

MIKAELA RENATA FUNADA

Avaliação de métodos de extração de DNA de *Cryptosporidium*
spp. em amostras fecais e comparação da *nested* PCR com
o método coproparasitológico de centrífugo-flutuação
em sacarose

São Paulo

2009

MIKAELA RENATA FUNADA

Avaliação de métodos de extração de DNA de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais e comparação da *nested* PCR com o método coproparasitológico de centrífugo-flutuação em sacarose

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares

São Paulo

2009

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2099 FMVZ	<p>Funada, Mikaela Renata Avaliação de métodos de extração de DNA de <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostras fecais e comparação de <i>nested</i> PCR com o método coproparasitológico de centrífugo-flutuação em sacarose / Mikaela Renata Funada. – São Paulo : M. R. Funada, 2009. 76 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2009.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses. Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares.</p> <p>1. <i>Cryptosporidium</i>. 2. Diagnóstico (métodos). 3. DNA (extração). 4. Reação em cadeia polimerase. 5. Fezes. I. Título.</p>
----------------	--



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

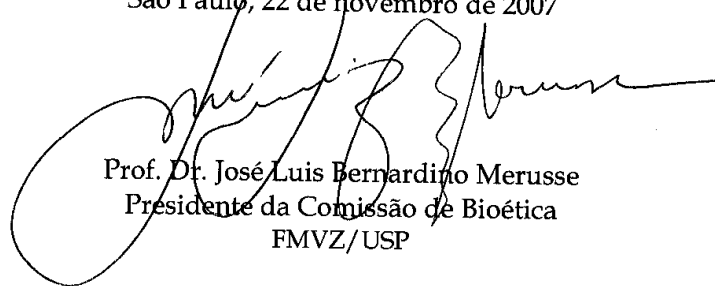
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação de métodos de extração de DNA de *Cryptosporidium* spp. Em amostras fecais de caninos e bovinos e comparação da PCR com método coproparasitológico de centrifugo-flutuação em solução de sacarose", protocolado sob o nº1236/2007, no qual não serão utilizados animais, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 21/11/07.

We certify that the Research "Evaluation of DNA extraction methods of *Cryptosporidium* spp. from stool samples of dogs and cattle and comparison of PCR with sucrose centrifugal flotation technique", protocol number 1236/2007, under the responsibility Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 11/21/07.

São Paulo, 22 de novembro de 2007



Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FUNADA, Mikaela Renata

Título: Avaliação de métodos de extração de DNA de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais e comparação da *nested* PCR com o método coproparasitológico de centrífugo-flutuação em sacarose

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

DATA ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

Aos meus pais
Yukio Funada e
Luiza Izuko Funada,
pelo carinho e atenção dedicados à minha formação,
direcionado-me na honra, determinação e trabalho

Ao meu esposo
Márcio Ribeiro Barbosa,
Ser admirável, de coração grandioso.
Por fazer parte de minha vida, enchê-la de sonhos e alegrias.
Por toda compreensão e paciência.

E desde então, sou porque tu és
E desde então és
Sou e somos...
E por amor...
Serei... Serás... Seremos...
(Pablo Neruda)

Agradecimentos especiais

A **DEUS**, por ter-me concedido a oportunidade, dentre tantos, de participar de um curso de excelência, dando-me saúde para completá-lo, dando-me paciência para entendê-lo, não necessitando em nenhum momento humilhar-me, ser desonesta ou abdicar-me de minha honra.

Ao Prof. Rodrigo Martins Soares,
pelas oportunidades de aperfeiçoamento profissional,
pelos ensinamentos, incentivos,
pela confiança em meu trabalho,
por todo esforço despendido nesta orientação.

A Prof^a Solange Maria Gennari,
pela oportunidade de ingresso na Parasitologia,
pela confiança, carinho e atenção.

Exemplos de pessoas e profissionais,
meus sinceros agradecimentos e eterna admiração.

Agradecimentos

À Dr^a Hilda Fátima de Jesus Pena, pela amizade e por ter contribuído de forma expressiva em minha formação profissional na área da Parasitologia.

Ao Prof. Leonardo José Richtzenhain, pela confiança, oportunidade de aprendizado e colaboração na realização deste trabalho pelo uso do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia.

À Dr^a Adriana Cortez, pela amizade e valiosos ensinamentos em Biologia Molecular.

Ao Prof. Marcelo Vasconcelos Meireles da Universidade Estadual Paulista, pelas sugestões e participação na banca examinadora.

Ao Prof. Paulo Eduardo Brandão, pelos ensinamentos e disponibilidade em auxiliar prontamente sempre que precisei.

A todos os demais professores do VPS, em especial, ao Prof. Silvio Arruda Vasconcelos, pelo esforço no aprimoramento do curso de pós-graduação.

À Prof^a Alda M. B. N. Madeira e à pós-graduanda Alessandra P. S. Manha do Instituto de Ciências Biomédicas, pelos esclarecimentos e contribuição material.

Aos Professores Maria Helena Matté e Glavur Rogério Matté, às pós-graduandas Ronalda Silva de Araújo e Licia Natal Fernandes do Departamento de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da USP, pelos esclarecimentos, sugestões e contribuição material.

Ao Prof. Eliseu Alves Waldman do Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da USP, por permitir minha participação em sua disciplina e pelos valiosos ensinamentos.

A Anaiá da Paixão Sevá, Patrícia de Lucca, Leandra Ribeiro Ferreira, Silvio Luís Pereira de Souza, Helena Arantes, Renata Molina Monteiro, Vanessa Muradian, Lúcia Eiko Oishi Yai, Alexandre Thomaz, pela amizade e por me auxiliarem sempre que precisei.

À pós-graduanda Tânia Alén Coutinho, pela amizade, auxílio e esclarecimentos nos procedimentos laboratoriais.

À Sheila Oliveira Souza pelo apoio e sequenciamento das amostras.

Ao José Márcio Sbruzi Cardoso pela amizade e coleta de amostras.

Aos funcionários Renato Caravieri e Pedro César Ferreira, pelo agradável convívio e fundamental auxílio nos trabalhos.

À Médica Veterinária Marta Brito Guimarães e Prof^a Lílían Rose Marques de Sá do Departamento de Patologia.

Aos funcionários da secretaria do VPS, Maria Cristina Paick, Danival Lopes Moreira, Ana Virgínia P. A. Prado e Tânia Delonero.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação da FMVZ-USP, Cláudia Lima, Dayse M. A. Flexa e Joana F. D. Vasconcelos.

Aos funcionários da Biblioteca, especialmente à Elena do atendimento e à Elza Maria Rosa Bernardo Faquim pelo auxílio na revisão da dissertação.

A todos os demais funcionários do VPS.

Aos demais amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias, pelo alegre e agradável convívio: Aldo Francisco Alves Neto, Alex Akira Nakamura, Alessandra Mara Alves Ragozo, Aline A. R. Rodrigues, Andreas Lazaros Chryssafidis, Daniela Pontes Chiebáo, Eliana M. C. Villalobos, Estela Gallucci Lopes, Fernanda Sartori Lima de Godoi, Guacyara Tenório Cavalcanti, Juliana Martins, Luciana Bandini, Luciana Nunes de Oliveira, Luciana Viero da Silva, Luciane Holsback Silveira, Michelle Klein Sercundes, Patrícia de Oliveira Esmerini, Sandra Mayumi Nichi e Tatiana E. H. Ueno.

Ao Prof. Marcelo Bahia Labruna e aos (ex) pós-graduandos Adriano Pinter dos Santos, Alexandre Camargo Ataliba, Daniel Moura Aguiar, Elisangela (Lili), Fernanda A. N. Bastos, Guilherme Sakae Sabatini, Iara Silveira, Jonas Moraes Filho, Maria H. Ogrzewalska, Maurício Claudio Horta, Ricardo Ramos Cabrera, Richard Campos Pacheco, Simone Rosa, Thaís B. Saito e Thiago Fernandes Martins.

Aos demais amigos do VPS, Carlos Augusto S. Oliveira, Clarisse, Daniela Carvalho Ribeiro, Enio Mori, Flávia C. S. Oliveira, Giselle Ayres Razera, Iracema Nunes de Barros, Karen Miyuki Asano, Lara Borges Keid, Márcio Pinotti Guirao, Maria del Pilar Vejarano Ruibal, Marianna Matrone, Renata Paixão, Renata Pucci, Rosely Bianca dos Santos, Sibele Pinheiro de Souza, Thaisa Lucas Sandri, Vanessa Riesz Salgado, Vivianne C. M. Rocha.

Aos pós-graduandos Jorge Luis Chacón e Luciana Cintra do Departamento de Patologia.

A Suzi, Chico, Pinho e Sara, pelo companheirismo e amor incondicionais.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro e concessão da bolsa de mestrado (Processo 06/58352-6).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa auxílio.

Muito obrigada.

Poema da paz

O dia mais belo? Hoje
A coisa mais fácil? Equivocar-se
O obstáculo maior? O medo
O erro maior? Abandonar-se
A raiz de todos os males? O egoísmo
A distração mais bela? O trabalho
A pior derrota? O desalento
Os melhores professores? As crianças
A primeira necessidade? Comunicar-se
O que mais faz feliz? Ser útil aos demais
O mistério maior? A morte
O pior defeito? O mau humor
A coisa mais perigosa? A mentira
O sentimento pior? O rancor
O presente mais belo? O perdão,
O mais imprescindível? O lar
A estrada mais rápida? O caminho correto
A sensação mais grata? A paz interior
O resguardo mais eficaz? O sorriso
O melhor remédio? O otimismo
A maior satisfação? O dever cumprido
A força mais potente do mundo? A fé
As pessoas mais necessárias? Os pais
A coisa mais bela de todas? O amor.

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

FUNADA, M. R. **Avaliação de métodos de extração de DNA de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais e comparação da *nested* PCR com o método coproparasitológico de centrífugo-flutuação em sacarose.** [Evaluation of DNA extraction methods of *Cryptosporidium* spp. in feces and comparison of nested PCR with sucrose centrifugal flotation method]. 2009. 76 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O desempenho de seis métodos de extração de DNA de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em fezes foram avaliados pela *nested* PCR do gene SSU rRNA. Os métodos consistem na combinação com pequenas variações de duas técnicas para a liberação de esporozoítos (indução de excistamento/E ou choque térmico/C) e três técnicas de purificação de DNA (fenol-clorofórmio/F, GuSCN-sílica/S ou *kit* QIAmp DNA Stool Mini/K). Para a avaliação da sensibilidade analítica, os testes foram realizados a partir de diluições seriadas de oocistos purificados, na ausência e na presença de 100 µl de fezes bovinas. A sensibilidade diagnóstica foi avaliada pela comparação com o método microscópico de centrífugo-flutuação em sacarose (padrão-ouro) em 15 amostras fecais de diferentes hospedeiros naturalmente infectados. Na ausência de fezes, foram avaliados apenas os métodos EF, ES, CF e CS, sendo que EF apresentou sensibilidade analítica superior, possibilitando a detecção de até 1 oocisto. Na presença de fezes, os métodos EF, EK e CK apresentaram desempenhos equivalentes, com sensibilidade de 10⁴ oocistos. As maiores sensibilidades diagnósticas foram obtidas pelos métodos EK e CK, que possibilitaram a detecção de 13 (86,7%) das 15 amostras. Devido à alta sensibilidade analítica de EF em amostras purificadas, avaliou-se sua sensibilidade diagnóstica em amostras de oocistos purificados pelo método de centrífugo-flutuação em sacarose, obtendo-se 100% de detecção. A presença de inibidores nas amostras fecais reduziu fortemente a sensibilidade das reações de PCR a partir de DNA extraído pelos métodos avaliados, sendo recomendável o emprego de técnicas de purificação de oocistos previamente à extração de DNA. Os resultados apontam para uma melhor eficiência dos métodos de indução de excistamento e *kit* QIAmp DNA Stool Mini.

Palavras-chave: *Cryptosporidium*. Diagnóstico (métodos). DNA (extração). Reação em cadeia polimerase. Fezes.

ABSTRACT

FUNADA, M. R. **Evaluation of DNA extraction methods of *Cryptosporidium* spp. in feces and comparison of nested PCR with sucrose centrifugal flotation method.** [Avaliação de métodos de extração de DNA de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais e comparação da *nested* PCR com o método coproparasitológico de centrífugo-flutuação em sacarose]. 2009. 76 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The performance of six methods for DNA extraction from *Cryptosporidium* spp. oocysts in feces were evaluated by nested PCR of SSU rRNA gene. The methods are the combination with small variations of two techniques for the release of sporozoites (induction of excystation/E or thermal shock/C) and three techniques for DNA purification (phenol-chloroform/F, GuSCN-silica/S or QIAmp DNA Stool Mini kit/K). For the evaluation of analytical sensitivity, tests were made from serial dilutions of purified oocysts, in absence and in presence of 100 µl of cattle feces. The diagnostic sensitivity was assessed by comparison with the microscopic method of centrifugal-flotation in sucrose (gold standard) in 15 fecal samples from different naturally infected hosts. In the absence of feces, only methods EF, ES, FC, and CS were tested. EF had the highest analytical sensitivity, enabling the detection of up to 1 oocyst. In the presence of feces, methods EF, EK, and CK showed similar performance, with sensitivity of 10⁴ oocysts. The highest sensitivities were obtained by methods EK and CK, which enabled the detection of 13 (86.7%) of 15 samples. Due to the high analytical sensitivity of EF in purified samples, its diagnostic sensitivity was evaluated in samples of purified oocysts by the method of centrifugal-flotation in sucrose, resulting in 100% detection. The presence of inhibitors in fecal samples greatly reduced the sensitivity of the PCR reactions from DNA extraction methods evaluated, and the use of techniques for purification of oocysts prior to DNA extraction is recommended. The results show a better performance of the methods of induction of excystation and QIAmp DNA Stool Mini kit.

Key words: *Cryptosporidium*. Diagnosis (methods). DNA (extraction). Polymerase chain reaction. Feces.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Eletroforeses em gel de agarose dos produtos das *nested* PCRs do gene SSU rRNA resultantes da amplificação de DNA extraído pelos métodos EF, ES, CF e CS, a partir de oocistos purificados. Os valores são referentes ao número estimado de oocistos de *C. parvum* presente nas amostras submetidas à extração de DNA. PM: Peso molecular, múltiplos de 100 pares de base. 45
- Figura 2 – Eletroforeses em gel de agarose dos produtos das *nested* PCRs do gene SSU rRNA resultantes da amplificação de DNA extraído pelos métodos de EF, ES, EK, CF, CS e CK, a partir de 100 µl de fezes bovinas contaminadas com oocistos purificados. Os valores são referentes ao número estimado de oocistos de *C. parvum* presente nas amostras submetidas à extração de DNA. PM: Peso molecular, múltiplos de 100 pares de base. 46
- Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos da *nested* PCR do gene SSU rRNA resultante da amplificação de DNA extraído pelo método EK, a partir de amostras fecais de hospedeiros naturalmente infectados com *Cryptosporidium* spp. PM: Peso molecular, múltiplos de 100 pares de base. 48
- Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos da *nested* PCR de gene SSU rRNA resultante da amplificação de DNA extraído pelo método CK, a partir de amostras fecais de hospedeiros naturalmente infectados com *Cryptosporidium* spp. PM: Peso molecular, múltiplos de 100 pares de base. 48
- Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos da *nested* PCR do gene SSU rRNA resultante da amplificação de DNA extraído pelo método EF, a partir de amostras de oocistos de *Cryptosporidium* spp. concentrados e purificados de fezes pela técnica de centrífugo-flutuação em sacarose. PM: Peso molecular, múltiplos de 100 pares de base. 50

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Espécies de *Cryptosporidium* descritas com base em estudos de diferenciação fenotípica e genotípica dos isolados 18
- Tabela 2 – Sequências dos *primers* utilizados nas reações de PCR / *nested* PCR e seus respectivos tamanhos de fragmentos amplificados. 28
- Tabela 3 – Identificação molecular pelo sequenciamento do gene SSU rRNA de isolados fecais de *Cryptosporidium* spp. provenientes de indivíduos apresentando intensa liberação de oocistos. 42
- Tabela 4 – Sensibilidades analíticas das *nested* PCRs do gene SSU rRNA após amplificação de DNA extraído por diferentes métodos, na ausência e na presença de 100 µl de fezes bovina. As diluições avaliadas continham de 10⁵ a 1 oocisto(s). 44
- Tabela 5 – Sensibilidades diagnósticas dos diferentes métodos de extração de DNA, determinadas por meio da *nested* PCR do gene SSU rRNA de 15 amostras fecais positivas pelo método coproparasitológico de centrífugo-flutuação em sacarose, considerado o padrão-ouro 47
- Tabela 6 – Resultados das ampliações pela *nested* PCR do gene SSU rRNA de amostras fecais positivas na pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* pelo método de centrífugo-flutuação em sacarose. As amostras fecais foram submetidas a seis métodos de extração de DNA, resultantes da combinação com pequenas variações de cinco técnicas: excistamento (E), choque térmico (C), fenol-clorofórmio (F), GuSCN-sílica (S) e *kit* QIAmp DNA Stool Mini (K). As amostras eram provenientes de humanos (H), bovinos (B), cão (C) e gatos (G)... 49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVOS GERAIS	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 OBTENÇÃO DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium parvum</i>	26
3.1.1 <i>Amostras fecais</i>	26
3.1.2 <i>Pesquisa de oocistos de Cryptosporidium spp. pelo método de centrífugo-flutuação em sacarose (Sheather modificado)</i>	27
3.1.3 <i>Recuperação de oocistos de Cryptosporidium tipo parvum</i>	27
3.1.4 <i>Caracterização genotípica</i>	28
3.1.4.1 <i>Extração de DNA</i>	28
3.1.4.2 <i>PCR e nested PCR</i>	28
3.1.4.3 <i>Detecção do produto amplificado</i>	29
3.1.4.4 <i>Purificação do produto amplificado</i>	29
3.1.4.5 <i>Quantificação do DNA Purificado</i>	30
3.1.4.6 <i>Reação de Sequenciamento</i>	30
3.1.4.7 <i>Precipitação do produto amplificado</i>	30
3.1.4.8 <i>Sequenciamento</i>	31
3.1.4.9 <i>Alinhamento, tradução das seqüências de nucleotídeos e edição final</i>	31
3.1.5 <i>Purificação de oocistos de Cryptosporidium parvum</i>	31
3.2 TESTE DE SENSIBILIDADE ANALÍTICA	32
3.3 TESTE DE SENSIBILIDADE DIAGNÓSTICA	33
3.3.1 <i>Sensibilidade diagnóstica dos métodos de extração de DNA em amostras fecais</i>	34
3.3.2 <i>Sensibilidade diagnóstica do método de excistamento/fenol-clorofórmio em amostras purificadas</i>	34
3.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA	34
3.4.1 Método 1: Excistamento + fenol-clorofórmio	35
3.4.1.1 <i>Excistamento</i>	35
3.4.1.2 <i>Fenol-clorofórmio</i>	35
3.4.2 Método 2: Excistamento + tiocianato de guanidina-sílica	36
3.4.2.1 <i>Excistamento</i>	36
3.4.2.2 <i>Tiocianato de guanidina-sílica (GuSCN-sílica)</i>	37
3.4.3 Método 3: Excistamento + kit QIAmp DNA Stool Mini	37
3.4.3.1 <i>Excistamento</i>	37
3.4.3.2 <i>kit QIAmp DNA Stool Mini</i>	38
3.4.4 Método 4: Choque térmico + fenol-clorofórmio	39
3.4.4.1 <i>Choque térmico</i>	39
3.4.4.2 <i>Fenol-clorofórmio</i>	39
3.4.5 Método 5: Choque térmico + tiocianato de guanidina-sílica	39
3.4.5.1 <i>Choque térmico</i>	40
3.4.5.2 <i>Tiocianato de guanidina-sílica</i>	40
3.4.6 Método 6: Choque térmico + kit QIAmp DNA Stool Mini	40
3.4.6.1 <i>Choque térmico</i>	40
3.4.6.2 <i>kit QIAmp DNA Stool Mini</i>	40
3.5 CONTROLES NEGATIVOS	41
3.6 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA	41
4 RESULTADOS	42

