am J Trop Med Hyg** 2000; 62(3): 368-372.

Di Giovanni GD, Hashemi FH, Shaw NJ, Abrams FA, LeChevallier MW, Abbaszadegan M. Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in surface and filter backwash water samples by immunomagnetic separation and integrated cell culture-PCR. **Appl Environ Microbiol** 1999; 65(8): 3427-3432.

Dillingham RA, Lima AA, Guerrant RL. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. **Microbes Infection** 2002; 4: 1059-1066.

Dubey JP, Speer CA, Fayer R. **Cryptosporidiosis on man and animals**. CRC Press. Boston, 1990. p.199.

Egyed Z, Sréter T, Széll, Varga I. Characterization of *Cryptosporidium* spp. – recent developments and future needs. **Vet Parasitol** 2003; 111: 103-114.

Elwin K, Chalmers RM, Roberts R, Guy EC, Casemore DP. Modification of a rapide method for the identification of gene-specific polymorphism in *Cryptosporidium parvum* and its application to clinical and epidemiological investigations. **Appl Environ Microbiol** 2001; 67(12): 5581-5584.

Enemark HL, Ahrens P, Juel CD, Petersen E, Petersen RF, Andersen JS, Lind P, Thamsborg SM. Molecular characterization of Danish *Cryptosporidium parvum* isolates. **Parasitol** 2002; 125: 331-341.

Espindola RS. **Impactos dos sistemas de saneamento “in situ” nas águas subterrâneas, município de Itaquaquecetuba (SP)**. São Paulo; 2001. [Dissertação de Mestrado- Instituto de Geociências – USP].

Fayer R, Dubey JP, Lindsay DS. Zoonotic protozoa: from land to sea. **TRENDS Parasitol** 2004; 20(11):531-536.

Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **Inter J Parasitol** 2000; 30: 1305-1322.

Fayer R., Morgan U., Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **Int J Parasitol** 2000; 30: 1305-1322.

Feitosa FLF, Shimamura GM, Roberto T, Meireles MV, Nunes CM, Ciarlini PC, Borges AS. Prevalência de criptosporidiose em bezerros na região de Araçatuba, estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural** 2004; 34(1): 189-193.

Ferreira MS, Borges AS. Some aspects of Protozoan infections in immunocompromised patients – A review. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2002; 97(4): 443-457.

Fontaine M, Guillot E. Study of 18SrRNA and rDNA stability by real-time RT-PCR in heat-inactivated *Cryptosporidium parvum* oocysts. **FEMS Microl Letters** 2003; 226: 237-243.

Fontaine M, Guillot E. Development of a TaqMan quantitative PCR assay specific for *Cryptosporidium parvum*. **FEMS Microbiol Lett** 2002; 214: 13-17.

Franco RMB. **Infecções parasitárias em creches: estudo em uma área urbana, com ênfase em *Cryptosporidium parvum* e *Giardia duodenalis***. Campinas; 1996. [Tese de Doutorado - Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas].

Franco RMB, Cantusio Neto R. Occurrence of Cryptosporidial oocysts and *Giardia* cysts in bottled mineral water commercialized in the city of Campinas, State of São Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2002; 97(2): 205-207.

Franco RMB, Cordeiro NS. Giardiose e Criptosporidiose em creches no município de Campinas, SP. **Rev Soc Bras Med Trop** 1996; 29(6):585-591.

Franco RMB, Rocha-Eberhardt R, Cantusio Neto R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia River, Campinas, Brazil. **Rev Inst Med trop S Paulo** 2001; 43(2):109-11.

Fretz R, Svoboda P, Ryan UM, Thompson RCA, Tanner M, Baumgartner A . Genotyping of *Cryptosporidium* spp isolated from human stool samples in Switzerland. **Epidemiol Infect** 2003; 131: 663-667.

Fricker CR, Crabb JH. Water-borne cryptosporidiosis: detection methods and treatment options. **Advances Parasitol** 1998. 40: 241-277.

Fujino T, Matsui T, Kobayashi F, Haruki K, Yoshino Y. The effect of heating against *Cryptosporidium* oocysts. **J Vet Med Sci** 2002; 64(3):199-200.

Gallaher MM, Herndon JL, Nims LJ, Sterling CR, Grabowski DJ, Hull HF. Cryptosporidiosis and surface water. **Am J Public Health** 1989; 79(1): 39-42.

Gamba RC, Ciapina EMP, Espíndola RS, Pacheco A, Pellizari VH. Detection of *Cryptosporidium* sp. oocysts in groundwater for human consumption in Itaquaquecetuba city, S. Paulo-Brasil. **Braz J Microbiol** 2000; 31:151-153.

Garcia LS, Brewer TC, Bruckner DA. Fluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens by using monoclonal antibodies. **J Clin Microbiol** 1987; 25(1): 119-121.

Garcia LS, Bruckner DA, Brewer TC, Shimizu RY. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. **J Clin Microbiol** 1983. 18(1): 185-190.

Garcia LS, Shimizu RY. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and

Cryptosporidium parvum in human fecal specimens. **J Clin Microbiol** 1997; 35: 1526-1529.

