

UFRRJ

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

TESE

***Cryptosporidium* em Bezerros Destinados a Exploração Leiteira no Estado
do Rio de Janeiro: Padronização das Técnicas Moleculares, Caracterização
Genotípica e Influência do Manejo na Infecção**

Melissa Carvalho Machado do Couto Chambarelli

2012



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

**CRYPTOSPORIDIUM EM BEZERROS DESTINADOS A EXPLORAÇÃO LEITEIRA
NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO: PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS
MOLECULARES, CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E INFLUÊNCIA DO
MANEJO NA INFECÇÃO**

MELISSA CARVALHO MACHADO DO COUTO CHAMBARELLI

Sob a Orientação da Professora
Dra. Teresa Cristina Bergamo do Bomfim

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.

Seropédica, RJ
Março de 2012

636.20896

C442c

T

Chambarelli, Melissa Carvalho Machado do
Couto, 1979-

Cryptosporidium em bezerros destinados a exploração leiteira no Estado do Rio de Janeiro: Padronização das técnicas moleculares, caracterização genotípica e influência do manejo na infecção / Melissa Carvalho Machado do Couto Chambarelli - 2012.

123 f.: il.

Orientador: Teresa Cristina Bergamo do Bomfim.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 111-123.


1. Bezerro - Doenças - Rio de Janeiro (Estado) - Teses. 2. Bovino de leite - Doenças - Rio de Janeiro - Teses. 3. Criptosporidiose - Diagnóstico - Teses. I. Bomfim, Teresa Cristina Bergamo do, 1961-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

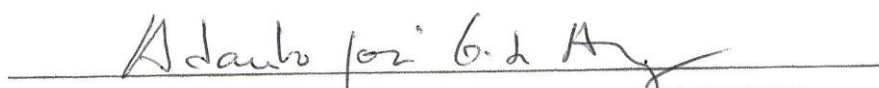
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS


MELISSA CARVALHO MACHADO DO COUTO CHAMBARELLI

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

TESE APROVADA EM 26/03/2012

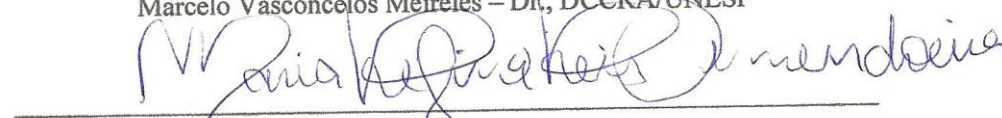

Teresa Cristina Bergamo do Bomfim – Ph.D., IV – DPA/UFRRJ
(Orientadora)


Adauto José Gonçalves de Araújo – Dr., ENSP – FIOCRUZ/RJ


Beatriz Brener de Figueiredo – Dra., CMB – CCM/UFF


Fabiano Borges Figueiredo – Dr., IPEC – FIOCRUZ/RJ


Marcelo Vasconcelos Meireles – Dr., DCCRA/UNESP


Maria Regina Reis Amendoeira – Dra., IOC – FIOCRUZ/RJ

Dedico esta conquista...

Primeiramente a Deus, “Inteligência suprema e causa primária de todas as coisas” (L.E.)

Ao meu marido Julinho, pelo amor, cumplicidade e incentivo.

Aos meus pais, Alexandre e Regina por me amarem e sempre acreditarem em mim.

Aos meus irmãos, Gustavo, Ticianne e Alexandre Filho, pelo companherismo.

Aos meus avós paternos, Thales e Lía (in memorian) e os maternos Jobe (in memorian) e Samaritana, vocês são a minha inspiração.

Aos meus “filhos de quatro patas”, por deixarem os meus dias mais alegres.

Amo vocês!

“A descoberta consiste em ver o que todos viram e em pensar no que ninguém pensou”

(A. Szent-Gyorgyi)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus, pois sem Ele em nossas vidas nada é possível.