4.1	OBTENÇÃO DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium parvum</i>	42
4.2	TESTE DE SENSIBILIDADE ANALÍTICA	43
4.3	TESTE DE SENSIBILIDADE DIAGNÓSTICA.....	47
4.3.1	<i>Sensibilidade diagnóstica dos métodos de extração de DNA em amostras fecais</i>	47
4.3.2	<i>Sensibilidade diagnóstica do método EF em amostras purificadas</i>	50
5	DISCUSSÃO	51
5.1	OBTENÇÃO DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium parvum</i>	51
5.2	AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA.....	52
5.2.1	<i>Teste de sensibilidade analítica</i>	54
5.2.2	<i>Teste de sensibilidade diagnóstica</i>	59
5.2.2.1	<i>Sensibilidade diagnóstica dos métodos de extração de DNA em amostras fecais</i>	59
5.2.2.2	<i>Sensibilidade diagnóstica do método EF em amostras purificadas</i>	62
6	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

A primeira espécie do gênero *Cryptosporidium* a ser relatada foi *C. muris* em 1907, pelo pesquisador americano Ernest Edward Tyzzer, ao descrever um protozoário freqüentemente encontrado nas glândulas gástricas de seus camundongos de laboratório. Em 1912, o mesmo pesquisador apresentou uma segunda espécie, *Cryptosporidium parvum*, também encontrada em um camundongo, mas com desenvolvimento no intestino delgado e com oocistos menores que *C. muris* (XIAO et al., 2004).

A descrição de uma nova espécie, *C. meleagridis*, em perus no ano de 1955 e a identificação de criptosporidiose em bovinos, no ano de 1971, forneceram os primeiros relatos de mortalidade e morbidade associados a infecções por *Cryptosporidium* spp. A patogenicidade do parasita em humanos foi demonstrada com a descrição de dois casos de criptosporidiose em 1976 e pela ocorrência na década de 80, de infecções oportunistas em indivíduos imunocomprometidos, devido principalmente a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (FAYER, 2004).

A criptosporidiose conquistou maior importância na saúde pública após o surto de veiculação hídrica que acometeu milhares de pessoas na cidade de Milwaukee (EUA) em 1993 (MACKENZIE et al., 1994). Atualmente é reconhecida como uma das mais graves patologias transmitidas pela água, tendo como agravantes as dificuldades do controle da contaminação ambiental, bem como do tratamento da enfermidade, devido à ausência de terapias eficazes (DILLINGHAM et al., 2002).

O parasita apresenta distribuição mundial, com relatos de criptosporidiose humana em mais de 90 países (FAYER et al., 2000). Além de ser reconhecido como parasita de uma infinidade de animais, incluindo mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes (TZIPORI; WARD, 2002).

Atualmente, o gênero *Cryptosporidium* pertencente ao filo Apicomplexa, Classe Esporozoasida, Subclasse Coccidiasida, Ordem Eucoccidia, Subordem Eimeriina, Família Cryptosporiidae. No entanto, análises filogenéticas de seqüências do gene SSU rRNA sugerem a maior proximidade de *Cryptosporidium* à subclasse Gregarina (CARRENO et al., 1999). Essa proposição é sustentada pela existência de estágios extracelulares no ciclo de vida de *Cryptosporidium andersoni* e capacidade multiplicativa em meio de cultura isento de células (HIJAWI et al., 2002, 2004).

Pelo menos 22 espécies do gênero *Cryptosporidium* foram identificadas por diferenças na ocorrência e preferência ao hospedeiro, morfologia e sítio de infecção. Entretanto, somente 15 espécies são consideradas válidas, com base em dados adicionais de caracterização genética resultantes principalmente do emprego de técnicas de PCR-RFLP e sequenciamento (XIAO et al., 2004; CACCIO et al., 2005; SUNNOTEL et al., 2006). Além das espécies reconhecidas, mais de 50 genótipos de *Cryptosporidium* foram descritos em animais, sendo que novos genótipos são continuamente descobertos (XIAO et al., 2004; FENG et al., 2007). Na tabela 1, são descritas apenas as espécies amplamente reconhecidas.

Tabela 1 – Espécies de *Cryptosporidium* descritas com base em estudos de diferenciação fenotípica e genotípica dos isolados

Espécie	Hospedeiro	Tamanho oocisto (µm)	Localização
<i>C. andersoni</i>	Bovinos	5,5 x 7,4	Abomasso
<i>C. baileyi</i>	Aves	4,6 x 6,2	Bursa de Fabricius, cloaca, trato respiratório
<i>C. canis</i>	Cães, humanos	5,0 x 4,7	Intestino delgado
<i>C. felis</i>	Gatos, humanos	4,5 x 5,0	Intestino delgado
<i>C. galli</i>	Aves	8,0-8,5 x 6,2-6,4	Proventrículo
<i>C. hominis</i>	Humanos	4,5 x 5,5	Intestino delgado
<i>C. meleagridis</i>	Aves, humanos	4,5-5,0 x 4,6-5,2	Intestino
<i>C. molnari</i>	Peixes	4,7 x 4,5	Estômago
<i>C. muris</i>	Roedores, humanos	5,6 x 7,4	Estômago
<i>C. parvum</i>	Ruminantes, humanos	4,5 x 5,5	Intestino
<i>C. saurophilum</i>	Lagartos, cobras	4,2-5,2 x 4,4-5,6	Intestino e mucosa cloacal
<i>C. serpentis</i>	Cobras, lagartos	4,8-5,6 x 5,6-6,6	Estômago
<i>C. suis</i>	Suínos, humanos	5,1 x 4,4	Intestino delgado
<i>C. wrairi</i>	Porquinho da Índia	4,0-5,0 x 4,8-5,6	Intestino delgado
<i>C. bovis</i>	Ruminantes	4,2-4,8 x 4,8-5,4	Intestino delgado

(Adaptado de SUNNOTEL et al., 2006)

Em 2008, quatro novas espécies de *Cryptosporidium* foram descritas, com base em características biológicas, morfológicas e moleculares. *C. fayeri* foi isolada de fezes de cangurus vermelhos (*Macropus rufus*), apresentando oocistos com dimensões de 4,5-5,1 por 3,8-5,0 µm e similaridade de 90,64% a 97,88% ao *C. parvum* pela análise multi-locus (RYAN et al., 2008). *C. macropodum* foi descrita após a identificação em fezes de cangurus cinza (*Macropus giganteus*). Os oocistos medem 4,5-6,0 µm de altura por 5,0-6,0 µm de comprimento. Análises filogenéticas dos loci SSU rRNA, actina e *hsp-70* demonstraram a

diferenciação genética de *C. macropodum* das demais espécies de *Cryptosporidium* (POWER; RYAN, 2008). *C. fragile* foi descrita como parasita estomacal de sapos *black-spined* (*Duttaphrynus melanostictus*). Os oocistos apresentavam dimensões de 5,5-7,0 por 5,0-6,5 μm . A análise filogenética do gene SSU rRNA demonstrou distinção de *C. fragile* das demais espécies gátricas, incluindo *C. muris*, *C. serpentis* e *C. andersoni* (JIRKU et al., 2008). A espécie mais recentemente descrita foi *C. ryanae* em bovinos (*Bos taurus*). Oocistos dessa espécie foram previamente classificados como pertencentes ao genótipo veado e são similares aos oocistos de *C. parvum* e *C. bovis*, mas com dimensões menores (2,94-4,41 x 2,94-3,68 μm). A espécie se mostrou distinta das outras espécies pela caracterização dos genes SSU-rRNA, actina e *hsp-70* (FAYER et al., 2008).

Cada espécie/genótipo de *Cryptosporidium*, com raras exceções, é adaptado a um grupo restrito de hospedeiros relacionados filogeneticamente, indicando que a transmissão cruzada entre diferentes grupos de animais é limitada. No entanto, as espécies e genótipos, apesar da adaptação, não são necessariamente específicos a um grupo de hospedeiros, já que a transmissão pode ocorrer entre espécies de animais que compartilham um mesmo habitat (FENG et al., 2007).

A espécie *C. parvum* afeta uma grande variedade de mamíferos, sendo mais comumente encontrada em humanos e ruminantes e, portanto recebe maior atenção na transmissão zoonótica da criptosporidiose (XIAO et al., 2004). Embora os bovinos sejam considerados o maior reservatório de *C. parvum*, apenas bezerros em período lactente são frequentemente infectados por essa espécie. Bovinos jovens e adultos são mais comumente infectados por *C. andersoni*, *C. bovis* e genótipo veado (*C. ryanae*) (XIAO; FENG, 2008).

O contato com bovinos infectados tem sido relatado como causa de pequenos surtos envolvendo estudantes de veterinária, técnicos de pesquisa e crianças que freqüentaram eventos e feiras agropecuárias (XIAO; FENG, 2008).

C. parvum e *C. hominis* são as espécies mais prevalentes em humanos e responsáveis por todos os surtos em que foi possível a identificação dos isolados (SMITH et al., 2006). A maioria dos surtos de veiculação hídrica em humanos está associada a *C. hominis* e poucos envolveram a espécie *C. parvum*, tendo como possíveis fontes de contaminação os bovinos (FAYER et al., 2000; GOH et al., 2004).

Pode-se considerar que existam dois ciclos de transmissão, um antroponótico envolvendo a espécie *C. hominis*, mais freqüente em áreas urbanas; e outro zoonótico com transmissão de *C. parvum* associado principalmente a ruminantes, com maior ocorrência em áreas rurais (MORGAN et al., 1999). A maior parte dos casos de criptosporidiose em uma

cidade urbana nos EUA foi devido à espécie *C. hominis* (>75%) (SULAIMAN et al., 1998), enquanto que *C. parvum* foi responsável por 61,5% dos casos em uma cidade rural do Reino Unido (MCLAUCHLIN et al., 2000). No Brasil, também foram relatadas as ocorrências relacionadas a *C. parvum* em pacientes residentes em áreas peri-urbanas e *C. hominis*, em pacientes de áreas estritamente urbanas (BRANTLEY, 2003; ARAÚJO, 2004).

Outras espécies, incluindo *C. felis*, *C. canis* e *C. muris* foram identificadas, embora com baixa ocorrência, em amostras clínicas de pacientes imunocomprometidos e em menor frequência em indivíduos imunocompetentes (XIAO et al., 2001). Entretanto, a espécie *C. meleagridis* foi identificada por diversas vezes em humanos imunocompetentes (MACLAUCHLIN et al., 2000; PEDRAZA-DIAZ et al., 2001), sendo reconhecida como um importante parasita humano (XIAO; FENG, 2008). *C. suis* foi isolado em um paciente HIV positivo no Peru e em dois pacientes na Inglaterra (XIAO et al., 2002; LEONI et al., 2006).

O papel dos animais de estimação e selvagens na transmissão zoonótica de *Cryptosporidium* spp. aparentemente é inexpressivo (MONIS; THOMPSON, 2003; APEELBEE et al., 2005). Cães e gatos são mais comumente infectados com espécies que apresentam maior especificidade ao hospedeiro, ou seja, *C. canis* e *C. felis*, respectivamente (ABE et al., 2002; FAYER et al., 2006; SATOH et al., 2006). Da mesma forma, a maioria das espécies de *Cryptosporidium* encontrada em animais selvagens naturalmente infectados é diferente daqueles que afetam os humanos (APEELBEE et al., 2005). Ainda que outras espécies e genótipos de *Cryptosporidium* encontrados em animais possam infectar humanos, a via de transmissão ainda não foi identificada, havendo a necessidade de estudos complementares para avaliar a importância da transmissão zoonótica desses animais (RAMIREZ et al., 2004).

A ingestão de água contaminada é a principal via de infecção por *Cryptosporidium* spp. em humanos, podendo ocorrer também por meio de alimentos contaminados. Nos países desenvolvidos foram relatados diversos surtos envolvendo contaminação de água de beber e destinada ao lazer (KRAMER et al., 1998). Outra via comum de transmissão é a fecal-oral, com risco maior a indivíduos que tenham contato com crianças, tratadores de animais e profissionais da saúde. Embora bastante raros, já houve relatos de transmissão aerógena de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (HOJLYNG et al., 1987).

Em indivíduos imunocompetentes, a infecção é auto-limitada, com duração de uma a duas semanas. Os principais sintomas são diarreia aquosa, associada a dores abdominais, anorexia, perda de peso, náuseas, vômitos, fadiga e febre baixa (RAMIREZ et al., 2004). Indivíduos imunocomprometidos são frequentemente acometidos por sintomas mais graves,

caracterizados por diarreia crônica, com duração de vários meses, resultando em severa desidratação e perda de peso, podendo levar a morte (PETERSEN, 1992). Crianças, sobretudo com idade inferior a cinco anos, parecem ser mais suscetíveis à infecção por *Cryptosporidium* spp., possivelmente devido à imaturidade imunológica e ao maior risco de contrair a doença em decorrência ao menor cuidado com a higiene (GUERRANT, 1997).

Embora a prevalência de criptosporidiose em pacientes com AIDS tenha diminuído substancialmente com a introdução de terapias antiretrovirais (LÊ MOING et al., 1998), o parasita ainda representa um grande problema de saúde pública, pelo seu alto potencial oportunista e freqüente envolvimento em surtos de diarreia em indivíduos imunocompetentes, tendo a água como principal via de transmissão (SMITH; ROSE, 1998).

A criptosporidiose em animais, além de sua importância clínica e possível transmissão zoonótica, é responsável por perdas econômicas em animais de produção, favorecidas pela dificuldade de controle do parasito (RAMIREZ et al., 2004).

Infecções por *Cryptosporidium* spp. têm sido associadas a diferentes sintomas clínicos (agudos e crônicos) em uma grande variedade de animais domésticos e selvagens. Animais jovens parecem ser mais suscetíveis à infecção clínica, com ocorrência de mortalidade significativa em neonatos de muitas espécies (O'DONOGHUE, 1995). Grande parte das infecções diagnosticadas em adultos foram assintomáticas ou associadas a sintomas clínicos de pouca gravidade. No entanto, infecções severas foram verificadas em diversos hospedeiros imunossuprimidos ou imunodeficientes, principalmente cães, gatos, cavalos e macacos (O'DONOGHUE, 1995). A maioria dos casos clínicos em mamíferos se caracteriza por diarreia aquosa, desidratação, perda de peso, febre e inapetência, ocorrendo recuperação espontânea dentro de uma a duas semanas. Em aves, a enfermidade se manifesta por distúrbios respiratórios ou entéricos, associados principalmente a infecções por *C. baileyi* ou *C. meleagridis*, respectivamente (RAMIREZ et al., 2004).

A infecção pelo *Cryptosporidium* spp. inicia-se com a ingestão ou inalação de oocistos esporulados pelo hospedeiro. O excistamento é facilitado sob determinadas condições de temperatura, pH, ação de enzimas proteolíticas e sais biliares, liberando quatro esporozoítos. Os esporozoítos penetram preferencialmente nos enterócitos do jejuno terminal ou íleo (ou ocasionalmente nos epitélios biliar, respiratório ou conjuntivo), envolvendo-se em um compartimento extracitoplasmático responsável pela nutrição e fixação do parasita. Os esporozoítos maduros se diferenciam em trofozoítos iniciando a multiplicação assexual ou merogonia resultante da divisão nuclear. Dois tipos de merontes são formados: o tipo I com seis a oito merozoítos, e o tipo II, com quatro merozoítos. Os merozoítos tipo I podem dar

origem a novos merozoítos do tipo I ou do tipo II; já os merozoítos tipo II dão origem à fase sexual do ciclo ou gametogonia com a diferenciação em estágios masculinos (microgametas) e femininos (macrogametas). Após a fertilização, o macrogameta desenvolve-se em oocisto. A esporulação ocorre *in situ* com o desenvolvimento de quatro esporozoítos. Dois tipos de oocistos podem ser produzidos: um tipo autoinfectante de parede delgada capaz de iniciar um novo ciclo dentro do mesmo hospedeiro e um de parede espessa altamente resistente às condições ambientais, que é eliminado nas principalmente nas fezes (DUBEY et al., 1990).

