



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA ANIMAL
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E ESTUDO FILOGENÉTICO
DE CRYPTOSPORIDIUM spp. OBTIDOS DE DIFERENTES
HOSPEDEIROS**

FRANZISKA HUBER

*Sob a Orientação da Professora
Teresa Cristina Bergamo do Bomfim*

*e Co-orientação dos Professores
Alexandre Ribeiro Bello
Rita de Cássia Alves Alcântara de Menezes*

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em
Ciências**, no Curso de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias, Área de
Concentração em *Parasitologia
Veterinária*

UFRRJ

Fevereiro, 2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

FRANZISKA HUBER

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**,
no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em
Parasitologia Veterinária

TESE APROVADA EM 27/02/2007

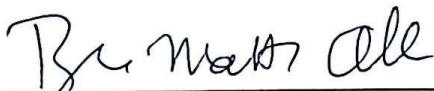

Teresa Cristina Bergamo do Bomfim (Orientadora, Ph.D. – UFRRJ)



Regina Maura Bueno Franco (Drª – UNICAMP)



Tânia Maria Pacheco Schubach (Drª – FIOCRUZ /RJ)



Rodolpho Mattos Albano (Dr. – UERJ)



Adriana Rayol Pedrenho (Drª – UFRRJ)

UFRRJ-Biblioteca Central
Registro
Data: <u>07/05/07</u>
Nº BC: <u>769/02</u>
Ex.: <u>130489</u>
Ac.: <u>42330</u>
Origem: <u>Doucino</u>

636.089696

H877

T

Huber, Franziska, 1975-
 Caracterização genotípica e estudo
 filogenético de *Cryptosporidium* spp.
 Obtidos de diferentes hospedeiros /
 Franziska Huber. - 2007.
 59 f. : il.

Orientadora: Teresa Cristina Bergamo
 do Bomfim,

Tese (doutorado) - Universidade
 Federal Rural do Rio de Janeiro,
 Instituto de Veterinária.

Bibliografia: f. 52-59.

1. *Cryptosporidium* - Parasito - Teses.
2. *Cryptosporidium* - Filogenia - Teses.
3. *Cryptosporidium* - Genética - Teses. I.
 Bomfim, Teresa Cristina Bergamo do, 1961.
 II. Universidade Federal Rural do Rio de
 Janeiro. Instituto de Veterinária. III.
 Título.

DEDICATÓRIA

Dedico o presente trabalho aos meus pais - Heidi e Albert e à vida, que constantemente evolui e se revela maravilhosa e perfeita, principalmente nos detalhes ínfimos.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço de todo coração à orientadora, professora e amiga Teresa Cristina Bergamo do Bomfim pelo amparo e constante empenho no trabalho. Sua dedicação e ética profissional são sem dúvida os mais importantes exemplos que eu poderia ter recebido neste curso.

Ao meu Co-orientador de fato, embora não tenha sido de direito, Sidnei Silva agradeço pelo indispensável acompanhamento durante a realização das análises moleculares. Sem sua amigável e agradabilíssima colaboração, a presente tese não teria metade de seu valor.

A Alexandre Ribeiro Bello agradeço por sua disponibilidade em abrir as portas de seu laboratório e de seu conhecimento, possibilitando assim a realização do trabalho.

Ao professor Rodolpho Mattos Albano e à Denise, do Laboratório de Genoma (UERJ), por contribuírem significativamente nos experimentos de seqüenciamento.

A Yara, Teresa, Érika e todos do laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UERJ.

A Kátia R. S. Teixeira (EMBRAPA/Agrobiologia) pela orientação e acompanhamentos durante as análises filogenéticas.

À Raquel Saucier Gomes pela presença e amizade constante.

Aos meus amigos e colegas do curso de Pós-graduação pela amizade, os momentos divertidos e alegres que passamos juntos. Embora os caminhos da vida tendam a separar muitos de nós, as lembranças e amizade real são inseparáveis.

São tantas as pessoas que colaboraram direta ou indiretamente neste trabalho, que fica difícil relembrar a todos. Peço perdão aos que porventura não sejam aqui lembrados diretamente e deixo meu abraço carinhoso a todos.

Agradeço especialmente a Deus, pela criação, seu bom humor e imaginação ao criar com tanta leveza e beleza aquilo que Ele nós permite descobrir através do estudo e trabalho.

RESUMO

HUBER, Franziska. Caracterização genotípica e estudo filogenético de *Cryptosporidium* spp. obtidos de diferentes hospedeiros. 2007. 59p Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

O presente trabalho teve por objetivo caracterizar geneticamente as espécies de *Cryptosporidium* oriundos de vários hospedeiros, realizar o seqüenciamento e análises filogenéticas, incluindo o depósito das primeiras seqüências brasileiras de *Cryptosporidium* spp. de origem animal no GenBank. Foram obtidas amostras fecais contendo oocistos de *Cryptosporidium* de pintos, patos, codornas e porquinhos da índia comercializados num mercado municipal da cidade do Rio de Janeiro, de bezerros de uma propriedade voltada à produção leiteira localizada no mesmo município e de gatos e cães de um abrigo para animais localizado no município de Nova Iguaçu. Para as análises foi utilizado Nested-PCR do DNA extraído a partir de 200µl de solução fecal. Foi realizada RFLP dos produtos obtidos no Nested-PCR, utilizando-se as enzimas *SspI* e *VspI*, para uma identificação preliminar das espécies de *Cryptosporidium* presentes. As amostras de DNA foram seqüenciadas e análises filogenéticas foram conduzidas. Foram diagnosticados e sequenciados *C. baileyi* infectando dois patos (DQ855339 e DQ885340) e uma codorna (DQ885335) e *C. meleagridis* infectando um pinto (DQ885341). As seqüências dos Porquinhos da Índia receberam os números de acesso DQ885337 e DQ885338, sendo que ambas as seqüências não puderam ser identificadas como espécie conhecida de *Cryptosporidium*, devido à grande distância genética entre elas e aquelas já depositadas no GenBank, sugerindo que se trate de um genótipo ou espécie nova. Parasitando os gatos foi diagnosticado *C. felis* (DQ885336) e em um cão *C. canis* (DQ885334). Uma das amostras de *C. parvum* de bovinos foi seqüenciada, sendo depositada no GenBank sob número de acesso DQ885333. Durante as análises dos sítios de corte enzimático dos produtos da Nested-PCR do gen 18Sr DNA, a única espécie que realmente possui padrão de corte característico é *C. baileyi*. As demais espécies de *Cryptosporidium* deveriam ser submetidas à ação de outras enzimas, para um diagnóstico acurado. Nas análises filogenéticas foi observada uma distância genética maior entre *C. felis* e *C. canis* isolados no Brasil quando comparados às seqüências do GenBank. Com base nos dados apresentados pelo agrupamento filogenético, uma possível nova espécie chama a atenção à presença de espécies desconhecidas de *Cryptosporidium*, mesmo em animais comuns de estimativa, como é o caso do Porquinho da Índia. Estas são as primeiras seqüências de *C. baileyi*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis* e *C. parvum* do Brasil depositadas no GenBank.

Palavras-chaves: *Cryptosporidium*, Filogenia, Caracterização genotípica, Brasil

ABSTRACT

HUBER, Franziska. **Genotypic characterization and phylogeny of *Cryptosporidium* spp. from different hosts.** 2007. 59p Thesis (PhD in Veterinary Sciences, Veterinary Parasitology). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

The objectives of the present study was the genetical characterizations of *Cryptosporidium* spp. from different hosts, realize the sequencing an phylogenetic analysis, including the deposit in GenBank of the first *Cryptosporidium* sequences of animal origin, from Brazil. There were obtained fecal samples, containing *Cryptosporidium* oocysts from chiken, ducks, quails and Guinea pigs from a public market localized in Rio de Janeiro city, from dairy calves maintained at a farm localized in the same city and from dogs and cats maintained at a shelter localized in the city of Nova Iguaçu. For the analysis was utilized the Nested-PCR of the extracted DNA from 200µl of fecal suspension. For primary identification of *Cryptosporidium* species was realized RFLP with enzymes *SspI* and *VspI*. DNA samples were sequenced and phylogenetic analysis were conducted. There were diagnosed and sequenced *C. baileyi* infecting two ducks (DQ855339 and DQ885340) and one quail (DQ885335) and *C. meleagridis* infecting one chicken (DQ885341). The sequences obtained form *Cryptosporidium* infecting Guinea pigs received accession numbers DQ885337 and DQ885338, both sequences were not identified with known *Cryptosporidium* species due to the great genetic distance between them and those already available at GenBank, suggesting that it may be a new genotype or species. Parasitizing cats was diagnosed *C. felis* (DQ885336) and in one dog *C. canis* (DQ885334). One sample of *C. parvum* of calf origin was sequenced and received accession number DQ885333. During analysis of RFLP pattern of the nested-PCR product from 18Sr DNA was stated that only *C. baileyi* has a characteristic digestion pattern. Other *Cryptosporidium* species should be digested by several other enzymes, for a accurate diagnosis. At phylogenetic analysis was found a greater genetic distance between *C. felis* and *C. canis* from Brazil when compared to the reference sequences obtained from GenBank. Based on the phylogenetic groupings, a possible new species of *Cryptosporidium* from Guinea Pigs calls attention for the existence of new species even in common pet animals. As is the case of the Guinea Pig. The sequences obtained in this study are the first Brazilian sequences of *C. baileyi*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis* and *C. parvum* deposited in GenBank.

KEY-WORDS: CRYPTOSPORIDIUM, PHYLOGENY, GENOTYPIC CHARACTERIZATION, BRAZIL

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Relação filogenética entre as espécies e genótipos de *Cryptosporidium*, analisadas pelo Neighbor-Joining de seqüências parciais do SSUrRNA gene. Os valores nos ramos são as percentagens do Bootstrap, usando 1000 replicas. Os números após os nomes das espécies ou genótipos são as identificações dos isolados usados na construção da árvore filogenética. Os números entre parênteses representam a quantidade de isolados seqüenciados (Xiao et al 2004). Página 25
- Figura 2:** Produtos da RFLP-PCR de amostras fecais contendo oocistos de *Cryptosporidium* sp. Colunas 1 a 5: produto da digestão SspI de *C. baileyi* de patos. Coluna 6: produto de digestão de *C. baileyi* de codorna, Coluna 7: produto de digestão de *C. meleagridis* isolado de pinto. Colunas 8 e 9: produto não digerido de *Cryptosporidium* sp. de Porquinhos da índia. Os pesos moleculares indicados são valores aproximados, admitindo uma variação de 3% para mais ou para menos. M: Marcador de peso Molecular 31
- Figura 3:** Produtos da RFLP-PCR de amostras fecais de gatos e de um cão, contendo oocistos de *Cryptosporidium* spp., provenientes de um abrigo. Colunas 1, 2 e 3: produtos da digestão de *C. felis* isolados de gatos. Coluna 4: produto da digestão de *C. canis*, isolado de cão. Os Pesos moleculares apresentados são aproximados, podendo variar em 3% para mais ou para menos. M: Marcador de peso molecular 33
- Figura 4:** Produtos da RFLP-PCR de amostras fecais contendo oocistos de *Cryptosporidium* spp. de bezerros de uma fazenda de exploração leiteira. Colunas 1, 2 e 3: produtos da digestão de *C. parvum*. Os Pesos moleculares apresentados são aproximados, podendo variar em 3% para mais ou para menos. M: Marcador de peso molecular 35
- Figura 5:** Resultado da digestão de *Cryptosporidium* spp. com a enzima *VspI*. Coluna 1: produto de digestão de *C. meleagridis* isolado de pinto. Colunas 2 e 3: produto de *Cryptosporidium* sp. de Porquinhos da Índia. Coluna 4: produto da digestão de *C. canis* de cão. Colunas 5 e 6: produto de *C. parvum* de bovinos. Os pesos moleculares indicados são valores aproximados, admitindo uma variação de 3% para mais ou para menos. M: Marcador de peso molecular 36
- Figura 6:** Fluxograma de uso das enzimas de restrição *SspI*, *VspI*, *DdeI*, *AseI* e *NdeI* para o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. 41
- Figura 7:** Alinhamento das seqüências de *C. parvum* (B83), *C. canis* (C224), *C. felis* (Gato), *Cryptosporidium* sp. de Porquinho da Índia (O92 e O93), *C. baileyi* de codorna (Codorna), *C. baileyi* de patos (P21 e P22) e *C. meleagridis* de pinto (Pinto). As cores marcam os sítios de restrição presentes nas seqüências, para as enzimas *DdeI* (CTAAG), *AseI* (ATTAT), *VspI* (ATTAAT) e *SspI* (AATATT). Lacunas são marcadas por (-) e Nucleotídeos idênticos por (.). 43

Figura 8: Árvore flogenética de espécies brasileiras de *Cryptosporidium* e 48 espécies já descritas e depositadas no GenBank, elaborada pelo método do Neighbor Joining, utilizando Kimura 2 Parâmetro. Note que os isolados de *Cavia porcellus* agrupam-se com *C. felis*, porém mantendo-se distintas o bastante para garantir estado de espécie distinta.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Alguns primers usados na caracterização dos genes SSu rRNA, HSP70 e actina, das várias espécies de <i>Cryptosporidium</i>	Página 9
Quadro 2: Primers de micro e minisatélites para o estudo populacional de <i>C. parvum</i> e <i>C. hominis</i> (TANRIVERDI & WIDMER, 2006).	21
Quadro 3: Comparação entre os sítios de restrição enzimática presentes nas seqüências parciais do gene 18Sr DNA (Tamanho aproximado dos fragmentos: 752pb) de <i>C. parvum</i> (B83), <i>C. canis</i> (C224), <i>C. felis</i> (Gato), <i>Cryptosporidium</i> sp. de Porquinho da Índia (O92 e O93), <i>C. baileyi</i> de codorna (Codorna), <i>C. baileyi</i> de patos (P21 e P22) e <i>C. meleagridis</i> de pinto (Pinto) e seqüências equivalentes já depositadas no GenBank. Foram comparadas as enzimas <i>SspI</i> , <i>VspI</i> , <i>DdeI</i> , <i>AseI</i> e <i>NdeI</i> .	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distância genética calculada pelo Kimura- 2 Parâmetro, comparando a amostra brasileira de <i>C. felis</i> e seqüências previamente depositadas no GenBank.	Página 46
Tabela 2: Distância genética calculada pelo Kimura- 2 Parâmetro, comparando a amostra brasileira de <i>C. canis</i> e seqüências previamente depositadas no GenBank.	46
Tabela 3: Distância genética calculada pelo Kimura- 2 Parâmetro, comparando as amostras brasileiras de <i>Cryptosporidium</i> de <i>Cavia porcelus</i> e seqüências previamente depositadas no GenBank.	47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Histórico do Gênero <i>Cryptosporidium</i> .	3
2.2 Morfologia	3
2.3 Importância como Zoonose	4
2.4 Diagnóstico	5
2.5 Diagnóstico Utilizando a Reação da Polimerase em Cadeia – PCR	6
2.5.1 Obtenção do DNA para a realização das análises - extração do DNA	6
2.5.2 Genes Utilizados Nas Análises	8
2.5.3 Técnicas de PCR	12
2.5.3.1 PCR simples e Nested PCR	12
2.5.3.2 PCR da Transcriptase Reversa (Reverse Transcription PCR)	13
2.5.3.3 PCR de Tempo Real (Real time PCR)	14
2.5.4 Técnicas de identificação de genótipos e subgenótipos - Fingerprinting	15
2.5.4.1 Técnica do Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição – RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	15
2.5.4.2 Amplificação Randomizada do DNA Polimórfico - RAPD	17
2.5.4.3 Polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados - AFLP	18
2.5.4.4 Uso de Micro e minisatélites	19
2.5.5 Polimorfismo da conformação de fitas únicas - SSCP	22
2.6 Estudo Filogênico	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Locais de Realização da Pesquisa	26
3.2 Locais de Coleta das Amostras fecais e obtenção de oocistos para as análises	26
3.2.1 Mercado Municipal	26
3.2.2 Abrigo para gatos.	27
3.2.3 Fazenda de bovinos de leite.	27
3.3 Processamento das amostras fecais	27
3.4 Extração do DNA total em amostras fecais	27
3.5 Realização do PCR primária e nested	28
3.6 Digestão dos Produtos do Nested PCR com Enzimas de Restrição	28
3.7 Seqüenciamento e Análise Filogenética	28
4 RESULTADOS	30
4.1 Mercado Municipal	30
4.2 Abrigo de gatos	33
4.3 Bovinos leiteiros	35
4.4 Seqüências obtidas e identificação de sítios de corte enzimático	38
4.5 Filogenia	46
5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÕES	52
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Cryptosporidium* tem sido classificado junto com outros coccídios entéricos na ordem Eucoccidiorida com base nas similaridades de suas características morfológicas e de seu ciclo de vida.

Baseado na proposta de classificação em 1988, por Levine, esse protozoário pertence ao Filo Apicomplexa, caracterizado por apresentar complexo apical e todos os seus representantes serem parasitas. Classe Sporozoasida por apresentar reprodução assexuada e sexuada com a produção de oocisto; Subclasse Coccidiásina com ciclo de vida que envolve merogonia, gametogonia e esporogonia. Ordem Eucoccidiida apresentando merogonia ou esquizogonia; Subordem Eimeriina com o desenvolvimento independente de macrogamonte e microgamontes. Família Cryptosporidiidae, apresentando oocisto com quatro esporozoítas, esporocisto ausente e todos os estágios endógenos desenvolvendo-se isoladamente em vacúolo parasitóforo na superfície das células parasitadas, sendo um protozoário intracelular/extracitoplasmático que possui um ciclo biológico essencialmente monoxeno.

Após a primeira descrição do gênero *Cryptosporidium*, em 1907 por Tyzzer, diversas espécies foram nomeadas em função dos hospedeiros nos quais foram encontradas e inclusive, oocistos de *Cryptosporidium* foram confundidos, por alguns pesquisadores, com esporocistos de *Sarcocystis*. Os critérios para designar espécies de representantes do filo Apicomplexa incluem a especificidade por hospedeiro, morfologia dos oocistos e local de parasitismo, contudo, para espécies pertencentes ao gênero *Cryptosporidium*, somente esses critérios não são adequados para identificar e nomear novas espécies.

Os oocistos das diferentes espécies de *Cryptosporidium* são idênticos morfológicamente e existem similaridades de morfometria em muitas delas. Essas similaridades na estrutura têm causado confusão na nomeação de várias espécies, não sustentando uma classificação segura.

Através de estudos morfológicos e ultra-estruturais foram identificadas as classificações errôneas e algumas espécies nomeadas no passado foram desconsideradas. Em seguida foi sugerido o conceito equivocado da especificidade estrita de *Cryptosporidium* quanto aos hospedeiros, o que resultou novamente na nomeação de diversas novas espécies. A intensificação de estudos de infecção cruzada derrubou o conceito da especificidade restrita e muitas das novas espécies de *Cryptosporidium* de localização intestinal, contendo oocistos considerados de tamanho pequeno, foram consideradas sinônimas de *C. parvum*. Durante alguns anos esta espécie foi descrita como sendo a única espécie parasita de mamíferos, ao lado de *C. wrairi* e *C. felis*, que conseguiram manter o status de espécie devido a características biológicas distintas (XIAO et al., 2004a).

Com o advento das técnicas de biologia molecular a taxonomia do gênero sofreu novas mudanças, sendo que o número de espécies consideradas como válidas ainda é largamente discutido entre os pesquisadores. O'Donoughue (1995) considerou seis espécies válidas de *Cryptosporidium*, sendo elas *C. parvum*, *C. muris*, *C. meleagridis*, *C. baileyi* e *C. serpentis* e *C. nasorum*. Mais tarde Fayer et al. (1997), acrescentaram a esta lista *C. wrairi* e *C. felis*. Recentemente, foram descritas diversas outras espécies, baseando-se principalmente em características moleculares, sendo *C. saurophylum* parasitando lagartos (KOUDELA; MODRÝ, 1998); *C. galli* (RYAN et al., 1999) afetando aves; *C. andersoni* (LINDSAY et al. 2000) em bovinos; *C. canis* (FAYER et al., 2001) parasitando cães; *C. molnari* em peixes marinhos (ALVAREZ-PELLITERO; SITJÀ-BOBADILLA, 2002); *C. hominis* (MORGAN-RYAN et al., 2002) em humanos; *C. suis* (RYAN et al, 2003) em suínos e *C. bovis* (FAYER et al, 2005) infectando também bovinos.

O desafio atual é definir até que ponto uma espécie deve ser considerada como tal ou como variante de outra. Existe, a necessidade de um critério para a descrição e validação das espécies do gênero *Cryptosporidium*. (XIAO et al., 2002).

Muitas tentativas têm sido feitas no sentido de caracterizar espécies, cepas e isolados de *Cryptosporidium* utilizando uma variedade de técnicas da biologia molecular, além das morfológicas, bioquímicas e imunológicas (O'DONUGHUE, 1995). Este tipo de abordagem tem sido enfatizado por vários autores, com o objetivo de proporcionar soluções significativas aos problemas relacionados à caracterizações genéticas do gênero *Cryptosporidium*. Porém, o tipo de informação disponível para as diferentes espécies e genótipos do parasito é altamente variável. Para algumas espécies, como *C. nasorum* e *C. molnari*, não existem dados referentes ao seqüenciamento genético, enquanto que para a maioria, poucas características morfológicas e biológicas são relatadas nos estudos (UPTON, 2002).

Nos últimos anos a espécie *C. parvum* foi submetida a intensos estudos moleculares e filogenéticos com o propósito de elucidar se os diversos genótipos caracterizados não seriam na realidade espécies distintas. Como resultado foram nomeados *C. canis* (FAYER et al., 2001), que era o antigo genótipo canino de *C. parvum*; *C. suis* (RYAN et al., 2004) que é a renominação do antigo *C. parvum* genótipo suíno. *Cryptosporidium hominis* (MORGAN-RYAN et al., 2002) representa o genótipo humano de *C. parvum*, cujo hospedeiro é o homem e *C. bovis* (FAYER et al., 2005) é o antigo subgenótipo bovino tipo B de *C. parvum*, que infecta apenas ruminantes e é geneticamente relacionado ao genótipo de cervídeos.

O nome da espécie *C. parvum* ficou reservado a hospedeiros ruminantes e outros mamíferos, incluindo o homem. Ainda se considera esta espécie como sendo na realidade um grupo de espécies crípticas (de origem comum a *C. parvum*), denominadas de genótipos de *C. parvum*, como forma de nomear protozoários de localização intestinal, de pequeno tamanho e que apresentam a capacidade de infectar diversas espécies de mamíferos.

O presente trabalho teve por objetivo caracterizar geneticamente as espécies de *Cryptosporidium* oriundos de vários hospedeiros, realizar o seqüenciamento e análises filogenéticas, incluindo o depósito das primeiras seqüências brasileiras de *Cryptosporidium* spp. de origem animal no GenBank.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico do Gênero *Cryptosporidium*.

A primeira descrição de um protozoário que infectava as células epiteliais do estômago de camundongos foi feita por TYZZER em 1907, que nominou o parasito de *C. muris*, em 1910. A família Cryptosporidiidae foi estabelecida em 1911 por LEGER e em 1912, TYZZER descreveu uma outra espécie do mesmo gênero, que parasitava as células intestinais de camundongos, denominando-a *C. parvum*.