Em segundo lugar agradeço de todo o coração a duas pessoas muito importantes que me ajudaram muito, de maneiras distintas, no decorrer desses anos de estudo. Uma delas é meu amado marido Julinho que me apoiou em todos os momentos em que precisei. Amando-me e me compreendendo, abrindo mão do seu maior sonho enquanto eu estava me dedicando a pesquisa. Que mesmo estando distante fez-se presente em minha vida durante todos os momentos.

A outra é a Professora Dra. Teresa Cristina Bergamo do Bomfim, que além de orientadora eu considero como uma grande amiga, que pretendo levar comigo para o resto da vida. Nesses anos de convivência aprendi a admirá-la pela sua inteligência e perseverança, além de respeitá-la como pessoa e profissional. Obrigada pela paciência e por todo o conhecimento que você transmitiu a mim.

Agradeço aos professores do Departamento de Química, Dra. Sonia Regina de Souza e Dr. Flávio Couto Cordeiro, ao professor do Departamento de Solos Dr. Leandro Azevedo Santos e ao Professor Dr. Harrison Azevedo Santos do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública pela ajuda imprescindível para na realização de etapas da minha Tese.

Em especial agradeço ao Professor do Departamento de Química, Dr. Marcelo de Freitas Lima pela amizade e pelo auxílio durante o estudo. Sendo, juntamente com minha orientadora, um dos grandes responsáveis para que este trabalho pudesse ser concluído.

Gostaria de agradecer também aos meus pais, irmãos, avós e a toda minha família, que sempre torceram por mim e estão muito felizes por mais esta conquista. Obrigada pelo incentivo e por aturarem minhas reclamações quando algo não saía como esperado.

Não posso deixar de agradecer também a todos os amigos que estiveram comigo durante esses quatro anos. Em especial agradeço as amigas Adriana Sudré e Simone Quinelato, pela amizade, carinho e incentivo, ao amigo Tarcísio Moura pela a amizade e ajuda durante o decorrer do experimento.

Obrigada a todos os amigos do LNMP por toda ajuda durante o decorrer da minha tese.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias pelo apoio financeiro. Aos professores, funcionários, colegas de curso e a todas as pessoas que trabalharam direta ou indiretamente para que este trabalho fosse desenvolvido, muito obrigada.

RESUMO

CHAMBARELLI, Melissa Carvalho Machado do Couto. *Cryptosporidium* em Bezerros Destinados a Exploração Leiteira no Estado do Rio de Janeiro: Padronização de Técnicas Moleculares, Caracterização Genotípica e Influência do Manejo na Infecção. 2012. 167p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

A criptosporidiose bovina é de grande relevância para a pecuária brasileira, principalmente em animais jovens. Bovinos infectados com *Cryptosporidium* podem apresentar um baixo desempenho produtivo além de eliminar grande quantidade de formas infectantes no ambiente, especialmente aqueles que apresentam um quadro clínico de diarreia. Os objetivos do trabalho foram: comparar duas técnicas de extração de DNA utilizando um kit comercial e um protocolo adaptado por pesquisadores; analisar diversas temperaturas de anelamento para as reações de PCR-Nested para os genes alvo *18S* e *GP60*, além de dois tipos de coloração de fragmentos de DNA em gel de agarose (brometo de etídio e gelred); determinar a ocorrência de espécies e subtipos de *Cryptosporidium* em bezerros com até um ano de idade, através da técnica de PCR para os genes alvos *18S* e *GP60* e analisar a influencia de modificações no manejo no percentual de infecção em bezerros. Os resultados da padronização demonstraram uma maior grau de pureza do kit comercial, tendo sido ainda estabelecido novas temperaturas para uma otimização das técnicas, além da maior sensibilidade e baixa toxicidade do corante gelred. Após o sequenciamento foi observada a presença de três espécies de *Cryptosporidium* infectando bezerros em diferentes faixas etárias. Na fase pré-desmame (< 2 meses) 10% dos animais encontravam-se infectados por *C. parvum*, enquanto que os bezerros na fase pós-desmame (≥ 2 meses) apresentaram-se infectados por *C. andersoni* (15%) e *C. ryanae* (2%). Nesse estudo também foi observado que a implantação de algumas mudanças no manejo da propriedade pode ser de grande ajuda na tentativa de diminuir a disseminação da doença entre os animais e reduzir a contaminação ambiental.