Uma grande variedade de métodos foi desenvolvida para o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. em amostras clínicas. A maioria deles envolve a detecção direta por observação microscópica de tecidos, fezes, aspirado duodenal, bile ou secreções respiratórias, com o auxílio de técnicas de coloração. As mais conhecidas são coloração por Kinyoun (MA; SOAVE et al., 1983), álcool-ácido (Ziehl-Neelsen modificado) (HENRIKSEN; POHLENZ et al., 1981), fucsina carbólica – dimetilsulfóxido (DMSO) (POHJOLA et al., 1984) e safranina azul de metileno (BARBY et al., 1984). Ainda há métodos de coloração negativos tais como *light green merbromide* (CHICHINO et al., 1991) ou verde malaquita (ELLIOT et al., 1999) que coram o material da lâmina, exceto pelos oocistos de *Cryptosporidium* spp. As técnicas de centrífugo-flutuação em solução de Sheather (LEVINE, 1978) e suas modificações, também são freqüentemente empregadas no diagnóstico em fezes, sendo os oocistos visualizados em tonalidade rosada. Tais técnicas microscópicas apresentam algumas limitações decorrentes da reduzida quantidade de oocistos nas amostras e do pequeno tamanho dos oocistos, o que requer tempo e experiência dos microscopistas.

Técnicas imunológicas como imunofluorescência direta com o emprego de conjugado anti-anticorpos monoclonais de *Cryptosporidium* que reconhecem epítomos de superfície nos oocistos, são rotineiramente utilizadas na detecção e enumeração de oocistos em amostras ambientais (SMITH; ROSE, 1998) ou fecais (SMITH, 2007). Essas técnicas podem apresentar variação considerável na sensibilidade e na especificidade diagnósticas, pela dependência de vários fatores incluindo a pureza do antígeno de *Cryptosporidium*, características do anticorpo, enzima ou fluorocromo utilizados (GARCIA; SHIMIZU et al., 1997). Essas variações podem afetar a intensidade da fluorescência, aumentando a subjetividade e a necessidade de uma avaliação bastante crítica do diagnóstico (JEX et al., 2008). A detecção de antígenos de *Cryptosporidium* em amostras fecais (coproantígenos) pelas técnicas de ELISA (ensaio imunoabsorvente ligado à enzima) e imunocromatografia apresenta alta especificidade, mas sensibilidade menor quando comparada às demais técnicas microscópicas (JOHNSTON et al., 2003).

As técnicas imunológicas apresentam maior custo em relação às técnicas de microscopia óptica e coloração, e não conferem vantagens na sensibilidade e especificidade que compensem custos adicionais (BIALEK et al., 2002; GARCIA; SHIMIZU, 1997). O método de microscopia ainda é, portanto, o mais indicado na detecção de *Cryptosporidium* spp. em rotinas laboratoriais, podendo ser associado a outros métodos, mas nunca substituído (MAGI et al., 2006; WEISEL et al., 2006).

O emprego de técnicas de biologia molecular, em particular de métodos baseados na reação em cadeia pela polimerase (ex. RFLP, AFLP *Fingerprinting*, Real-time PCR, sequenciamento), oferece muitas vantagens em relação às demais técnicas por apresentar maior sensibilidade e especificidade, além de permitir a diferenciação entre genótipos. Os métodos de PCR, não apenas podem ser aplicados na detecção de um pequeno número de oocistos, mas também na amplificação de DNA extraído diretamente das fezes ou amostras ambientais sem a necessidade de se isolar oocistos intactos (WIDMER et al., 2002).

Dessa forma, uma grande variedade de marcadores genéticos tem sido empregada em estudos de investigação epidemiológica, por meio da caracterização de isolados provenientes de diversos hospedeiros e regiões geográficas, bem como na investigação de surtos de criptosporidiose veiculados pela água ou alimento (WIDMER et al., 2002). No entanto, a presença de inibidores nas amostras e a dificuldade na liberação (lise), extração e purificação do DNA dos oocistos diminuem drasticamente a eficiência das técnicas de PCR, especialmente em amostras pobres em oocistos, incorrendo em resultados falso-negativos (JOHNSON et al., 1995, GOBET et al., 1997).

A presença de inibidores em amostras fecais e ambientais interfere principalmente na interação entre o DNA e a DNA polimerase, podendo reduzir a sensibilidade da PCR em até 1000 vezes (JOHNSON et al., 1995). Duas abordagens básicas têm sido utilizadas para eliminar o efeito negativo dos inibidores. Uma delas é empregada antes da extração de DNA com a purificação dos oocistos por meio de gradientes de densidade em soluções de sacarose, percoll ou NaCl, *cell sorting* ou separação imunomagnética, dentre outros métodos. A outra se procede durante a extração, com a purificação de DNA com o uso basicamente de fenol-clorofórmio (BALATBAT et al., 1996), *spin column* (LENG et al., 1996), suspensão de sílica e tiocianato de guanidina (BOOM et al., 1990), dentre outros. Atualmente, os *kits* comerciais (QIAamp DNA Stool Mini kit, DNeasy Tissue kit, FastDNA SPIN Kit for Soil) são um dos métodos mais comumente empregados, por serem rápidos e de fácil execução.

A dificuldade de ruptura da parede dos oocistos para liberação do material genético representa uma das maiores limitações no uso das técnicas de PCR. A maioria dos protocolos

de extração de DNA utiliza para ruptura da parede do oocisto, ciclos de congelamento e descongelamento ou pérolas de vidro, em conjunto ou não com proteinase K (CAREY et al., 2004).

Ward e Wang (2000) comparam pela PCR, dois tratamentos para liberação de DNA em oocistos *Cryptosporidium parvum* em fezes congeladas. O primeiro deles consistiu no uso de ácido taurocólico para indução de excistamento, o segundo envolveu a técnica tradicional de congelamento e descongelamento, ambas com tratamento adicional de proteinase K. As duas técnicas resultaram em quantidades semelhantes de DNA extraído, mostrando que a indução de excistamento pode ser viável na obtenção de DNA para uso nos estudos taxonômicos e epidemiológicos que envolvem PCR. O excistamento *in vitro* é largamente empregado nos estudos de infecção por *Cryptosporidium* spp. em culturas de células (UPTON et al., 1994; GOLD et al., 2001; FENG et al., 2006) ou com o objetivo de se verificar a viabilidade de oocistos a potenciais infecções (CAMPBELL et al., 1992; BLACK et al., 1996; PEZZANI et al., 1998; WAGNER-WIENING; KIMMING, 1995). Para indução do excistamento, os oocistos são submetidos a simulações das condições internas do intestino, como temperatura (37°C), flutuações de pH, concentrações ideais de sais biliares e enzimas pancreáticas (ROBERTSON et al., 1993).

A caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. pela análise de oocistos de origem fecal, tem contribuído de forma expressiva, não somente nos estudos taxonômicos, mas também na definição dos agrupamentos de hospedeiros de cada espécie/genótipo para elucidação da dinâmica de transmissão do parasita, na determinação de fatores de risco e no rastreamento da fonte de infecção em casos de surtos (THOMPSON et al., 2008). Os principais métodos de caracterização molecular de oocistos são baseados na técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR), cuja eficácia é dependente da qualidade da amostra de DNA a ser amplificada. O emprego de métodos de extração de DNA capazes de retirar substâncias inibitórias de origem fecal, mantendo boa recuperação e integridade do material genético, é um fator determinante na eficiência de detecção da PCR. Dada a relevância da escolha do método de extração de DNA, poucos são os estudos comparativos e de avaliação das técnicas atualmente utilizadas, podendo gerar interpretações e conclusões equivocadas em estudos com base no diagnóstico molecular de *Cryptosporidium* spp.

2 OBJETIVOS

O estudo teve como objetivos:

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar o desempenho de métodos para extração de DNA de oocistos de *Cryptosporidium* spp. pela *nested* PCR do gene SSU rRNA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o desempenho de quatro métodos para extração de DNA de *Cryptosporidium parvum* em oocistos purificados.
- Avaliar o desempenho de seis métodos para extração de DNA em fezes de origem bovina experimentalmente contaminada com oocistos de *Cryptosporidium parvum*.
- Verificar a sensibilidade diagnóstica das *nested* PCRs realizadas com seis métodos de extração de DNA, tomando como padrão-ouro o teste de centrífugo-flutuação em solução de sacarose em fezes de diversos hospedeiros naturalmente infectados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Com o objetivo de se obter um grande número de oocistos de *Cryptosporidium parvum*, foi realizada uma triagem com técnicas de microscopia óptica em amostras fecais de humanos e bovinos naturalmente infectados. As amostras ricas em oocistos foram caracterizadas genotipicamente e aquela cujo isolado foi identificado como pertencente à espécie *C. parvum* foi submetida à purificação de oocistos. Posteriormente, os oocistos purificados foram empregados nos testes de sensibilidade analítica dos diferentes métodos de extração de DNA, assim como foram utilizados na contaminação experimental de amostras fecais de bovinos livres de *Cryptosporidium* spp. Da mesma forma, essas amostras fecais contaminadas com concentrações conhecidas de oocistos foram empregadas na avaliação do desempenho dos diferentes métodos de extração de DNA. Os testes de sensibilidade diagnóstica foram realizados a partir de amostras fecais de diferentes hospedeiros naturalmente infectados por *Cryptosporidium* spp., previamente diagnosticadas pelo método de centrífugo-flutuação em sacarose (padrão-ouro).

3.1 OBTENÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium parvum*

Os itens que seguem referem-se aos procedimentos laboratoriais envolvidos na obtenção de amostras de oocistos de *Cryptosporidium parvum* para realização das contaminações experimentais.

3.1.1 Amostras fecais

Oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram obtidos a partir de amostras fecais de humanos e de bovinos. Dezenove amostras de oocistos de fezes de humanos foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Parasitologia do Instituto de Infectologia Emílio Ribas (São Paulo, SP), previamente diagnosticadas como positivas para *Cryptosporidium*

spp. Na pesquisa em bovinos, foram analisadas 25 amostras de bezerros com 10 dias a 6 meses de idade, provenientes das cidades de Coronel Macedo e Pirassununga (SP).

3.1.2 *Pesquisa de oocistos de Cryptosporidium spp. pelo método de centrífugo-flutuação em sacarose (Sheather modificado)*

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

As amostras fecais nas quais foi detectado menos de um oocisto por campo de observação em microscópio (aumento de 400 x) foram classificadas como (+). Aquelas com detecção de 1 a 5 oocistos por campo foram classificadas como (+ +), de 6 a 10 oocistos como (+ + +) e mais de 10 oocistos como (+ + + +).

As amostras que foram classificadas como (+ + +) ou (+ + + +) e apresentavam oocistos com características morfológicas semelhantes ao *Cryptosporidium parvum* foram purificadas e caracterizadas genotipicamente.

3.1.3 *Recuperação de oocistos de Cryptosporidium tipo parvum*

A recuperação dos oocistos foi realizada sobre uma placa de Petri, mediante lavagem da lâmina e lamínula com 1,5 ml de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0). O lavado foi transferido para um microtubo de 1,5 ml e centrifugado a 12.000 g durante 10 min. Desprezado o sobrenadante, seguiu-se um novo processo de lavagem e centrifugação nas mesmas condições anteriores. Desprezou-se o sobrenadante e o sedimento contendo oocistos de *Cryptosporidium* tipo *parvum* foi imediatamente submetido à extração do DNA ou armazenado a -20°C para posterior processamento.

3.1.4 Caracterização genotípica

Após a obtenção dos oocistos de *Cryptosporidium*, foi realizada a caracterização genotípica pelo sequenciamento do gene SSU rRNA.

3.1.4.1 Extração de DNA

Os oocistos purificados foram submetidos à extração de DNA com o emprego de choque térmico, proteinase K e fenol-clorofórmio. O procedimento está descrito detalhadamente no item 3.4.4. As amostras de DNA extraído foram processadas imediatamente ou armazenadas a -20°C para posterior amplificação pela PCR.

3.1.4.2 PCR e *nested* PCR

As amostras de DNA extraído foram amplificadas pela PCR e *nested* PCR do gene codificador da subunidade menor do rRNA (SSU rRNA). Os *primers* utilizados na PCR e *nested* PCR estão expostos na tabela 2.

Tabela 2 – Sequências dos *primers* utilizados nas reações de PCR / *nested* PCR e seus respectivos tamanhos de fragmentos amplificados

	<i>Primers</i>	Sequências	Tamanhos dos fragmentos (bp)	Referências
PCR	SSU-F2	5'-TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG-3'	~1300	Xiao et al. (1999)
	SSU-R2	5'-CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA-3'		Xiao et al. (2000)
<i>nested</i> PCR	SSU-F3	5'-GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG -3'	~800	Xiao et al. (1999)
	SSU-R3	5'-AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A-3'		Xiao et al. (1999)

As ampliações pela PCR e *nested* PCR foram realizadas em um volume final de 25 µl. A cada reação de amplificação foram incluídos um controle positivo, previamente testado, e um controle negativo (água ultrapura autoclavada), tanto para a PCR quanto para *nested* PCR.

As reações de amplificação consistiam de 0,3 µM para cada *primer*, 200 µM de dNTPs, 2,0 mM de MgCl₂, 1x PCR *Buffer*, 1,25 u de DNA polimerase Platinum *Taq* (Invitrogen, Carlsbad, CA) e 2,5 µl de DNA extraído.

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

A *nested* PCR foi realizada nas mesmas condições da PCR, mas com o emprego do par de *primers* SSU-F3 / SSU-R3 e 2,5 µl do produto da primeira reação.

3.1.4.3 Detecção do produto amplificado

Os fragmentos amplificados pela *nested* PCR foram analisados em eletroforese de cuba horizontal. Uma alíquota de 10 µl de cada amostra foi disposta em gel de agarose a 1,5%, previamente imerso em tampão TBE (0,045M Tris-Borato; 1mM EDTA).

Após a corrida eletroforética, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml) por 20 min. A visualização das bandas foi feita sob transiluminação com luz ultravioleta.

As dimensões dos fragmentos amplificados foram comparadas a um padrão de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de base disposto no gel juntamente com as amostras analisadas.

3.1.4.4 Purificação do produto amplificado

Após a separação dos produtos amplificados pela eletroforese, as bandas de interesse foram recortadas e purificadas com o *kit* GFXTM (Amersham Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante.

3.1.4.5 Quantificação do DNA purificado

Uma nova eletroforese foi realizada para estimar a concentração de DNA presente nas amostras purificadas. Para isso, comparou-se uma alíquota de 5 μl do produto purificado com o padrão *Low Mass DNA Ladder* (Gibco BRL-Gaytherburg/USA), utilizando a tabela fornecida pelo fabricante, obtendo-se a concentração em $\text{ng}/\mu\text{l}$.

3.1.4.6 Reação de sequenciamento

Para a reação de sequenciamento empregou-se o *kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Perkin Elmer). As quantidades de reagentes foram determinadas a partir da concentração de DNA purificado. Para uma reação com 10 μl de volume final, foram utilizados 1 μl de *BigDye*TM v.3.1 (Applied Biosystems), 2 μl de tampão *Save Money* 5x (200mM Tris-HCl; 5 mM MgCl_2 ; pH 9,0), 10 pmoles de *primer* (senso ou anti-senso) e 24 ng de DNA purificado. Em amostras com concentração de DNA abaixo de 4 $\text{ng}/\mu\text{l}$, o volume final da reação foi dobrado, assim como as concentrações dos reagentes, exceto a do *primer* utilizado.

As condições das reações de sequenciamento consistiram de desnaturação inicial a 96°C por 1 min e 40 ciclos de 96 °C por 15 s, 50°C por 15 s e 60°C por 4 min.

3.1.4.7 Precipitação do produto amplificado

Após a reação de sequenciamento, os produtos foram purificados por precipitação em álcool. A cada amostra, adicionaram-se 40 μl ou 80 μl de isopropanol a 65% para reações com volumes finais de 10 μl e 20 μl , respectivamente. Após a homogeneização, as amostras foram mantidas em local protegido da luz por 15 min, em temperatura ambiente, e em seguida, centrifugadas a 14.000 g por 25 min. Descartou-se o isopropanol por inversão de tubos e o sedimento foi homogeneizado com 300 μl de etanol a 70%. Procedeu-se nova centrifugação a 14.000 g por 10 min. O excesso de etanol foi cuidadosamente aspirado com o

auxílio de pipeta, sendo sua total remoção conduzida em banho-seco a 80°C por 2 min. As amostras foram mantidas a -20°C até o momento do sequenciamento.

3.1.4.8 Sequenciamento

Antes de serem submetidas à eletroforese em seqüenciador automático modelo ABI Prism™ 377 DNA Sequencers (Applied Biosystems, USA), as amostras foram homogeneizadas com 3,4 µl de formamida e Blue Dextran-EDTA (Applied Biosystems, USA) na proporção de 5:1, desnaturadas a 95° por 3 min e colocadas no gelo por 2 min.

3.1.4.9 Alinhamento, tradução das seqüências de nucleotídeos e edição final

As seqüências de nucleotídeos foram analisadas e modificadas com o auxílio do programa Phred *online* (<http://asparigin.cenargen.embrapa.br/phph/>) e BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999). As seqüências resultantes foram comparadas com seqüências homólogas disponíveis no GenBank. Os genótipos dos isolados foram determinados com base nessa comparação.

3.1.5 Purificação de oocistos de *Cryptosporidium parvum*

A amostra fecal com oocistos pertencentes à espécie *Cryptosporidium parvum* e que apresentou previamente a maior quantidade de oocistos pelo exame microscópico (item 3.1.2) foi submetida a purificação e concentração de oocistos de acordo com o método descrito por Brien e Jenkins (2007) com algumas modificações.

Inicialmente as fezes (aproximadamente 50 g) foram peneiradas em tamises de 0,5 mm, 150 µm e 45 µm, sendo diluídas aos poucos com 350 ml de água destilada. A suspensão fecal foi fracionada em 8 tubos cônicos de 50 ml e centrifugada a 1.500 g por 15 min a 4°C. Em todo o procedimento empregou-se uma centrífuga com rotor basculante programada para

trabalhar em lenta desaceleração. Após a centrifugação, aproximadamente 45 ml do sobrenadante foram descartados com uma pipeta de 25 ml, e o restante do sobrenadante foi homogeneizado ao sedimento. As amostras foram reunidas aos pares para que restassem apenas quatro tubos. A suspensão resultante foi diluída (1:4) em NaCl (360g/L, $d=1,21 \text{ g/cm}^3$) e centrifugada a 720 g por 20 min. Após as amostras serem deixadas em repouso por 10 min, aproximadamente 20 ml do sobrenadante foram transferidos para outro tubo de 50 ml. A suspensão foi diluída em 1:4 com água destilada e centrifugada a 1.500 g por 20 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com água destilada e centrifugado a 1.500 g por 20 min. O sedimento foi diluído em água destilada até o volume final de 40 ml, homogeneizados fortemente com 8 ml de éter e centrifugado a 1.200 g por 10 minutos. Observa-se a formação de três camadas: a superior composta pelo solvente, a intermediária com debris fecais e a camada aquosa inferior. As três camadas foram descartadas com uma pipeta de 25 ml e o sedimento contendo oocistos foi lavado três vezes em 50 ml de água deionizada com centrifugações a 1.200 g por 10 min. Após o descarte de aproximadamente 45 ml do sobrenadante de cada amostra, as suspensões restantes contendo oocistos foram transferidas para um único tubo de 15 ml.