Em 1929, TYZZER descreveu *Cryptosporidium* sp. em cecos de frangos e o indentificou como sendo *C. parvum*. A espécie foi mais tarde considerada como sendo sinónímia de *C. baileyi* (CURRENT et al., 1986). A partir dessa data, diversos trabalhos descreveram o parasitismo por *Cryptosporidium* sp. em várias espécies de mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes, porém na maioria das descrições iniciais tratava-se de esporocistos de *Sarcocystis* sp. Em diversas outras circunstâncias, foram nomeadas novas espécies de *Cryptosporidium*, com base unicamente no hospedeiro do qual o isolado foi obtido. Mais tarde, estas espécies foram consideradas inválidas, quando foi verificada a baixa especificidade do parasito ao hospedeiro. (XIAO et al., 2004a).

A patogenicidade do gênero foi relatada pela primeira vez por Slavin, em 1955, que atribuiu a *C. meleagridis* a mortalidade de perus jovens de uma criação comercial e em 1971 o primeiro caso de infecção de um bezerro foi descrito (PANCIERA et al., 1971).

Na década de 70, surgiu o interesse da comunidade médica, após os relatos da criptosporidiose em pacientes imunocompetentes e imunodeprimidos (MEISEL et al, 1976; NIME et al, 1976). Atualmente, a criptosporidiose é uma doença bem estudada e relatada, principalmente como causa de diarréia severa em pessoas imunocomprometidas, como ocorre em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência adquirida humana (HIV).

Apesar da reconhecida importância de *Cryptosporidium* como patógeno de vertebrados, ainda há muitas dúvidas sobre quais são as espécies, e dentro destas, quais os genótipos que representam maiores riscos para populações humanas e animais. É evidente a necessidade de estudos sobre patogenicidade, transmissão cruzada e potencial zoonótico do agente (O'DONOUGUE, 1995).

2.2 Morfologia

O gênero *Cryptosporidium* possui morfologia variável, de acordo com os estádios evolutivos. Há, ainda, ligeiras diferenças morfométricas, principalmente em relação ao tamanho dos oocistos, entre as diferentes espécies.

Todos os estádios evolutivos de *Cryptosporidium* sp. são microscópicos e considerados muito pequenos, quando comparados a outros esporozoários entéricos (O'DONOUGHUE, 1995).

A parede do oocisto possui uma camada interna e outra externa, como ocorre também em outros coccídios. Em uma das extremidades, o oocisto possui uma região de fragilidade que origina uma sutura e é através da abertura desta que os esporozoítas deixam o oocisto durante o desencistamento (REDUKER et al., 1985).

Cada oocisto possui quatro esporozoítas e a ausência de esporocisto é uma característica do gênero (O'DONOUGHUE, 1995).

Os estádios endógenos são estreitamente associados com a superfície luminal das células epiteliais do hospedeiro. Em cortes histológicos, o protozoário se apresenta como pequenos corpos basofilicos aparentemente aderidas à superfície das células, dando algumas vezes à borda das microvilosidades uma aparência granulada. Os estádios evolutivos são esféricos a elípticos, medindo de 2 a 6 μm de diâmetro. Pela microscopia eletrônica foi evidenciado que os estádios evolutivos são intracelulares, extracitoplasmáticos e contidos por um vacúolo parasitóforo (O'DONOUGHUE, 1995).

Os esporozoitas e merozoítas de *Cryptosporidium* são similares aos dos outros coccídios, possuindo as organelas características do filo. Desta maneira, estão presentes as roptrias, micronemas, grânulos densos, núcleo, ribossomos, microtúbulos e o anel apical. Porém, outras organelas estão ausentes como os anéis polares, mitocôndria, microporos e conóide (FAYER et al., 1997).

Esporozoitas e merozoítas nas células epiteliais são englobados pelas microvilosidades, formando-se um vacúolo parasitóforo. Ocorre a formação da organela de fixação ou alimentação por parte do parasito e da célula parasitada (FAYER et al., 1997). Acredita-se que esta organela facilite a absorção de nutrientes da célula hospedeira (O'DONOUGHUE, 1995).

Microgamontes são menos freqüentemente encontrados que outras formas evolutivas. Microgamontes imaturos assemelham-se a esquizontes, porém eles contêm núcleos pequenos e compactos. Os microgametas possuem forma alongada ($1,4 \times 0,5\mu\text{m}$ em *C. parvum*), com a extremidade anterior achata, sendo que há ausência de flagelos e mitocôndria (FAYER et al., 1997)

Macrogamontes de *C. parvum* medem aproximadamente 4- 6 μm e são esféricos a ovóides. Para a fertilização, os microgametas aderem-se, por intermédio do capuz apical, à célula que contém o macrogamonte, ocorrendo em seguida a inserção do núcleo com seus microtúbulos associados no macrogamonte (FAYER et al., 1997).

O macrogamonte fertilizado, ou zigoto, pode formar um oocisto de parede espessa ou fina. Aqueles zigotos que formarão oocistos de parede espessa possuem corpos de formação de parede do tipo I e II, similarmente a outros coccídios. Os zigotos que formarão oocistos de parede fina, não possuem estes corpos de formação de parede (FAYER et al., 1997).

2.3 Importância como Zoonose

Com o advento da imunodeficiência adquirida humana (AIDS) o estudo da criptosporidiose ganhou destaque. A possibilidade da transmissão a partir do contato com animais, água ou alimentos contaminados tem sido um campo vasto de estudos epidemiológicos.

A contaminação da água pode ocorrer com oocistos eliminados através das fezes de animais ou do homem. Os principais fatores que possibilitaram que *C. parvum* se tornasse o mais importante contaminante de água potável nos Estados Unidos da América (EUA), é a extrema resistência dos oocistos aos tratamentos convencionais de água (ROSE et al., 1997) e o rápido ciclo biológico resultando em grande quantidade de oocistos eliminados pelas fezes (O'DONOUGHUE, 1995).

Apesar do comprovado potencial zoonótico, oocistos isolados de casos humanos individuais e de casos ocorridos durante surtos indicaram que na maioria dos isolados tratava-se de *C. hominis*, evidenciando que a transmissão entre humanos, sem o envolvimento de animais, é um fator de alta importância na epidemiologia da doença (SULAIMAN et al., 1998).

Outras espécies de *Cryptosporidium* também podem infectar animais domésticos e o homem, sendo que a possibilidade de transmissão zoonótica depende da espécie do protozoário e da suscetibilidade do hospedeiro.

Em animais domésticos são encontrados *C. felis*, infectando principalmente gatos, *C. canis* infectando os cães (Morgan et al. 2000; Fayer et al., 2001); *C. parvum*, *C. andersoni* e *C. bovis*, infectando os ruminantes; *C. galli*, *C. baileyi* e *C. meleagridis* infectando aves domésticas e silvestres (RYAN at al., 2003). Porém, a maioria destas espécies já foi diagnosticada infectando outros hospedeiros, além dos mais comuns. Assim há diversos relatos sobre o parasitismo de *C. felis* em humanos (PIENIAZEK et al., 1999; XIAO et al., 2001; CAMA et al, 2003) e apesar desta espécie ter sido considerada de alta especificidade para gatos, ela também já foi encontrada infectando bovinos (BORNAY-LLINARES et al., 1999). Foi possível, experimentalmente, infectar gatos com *C. parvum* (FAYER, 1997; DARABUS; OLARIU, 2003).

Cães podem ser infectados experimentalmente com *C. parvum* (DARABUS; OLARIU, 2003). *Cryptosporidium canis* também já foi diagnosticado em alguns casos humanos (XIAO et al., 2001; CAMA et al., 2003), porém, na maioria dos estudos epidemiológicos, a infecção natural dos cães ocorre por *C. canis* (ABE et al., 2002).

Atualmente, a atenção dos pesquisadores tem se voltado sobre a capacidade de *C. meleagridis* infectar o homem, sendo que esta espécie é considerada a terceira espécie mais diagnosticada neste hospedeiro (COUPE et al, 2005; XIAO et al., 2001; XIAO et al., 2004c).

Apesar destes relatos de infecção humana por espécies de *Cryptosporidium* relacionadas ao parasitismo animal, as espécies mais freqüentemente encontradas são *C. hominis* e *C. parvum* (COUPE et al, 2005; PENG et al, 1997; XIAO et al., 2001; XIAO et al., 2004 a; XIAO et al., 2004 c).

Os estudos demonstraram que diversas espécies podem parasitar o homem, sendo que indivíduos com alguma disfunção imunológica são os mais suscetíveis, como ocorre com os portadores do HIV e em crianças, nas quais o sistema imunológico ainda não está totalmente desenvolvido (CAMA et al., 2003; XIAO et al., 2001; XIAO et al., 2004c).

2.4 Diagnóstico

Há diversos métodos de diagnóstico da criptosporidiose, desde métodos simples como o exame parasitológico de fezes à fresco, até métodos sofisticados como a reação em cadeia da polimerase (PCR). A metodologia a ser empregada depende das condições de infra-estrutura do laboratório e da especificidade do diagnóstico desejado. Se a finalidade é apenas determinar se há o parasitismo por *Cryptosporidium* sp., sem a identificação de espécie, então métodos de exame parasitológico de fezes rotineiros e colorações especiais de esfregaços de fezes podem ser o suficiente.

Para determinar qual é a espécie de *Cryptosporidium* envolvida, o uso da PCR torna-se imprescindível. Já, se o objetivo é determinar se o hospedeiro alguma vez foi exposto ao protozoário, então métodos sorológicos podem ser empregados. Os resultados destes irão indicar o contato do hospedeiro com o protozoário, porém não permitem a diferenciação entre uma infecção passada e já curada e uma infecção atual subclínica ou clínica.

A principal metodologia de diagnóstico utilizada na maioria dos laboratórios é a que permite a identificação da presença de oocistos do protozoário nas fezes, sem a determinação da espécie envolvida. Este fato deve-se a duas razões principais: a facilidade do procedimento laboratorial e o relativo baixo custo, quando comparado a metodologias mais elaboradas.

Para o diagnóstico através de exames de fezes, amostras recém emitidas podem ser coletadas e enviadas ao laboratório sem adição de conservantes ou preservantes ou o material

fecal pode ser preservado em formalina à 10% ou em solução aquosa de dicromato de potássio a 2,5%. Oocistos mantidos em dicromato de potássio à 2,5 %, mantém a infectividade durante vários meses e devem ser considerados como material de risco biológico. Para inativar os oocistos é recomendada a adição de formalina a 10%, sendo que o tempo de contato deve ser superior à 24 horas para neutralização dos oocistos (ARROWOOD, 1997).

A eliminação de oocistos, pelo hospedeiro, é intermitente em indivíduos sintomáticos e assintomáticos. Desta maneira, várias amostras de fezes devem ser analisadas antes de ser dado um diagnóstico preciso (CURRENT; GARCIA, 1991). Durante um surto de cryptosporidiose humana transmitida pela água, nos Estados Unidos da América, a análise de uma única amostra fecal foi capaz de identificar apenas 50% dos indivíduos infectados pelo *Cryptosporidium* (FAYER et al., 1997).

A concentração das fezes possui importância relevante para aumentar as chances de encontrar o protozoário. Podem ser utilizadas técnicas comuns de flutuação em solução saturada de açúcar, sal ou sulfato de zinco (ARROWOOD, 1997).

Quando forem utilizadas técnicas de sedimentação, deve ser considerado o baixo peso dos oocistos, que pode prejudicar a sedimentação em exames de rotina. Para a sedimentação de oocistos de *Cryptosporidium*, devem ser aumentados a rotação da centrífuga e o tempo de centrifugação. Uma rotação de 2000 – 2500 rpm por 10 minutos é necessária para garantir a sedimentação adequada dos oocistos (ARROWOOD, 1997), o que equivale a apoximadamente 402,48g.

Quando se utilizam técnicas de flutuação em solução de açúcar, os oocistos podem ser observados ligeiramente róseos, na microscopia de campo claro, são claros e birefringentes quando vistos em contraste de fase. Os oocistos encarquilham a partir de 15 minutos, quando estão em solução saturada de açúcar, perdendo sua forma esférica, assim como também, a sua coloração rósea (CURRENT; GARCIA, 1991).

A observação de estádios endógenos foi inicialmente realizada através da coloração de cortes histológicos de tecidos infectados, raspados da mucosa intestinal ou do conteúdo intestinal. Posteriormente, foi descoberto que os oocistos podiam ser evidenciados por métodos não invasivos, utilizando técnicas ou métodos de coloração em material fecal. Inicialmente utilizou-se o corante Giemsa, porém com este corante, não havia diferença entre os oocistos e outras estruturas fecais fato que dificulta o diagnóstico.

Em 1981, a técnica de coloração de Ziehl-Neelsen possibilitou aos laboratórios clínicos e de pesquisa um diagnóstico fácil e rápido da forma infectante, que são os oocistos eliminados nas fezes. Com esta técnica, os oocistos apresentavam-se corado de vermelho ou róseo, enquanto que outras estruturas fecais coraram-se de verde ou azul, de acordo com o corante utilizado para contra corar. O método de Ziehl-Neelsen foi modificado e melhorado durante os anos, e atualmente há vários protocolos de coloração, a frio e à quente, baseados no método original (ARROWOOD, 1997).

2.5 Diagnóstico Utilizando a Reação da Polimerase em Cadeia – PCR

2.5.1 Obtenção do DNA para a realização das análises - extração do DNA

Um dos desafios primordiais dos pesquisadores foi a obtenção do DNA a partir de oocistos de *Cryptosporidium*. As técnicas inicialmente utilizadas para a obtenção de DNA genômico de bactérias não se aplicavam ao *Cryptosporidium*, por este possuir um oocisto com uma parede extremamente resistente que não se rompe com facilidade. Portanto as técnicas de extração de DNA deste protozoário incluem sempre um passo de rompimento dos oocistos, seja por meios físicos, mecânicos, enzimáticos ou ainda a combinação destes.

Outros fatores que podem causar dificuldades no emprego da PCR para *Cryptosporidium* são a distribuição desigual de oocistos nas fezes, fazendo com que a alíquota utilizada no procedimento não contenha oocistos; falha na ruptura dos oocistos durante a extração, evitando assim a liberação do DNA para a análise; a adsorção do DNA por compostos presentes nas fezes e a presença de inibidores da PCR que também podem dificultar o emprego da técnica (SCORZA et al., 2003).

Os inibidores, principalmente compostos orgânicos, presentes em amostras complexas, tais como fezes e solos, podem diminuir a sensibilidade da PCR em até 1000 vezes (WARD; WANG, 2001). Para evitar o impacto negativo de tais substâncias, são previamente utilizadas técnicas de concentração e purificação dos oocistos, aumentando assim a sensibilidade da PCR. São diversas as técnicas descritas na literatura, indicadas para amostras fecais, sendo que, para amostras que não sofreram congelamento antes do processamento, podem ser utilizadas técnicas comuns de flutuação em solução saturada de açúcar, sal ou sulfato de zinco (ARROWOOD, 1997). Oocistos das amostras fecais podem ser concentrados pela técnica do álcool-éter seguido por gradiente de sacarose (COUPE et al., 2005) ou Percoll ou outras soluções hipertônicas (KUCZYNSKA; SHELTON, 1999).

O uso da formalina e do álcool polivinílico como conservantes ou preservantes pode inviabilizar a extração do DNA, uma vez que podem causar a degradação do mesmo (PIENIAZEK et al., 1999). Portanto, métodos como a concentração de oocistos pelo uso da formalina-éter devem ser evitados, sendo que nesta técnica a formalina pode ser substituída pela água destilada. Nichols et al (2006) relatam altas taxas de amplificação na PCR, utilizando uma concentração prévia dos oocistos contidos nas amostras fecais utilizando para esta metodologia a água e éter. Os autores relatam que fezes líquidas ou semi-sólidas apresentam maiores taxas de recuperação de oocistos do que fezes sólidas, sendo que a perda de oocistos no sobrenadante e no tampão gorduroso, varia entre 1 a 2 % dos oocistos nas amostras fecais líquidas e semi-sólidas, chegando a mais de 3 % em amostras fecais sólidas.

Em amostras fecais congeladas, ocorre o rompimento dos oocistos e consequentemente a liberação dos esporozoítas de *Cryptosporidium*, portanto nessas amostras não podem ser realizadas as etapas de purificação ou concentração usando soluções saturadas, uma vez que este procedimento causaria a perda e/ou degradação do material genético presente. Tornam-se assim necessários métodos de extração de DNA aplicáveis à amostra de fezes totais. Nestes casos pode ser usada a extração de DNA pelo fenol-clorofórmio, ou o uso de suspensão de sílica (Glassmilk) (WARD; WANG, 2001).

A purificação do DNA usando suspensão de sílica é baseada na adsorção seletiva de ácidos nucléicos às partículas de sílica, o que possibilita procedimentos de lavagem do complexo sílica-DNA para a remoção de proteínas e inibidores indesejáveis. O protocolo original foi proposto por Boom et al. (1990), sendo que a técnica pode ser aplicada tanto para a purificação de DNA quanto de RNA.

Colunas de centrifugação (spin colums) usam uma resina com microporos que permite que as moléculas grandes (como ácidos nucléicos) sejam eluídas primeiro, enquanto moléculas menores (proteínas e inibidores) ficam retidas (WARD; WANG, 2001).

A extração com o uso do fenol-clorofórmio desnatura as proteínas que subsequentemente formam uma camada entre as fases de água e resíduos orgânicos, sendo que o DNA fica retido na fase aquosa e a precipitação com álcool, geralmente empregada como etapa final das diversas técnicas, auxilia na remoção de resíduos orgânicos e concentra o DNA da solução aquosa (WARD; WANG, 2001).

Para a remoção de inibidores pode ser adicionado PVP no processo de extração (COUPE et al., 2005) ou mais tarde, na própria reação da PCR (NICHOLS et al., 2006).

Para promover a lise dos oocistos, as duas alternativas descritas a seguir estão entre as mais utilizadas, porém podem ser encontradas na literatura inúmeras combinações de técnicas,

inserção e/ou retirada de certos reagentes e alterações quantitativas no seu uso, de acordo com o protocolo seguido por cada laboratório.

A lise dos oocistos pode ser promovida por meios físicos, através de ciclos de congelamento e descongelamento usando-se nitrogênio líquido seguido de fervura do material contendo oocistos. A extração do DNA ocorre posteriormente em soluções com proteinase K e pelo fenol-clorofórmio (WARD; WANG, 2001; NICHOLS et al., 2006).

Os protocolos descritos variam consideravelmente quanto aos ciclos de congelamento-descongelamento necessários. Higgins et al (2001) sugerem que dois ciclos são o suficiente para promover o rompimento da maioria dos oocistos, enquanto que Nichols et al (2006) descrevem 15 ciclos, adicionando o uso do vórtex a cada cinco ciclos, para aumentar a eficácia do protocolo.

Uma alternativa é o uso de pérolas de vidro de 0,5 mm de diâmetro e uso do vórtex, para promover a lise dos oocistos e a liberação do DNA. Esta lise mecânica é realizada na presença de Tiocianato de Guanidina 10M, podendo ser usada a solução comercial (DNAzol ®) ou preparada no laboratório, que promove a diluição do DNA. O DNA fica retido na solução de Tiocianato de Guanidina, podendo ser precipitada pelo álcool 80% (McLAUCHLIN et al., 1999). Para inibir a formação de espuma durante o processo de extração com o uso do Tiocianato de Guanidina, o álcool isoamílico pode ser acrescentado ao processo (McLAUCHLIN et al., 1999).

2.5.2 Genes Utilizados Nas Análises

Considerando que a seqüência de DNA genômico codifica todas as informações hereditárias responsáveis para o desenvolvimento da patogênese, virulência, especificidade e resistência imunológica, um conhecimento do genoma de *C. parvum* poderá fornecer informações necessárias para uma pesquisa específica e de eficiente custo-benefício sobre a prevenção e tratamento da criptosporidiose (WIDMER et al., 2002).

Cryptosporidium parvum possui provavelmente oito cromossomos. Cada um com tamanho aproximado de 1,03 a 1,54 Mb, tendo um tamanho total do genoma de ~10,4Mb. Trata-se de um genoma Eucariota relativamente pequeno, tornando-o ideal para o seqüenciamento. Adicionalmente a grande maioria dos genes caracterizados não possui introns, o que aumenta a eficácia da caracterização de seqüências codificantes de genes de *C. parvum*. O genoma completo de *C. parvum* contém aproximadamente ~5000 genes (WIDMER et al., 2002).

Dentre esses genes, alguns são os alvos mais escolhidos para a realização da PCR, tais como o gene codificador da subunidade menor do RNA ribossomal (SSU rDNA ou SSU rRNA ou 18S rDNA ou 18Sr RNA), da proteína da parede do oocisto de *Cryptosporidium* (COWP), o gene codificador da glicoproteína 60kDa (GP60), o gene codificador para a proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP-70) e o gene codificador da Actina (XIAO; RYAN, 2004; XIAO et al., 2004 c).

Para a genotipagem de *Cryptosporidium*, especialmente para o diagnóstico de espécies, torna-se necessária a escolha de loci conservados, que possam ser utilizados como marcadores filogenéticos, tais como a sub-unidade menor do DNA ribossomal (SSU rDNA) e o locus da proteína do choque térmico 70-kDa (HSP-70). A determinação de subgenótipos, envolvendo a pesquisa de variação dentro de uma determinada espécie ou genótipo requer o uso de loci mais variáveis como o gene hiper-variável da glicoproteína 60-kDa (GP-60) e o uso de microsatélites (FERGUSON et al., 2006).

O gene SSU rDNA de *Cryptosporidium* evolui lentamente, com variações nas seqüências limitadas a diversas regiões do gene. Contrastando, os genes codificantes do HSP70 e Actina são altamente polimórficos em todo o comprimento dos genes e a diferença

entre as espécies gástricas e intestinais, quando estes genes são utilizados, é tão grande quanto a diferença entre os gêneros *Plasmodium* e *Cryptosporidium*. Assim os genes HSP-70 e Actina podem ser muito úteis na diferenciação de espécies de *Cryptosporidium* muito similares, devido à alta heterogeneidade das seqüências (XIAO et al., 2004 c).

O gene SSU rDNA é o mais amplamente caracterizado pelos pesquisadores, havendo grande número de seqüências, de espécies conhecidas de *Cryptosporidium*, depositadas nos bancos de dados públicos. O gene SSU rDNA possui uma região hipervariável localizada entre os nucleotídeos 615-850 e três regiões polimórficas entre os nucleotídeos 179-271 (COUPE et al., 2005). O gene possui ainda cinco cópias por genoma haplóide (CHALMERS, 2005; FERGUSON et al., 2006).

Técnicas associando a PCR do SSU rDNA gene e o uso de enzimas de restrição (RFLP), são capazes de identificar praticamente todas as espécies de *Cryptosporidium*. Também há primers para a PCR primário e o Nested, que amplificam todas as espécies do gênero, possibilitando o posterior seqüenciamento ou RFLP para a determinação das espécies (XIAO; RYAN, 2004).

O gene COWP possui alto grau de polimorfismo, o que gerou uma mistura de cinco ou seis conjuntos de primers para a detecção das variações inter-específicas, fazendo com que o gene possa ser utilizado na diferenciação entre *C. parvum*, *C. hominis* e *C. meleagridis* (AMAR et al., 2004). Em contraste ao 18S rDNA gene, o gene COWP possui apenas uma cópia no genoma inteiro, o que resulta em uma menor sensibilidade dos métodos que utilizam o gene COWP, em levantamentos epidemiológicos, quando comparado ao primeiro (MC LAUCHLIN et al., 1999).