Palavras chave: *Cryptosporidium*, bezerro, manejo, técnicas moleculares, filogenia

ABSTRACT

CHAMBARELLI, Melissa Carvalho Machado do Couto. *Cryptosporidium* in dairy calves in Rio de Janeiro State: Standardization of Molecular Techniques, Genotypic Characterization and Influence of Management in Infection. 2012. 167p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Bovine cryptosporidiosis is of great relevance for Brazilian livestock, especially in young animals. Calves infected by *Cryptosporidium* may present low productivity, eliminating a great amount of infectious forms in the environment, especially those with clinical diarrhea. The aims of this study were: compare two DNA extraction techniques using a commercial kit and a researchers adapted protocol; analyze several annealing temperatures used in the PCR-Nested reactions for the gene target *18S* and *GP60*, in addition to two types of DNA fragments staining in agarose gel (ethidium bromide and gelred); determine the occurrence of *Cryptosporidium* species and subtypes in calves up to one year of age, throughout PCR technique for the gene targets *18S* and *GP60* and analyze the influence of management modifications in the percentage of infection in calves. The standardization results demonstrate a higher sensitivity of the commercial kit and gelred, with the establishment of new temperatures for a better performance of the applied techniques. After sequencing, three species of *Cryptosporidium* were observed infecting calves at different ages. At pre-weaning fase (< 2 months) 10% of animals were infected by *C. parvum*, while 15% and 2% of animals in post-weaning fase (\geq 2 months) were infected by *C. andersoni* and *C. ryanae* respectively. Moreover, it was also possible to notice in this study that the implementation of some changes at the farm management could be of great help for reducing the dissemination of the disease between the animals and the environmental contamination.

Keywords: *Cryptosporidium*, calf, management, molecular techniques, phylogeny

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Métodos de diagnóstico de <i>Cryptosporidium</i> utilizando amostras fecais.	4
Tabela 2 – Genes alvos, utilizados em técnicas moleculares no diagnóstico de <i>Cryptosporidium</i> .	8
Tabela 3 – Famílias subtipos de <i>Cryptosporidium parvum</i> identificadas através da genotipagem utilizando o gene alvo <i>GP60</i> .	11
Tabela 4 – Diferenças entre o gênero <i>Cryptosporidium</i> e os demais grupos de coccídios.	21
Tabela 5 – Controle positivo para <i>Cryptosporidium</i> , suas diluições e concentrações de DNA.	31
Tabela 6 – Quantificação e relação de absorvância do DNA extraído de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp. obtidos em amostras fecais de bezerros.	34
Tabela 7 – Ocorrência de diarreia em bezerros nas três propriedades estudadas.	64
Tabela 8 – Amostras fecais positivas para <i>Cryptosporidium</i> sp. provenientes de bezerros de acordo com a idade, presença ou ausência de diarreia, utilizando o diagnóstico microscópico e o molecular, em cada uma das três propriedades estudadas.	66
Tabela 9 – Amostras sequenciadas, suas respectivas espécies de <i>Cryptosporidium</i> e número de acesso no ‘GenBank’, de acordo com as propriedades analisadas e a idade dos animais.	69
Tabela 10 – Distribuição da incidência da infecção por <i>Cryptosporidium</i> spp. nas propriedades estudadas de acordo com a faixa etária dos bezerros.	80
Tabela 11 – Número de bezerros positivos para infecção por <i>Cryptosporidium</i> spp. na propriedade A durante as diferentes coletas de amostras fecais.	95
Tabela 12 – Amostras sequenciadas, suas respectivas espécies de <i>Cryptosporidium</i> e número de acesso no ‘GenBank’.	96