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

3.2 TESTE DE SENSIBILIDADE ANALÍTICA

Para a determinação da sensibilidade analítica dos métodos de extração de DNA, foram realizadas diluições seriadas dos oocistos purificados. As amostras de oocistos em concentrações conhecidas foram testadas na forma purificada e contaminadas em fezes. Cada método foi avaliado por três vezes, com exceção daqueles que empregavam o *kit* comercial QIAmp DNA Stool Mini. As repetições foram realizadas em dias distintos, buscando seguir os procedimentos padrões previamente estabelecidos.

A partir de uma alíquota da suspensão de oocistos purificados, foram realizadas diluições seriadas na base 10 (10^6 a 1 oocistos/ml) em tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0).

Para os testes de sensibilidade analítica em oocistos purificados, alíquotas de 100 µl de cada suspensão nas sete diferentes concentrações (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 e 1 oocistos/ml) e um controle negativo (tampão TE) foram distribuídos em microtubos de 1,5 ml. Portanto, no volume de 100 µl estima-se que continha(m) 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10, 1 e 10^{-1} oocisto(s) referente(s) a cada concentração das diluições.

Para avaliar a sensibilidade analítica dos métodos na presença de material fecal, uma amostra de fezes bovina, comprovadamente livre de *Cryptosporidium* spp., tanto pelo método de microscopia (item 3.1.2) quanto pela *nested* PCR (itens 3.1.4.1 a 3.1.4.3), foi contaminada com oocistos purificados de *Cryptosporidium parvum*. A amostra fecal foi alíquotada em volumes de 100 µl, que foram então contaminados com 100 µl da suspensão de oocistos nas diferentes concentrações.

As amostras foram mantidas a -20°C para posteriormente serem processadas. Portanto, os métodos foram avaliados quanto à eficiência de extrair DNA de oocistos de *Cryptosporidium* em fezes congeladas.

3.3 TESTE DE SENSIBILIDADE DIAGNÓSTICA

As amostras fecais de humanos foram cedidas pelo Laboratório de Parasitologia do Instituto de Infectologia Emílio Ribas (São Paulo, SP). As fezes bovinas foram provenientes de animais da cidade de Coronel Macedo e Pirassununga (SP). As amostras de cão e gatos foram obtidas no Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (USP).

As sensibilidades diagnósticas dos métodos de extração de DNA/*nested* PCR na detecção de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais foram determinadas pela comparação com o método de centrífugo-flutuação em sacarose, considerado o padrão-ouro.

Foram selecionadas 5 amostras fecais de humanos, 6 de bovinos, 3 de felinos e 1 de canino. As 15 amostras eram positivas na pesquisa de oocistos *Cryptosporidium* spp. pelo método de centrífugo-flutuação em sacarose, como descrito no item 3.1.2. A quantidade de oocistos presente nas amostras foi estimada pela média de oocistos presentes por campo de observação em microscópio (aumento de 400x).

3.3.1 *Sensibilidade diagnóstica dos métodos de extração de DNA em amostras fecais*

Para o teste de sensibilidade diagnóstica dos métodos de extração de DNA, foram separadas alíquotas de 100 µl de cada amostra fecal. As alíquotas foram congeladas a -20 °C por aproximadamente dois meses.

As amostras foram submetidas aos seis métodos de extração de DNA descritos no item 3.4.

3.3.2 *Sensibilidade diagnóstica do método de excistamento/fenol-clorofórmio em amostras purificadas*

Devido ao alto limiar de detecção observado em amostras de oocistos purificados, o método de excistamento/fenol-clorofórmio também foi avaliado nas 15 amostras fecais selecionadas, mas previamente submetidas aos processos de concentração e purificação de oocistos conforme descritos nos itens 3.1.2 e 3.1.3.

As amostras fecais após serem processadas pelo método de centrífugo-flutuação em sacarose e dispostas em lâmina, foram observadas ao microscópio para visualização dos oocistos. As lâminas e lamínulas foram então lavadas em tampão TE. A suspensão de oocistos foi colocada em microtubos e submetida a lavagens por centrifugação para retirada da sacarose. O sedimento contendo oocistos e pequena quantidade de material fecal foi armazenado a -20° por aproximadamente 2 meses.

As amostras foram submetidas somente ao método de extração de DNA por excistamento/fenol-clorofórmio (item 3.4.1).

3.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA

As amostras foram submetidas a diferentes técnicas de rompimento de oocistos, lise de esporozoítos e purificação de DNA:

- a. **Método 1:** Excistamento + fenol-clorofórmio (EF)
- b. **Método 2:** Excistamento + tiocianato de guanidina-sílica (ES)
- c. **Método 3:** Excistamento + *kit* QIAmp DNA Stool Mini (EK)
- d. **Método 4:** Choque térmico + fenol-clorofórmio (CF)
- e. **Método 5:** Choque térmico + tiocianato de guanidina-sílica (CS)
- f. **Método 6:** Choque térmico + *kit* QIAmp DNA Stool Mini (CK)

3.4.1 *Método 1: Excistamento + fenol-clorofórmio (EF)*

As amostras foram submetidas ao processo de indução de excistamento descrito por Ward e Wang (2000) e a purificação de DNA por fenol-clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989).

3.4.1.1 Excistamento

As amostras foram suspensas em 300 µl de ácido taurocólico (Sigma, Nova Zelândia) 1,5% em água e incubadas a 37°C por 2 h, com agitação de 1.000 rpm por 15 s a cada 5 min. Após a centrifugação a 15.000 g por 5 min, o sobrenadante foi descartado por inversão de tubos e o sedimento foi lavado com tampão TE q.s.p. 1,5 ml. Centrifugou-se novamente a 15.000 g por 5 min, sendo o sobrenadante descartado por inversão tubos e o sedimento suspenso em 500 µl de tampão de lise (100 mM NaCl; 10 mM Tris-Cl pH 8,0; 25 mM EDTA; 0,5% SDS; 0,1 mg/ml proteinase K). As amostras foram incubadas a 56°C por 2 h, com agitação de 1.000 rpm por 15 s a cada 5 min.

3.4.1.2 Fenol-clorofórmio

Para a purificação foram adicionados 250 µl de fenol e 250 µl de clorofórmio às amostras, que foram então homogeneizadas e centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos.

Posteriormente 400 µl do sobrenadante foram transferidos a outro microtubo, no qual foram adicionados 400 µl de propanol absoluto. Após a homogeneização, as amostras foram mantidas a -20°C por 2 h. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 30 minutos a 4°C. Desprezado o sobrenadante, o sedimento foi suspenso em 1 ml de etanol 70%. Uma nova centrifugação foi feita a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e os microtubos foram deixados em posição invertida, até a secagem completa, em temperatura ambiente. As amostras foram homogeneizadas com 30 µl de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) e incubadas em banho-seco a 56°C por 10 min. Após a homogeneização, as amostras foram armazenadas a -20°C até a sua utilização.

3.4.2 *Método 2: Excistamento + tiocianato de guanidina-silica*

Após o processo de indução de excistamento, as amostras foram incubadas apenas em pK e tampão TE, diferentemente do método 1, no qual a incubação foi realizada em tampão de lise, contendo não somente a enzima, mas também detergente SDS e outros sais. Posteriormente, as amostras foram tratadas com solução de tiocianato de guanidina (GuSCN) e suspensão de partículas de sílica, com base no protocolo descrito por Boom et al. (1990).

3.4.2.1 Excistamento

As amostras foram homogeneizadas com 300 µl de ácido taurocólico 1,5% em água e incubadas a 37°C por 2 h, com agitação de 1.000 rpm por 15 s a cada 5 min. Após a centrifugação a 15.000 g por 5 min, o sobrenadante foi descartado por inversão de tubos e o sedimento foi lavado com tampão TE q.s.p. 1,5 ml. Centrifugou-se novamente a 15.000 g por 5 min, sendo o sobrenadante descartado por inversão de tubos. O sedimento foi homogeneizado com 20 µl de proteinase K (10 mg/ml) e tampão TE q.s.p. 200 µl. As amostras foram incubadas a 56°C por 2 h, com agitação de 1.000 rpm por 15 s a cada 5 min.

3.4.2.2 Tiocianato de guanidina-sílica (GuSCN-sílica)

As amostras foram homogeneizadas com 1 ml de solução de lise (10 M GuSCN; 0,1 M Tris-HCl pH 6,4; 0,02 M EDTA pH 8,0; 1,3% Triton X-100) e 40 µl de solução carreadora (20% de Terra Diatomácea em 0,17 M HCl) e deixadas em repouso durante 20 min. Após serem homogeneizadas novamente, as amostras foram centrifugadas a 15.000 g por 1,5 min. Descartou-se o sobrenadante por inversão de tubos. O sedimento foi lavado duas vezes com 500 µl de tampão de lavagem (10 M GuSCN; 0,1 M Tris-HCl pH 6,4), duas vezes com etanol 70% e uma vez com acetona 99,5%, sempre com centrifugações a 15.000 g por 2 min e descarte do sobrenadante por inversão de tubos. Após o descarte da acetona, os microtubos foram incubados destampados a 37 °C por 30 min. Após a secagem do sedimento, foram acrescentados 150 µl de tampão TE (10 mM Tris HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0). As amostras foram incubadas a 56 °C por 10 min, homogeneizadas e centrifugadas a 15.000 g por 5 min. O sobrenadante (70 µl) foi disposto em outro microtubo e armazenado a -20 °C até a sua utilização.

3.4.3 *Método 3: Excistamento + kit QIAmp DNA Stool Mini*

As amostras foram submetidas ao método de indução de excistamento e posteriormente processadas de acordo com as instruções do manual fornecido pelo fabricante do *kit* comercial QIAmp DNA Stool Mini (Qiagen, Alemanha). Apenas reduziu-se o volume do tampão AE de 200 µl para 50 µl.

3.4.3.1 Excistamento

As amostras foram homogeneizadas com 300 µl de ácido taurocólico 1,5% em água e incubadas a 37°C por 2 h, com agitação de 1.000 rpm por 15 s a cada 5 min. Após a centrifugação a 15.000 g por 5 min, o sobrenadante foi descartado por inversão de tubos e o

sedimento foi lavado com tampão TE q.s.p. 1,5 ml. Centrifugou-se novamente a 15.000 g por 5 min, sendo o sobrenadante descartado por inversão de tubos.

3.4.3.2. *kit* QIAmp DNA Stool Mini

As amostras foram homogeneizadas a 1,4 ml de tampão ASL por 1 min em vórtex. As suspensões foram aquecidas por 5 min a 95°C, com agitação de 1.000 rpm por 15 s a cada 1 min, homogeneizadas e centrifugadas a 20.000 g por 1 min. O volume de 1,2 ml do sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 2 ml e o pellet foi descartado. A cada amostra adicionou-se um tablete InhibitEX, e para que este estivesse em completa suspensão, as amostras foram homogeneizadas por 1 min em vórtex. Em seguida foram incubadas por 1 min em temperatura ambiente para permitir que os inibidores fossem adsorvidos pela matriz do InhibitEX. Para sedimentação dos inibidores ligados à matriz do InhibitEX, as amostras foram centrifugadas a 20.000 g por 3 min. Em seguida todo o sobrenadante foi transferido a um novo microtubo de 1,5 ml, sendo o pellet descartado. Centrifugou-se novamente a 20.000 g por 3 min para eliminação de resíduos do InhibitEX. Foram transferidos 200 µl do sobredante a um novo microtubo contendo 15 µl de proteinase K. Após a adição de 200 µl de tampão AL, as amostras foram homogeneizadas e incubadas a 70° C por 10 min. Em seguida, adicionaram-se 200 µl de etanol 100% e as amostras foram cuidadosamente transferidas a uma coluna QIAmp spin sobreposta a um tubo coletor de 2 ml e centrifugadas a 20.000 g por 1 min. A coluna foi sobreposta a um novo tubo coletor de 2 ml e o tubo contendo o filtrado foi descartado. Adicionaram-se 500 µl de tampão AW1 e centrifugou-se a 20.000 g por 1 min. A coluna foi sobreposta a um novo tubo coletor de 2 ml e o tubo contendo o filtrado foi descartado. Foram acrescentados 500 µl de tampão AW2, em seguida as amostras foram centrifugadas a 20.000 g por 3 min. A coluna foi transferida a um novo microtubo de 1,5 ml e cuidadosamente acrescentaram-se 50 µl de tampão AE diretamente na membrana QIAmp. Após uma incubação de 1 min em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 20.000 g por 1 min. O tubo contendo o filtrado foi armazenado a -20° C até a sua utilização.

Todos os reagentes citados compõem o *kit* QIAmp DNA Stool Mini, com exceção do etanol 100%.

3.4.4 *Método 4: Choque térmico + fenol-clorofórmio*

As amostras foram primeiramente homogeneizadas ao tampão de SDS, submetidas ao choque térmico e posteriormente incubadas em pK, para então serem purificadas pela técnica de fenol-clorofórmio.

3.4.4.1 Choque térmico

As amostras foram homogeneizadas com 500 µl de 10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 25 mM EDTA (pH 8,0); 100 mM NaCl e 1% SDS. Para ruptura dos oocistos foram realizados cinco ciclos de congelamento em gelo seco por 5 min e descongelamento em banho-seco a 65°C por 5 minutos. Adicionaram-se 20 µl de proteinase K (10 mg/ml) com incubação a 56°C por 2 h, com agitação de 1.000 rpm de 15 s a cada 5 min.

3.4.4.2 Fenol-clorofórmio

As amostras foram purificadas pelo mesmo método descrito no item 3.3.1.2.

3.4.5 *Método 5: Choque térmico + tiocianato de guanidina-silica*

As amostras foram submetidas diretamente ao processo de choque térmico, sem o acréscimo de reagentes e posteriormente incubadas somente em pK e tampão TE, para então serem purificadas pela técnica descrita por Boom et al. (1990).

3.4.5.1 Choque térmico

As amostras foram submetidas a 5 ciclos de congelamento em gelo seco por 5 min e descongelamento em banho-seco a 65°C por 5 minutos. Adicionaram-se 20 µl de proteinase K (10 mg/ml) e tampão TE q.s.p. 200 µl, com incubação a 56°C por 2 h e agitação de 1.000 rpm de 15 s a cada 5 min.

3.4.5.2 Tiocianato de guanidina-sílica

A purificação do DNA foi realizada conforme descrito no item 3.4.2.2.

3.4.6 *Método 6: Choque térmico + kit QIAmp DNA Stool Mini*

As amostras foram submetidas ao choque térmico previamente acrescidas de tampão ASL, fornecido pelo *kit* QIAmp DNA Stool Mini.

3.4.6.1 Choque térmico

Primeiramente as amostras foram homogeneizadas a 1,4 ml do tampão ASL e em seguida procederam-se os cinco ciclos de congelamento em gelo seco por 5 min e descongelamento em banho-seco a 65°C por 5 minutos.

3.4.6.2 *kit* QIAmp DNA Stool Mini

Após a lise dos oocistos e esporozoítos, as amostras foram processadas com o *kit* QIAmp DNA Stool Mini conforme descrito no item 3.4.3.2, apenas levando-se em

consideração que o tampão ASL fora adicionado antes dos ciclos de congelamento de descongelamento.

3.5 CONTROLES NEGATIVOS

A cada cinco amostras submetidas aos métodos de extração de DNA foi incluído um controle negativo composto de TE, o qual foi processado na mesma forma que as demais amostras.

3.6 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA

A avaliação das sensibilidades foi realizada pela eficiência das *nested* PCRs em amplificar um fragmento do gene SSU rRNA a partir de DNA extraído pelos diferentes métodos. Os protocolos das reações de amplificação estão descritos no item 3.1.4.2. Os produtos amplificados foram detectados por corrida eletroforética em gel de agarose (item 3.1.4.3).

4 RESULTADOS

O item descreve os dados obtidos na obtenção de oocistos de *Cryptosporidium parvum* e nos testes de sensibilidades analítica e diagnóstica dos diferentes métodos de extração de DNA.

4.1 OBTENÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium parvum*

Foram analisadas 25 amostras fecais de bezerros, das quais 3 (12%) apresentaram-se positivas na pesquisa de *Cryptosporidium* tipo *parvum* pelo exame microscópico (item 3.1.2). No entanto, as três amostras positivas apresentavam um número pequeno de oocistos, sendo inviável submetê-las à purificação de oocistos para avaliação dos métodos de extração de DNA.

Dentre as 19 amostras de humanos, previamente diagnosticadas como positivas, cinco apresentavam quantidade satisfatória de oocistos e foram caracterizadas genotipicamente pelo sequenciamento do gene SSU rRNA (Tabela 3).

Tabela 3 – Identificação molecular pelo sequenciamento do gene SSU rRNA de isolados fecais de *Cryptosporidium* spp. provenientes de indivíduos apresentando intensa liberação de oocistos

Amostra	Espécie (Sequenciamento gene SSU rRNA)
4	<i>Cryptosporidium hominis</i>
28	<i>Cryptosporidium felis</i>
51	<i>Cryptosporidium parvum</i>
83	<i>Cryptosporidium parvum</i>
9N*	<i>Cryptosporidium parvum</i>

*Amostra empregada nos testes de sensibilidade analítica.

A amostra 9N foi submetida à purificação de oocistos, conforme o item 3.1.3, e empregada nos testes de sensibilidade analítica dos métodos moleculares deste estudo. Embora os isolados 51 e 83 também tenham sido identificados como *C. parvum*, optou-se por utilizar a amostra 9N, pois além da presença de grande quantidade de oocistos, havia a disponibilidade de uma quantidade maior de fezes.