Sua utilidade, como ferramenta para diagnóstico molecular só é interessante quando há grande quantidade de material do qual se deseja extrair DNA, grande número de amostras a serem testadas, e quando *C. parvum* e *C. hominis* são as espécies predominantes nas amostras, como ocorre em amostras clínicas humanas (FERGUSON et al., 2006).

Kato et al. (2003) descreveram uma técnica de Nested PCR e um par de primers para o gene COWP, que amplifica *C. parvum*, *C. hominis*, *C. wrairi* e *C. meleagridis*, sendo que as espécies podem ser diferenciadas pela RFLP. Os autores descrevem que o limite de detecção da técnica é de 100 oocistos por 1 ml de material fecal contendo ou ajustado para 50% de líquido, o que torna o procedimento menos sensível que o uso do SSU rDNA gene, que detecta um oocisto em 1 ml de material fecal.

O gene codificador das glicoproteínas presentes na superfície de esporozoítos gp 40 e gp15 (Cpgp 40/15), por ser um locus altamente variável, pode ser de alta utilidade na sub-genotipagem de diferentes isolados de *Cryptosporidium*, particularmente de *C. hominis*, onde podem ser identificados quatro sub-genótipos (COHEN et al., 2006; CEVALLOS et al., 2000; WINTER et al., 2000). Para aumentar a sensibilidade do diagnóstico utilizando o Cpgp 40/15, Cohen et al (2006), descreveram o uso de uma Nested PCR para este gene.

A Proteína adesiva relacionada à trombospondina (TRAP) é membro de uma classe de proteínas presente nos apicomplexas. A proteína está associada com a superfície celular e o complexo micronemal destes parasitos e acredita-se que esteja envolvida com o processo de aderência à superfície da célula hospedeira. Conseqüentemente, mudanças nesta proteína poderiam afetar a especificidade de aderência e, conseqüentemente, a especificidade quanto às espécies hospedeiras do parasito (PENG et al, 1997). O gene codificador da TRAP – C1 é utilizado na genotipagem das espécies de *Cryptosporidium*.

Muthsuamy et al (2006) realizaram a genotipagem de múltiplo locus de isolados de *Cryptosporidium* de humanos. A sensibilidade dos diferentes métodos foi de 100% para os exames de amplificação do gene codificador do SSU rRNA, 39,5% para o gene codificador do COWP, 44% para o gene codificador da proteína TRAP e 97,5% para o Cpgp 40/15 gene.

O espaçador de transcrição interna (ITS) de DNA nuclear ribossomal é um marcador eficiente para a identificação genotípica ou subgenotípica, possuindo grande variação dentro das espécies (GASSER et al., 2004). O seqüenciamento direto das regiões ITS é difícil ou impossível devido à variabilidade das seqüências (polimorfismo) no mesmo isolado de oocistos, e a PCR-RFLP não resolve acuradamente a variação apresentada. Apesar deste impedimento, a variação das seqüências internas ao ITS indica que esta região espaçadora ribosomal deve ser particularmente útil no estudo da estrutura genética de populações e para caracterizar a variabilidade genética inter e intra isolados (GASSER et al., 2003).

Alguns pesquisadores evidaram esforços para o desenvolvimento de primers específicos para *C. parvum* e outras espécies do gênero. O primer descrito por Laxer et al. (1991) foi um dos primeiros publicados. Originalmente foi desenvolvido para ser específico ao *C. parvum* e *C. hominis*, que na época ainda não era reconhecido como uma nova espécie, porém ele também amplifica *C. meleagridis* e *C. wrairi* (GUYOT et al., 2002).

Akiyoshi et al (2002) desenvolveram primers específicos para o diagnóstico de *C. parvum* e outro par de primers específicos para *C. hominis*. A aplicação destes primers é para possibilitar a identificação de infecções mistas, mesmo quando uma das espécies estiver presente em quantidade menor que a outra.

No quadro 1 estão relacionados alguns dos primers descritos na literatura e que são mencionados em vários trabalhos científicos.

Um protocolo de multiplex PCR, amplificando fragmentos de 18S rDNA com uso de vários primers específicos, desenvolvido por Patel et al (1999), permite a identificação *C. parvum*, *C. wrairi*, *C. baileyi* e *C. muris*, de acordo com o tamanho final dos amplicons obtidos, sendo que *C. parvum* e *C. wrairi* precisam ser diferenciados pelo uso de RFLP.

Atualmente os procedimentos da PCR visam a utilização de iniciadores específicos ao gênero *Cryptosporidium*, sendo que se torna necessária a realização de procedimentos complementares, tais como a digestão por enzimas ou o sequenciamento, para a identificação das espécies e genótipos.

Quadro 1: Alguns primers usados na caracterização dos genes SSu rRNA, HSP70 e actina, das várias espécies de *Cryptosporidium*.

Gene	Nome dos primers	Sequencia (5' a 3')	Tamanho do Amplicon (bp)	Uso	Referência
SSU rRNA	SSU-F1 SSU-R1	AACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTC TGATCCTCTGCAGGTTCACCTACG	~1,750	Amplifica o gene rRNA completo da maioria de organismos eucariotos	Xiao et al., 1999 apud Xiao et al, 2004
SSU rRNA	SSU-F2 SSU-R2	TTCTAGAGCTAATACATGCG CCCATTCTCGAAACAGGA	~1,325	Ambos os primers são específicos para <i>Cryptosporidium</i> e podem ser usados no nested PCR	Xiao et al., 2000 apud Xiao et al, 2004
	SSU-F3 SSU-R3	GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG AAGGAGTAAGGAACACCTCCA	~820		
SSU Nuclear rDNA	18 SiF 18SiR	AGT GAC AAG AAA TAA CAA TAC AGG CCT GCT TTA AGC ACT CTA ATT TTC	~300		Gasser et al., 2004
HSP70	HSP-F1 HSP-R1	ATGTCTGAAGGTCCAGCTATTGGTATTGA TTAGTCGACCTCTCAACAGTTGG	~2,010	Ambos os primers amplificam a maioria dos parasitos apicomplexas e são usados no nested PCR.	Sulaiman et al., 2000 apud Xiao et al, 2004
	HSP-F2 HSP-R2	TA/CTTCATG/CTGTTGGTGTATGGAGAAA CAACAGTTGGACCATTAGATCC	~1,950		
Actina	Act-F1 Act-R1	ATGA/GGA/TGAAGAAGA/TAA/GC/TA/TCAAGC AGAAG/ACAC/TTTCTGTGT/GACAAT	~1,095	Ambos os primers amplificam a maioria dos parasitos apicomplexas e são usados no nested PCR.	Sulaiman et al, 2002 apud Xiao et al, 2004
	Act-F2 Act-R2	CAAGCA/TTTG/AGTTGTGAT/CAA TTTCTGTGT/GACAATA/TG/CA/TTGG	~1,066		
Cpgp 40/15 Cpgp 40/15 para Nested	Nested	CCG TTA TAG TCT CCG CTG TA AAA GCA GAG GAA CCG GCA T ATG CAA AAA TAC GTG GAC TGG G TCG CAC GAA AGA TTT CCA TTG		Genotipagem subgenótipos	Wu et al., 2003
		TTA CTC TCC GTT ATA GTC TCC GCT G CGA ATA AGG CTG CAA AGA TTG C		Genotipagem subgenótipos	Cohen et al., 2006
DNA J-Like Protein ITS-2	Primer de Laxer	CCG AGT TTG ATC CAA AAA GTT ACG AA ATG AGT TAT TCC GTA TAC TCC TCG AT	452	Específico para <i>C. parvum</i> , <i>C. hominis</i> e <i>C. meleagridis</i>	Laxer et al. 1991
	YA56F YA54R	GGC GCT ACT TCA TAT AAT ATA ATG TTT TTT GGC GCT AAT TTT AAC TTA AAT TGG TTA AGA AA	~230	Genotipagem de subgenótipos	Gasser et al., 2004
COWP nested	COWP 1 COWP 2	GGA AGA GAT TGT GTT CG GCA GGA GCT ACA TAT AG	~422		Kato et al., 2003
	COWP 3 COWP 4	GTG TTC AAT CAG ACA CAG CTB TAT ATC CTG GTG GGC AGA	~312		
COWP TRAP C1 TRAP C1	BCOWPF BCOWPR	ACC GCT TCT CAA CAA CCA TCT TGT CCT C CGC ACC TGT TTC CCA CTC AAT GTA A	~769	Específico para <i>C. parvum</i>	Pedraza-Diaz, 2000
	TRAPC1F2 TRAPC1-Rc	TAA GGG TGG TGA TAA TGG CTG TA CCT TCT GAT AAA GTT GCA TTA TAC GAC C			C. Akiyoshi et al., 2002
	TRAPC1F1 TRAPC1-Rc	TAA AAG TGG TGA TAA CAF ATG CG CCT TCT GAT AAA GTT GCA TTA TAC GAC C		Específico para <i>C. hominis</i>	C. Akiyoshi et al., 2002

2.5.3 Técnicas de PCR

2.5.3.1 PCR simples e Nested PCR

Na década de 80 surgiu a técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR), descrita por Saiki et al. (1988), cuja capacidade de amplificação seletiva de genomas complexos está promovendo uma revolução na taxonomia e estudo dos seres vivos.

O princípio da técnica de PCR baseia-se na desnaturação de uma amostra de DNA de fita dupla através do aquecimento, em seguida a temperatura é diminuída para permitir que seqüências conhecidas de oligonucleotídeos, os iniciadores ou primers, realizem o anelamento nas seqüências complementares em fitas opostas do DNA molde (template); posteriormente ocorre a extensão ou síntese de DNA ao longo da fita molde, em ambas as direções, que é catalisada pela enzima termoestável DNA polimerase, obtendo-se duas fitas duplas de DNA. A síntese é usualmente repetida 20 a 40 vezes, utilizando-se um termociclador automatizado. Durante cada ciclo, o DNA molde é multiplicado por um fator dois, de forma que ao final do processo existem milhões de cópias do DNA molde disponível para análises subseqüentes (GASSER, 2006).

Esta técnica é particularmente importante no estudo dos parasitos, uma vez que freqüentemente é difícil obter material genético suficiente dos diferentes estádios evolutivos, para viabilizar a aplicação de análises mais antigas tais como a eletroforese de isoenzimas e immunoblotting, que requerem grandes quantidades de proteínas de boa qualidade (WIDMER et al., 2002; GASSER, 2006).

Ao longo dos anos surgiram diversas evoluções da técnica original, bem como diferentes métodos de tratamento para o processamento dos produtos obtido, afim de que possa ser realizada uma descrição acurada da espécie sob estudo.

As espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Cryptosporidium* também foram e estão sendo intensamente estudadas por intermédio das ferramentas que a biologia molecular oferece, sendo que podem ser processadas amostras fecais ou ambientais, com ou sem etapas de purificação anteriores às análises moleculares (WIDMER, 2002).

Segundo Morgan & Thompson (1998), as qualidades ideais de um teste de PCR para diagnóstico de *Cryptosporidium* seriam a aplicabilidade a amostras clínicas e ambientais; capacidade de processamento de 10-20 amostras em menos de uma hora; uma sensibilidade para detectar amostras com menos de 10 oocistos; resultados de interpretação rápida; ensaio robusto e altamente reproduzível; capacidade de diferenciar genótipos infectantes a uma grande variedade de hospedeiros incluindo humanos e ainda uma boa relação custo-benefício com possibilidades de quantificação dos oocistos.

Para poder alcançar estas características, vários protocolos foram desenvolvidos, incluindo-se o uso de diferentes métodos de extração do DNA molde bem como a análise de diferentes genes, de acordo com o poder discriminatório desejado.

Como algumas vezes a detecção do DNA por meio da PCR simples era considerado inviável, devido à baixa quantidade de DNA ou inibidores enzimáticos presentes na amostra, foi desenvolvida a técnica da Nested PCR para aumentar a especificidade e sensibilidade dos testes (MORGAN; THOMPSON, 1998). Esta técnica consiste em realizar uma amplificação primária da PCR simples, usando um par de primers específicos. Após, uma quantidade determinada do produto é utilizada como DNA molde numa nova PCR, utilizando-se geralmente um segundo par de primers específicos.

O uso da Nested PCR torna-se especialmente importante quando se necessita detectar poucos organismos específicos contidos numa microflora diversa, como ocorre na extração de DNA a partir de material fecal (AMAR et al., 2004). Porém, seu uso também aumenta os

riscos de contaminação, podendo estes ser controlados pela observação de protocolos preventivos padrões (MORGAN; THOMPSON, 1998).

Higgins et al (2001) descrevem que a PCR primária aplicada a amostras fecais congeladas, resulta em positividade quando nas amostras examinadas estão presentes mais de 200 oocistos de *Cryptosporidium*. Se na amostra houver um número menor de oocistos, então se torna necessária a realização da Nested-PCR.

A maioria das técnicas de biologia molecular, aplicada ao diagnóstico para *Cryptosporidium* inclui uma etapa final de seqüenciamento, para a identificação da espécie estudada. O seqüenciamento também é de fundamental importância, quando as demais técnicas deixarem dúvidas quanto à identificação correta da espécie envolvida. Sugere-se o seqüenciamento direto a partir dos produtos da PCR, em vez de clones, para evitar que artefatos sejam introduzidos na seqüência (XIAO; RYAN, 2004).

São aceitas 15 espécies de *Cryptosporidium* e mais de 30 genótipos já foram descritos, destas apenas algumas espécies apresentam potencial zoonótico como *C. felis*, *C. canis*, *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. hominis* e *C. parvum*. Sendo que *C. felis* e *C. hominis* também já foram diagnosticados em bovinos, contribuindo para uma maior contaminação ambiental (SMITH et al., 2005; XIAO et al., 2004 a).

Assim torna-se essencial a identificação correta das espécies, principalmente em amostras ambientais, tais como solo e água, para possibilitar uma estimativa do risco de infecção à população humana (FERGUSON et al., 2006).

Dificuldades podem surgir, quando são utilizadas amostras ambientais ou de fezes, para o diagnóstico de *Cryptosporidium* devido à presença de inibidores, que impedem a realização da reação da PCR.

Como forma de superar o efeito dos inibidores fecais foi sugerido o aumento da quantidade da enzima Taq DNA polimerase para 5U, a adição de Poli-Vinil-Pirrolidona (PVP) na reação da PCR e diminuição da quantidade do DNA molde (NICHOLS et al., 2006). Quando necessário também pode ser realizada a diluição do DNA genômico, o que dilui concomitantemente os inibidores, possibilitando a reação da PCR, apesar de refletir negativamente na sensibilidade do teste (WILDE et al., 1990).

Para identificar falsos negativos, devido à presença destes compostos, podem ser utilizados controles de amplificação interna, que co-amplificam com o alvo durante a reação da PCR. Na presença de inibidores, nem o controle interno, nem o alvo irão amplificar, assim uma amostra verdadeiramente negativa pode ser identificada se o controle interno foi amplificado e o alvo não (RAMIREZ et al., 2006).

2.5.3.2 PCR da Transcriptase Reversa (Reverse Transcription PCR)

Uma crítica à PCR convencional é que esta não diferencia entre oocistos de *Cryptosporidium* viáveis e inviáveis. Porém, esta informação é de grande importância para a estimativa do risco real ao qual a população humana está exposta, bem como à avaliação da eficácia dos sistemas de tratamento de água (HALLIER-SOULIER; GUILLOT, 2003; FERGUSON et al., 2006).

Como resposta ao problema foi desenvolvido um teste de PCR usando a detecção de mRNA pela PCR da Transcriptase Reversa (RT-PCR), baseado na informação de que organismos vivos utilizam a transcrição para formar mRNAs, os quais sofrem rápida degradação após a morte do organismo (MORGAN; THOMPSON, 1998).

Esta técnica pesquisa a quantidade de mRNA presente na amostra, podendo ser utilizado o mRNA produzido por diversos gêns.

Sob condições de estresse, o mRNA do heat shock protein 70 é um dos maiores produtos de síntese, ocorrendo um aumento de 1000 a 10.000 vezes de sua quantidade, assegurando uma quantidade suficiente para a detecção. Este fato é importante, pois o resultado positivo na PCR indica a ocorrência de oocistos viáveis na amostra. Têm sido sugeridos que a instabilidade e meia-vida curta do HSP-70 não permite a sua conservação em oocistos inviáveis (MORGAN; THOMPSON, 1998).

Os fatores que podem aumentar a síntese de mRNA do HSP-70 são o aquecimento a 42° C por 30 minutos e o congelamento inicial a -80° C com posterior descongelamento e incubação a 42° C (HALLIER-SOULIER; GUILLOT, 2003).

Outro estudo pesquisou o mRNA codificador da enzima amiloglucosidase como forma de testar a viabilidade de oocistos de *Cryptosporidium*. Os autores argumentaram que uma enzima com função metabólica seja um indicador melhor de viabilidade dos oocistos, do que a pesquisa de mRNA sem função metabólica direta, tal como o HSP-70. A enzima é responsável pela formação da amilopectina, fonte de energia dos esporozoítos, que está presente em quantidades ínfimas em oocistos inviáveis (JENKINS et al., 2000).

A PCR da transcriptase reversa possui sua aplicação sempre quando há necessidade de provar a presença de oocistos infectantes ou não. Desta forma ela pode ser utilizada em testes de métodos de desinfecção química ou física (HALLIER-SOULIER; GUILLOT, 2003; Jenkins et al., 2000), testes de drogas para o tratamento da criptosporidiose (CAI et al., 2005) e o diagnóstico de oocistos viáveis em amostras ambientais ou biofertilizantes (GARCES et al., 2006).

2.5.3.3 PCR de Tempo Real (Real time PCR)

A técnica da PCR de Tempo Real (Real time PCR) foi desenvolvida no início dos anos 90 e permite que a amplificação da PCR seja monitorada em tempo real. Todos os sistemas de PCR de Tempo Real atualmente existentes utilizam químicos fluorescentes para detectar a amplificação. A vantagem principal da PCR de Tempo Real sobre a PCR convencional é que ela permite a análise dos produtos em um formato de “tubo fechado”, não sendo necessária a manipulação após a amplificação. Assim a técnica pode ser utilizada para quantificação e pode diferenciar amplicons de diversas seqüências pela análise da curva de fusão (melting curve analysis) (GASSER, 2006).

De acordo com os gens amplificados e o tamanho final dos amplicons, a técnica da PCR de Tempo Real pode ser utilizada para quantificar oocistos e identificar as espécies presentes nas amostras (RAMIREZ et al., 2006). Também pode ser utilizada no diagnóstico específico de oocistos viáveis presentes nas amostras (CAI et al., 2005), onde se torna necessário a pesquisa de RNA, pela PCR da Transcriptase Reversa (RT-PCR).

Uma vantagem da PCR de Tempo Real é que ela pode diferenciar as espécies testadas, sem o uso adicional de RFLP ou seqüenciamento (RAMIREZ, et al., 2006), o que diminui o tempo necessário para o processamento das amostras.

A dificuldade no uso da PCR de Tempo Real é que produtos de amplificação inespecífica não são diferenciados dos produtos de amplificação desejados. Este fato torna a seleção cuidadosa dos primers essencial. Alternativamente o instrumento pode ser ajustado para monitorar a intensidade da fluorescência em temperaturas elevadas, nestas condições ocorre a desestabilização de produtos de PCR inespecíficos e de pequeno tamanho (ZARLENGA; HIGGINS, 2001).

Fontaine et al. (2003) descreveram uma técnica de PCR de Tempo Real usando o gene 18S rDNA. O procedimento desenvolvido é específico para *C. parvum*, *C. hominis* e *C. meleagridis*, não sendo capaz de diferenciar estas três espécies entre si. Outras espécies de *Cryptosporidium* não são detectadas pela técnica. Os autores argumentaram que o diagnóstico

das três principais espécies que ocorrem em humanos é de fundamental importância, principalmente em situações de surtos de criptosporidiose.

Amar et al. (2004) descrevem uma técnica de PCR de Tempo Real, associada a RFLP, para o diagnóstico de *Cryptosporidium*, utilizando a amplificação do gene COWP e de Nested-PCR. Na técnica proposta pelos autores a PCR primária é realizada em termociclador convencional, enquanto a Nested-PCR é processada em uma cicladora de luz para de PCR de Tempo Real com ‘hot start’. Neste procedimento não foi possível diferenciar as espécies de *Cryptosporidium* apenas baseando-se nos seus pontos de fusão. Assim houve a necessidade de RFLP dos produtos, com as enzimas *AluI* e *RsaI*, o que possibilitou a distinção de *C. hominis*, *C. parvum*, *C. wrairi*, *C. canis* e *C. baileyi*. As espécies *C. felis* e *C. meleagridis* possuem o mesmo padrão de restrição. O mesmo ocorre com as espécies *C. andersoni*, *C. muris* e *C. serpentis*, que não podem ser distinguidas entre si.

Já a técnica desenvolvida por Ramirez et al (2006), é capaz de diagnosticar as espécies *C. hominis*, *C. canis*, *C. felis* e *C. meleagridis* apenas usando a análise da curva de fusão. Os pontos de fusão possuem diferença de pelo menos 1º C entre as espécies estudadas. Os autores consideram que a alta especificidade do procedimento se deve ao pequeno tamanho do fragmento amplificado, de 272pb, o que diminui a temperatura de fusão e aumenta a sensibilidade do teste, quando comparado a outros protocolos que amplificam fragmentos maiores (820 pb).

No teste de eficácia de medicamentos anti-criptosporidiais, a PCR de Tempo Real têm se mostrado como ferramenta importante, por permitir uma PCR quantitativa (qPCR). Porém, os testes que quantificam o DNA parasitário, podem levar as falsas conclusões, por não distinguirem formas parasitárias viáveis das inviáveis, uma vez que o DNA se mantém estável na amostra. Para superar esta limitação, Cai et al (2005) desenvolveram um procedimento de PCR de Transcriptase Reversa de Tempo Real quantitativo (Real-Time Reverse Transcription-PCR), para detecção da quantidade de 18S RNA presente na amostra. Devido ao fato da rápida degradação do 18S RNA, em formas parasitárias inviáveis, a sua presença e quantificação indicam a atividade celular de formas viáveis de *Cryptosporidium*.

2.5.4 Técnicas de identificação de genótipos e subgenótipos - Fingerprinting

As técnicas de “Fingerprinting” são utilizadas para a detecção de variação genética ou a definição de marcadores genéticos de organismos vivos (GASSER, 2006).

Vários métodos, associados a PCR convencional, possibilitam o Fingerprint genético de uma amostra (ou indivíduo) de parasitos. Estes métodos se baseiam na busca no genoma por variações na seqüência e/ou organização sendo que os dados gerados para populações podem ser usados para investigar a diversidade genética e relações genéticas. A vantagem de algumas destas técnicas é que não são necessárias informações prévias de seqüências do genoma do parasito a ser analisado. A desvantagem pode ser que quando os organismos são analisados como “pool”, o fingerprint genético vai representar a população de organismos e não um indivíduo. Assim marcadores individuais podem não representar todos os indivíduos na população (GASSER, 2006).

2.5.4.1 Técnica do Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição – RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

A técnica do Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição – RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) é atualmente um dos métodos mais empregados para a determinação de espécies e genótipos de *Cryptosporidium*. A técnica se baseia na

reação de digestão dos produtos da PCR por enzimas específicas, denominadas enzimas de restrição ou endonucleases. Estas enzimas clivam o DNA em fragmentos de determinados tamanhos, cuja análise no gel de Agarose ou Poliacrilamida, resulta em diferentes padrões de tamanhos de fragmentos, de acordo com a espécie de *Cryptosporidium* examinada, possibilitando a identificação.