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – As possíveis rotas de transmissão de *Cryptosporidium parvum* (NICHOLS, 2007). 17
- Figura 2** – Árvore consenso, utilizando máxima parcimônia, retratando a relação entre gregarinas, *Cryptosporidium* e outros representantes do filo Apicomplexa (CARRENO et al., 1999). 20
- Figura 3** – Relações filogenéticas entre os principais subtipos de *C. parvum* (II) e *C. hominis* (I) baseado na análise Neighbor-Joining, utilizando o gene alvo *GP60* (XIAO; RYAN, 2007). 22
- Figura 4** – Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, reação da PCR com gradiente de temperatura variando entre 55° e 60°C, gene *18S*. As setas apontam para bandas inespecíficas. Tempo de exposição à luz ultravioleta foi de aproximadamente 1 segundo. M: marcador; C+: controle positivo da reação; C-: controle negativo da reação; 1: amostra 1; 2: amostra 2 e 3: amostra 3. 35
- Figura 5** – Gel de agarose a 1% corado com GelRedTM, reação de PCR com gradiente de temperatura variando entre 55° e 60°C, gene *18S*. As setas apontam para bandas inespecíficas. Tempo de exposição à luz ultravioleta foi de aproximadamente 1 segundo. M: marcador; C+: controle positivo da reação; C-: controle negativo da reação; 1: amostra 1; 2: amostra 2 e 3: amostra 3. 36
- Figura 6** – Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, reação de Nested-PCR com gradiente de temperatura variando entre 55° e 60°C, gene *18S*. Tempo de exposição à luz ultravioleta foi de aproximadamente 1 segundo. M: marcador; C+: controle positivo da reação; C-: controle negativo da reação; 1: amostra 1; 2: amostra 2 e 3: amostra 3. 37
- Figura 7** – Gel de agarose a 1% corado com GelRedTM, reação de Nested-PCR com gradiente de temperatura variando entre 55° e 60°C, gene *18S*. Tempo de exposição à luz ultravioleta foi de aproximadamente 1 segundo. M: marcador; C+: controle positivo da reação; C-: controle negativo da reação; 1: amostra 1; 2: amostra 2 e 3: amostra 3. 38
- Figura 8** – Gradiente de temperatura, variando entre 50° e 60°C, utilizado nas reações de PCR para o gene *GP60* em gel de agarose 1% utilizando brometo de etídio. O tempo de exposição à radiação UV foi de aproximadamente 0,9 segundos. M: marcador; C+: amostra concentrada do controle positivo, D1: diluição 1; D2: diluição 2 e C-: controle negativo. 40

Figura 9 – Gradiente de temperatura, variando entre 50° e 60°C, utilizado nas reações de PCR para o gene *GP60* em gel de agarose 1% utilizando *GelRedTM*. Seta aponta para banda de aproximadamente 650 pb. O tempo de exposição à radiação UV foi de aproximadamente 0,9 segundos. M: marcador; C+: amostra concentrada do controle positivo, D1: diluição 1; D2: diluição 2 e C-: controle negativo. 41

Figura 10 – Gradiente de temperatura, variando entre 50° e 60°C, utilizado nas reações de Nested-PCR para o gene *GP60* em gel de agarose 1% utilizando brometo de etídio. O tempo de exposição à radiação UV foi de aproximadamente 0,9 segundos. M: marcador; C+: amostra concentrada do controle positivo, D1: diluição 1; D2: diluição 2 e C-: controle negativo. 42

Figura 11 – Gradiente de temperatura, variando entre 50° e 60°C, utilizado nas reações de Nested-PCR para o gene *GP60* em gel de agarose 1% utilizando *GelRedTM*. O tempo de exposição à radiação UV foi de aproximadamente 0,9 segundos. M: marcador; C+: amostra concentrada do controle positivo, D1: diluição 1; D2: diluição 2 e C-: controle negativo. 43