A amostra 9N continha aproximadamente 50 g de fezes, sendo que ao final do processo de purificação, restringiu-se a uma suspensão de aproximadamente 10 ml, com concentração estimada de 10^6 oocistos/ml.

4.2 TESTE DE SENSIBILIDADE ANALÍTICA

Os testes de sensibilidade analítica de cada método de extração de DNA foram realizados em triplicatas, processadas em dias distintos. Somente os métodos com o emprego do *kit* QIAmp DNA Stool Mini foram realizados uma única vez.

Os métodos foram aplicados em amostras de oocistos purificados e em amostras fecais contaminadas com quantidades conhecidas de oocistos purificados, com exceção das técnicas envolvendo o *kit* comercial, as quais foram aplicadas somente em amostras fecais.

Nos métodos em que houve a possibilidade de comparação, as sensibilidades das *nested* PCRs foram reduzidas na presença de fezes, quando comparada com amostras de oocistos purificados. O método de extração com o emprego de excistamento e purificação com fenol-clorofórmio, possibilitou a detecção de até 1 oocisto pela *nested* PCR. No entanto, na presença de fezes, a sensibilidade reduziu-se até 10.000 vezes. Nos demais métodos a redução das sensibilidades analíticas na presença de fezes também foi bastante expressiva, variando de 1.000 a 10.000 vezes (Tabela 4).

Em amostras purificadas, EF apresentou a maior sensibilidade analítica em amostras purificadas, possibilitando a detecção de até 1 oocisto. Também proporcionou boa repetibilidade, sendo obtidos resultados semelhantes nas três repetições. CF e ES apresentaram sensibilidades similares na ausência de fezes, possibilitando a detecção de 10 oocistos (duas replicatas) e 10^2 oocistos (uma replicata). O método CS permitiu a detecção de 10^2 oocistos (duas replicatas) e 10^3 oocistos (uma replicata).

Em amostras fecais, os métodos que empregaram fenol-clorofórmio e *kit* QIAmp DNA Stool Mini mostraram eficiência semelhante, com detecção apenas em amostras com 10^4

oocistos. Somente em uma das replicatas, o método EF possibilitou a detecção de até 10^3 oocistos. As extrações com GuSCN-sílica foram em média 10 vezes menos sensíveis que os demais métodos de purificação, com capacidade de detecção de 10^5 oocistos, exceto por uma replicata com excistamento, na qual o limiar de detecção foi de 10^4 oocistos.

Em oocistos purificados, os procedimentos de extração de DNA com o emprego da técnica de indução de excistamento apresentaram melhor sensibilidade analítica, quando comparados aos de choque térmico. Na presença de fezes, a melhora com a técnica de excistamento foi inconsistente, tendo um aumento de 10 vezes em apenas uma das replicatas, tanto associada ao fenol-clorofórmio, como a GuSCN-sílica. Da mesma forma, EK e CK apresentaram mesma sensibilidade.

As sensibilidades diagnósticas dos métodos de extração de DNA avaliadas pela *nested* PCR do gene SSU rRNA são apresentadas na tabela 4.

Tabela 4 – Sensibilidades analíticas das *nested* PCRs do gene SSU rRNA após amplificação de DNA extraído por diferentes métodos, na ausência e na presença de 100 μ l de fezes bovina. As diluições avaliadas continham de 10^5 a 1 oocisto(s)

Métodos de extração de DNA	Oocistos			Oocistos + Fezes		
1. Excistamento / Fenol-clorofórmio	1	1	1	10^3	10^4	10^4
2. Excistamento / GuSCN-sílica	10	10^2	10	10^5	10^4	10^5
3. Excistamento / <i>Kit</i> QIAmp DNA Stool Mini	NR	NR	NR	10^4	NR	NR
4. Choque térmico / Fenol-clorofórmio	10	10	10^2	10^4	10^4	10^4
5. Choque térmico / GuSCN-sílica	10^2	10^2	10^3	10^5	10^5	10^5
6. Choque térmico / <i>Kit</i> QIAmp DNA Stool Mini	NR	NR	NR	10^4	NR	NR

NR: não realizado.

As fotos apresentam os resultados dos testes de sensibilidade analítica em gel de agarose, depois de realizada corrida eletroforética dos produtos amplificados pela *nested* PCR do gene SSU rRNA, provenientes de diferentes métodos de extração de DNA em amostras com diluições conhecidas de oocistos purificados, na ausência (Figura 1) e na presença de fezes (Figura 2). Nos métodos que apresentaram valores de sensibilidades analíticas diferentes nas triplicatas, foi ilustrado o resultado que apresentou repetição.

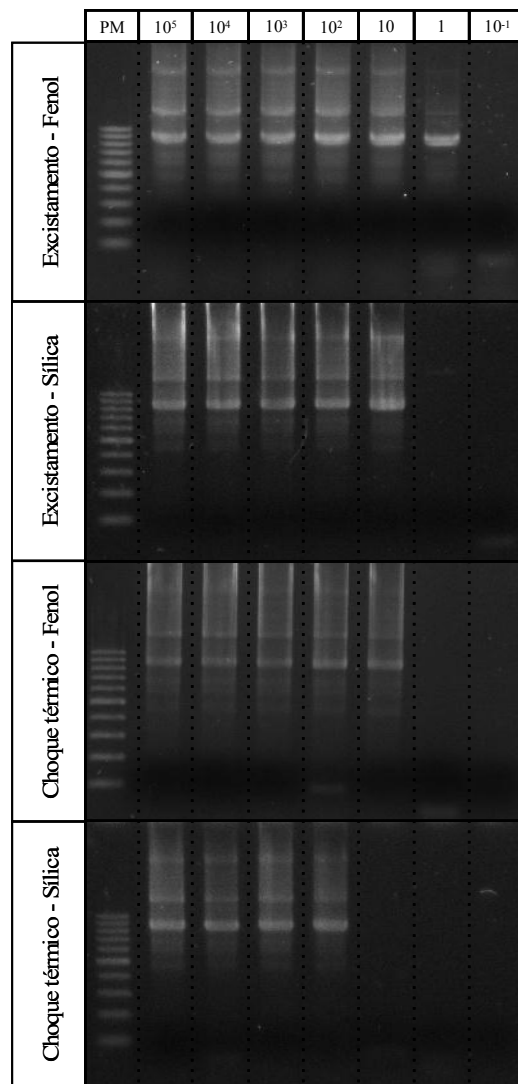


Figura 1 – Eletroforeses em gel de agarose dos produtos das *nested* PCRs do gene SSU rRNA resultantes da amplificação de DNA extraído pelos métodos EF, ES, CF e CS, a partir de oocistos purificados. Os valores são referentes ao número estimado de oocistos de *C. parvum* presente nas amostras submetidas à extração de DNA. PM: Peso molecular, múltiplos de 100 pares de base

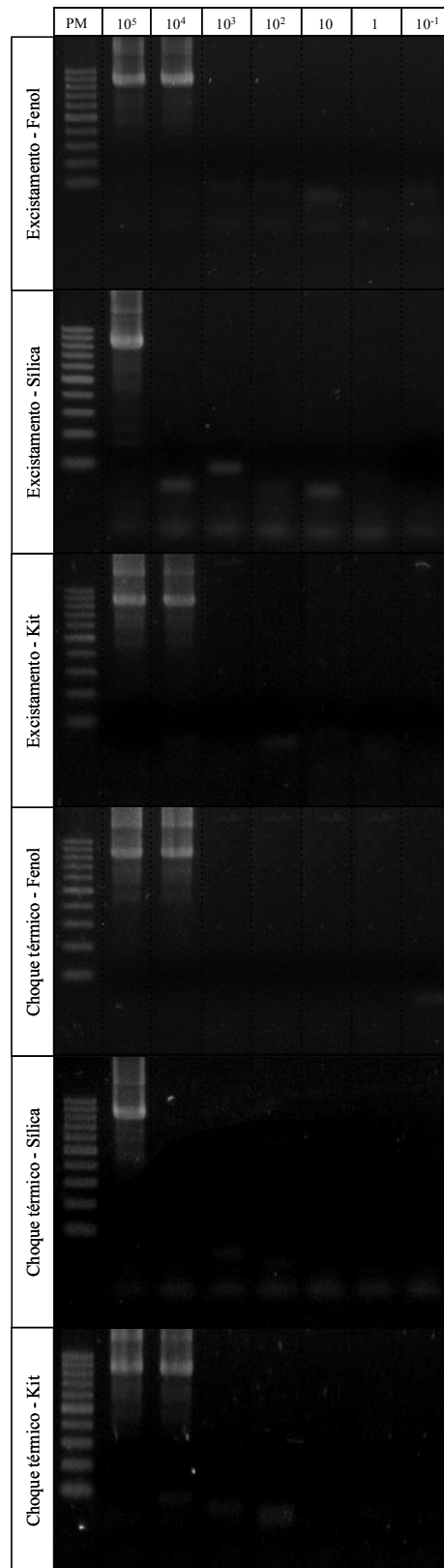


Figura 2 – Eletroforeses em gel de agarose dos produtos das *nested* PCRs do gene SSU rRNA resultantes da amplificação de DNA extraído pelos métodos de EF, ES, EK, CF, CS e CK, a partir de 100 μ l de fezes bovinas contaminadas com oocistos purificados. Os valores são referentes ao número estimado de oocistos de *C. parvum* presente nas amostras submetidas à extração de DNA. PM: Peso molecular, múltiplos de 100 pares de base

4.3 TESTE DE SENSIBILIDADE DIAGNÓSTICA

Para a avaliação das sensibilidades diagnósticas dos métodos de extração de DNA foram empregadas 15 amostras fecais provenientes de diversos hospedeiros naturalmente infectados com *Cryptosporidium* spp. As amostras foram diagnosticadas pelo método coproparasitológico de centrífugo-flutuação em sacarose, considerado o padrão-ouro.

4.3.1 Sensibilidade diagnóstica dos métodos de extração de DNA em amostras fecais

O *kit* QIAmp DNA Stool Mini, empregado em conjunto com excistamento e choque térmico, apresentou os melhores desempenhos nas reações de amplificação do DNA das amostras avaliadas, com sensibilidades de 86,7% (13/15). CS obteve 66,7% (10/15) de sensibilidade, enquanto que EF e ES obtiveram 60% (9/15) (Figuras 3 e 4). CF detectou o menor número de amostras, com apenas 53,3% (8/15) de sensibilidade. A tabela 5 apresenta os valores das sensibilidades diagnósticas dos diferentes métodos avaliados.

Tabela 5 – Sensibilidades diagnósticas dos diferentes métodos de extração de DNA, determinadas por meio da *nested* PCR do gene SSU rRNA de 15 amostras fecais positivas pelo método coproparasitológico de centrífugo-flutuação em sacarose, considerado o padrão-ouro

Métodos de extração de DNA	Nº de amostras positivas	Sensibilidade diagnóstica %
1. Excistamento/Fenol-clorofórmio	9	60
2. Excistamento/GuSCN-sílica	9	60
3. Excistamento/ <i>kit</i> QIAmp DNA Stool Mini	13	86,7
4. Choque térmico/Fenol-clorofórmio	8	53,3
5. Choque térmico/GuSCN-sílica	10	66,7
6. Choque térmico/ <i>kit</i> QIAmp DNA Stool Mini	13	86,7

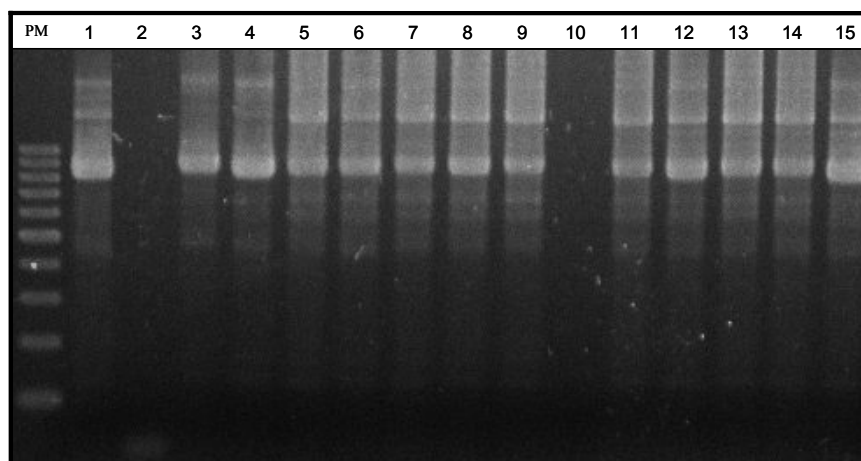


Figura 3 – Eletroforese em gel agarose dos produtos da *nested* PCR do gene SSU rRNA resultantes da amplificação de DNA extraído pelo método EK, a partir de amostras fecais de hospedeiros naturalmente infectados com *Cryptosporidium* spp. PM: Peso molecular, múltiplos de 100 pares de base

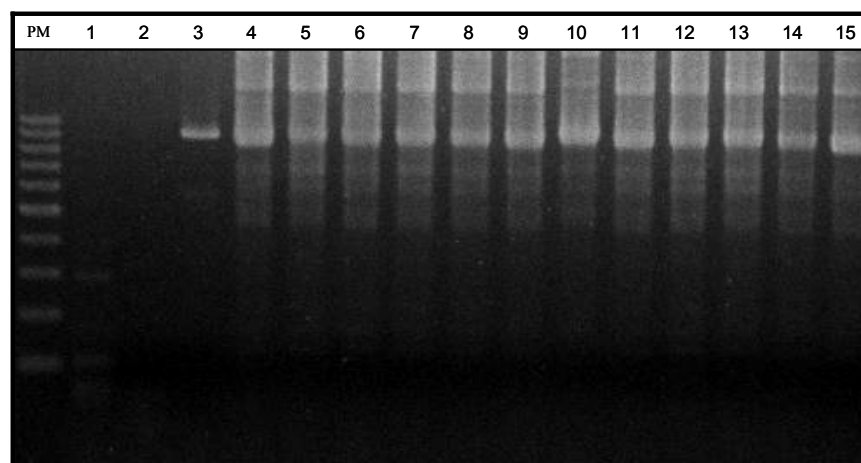


Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos da *nested* PCR do gene SSU rRNA resultante da amplificação de DNA extraído pelo método CK, a partir de amostras fecais de hospedeiros naturalmente infectados com *Cryptosporidium* spp. PM: Peso molecular, múltiplos de 100 pares de base

A tabela 6 expõe os resultados das *nested* PCRs pelo gene SSU rRNA de *Cryptosporidium* spp. das 15 amostras fecais positivas submetidas aos diferentes métodos de extração de DNA, correlacionando com as espécies dos hospedeiros e com a intensidade de eliminação de oocistos nas fezes.

As cinco amostras fecais de humanos analisadas, apresentaram-se positivas por pelo menos quatro métodos de extração de DNA, mesmo aquelas que apresentavam poucos oocistos, como as amostras 5 e 7. Somente a amostra 9, apesar da observação de 6 a 10

oocistos por campo na lâmina, apresentou-se negativa pelos métodos que empregaram fenol-clorofórmio. As amostras 6 e 8 foram negativas somente pelo método CF.

De forma semelhante, as seis amostras fecais de bovino analisadas apresentaram resultados positivos em todos os métodos de extração de DNA. Exceto pelas amostras 4 e 15, que não foram amplificadas quando extraídas pelos métodos que empregaram a GuSCN-sílica, e as amostras 11 e 14, negativas pelo método EF.

Contrariamente, as amostras de cão e gatos apresentaram-se negativas para a maioria dos métodos de extração de DNA, mesmo aquelas como a 3 e a 10, com mais de 6 oocistos por campo de observação em lâmina. Os métodos ES e CF não foram eficazes na purificação de nenhuma das amostras desses hospedeiros.

Tabela 6 – Resultados das ampliações pela *nested* PCR do gene SSU rRNA de amostras fecais positivas na pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* pelo método de centrífugo-flutuação em sacarose. As amostras fecais foram submetidas a seis métodos de extração de DNA, resultantes da combinação com pequenas variações de cinco técnicas: excistamento (E), choque térmico (C), fenol-clorofórmio (F), GuSCN-sílica (S) e *kit* QIAmp DNA Stool Mini (K). As amostras eram provenientes de humanos (H), bovinos (B), cão (C) e gatos (G)

Amostra	Hospedeiro	Intensidade da eliminação de oocistos	Métodos de extração de DNA					
			EF	ES	EK	CF	CS	CK
1	Cão	+	N	N	P	N	N	N
2	Gato	+	P	N	N	N	N	N
3	Gato	++++	N	N	P	N	N	P
4	Bovino	+	P	N	P	P	N	P
5	Humano	+	P	P	P	P	P	P
6	Humano	++	P	P	P	N	P	P
7	Humano	++	P	P	P	P	P	P
8	Humano	+	P	P	P	N	P	P
9	Humano	+++	N	P	P	N	P	P
10	Gato	++++	N	N	N	N	P	P
11	Bovino	+	N	P	P	P	P	P
12	Bovino	++++	P	P	P	P	P	P
13	Bovino	+++	P	P	P	P	P	P
14	Bovino	+++	N	P	P	P	P	P
15	Bovino	++	P	N	P	P	N	P

P (Positivo); N (Negativo).

(+) < 1 oocisto por campo de observação em microscópio óptico (aumento de 400x); (++) 1-5 oocistos por campo; (+++) 6-10 oocistos por campo; (++++) > 10 oocistos por campo.

4.3.2 Sensibilidade diagnóstica do método EF em amostras purificadas

Todas as 15 amostras fecais submetidas ao processo de purificação e concentração de oocistos por centrífugo-flutuação em sacarose, antes da extração de DNA pelo método EF, foram amplificadas pela *nested* PCR do gene SSU rRNA. Comparando-se a capacidade de detecção deste método com a técnica de microscopia, considerada como padrão-ouro, a sensibilidade obtida foi de 100%. A figura 5 ilustra os resultados das *nested* PCR em gel de agarose na avaliação da sensibilidade diagnóstica do método de centrífugo-flutuação em sacarose associado à extração de DNA por excistamento/fenol-clorofórmio.