Apesar de ser uma técnica relativamente simples, sua aplicação é limitada por uma falha na resolução e por não diferenciar subgenótipos contidos em uma mesma espécie ou de genótipos de diferentes regiões geográficas (WIDMER et al., 2002).

A técnica também não é capaz de detectar infecções mistas, quando o genótipo minoritário representa menos de 25% do total de oocistos presentes na amostra. Foi observado que em infecções mistas experimentais conduzidas utilizando dois genótipos distintos, ocorre primeiro um pico de eliminação de um dos genótipos, seguido pelo pico de eliminação do segundo. Em outras instâncias, um dos genótipos tende a deslocar o outro, que não pode mais ser detectado, sendo que a infecção acaba sendo relacionada apenas ao genótipo predominante. Estes fatos ocorrem na infecção mista de *C. parvum* e *C. hominis* e naquelas em que são usados sub-genótipos distintos de *C. parvum* (WIDMER et al., 2002).

Diversos grupos trabalham para estabelecer protocolos de RFLP que possam ser utilizados no diagnóstico de *Cryptosporidium* em exames fecais ou amostras de água, podendo ainda ser utilizados em grande quantidade de amostras.

Xiao et al. (2004) padronizaram um protocolo que diferencia quase todas as espécies descritas de *Cryptosporidium*. A protocolo utiliza Nested PCR do gene SSU rRNA, e digestão dos produtos com as enzimas *SspI*, *VspI* e *Dde I*. A enzima *Dde I* diferencia *C. muris* de *C. andersoni*, enquanto as duas primeiras enzimas devem ser usadas em todas as amostras, para confirmar o diagnóstico, principalmente referente às espécies *C. parvum*, *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. canis* e *C. serpentis*, todas pertencentes ao antigo grupo reconhecido como *C. parvum*.

Ainda utilizando o gene 18S rDNA, Coupe et al. (2005), padronizaram uma RFLP-PCR, amplificando uma região polimórfica localizada na região entre os nucleotídeos 179-271 do gene. Os seguintes iniciadores foram desenvolvidos pelos pesquisadores para a PCR primária: SCL1 (5'-CTG GTT GAT CCT GCC AGT AG-3') e CPB-DIAGR (5'-TAA GGT GCT GAA GGA GTA AGG-3') e para a Nested PCR: SCL2 (5'-CAG TTA TAG TTT ACT TGA TAA TC-3') e (5'-CAA TAC CCT ACC GTC TAA AG-3'). Após a amplificação o produto da Nested-PCR deve ser digerido com a enzima *TaqI*, cujo resultado positivo identifica *C. hominis* e *C. parvum*, ambas podendo ser diferenciadas entre si pela enzima *Ase I*. Outras espécies de *Cryptosporidium* podem ser identificadas pelo uso seqüenciado ou concomitante das enzimas *MseI*, *BstUI*, e *SspI*.

Um teste de RFLP dos produtos de PCR gerados pelo uso do primer proposto por Laxer, demonstrou que com o procedimento diferencia as espécies *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. wrairi* e *C. hominis*. Considerando que o primer não é genérico, sua utilidade em amostras ambientais é restrita, devido ao estreito espectro de espécies que ele amplifica (GUYOT et al., 2002).

Spano et al. (1997) descreveram uma técnica de RFLP, que diferencia *C. wrairi* de *C. parvum* e *C. hominis*. Os pesquisadores utilizaram a PCR do gene COWP e digestão com a enzima *RsaI*. A capacidade de diferenciar *C. wrairi* de *C. parvum* é importante, pois são poucos os protocolos de RFLP-PCR que distinguem adequadamente estas duas espécies.

Pedraza-Díaz et al (2000), realizaram RFLP-PCR dos genes COWP e TRAP-1, encontrando um padrão de restrição não compatível com *C. parvum* nem *C. hominis*. Para a identificação da espécie, os autores tiveram que recorrer à amplificação de parte do gene 18S rRNA e subsequente seqüenciamento. Foi só então que os autores conseguiram diagnosticar *C. meleagridis* infectando humanos imunocompetentes. O trabalho evidencia as limitações da

RFLP-PCR do gene COWP, para diagnóstico de espécies distintas de *C. parvum* e *C. hominis*, com os primers utilizados e quando os padrões de restrição ainda não são conhecidos para todas as espécies.

Por ser uma técnica relativamente fácil de ser realizada, Chalmers et al., (2005), sugerem que RFLP-PCR do gene COWP seja utilizada para a avaliação de amostras clínicas de origem humana, pois predominam nestas as espécies *C. hominis* e *C. parvum*.

A RFLP-PCR possui suas limitações, pois o tamanho dos fragmentos pode ser similar entre as espécies de *Cryptosporidium*, de modo que um único teste pode não ser capaz de diferenciar as espécies. Por isso recomenda-se a digestão com mais de uma enzima e preferencialmente também a realização da genotipagem de múltiplos loci, para a confirmação do diagnóstico. Como consequência este procedimento pode aumentar os custos do diagnóstico.

Wu et al. (2003) descrevem a PCR-RFLP para o gene codificante de uma glicoproteína nomeado de Cpgp40/15, de *C. parvum*. Os autores desenvolveram os primers e realizaram a digestão dos produtos com as enzimas *AluI* e *RsaI*. A técnica identificou, além de *C. hominis* e *C. parvum*, quatro sub-genótipos de *C. hominis* e três subgenótipos de *C. parvum* (WU et al., 2003).

O protocolo foi aplicado com sucesso na genotipagem de isolados humanos de *Cryptosporidium*, por Muthusamy et al. (2006), possibilitando a identificação de *C. hominis*, *C. parvum*, *C. felis* e *C. meleagridis*, além dos subgenótipos de *C. hominis*. Cohen et al. (2006), utilizaram Nested-PCR seguido de RFLP deste mesmo gene para a genotipagem de oocistos de *Cryptosporidium* em águas na França. Os autores identificaram o genótipo Ib de *C. hominis* como sendo o principal responsável pelo surto de criptosporidiose investigado.

Para a RFLP-PCR do gene 18S rDNA e COWP existem relatos na literatura identificando todas as espécies válidas de *Cryptosporidium*, enquanto que os padrões de restrição do HSP-70, Poly-T e TRAP-C1 são relatados para poucas espécies ou genótipos (ABE et al., 2002).

Outro fator a ser considerado é que a aplicação de genotipagem de múltiplos loci para a identificação das fontes de infecção e vias de transmissão é altamente dependente devido ao fato dos genótipos se manterem estáveis ao longo do tempo. Num organismo clonal isto pode ser o caso, enquanto que num organismo em cujo ciclo as trocas genéticas possuem relevância, este genótipo não se manterá estável, uma vez que a recombinação irá deslocar o linkage entre alelos em diferentes loci (TIBAYRENC, 1998).

Assim pode ser que a realização do seqüenciamento direto seja a ferramenta adequada para a identificação acurada dos isolados de *Cryptosporidium* (ABE, et al., 2002).

2.5.4.2 Amplificação Randomizada do DNA Polimórfico - RAPD

A Amplificação Randomizada do DNA Polimórfico (Random Amplified Polymorphic DNA - RAPD) ou Arbitrarily primed-polimerase chain reaction (AP-PCR) é um dos métodos de fingerprinting. A técnica é baseada na amplificação de fragmentos de DNA, usando normalmente primers isolados de seqüências arbitrárias, e a subsequente separação dos amplicons pela eletroforese em gel de agarose. Apesar deste método possuir as vantagens de ser de fácil e rápida execução, o padrão de bandas do RAPD pode ser influenciado por vários fatores, tais como a qualidade do DNA, a especificidade do primer, concentração do template, co-migração de fragmentos não homólogos e/ou o uso de diferentes termocicladoras, resultando numa falha na reproduutibilidade (GASSER, 2006).

Os estudos indexados na base de pesquisa Pubmed, que utilizam RAPD para a investigação de *Cryptosporidium* spp. são relativamente poucos, totalizando quatorze, sendo

que o último trabalho original publicado, data do ano de 2002. Neste estudo a técnica foi utilizada para a identificação de um fragmento genético espécie-específico para *C. parvum*, possibilitando posteriormente o desenvolvimento de RAPD específico para esta espécie (TIAN et al., 2002).

Outra dificuldade é que, devido à baixa reprodutibilidade da técnica, os pesquisadores precisam realizar testes com vários primers, antes de efetuarem a escolha daqueles que serão usados nos estudo. Assim, Tian et al., (2001) testaram 200 primers para escolher os 26 utilizados enquanto que Shianna et al (1998) testaram 28 primers já descritos para *Cryptosporidium*, dos quais apenas quatro amplificaram as amostras analisadas, os outros ou falharam na amplificação, ou amplificaram amostras sem DNA específico ou não apresentaram reprodutibilidade em testes seriados.

A variação na formação de bandas pode tornar necessário alguns cuidados para garantir a reprodutibilidade dos resultados. Afim de não definir indevidamente novos genótipos, Morgan et. al (1999) realizaram análises de oocistos de *Cryptosporidium* de répteis, em triplicatas, considerando apenas as bandas que apareceram em todos os ensaios. Além do RAPD os pesquisadores utilizaram também da PCR do 18S rDNA gene e seqüenciamento.

Shianna et al (1998) utilizaram o RAPD para caracterizar 20 isolados de *Cryptosporidium*. Para a confirmação de que os oocistos que possuíam eram realmente de *C. parvum*, os autores realizaram uma primeira PCR usando o Primer proposto por Laxer, o qual até então era conhecido por ser espécie-específico. Os autores conseguiram, através de RAPD, identificar quatro genótipos distintos de *Cryptosporidium*, sendo um de origem humana e três de bovinos.

Como a validade das análises usando RAPD depende principalmente da pureza do DNA, métodos de purificação das amostras tornam-se essenciais para a reprodutibilidade da técnica. Assim podem ser usados procedimentos de purificação de oocistos e posterior esterilização pelo hipoclorito de sódio (DENG ; CLIVER 1998). Outra técnica de purificação descrita é a separação imunomagnética dos oocistos, seguido ou não do excistamento *in vitro*, possibilitando a obtenção de DNA de boa qualidade para a realização do RAPD (DEN ; CLIVER, 1998; DENG et al., 2000).

2.5.4.3 Polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados - AFLP

O método do Polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (Amplified fragment length polymorphism - AFLP) tem sido aplicado na investigação de plantas e animais, no diagnóstico de doenças, na ciência forense e na análise de parentesco. O método baseia-se na digestão do DNA genômico por um conjunto de duas enzimas de restrição. Em seguida é realizada a adição de adaptadores específicos que se ligam às terminações 3' e 5' do fragmento de restrição. Com o uso de primers que anelam à seqüência dos adaptadores, é realizada a amplificação do fragmento e, finalmente a análise do fragmento de restrição através da eletroforese (GASSER, 2006).

As vantagens do processo são que ele dispensa a existência de informações prévias sobre a seqüência, podendo ser aplicado ao DNA de qualquer origem, é realizado sob condições altamente restritivas e pode alcançar altos níveis de discriminação. A limitação é que a técnica é relativamente demorada para ser realizada, quando comparada a outras técnicas de fingerprinting. A existência de alto nível de variação e o número limitado de marcadores “homólogos” detectados pelo AFLP pode ser tornar um fator limitante (GASSER, 2006).

Um protocolo de AFLP, que diferencia *C. hominis* (na época do estudo ainda considerado como genótipo I de *C. parvum*) e *C. parvum*, foi descrito por Blears et al. (2000).

Para encontrar a combinação ideal de primers, os autores testaram 112 combinações de primers, encontrando nove pares adequados para a análise. A técnica aparentemente não é muito utilizada na pesquisa de *Cryptosporidium*, pois não foram encontrados outros trabalhos além do citado.

2.5.4.4 Uso de Micro e minisatélites

Outra técnica é o uso de satélites no DNA para a análise da estrutura genética e a população de parasitos (GASSER, 2006). São consideradas satélites seqüências repetitivas no genoma e microsatélites, quando as seqüências repetitivas são extremamente curtas de até três bases, minisatélites e macrosatélites, quando as seqüências repetidas são mais longas (FENG et al., 2000).

Microsatélites e macrosatélites têm sido descritos como abundantes no genoma de todos os Eucariotos. Estas seqüências consistem em repetições que tendem a curtas seqüências que são aleatoriamente dispersas pelo genoma. Geralmente não são transcritas e mantêm polimorfismo devido ao acúmulo de mutações. A variação no número de repetições permite aos alelos presentes num locus serem classificados pelo tamanho, em géis de eletroforese. Os satélites são caracterizados pela hiper-variabilidade alelica. O comprimento da repetição tem sido usado no estudo da estrutura genética de populações bem como na análise de linkage e mapeamento genético (GASSER, 2006).

Regiões não codificantes do genoma são mais sujeitas a mutações que seqüências de regiões codificantes para proteínas, devendo ter preferência sobre estas, por permitirem a identificação de subgenótipos. Em contraste com RAPD e AFLP, os fingerprints de microsatélites não são afetados por DNA exógeno, tornando a técnica mais adequada para a análise de amostras ambientais (FENG et al., 2000).

Até o ano de 2002, a espécie de *Cryptosporidium* que infectava homem e ruminantes de localização intestinal, era nomeado como *C. parvum*. Até esta data, a pesquisa de micro e minisatélites visavam definir o genótipo I, ou humano, atualmente denominado de *C. hominis* e o genótipo II ou bovino de *C. parvum* (WIDMER et al., 2004). A mesma técnica permitiu a posterior separação destes em duas espécies distintas, *C. parvum* e *C. hominis* (MORGAN-RYAN et al., 2002). O uso de micro e minisatélites também têm demonstrado importância no estudo populacional de *Cryptosporidium*.

Mallon et al (2003a) sugerem em seus estudos que *C. hominis* apresenta uma estrutura clonal, enquanto que *C. parvum* possui estrutura não clonal. Uma possível explicação para a estrutura clonal de *C. hominis* é que as infecções sejam adquiridas a partir de um ou de poucos oocistos, com expansão rápida e disseminação em populações locais, ficando assim pouca possibilidade de ocorrer recombinação genética com outros genótipos. Isso possibilita a formação de populações específicas em *C. hominis*, enquanto que em *C. parvum*, não foi observada a formação de populações específicas em um determinado espaço geográfico ou temporal (MALLON et al., 2003 b).

A maior diversidade genética, devido à ocorrência de recombinação genética na espécie *C. parvum*, foi evidenciada por Feng et al (2002). Os pesquisadores utilizaram cinco microsatélites para caracterizar dois subgenótipos iniciais de *C. parvum* e o subgenótipo resultante de recombinação genética ocorrida durante a infecção mista em camundongos GKO.

Mais recentemente a técnica foi utilizada para a identificação de genótipos distintos de *C. parvum* e sua aplicação na definição de subgenótipos específicos isolados de bovinos de várias propriedades. Tanriverdi et al (2006) utilizaram 16 marcadores de mini e microsatélites, sendo que foram encontrados genótipos específicos confinados a certas propriedades. Em contraste ao descrito por Mallon et al (2003b), os autores sugerem que

populações genéticas distintas podem emergir dentro de um grupo em relativamente pouco tempo. Isso pode explicar a freqüente detecção de genótipos específicos ao hospedeiro, com status taxonômico desconhecido, como ocorre em águas superficiais e a existência de genótipos geograficamente restritos de *C. hominis* no homem.

O uso de micro e minisatelites evidenciaram que *C. hominis* e *C. parvum* possuem um mesmo ancestral, tendo evoluído em espécies distintas recentemente, sugeriu-se ainda que a evolução diferencial dos micro e minisatelites de diferentes isolados podem estar ligadas à adaptação a diferentes hospedeiros (TANRIVERDI; WIDMER, 2006).

A técnica pode evidenciar a correlação entre as regiões geográficas de origem dos isolados e os respectivos genótipos existentes e ainda evidencia alterações ocorridas quando um determinado isolado de *Cryptosporidium* é passado de uma espécie hospedeira para outra, como exemplo, de bovinos para camundongos (FENG et al., 2000; TANRIVERDI et al., 2006).

No quadro 2 estão relacionados os micro e minisatélites pesquisados por Tanriverdi; Widmer (2006) e os respectivos primers.

Quadro 2: Primers de micro e minisatélites para o estudo populacional de *C. parvum* e *C. hominis* (TANRIVERDI; WIDMER, 2006).

Locus	Primers Forward e Reverse	Tamanho do amplicon	OBS:
MAS	TAGGCTCGGGTTCAGA GACTGTCACAAAAGTTAACCC	139-248	
MAS	TAGGTTCGGGTTCAGA GACTGTCACACAAGTTAACCC	139-248	Específico <i>C. hominis</i>
MSB	CTTTGATCGCTTCTTTCCA GGGAGGCATAGGGATGA	246-234	
MSC	AAATGGGTGTGGAGAAAAG TTAGATAAAAGATTGGTCTGTC	147-238	
MSE	CTTAGGTACAACGTAAACAGA AGCTTATTCCCTGATTGGAC	149-272	
MSF	TCGGCCTCCTCTACAG AGAAGAAAGCCAAGAAGGGT	124-200	
MSF	TCGGTCTCCTCGACAG AGAAGAAGGCCAAGAAGGGT	124-200	Específico <i>C. hominis</i>
MSG	TGGAATGATAATTGGACC GGAGTTTCTGAGACAC	179-334	
MSG	TGGGATGATAATTGGACC GGAGTTTCTGAGACAC	179-334	Específico <i>C. hominis</i>
MSI	TCCTTGATAAACCTGG AGTGACGCATCTCAAAC	168-240	
MSK	ATAGTTGACAGGATGAC AGAAGAAAGCCAAGAAGGGT	124-232	
MSK	ATAGTTTACAGGATGAC AGAACAAAGCCAAGAAGGGT	124-232	Específico <i>C. hominis</i>
MS5	CTTTCTCATCAACTTGCATG AGCGAGTGGAGGAGCT	192-324	
1887	ATGATTGAGAGGTAAGTTC GTTATTGATTTATACGA	150-194	
1887	ATGATTGAGAGGTAAGTTC GTCATTGATTTATACGA	150-194	Específico <i>C. hominis</i>
Cp492	TCATCTACCAGCACTAC ACCAATAGTGTATCTTACATC	227-251	
MS9	ACCTGGAGTGTGATTGG GTTCTGTTCAAAGTCA	110-248	
TP14	GTTCACAGCCAACAGT CATTTGATTTGGGAGT	179-223	
5B12	AGGAGGAGGAGAAAAATAG AATTCCCCATATTACTCTATTGT	134-155	

2.5.5.5 Polimorfismo da conformação de fitas únicas - SSCP

Existe uma ampla gama de técnicas que possibilitam a detecção de mutações, das quais o Polimorfismo da conformação de fitas únicas (Single-Strand Conformation Polymorphism – SSCP) é particularmente prática e de versátil aplicação. O princípio da SSCP é que a mobilidade eletroforética de uma molécula de DNA de fita simples em um gel de poliacrilamida não desnaturalante, depende da sua estrutura e tamanho. Moléculas de fita única assumem estruturas com conformações secundárias ou terciárias, quando em soluções, causadas pelo pareamento das bases entre nucleotídeos dentro de cada fita. Estas conformações são altamente dependentes da seqüência primária e do comprimento da molécula, sua localização e número de regiões onde ocorre o pareamento das bases. Assim, moléculas que possuem seqüências distintas, por exemplo, devido a uma única base, podem ser separados num gel de poliacrilamida não-desnaturalante, devido às diferenças na mobilidade das distintas conformações geradas. O método SSCP pode ser usado para evidenciar mutações pontuais de amplicons pequenos (200-300bp), porém a técnica pode ser usada também com amplicons de até 530pb (GASSER, 2006).

A técnica inicialmente descrita utilizava iniciadores de oligonucleotídeos radiomarcados para a etapa de amplificação pela PCR, sendo que os amplicons eram submetidos a eletroforese num anel de seqüenciamento convencional (Conventional sequencing ring) (GASSER et al., 2003). Apesar do método ser altamente eficiente, o uso de marcadores radioativos representa um risco potencial para a saúde dos pesquisadores, assim o mesmo grupo de pesquisa desenvolveu um método de SSCP ‘frio’, sem marcadores radioativos, para *Cryptosporidium* (GASSER et al., 2004).

A técnica proposta utiliza a SSCP para o gene SSU rDNA, com um amplicon esperado de ~300pb e a região ITS-2, com um amplicon esperado de ~230pb, sendo que o SSU rDNA identifica *Cryptosporidium* até ao nível de espécie, enquanto a mesma técnica utilizando a região ITS-2 discrimina sub-genótipos. Os pesquisadores identificaram 10 sub-genótipos para *C. hominis* e 13 sub-genótipos para *C. parvum* (GASSER et al., 2003).

O SSCP com os primers descritos por Gasser (2003), mostrou ter boa repetibilidade, podendo ser utilizado no rastreamento das fontes de infecção exatas (CHALMERS et al., 2005). Mas também pode ser utilizada preferencialmente quando grandes quantidades de amostras precisam ser analisadas, isso devido ao seu alto poder discriminatório e os custos relativamente baixos. A técnica possui a capacidade de identificar sub-genótipos, podendo ser usada para o fingerprint (FERGUSON et al., 2006). Porém ainda são necessários maiores estudos para padronização do SSCP para todas as espécies de *Cryptosporidium*.

Um gene codificante de uma glicoproteína, nomeado de Cpgp40/15 de *C. parvum*, possui variações suficientes para identificar ao menos cinco genótipos da espécie. Wu et al (2003) desenvolveram um primer para o gene de Cpgy40/15 e uma técnica que combina RFLP e SSCP, nesta técnica o DNA é primeiramente amplificada na PCR convencional, o produto é submetido à digestão enzimática e posteriormente os fragmentos de DNA são desnaturalados em solução própria, e aplicados no gel de Acrilamida. A técnica identificou quatro sub-genótipos de *C. hominis* e três sub-genótipos de *C. parvum*, mostrando-se adequada para o estudo de sub-populações (WU et al., 2003).

2.6 Estudo Filogênico

Atualmente o gênero *Cryptosporidium* possui 15 espécies consideradas como válidas, sendo elas: *C. andersoni*; *C. baileyi*; *C. bovis*; *C. canis*; *C. felis*; *C. galli*; *C. hominis*; *C. meleagridis*; *C. molnari*; *C. muris*; *C. parvum*; *C. saurophilum*; *C. serpentis*; *C. suis*; *C. wrairi*.

Algumas espécies apresentam como local de parasitismo o estômago, sendo estas: *C. serpentis*, *C. muris*, *C. galli* e *C. andersoni* e as demais são de localização parasitária intestinal. *Cryptosporidium baileyi* também é capaz de infectar o trato respiratório de aves.

Análises filogenéticas de *Cryptosporidium* spp. usando os loci do SSU rRNA, HSP-70 e actina, suportam a estrutura genética geral do gênero, com as espécies gástricas e as intestinais formando grupos monofiléticos distintos. Dentro de cada grupo as espécies que parasitam répteis formam os ramos basais e a maioria das espécies encontradas em mamíferos formam os ramos mais distantes (XIAO et al., 2004a).

A colocação de *C. baileyi* ainda é incerta, nas análises utilizando o SSU rRNA e actina, esta espécie se agrupa com os parasitos intestinais, já nas árvores construídas com o HSP-70, ela se agrupa com as espécies gástricas (XIAO et al., 2004 a).