Gasser RB, El-Osta YG, Chalmers RM. Electrophoretic analysis of genetic variability within *Cryptosporidium parvum* from imported and autochthonous cases of human cryptosporidiosis in the United Kingdom. **Appl Environ Microbiol** 2003; 69(5): 2719-2730.

Gasser RB, Zhu X, Caccio S, Chalmers R, Widmer G, Morgan UM, Thompson RC, Pozio E, Browning GF Genotyping *Cryptosporidium parvum* by single-strand conformation polymorphism analysis of ribosomal and heat shock gene regions. **Electrophoresis** 2001; 22(3): 433-437.

Gatei W, Greensill J, Ashford RW, Cuevas LE, Parry CM, Cunliffe NA, Beeching NJ, Hart CA. Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. **J Clin Microbiol** 2003; 41(4):1458-1462.

Gatei W, Suputtamongkol Y, Waywa D, Ashford RW, Bailey JW, Greensill J, Beeching NJ, Hart CA. Zoonotic species of *Cryptosporidium* are as prevalent as the anthroponotic in HIV-infected patients in Thailand. **Ann Trop Med Parasitol** 2002; 96(8): 797-802.

Glaberman S, Moore JE, Lowery CJ, Chalmers RM, Sulaiman I, Elwin K, Rooney PJ, Millar BC, Dooley JSG, Lal AA, Xiao L. Three drinking-water-associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. **Emerging Infect Dis** 2002; 8(6): 631-633.

Gennari-Cardoso ML, Costa-Cruz JM, de Castro E, Lima LM, Prudente DV. *Cryptosporidium* sp. in children suffering from acute diarrhea at Uberlândia City, State of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1996; 91(5):551-554.

Gibbons-Matthews C, Prescott AM. Intra-isolate variation of *Cryptosporidium parvum* small subunit ribosomal RNA genes from human hosts in England. **Parasitol Res** 2003; 90: 439-444.

Gobet P, Buisson JC, Vagner O, Naciri M, Grappin M, Comparot S, Harly G, Aubert D, Varga I, Camerlynck, Bonnin A. Detection of *Cryptosporidium parvum* DNA in formed human feces by sensitive PCR-based assay including uracil-N-glycosylase inactivation. **J Clin Microbiol** 1997; 35(1): 254-256.

Gomes AH. **Estudo comparativo entre métodos morfológico, imunológico e molecular aplicados ao diagnóstico da criptosporidiose em amostras fecais de pacientes portadores do vírus HIV e AIDS.** São Paulo; 2003. [Dissertação de Mestrado – Coordenação dos Institutos de Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde]

Gonçalves EMN. ***Cryptosporidium parvum*: avaliação de métodos diagnósticos e aspectos epidemiológicos.** São Paulo; 2002. [Dissertação de Mestrado – Instituto de Ciências Biomédicas, USP].

Graczyk TK, Grimes BH, Knight R, da Silva AJ, Pieniazek NJ, Veal DA. Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* carried by synanthropic flies by combined fluorescent *in situ* hybridization and a monoclonal antibody. **Am J Trop Med Hyg** 2003; 68(2): 228-232.

Griffiths JK, Human cryptosporidiosis: epidemiology, transmission, clinical disease, treatment, and diagnosis. **Advances in Parasitology** 1998; 40: 37-85.

Grisi SJFE. **Contribuição ao estudo da doença diarréica aguda em crianças com idade inferior a 5 anos e recuperação fecal de *Cryptosporidium* sp.** São Paulo; 1993. [Tese de Livre Docência – Faculdade de Medicina – USP].

Guizelini E. **Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* sp. nas fezes de pacientes com diarréia, mediante emprego de três técnicas de coloração.** São Paulo; 1991. [Dissertação de Mestrado - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo].

Guizelini E, Amato Neto V. Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* sp. nas fezes diarréicas de aidéticos e de crianças e adultos imunocompetentes, em São Paulo. **Rev Hosp Clin Fac Med Univ São Paulo** 1992; 47(3): 150-152.

Guk SM, Yong TS, Park SJ, Park JH, Chai JY. Genotype and animal infectivity of a human isolate of *Cryptosporidium parvum* in the Republic of Korea. **Korean J Parasitol** 2004; 42(2): 85-89.

Guyot K, Follet-Dumoulin A, Recourt C, Lelièvre E, Cailliez JC, Dei-Cas E. PCR-Restriction Length Polymorphism analysis of a diagnostic 452-base-pair DNA fragment discriminates between *Cryptosporidium parvum* and *C. meleagridis* and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. **Appl Environ Microbiol** 2002; 68(4):2071-2076.

Hachich EM. **Avaliação da presença dos protozoários *Giardia* sp e *Cryptosporidium* sp em águas captadas para consumo humano no Estado de São Paulo.** São Paulo; 2002. [Tese de Doutorado - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo].

Haque R, Ali IKM, Akther S, Petri Jr WA. Comparison of PCR, Isoenzyme Analysis, and Antigen Detection for Diagnosis of *Entamoeba histolytica* Infection. **J Clin Microbiol** 1998; 36(2): 449-452.

Hasnain SE. Molecular epidemiology of infectious diseases: a case for increased surveillance. **Bull World Health Organ** 2003; 81(7): 474.

Harris JR, Petry F. *Cryptosporidium parvum*: structural components of the oocyst wall. **J Parasitol** 1999; 85(5): 839-849.