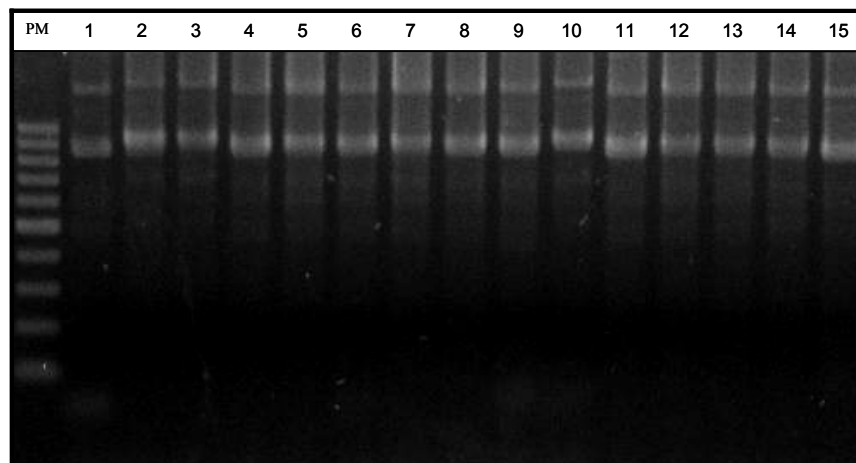


Figura 5 – Eletroforese em gel agarose dos produtos da *nested* PCR resultante da amplificação de DNA extraído pelo método EF, a partir de amostras de oocistos de *Cryptosporidium* spp. concentrados e purificados de fezes pela técnica de centrífugo-flutuação em sacarose. PM: Peso molecular, múltiplos de 100 pares de base

5 DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium parvum*

A obtenção de grande quantidade de oocistos de *Cryptosporidium parvum* foi possível somente a partir de amostras fecais humanas, previamente diagnosticadas como positivas pelo Laboratório de Parasitologia do Instituto de Infectologia Emílio Ribas. As amostras eram provenientes de pacientes imunocomprometidos pelo vírus da imunodeficiência humana, e apresentavam infecção oportunista por *Cryptosporidium*. A amostra 9N foi selecionada, não somente pela presença de grande quantidade de oocistos, mas também pela disponibilidade de um volume maior de fezes.

Entre as 25 amostras fecais bovinas analisadas, 3 (12%) apresentaram-se positivas para *Cryptosporidium*. No entanto, por serem provenientes de animais com baixa intensidade de infecção, foi observada eliminação de pequena quantidade de oocistos. Instalada então infecção experimental em bezerro com uma semana de idade, não se verificou a eliminação de oocistos (dados não mostrados). Talvez fosse necessário impedir a ingestão de colostro pelo bezerro ou realizar imunossupressão para que a instalação da infecção fosse consistente.

No processo de purificação de oocistos, buscou-se o emprego de um método acessível e com eficácia satisfatória na recuperação e limpeza dos oocistos. Embora existam outros métodos tecnologicamente mais sofisticados e com desempenho superior, o selecionado é de fácil execução, bem como emprega reagentes e equipamentos comuns a maior parte dos laboratórios. O método foi descrito por Brien e Jenkins (2007) para purificação de oocistos em grandes volumes de fezes (no presente trabalho foram realizadas algumas adaptações para volumes menores). Ao final do processo, verificou-se boa recuperação de oocistos e pequena quantidade de debris, que pouco prejudicou a visualização em câmara de Neubauer para a contagem de oocistos. De acordo com os autores, o método é capaz de recuperar um grande número de oocistos, com mínima contaminação por microorganismos fecais. Ainda é recomendado para purificação de oocistos destinados a métodos como excistamento, cultura de célula, análise de proteômica ou infecção experimental.

5.2 AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA

Para a avaliação da sensibilidade analítica dos métodos de extração de DNA, foram empregados oocistos da espécie *Cryptosporidium parvum*. Esta é considerada a principal espécie zoonótica e encontra-se em grande variedade de animais domésticos e silvestres. No entanto, estudos têm apontado que os bovinos em período lactente são o único grande reservatório de *C. parvum* aos humanos (GOH et al., 2004; XIAO; FENG, 2008). *C. parvum* também é amplamente distribuído entre os humanos, sendo responsável pela maioria dos casos de criptosporidiose em países desenvolvidos. Além da transmissão zoonótica, recentemente tem sido demonstrada a transmissão antroponótica de subgenótipos de *C. parvum* compartilhados entre humanos e bovinos, principalmente em países em desenvolvimento (XIAO; FENG, 2008). Na avaliação da sensibilidade analítica do presente estudo, oocistos de origem humana foram empregados na contaminação experimental de fezes provenientes de bezerro lactente. A espécie hospedeira na qual foram isolados os oocistos tem pouca relevância, levando-se em consideração que os oocistos foram identificados como pertencentes à espécie *C. parvum*, sabidamente compartilhada entre humanos e bovinos.

A *nested* PCR do gene SSU rRNA foi empregada na avaliação qualitativa do desempenho dos métodos de extração de DNA de oocistos de *Cryptosporidium* provenientes de amostras fecais. Apesar do alto risco de contaminação, a realização da *nested* PCR, e não somente da PCR, mostrou-se necessária, uma vez que a sensibilidade e especificidade são aumentadas consideravelmente, propriedade importante quando o diagnóstico é realizado a partir de amostras fecais. Além da presença de inibidores, o material fecal é composto por uma microbiota bastante diversificada, muitas vezes, em meio a poucos oocistos de *Cryptosporidium* (AMAR et al, 2004), o que requer um método de detecção altamente sensível e específico. As duas etapas da PCR contribuem para diluição de potenciais inibidores e fornece quantidade suficiente de DNA alvo para a PCR secundária, já que na PCR primária, ocorrem algumas amplificações na presença de inibidores, mesmo que não sejam detectadas pela técnica de eletroforese (MCORIST et al., 2002).

Uma outra forma de quantificar a concentração de DNA extraído pode ser realizada por meio de espectrofotômetro em luz violeta nos comprimentos de onda 260 e 280 nm, assim como sua qualidade pode ser verificada pela razão de absorbância a A_{260}/A_{280} . No entanto, esse método, quando empregado em amostras clínicas tem pequena resolução por

não ser capaz de discriminar o DNA extraído de diferentes organismos. A quantificação de DNA por espectrofotometria ainda pode apresentar baixa correlação em relação ao método da PCR. Em amostras fecais, a correlação é agravada pela presença e concentrações variadas de diferentes tipos de inibidores. Dessa forma, amostras com elevadas concentrações de DNA pela espectrofotometria, podem apresentar resultados negativos nas ampliações pela PCR, quando comparados ao resultado positivo em pequenas concentrações (ALMEIDA, 2004).

A técnica de *Real-Time* PCR tem sido empregada em estudos comparativos de métodos diagnósticos envolvendo extração e amplificação de DNA. Apesar de oferecer diversas vantagens em relação ao PCR convencional, trata-se de uma tecnologia cara, que emprega equipamentos e reagentes de alto custo, não sendo acessível para grande parte das instituições de pesquisa. Além disso, Higgins et al. (2001) não obtiveram resultados satisfatórios nas quantificações de DNA de *C. parvum* em amostras com poucos oocistos e alta concentração de inibidores, sendo necessário o uso de *nested* PCR para a detecção de tais amostras. Embora a técnica de *Real-time* PCR também seja empregada na identificação de isolados de *Cryptosporidium*, a *nested* PCR associada com outras técnicas como RFLP e sequenciamento ainda é o método mais comumente utilizado para esse fim.

O gene SSU rRNA foi selecionado como marcador na avaliação do desempenho dos diferentes métodos de extração de DNA, por ser um gene de cópias múltiplas, o que confere aumento de sensibilidade às reações de amplificação de DNA, quando comparado a genes de cópia única. Este marcador é amplamente empregado na identificação das espécies de *Cryptosporidium*, por possuir alta variabilidade interespecífica e baixa variabilidade intraespecífica, quando comparado às seqüências gênicas de outros marcadores, como *gp60* e ITS-2 (JEX et al., 2008). O protocolo de amplificação do gene SSU rRNA foi empregado em diversos estudos realizados no nosso laboratório (MEIRELES et al., 2006; THOMAZ et al., 2007; MEIRELES et al., 2007), encontrando-se bem estabelecido e padronizado nas condições do local de trabalho de nossa instituição.

A avaliação do desempenho dos métodos de extração de DNA foi realizada em amostras fecais congeladas. O congelamento é uma das formas mais comuns de preservação de material fecal ou de oocistos previamente purificados (WARD; WANG, 2001). No primeiro caso, requer métodos que extraiam o DNA do parasita diretamente das fezes (WARD; WANG, 2001), já que o congelamento de oocistos pode interferir em suas propriedades físicas e bioquímicas, alterando a eficiência dos métodos de purificação e concentração realizados previamente à extração de DNA (INOUE et al., 2006).

5.2.1 *Teste de sensibilidade analítica*

A avaliação da sensibilidade analítica dos métodos de extração de DNA foi realizada em amostras de oocistos purificados e em 100 µl de fezes de bovino contaminadas com oocistos purificados. As diluições decimais analisadas continham de 10^5 a 1 oocisto(s). A comparação entre as sensibilidades na ausência e na presença de fezes não foi possível nos métodos que empregaram o *kit* QIAmp DNA Stool Mini, o qual foi avaliado apenas na presença de fezes, não sendo realizado em amostras de oocistos purificados devido ao seu alto custo.

O presente estudo empregou o *kit* QIAmp DNA Stool Mini, adicionando algumas modificações ao protocolo descrito pelo fabricante. As amostras foram primeiramente submetidas a ciclos de congelamento e descongelamento ou excistamento com ácido taurocólico, sendo posteriormente processadas de acordo com as instruções do fabricante. Além disso, na última etapa, o volume do tampão de eluição AE foi reduzido de 200 µl para 50 µl. Os tratamentos adicionais para o rompimento dos oocistos foram considerados necessários, já que as instruções do fabricante preconizam apenas o aumento de temperatura de 70°C para 95°C para a lise de células com estruturas mais resistentes, tais como bactérias Gram-positivas. No entanto, oocistos de *Cryptosporidium* têm resistência superior, sendo necessários tratamentos mais rigorosos ou específicos para o seu rompimento.

O emprego do *kit* em amostras fecais sem purificação prévia resultou em sensibilidade diagnóstica de 10^4 oocistos, tanto associado com a técnica de excistamento, quanto com a de choque térmico. Sensibilidades semelhantes ao *kit* foram obtidas pelos métodos aplicados em conjunto com a purificação por fenol-clorofórmio. Pode-se concluir que não houve diferenças expressivas nas sensibilidades analíticas entre os métodos que empregaram o *kit* QIAmp DNA Stool Mini e a técnica de fenol-clorofórmio na extração de DNA em amostras fecais. No entanto os métodos de GuSCN-sílica foram em média 10 vezes menos sensíveis.

Analisando-se somente os resultados das sensibilidades dos métodos de extração de DNA em oocistos purificados, verificou-se que a técnica de purificação por fenol-clorofórmio obteve melhor desempenho em relação à de GuSCN-sílica. Um dos fatores que pode reduzir a sensibilidade do método de GuSCN-sílica, mesmo em amostras puras, é a presença de inibidores originados da suspensão de partículas de sílica empregada na extração de DNA. Esses inibidores aparentemente estão fortemente ligados às partículas de sílica, assim permanecendo no processo de purificação, sendo eluídos, juntamente com o DNA na última etapa do procedimento (BOOM et al., 1999). Boom et al. (1990) também relatam que

algumas moléculas de DNA falham em se aderir nas partículas de sílica, sendo perdidas durante as lavagens ou não são eluídas devido a forças físicas irreversíveis.

Na técnica de fenol-clorofórmio as amostras foram incubadas em tampão contendo detergente SDS, que lisa as células e auxilia na remoção das proteínas do DNA e proteinase K, responsável pela desproteíntização. Resíduos protéicos e lipídicos, além de outros compostos orgânicos, são removidos pela extração com fenol-clorofórmio, e o DNA permanece retido na fase aquosa da amostra. A precipitação com álcool auxilia na remoção de resíduos orgânicos e ajuda a concentrar o DNA da solução aquosa. Essa técnica demonstrou boa recuperação de DNA, verificada pelo alto limiar de detecção em amostras de oocistos purificados. No entanto, sua capacidade de remover inibidores é deficiente, evidenciada pela intensa redução de sensibilidade na presença de material fecal. Ward e Wang (2001) empregando o método de fenol-clorofórmio obtiveram resultados inconsistentes em amostras fecais com menos de 10^4 oocistos. Além disso, a técnica tem como principais desvantagens a geração de resíduos perigosos e consumir longos períodos de tempo.

Avaliando-se as técnicas de fenol-clorofórmio e GuSCN-sílica quanto ao desempenho da purificação de DNA, observou-se que na presença de fezes houve uma significativa diminuição na sensibilidade analítica de todos os métodos avaliados, verificando-se reduções de 1.000 a 10.000 vezes, quando comparado a sensibilidade em oocistos purificados. A principal causa dessa redução se deve a presença de inibidores que interferem na interação entre o DNA e a DNA polimerase (JOHNSON et al., 1995). Os inibidores fecais de PCR incluem polissacarídeos complexos, sais biliares, produtos da degradação da hemoglobina, compostos polifenólicos, metais pesados, dentre outros (STAUFFER et al., 2008); e apresentam variação de acordo com a dieta, flora intestinal e condições de saúde do hospedeiro (GONÇALVES et al., 2008). O excistamento *in vitro* também pode ser parcialmente inibido em oocistos expostos a gorduras fecais que interferem na sinalização, bloqueando a exposição dos receptores de superfície necessários ao processo de indução de excistamento (ROBERTSON et al., 1993). Essa inibição pode ser reversível pela exposição dos oocistos a uma solução de hipoclorito de sódio (1,75-5,25%) ou solução de Hanks (HBSS), capazes de expor novamente os receptores necessários na sinalização do excistamento (ROBERTSON et al., 1993).

Em oocistos purificados, os métodos que empregaram excistamento (300 µl de ácido taurocólico 1,5% a 37°C por 2 h) foram em média 10 vezes mais sensíveis quando comparados aos métodos que aplicaram o choque térmico (5 ciclos de congelamento em gelo seco por 5 min e descongelamento a 65°C por 5 min). Na presença de material fecal, as duas

técnicas foram eficientemente equivalentes. Ward e Wang (2001) compararam a técnica de excistamento (100 µl de ácido taurocólico 1,5% a 37°C por 2 h) e choque térmico (3 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido por 2 min e descongelamento a 75°C por 2 min) de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras fecais, e também não observaram diferenças entre os desempenhos dos métodos.

Na presença de material fecal, o desempenho do excistamento pode ser melhorado adicionando-se um tratamento prévio com hipoclorito de sódio ou HBSS para exposição dos receptores dos oocistos, antes da incubação em ácidos ou sais biliares (ROBERTSON et al., 1993). Em amostras de oocistos com mínima contaminação, esse tratamento parece ser desnecessário. De acordo com Gold et al. (2001), o clareamento em hipoclorito de sódio não aumentou a porcentagem de excistamento, comparativamente ao tratamento isolado com sal biliar de taurocolato de sódio. Os autores apontam que a variação nos métodos de purificação e concentração pode influenciar nas propriedades da superfície dos oocistos, fazendo com que o tratamento prévio com hipoclorito de sódio melhore ou não a porcentagem de excistamento.

Os mecanismos moleculares e bioquímicos envolvidos no excistamento de esporozoítos de *Cryptosporidium* são pouco conhecidos. Sabe-se que fatores do meio interno do hospedeiro como, temperatura, flutuações no pH, proteases, sais biliares, agentes redutores, além do tempo de exposição, são importantes na ativação do excistamento de oocistos. No entanto, o modo como tais fatores de indução estão relacionados e a importância hierárquica de cada um são pouco compreendidos, em parte pela ausência de padronização dos métodos empregados nos estudos (SMITH et al., 2005).

Ácidos e sais biliares, tais como ácido taurocólico e taurocolato de sódio, são comumente empregados na indução de excistamento *in vitro*, por aumentar a secreção de proteínas e a mobilidade dos esporozoítos (FENG et al., 2006), mas pouco se conhece sobre o mecanismo de ação desses agentes (GOLD et al., 2001).

De acordo com Kato et al. (2001) existem basicamente dois métodos pelos quais o excistamento poderia ser induzido. Em um deles, enzimas armazenadas internamente nos oocistos ou nos esporozoítos seriam secretadas após estímulos específicos causando abertura da sutura do oocisto. Pelo outro método, mudanças físicas e químicas externas causariam modificações na sutura, ocasionando a abertura da parede sem a necessidade de enzimas. Oocistos que são expostos ao calor (60°C por 5 min) ou folmaldeído (10% formalina) não apresentam excistamento (JENKINS et al., 1997), o que sugere que a viabilidade dos esporozoítos é requerida para induzir o excistamento. No entanto, a maioria dos tratamentos

que inviabiliza os oocistos, também modifica a conformação da parede e da sutura dos oocistos. Para avaliar a necessidade de viabilidade dos oocistos para o excistamento, Kato et al. (2001) analisaram os efeitos da irradiação gama sobre oocistos, a qual é potencialmente capaz de inativar os esporozoítos sem afetar a estrutura da parede dos oocistos. Os resultados do estudo sugerem que oocistos irradiados podem manter a capacidade de excistamento e aparente infecção, perdendo a viabilidade pela provável incapacidade de reprodução dos esporozoítos. A hipótese de que enzimas têm envolvimento no processo de excistamento pôde ser sustentada pelo fato de que oocistos irradiados com 5.000 kra foram incapazes de excistar, sabendo-se que essa dose de irradiação é capaz de inativar enzimas. Assim, possivelmente o excistamento ocorra mesmo em oocistos sem viabilidade, mas que têm as propriedades da parede conservadas.