De maneira geral as espécies gástricas de *Cryptosporidium* apresentam oocistos maiores que as espécies intestinais, existindo como única exceção *C. baileyi*, que também apresenta oocistos relativamente grandes. Possivelmente esta espécie tenha sido originalmente pertencente ao grupo gástrico, sofrendo adaptação intestinal recentemente, o que justificaria sua colocação ora num grupo, ora no outro, de acordo com os genes analisados.

A formação dos dois grupos principais, de espécies de *Cryptosporidium* gástricos e intestinais, parece ter ocorrido antes do surgimento de peixes e répteis, uma vez que em ambos os grupos de hospedeiros ocorrem os dois tipos de localização do protozoário (XIAO et al., 2004 a).

Hospedeiros geneticamente relacionados muitas vezes albergam espécies semelhantes de *Cryptosporidium*, sugerindo a co-evolução entre hospedeiro e parasito (XIAO et al., 2004 c). Duas espécies consideradas como exceções para a hipótese da co-evolução no gênero *Cryptosporidium* são *C. parvum* e *C. meleagridis* a primeira está geneticamente relacionado à espécie encontrada em camundongos, o Mouse Genotype, e forma um grupo monofilético com *C. hominis* e os genótipos de primatas e coelhos. Por outro lado, roedores, primatas e lagomorfos possuem um mesmo ancestral, que é diferente do ancestral dos ruminantes. Assim é possível que *C. parvum* tenha sido originalmente um parasito de roedores e que se estabeleceu apenas recentemente em ruminantes. Esta expansão de hospedeiros para a espécie *C. parvum*, pode justificar sua habilidade em parasitar diferentes hospedeiros mamíferos, incluindo os roedores (XIAO et al, 2004).

Cryptosporidium meleagridis é outra espécie que aparentemente está expandindo seus hospedeiros. Diferentemente de *C. baileyi* e *Cryptosporidium* spp. de patos e gansos, que sempre assumem posições basais no grupo intestinal nas análises filogenéticas, *C. meleagridis* sempre é colocado no clado contendo a maioria das espécies de *Cryptosporidium* que parasitam mamíferos (FAYER et al., 2005; XIAO et al., 2004a; XIAO et al., 2000). A espécie é geneticamente relacionada a *C. parvum*, *C. hominis*, *C. wrairi* e aos genótipos de macaco, coelho e camundongo. Assim *C. meleagridis* pode ter sido originalmente uma espécie parasitária de mamíferos que se estabeleceu em aves. Esta hipótese é fortalecida pelo diagnóstico da espécie em uma ampla variedade de mamíferos, incluindo o homem, roedores, suínos gnotobióticos e bezerros (XIAO et al, 2004).

A formação das espécies do gênero *Cryptosporidium* aparentemente é o resultado da adaptação do parasito a diferentes hospedeiros, porém diferentes espécies de *Cryptosporidium*

podem parasitar um mesmo hospedeiro, como ocorrem em *C. parvum*, *C. hominis*, *C. meleagridis* e *C. muris*, sugerindo que outros fatores podem levar à especiação (TANRIVERDI; WIDMER, 2006).

Cryptosporidium wrairi, *C. meleagridis*, *C. hominis* e *C. parvum*, juntamente com os genótipos de camundongos, furão e primatas, formam um clado único, evidenciando que se trata de espécies relacionadas (XIAO et al., 2000) e que podem ter surgido num mesmo ancestral.

Os bovinos possuem também seu próprio genótipo de *Cryptosporidium*, o antigo genótipo B, atualmente nomeado como espécie distinta, *C. bovis* (FAYER et al., 2005) e que se localiza num ramo distinto daquele que agrupa *C. parvum*, *C. meleagridis* e *C. wrairi*.

A figura 1 mostra a árvore filogenética publicada na revisão por XIAO et al. (2004), contendo as principais espécies e genótipos descritos de *Cryptosporidium*, utilizando a análise do gene SSU rRNA.

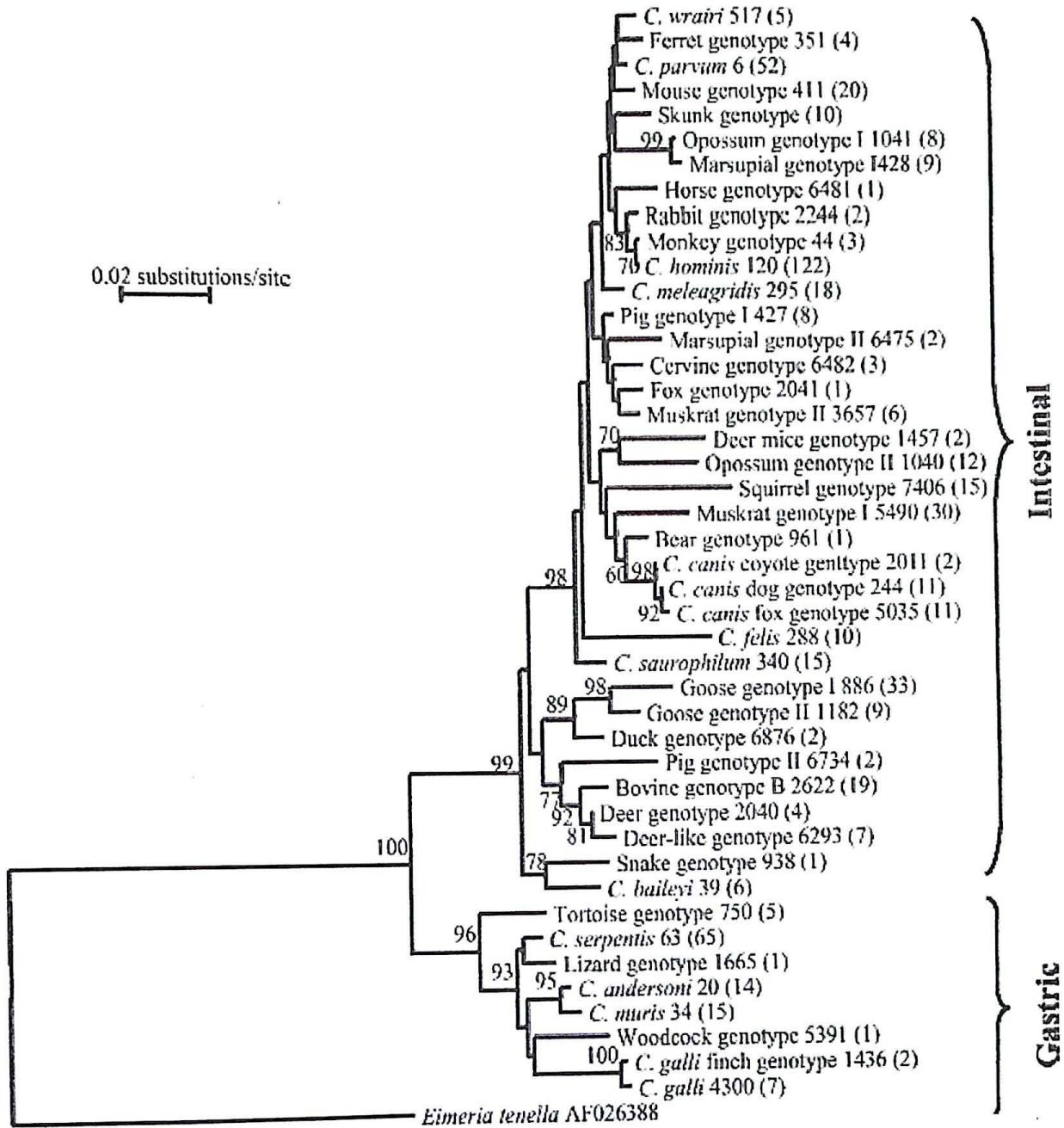


Figura 1: Relação filogenética entre as espécies e genótipos de *Cryptosporidium*, analisadas pelo Neighbor-Joining de seqüências parciais do SSUrRNA gene. Os valores nos ramos são pelas percentagens do Bootstrap, usando 1000 replicatas. Os números após os nomes das espécies ou genótipos são as identificações dos isolados usados na construção da árvore filogenética. Os números entre parênteses representam a quantidade de isolados seqüenciados (Xiao et al 2004).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Locais de Realização da Pesquisa

O diagnóstico inicial de *Cryptosporidium* em amostras fecais dos diferentes hospedeiros utilizados no trabalho foi realizado no Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. A manutenção de animais vivos foi realizada no biotério pertencente ao laboratório.

Os procedimentos de extração de DNA genômico, realização da PCR e RFLP foram realizados no laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

O seqüenciamento foi realizado no Laboratório do Projeto GENOMA do Centro Biomédico, localizado na Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

As seqüências consenso e análises filogenéticas foram realizadas no Laboratório de Genética e Bioquímica da Embrapa Agrobiologia, localizado em Seropédica, Estado do Rio de Janeiro.

3.2 Locais de Coleta das Amostras fecais e obtenção de oocistos para as análises

3.2.1 Mercado Municipal

Localizado no Município do Rio de Janeiro, sua estrutura física apresenta as laterais fechadas, abrigando cerca de 50 lojas, com grande diversidade de produtos. Neste mercado existem duas lojas de comercialização de animais vivos, como pintos, codornas, patos, e pequenos mamíferos (coelhos, cobaia e hamsters).

As lojas onde foram adquiridos os animais para esse estudo, localizavam-se no centro do mercado, ao lado de lojas destinadas à comercialização de carnes e verduras para consumo alimentar.

Os animais oferecidos para venda ficavam alojados em gaiolas com telas de arame, dispostas em prateleiras, com fundo removível para a limpeza. As espécies animais eram mantidas separadas, sendo duas gaiolas do topo utilizadas para canários e pombos, respectivamente. Nas três gaiolas logo abaixo eram alojados os pintos, patos e codornas e as duas gaiolas do fundo eram ocupadas por Galinhas de Angola e Porquinhos da Índia.

Devido ao empilhamento, muitas vezes observavam-se fezes de uma espécie de animal caídas em outras gaiolas, por não haver um isolamento adequado entre as mesmas. Além disso não havia uma separação que impedissem o contato direto do público que comumente transita nesse mercado, com os animais.

Para verificar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. nos animais comercializados, foram realizadas inicialmente coletas das fezes presentes nas gaiolas de exposição no próprio estabelecimento. As amostras fecais foram processadas conforme descrito abaixo.

Após 24 horas da primeira coleta, nos casos em que foram encontrados oocistos, retornou-se ao estabelecimento para a aquisição de animais possivelmente infectados, oriundos das gaiolas nas quais foram detectados oocistos. Após a aquisição, os animais foram acondicionados em gaiolas individuais, recebendo ração e água à vontade. Amostras fecais diárias foram coletadas e processadas conforme descrito. Para verificar a ocorrência de *Cryptosporidium* sp. nos animais comercializados, foram realizadas inicialmente coletas das fezes presentes nas gaiolas de exposição no próprio estabelecimento.

3.2.2 Abrigo para gatos

Foram coletadas 30 amostras fecais de gatos mantidos em um abrigo particular de animais no Município de Nova Iguaçu no Estado do Rio de Janeiro. Os gatos eram recolhidos da rua pela proprietária do abrigo, sendo ao total 80 gatos, alojados em dois gatis distintos, de piso de alvenaria e cercados com tela, recebendo água e ração específica à vontade.

As amostras fecais foram coletadas diretamente do chão, sendo recolhidas em sacos plásticos e identificadas. Apenas foram coletadas fezes recentemente eliminadas, para minimizar o risco da coleta repetida de amostras fecais de um mesmo animal.

Também foram coletadas amostras fecais de quatro cães filhotes que ficavam soltos na área livre do abrigo, sendo estes animais filhotes de uma cadela sem raça definida que fazia a guarda do terreno.

3.2.3 Fazenda de bovinos de leite

Amostras fecais de 56 bezerros foram coletadas diretamente da ampola retal de animais pertencentes a uma fazenda de gado de leite, localizada no Município do Rio de Janeiro. No manejo da fazenda, os bezerros são separados da mãe logo após o parto, recebendo colostro na mamadeira. Os animais examinados possuíram entre 1 a 14 dias de idade, sendo alimentados com substituto de leite (PURINA).

3.3 Processamento das amostras fecais

As amostras fecais, aos serem recebidas no Laboratório de Protozoologia da UFRRJ, foram identificadas individualmente com um número sequenciado de registro. Os dados referentes a cada amostra foram anotadas em um livro no qual foram registrados o número da amostra, a data da coleta, idade e sexo do animal (quando isto era possível), a origem da amostra e os resultados do exame parasitológico de fezes.

Após receber o número de registro as fezes foram homogeneizadas com água destilada e, logo após, filtradas em tamis de plástico descartável contendo uma gaze sobre o mesmo para reter ao máximo os resíduos grosseiros. Após esta filtragem, o material fecal foi colocado em dois tubos de ensaio cônico e centrifugado a 402,48g por 10 minutos. Posteriormente, foi desprezado o sobrenadante e um dos tubos foi gradado sob refrigeração, enquanto ao sedimento do segundo tubo foi adicionada solução saturada de açúcar com densidade específica de 1.30 g/ml, após homogeneização o material foi centrifugado a 402,48g por 5 minutos. O tubo foi completado com solução de açúcar e coberto com uma lamínula, ficando em repouso por 3 minutos. A lamínula foi montada sobre uma lâmina de vidro e examinada em microscópio óptico com contraste de fase. Nos casos em que foi diagnosticada a presença de *Cryptosporidium*, do sedimento contido no primeiro tubo, era realizada a extração de DNA e as análises subsequentes.

3.4 Extração do DNA total em amostras fecais

A extração de DNA foi feita a partir de 200 µl de suspensão de fezes semipurificados por centrífugo-sedimentação, sendo que foi utilizado um protocolo baseado nos propostos por McLauchlin et. al. (1999), Zhu et al (1998) e Boom et al (1990), com modificações. Resumidamente: a 200 µl de sedimento fecal, num tubo eppendorf de 1.5 ml, foram adicionados 500µl de DNAzol ® (Invitrogen), 0,5% (concentração final) de solução de polivinilpirrolidona (PVP, Sigma) e aproximadamente 0.2g de pérolas de vidro com 425-600µm de diâmetro (Sigma). Os microtubos foram agitados três vezes em vórtex, e após,

incubados a 96° C por 60 minutos. Foram posteriormente centrifugados, sendo o sobrenadante aspirado e depositado em outro tubo eppendorf, precipitado com 1000µl de etanol absoluto e centrifugado. O sobrenadante foi desprezado e o pellet lavado com 500µl etanol 95% por duas vezes. O sobrenadante da última lavagem foi desprezado e o pellet foi resuspensão com 500µl de DNAzol, centrifugado e o sobrenadante transferido para novo tubo. O DNA foi precipitado com etanol absoluto e a lavagem foi repetida, sendo o pellet resultante resuspensão em 100 µl de tampão Tris-EDTA (TE). Os microtubos contendo o DNA foram mantidos a – 20° C até serem utilizados.

3.5 Realização do PCR primária e nested

Para a PCR primário (tamanho esperado do amplicon: 1.325pb) foram utilizados os primers: 18 SF: 5'- TTCTAGAGCTAATACATGCG-3' (Forward) e 18 SR: 5'- CCCATTCC TTCGAAACAGGA-3' (Reverse). Para o nested PCR (tamanho esperado do amplicon: 819 a 825pb, dependendo da espécie) foram utilizados os primers 18 SNF: 5'- GGAAGGGTTGTATTAGATAAAG-3' (Forward) e 18 SNR 5'- AAGG AGTAAGGAACAAACCTCCA-3' (Reverse)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada num volume final de 50µl, onde se usou na reação primária 4mM de MgCl₂, 0,2µM de cada primer (18 SF e 18SR), tampão da Taq 1x, 200 µM de cada desoxirribonucleotídeo, 2,5U de Taq DNA Polimerase (Cenbiot ®), 2 µl de DNA da amostra e água milliQ até completar o volume de 50 µl.

As condições para a realização do Nested PCR foram idênticas às do primário, exceto pelo uso do outro par de primers e de 3 mM de MgCl₂.

As concentrações de MgCl₂ foram determinadas através de teste prévio das seguintes concentrações: 6mM, 4mM, 3mM e 2mM, encontrando-se os valores ideais de 4mM na PCR primária e 3mM na PCR secundária, quando utilizada a Taq DNA Polimerase da Cenbiot ®.

Os ciclos, para ambos os procedimentos foram: 30 ciclos de 94° C/1 min, 65° C/1min, 72° C/1 min. Ao final do programa foi realizada uma etapa adicional de extensão de 72° C/ 10 min.

3.6 Digestão dos Produtos do Nested PCR com Enzimas de Restrição

Para a identificação das espécies de *Cryptosporidium* foi realizada a digestão dos produtos do nested PCR com a enzima *SspI* (Invitrogen), segundo as recomendações do fabricante, exceto que foram utilizadas 4U de enzima para cada reação. Para um diagnóstico acurado de *C. meleagridis*, foi realizado também a digestão com a enzima *VspI* (Invitrogen), usando igualmente 4 U da enzima para cada reação.

Após a realização da digestão foi feito uma eletroforese em gel de agarose a 3% para a visualização, análise e fotografia dos produtos. O marcador de peso molecular utilizado foi o 1Kb plus DNA ladder, Invitrogen ®.

3.7 Seqüenciamento e Análise Filogenética

Os produtos da nested PCR foram submetidos à purificação utilizando Polietilenoglycol (PEG) a 22% (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e posteriormente seqüenciados utilizando-se o kit de seqüenciamento DYEnamic ET Dye Terminator Kit, compatível para a plataforma MEGA BACE, segundo o protocolo fornecido pelo fabricante.

As seqüências obtidas foram submetidas a uma busca no BLAST para determinar suas identidades e encontrar homologias e similaridades às seqüências depositadas de cada grupo de *Cryptosporidium* no GenBank. As seqüências foram alinhadas utilizando-se CLUSTAL W

(HIGGINS et al., 1994) e ajustes manuais. As análises filogenéticas foram conduzidas utilizando-se o software MEGA versão 3.1 (Kumar et al., 2004). Como teste filogenético foi realizado bootstrap com 1000 réplicas, das quais foi construída uma árvore consenso pelo método Neighbor joining, utilizando-se o logaritmo Kimura 2 Parâmetro.

Também foi realizada a análise filogenética pelo método da Maximum parcimony, com 1000 bootstrap. Para a construção de árvore filogenética pelo método da Maximum Likelyhood, foi utilizado o programa computacional dnaML do conjunto de programas PHYLIP (FELSENSTEIN, 1993), igualmente com teste filogenético de 1000 Bootstrap.

As seqüências obtidas no presente trabalho foram depositadas no GenBank, utilizando-se o programa computacional SeqIn, disponibilizado pelo GenBank.

Nas análises filogenéticas comparativas entre as seqüências consenso obtidas no presente estudo, foram utilizadas as seguintes seqüências depositadas no GenBank: *C. meleagridis*: AF112574, AF329187, AF404821; *C. parvum* ferret: AF112572; *C. parvum* mouse genotype AF112571; *C. suis*: AF 115377 e AF 108861; *C. wrairi*: AY115378; *C. parvum* DQ067566, AF164102, AF093490; *C. hominis*: DQ286403, AF093489, AF108865, AJ849464; *C. parvum* rabbit genotype: AY112573; *C. saurophylum*: AF112573; *C. felis*: AF159113, AF108862, AF112575; *Cryptosporidium* sp. isolate N: AF262332; *C. canis*: AY120909, AJ493209, AF112576, AB210854; *Cryptosporidium* sp. Deer genotype: AY120910; *C. bovis*: AY120911, AY731305; *C. baileyi*: AF093495, AY954884; AF262324; *C. serpentis*: AF093502; *C. galli*: AY168847; *C. muris*: AF093498; *C. andersoni*: AB089285 e *Eimeria tenella*: AF026388 como grupo externo.

4 RESULTADOS

4.1 Mercado Municipal

Durante a avaliação inicial foi realizado o exame de amostras fecais coletivas, coletadas das gaiolas contendo pintos, patos, codornas, galinhas da Angola, canários e porquinhos da índia. Oocistos de *Cryptosporidium* foram encontradas nas fezes de pintos, patos, codornas e dos Porquinhos da Índia, sendo que foram adquiridos posteriormente, quatro patos, três pintos, três codornas e dois Porquinhos da Índia.

Das três codornas adquiridas, duas já estavam eliminando oocistos de *Cryptosporidium* sp. nas fezes, mantendo a eliminação durante três dias consecutivos. Após 10 dias, sem a presença de oocistos nas fezes, estes começaram a serem encontrados novamente, sendo que foram eliminados apenas poucos oocistos durante dois dias. Posteriormente não houve novos episódios de eliminação até o 21º dia, quando o acompanhamento coproparasitológico das codornas foi encerrado.

A terceira codorna começou a eliminar oocistos no segundo dia de observação, mantendo o período patente até o 14º dia, totalizando um período patente de 12 dias, com um pico de eliminação no sexto dia após o início do período patente.

Um pato começou a eliminar oocistos de *Cryptosporidium* sp. no 3º dia de observação, tendo um aumento lento e gradativo das quantidades de oocistos nas fezes, sendo que o pico de eliminação foi observado no 14º e 15º dias, posteriormente houve uma redução gradual dos oocistos eliminados até o 29º dia de observação. O período patente totalizou 26 dias. Após cinco dias, houve um retorno de eliminação de oocistos, durante um único dia, com a presença de poucos oocistos nas fezes. Posteriormente o pato não voltou a eliminar oocistos nas fezes. Após 35 dias, o acompanhamento coproparasitológico do pato foi encerrado. Dos outros quatro patos não foi realizado o acompanhamento do período patente.

Os três pintos começaram a eliminar oocistos nas fezes no terceiro dia de observação e mantiveram o período patente por 16 dias. Ocorreram dois picos de eliminação mais intensa de oocistos, sendo o primeiro no dia 3, após o início da eliminação, e o segundo nos dias 9 e 10, após o início da eliminação.

Os dos dois Porquinhos da Índia chegaram ao laboratório, sem a eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* sp. nas fezes. Após oito dias, o primeiro animal começou a apresentar oocistos nas fezes, mantendo um período patente de 23 dias. O segundo animal começou a eliminar oocistos após 25 dias de acompanhamento, apresentando período patente de 12 dias. Em ambos os casos eram poucos os oocistos eliminados, sendo que por este motivo não foi evidenciado um pico de maior eliminação de oocistos.

Para a realização da RFLP-PCR foram selecionadas uma amostra de cada pato, uma amostra de codorna, uma de pinto e uma de cada Porquinho da Índia.