Hawdon MJ. Differentiation between the Human Hookworms *Ancylostoma duodenale* and *Necator americanus* Using PCR-RFLP. **J Parasitol** 1996; 82(4): 642-647.

Herwaldt BL, Arroyave KR, Wahlquist SP, Merida AM, Lopez AS, Juranek DD. Multiyear prospective study of intestinal parasitism in a cohort of peace corps volunteers in Guatemala. **J Clin Microbiol** 2001. 39(1): 34-42.

Higgins JÁ, Jenkins MC, Shelton DR, Fayer R, Karns JS. Rapid extraction of DNA from *Escherichia coli* and *Cryptosporidium parvum* for use in PCR. **Appl Environ Microbiol** 2001; 67(11): 5321-5324.

Higgins JÁ, Fayer R, Trout JM, Xiao L, Lal AA, Kerby S, Jenkins MC. Real-time PCR for the detection of *Cryptosporidium parvum*. **J Microbiol Methods** 2001; 47: 323-337.

Howe AD, Forster S, Morton S, Marshal R, Osborn KS, Wright P, Hunter PR. *Cryptosporidium* oocysts in a water supply associated with a cryptosporidiosis outbreak. **Emerg Infect Dis** 2002; 8(6): 619-624.

Huber F, Bonfim TC, Gomes RS. Comparação da eficiência da coloração pelo método da safranina a quente e da técnica de centrífugo-flutuação na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras fecais de animais domésticos. **Rev Bras Parasitol Vet** 2004, 13(2): 81-84.

Hunter PR, Hughes S, Woodhouse S, Raj N, Syed Q, Chalmers RM, Verlander NO, Goodacre J. Health sequelae of human cryptosporidiosis in immunocompetent patients. **Clin Infect Dis** 2004; 39: 504-510.

Isaac-Renton J, Blatherwick J, Bowie WR, Fyfe M, Khan M, Li A, King A, McLean M, Medd L, Moorehead W, Ong CS, Robertson W. Epidemic and endemic seroprevalence of antibodies to *Cryptosporidium* and *Giardia* in residents of three communities with different drinking water supplies. **Am J Trop Med Hyg** 1999; 60(4): 578-583.

Jabur J, Miorin P, Silva LA, Cardim HG, Paschoalotti MA, Chieffi, Chieffi PP, Sens YAS. Criptosporidiose e outras enteroparasitoses em pacientes submetidos a transplante renal ou hemodiálise **J. bras. nefrol** 1996; 18(3): 239-242.

Jellison KL, Distel DL, Hemond HF, Schauer DB. Phylogenetic analysis of the hypervariable region of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* oocysts in feces of Canada geese (*Branta canadensis*): evidence for five novel genotypes. **Appl Environ Microbiol** 2004; 70(1):452-458.

Jensen BN, Gerstoft J, Hojlyng N, Backer V, Paaske M, Gomme G, Skinhoj P. Pulmonary pathogens in HIV-infected patients. **Scand J Infect Dis** 1990; 22(4):413-420.

Jianlin J, Xiao L. An evaluation of molecular diagnostic tools for the detection and differentiation of human-pathogenic *Cryptosporidium* spp. **J Eukaryot Microbiol** 2003; 542-547.

Johnson DW., Pieniazek NJ., Griffin DW., Misener L., Rose JB. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. **Appl Environ Microbiol** 1995; 61(11): 3849-3855.

Jongwutiwes S, Tiangtip R, Yentakarm S, Chantachum N. Simple method for long-term copro-preservation of *Cryptosporidium* oocysts for morphometric and molecular analysis. **Trop Med Int Health** 2002; 7(3): 257-264.

Kassa H, Harrington BJ, Bisesi MS. Cryptosporidiosis: a brief literature review and update regarding *Cryptosporidium* in feces of Canada geese (*Branta canadensis*). **J Environ Health** 2004; 66(7): 34-40.

Kimbell III LM, Miller DL, Chavez W, Altman N. Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium serpentis* in a wild-caught corn snake (*Elaphe guttata guttata*) and a five-species restriction fragment length polymorphism-based assay that can additionally discern *C. parvum* from *C. wrairi*. **Appl Environ Microbiol** 1999; 65(12): 5345-5349.

Khun RC, Rock CM, Oshima KH. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in wild ducks along the Rio Grande River Valley in Southern New Mexico. **Appl Environ Microbiol** 2002; 68(1): 161-165.

Laberge I, Ibrahim A, Barta JR, Griffiths MW. Detection of *Cryptosporidium parvum* in raw milk by PCR and oligonucleotide probe hybridization. **Appl Environ Microbiol** 1996; 62(9): 3259-3264.

Lallo MA. **Ocorrência de *Cryptosporidium parvum* em cães na Grande São Paulo.** São Paulo; 1993. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP].

Laxer MA, Timblin BK, Patel RJ. DNA sequences for the specific detection of *Cryptosporidium parvum* by the polymerase chain reaction. **Am J Trop Med Hyg** 1991; 45(6): 688-694.

Leav BA, Mackay M, Ward HD. *Cryptosporidium* species: New insights and old challenges. **Clin Infect Dis** 2003; 36: 903-908.