O efeito da temperatura no excistamento de oocistos de *Cryptosporidium* foi avaliado por diversos estudos por se tratar de um dos principais fatores determinantes para o processo. Particularmente o efeito de baixas temperaturas na viabilidade da espécie *C. parvum* foi avaliado por Fayer e Nerad (1996) e Kim e Healey (2001). Os primeiros submetem oocistos purificados de *C. parvum* a diferentes temperaturas, sendo que os oocistos congelados foram considerados viáveis apenas quando parasitas em estágio de desenvolvimento eram observados microscopicamente nos tecidos de filhotes de camundongos imunossuprimidos. Todos os camundongos que receberam oocistos congelados a -10°C por 8, 24 e 168 h apresentaram parasitas em estágio de desenvolvimento. Os camundongos inoculados com oocistos congelados a -15°C por 8 e 24 h apresentaram parasitas em fase de desenvolvimento, mas não aqueles inoculados com oocistos congelados na mesma temperatura por 168 h. Todos os camundongos que receberam oocistos congelados a -20°C por 1, 3, 5 h tiveram *C. parvum* em estágio de desenvolvimento, mas não em oocistos congelados por 24 e 168 h. Os oocistos congelados a -70°C não foram capazes de se desenvolver. Kim e Healey (2001) avaliaram a viabilidade de oocistos de *C. parvum* após congelamento em baixas temperaturas (-20°C e -80°C) por diferentes períodos (2, 7 e 30 dias) na presença e ausência de fezes. A viabilidade foi determinada por *nucleic acid stain*, teste de excistamento, infectividade em cultura de células e em camundongos adultos imunossuprimidos. Os oocistos purificados antes do congelamento perderam a viabilidade. No entanto quando preservados em fezes a -20°C por 2, 7 e 30 dias, foram capazes de se manter viáveis e manter a capacidade de infectividade. O mesmo não foi observado em oocistos congelados em fezes a -80°C . Os resultados desses estudos demonstram que oocistos de *C. parvum* não perdem a viabilidade após congelamento em criopreservantes, temperaturas e períodos apropriados.

No presente estudo, as amostras de oocistos de *Cryptosporidium* foram primeiramente mantidas em solução conservante de bicromato de potássio 2,5% a 4°C por aproximadamente 1 semana, purificadas e congeladas a -20°C por 2 meses. Da mesma forma, as amostras fecais após serem contaminadas com oocistos purificados e aquelas empregadas nos testes de sensibilidade diagnóstica foram congeladas nas mesmas condições. Não é possível afirmar se os oocistos existiram porque mantiveram a viabilidade após congelamento a -20°C por aproximadamente 2 meses ou se o existimento ocorreu mesmo em oocistos não viáveis. No entanto, os resultados demonstram que a técnica de existimento tem eficiência superior ou equivalente à técnica de choque térmico.

Apesar de necessitar de um tempo de execução maior que a técnica de choque térmico, o método de indução de existimento é de fácil execução e emprega reagentes de baixo custo. Já o método de choque térmico é mais trabalhoso e depende da disponibilidade de obtenção de gelo seco, o qual só pode ser armazenado por breves períodos. Mesmo quando realizado em nitrogênio líquido requer equipamento sofisticado, suprimento contínuo de N₂ e boa infraestrutura do laboratório para casos de acidentes com vazamentos. Além disso, os ciclos de congelamento de descongelamento podem degradar o DNA. Ainda tem como desvantagem o maior risco de contaminação, já que o processo de choque térmico pode danificar os microtubos, causando o rompimento das paredes ou abertura das tampas. Portanto o uso da técnica de existimento para a liberação de esporozoítos e posterior extração de DNA mostrou-se bastante eficiente e uma boa alternativa para o método de choque térmico.

Cada teste de sensibilidade analítica dos diferentes métodos de extração de DNA foi realizado por três vezes, em dias distintos, para verificação da confiabilidade dos resultados, que é definida pelo grau de estabilidade quando uma medida é repetida em condições idênticas. Mesmo que um teste apresente altas sensibilidade e especificidade, se este não for reprodutível, seu valor e utilidade são consideravelmente reduzidos (GORDIS, 2004). Inúmeros fatores podem contribuir para redução da repetibilidade e acurácia do método. A distribuição do parasita na amostra pode não ser homogênea, o que é mais evidente em amostras com baixa contaminação. A própria consistência da amostra não é homogênea, especialmente em amostras aquosas. O emprego de volumes muito pequenos pode causar o aumento do viés, causado por diferenças na pipetagem da amostra e dos diferentes reagentes.

5.2.2 Teste de sensibilidade diagnóstica

5.2.2.1 Sensibilidade diagnóstica dos métodos de extração de DNA em amostras fecais

Na avaliação das sensibilidades diagnósticas, o *kit* QIAmp DNA Stool Mini possibilitou os melhores desempenhos das *nested* PCRs, em comparação aos outros métodos analisados. Tanto em conjunto com excistamento ou choque térmico, a sensibilidade analítica foi de 86,7%.

Embora o *kit* QIAmp DNA Stool Mini tenha sido utilizado em muitos estudos, não foram encontrados estudos comparativos desse produto em relação a outros métodos de extração de DNA em oocistos de *Cryptosporidium*, somente empregando outros microorganismos.

McOrist et al. (2002) compararam cinco métodos de extração de DNA das espécies *Lactobacillus acidophilus* e *Bacteroides uniformis* em fezes humanas. O *kit* QIAmp DNA Stool Mini apresentou o melhor desempenho quando comparado a outros três *kits* (FastDNA[®], Bio 101; Nucleospin[®] C + T, Macherey-Nagal e Quantum Prep[®] Aquapure Genomic DNA, Bio-Rad) e o método descrito por Boom et al. (1990).

Subrungruang et al. (2004) avaliaram pela PCR as sensibilidades de três métodos de extração de DNA de esporos de *Enterocytozoon bieneusi* em amostras fecais. Os métodos comerciais QIAmp Stool Mini kit e FTA filter paper apresentaram melhores desempenhos, quando comparados ao método tradicional de fenol-clorofórmio.

Métodos semelhantes foram comparados na extração de DNA de cistos de *Giardia duodenalis* presentes amostras fecais. No entanto, os autores obtiveram melhores resultados nas ampliações pela PCR com DNA extraído pelo método de FTA filter paper, comparados com as técnicas de fenol-clorofórmio e QIAmp DNA Stool Mini kit, que apresentaram desempenho equivalentes (TANG et al., 2007).

A principal vantagem dos *kits* de extração de DNA é a rapidez com que as amostras são processadas. Excluindo-se o tempo gasto com o excistamento (~2 horas) e choque térmico (~1 hora), o processamento de 10 amostras pelo *kit* QIAmp DNA Stool Mini consumiu aproximadamente 1 hora. Comparativamente, os métodos de GuSCN-sílica e fenol-clorofórmio são procedimentos mais demorados, consumindo em média 4 e 6 horas, respectivamente.

No entanto, além do custo elevado, outra principal desvantagem dos *kits* de extração de DNA que utilizam tecnologia por *spin column* é a possibilidade de contaminação cruzada, devido a formação de aerossóis. O risco de contaminação é maior no *kits* nos quais as colunas não são adaptadas firmemente aos tubos coletores (QUEIPO-ORTUÑO et al., 2008). Apesar do *kit* QIAmp DNA Stool Mini possuir tubos coletores que se encaixam de forma segura à coluna, não é fornecida quantidade suficiente para a realização de todas as etapas de centrifugação, sendo necessária a utilização de microtubos que não se adaptam perfeitamente às colunas. Deve-se considerar a possibilidade de resultados falso-positivos nas amostras processadas por esse método, assim com relatado por Fredericks et al. (2005) em amostras de DNA extraído de fungo.

O fabricante do *kit* não disponibiliza informações completas acerca da composição dos reagentes, devido aos direitos de patente de alguns componentes do produto. De forma genérica, o princípio do *kit* QIAmp DNA Stool Mini se baseia na lise e digestão das amostras em tampão ASL, adsorção de impurezas pela matriz do tablete InhibitEX, composta por uma mistura de polissacarídeos, e purificação de DNA pela coluna QIAmp spin. O DNA é adsorvido por uma membrana de sílica presente na coluna QIAmp spin, na presença de concentrações de sal e condições de pH adequadas. Para isso são utilizados tampões com agentes caotrópicos capazes de assegurar que resíduos de proteínas digeridas e outras impurezas não sejam retidas na membrana de sílica.

Princípio semelhante é baseado o método de GuSCN-sílica, descrito por Boom et al. (1990). Este método apresentou sensibilidade de 66,7% quando associado à técnica de choque térmico e de 60% quando associado ao excistamento. A técnica foi selecionada para avaliação neste estudo, como uma alternativa ao emprego dos *kits* comerciais, pelo menor custo, e ao uso de solventes orgânicos, como o fenol. Além disso, comparativamente ao método de fenol-clorofórmio, é realizado em um menor tempo.

No presente estudo, o método de GuSCN-sílica apresentou as menores sensibilidades analíticas, tanto em oocistos purificados, quanto na presença de material fecal, ao contrário do método de fenol-clorofórmio que obteve os melhores resultados, possibilitando a detecção de até 10^3 oocistos em amostras fecais. No entanto, na avaliação das sensibilidades diagnósticas, a purificação por GuSCN-sílica mostrou maior eficiência do que a purificação por fenol-clorofórmio. Essa diferença no desempenho dos métodos pode ter vários fatores. Possivelmente o mais importante deles seja a grande variabilidade na composição das amostras fecais. Essa variabilidade é dependente da consistência, dieta, flora intestinal e condições de saúde endógenas do hospedeiro (GONÇALVES et al., 2008), resultando em

concentrações distintas de substâncias inibidoras. A inibição da PCR parece ser reduzida em amostras fecais provenientes de indivíduos com dieta isenta de vegetais (MONTEIRO et al., 2001).

Em amostras fecais, a variabilidade na composição, mesmo uma mesma espécie, é mais acentuada em comparação a outras amostras clínicas, como por exemplo, tecidos e sangue (MCORIST et al., 2002). Tais características também dificultam a comparação entre resultados obtidos em diferentes estudos, já que os valores de sensibilidades analíticas são dependentes da natureza e da quantidade de amostra utilizada.

A diferença na concentração de inibidores, provavelmente devido à natureza de cada amostra, fez com que em algumas amostras não fosse verificada a correlação entre quantidade de oocistos e amplificação na PCR. Todos os métodos de extração de DNA avaliados foram eficientes e permitiram a amplificação da amostra 5 (humano), apesar da pequena concentração de oocistos detectada pelo método de centrífugo-flutuação em sacarose. Já a amostra 3 (gato) que apresentava grande quantidade de oocistos, foi amplificada apenas com a utilização dos métodos de EK e CK.

Apesar das limitações do estudo ocasionadas pelo pequeno número de amostras analisadas, pôde-se observar que as amostras provenientes do cão e dos gatos proporcionaram maior dificuldade de detecção pelos métodos, muito provavelmente pela composição do material fecal. O baixo desempenho dos métodos não é resultante da variabilidade genética dos oocistos, já que essas amostras, assim como as demais, foram amplificadas ao serem previamente purificadas pelo método de centrífugo-flutuação em sacarose, mantidas as demais condições de extração de DNA e PCR.

O presente estudo teve como objetivo avaliar somente a sensibilidade dos métodos de extração de DNA, portanto o método de centrífugo-flutuação em sacarose foi selecionado como padrão-ouro para detecção de amostras positivas. A porcentagem de resultados falso-positivos por esse método é menor quando comparado a outras técnicas convencionais como ELISA e imunofluorescência. Os oocistos imersos na solução de sacarose têm coloração rosada sob a luz do microscópio, o que facilita a sua visualização, apesar do reduzido tamanho. O método é rápido e de fácil execução, além de não exigir materiais e equipamentos de alto custo. No entanto, exige experiência do microscopista e não permite o processamento de muitas amostras, sendo que a leitura deve ocorrer antes da deformação dos oocistos. Amostras com grande quantidade de gordura necessitam de um tratamento prévio para sua retirada, caso contrário, a visualização em lâmina é fortemente comprometida.

McPherson e McQueen (1993) avaliaram seis métodos de diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. em fezes: coloração por Giemsa, coloração por Ziehl-Neelsen (ZN), coloração *auramine-rhodamine* (*AR staining*), flotação em solução de Sheather (SSF), imunofluorescência indireta e método modificado de concentração em solução de sacarose (MCSF). O método SSF detectou 87% das 54 amostras consideradas positivas, obtendo desempenho inferior somente ao método de *AR staining* que possibilitou a detecção de 94,4% das amostras. Três amostras foram positivas apenas pelo método de Sheather. Apesar de ser um método rápido e capaz de processar grande número de amostras, *AR staining* é considerado complexo e exige monitoramento de qualidade e especialização tecnológica, além de necessitar de um microscópio de fluorescência e utilizar corante carcinogênico (MCPHERSON; MCQUEEN, 1993).

Truong e Ferrari (2006) avaliaram métodos de purificação para o isolamento de oocistos de *Cryptosporidium* para análise proteômica. Os autores observaram que os métodos de centrífugo-suspensão e centrífugo-flutuação em sacarose apresentaram maior porcentagem de recuperação de oocistos, em relação os métodos de gradiente em sacarose e Percoll, gradiente em cloreto de céσιο, gradiente em Ficoll e gradiente em sacarose e *isopycnic Percoll*.

5.2.2.2 Sensibilidade diagnóstica do método EF em amostras purificadas

Nenhum dos métodos moleculares avaliados foi 100% eficiente na detecção de DNA das 15 amostras fecais positivas na pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* pela técnica microscópica. No entanto, o método de extração de DNA por EF apresentou alta sensibilidade analítica em amostras purificadas, possibilitando a detecção de até 1 oocisto. Esse resultado permite considerar o método de excistamento/fenol-clorofórmio eficiente na lise de oocistos e recuperação de DNA em amostras puras, portanto com baixa concentração de inibidores.

Foi então realizada a avaliação da sensibilidade diagnóstica do método EF em oocistos purificados de amostras fecais provenientes de hospedeiros naturalmente infectados. Das 15 amostras processadas pelo método, todas foram amplificadas pela *nested* PCR, resultando em 100% de sensibilidade diagnóstica.

O método de purificação selecionado foi descrito no item 3.1.2 e é tradicionalmente empregado nas pesquisas do Laboratório de Parasitologia (VPS-USP), obtendo-se resultados satisfatórios.

O método de centrífugo-flutuação em sacarose possibilita a remoção de grande parte dos inibidores presentes nas amostras fecais, além de concentrar os oocistos. A observação do parasita em microscópio confere maior segurança quanto a positividade das amostras. A recuperação dos oocistos pela lavagem da lâmina e lamínula mostrou-se eficiente, uma vez que o método possibilitou a amplificação de amostras com pequeno número de oocistos, como por exemplo, as amostras 1, 2, 4, 5 e 8, nas quais foram observados somente 7, 6, 7, 8 e 5 oocistos, respectivamente, em toda área da lamínula (dados não mostrados). Além disso, o método possibilitou a detecção de DNA das amostras 1, 2, 3 e 10, as quais possivelmente apresentavam grande quantidade de inibidores, pelo baixo desempenho da *nested* PCR em amplificar o DNA extraído pela maioria dos métodos avaliados, em amostras fecais sem purificação prévia.

Portanto, grande parte dos estudos que emprega técnicas de PCR e extração de DNA (SAMIEA et al., 2006; COKLIN et al. 2007; KARANIS et al.; 2007; MENDONÇA et al., 2007; SANTINA et al., 2007), realiza uma etapa prévia de purificação de oocistos das fezes, com o intuito principal de reduzir a quantidade de inibidores de PCR. Também permite o emprego de um volume superior de material fecal, possibilitando a recuperação de um maior número de oocistos. A extração de DNA diretamente das fezes, requer o emprego de volumes reduzidos de amostra, em parte pela própria técnica, que é padronizada para pequenos volumes, em parte para reduzir a quantidade de inibidores de PCR.

O emprego de apenas 100 µl de fezes pode ter contribuído para a redução das sensibilidades diagnósticas dos métodos de extração de DNA em amostras fecais. No entanto, deve-se considerar que, apesar do emprego de um volume maior de fezes no método de centrífugo-flutuação em sacarose, ocorrem perdas em várias etapas do procedimento: filtração da amostra fecal em camada de gaze, centrifugação em sacarose, recuperação de oocistos pela alça bacteriológica e lavagem da lâmina.

Os resultados do presente estudo ilustram a influência dos métodos de extração de DNA no rendimento de um experimento e que o uso de métodos apropriados é decisivo para a eficácia da PCR em amostras clínicas. Além disso, demonstra que a escolha do método deve levar em consideração o tipo de amostra, grau de contaminação, presença de possíveis inibidores de PCR e forma de preservação a que foi submetida. Dessa forma, estudos

comparativos são necessários para assegurar que os métodos de extração de DNA sejam otimizados para cada aplicação em particular.

6 CONCLUSÕES

- O método de extração de DNA envolvendo liberação dos esporozoítos por excistamento e purificação de DNA por fenol-clorofórmio (EF) possibilitou a detecção de até 1 oocisto pela *nested* PCR do gene SSU rRNA, demonstrando ter alta sensibilidade quando empregado em amostras de oocistos previamente purificados. EF apresentou sensibilidade analítica superior aos métodos ES (excistamento/GuSCN), CF (choque térmico/fenol-clorofórmio) e CS (choque térmico/GuSCN).
- Na presença de 100 µl de fezes bovina, os métodos EF, EK (excistamento/kit QIAmp DNA Stool Mini) e CK (choque térmico/ *kit* QIAmp DNA Stool Mini) apresentaram desempenhos equivalentes, com sensibilidade analítica de 10⁴ oocistos. Esses métodos possibilitaram limiar de detecção superior aos demais métodos avaliados (ES, CF e CS).
- Na presença de fezes, a sensibilidade diagnóstica dos métodos de extração EF, ES, CF e CS apresentou redução de até 10.000 vezes, quando comparado às sensibilidades em amostras de oocistos purificados.
- Os métodos EK e CK apresentaram as maiores sensibilidades diagnósticas (86,7%), possibilitando a detecção de DNA de *Cryptosporidium* spp. em 13 das 15 amostras fecais previamente diagnosticadas como positivas pelo método de centrífugo-flutuação em sacarose, considerado o padrão-ouro. Esses resultados sugerem que a extração de DNA pelo *kit* QIAmp DNA Stool Mini possibilita uma melhor recuperação de material genético e/ou retirada de inibidores de PCR, quando comparado aos métodos de fenol-clorofórmio e GuSCN-sílica.
- A extração de DNA pelo método EF, a partir de amostras de oocistos previamente purificados e concentrados das fezes pelo método de centrífugo-flutuação em sacarose, possibilitou 100% de sensibilidade pela *nested* PCR. Pode-se considerar que o emprego dessa técnica de concentração de oocistos e retirada de inibidores, favorece a sensibilidade dos métodos de extração de DNA e PCR.