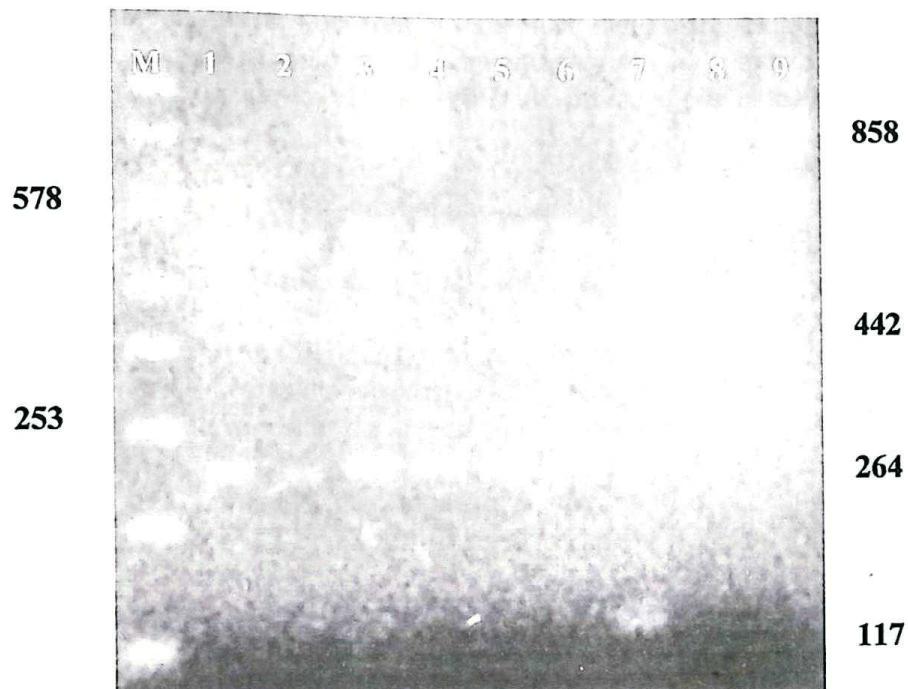
A digestão com a enzima *SspI* mostrou padrão compatível com *C. baileyi*, infectando os patos e a codorna, ou seja, apresentando duas bandas de peso aproximado de 253pb e 578 pb. No pinto o padrão de corte foi compatível com *C. meleagridis*, apresentando fragmentos de 117pb, 264pb e 442pb. Usando a enzima *VspI* os fragmentos obtidos (468pb, 186pb e 168pb) foram compatíveis com a espécie descrita.

A amostra oriunda dos Porquinhos da Índia não sofreu digestão pela *SspI* e a digestão pela *VspI* obteve fragmentos de aproximadamente 689pb e 110pb.

Os padrões de corte foram comparados com aqueles estabelecidos por Xiao et al (2004 b).

O resultado da RFLP pode ser visualizado na Figura 2, para a enzima *SspI* e na Figura 5 para a enzima *VspI*.

Figura 2: Produtos da RFLP-PCR de amostras fecais contendo oocistos de *Cryptosporidium* sp. Colunas 1 a 5: produto da digestão SspI de *C. baileyi* de patos. Coluna 6: produto de digestão de *C. baileyi* de codorna, Coluna 7: produto de digestão de *C. meleagridis* isolado de pinto. Colunas 8 e 9: produto não digerido de *Cryptosporidium* sp. de Porquinhos da índia. Os pesos moleculares indicados são valores aproximados, admitindo uma variação de 3% para mais ou para menos. M: Marcador de peso Molecular



4.2 Abrigo de gatos

Das 30 amostras fecais de gatos, nove amostras continham oocistos de *Cryptosporidium* sp. (30,00%). Todas as amostras continham ovos ou oocistos de ao menos uma espécie de parasito. Foram encontrados ovos de *Toxocara* sp. em 26 amostras (86,66%), *Ancylostoma* sp. em 14 amostras (46,66%), *Platynossomum* em seis amostras (20,00%), *Dipylidium caninum* em quatro (13,33%), *Cystoisospora* em quatro (13,33%), *Sarcocystis* sp. em uma amostra (3,33%) *Giardia* sp. em 18 (60,00%) amostras.

Parasitismo simples ocorreu em apenas três amostras (10,00%), parasitismo duplo em 10 amostras (33,33%), triplo em 12 amostras (40,00%), parasitismo por quatro diferentes espécies de parasitos em dois casos (6,66%) e infecção por cinco diferentes espécies em três amostras (10,00%).

Das quatro amostras fecais de cães apenas uma (25,00%) continha oocistos de *Cryptosporidium* sp. e todas continham cistos de *Giardia* sp., ovos de *Toxocara* sp e de *Ancylostoma* sp., sendo que ovos de *Trichuris* sp. foram encontrados em uma amostra.

Das nove amostras de gatos, contendo oocistos de *Cryptosporidium* sp., seis apresentavam mais de quatro oocistos observados na técnica de centrífugo-flutuação. Estas seis amostras e a amostra de cão foram submetidas às técnicas de Biologia Molecular para a determinação das espécies de *Cryptosporidium* envolvidas no parasitismo.

O padrão de digestão da amostra proveniente do cão mostrou-se compatível com *C. canis* (fragmentos de peso aproximado: 447pb, 275pb e 110pb) enquanto que o padrão de digestão de três amostras de gatos foi compatível com *C. felis* (fragmentos de peso aproximado: 447pb e 418pb), conforme descrito por Xiao et al. (2004 b).

As outras três amostras dos gatos não amplificaram, mesmo após diversas tentativas e modificações no protocolo.

A fotografia do gel de agarose pode ser vista na Figura 3.

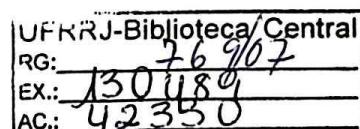
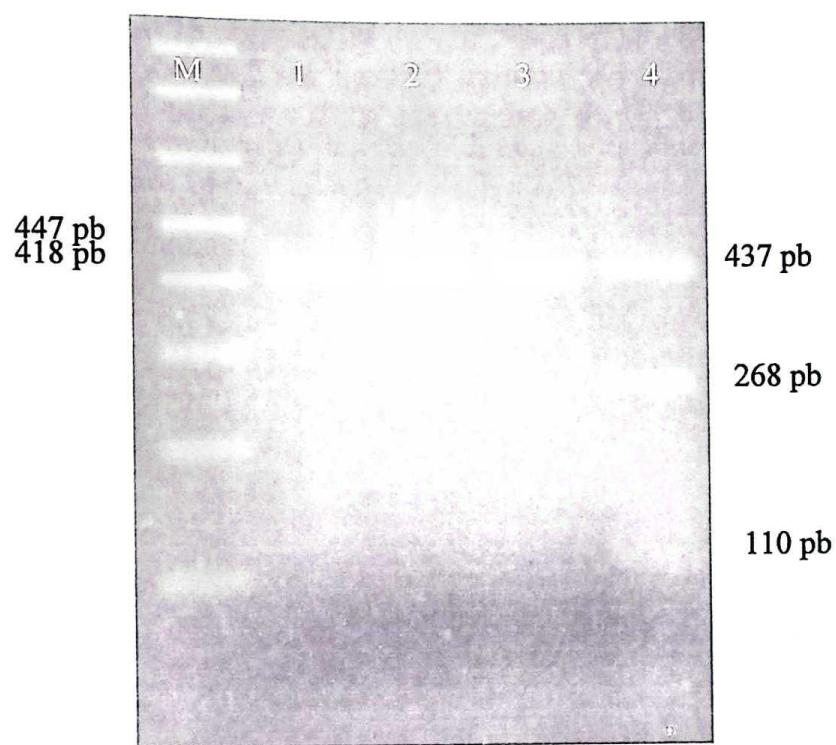


Figura 3: Produtos da RFLP-PCR de amostras fecais de gatos e de um cão, contendo oocistos de *Cryptosporidium* spp., provenientes de um abrigo. Colunas 1, 2 e 3: produtos da digestão de *C. felis* isolados de gatos. Coluna 4: produto da digestão de *C. canis*, isolado de cão. Os Pesos moleculares apresentados são aproximados, podendo variar em 3% para mais ou para menos. M: Marcador de peso molecular



4.3 Bovinos leiteiros

Das 56 amostras de fezes de bovinos, 10 continham oocistos de *Cryptosporidium*, destas três amostras foram selecionadas para serem submetidas ao PCR, devido à alta quantidade de oocistos de *Cryptosporidium* sp. presente e a ausência de outros parasitos.

A técnica da RFLP do produto da amplificação do gene 18S rDNA usando a enzima *SspI* mostrou um padrão de corte compatível com o descrito para *C. parvum* tendo fragmentos com peso aproximado de 461pb, 260pb e 110pb. Foi realizada uma segunda digestão com a enzima *VspI*, que também mostrou padrão de corte compatível com esta espécie, apresentando fragmentos de peso aproximado de 689pb e 112pb.

Na figura 4 poder ser visualizado o resultado da digestão enzimática utilizando a enzima *SspI* e na figura 5 para a enzima *VspI*.

Figura 4: Produtos da RFLP-PCR de amostras fecais contendo oocistos de *Cryptosporidium* spp., de bezerros de uma fazenda de exploração leiteira. Colunas 1, 2 e 3: produtos da digestão de *C. parvum*. Os Pesos moleculares apresentados são aproximados, podendo variar em 3% para mais ou para menos. M: Marcador de peso molecular

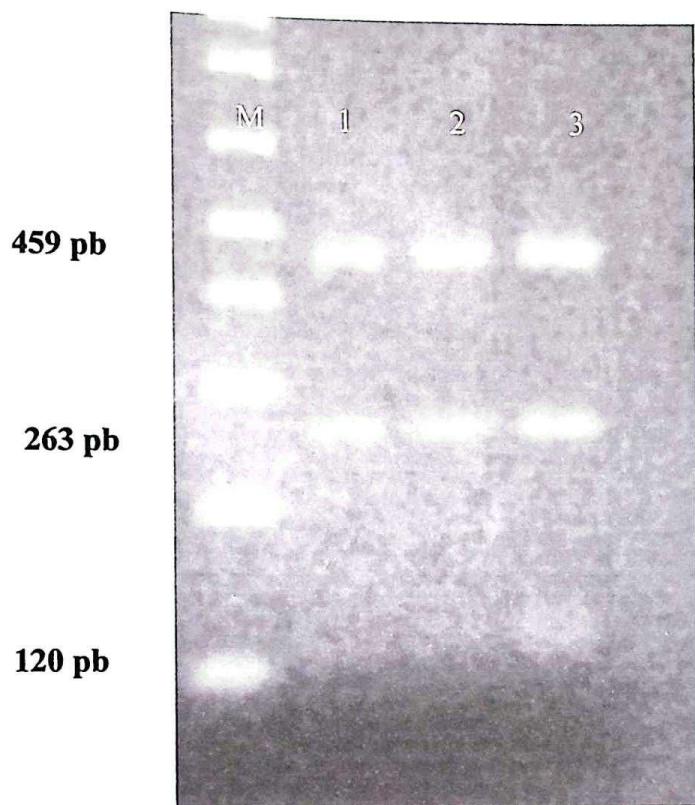
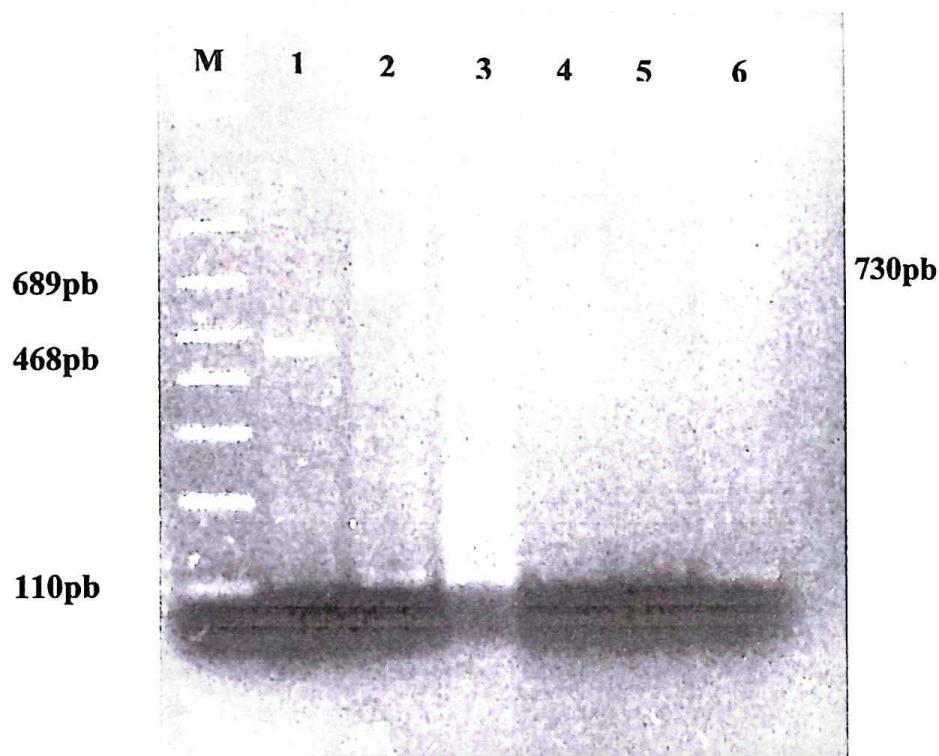


Figura 5: Resultado da digestão de *Cryptosporidium* spp. com a enzima *VspI*. Coluna 1: produto de digestão de *C. meleagridis* isolado de pinto. Colunas 2 e 3: produto de *Cryptosporidium* sp. de Porquinhos da Índia. Coluna 4: produto da digestão de *C. canis* de cão. Colunas 5 e 6: produto de *C. parvum* de bovinos. Os pesos moleculares indicados são valores aproximados, admitindo uma variação de 3% para mais ou para menos. M: Marcador de peso molecular



4.4 Seqüências obtidas e identificação de sítios de corte enzimático

As amostras seqüenciadas resultantes deste trabalho, foram depositadas no GenBank, recebendo os números de acesso descritos abaixo, seguidos pelo tamanho do fragmento.

As duas amostras seqüenciadas de *C. baileyi* oriundas de patos, receberam os números de acesso: DQ885339 com tamanho de 694pb e DQ885340 com 684pb.

A amostra de *C. baileyi* da codorna recebeu o número de acesso DQ885335, possuindo tamanho de 657pb e a seqüência de *C. meleagridis* encontrada parasitando o pinto foi depositado sob número DQ885341, medindo 672pb.

As seqüências dos Porquinhos da Índia receberam os números de acesso DQ885337 possuindo 673pb e DQ885338 com 676pb, sendo que ambas as seqüências não puderam ser identificadas como espécie conhecida de *Cryptosporidium*, pois na busca pelo BLAST elas alinharam principalmente com seqüências de *Cryptosporidium* sp. obtidas de amostras ambientais, sem hospedeiros identificados. Assim sendo, a seqüência com o número de acesso AF262332 foi a única, que em toda sua extenção alinha-se com a seqüência do presente estudo. Trata-se de uma amostra ambiental (isolado N) de *Cryptosporidium* sp. isolado das águas de um lago após um evento de tempestade. A similaridade entre as duas seqüências é de 93%. As demais seqüências identificadas na busca do BLAST, alinharam, formando dois fragmentos e uma grande lacuna intermediária, o que torna a busca pela similaridade impossível.

Devido à grande distância genética entre as seqüências de *Cryptosporidium* sp. de Porquinho da Índia, do presente estudo, e seqüências de espécies conhecidas de *Cryptosporidium* depositadas no GenBank sugerimos que se trate de um genótipo ou espécie nova.

Apenas duas amostras de gatos continham DNA suficiente para permitir o seqüenciamento, sendo que uma das seqüências resultantes foi de baixa qualidade, não possibilitando o estabelecimento de uma seqüência consenso confiável. A seqüência depositada recebeu o número DQ885336 e possui tamanho de 702pb. A amostra de *C. canis* foi seqüenciada e recebeu o número de depósito DQ885334, possuindo tamanho de 571pb.

Uma das amostras de *C. parvum* de bovinos foi seqüenciada, sendo depositada no GenBank sob número de acesso DQ885333, possuindo 689pb.

Estas são as primeiras seqüências de *C. baileyi*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis* e *C. parvum* do Brasil depositadas no GenBank.

Para uma melhor avaliação da eficácia da RFLP na identificação das espécies de *Cryptosporidium*, foi realizado o alinhamento das seqüências obtidas no presente trabalho e de uma seqüência ‘tipo’ já depositada no GenBank. Os sítios de restrição foram pesquisados para as enzimas *SspI*, *VspI*, *DdeI*, *AseI*, e *NdeI* (Quadro 3).

Apenas *C. felis*; *C. suis* e *C. baileyi* podem ser seguramente diagnosticados com a digestão pela enzima *SspI*, possuindo estas espécies padrão de corte que as diferencia das demais. Na distinção entre *C. suis* e *C. felis*, pode ainda ser utilizado a enzima *NdeI*.

Para a identificação das outras espécies de *Cryptosporidium* combinações de enzimas precisam ser empregadas, assim *C. parvum*, *C. hominis* e *C. meleagridis* podem ser distinguidas entre si pelo uso da enzima *VspI*. Embora Xiao et al. (2004) relataram que estas duas enzimas sejam suficientes para o diagnóstico das espécies de *Cryptosporidium*, foi constatado que o uso da enzima *NdeI* pode ser necessário na diferenciação clara entre *C. parvum* e *C. canis*, enquanto o uso de *DdeI* diferencia *C. parvum* de *C. bovis*.

A enzima *AseI* distingue *Cryptosporidium* Mouse Genotype das demais espécies. Já *Cryptosporidium* Ferret genotype e *C. melagridis* não conseguem ser diferenciadas com as enzimas testadas.

Conforme foi notado, as seqüências de *Cryptosporidium* sp. dos Porquinhos da Índia são as únicas que não possuem sítio de restrição para a enzima *SspI*, porém possuem sítios para as demais enzimas.

No Quadro 3 podem ser visualizados os sítios aproximados de restrição para as diversas enzimas, na Figura 6 está exposto um fluxograma, evidenciando o emprego seqüenciado de enzimas de restrição no diagnóstico das principais espécies de *Cryptosporidium* e na Figura 7 pode ser visto o alinhamento das seqüências obtidas no presente estudo.

Quadro 3: Comparação entre os sítios de restrição enzimática presentes nas seqüências parciais do gene 18Sr DNA (Tamanho aproximado dos fragmentos: 752pb) de *C. parvum* (B83), *C. canis* (C224), *C. felis* (Gato), *Cyryptosporidium* sp. de Porquinho da Índia (O92 e O93), *C. baileyi* de codorna (Codorna), *C. baileyi* de patos (P21 e P22) e *C. meleagridis* de pinto (Pinto) e seqüências equivalentes já depositadas no GenBank. Foram comparadas as enzimas *SspI*, *VspI*, *DdeI*, *AseI* e *NdeI*. O término das seqüências (-), indica que a seqüência é mais curta, terminando antes das outras seqüências comparadas.

Região aproximada (pb)	23	29	173	414	420	427	437	448	429	438	486	543	573	608	625	720
B83			DdeI	SspI	SspI	SspI	SspI	SspI	NdeI	SspI	DdeI	VspI	VspI			
<i>C. parvum</i>			DdeI	SspI	SspI	SspI	SspI	SspI	NdeI	SspI	DdeI	VspI	VspI			
AF164102																
<i>C. hominis</i>			VspI	DdeI	SspI	SspI	SspI	SspI	NdeI	SspI	DdeI	VspI	VspI			
DQ286403				DdeI	SspI	SspI	SspI	SspI	NdeI	SspI	DdeI	VspI	VspI			
Pinto				DdeI	SspI	SspI	SspI	SspI	NdeI	SspI	DdeI	VspI	-			
<i>C. meleagridis</i>									NdeI	SspI	DdeI	VspI	VspI			
AF112574									NdeI	SspI	DdeI	VspI	VspI			
Mouse AF112571			DdeI	SspI	SspI	SspI	VspI	AseI	NdeI	SspI	DdeI	VspI	VspI			
C. ferret AF112572			DdeI	SspI	SspI	SspI	VspI	NdeI	SspI	DdeI	VspI	VspI	VspI			
<i>C. suis</i> AF1125377			DdeI	SspI	SspI	SspI	SspI	NdeI	DdeI	VspI	VspI	VspI	VspI			
C. RABBIT			DdeI	SspI	SspI	SspI	SspI	NdeI	SspI	DdeI	VspI	VspI	VspI			
AY120901									NdeI	SspI	DdeI	VspI	VspI			
<i>C. wrairi</i>			DdeI	SspI	SspI	SspI	NdeI	SspI	DdeI	VspI	VspI	VspI	VspI			
<i>C. bovis</i> AY731305			AseI	DdeI	DdeI	SspI	SspI	SspI	SspI	VspI	VspI	VspI	VspI			
C224				DdeI	SspI	SspI	SspI	SspI	SspI	VspI	VspI	VspI	VspI			
<i>C. canis</i> AB210854			DdeI	SspI	SspI	SspI	SspI	SspI	DdeI	VspI	VspI	VspI	VspI			
Gato			DdeI	SspI	SspI	SspI	AseI	AseI	DdeI	VspI	VspI	VspI	VspI			
<i>C. felis</i> AF112575			DdeI	SspI	SspI	SspI	AseI	AseI	DdeI	VspI	VspI	VspI	VspI			
O92			DdeI	DdeI	DdeI	AseI	AseI	AseI	DdeI	VspI	VspI	VspI	VspI			
O93			DdeI	DdeI	DdeI	AseI	AseI	AseI	DdeI	VspI	VspI	VspI	VspI			
C. sp. N AF262332																
Codorna																
P21																
P22																
<i>C. baileyi</i>			DdeI													
AF262324			DdeI	SspI	DdeI	AseI	AseI	AseI								
<i>C. muris</i>			DdeI	SspI	DdeI	AseI	AseI	AseI								
<i>C. galli</i>			DdeI	AseI	AseI											
<i>C. serpentis</i>			DdeI	SspI	AseI	SspI	SspI	SspI								
<i>C. andersoni</i>			DdeI	SspI	AseI	AseI	AseI	AseI								

Figura 6: Fluxograma de uso das enzimas de restrição *SspI*, *VspI*, *DdeI*, *AseI* e *NdeI* para o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. de répteis, aves e mamíferos.