Lemarchand K, Lebaron P. Occurrence of *Salmonella* spp. and *Cryptosporidium* spp. in a French coastal watershed: relationship with fecal indicators. **FEMS Microbiol Letters** 2003; 218: 203-209.

Leoni F, Gallimore CI, Green J, McLauchlin J. A rapid method for identifying diversity within PCR amplicons using a heteroduplex mobility assay and synthetic polynucleotides: application to characterization of dsRNA elements associated with *Cryptosporidium*. **J Microbiol Methods** 2003; 54: 95-103.

Levine ND. Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (Protozoa: Apicomplexa). **J Protozool.** 1984; 31(1):94-98.

Lima AA, Moore SR, Barboza MS Jr, Soares AM, Schleupner MA, Newman RD, Sears CL, Nataro JP, Fedorko DP, Wuhib T, Schorling JB, Guerrant RL. Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in northeastern Brazil. **Infect Dis** 2000; 181(5):1643-1651.

Lima EC, Stamford TLM. *Cryptosporidium* spp. no ambiente aquático: aspectos relevantes da disseminação e diagnóstico. **Ciência Saúde Coletiva** 2003; 8(3): 791-800.

Lima AA, Fang G, Schorling JB, De Albuquerque L, Mcauliffe JF, Mota S, Leite R, Guerrant RL. Persistent diarrhea in Northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. **Acta Paediatr**. 1992;81 Suppl 381:39-44.

Limor JR, Lal AA, Xiao L. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* parasites that are pathogenic for humans by Real-Time PCR. **J Clin Microbiol** 2002; 40(7):2335-2338.

Linhares AC, Freitas RB, Gabbay YB, Mascarenhas JDP, Lins ZC, Ramos FLP. Incidencia das diarreias infantis agudas em um bairro periferico de Belem, Para: fase preparatoria de um futuro estudo de campo com uma vacina contra rotavirus . **J Pedriat** 1990; 66(8/9): 205-210.

Loureiro ECB, Linhares AC, Mata L. Criptosporidiose em crianças de 1 a 2 anos de idade, com diarreia aguda em Belém, Pará, Brasil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1989; 84(1): 117-122.

Newman RD, Sears CL, Moore SR, Nataro JP, Wuhib T, Agnew DA, Guerrant RL, Lima AA. Longitudinal study of *Cryptosporidium* infection in children in northeastern Brazil. **J Infect Dis**. 1999;180(1):167-175.

Lowery CJ, Moore JE, Millar BC, Burke DP, McCorry KAJ, Crothers E, Dooley JSG. Detection and speciation of *Cryptosporidium* spp. in environmental water samples by immunomagnetic separation, PCR and endonuclease restriction. **J Med Microbiol** 2000; 49: 779-785.

Lowery CJ, Moore JE, Millar BC, McCorry KAJ, Xu J, Rooney PJ, Dooley JSG. Occurrence and molecular genotyping of *Cryptosporidium* spp. in surface waters in Northern Ireland. **J Appl Microbiol** 2001; 91: 774-779.

Luna S, Reyes L, Chinchilla L, Misael, Gabriela C. Presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp en aguas superficiales en Costa Rica **Parasitol. Latinoam** 2002; 57(1/2): 63-65.

Makri A, Modarres R, Parkin R. Cryptosporidiosis susceptibility and risk: A case study. **Risk Analysis** 2004; 24(1): 209-219.

Mangini ACS, Dias RMDS, Grisi SJFE, Escobar AMU, Torres DMAGV, Zuba IPR, Quadros CM, Chieffi PP. Parasitismo por *Cryptosporidium* sp. em crianças com diarreia aguda. **Rev Inst Med trop São Paulo** 1992; 34(4):341-345.

Martinez I, Belda Neto F. Contribution to the laboratory diagnosis of human cryptosporidiosis. **Rev Inst Med S Paulo** 2001; 43(2): 79-82.

Mayer CL, Palmer CJ. Evaluation of PCR, Nested PCR, and fluorescent antibodies for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* species in wastewater. **Appl Environ Microbiol** 1996; 62(6): 2081-2085.

McLauchlin J, Amar C, Pedraza-Díaz S, Nichols. Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. **J Clin Microbiol** 2000; 38(11): 3984-3990.

McLauchlin J, Pedraza-Díaz, Amar-Hoetzeneder C, Nichols GL. Genetic characterization of *Cryptosporidium* strains from 218 patients with diarrhea diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis. **J Clin Microbiol** 1999; 37(10): 3153-3158.

Mead JR. Recent trends in *Cryptosporidium* research: workshop summary **J Eukaryot Microbiol.** 1999 Sep-Oct;46(5):38S-39S.

Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. Food-related illness and death in the United States. Emerg Infect Dis. 1999; 5(5): 607-625

Meisel JL, Perera DR, Meligro C, Rubin CE. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. **Gastroenterology** 1976; 70: 1156-1160.

Millar BC, Finn M, Xiao L, Lowery CJ, Dooley JSG, Moore JE. *Cryptosporidium* in foodstuffs- an emerging aetiological route of human foodborne illness. **Trends Food Scien Tech** 2002; 13: 168-187.