REFERÊNCIAS

- ABE, N. S.; YAMADA, Y.; KIMATA, I.; ISEKI, M. *Cryptosporidium* infections in dogs in Osaka, Japan. **Veterinary Parasitology**, v. 108, p. 185-193, 2002.
- ALMEIDA, T. T. C. **Padronização e avaliação de métodos moleculares para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp (Apicomplexa: Cryptosporiidae) em amostras fecais : extração de DNA genômico e PCR (reação em cadeia pela polimerase)**. 2004. 130 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- AMAR, C. F.; DEAR, P. H.; MCLAUCHLIN, J. Detection and identification by real time PCR/RFLP analyses of *Cryptosporidium* species from human faeces. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 217-222, 2004.
- APEELBEE, A. J.; THOMPSON, R. C. A.; OLSON, M. E. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife – current status and future needs. **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 371-376, 2005.
- ARAÚJO, A. J. U. S. **Estudo da ocorrência de infecção por *Cryptosporidium* ssp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) entre crianças do município de Taubaté - SP e caracterização genotípica de isolados clínicos do parasito**. 2004. 103 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- BALATBAT, A. B.; JORDAN, G. W.; TANG, Y. J.; SILVA, J. J. Detection of *Cryptosporidium parvum* DNA in human feces by nested PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 1769-1772, 1996.
- BIALEK, R.; BINDER, N.; DIETZ, K.; JOACHIN, A.; KNOBLOCK, J.; ZELCK, E. U. Comparison of fluorescence, antigen and PCR assays to detect *Cryptosporidium parvum* in fecal specimens. **Diagnostic of Microbiology Infection Diseases**, v. 43, p. 283- 288, 2002.
- BLACK, E. K.; FINCH, G. R.; TAGHI-KILANI, R.; BELOSEVIC, M. Comparison of assays for *Cryptosporidium parvum* oocyst viability after chemical disinfections. **FEMS Microbiology Letters**, v. 135, p. 187-189, 1996.

BOOM, R.; SOL, C.; BELD, M.; WEEL, J.; GOUDSMIT, J.; DILLEN, P. W. Improved silica-guanidiniumthiocyanate DNA isolation procedure based on selective binding of bovine alpha-casein to silica particles. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 615-619, 1999.

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M.; VAN DER NOORDA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 495-503, 1990.

BRANTLEY, R. K.; WILLIAMS, K. R.; SILVA, T. M. J.; SISTROM, M.; THIELMAN, N. M.; WARD, H.; LIMA, A. A. M.; GUERRANT, R. L. AIDS-Associated diarrhea and wasting in northeast Brazil is associated with sub therapeutic plasma levels of antiretroviral medications and with both bovine and human subtypes of *Cryptosporidium parvum*. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 7, p. 16-22, 2003.

BRIEN, C. N.; JENKINS, M. C. A rapid method for producing highly purified *Cryptosporidium parvum* oocysts. **The Journal of Parasitology**, v. 93, n. 2, p. 434-436, 2007.

CACCIO, S. M.; THOMPSON, R. C. A.; MCLAUCHLIN, J.; SMITH, H. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 430-437, 2005.

CAMPBELL, A. T.; ROBERTSON, L. J.; SMITH, H. V. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts: correlation of in vitro excystation with inclusion or exclusion of fluorogenic vital dyes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 3488-3493.

CAREY, C. M.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. **Water Research**, v. 38, p. 818-862, 2004.

CARRENO, R. A.; MARTIN, D. S.; BARTA, J. R. *Cryptosporidium* is more closely related to gregarines than coccidian as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. **Parasitology Research**, v. 85, p. 899-904, 1999.

CHICHINO, G.; BRUNO, A.; CEVINI, C.; ATZORI, C.; GATTI, S.; SCAGLIA, M. New rapid staining methods of *Cryptosporidium* oocysts in stools. **Journal of Protozoology**, v. 38, p. 212S-214S, 1991.

COKLIN, T.; FARBER, J.; PARRINGTON, L.; DIXON, B. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Ontario, Canada. **Veterinary Parasitology**, v. 25, p. 297-305, 2007.

DILLINGHAM, R. A.; LIMA, A. A.; GUERRANT, R. L. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 1059-1066, 2002.

DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; FAYER, R. **Cryptosporidiosis of man and animals**. Boston: CRC Press, 1990. 199 p.

ELLIOT, A.; MORGAN, U. M.; THOMPSON, R. C. Improved staining method for detecting *Cryptosporidium* oocysts in stools using malachite green. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 45, p. 139-142, 1999.

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

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1305-22, 2000.

FAYER, R.; NERAD, T. Effects of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1431-1433, 1996.

FAYER, R.; SANTIN, M.; TROUT, J. M. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos Taurus*). **Veterinary Parasitology**, v. 156, p. 191-198, 2008.

FAYER, R.; SANTIN, M.; TROUT, J. M.; DUBEY, J. P. Detection of *Cryptosporidium felis* and *Giardia duodenalis* Assemblage F in a cat colony. **Veterinary Parasitology**, v. 31, p. 44-53, 2006.

FENG, H.; NIE, W.; SHEORAN, A.; ZHANG, Q.; TZIPORI, S. Bile acids enhance invasiveness of *Cryptosporidium* spp. into culture cells. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 3342-3346, 2006.

FENG, Y.; ALDERISIO, K. A.; YANG, W. *Cryptosporidium* genotypes in wildlife from a New York watershed. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 6475-6483, 2007.

FREDRICKS, D. N.; SMITH, C.; MÉIER, A. Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n.10, p. 5122-5128, 2005.

GARCIA, L. S.; SHIMIZU, R. Y. Evaluation of nine immuno assay Kits (enzyme immune assay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 209-212, 1997.

GOBET, P.; BUISSON, J. C.; VAGNER, O.; NACIRI, M.; GRAPPIN, M.; COMPAROT, S.; HARLY, G.; AUBERT, D.; VARGA, I.; CAMERLYNCK, P.; BONNIN, A. Detection of *Cryptosporidium parvum* in human feces by sensitive PCR-based assay including uracil-N-glycosylase inactivation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 254-256, 1997.

GOH, S.; REACHER, M.; CASEMORE, D. P.; VERLANDER, N. Q.; CHALMERS, R.; KNOWLES, M.; WILLIAMS, J.; OSBORN, K.; RICHARDS, S. Sporadic cryptosporidiosis, North Cumbria, England, 1996-2000. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, p. 1007-1015, 2004.

GOLD, D.; STEIN, B.; TZIPORI, S. The utilization of sodium taurocholate in excystation of *Cryptosporidium parvum* and infection of tissue culture. **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 997-1000, 2001.

GONÇALVES, E. M.; ARAÚJO, R. S.; ORBAN, M.; MATTÉ, G. R.; MATTÉ, M. H.; CORBETT, C. E. Protocol for DNA extraction of *Cryptosporidium* spp. oocysts in fecal samples. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 3, p. 165-167, 2008.

GORDIS, L. **Epidemiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2004. 302 p.

GUERRANT, R. L. Cryptosporidiosis: an emerging, highly infectious threat. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, p. 1-10, 1997.

HENRIKSEN, S. A.; POHLENZ, J. F. L. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 22, p. 594-596, 1981.

HIGGINS, J. A.; FAYER, R.; TROUT, J. M.; XIAO, L.; LAL, A. A.; KERBY, S.; JENKINS, M. C. Real-time PCR for detection of *Cryptosporidium parvum*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 47, p. 323-337, 2001.

HIJJAWI, N. S.; MELONI, B. P.; MORGAN, U. M.; OLSON, M. E.; THOMPSON, R. C. A. Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni* with evidence of novel extracellular stages in the *Cryptosporidium* life cycle. **Internacional Journal for Parasitology**, v. 32, p. 1719-1726, 2002.

HIJJAWI, N. S.; MELONI, B. P.; NG'ANZO, M.; RYAN, U. M.; OLSON, M. E.; COX, P. T.; THOMPSON, R. C. A. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. **Internacional Journal for Parasitology**, v. 34, p. 769-777, 2004.

HOJLYNG, N.; HOLTEN-ANDERSEN, W.; JEPSEN, S. Cryptosporidiosis: a case of airborne transmission, **The Lancet**, v. 2, p. 271-272, 1987.

INOUE, M.; UGA, S.; ODA, T.; RAÍ, S. K.; VESEY, G.; HOTTA, H. Changes of physical and biochemical properties of *Cryptosporidium* oocysts with various storage conditions. **Water Research**, v. 40, p. 881-886, 2006.

JEX, A. R.; SMITH, H. V.; MONIS, P. T.; CAMPBELL, B. E.; GASSER, R. B. *Cryptosporidium* - Biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 4, p.304-317, 2008.

JENKINS, M. B.; ANGUISH, L. J.; BOWMAN, D. D.; WALKER, M. J.; GHIORSE, W. C. Assessment of a dye permeability assay for determination of inactivation rates of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 10, p. 3844-3850, 1997.

JIRKŮ, M.; VALIGUROVÁ, A.; KOUDELA, B.; KRÍZEK, J.; MODRÝ, D.; SLAPETA, J. New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. **Folia Parasitologica**, v. 55, n. 2, p. 81-94, 2008.

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

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

KATO, S.; JENKINS, M. B.; GHIORSE, W. C.; BOWMAN, D. D. Chemical and physical factors affecting the excystation of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 575-581, 2001.

KIM, H. C.; HEALEY, C. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts following cryopreservation. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 5, p. 1194-1196, 2001.

KRAMER, M. H.; SORHAGE, F. E.; GOLDSTEIN, S. T.; DALLEY, E.; WAHLQUIST, S. P.; HERWALDT, B. L. First reported outbreak in the United States of cryptosporidiosis associated with a recreational lake, **Clinical Infectious Diseases**, v. 26, p. 27-33, 1998.

LÊ MOING, V.; BISSUEL, F.; COSTAGLILOLO, D. Decreased prevalence of intestinal cryptosporidiosis in HIV-infected patients concomitant to the widespread use of protease inhibitors. **AIDS**, v. 12, p. 1395, 1998.

LENG, X.; MOSIER, D. A.; OBERST, R. D. Simplified method for recovery and PCR detection of *Cryptosporidium* DNA from bovine feces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 643-647, 1996.

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

LEVINE, N. D. **Textbook of veterinary parasitology**. Minneapolis: Burges, 1978. 236 p.

MA, P.; SOAVE, R. Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. **Journal of Infectious Diseases**, v. 147, p. 824-828, 1983.

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

MAGI, B.; CANOCCHI, V.; TORDINI, G.; CELLESI, C.; BARBERI, A. *Cryptosporidium* infection: diagnostic techniques. **Parasitology Research**, v. 98, p. 150-152, 2006.

MCPHERSON, D. W.; MCQUEEN, R. Cryptosporidiosis: Multiattribute evaluation of six diagnostic methods. **Journal of Microbiological Methods**, v. 31, p. 198-202, 1993.

MEIRELES, M. V.; SOARES, R. M.; BONELLO, F.; GENNARI, S. M. Natural infection with zoonotic subtype of *Cryptosporidium parvum* in Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 20, p. 166-170, 2007.

MEIRELES, M. V.; SOARES, R. M.; SANTOS, M. M.; GENNARI, S. M. Biological studies and molecular characterization of a *Cryptosporidium* isolate from ostriches (*Struthio camelus*). **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 3, p. 623-626, 2006.

MCLAUCHLIN, J.; AMAR, C.; PEDRAZA-DIAZ, S.; NICHOLS, G. L. Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3984-3990, 2000.

MCORIST, A. L.; JACKSON, M.; BIRD, A. R. A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 50, p. 131-139, 2002.

MENDONÇA, C.; ALMEIDA, A.; CASTRO, A.; DELGADO, M. L.; SOARES, S.; COSTA, J. M. C.; CANADA, N. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 47-50, 2007.

MONTEIRO, L.; GRAS, N.; VIDAL, R.; CABRITA, J.; MÉGRAUD, F. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human feces by PCR: DNA stability and removal of inhibitors. **Journal of Microbiological Methods**, v. 45, p. 89-94, 2001.

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

MORGAN, U. M.; XIAO, L.; FAYER, R.; LAL, A. A.; THOMPSON, R. C. A. Variation in *Cryptosporidium*: Towards a taxonomic revision of the genus. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1733-1751, 1999.

O'DONOGHUE, P. J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. **Internacional Journal for Parasitology**, v. 25, p. 139-95, 1995.

OGASSAWARA, S.; BENASSI, S. Infecção experimental de gatos com coração bovino parasitado por *Sarcocystis* spp. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 47, n. 1-2, p. 27-32, 1980.

PEDRAZA-DIAZ, S.; AMAR, C.; NICHOLS, G. L.; MCLAUCHLIN, J. Nested polymerase chain reaction for amplification of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, p. 49-56, 2001.

PETERSEN, C. Cryptosporidiosis in patients infected with the human immunodeficiency virus. **Clinical Infectious Disease**, v. 15, p. 903-909, 1992.

PEZZANI, B. C.; BAUTISTA, E.; CORDOBA, A.; DE LUCA, M. M.; BASUALDO, J. A. Factors affecting the in vitro excystation of *Cryptosporidium* sp. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 30, p. 138-142, 1998.

POHJOLA, S.; JOKIPII, L.; JOKIPII, A. M. Dimethylsulphoxide-Ziehl-Neelsen staining technique for detection of cryptosporidial oocysts. **Veterinary Record**, v. 116, p. 442-443, 1984.

POWER, M.; RYAN, U. *Cryptosporidium macropodum* n.sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos *Macropus giganteus*. **Journal of Parasitology**, v. 11, n. 1, p. 1114-1117, 2008.

QUEIPO-ORTUÑO, M. I.; TENA, F.; COLMENERO, J. D.; MORATA, P. Comparison of seven commercial DNA extraction kits for the recovery of *Brucella* DNA from spiked human serum samples using real-time PCR. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, p. 109-114, 2008.

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

ROBERTSON, L. J.; CAMPBELL, A. T.; SMITH, H. V. In vitro excystation of *Cryptosporidium parvum*. **Parasitology**, v. 106, p. 13-19, 1993.

RYAN, U. M.; POWER, M.; XIAO, L. *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 22-26, 2008.

SAMIE, A.; BESSONG, P. O.; OBI, C. L.; SEVILLEJ, J. E. A. D.; STROUP, S.; HOUP, E.; GUERRANT, R. L. *Cryptosporidium* species: Preliminary descriptions of the prevalence and genotype distribution among school children and hospital patients in the Venda region, Limpopo Province, South Africa. **Experimental Parasitology**, v. 114, n. 4, p. 314-322, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 2100 p.

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

SATOH, M.; MATSUBARA-NIHEI, Y.; SASAKI, T.; NAKAI, Y. Characterization of *Cryptosporidium canis* isolated in Japan. **Parasitology Research**, v. 99, n. 6, p. 746-748, 2006.

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

SMITH, H. V.; CACCIO, S. M.; TAIT, A.; MCLAUCHLIN, J.; THOMPSON, R. C. A. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. **Trends in Parasitology**, v. 22, p. 160-167, 2006.

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

STAUFFER, S. H.; BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; MARR, H.; GOOKIN, J. L. Evaluation of four DNA extraction methods for the detection of *Trichomonas foetus* in feline stool specimens by polymerase chain reaction. **The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, n. 5, p. 639-641, 2008.

SUBRUNGRUANG, I.; MUNGTHIN, M.; CHAVALITSHEWINKOON-PETMITR, P.; RANGSIN, R.; NAAGLOR, T.; LEELAYOOVA, S. Evaluation of DNA extraction and PCR methods for detection of *Enterocytozoon bienuesi* in stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3490-3494, 2004.

SULAIMAN, I. M.; XIAO, L.; YANG, C.; ESCALANTE, L.; MOORE, A.; BEARD, C. B.; ARROWOOD, M. J.; LAL, A. A. Differentiating humans from animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, p. 681-685, 1998.

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

TANG, J. N.; ZENGA, Z. G.; WANG, H. N.; YANG, T.; ZHANG, P. J.; LI, Y. L.; ZHANG, A. Y.; FAN, W. Q.; ZHANG, Y.; YANG, X.; ZHAO, S. J.; TIAN, G. B.; ZOU, L. K. An

effective method for isolation of DNA from pig faeces and comparison of five different methods. **Journal of Microbiological Methods**, v. 75, n. 3, p. 432-436, 2008.

THOMAZ, A.; MEIRELES, M. V.; SOARES, R. M.; PENA, H. F.; GENNARI, S. M. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of felines, canines and bovines in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 150, n. 4, p. 291-296, 2007.

THOMPSON, R. C. A.; PALMER, C. S.; O'HANDLEY, R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. **The Veterinary Journal**, v. 177, p. 18-25, 2008.

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

UPTON, S. J.; TILLEY, M.; NESTERENKO, V.; BRILLHART, D. B. A simple and reliable method of producing in vitro infections of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa). **FEMS Microbiology Letters**, v. 118, p. 45-50, 1994.

WAGNER-WIENING, C.; KIMMIG, P. Detection of viable *Cryptosporidium parvum* oocysts by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 4514-4516, 1995.

WARD, L. A.; WANG, Y. Rapid methods to isolate *Cryptosporidium* DNA from frozen feces for PCR. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 41, p. 37-42, 2001.

WEISEL, T.; DITTRICH, S.; MÖHL, I.; ADUSU, E.; JELINEK, T. Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, p. 656-659, 2006.

XIAO, L.; BERN, C.; ARROWOOD, M. Identification of the *Cryptosporidium* pig genotype in a human patient. **Journal of Infectious Diseases**, v. 185, p. 1846-1848, 2002.

XIAO, L.; BERN, C.; LIMOR, J.; SULAIMAN, I.; ROBERTS, J.; CHECKLEY, W.; CABRERA, L.; GILMAN, R. H.; LAL, A. A. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, p. 492-497, 2001.

XIAO, L.; FENG, Y. Zoonotic cryptosporidiosis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, p. 309-323, 2008.

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

XIAO, L.; MORGAN, U. M.; LIMOR, J.; ESCALANTE, A.; ARRWOOD, M.; SHULAW, W.; THOMPSON, R. C. A.; FAYER, R.; LAL, A. A. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3386-3391, 1999.