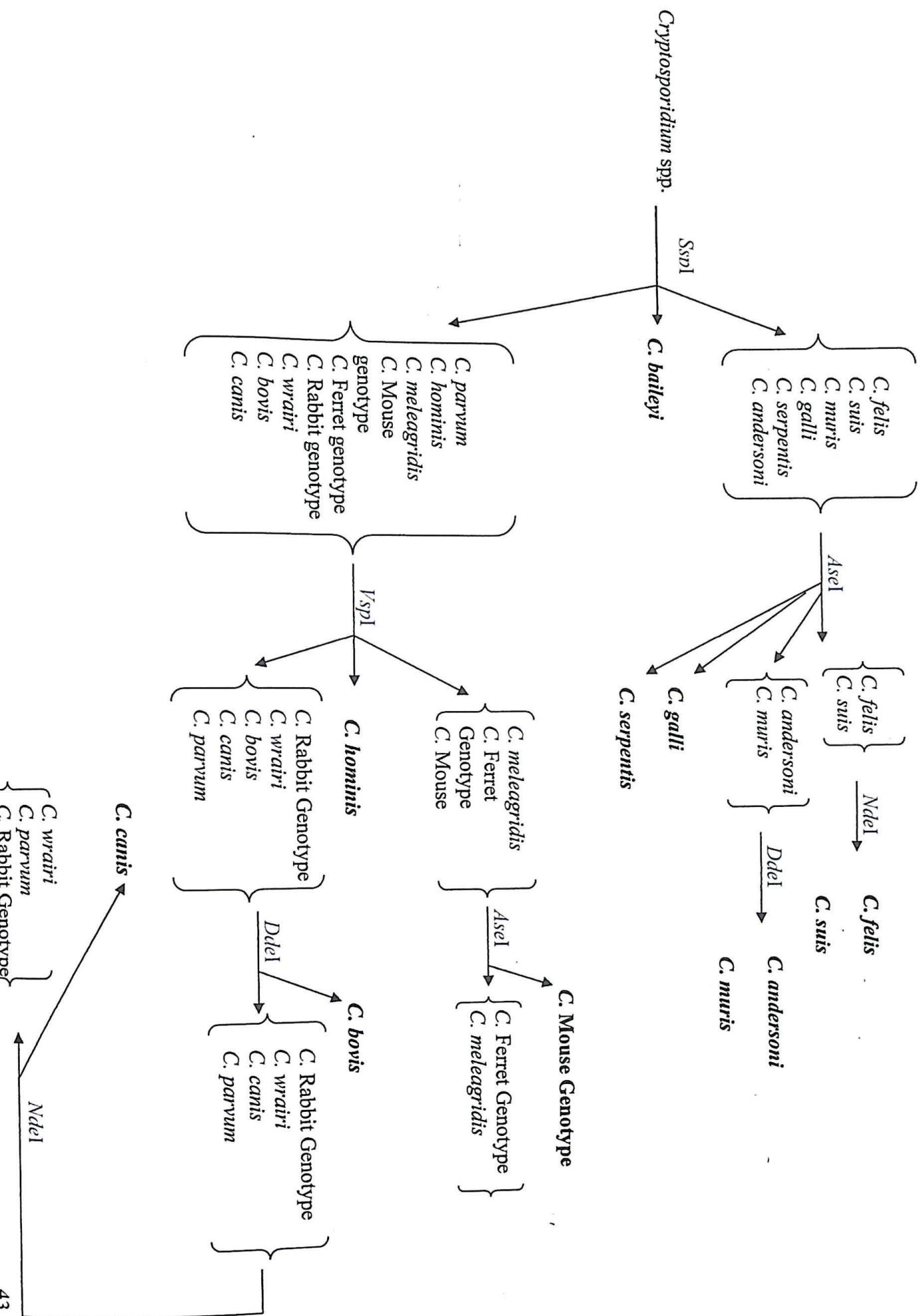


Figura 7: Alinhamento das seqüências de *C. parvum* (B83), *C. canis* (C224), *C. felis* (Gato), *Cyryptosporidium* sp. de Porquinho da Índia (O92 e O93), *C. baileyi* de codorna (Codorna), *C. baileyi* de patos (P21 e P22) e *C. meleagridis* de pinto (Pinto). As cores marcam os sítios de restrição presentes nas seqüências, para as enzimas *DdeI* (CTAAG), *AseI* (ATTAT), *VspI* (ATTAAT) e *SspI* (AATATT). Lacunas são marcadas por (-) e Nucleotídeos idênticos por (.).

#B83 -CT TTACGGATCA CA-----T TAAATGTGAC ATATCATTCA AGTTTCTGAC CTATCAGCTT TAGA-CGGA [80]
 #C224
 #Gato -----TAATAA... .ACAATTAA TT.G..... .A...
 #O92 -----TAA... .TT..T... .A...
 #O93 -----TAA... .TT..T... .A...
 #Codorna CATAATTA... .TT... TT...
 #P21 -----TTA... G... TT.C... T...
 #P22 -----TTA... G... TT.C... T...
 #Pinto -----A... A TT...
 #B83 GGGTATTGGC CTACCG-TGG CAATGACGGG TAACGGGGAA TTAGGGTTGC ATTCCGGAGA GGGAGCCCTGA GAAACGGCTA [160]
 #C224
 #GatoG... G... T...
 #O92T...
 #O93T...
 #CodornaT...
 #P21T...
 #P22T...
 #PintoT...
 #B83 CCACATCTAA GGAAG-GCAG CAGGCCGC AATTACCAA TCCTAATACA GGGAGGTAGT GACAAGAAAT AACAAATACAG [240]
 #C224T...
 #Gato-
 #O92-
 #O93-
 #Codorna-
 #P21G.C...
 #P22G.C...
 #PintoG.C...
 #B83 GACTTT--T GTTTTGAA TTGGAATGAG TAAAGTATAA ACCCCCTTAC AAGTATCAAT TGGAGGGCAA GTCTGGTCCC [320]
 #C224AA-C A... .G...
 #GatoA-C ...G... G...
 #O92C... AT...
 #O93C... AT...
 #Codorna G.C.AA--C ...C...
 #P21 .G.C.AA--C ...C...
 #P22 .G.C.AA--C ...C...
 #Pinto-
 #B83 AGCAGCCGGC GTAATTCCAG CTCCAATAGC GTATATTAAA GTGTTGCAG TAAAAAGCT CGTAGTTGGA TTTCTGTTAA [400]
 #C224
 #Gato-
 #O92-
 #O93-
 #Codorna-
 #P21-
 #P22-
 #Pinto-
 #B83 TAATT-TATA TAAATATAT TGTAT-GAT ATATATAA ATTAACATA ATTCAATTAA -----CTATATA [480]
 #C224-
 #Gato ACC...A... .T... AACA...
 #O92G...TC... .T... CC ATT--GAT... T... G... G... .C... C... T... TTTAAGACTG AATT.T..GT [480]
 #O93G...TC... .T... CC ATT--GAT... T... G... G... C... ?...T... ACTT.CGGGT [480]
 #Codorna ..C.A... C.T.CCACCG GT...
 #P21 ..C.A... C.T.CCACCG GT...
 #P22 ..C.A... C.T.CCACCG GT...
 #Pinto-
 #B83 TTTAGTATA TGAATTTTA CTTTGAGAAA ATTAGACTGC TTAAAGCAGG CATATGCCCT GAATACTCCA GCATGGAAAT [560]
 #C224 ..A... .C...
 #Gato ..G.TA... .C...
 #O92G...
 #O93G...
 #Codorna AA...G... C...
 #P21 ..AA...G... C...
 #P22 ..AA...G... C...
 #Pinto A...
 #B83 AAAAAGA TTTTA---T CTTCTTATT GGTTCTAAGA TAAGAATAAT GATTAATAGG GACAGTTGGG GGCAATTGTA [640]
 #C224
 #Gato ..A... AG A... TATC... T... T...
 #O92 ..A... AG A... TATC... T... T... TA...
 #O93 ..A... AG A... TATC... T... T... TA...
 #Codorna-
 #P21-
 #P22-
 #Pinto-
 #B83 -TTAACAGTC AGAGGTGA-A TTCTTAGATT TGTTAAAGAC AA-CTAATGC GAAAGCATT- GCCAAGGATG TTTCTGTTAA [720]
 #C224 T...AT...A-
 #Gato T...T...
 #O92A...
 #O93A...
 #Codorna T...A...
 #P21 T...A...
 #P22 T...A...
 #Pinto T...A...
 #B83 CAAGACGAA GT [752]
 #C224 G.A.C...A.TT AGGGATCGAG ACGATCAGAT AC [752]
 #Gato-
 #O92-
 #O93-
 #Codorna-
 #P21-
 #P22-
 #Pinto- [752]

4.5 Filogenia

As espécies *C. parvum*, *C. baileyi* e *C. meleagridis* mostraram 99% de similaridade quando comparadas às seqüências já existentes no GenBank. A espécie *C. felis* e *C. canis* do presente estudo, possuem similaridade de 98% e 97%, respectivamente, quando comparadas às seqüências do GenBank.

Não foi possível identificar as seqüências de *Cryptosporidium* obtidas dos Porquinhos da Índia, sugerindo tratar-se de uma seqüência que ainda não foi depositada no GenBank, sendo provavelmente um genótipo ou espécie nova.

Nas tabelas 1 e 2 podem ser observadas as distâncias genéticas entre diversas seqüências de *C. felis* e de *C. canis* já depositadas no GenBank e as seqüências obtidas no presente estudo. É interessante notar que a distância genética dos isolados brasileiros é maior que aquela existente entre os isolados previamente descritos.

Na tabela 3 podem ser observadas as distâncias genéticas entre as seqüências de *Cryptosporidium* obtidas dos Porquinhos da Índia e seqüências de espécies conhecidas de *Cryptosporidium* e uma não identificada (Xiao et al, 2000).

Na análise filogenética, os isolados brasileiros agruparam-se às espécies correlatas já descritas. Os isolados de *Cryptosporidium* obtidos de *Cavia porcelus* se localizaram entre as espécies intestinais, estando geneticamente relacionadas a *C. felis*, porém mantendo-se distintas o bastante para caracterizarem uma espécie distinta. Na figura 7 pode ser visualizada a árvore filogenética elaborada pelo método do Neighbor Joining. Os dados foram confirmados também pela análise da Maximum parcimony e Maximum Likelyhood, cujas árvores finais são condizentes com a apresentada.

Tabela 1: Distância genética calculada pelo Kimura- 2 Parâmetro, comparando a amostra brasileira de *C. felis* e seqüências previamente depositadas no GenBank.

	<i>C. felis</i> amostra brasileira	<i>C. felis</i> _AF112575	<i>C. felis</i> _AF159113	<i>C. felis</i> _AF108862
<i>C. felis</i> amostra brasileira				
<i>C. felis</i> AF112575	0.005			
<i>C. felis</i> AF159113	0.007	0.002		
<i>C. felis</i> _AF108862	0.005	0.000	0.002	
<i>E. tenella</i> _AF026388	0.282	0.274	0.274	0.274

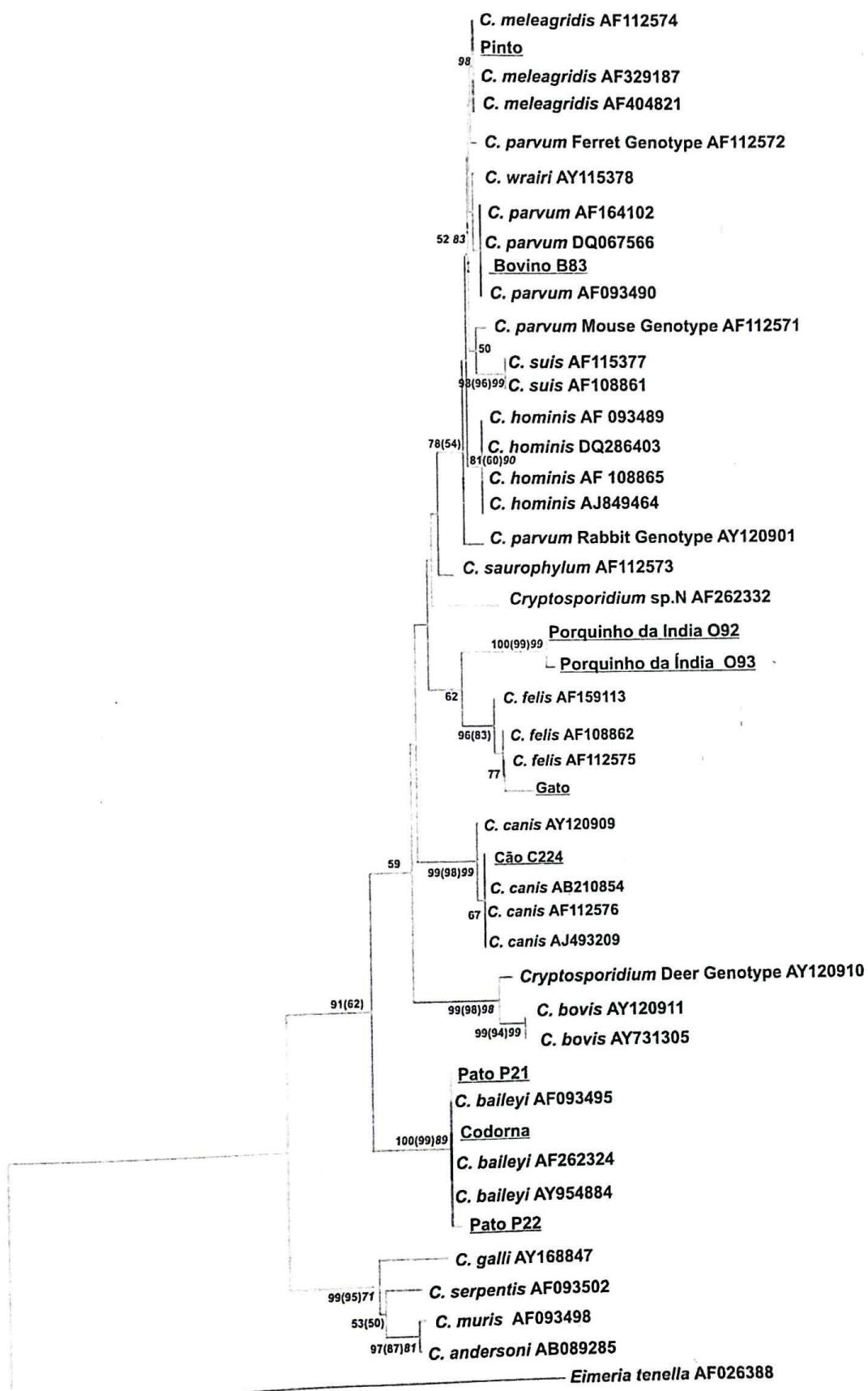
Tabela 2: Distância genética calculada pelo Kimura- 2 Parâmetro, comparando a amostra brasileira de *C. canis* e seqüências previamente depositadas no GenBank.

	<i>C. canis</i> amostra brasileira	<i>C. canis</i> AF112576	<i>C. canis</i> AB210854	<i>C. canis</i> AY120909	<i>C. canis</i> AJ493209
<i>C. canis</i> amostra brasileira					
<i>C. canis</i> AF112576	0.008				
<i>C. canis</i> AB210854	0.008	0.000			
<i>C. canis</i> AY120909	0.010	0.002	0.002		
<i>C. canis</i> AJ493209	0.008	0.000	0.000	0.002	
<i>E. tenella</i> AF026388	0.270	0.264	0.264	0.262	0.264

Tabela 3: Distância genética calculada pelo Kimura-2 Parâmetro, comparando as amostras brasileiras de *Cryptosporidium* de *Cavia porcellus* e seqüências previamente depositadas no GenBank.

	092	093	<i>C. felis</i> AF112575	<i>C.sp. N</i> AF262332	<i>C.wrairi</i> AY115378	RABBIT GENOT AY120901	<i>C.parvum</i> AF164102	MOUSE GENOT AF112571	FERRET AF112572	<i>C.canis</i> AB210854	<i>C.baileyi</i> AF262324	DEER GENOT AY120910	<i>C.muris</i> AF093498
092													
093	0.003												
<i>C. felis</i> AF112575	0.037	0.040											
<i>C.sp. N</i> AF262332	0.045	0.048	0.050										
<i>C.wrairi</i> AY115378	0.048	0.050	0.037	0.037									
RABBIT GENOT AY120901	0.048	0.050	0.039	0.034	0.013								
<i>C.parvum</i> AF164102	0.050	0.053	0.039	0.040	0.003	0.010							
MOUSE GENOT AF112571	0.053	0.056	0.039	0.042	0.008	0.010	0.005						
FERRET AF112572	0.053	0.056	0.039	0.042	0.008	0.010	0.005	0.005					
<i>C. canis</i> AB210554	0.064	0.067	0.042	0.048	0.031	0.039	0.034	0.039	0.039				
<i>C.baileyi</i> AF262324	0.076	0.078	0.059	0.059	0.056	0.056	0.056	0.062	0.062	0.053			
DEER GENOT AY120910	0.076	0.078	0.059	0.059	0.053	0.048	0.053	0.053	0.053	0.050	0.045		
<i>C.muris</i> AF093498	0.113	0.116	0.102	0.113	0.096	0.104	0.099	0.099	0.104	0.099	0.078	0.107	
<i>E.tenella</i> AF026388	0.263	0.267	0.266	0.255	0.282	0.282	0.286	0.285	0.289	0.286	0.285	0.292	0.262

Figura 8: Árvore filogenética de espécies brasileiras de *Cryptosporidium* e espécies já descritas e depositadas no GenBank. Os números mostram os valores do Bootstrap para Neighbor Joining, Maximum parsimony entre parênteses e Maximum Likelihood em itálico.



5 DISCUSSÃO

No presente estudo foi diagnosticado quatro espécies de *Cryptosporidium* com comprovado potencial zoonótico, sendo elas: *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis* e *C. canis*.

Nos cães e gatos do abrigo de animais, a ocorrência de infecções concomitantes com helmintos e outros protozoários, mostraram a precária sanitária dos animais nesse ambiente. Como *Cryptosporidium* é um importante parasito oportunista de várias espécies de animais e de humanos, este intenso parasitismo pode ter colaborado para a debilidade dos hospedeiros, favorecendo a infecção por *C. felis* e *C. canis*, nos gatos e no cão, respectivamente, justificando a alta ocorrência encontrada nesse estudo.

Huber et al (2002) encontraram uma ocorrência de *Cryptosporidium* sp. de 25% em 20 gatos mantidos aglomerados. Porém a maioria dos relatos se refere a uma ocorrência até 12,1% da infecção em gatos.

O que chamou atenção foi que, apesar do ambiente altamente contaminado por fezes e consequentemente por oocistos de *C. felis*, o cão que estava infectado apresentou a espécie *C. canis*, indicando certa preferência ao hospedeiro, apesar do ambiente propício para a dispersão de *C. felis*.

Abe et al (2002), estudando 140 amostras de fezes de cães recolhidos das ruas também diagnosticaram apenas *C. canis* nestes animais, evidenciando uma certa especificidade pelo hospedeiro, ao menos na infecção natural de cães.

Até o momento não há relato de infecção natural por outra espécie de *Cryptosporidium* em gatos, que não seja *C. felis*, porém estudos conduzidos em gatos domésticos realizando a genotipagem, ainda são raros.

Segundo Scorza et al. (2003) a distribuição desigual de oocistos nas fezes, fazendo com que a alíquota utilizada no procedimento não contenha oocistos suficientes; falha na ruptura dos oocistos durante extração, evitando assim a liberação do DNA para a análise; a absorção do DNA por compostos presentes nas fezes e a presença de inibidores da PCR, podem dificultar o uso da PCR em materiais fecais. Estes fatores podem ter sido responsáveis pela não amplificação do material de três das amostras fecais de gatos que apresentavam-se positivas para *Cryptosporidium* no exame de centrífugo-flutuação.

É notável, e ao mesmo tempo preocupante, a facilidade com a qual foram encontradas pelo menos duas espécies distintas de *Cryptosporidium* nos animais comercializados no Mercado Municipal. Considerando que *C. meleagridis* também infecta humanos, causando infecção tanto em adultos quanto em crianças, fica evidente o risco de contrair a doença aos quais os freqüentadores, comerciantes e fregueses do Mercado, e em especial, da loja de animais, estão expostos, existindo também a possibilidade da contaminação dos alimentos comercializados nas vizinhanças do local.

É comum serem vistas crianças, acariciando animais por entre a tela, principalmente nos patos e pintinhos. Outras vezes, pedem aos pais para que comprem um dos animais para poderem ser levados para casa, como animais de estimação. Devido ao baixo custo de aquisição, muitas das vezes o desejo das crianças é realizado. Desta forma possíveis portadores de criptosporidiose são levados para o domicílio. O estreito contato de crianças com seus animais de estimação pode aumentar ainda mais os riscos da transmissão zoonótica.

Durante as análises dos sítios de corte enzimático dos produtos da Nested-PCR do gen 18Sr DNA, utilizando-se as enzimas *SspI* e *VspI*, a única espécie que realmente possui padrão de corte característico é *C. baileyi*. As demais espécies de *Cryptosporidium* deveriam ser submetidas à ação de outras enzimas, conforme mostrado na Figura 06, para um diagnóstico específico. Porém, as espécies *C. wrairi*, *C. parvum* e *Cryptosporidium Rabbit genotype*, bem

como *C. meleagridis* e *Cryptosporidium* Ferret genotype, não podem ser especificados pelos métodos propostos, devendo ser analisadas mediante uso de outros gens, como o COWP ou o sequenciamento. No presente trabalho a RFLP foi realizada utilizando-se as enzimas *SspI* e *VspI*, sendo que o diagnóstico específico foi confirmado mediante a realização do sequenciamento do produto obtido na Nested-PCR.

Com base nos dados apresentados pelo agrupamento filogenético, uma possível nova espécie chama a atenção à presença de espécies desconhecidas de *Cryptosporidium*, mesmo em animais comuns de estimação, como é o caso do Porquinho da Índia.

As espécies do gênero *Cryptosporidium* podem sofrer recombinações genéticas, principalmente quando ocorrem infecções mistas de genótipos ou mesmo de espécies distintas (FENG et al., 2002), sendo que a formação das espécies do gênero *Cryptosporidium* aparentemente é o resultado da adaptação do parasito a diferentes hospedeiros. Diferentes espécies de *Cryptosporidium* podem parasitar um mesmo hospedeiro, como ocorrem em *C. parvum*, *C. hominis*, *C. meleagridis* e *C. muris*, sugerindo que outros fatores podem levar à especiação (TANRIVERDI; WIDMER, 2006).

Também foi sugerido que populações genéticas distintas podem emergir dentro de um grupo de hospedeiros em relativamente pouco tempo, devido à rápida reprodução do gênero e a possibilidade de estabelecer uma população clonal. Segundo Tanriverdi et al. (2006), isso pode explicar a freqüente detecção de genótipos específicos a hospedeiros cujo status taxonômico é desconhecido, como ocorre em estudos que isolam oocistos em águas superficiais. O mesmo fato pode explicar a existência de genótipos geograficamente restritos de *C. hominis* no homem. Este fato poderia explicar a distância genética maior observada entre *C. felis* e *C. canis* isolados no Brasil quando comparados às seqüências do GenBank. Também seria possível que a espécie de *Cryptosporidium* dos Porquinhos da Índia tenha se formado desta forma.

Existe a possibilidade de surgimento de uma nova espécie a partir de recombinações genéticas, quando há a infecção do hospedeiro por mais de uma espécie. No caso dos Porquinhos da Índia acompanhados, as seqüências obtidas não alinharam, utilizando o BLAST, com seqüências de espécies conhecidas, mas com uma seqüência de *Cryptosporidium* sp. ‘isolado N’ encontrado na água, cuja provável origem seria de roedores silvestres (XIAO et al, 2000).

Maiores estudos são extremamente necessários para a descrição do ciclo biológico, infectividade e obtenção de mais seqüências, se possível maiores que as obtidas no presente trabalho e de outros locus genéticos.

O estudo da criptosporidiose em ruminantes é bem avançado, sendo que ruminantes domésticos jovens, principalmente neonatos, são capazes de eliminar uma grande quantidade de oocistos de *Cryptosporidium*, podendo atingir um número de 10^6 a 10^7 por grama de fezes (FAYER, 1997). Como isto representa uma intensa contaminação ambiental, se tornam de fundamental importância às práticas de manejo para o controle da infecção (MOHAMMED et al., 1999).

Apesar da presença da pesquisa veterinária brasileira nos levantamentos epidemiológicos da criptosporidiose animal, ela se mostra ausente na aplicação das tecnologias moleculares no seu diagnóstico, assim maiores estudos são necessários com relação às espécies de *Cryptosporidium* que ocorrem no Brasil, incluindo o depósito de seqüências no GenBank, para fornecer aos pesquisadores bases de dados eficientes na realização de estudos filogenéticos.

6 CONCLUSÕES

Através do uso da Nested-PCR e do seqüenciamento de fragmento do gene 18Sr DNA, foi possível identificar as seguintes espécies de *Cryptosporidium* nos respectivos hospedeiros: *C. parvum* em bovinos, *C. meleagridis* em pintos, *C. baileyi* em codornas e patos, *C. felis* em gatos, *C. canis* em um cão e *Cryptosporidium* sp. em Porquinhos da Índia.