Moitinho MLR, Roberto ACBS, Martins MR. Ocorrência de *Cryptosporidium* sp em fezes diarréicas de crianças do Município de Maringá PR. **Acta bioquim clin latinoam** 1999; 33(2): 249-253.

Monis PT, Andrews RH, Saint CP. Molecular biology techniques in parasite ecology. **Int J Parasitol** 2002; 32: 551-562.

Monis PT. e Andrews RH. Molecular epidemiology: assumptions and limitations of commonly applied methods. **Int J Parasitol** 1998; 28: 981-987.

Morgan UM. Detection and characterization of parasites causing emerging zoonoses. **Int J Parasitol** 2000; 30: 1407-21.

Morgan UM, Monis PT, Xiao L, Limor J, Sulaiman I, Raidal S, O'Donoghue, Gasser R, Murray A, Fayer R, Blagburn BL, Lal AA, Thompson RCA. Molecular and phylogenetic characterisation of *Cryptosporidium* from birds. **Int J Parasitol** 2001; 31(3):289-296.

Morgan UM, Xiao L, Monis P, Fall A, Irwin PJ, Fayer R, Denholm KM, Limor J, Lal A, Thompson RCA. *Cryptosporidium* spp. in domestic dogs: the “dog” genotype. **Appl Envir Microbiol** 2000; 66(5): 2220-2223.

Morgan U, Weber R, Xiao L, Sulaiman I, Thompson RCA, Ndiritu W et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected individual living in Switzerland, Kenya, and the United States. **J Clin Microbiol** 2000; 38(3): 1180-1183

Morgan UM, Xiao L, Fayer R, Lal AA, Thompson RC. Variation in *Cryptosporidium*: towards a taxonomic revision of the genus. **Int J Parasitol** 1999; 29:1733-1751.

Morgan UM, Pallant L, Dwyer BW, Forbes DA, Rich G, Thompson RCA. Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. **J Clin Microbiol** 1998; 36(4): 995-998.

Morgan UM, Constantine CC, Forbes DA, Thompson RCA. Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using rDNA sequencing and direct PCR analysis. 1997; **J Parasitol** 83(5): 825-830.

Morgan UM, O'Brien PA, Thompson RCA. The development of diagnostic PCR primers for *Cryptosporidium* using RAPD-PCR. **Mol Bioch Parasitol** 1996; 77: 103-108.

Morgan-Ryan UM, Fall A, Ward LA, Hijjawi N, Sulaiman I, Fayer R, et al. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. **J Eukaryot Microbiol** 2002; 49(6):433-440.

Muller APB. **Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana de São Paulo.** São Paulo; 2000. [Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].

Navarro-i-Martinez L, Bornay-Llinares J, Rueda C, del Aguila C, da Silva AJ, Oleaga A, Ramajo V, Fenoy S, Pieniazek NJ. Molecular characterization of *Cryptosporidium* sp. from animals in Spain. **J Eukaryot Microbiol** 2003; 553-554.

Navin TR, Juranek DD. Cryptosporidiosis: clinical, epidemiologic and parasitologic review. **Rev Infect Dis** 1984; 6: 313-327.

Newman RD, Zu SX, Wuhib T, Lima AA, Guerrant RL, Sears CL. Household epidemiology of *Cryptosporidium parvum* infection in an urban community in northeast Brazil. **Ann Intern Med** 1994; 120(6): 500-505.

Newman RD, Wuhib T, Lima AA, Guerrant RL, Sears CL. Environmental sources of *Cryptosporidium* in an urban slum in northeastern Brazil. **Am J Trop Med Hyg** 1993; 49(2): 270-275.

Nime FA, Burek JD, Page DL, Holscher MA, Yardley JH. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. **Gastroenterology** 1976; 70: 592-598.

Ong CSL, Eisler DL, Goh SH, Tomblin J, Awad-El-Kariem FM, Beard CB, Xiao L, Sulaiman I, Lal AA, Fyfe M, King A, Bowie WR, Isaac-Renton J. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis outbreaks and transmission in British Columbia, Canada. **Am J Trop Med Hyg** 1999; 61(1): 63-69.

Orlandi PA e Lampel KA. Extraction-free, filter-based template preparation for rapid and sensitive PCR detection of pathogenic parasitic protozoa. **J Clin Microbiol** 2000; 38(6): 2271-2277.

Ortega YR, Roxas CR, Gilman RH, Miller NJ, Cabrera L, Taquiri C, Sterling CR. Isolation of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* from vegetables collected in markets of an endemic region in Peru. **Am J Trop Med Hyg** 1997; 57(6): 683-686.

Ortega YR, Sheehy RR, Cama VA, Oishi KK, Sterling CR. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates of bovine and human origin. **J Protozool** 1991; 38(6): 40S-41S.

Oshiro ET, Dorval MEC, Nunes VLB, Silva MAA, Said LAM. Prevalência do *Cryptosporidium parvum* em crianças abaixo de 5 anos, residentes na zona urbana de Campo Grande, MS, Brasil, 1996. **Rev Soc Bras Med Trop** 2000; 33(3): 277-280.

Palmer C, Xiao L, Terashima A, Guerra H, Gotuzzo E, Saldías G, et al. *Cryptosporidium muris*, a rodent pathogen, recovered from a human in Perú. **Emerging Infect Dis** 2003; 9(9): 1174-1176.