A análise das distâncias genéticas entre as seqüências de *Cryptosporidium* oriundas de porquinhos da Índia e de espécies conhecidas, permitiu o reconhecimento de um novo genótipo, nesse hospedeiro.

A realização da RFLP com as enzimas utilizadas foi suficiente para a indicação das espécies de *Cryptosporidium* encontradas, porém para o diagnóstico específico, o sequenciamento torna-se essencial.

Animais comercializados em mercados municipais podem ser considerados potenciais fontes de contaminação ambiental para diversas espécies de *Cryptosporidium*, evidenciando-se assim o risco de infecção a partir da aquisição de animais provenientes desses mercados, bem como da contaminação accidental de alimentos que são comercializados no entorno das lojas de animais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, N.; KIMATA, I.; ISEKI, M. Comparative study of PCR-based *Cryptosporidium* discriminating techniques with a review of literature. *Kansenshogaku Zassi*. V. 76, n. 10, p. 869-881. 2002.
- AKIYOSHI, D. E.; FENG, X.; BUCKHOLT, M. A.; WIDMER, G.; TZIPORI, S. Genetic Analysis of a *Cryptosporidium parvum* human genotype I isolate passaged through different host species. *Infection and Immunity*. V.70, n. 10, p. 5670-5675, 2002.
- ALVAREZ-PELLITERO, P.; SITJÁ-BOBADILLA, A. *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa:Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *International Journal for Parasitology*, v. 32, n. 8. p. 1007-1021, 2002.
- AMAR, C. F. L.; DEAR, P. H.; McLAUCHLIN, J. Detection and identification Br real-time PCR/RFLP analyses of *Cryptosporidium* species from human faeces. *Letters in Applied Microbiology*. V.38, n.1, p. 217-222, 2004.
- ARROWOOD, M. J. Diagnosis. IN: FAYER, R. *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. CRC Press: Washington, p. 43-60, 1997.
- BLEARS, M. J.; POKORNY, N. J.; CARRENO, R. A.; CHEN, S.; DE GRANDIS, S. A.; LEE, H.; TREVORS, J.T. DNA Fingerprinting of *Cryptosporidium parvum* isolates using Amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Journal for parasitology*. V.86, n.4, p. 838-841. 2000.
- BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M. E.; NOORDAA, J. Rapid and simple Method for purification of Nucleic Acids. *Journal of Clinical Microbiology*, v.28, n. 3, p. 495-503, 1990.
- CAMA V.A., BERN C., SULAIMAN I.M., GILMAN R.H., TICONA E., VIVAR A., KAWAI V., VARGAS D., ZHOU L., XIAO L.. Cryptosporidium species and genotypes in HIV-positive patients in Lima, Peru. *J. Eukaryotic Microbiol.*, 50(Suppl.) 531-533, 2003.
- CAI, X.; WOODS, K. M.; UPTON, S. J.; ZHU1, G. Application of Quantitative Real-Time Reverse Transcription-PCR in Assessing Drug Efficacy against the Intracellular Pathogen *Cryptosporidium parvum* In Vitro. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. V. 49, N. 11 p. 4437-4442, 2005.
- CEVALLOS, A. M.; ZHANG, X.; WALDOR, M. K.; JAISON, S.; ZHOU, X.; TZIPORI, S.; NEUTRA, M. R.; WARD, H. D. Molecular cloning and expression od a gene encoding *Cryptosporidium parvum* glycoproteins gp 40 and gp 15. *Infection and immunity*. V. 68, n. 1, p.4108-4116, 2000.
- CHALMERS, R.M.; FERGUSON, C.; CACCIO, S.; GASSE, R. B.; ABS EL-OSTA, Y. G.; HEIJNEN, L.; XIAO, L.; ELWIN, K.; HADFIELD, S.; SINCLAIR, M.; STEVENS, M. Direct comparison of selected methods for genetic categorization of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* species. *International Journal for Parasitology*. V. 35, N. 1, p. 397-410, 2005.

COHEN, S.; DALLE, F.; GALLAY, A.; DI PALMA, M.; BONNIN, A.; WARD, H. D. Identification of Cpgp 40/15 type Ib as the predominant Allele in isolates of *Cryptosporidium* spp. From a waterborne outbreak of gastroenteritis in South Burgundy, France. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 44, n. 2, p. 589-591, 2006.

COUPE, S.; SARFATI, C.; HAMANE, S.; DEROIN, F. Detection of *Cryptosporidium* and identification to the species level by nested PCR and restriction Fragment Length Polymorphism. **Journal of Clinical Microbiology**. V.43, n.3. p.1017-1023, 2005.

CURRENT, W. L.; GARCIA, L. S. Cryptosporidiosis. **Clinical Microbiological Reviews**, Jul, p. 325-358, 1991.

CURRENT, W. L.; UPTON, S. J.; HAYNES, T. B. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi*, n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting chickens. **Journal of Protozoology**. V. 33, p. 289, 1986.

DENG, M. Q.; CLIVER, D. O. Differentiation of *Cryptosporidium parvum* isolates by Simplified Randomly Amplified Polymorphic DNA Technique. **Applied Environmental Microbiology**. V. 64, n. 5, p. 1954-1957, 1998.

DENG, M. Q.; LAM, K. M.; CLIVER, D. O. Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium parvum* oocysts using MACS MicroBeads and high gradient separation columns. **Journal of Microbiological Methods**. V.40, n.1, p. 11-17, 2000.

FAYER, R.; SANTÍN, M.; XIAO, L. *Cryptosporidium Boris* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). **Journal of Parasitology**. V.91, n. 3. p.624-629, 2005.

FAYER, R.; SPEER, C. A.; DUBER, J. P. The general Biology of *Cryptosporidium*. IN: FAYER, R. **Cryptosporidium and cryptosporidiosis**. CRC Press:Washington, p. 1-60, 1997.

FAYER, R.; TROUT, J. M.; XIAO, L.; MORGAN, U. M; LAI, A. A.; DUBEY, J. P. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. **Journal for parasitology**. V. 87, n. 6, p. 1415-1422, 2001.

FENG, X.; RICH, S.M.; AKIYOSHI, D.; TUMWINE, J. K.; KEKITIINWA, A.; NABUKEERA, N.; TZIPORI, S.; WIDMER, G. Extensive Polymorphism in *Cryptosporidium parvum* identified by Multilocus Microsatellite Analysis. **Applied Environmental Microbiology**. V.66, n.8, p. 3344-3349, 2000.

FENG, X.; RICH, S.M.; TZIPORI, S.; WIDMER, G. Experimental evidence for genetic recombination in the opportunistic pathogen *Cryptosporidium parvum*. **Molecular & Biochemical Parasitology**. V. 119, n. 1, p. 55-62, 2002.

FERGUSON, C.; DEERE, D.; SINCLAIR, M.; CHALMERS, R. M.; ELWIN, K.; HADFIELD, S.; XIAO, L.; RYAN, U.; GASSER, R.; EL-OSTA, Y. A.; STEVENS, M. Meeting report: Application of genotyping methods to assess risks from *Cryptosporidium* in watersheds. **Environmental Health Perspectives**. V. 114, N. 3, p. 430-434, 2006.

FELSENSTEIN, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle. Disponível na internet:< <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>>, Acesso em: 25/07/06

FONTAINE, M.; GUILLOT, E. Study of 18S rRNA and rDNA stability by real-time RT-PCR in heat-inactivated *Cryptosporidium parvum* oocysts. **FEMS Microbiology Letters**, v. 223, n. 1, p. 237-243, 2003.

GARCES, G.; EFFENBERGER, M.; NAJDROWSKI, M.; WACKWITZ, C.; GRONAUER, A.; WILDERER, P. A.; LEBUHN, M. Quantification of *Cryptosporidium parvum* in anaerobic digesters treating manure by (reverse-transcription) quantitative real-time PCR, infectivity and excystation tests. **Water Science Technology**. V. 53, n. 8, p. 195-202, 2006.

GASSER, R. B. Molecular tools – advances, opportunities and prospects. **Veterinary parasitology**. V. 136. n. 1. p.69-89, 2006.

GASSER, R. B.; ABS EL-OSTA, Y. G. ; CHALMERS, R. M. Eletrophoretic Analyis of genetic variability within *Cryptosporidium parvum* from imported and autochthonous cases of human cryptosporidiosis in the United Kingdom. **Applied and Environmental Microbiology**. V.69, n. 5, p. 2719-2730, 2003.

GASSER, R. B.; ABS EL-OSTA, Y. G.; PREPENS, S.; CHALMERS, R. M. An improved ‘cold SSCP’ method for the genotypic and subgenotypic characterization of *Cryptosporidium*. **Molecular and Cellular Probes**. V.18, n. 5, p. 329-332, 2004.

GUYOT, K.; FOLLET-DUMOULIN, A.; RECOURT, C.; LELIÈVRE, E.; CAILLIEZ, J. C.; DEI-CAS, E. PCR-Restriction Frangment Length Polimorfism analysis of a Diagnostic 452-base-pair DNA fragment discriminates between *Cryptosporidium parvum* and *C. meleagridis* and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. **Applied and environmental Microbiology**. V. 68, n.4, p. 2071-2076, 2002.

HALLIER-SOULIER, S.; GUILLOT, E. An immunomagnetic separation-reverse transcription polymerase chain reaction (IMS-RT-PCR) test for sensitive and rapid detection of viable waterborne *Cryptosporidium parvum*. **Environmental Microbiology**. v. 7, n. 1, p. 592–598, 2003.

HIGGINS, D.; THOMPSON, J.; GIBSON, T.; THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. 22:4673-4680, 1994.

HIGGINS, J. A.; JENKINS, M. C.; SHELTON, D. R.; FAYER, R.; KARNS, J. S. Rapid extraction of DNA from *Escherichia coli* and *Cryptosporidium parvum* for use in PCR. **Applied and environmental Microbiology**. V. 67, n. 11, p.5321-5324, 2001.

JENKINS, M. C.; TROUT, J.; ABRAHAMSEN, M. S.; LANCTO, C. A.; HIGGINS, J.; FAYER, R. Estimating viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) directed at mRNA encoding amyloglucosidase. **Journal of Microbiological Methods**. V. 43, N. 1, P. 97–106, 2000.

KATO, S.; LINDERGARD, G.; MOHAMMED, H. O. Utility of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene in a nested PCR approach for detection infection in cattle. **Veterinary Parasitology.** V.111, n.1, p. 53-159, 2003.

KUMAR, S; TAMURA, K., NEI, N. (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics** 5:150-163. Disponível na Internet: <http://www.megasoftware.net/m_con_select.html>. Acesso em: 14/03/2006.

KOUDALA, B; MODRÝ, D. New species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from lizards. **Folia Parasitologica**, n. 45, p. 93-100, 1998.

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

LAXER, M. A.; TIMBLIN, B. K.; PATEL, R. J. DNA sequences for the specific detection of *Cryptosporidium parvum* by the polymerase chain reaction. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** V.46, n. 6, p. 688-694, 1991.

LEVINE, N. D. The Protozoan Phylum Apicomplexa. CRC Press, Boca Raton: Florida. 2 V. 1988.

MALLON, M.; MacLEOD, A.; WASTLIN, J.; SMITH, H.; REILLY, B.; TAIT, A. Population structure and the role of genetic exchange in the zoonotic pathogen *Cryptosporidium parvum*. **Journal of Molecular Evolution.** V.56, n.1, p.407-417, 2003a.

MALLON, M.; MacLEOD, A.; WASTLIN, J.; SMITH, H.; TAIT, A. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium parvum* Type 2: population genetics and sub-structuring. **Infects Genetic Evolution.** V.3, n. 3, p. 207-218, 2003b.

McDONALD, V.; DEER, R.; UNI, S.; ISEKI, M.; BANCROFT, G. J. Immune responses to *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium parvum* in adult immunocompetent or immunocompromised (Nude and SCID) Mice. **Infection and Immunity.** V. 60, n.8, p. 3325-3331, 1992.

MC LAUCHLIN, J.; PEDRAZA-DIAZ, S.; AMAR-HOETZENEDER, C.; NICHOLS, G. L. Genetic Characterization of *Cryptosporidium* strains from 218 patients with diarrhea diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis. **Journal of Clinical Microbiology.** V.37, n.10, 1999.

MEAD, J. R.; ARROWOOD, M. J.; SIDWELL, R. W.; HEALEY, M. C. Chronic *Cryptosporidium parvum* infections in congenitally immunodeficient SCID and Nude mice. **The Journal of Infectious Diseases.** V. 163, n. 1. p. 1297-1304, 1991.

MEAD, J. R.; YOU, X. Susceptibility differences to *Cryptosporidium parvum* infection in two strains of gamma intereron knockout mice. **The Journal of Parasitology.** V. 84, n.5, p. 1045-1048, 1998.

MORGAN, U. M.; XIAO, L.; FAYER, R.; GRACZYK, T. K.; LAL, A. A.; DEPLAZES, P.; THOMPSON, R. C. A. Phylogenetic Analysis of *Cryptosporidium* isolates from captive

reptiles using 18S rDNA sequence data and Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. **Journal for Parasitology**. V.85, n.3, p. 525-530, 1999.

MORGAN, U.M.; THOMPSON, R. C. A. PCR Detection of *Cryptosporidium*: the way forward?. **Parasitology today**, V. 14, n.6, p.241-245, 1998.

MORGAN-RYAN, U. M., FALL, A.; WARD, L. A.; HIJJAWI, N.; SULAIMAN, I.; FAYER, R.; THOMPSON, R. C.; OLSON, M. ; LAL, A.; XIAO, L. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**. V. 49, n. 1, p.433-440, 2002.

MUTHUSAMY, D.; RAO, S. S.; RAMANI, S.; MONICA, B.; BANETJEE, I.; ABRAHAM, O. C.; MATHAI, D. C .; PRIMROSE, B.; MULIJIL, J.; WANKE, C. A.; WARD, H. D.; KANG, G. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* sp. isolates from human immunodeficiency virus-infected individuals in South India. **Journal of Clinical Microbiology**. V.44. n. 2, p. 632-634, 2006.

NICHOLS, R. A. B.; MOORE, J. E.; SMITH, H. V. A rapid method for extracting oocyst DNA from *Cryptosporidium* -positive human faeces for outbreak investigations. **Journal of Microbiological Methods**. V. 65, n. 3, p. 512-524, 2006.

O'DONOUGHUE, P. J. Cryptosporidium and cryptosporidiosis in man and animals. **International Journal for Parasitology**. V. 25, n. 2, p. 139-195, 1995.

PATEL, S.; PEDRAZA-DÍAZ, S.; McLAUCHLIN, J. The identification of *Cryptosporidium* species and *Cryptosporidium parvum* directly from whole faeces by analysis of a multiplex PCR of the 18S rRNA gene and br PCR/RFLP of the *Cryptosporidium* outer wall protein (COWP) gene. **International Journal for Parasitology**. V. 29, n. 1, p. 1241-1247, 1999.

PEDRAZA-DÍAZ, S.; AMAR, C.; McLAUCHLIN, J. The identification and characterization of an unusual genotype of *Cryptosporidium* from human faeces as *Cryptosporidium meleagridis*. **FEMS Microbiology letters**. V. 189, n. 1, p. 189-194, 2000.

PENG, M. M.; XIAO, L.; FREEMAN, A. R.; ARROWOOD, M. J.; ESCALANTE, A. A.; WELTMAN, A. C.; ONG, C. S. L.; MacKENZIE, W. R.; LAL, A. A.; BEARD, C. B. Genetic Polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: Evidence of two distinct human transmission cycles. **Emerging Infectious Diseases**. V. 3, n. 4, p. 567-573, 1997.

PIENIAZEK, N. J.; BORNAY-LLINARES, F. J.; SLEMENDA, S. B.; SILVA, A. J.; MOURA, I. N. S.; ARROWOOD, M. J.; DITRICH, O.; ADDISS, D. G. New *Cryptosporidium* genotypes in HIV-infected persons. **Emerging Infectious Diseases**. V. 5, n. 3, p. 444-449, May-Jun, 1999.

RAMIREZ, N. E.; SREEVATSAN, S. Development of a sensitive detection system for *Cryptosporidium* in environmental samples. **Veterinary Parasitology**. V. 136, n. 1, p. 201-213, 2006.

RASMUSSEN, K. R.; HEALEY, M. C. *Cryptosporidium parvum*: Experimental infection in aged Syrian Golden Hamsters. **The Journal of Infectious Diseases**. V. 165, N. 1, p. 769-772, 1992.

REDUKER, D. W.; SPEER, C. A.; BLIXT, J. A. Ultrastructure of *Cryptosporidium parvum* oocysts and excysting sporozoites as revealed by high resolution scanning electron microscopy. **Journal of protozoology**. V. 32, n. 1, p. 708-711, 1985.

RYAN, U. M.; XIAO, L.; READ, C.; SULAIMAN, I. M.; MONIS, P.; LAL, A. A.; FAYER, R.; PAVLASEK, I. A redescription of *Cryptosporidium galli*, Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. **Journal of Parasitology**. V. 9, n. 1, p. 809-813, 1999.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**. V. 239, n. 4839, p. 487-491, 1988.

SAMBROOCK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3a Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.

SCORZA, A. V.; BREWER, M. M.; LAPPIN, M. R. Polymerase Chain Reaction for the detection of *Cryptosporidium* spp. In cat feces. **Journal of Parasitology**. V. 89, n. 2, p.423-426, 2003.

SHIANNA, K. V.; RYTTER, R.; SPANIER, J. G. Randomly Amplified Polymorphic DNA PCR Analysis of bovine *Cryptosporidium parvum* strains isolated from watershed of the Red River of the North. **Applied and Environmental Microbiology**. V. 64, n. 6, p. 2262-2265, 1998.

SMITH, H.V.; NICHOLS, R.A.; MALLON, M.; MACLEOD, A.; TAIT, A.; REILLY, W.J.; BROWNING, L.M.; GRAY, D.; REID, S.W.; WASTLING, J. M. Natural *Cryptosporidium hominis* infections in Scottish cattle. **Veterinary Records**. V. 156, n. 22, p.710-711. 2005.

SPANO, F.; CRISANTI, A. *Cryptosporidium parvum*: the many secrets of a small genome. **International Journal of Parasitology**. V. 30, n. 1, p. 553-565, 2000.

SPANO, F.; PUTIGNANI, L.; McLAUCHLIN, J.; CASEMORE, D. P.; CRISANTI, A. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. **FEMS Microbiology Letters**. V. 150, n. 1, p. 209-217, 1997.

TANCRIVERDI, S.; WIDMER, G. Differential evolution of repetitive sequences in *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. **Infection, Genetics and Evolution**. V.6, n.1, p.113-122, 2006.

TANRIVERDI, S.; MARKOVICS, A.; ARSLAN, M. O.; ITIK, A.; SHKAP, V.; WIDMER, G. Emergence of distinct genotypes of *Cryptosporidium parvum* in structured host populations. **Applied Environmental Microbiology**. V.72, n.4, p.2507-2413, 2006.

TIAN, Z. C.; ZHANG, X. C.; LI, J; YIN, J. G. H.; YANG, J. ; HE, H. X. Cloning of a species-specific gene fragment from *Cryptosporidium parvum* and the development of diagnostic PCR primers. **Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng CHong Bing Za Zhi**, v. 20, n. 2, p. 72-75, 2002.

TIAN, Z. C.; ZHANG, X. C.; WANG, J. M.; YIN, J. G.; LI, J. H.; CHEN, J. B.; YANG, J. Random Amplified Polymorphic DNA analysis of *Cryptosporidium* species and strains.

Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng CHong Bing Za Zhi. V. 19, n. 2, p. 100-102, 2001.

TIBAYRENC, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. **International journal of parasitology.** N. 28, p. 85-104, 1998.

TZIPORI, S. Cryptosporidiosis in perspective. **Advances in parasitology.** V.27, n.1, p. 63-120, 1988.

TZIPORI, S.; GRIFFITHS, J. K. Natural History and Biology of *Cryptosporidium parvum*. **Advances in Parasitology.** V.40, n.1, p. 4-39, 1988.

UPTON, S.J. Taxonomic chronology of *Cryptosporidium* – Some historical milestones (good or bad). 2002. Disponível na internet: <<http://www.ksu.edu/parasitology/taxonomy>> Acesso em 2/1/2003, 2002.

WARD, L.A.; WANG, Y. rapid methods to isolate *Cryptosporidium* DNA from frozen feces for PCR. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.** V.41, n.1, p.37-42, 2001.

WIDMER, G.; FENG, X.; TANRIVERDI, S. Genotyping of *Cryptosporidium parvum* with microsatellite markers. **Methods of Molecular Biology.** V. 268, n. 1, p. 177-187. 2004.

WIDMER, G.; LIN, L.; KAPUR, V.; FENG, X.; ABRAHAMSEN, M. S. Genomics and genetics of *Cryptosporidium parvum*: the key to understanding cryptosporidiosis. **Microbes and infection.** V. 4. p. 1081-1090. 2002.

WILDE, J.; EIDEN, J.; YOLKEN, R. Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of Group A Rotaviruses br Reverse Transcriptade and Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology.** V.28, n. 6, p. 1300-1370, 1990.

WINTER, G.; GOOLEY, A. A.; WILLIAMS, K. L.; SLADE, M. B. Characterization of a major sporozoite surface glycoprotein of *Cryptosporidium parvum*. **Functional Integrated Genomics.** V. 1, n.1, p. 207-217, 2000.

WU, Z.; NAGANO, I.; BOONMARS, T.; NAKADA, T.; TAKAHASHI, Y. Intraspecies polymorphismo of *Cryptosporidium parvum* revealed by PCR- restriction Length Polymorphism (RFLP) and RFLP-Single-Strand Conformational Polymorphism Analyses. **Applied and environmental Microbiology.** V.69, n.8, p.4720-4726, 2003.

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S. *Cryptosporidium* taxonomy: Recent advances and Implications for public health. **Clinical Microbiological Reviews.** V.17, n.1, p.72-92. 2004 a.

XIAO, L., SULAIMAN, I. M.; RYAN, U.M.; ZHOU, L.; ATWILL, E.R.; TISCHLER, M. L.; ZHANG, X.; FAYER, R.; LAL, L. L. Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. **International Journal for Parasitology.** V. 32, n. 1, p.1773–1785, 2002.

XIAO, L.; LAL, A. A.; JINAG, J. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* oocysts in water by PCR-RFLP. **Methods in Molecular Biology,** v.268, p. 163-176. 2004b.

XIAO, L.; MORGAN, U. M.; FAYER, R.; THOMPSON, R. C. A. *Cryptosporidium* systematics and Implications for Public Health. **Parasitology Today**. V. 16, n. 7, p. 297-295, 2000.

XIAO, L.; MORGAN, U. M.; LIMOR, J.; ESCALANTE, A.; ARROWOOD, 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, n. 8, p. 3386-3391, 1999.

XIAO, L.; RYAN, U. M. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. **Current Opinion in Infectious Diseases**. V. 17, n. 1, p. 483-490, 2004c.

ZARLENGA, D. S.; HIGGINS, J. PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. **Veterinary Parasitology**. V. 101, n. 1, p. 215-230, 2001.

ZHU, G.; MARCHEWKA, M. J.; ENNIS, J. G.; KEITHLY, J. S. Direct isolation of DNA from patient stools for polymerase chain reaction detection of *Cryptosporidium parvum*. **Journal of infectious diseases**. V. 177, p. 1443-1446, 1998.