Pastwa E, Neumann RD, Winters TA. *In vitro* repair complex unligatable oxidatively induced DNA double-strand breaks by human cell extracts. **Nucleic Ac Res** 2001; 29(16): e78.

Patel S, Pedraza-Díaz, McLauchlin. The identification of *Cryptosporidium* species and *Cryptosporidium parvum* directly from whole faeces by analysis of a Multiplex PCR of the 18S rRNA gene and by PCR/RFLP of the *Cryptosporidium* outer wall protein (COWP) gene. **Int J Parasitol** 1999; 29: 1241-1247.

Pedraza-Díaz S, Amar CFL, McLauchlin J, Nichols GL, Cotton KM, Godwin P, Iversen AM, Milne L, Mulla JR, Nye K, Panigrahl H, Venn SR, Wiggins R, Williams M, Youngs ER. *Cryptosporidium meleagridis* from humans: molecular analysis and description of affected patients. **J Infection** 2001; 42(4): 243-250.

Pedraza-Díaz S, Amar C, McLauchlin. The identification and characterization of an unusual genotype of *Cryptosporidium* from human faeces as *Cryptosporidium meleagridis*. **FEMS Microbol Let** 2000; 189: 189-194.

Peng MM, Wilson ML, Holland RE, Meshnick SR, Lal AA, Xiao L. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in cattle in Michigan: implications for understanding the transmission dynamics. **Parasitol Res** 2003; 90: 175-180.

Peng MM, Meshnick SR, Cunliffe NA, Thindwa BDM, Hart CA, Broadhead RL, Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis in children in Malawi. **J Eukaryot Microbiol** 2003; 557-559.

Peng MM, Xiao L, Freeman AR, Arrowood MJ, Escalante AA, Weltman AC. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. **Emerging Infect Dis** 1997; 3(4): 567-573.

Pereira MD, Atwill ER, Barbosa AP, Silva AS; García-Zapata MT. Intra-familial and extra-familial risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* among children hospitalized for diarrhea in Goiânia, Goiás, Brazil. **Am J Trop Med Hyg** 2002; 66(6): 787-793.

Perz JF., Le Blancq SM. *Cryptosporidium parvum* infection involving novel genotypes in wildlife from Lower New York State. **Appl Environ Microbiol** 2001; 67(3): 1154-1162.

Pieniazek NJ, Bornay-Llinares FJ, Slemenda SB, da Silva AJ, Moura INS, Arrowood MJ, Ditrich O, Addiss DG. New *Cryptosporidium* genotypes in HIV-infected persons. **Emerg Infect Dis** 1999; 5(3): 444-449.

Prichard R, Tait A. The role of molecular biology in veterinary parasitology. **Vet Parasitol** 2001; 98: 169-194.

Quintero-Betancourt W, Peele ER, Rose JB. *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis*: a review of laboratory methods for detection of these waterborne parasites. **J Microbiol Methods** 2002; 49: 209-224.

Ramachandran S, Gam AA, Neva FA. Molecular differences between several species of *Strongyloides* and comparison of selected isolates of *S. stercoralis* using a Polymerase Chain Reaction-linked restriction fragment length polymorphism approach. **Am J Trop Med Hyg** 1997; 56(1): 61-65.

Ramirez NE, Ward LA, Sreevatsan S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. **Microbes Infection** 2004; 6: 773-785.

Rimhanen-Finne R, Vuorinen A, Marmo S, Malmberg S, Hänninen ML. Comparative analysis of *Cryptosporidium*, *Giardia* and indicator bacteria during sewage sludge hygienization in various composting process. **LETTERS Appl Microbiol** 2004; 38: 301-305.

Rimhanen-Finne R, Ronkainen P, Hänninen ML. Simultaneous detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* in sewage sludge by IC-PCR. **J Appl Microbiol** 2001; 91: 1030-1035.

Robertson LJ, Campbell AT, Smith HV. Induction of folds or sutures on the walls of *Cryptosporidium parvum* oocysts and their importance as a diagnostic feature. **Appl Environ Microbiol**. 1993; 59(8):2638-2641.

Rochelle PA, de Leon R, Johnson A, Stewart MH, Wolfe RL. Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts from environmental samples. **Appl Environ Microbiol** 1999; 65(2): 841-845.

Rochelle PA, de Leon R, Stewart MH, Wolfe RL. Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. **Appl Environ Microbiol** 1997; 63(1): 106-114.

Rochelle PA, Ferguson DM, Handojo TJ, de Leon R, Stewart MH, Wolfe R. An assay combining Reverse Transcriptase PCR to detect and determine the infectivity of waterborne *Cryptosporidium parvum*. **Appl Environ Microbiol** 1997; 63(5): 2029-2037.

Rodrigues JLN, Leser P, Silva TMJ, Santos MID dos, Dalboni MA, Acceturi CA, Castelo Filho A. Prevalência de criptosporidiose na síndrome diarréica do paciente HIV positivo. **AMB Rev Assoc Med Bras** 1991; 37(2): 79-84.

Roy SL, DeLong SM, Stenzel AS, Shiferaw B, Roberts JM, Khalakdina A, Marcus R, Segler S, Shah DD, Thomas S, Vugia DJ, Zansky SM, Dietz V, Beach MJ, and the Emerging Infections Program FoodNet Working Group. Risk factors for sporadic cryptosporidiosis among immunocompetent persons in the United States from 1999 to 2001. **J Clin Microbiol** 2004; 42(7):2944-2951.

Ryan U, Xiao L, Read C, Zhou L, Lal AA, Pavlasek. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. **Appl Environ Microbiol** 2003; 69(7): 4302-4307.

Sambrook J, Frits EF, Maniatis T. **Molecular cloning. A laboratory manual.** 2nd ed, Cold Spring Harbor. Laboratory Press, USA, 1989.

Saredi N, Bava J. Cryptosporidiosis in pediatric patients. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1998; 40: 197-200.

Satoh M, Hikosaka K, Sasaki T, Suyama Y, Yanai T, Ohta M, Nakai Y. Characteristics of a novel type of bovine *Cryptosporidium andersoni*. **Appl Envir Microbiol** 2003; 69(1): 691-692.

Sauda FC, Zamarioli LA, Ebner Filho W, Mello LB. Prevalence of *Cryptosporidium* sp and *Isospora belli* among AIDS patients attending Santos Reference Center for AIDS, São Paulo, Brazil. **J Parasitol** 1993; 79(3): 454-456.

Schnack FJ, Fontana LM, Barbosa PR, da Silva LSM, Baillargeon CMM, Barichello T, Póvoa MM, Cavasini CE, Machado RL. Enteropatógenos associados com diarreia infantil (< 5 anos de idade) em amostra da população da área metropolitana de Criciúma, Santa Catarina, Brasil. **Cad Saude Publica** 2003; 19(4): 1205-1208.

Schuller M. São Paulo, 2003. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública – USP]

Scorza AV, Brewer MM, Lappin MR. Polymerase Chain Reaction for the detection of *Cryptosporidium* spp. in cat feces. **J Parasitol** 2003; 89(2): 423-426.

Simmons III OD, Sobsey MD, Heaney CD, Chaefer III FW, Francy DS. Concentration and detection of *Cryptosporidium* oocysts in surface water samples by Method 1622 using ultrafiltration and capsule filtration. **Appl Env Microbiol** 2001; 67(3):1123-1127.

Silva CGM, Andrade SAC, Stamford TLM. Ocorrência de *Cryptosporidium* e outros parasitas em hortaliças consumidas *in natura* no Brasil. Anais do XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia. Florianópolis, 2003.

Singh B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. **Int J Parasitol** 1997; 27(10): 1135-1145.

Slifko TR, Smith HV, Rose JB. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. **Int J Parasitol** 2000; 30: 1379-1393.

Sodre FC, Franco RMB. Novos aspectos sobre um tema bem conhecido: *Cryptosporidium*. **RBAC** 2001; 33(2): 97-107.

Spano F, Putignani L, Crisanti A, Sallicandro P, Morgan UM, Le Blancq SM, Tchack L, Tzipori S, Widmer G. Multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from different hosts and geographical origins. **J Clin Microbiol** 1998; 36(11): 3255-3259.

Sréter T, Varga I. Cryptosporidiosis in birds – A review. **Vet Parasitol** 2000; 87(4): 261-279.

Sturbaum GD, Reed C, Hoover PJ, Jost BH, Marshall MM, Sterling CR. Species-specific, Nested PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism detection of single *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Appl Environ Microbiol** 2001; 67(6): 2665-

Sulaiman IM, Morgan UM, Thompson RCA, Lal AA, Xiao L. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. **Appl Environ Microbiol** 2000; 66(6): 2385-2391.

Sulaiman IM, Xiao L, Lal AA. Evaluation of *Cryptosporidium parvum* genotyping techniques. **Appl Environ Microbiol** 1999; 65(10): 4431-4435.

Tanriverdi S, Özkan Arslan M, Akiyoshi DE, Tzipori S, Widmer G. Identification of genotypically mixed *Cryptosporidium parvum* populations in humans and calves. **Mol Bioch Parasitol** 2003; 130: 13-22.

Tanriverdi S, Tanyeli A, Baslamish F, Köksal F, Kilingç Y, Feng X, Batzer G, Tzipori S, Widmer G. Detection and genotyping of oocysts of *Cryptosporidium parvum* by real-time PCR and melting curve analysis. **J Clin Microbiol** 2002; 40(9): 3237-3244.

Teunis PFM, Chappell CL, Okhuysen PC. *Cryptosporidium* dose-response studies: variation between hosts. **Risk Analysis** 2002; 22(3): 475-485.

Thompson RC. Presidential address: rediscovering parasites using molecular tools – towards revising the taxonomy of *Echinococcus*, *Giardia* and *Cryptosporidium*. **Int J Parasitol** 2002; 32: 493-496.

Thompson RC e Chalmers RM. *Cryptosporidium*: from molecules to disease. **TRENDS in Parasitology** 2002; 18(3): 98-100.

Thompson RCA, Constantine CC, Morgan UM. Overview and significance of molecular methods: what role for molecular epidemiology? **Parasitol** 1998; 117: S161-S175.

Tiangtip R, Jongwutiwes S. Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from patients in Thailand. **Trop Med Int Health** 2002; 7(4): 357-364.

Tomps SR. **Estudo epidemiológico da criptosporidiose e sua associação com as condições de saneamento ambiental no Distrito Municipal de Perus, São Paulo-**

SP. São Paulo; 1998. [Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Saneamento Ambiental. Universidade Mackenzie].

Tzipori S, Ward H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. **Microbes Infections** 2002; 4: 1047-1058.

Upton SJ. Basic biology of *Cryptosporidium* <http://www.ksu.edu/parasitology/basicbio>, acesso em Novembro de 2004.

Verlengia R, Hirata RDC, Hirata MH. Prevenção e controle da contaminação nas Reações de Amplificação de Ácidos Nucléicos. **NewsLab** 2000; 43: 69-78.

Wallis PM, Erlandsen SL, Isaac-Renton JL, Olson ME, Robertson WJ, Van Keulen H. Prevalence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts and characterization of *Giardia* spp. isolated from drinking water in Canada. **Appl Environ Microbiol** 1996; 62(8): 2789-2797.

Ward LA, Wang Y. Rapid methods to isolate *Cryptosporidium* DNA from frozen feces for PCR. **Diag Microbiol Inf Dis** 2001; 41: 37-42.

Ward PI, Deplazes P, Regli W, Rinder H, Mathis A. Detection on eight *Cryptosporidium* genotypes in surface and waste waters in Europe. **Parasitol** 2002; 124: 359-368.

Weikel CS, Johnston LI, de Souza MA, Guerrant RL. Cryptosporidiosis in northeastern Brazil: association with sporadic diarrhea. **J Infect Dis** 1985; 151: 963-965.

Wiebbelling AMP, Mezzari A, Schenato LK, Richter VT, Bohme ES. Avaliação do conhecimento sobre criptosporidiose em uma amostra de médicos de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **J bras patol med lab** 2002; 38(2): 119-123.

Widmer G. Population genetics of *Cryptosporidium parvum*. **TRENDS Parasitol** 2004; 20(1): 3-6.

Widmer G., Lin L., Kapur V., Feng X., Abrahamsen MS. Genomics and genetics of *Cryptosporidium parvum*: the key to understanding cryptosporidiosis. **Microbes and Infection** 2002; 4: 1081-1090.

Widmer G, Orbach EA, Tzipori S. β -Tubulin mRNA as a marker of *Cryptosporidium parvum* oocysts viability. **Appl Env Microbiol** 1999; 1584-1588.

Widmer G, Tzipori, Fichtenbaum CJ, Griffiths CJ. Genotypic and phenotypic characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates from people with AIDS. **J Infect Dis** 1998; 178: 834-840.

Wu Z, Nagano I, Matsuo A, Uga S, Kimata I, Iseki M, Takahashi Y. Specific PCR primers for *Cryptosporidium parvum* with extra high sensitivity. **Mol Cel Probes** 2000; 14: 33-39.

Wuhib T, Silva TM, Newman RD, Garcia LS, Pereira ML, Chaves CS, Wahlquist SP, Bryan RT, Guerrant RL, Sousa Ade Q, *et al.* Cryptosporidial and microsporidial infections in human immunodeficiency virus-infected patients in northeastern Brazil. **J Infect Dis.** 1994;170(2):494-497.

Xiao L, Sulaiman IM, Ryan UM, Zhou L, Atwill ER, Tischler ML, et al. Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. **Int J Parasitol** 2002; 32: 1773-1785.

Xiao L, Bern C, Limor J, Sulaiman I, Roberts J, Checkley W, et al. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. **J Infect Dis** 2001; 183: 492-497.

Xiao L, Singh A, Limor J, Graczyk TK, Gradus S, Lal A. Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw water and wastewater. **Appl Environ Microbiol** 2001; 67(3): 1097-1101.

Xiao L, Morgan UM, Fayer R, Thompson RCA, Lal AA. *Cryptosporidium* systematics and implications for public health. **Parasitol Today** 2000; 16(7): 287-292.

Xiao L, Alderisio K, Limor J, Royer M, Lal AA. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. **Appl Environ Microbiol** 2000; 66(12): 5492-5498.

Xiao L, Morgan UM, Limor J, Escalante A, Arrowood M, Shulaw W, et al. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. **Appl Environ Microbiol** 1999a; 65(8): 3386-3391.

Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ et al. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. **Appl Environ Microbiol** 1999b; 65(4): 1578-1583.

Zhou L, Singh A, Jiang J, Xiao L. Molecular surveillance of *Cryptosporidium* spp. in raw water in Milwaukee: implications for understanding outbreak occurrence and transmission dynamics. **J Clin Microbiol** 2003; 41(11): 5254-5257.

Zhu G, Marchewka, Ennis JG, Keithly JS. Direct isolation of DNA from patients stools for Polymerase Chain Reaction detection of *Cryptosporidium parvum*. **J Inf Dis** 1998; 177: 1443-1447.

Zu SX, Li JF, Barret LJ, Fayer R, Shu SY, McAuliffe JF, Roche JK, Guerrant RL. Seroepidemiologic study of *Cryptosporidium* infection in children from rural communities of Anhui, China and Fortaleza, Brazil. **Am J Trop Med Hyg** 1994; 51(1): 1-10.