Figura 12 – Controles positivos e negativos das reações da PCR-Nested em gel de agarose 1% utilizando brometo de etídio para o gene *18S*. O tempo de exposição a radiação UV foi de aproximadamente 0,9 segundos. A: reação da PCR primária; B: reação da Nested-PCR. M: marcador; C+: amostra concentrada do controle positivo, D1: diluição 1; D2: diluição 2; D3: diluição 3; D4: diluição 4; D5: diluição 5 e C-: controle negativo da reação. 44

Figura 13 – Controles positivos e negativos das reações de PCR-Nested em gel de agarose 1% utilizando *GelRedTM* para o gene *18S*. O tempo de exposição a radiação UV foi de aproximadamente 0,9 segundos. A: reação da PCR primária; B: reação da Nested-PCR. M: marcador; C+: amostra concentrada do controle positivo, D1: diluição 1; D2: diluição 2; D3: diluição 3; D4: diluição 4; D5: diluição 5 e C-: controle negativo da reação. 45

Figura 14 – Controles positivos e negativos das reações da PCR-Nested em gel de agarose 1% utilizando brometo de etídio para o gene *GP60*. O tempo de exposição a radiação UV foi de aproximadamente 0,9 segundos. A: reação da PCR primária; B: reação da Nested-PCR. M: marcador; C+: amostra concentrada do controle positivo, D1: diluição 1; D2: diluição 2; D3: diluição 3; D4: diluição 4; D5: diluição 5 e C-: controle negativo da reação. 46

Figura 15 – Controles positivos e negativos das reações de PCR-Nested em gel de agarose 1% utilizando *GelRedTM* para o gene *GP60*. O tempo de exposição a radiação UV foi de aproximadamente 0,9 segundos. A: reação da PCR primária; B: reação da Nested-PCR. M: marcador; C+: amostra concentrada do controle positivo, D1: diluição 1; D2: diluição 2; D3: diluição 3; D4: diluição 4; D5: diluição 5 e C-: controle negativo da reação. 47

Figura 16 – Animais utilizados no estudo provenientes da propriedade A e as instalações onde eles eram acondicionados. 60

- Figura 17** - Animais utilizados no estudo provenientes da propriedade B e as instalações onde eles eram acondicionados. 62
- Figura 18** - Animais utilizados no estudo provenientes da propriedade C e as instalações onde eles eram acondicionados. 63
- Figura 19** – Percentual de bezerros positivos para *Cryptosporidium* spp. baseado em microscopia óptica de campo claro e contraste de fase. 64
- Figura 20** – Percentual de todos os animais com sintomas de diarreia nas três propriedades estudadas. 65
- Figura 21** - Reação de Nested- PCR utilizando gene *18S* visualizado em gel de agarose a 1% corado com *GelRedTM*. Tempo de exposição à luz ultravioleta foi de 0,9 segundos. M: marcador; C+: controle positivo da reação; C-: controle negativo da reação; 1 a 11: amostras coletadas na propriedade A; 12 a 17: amostras coletadas na propriedade B; 18 a 28: amostra coletadas na propriedade C. 67
- Figura 22** – Alinhamento das sequências de *Cryptosporidium parvum*, *C. andersoni* e *C. ryanae*, utilizando gene 18S, encontradas parasitando bezerros de diferentes faixas etárias. Sequências alinhadas através do programa Clustal W 2.1 (LARKIN et al., 2007; GOUJON et al., 2010), destacando as diferenças entre cada sequência (cinza); região de polimorfismo (—); região de intenso polimorfismo (↑) e variação dentro da espécie *C. andersoni* (preto). 70-77
- Figura 23** – Percentual de infecção de cada espécie de *Cryptosporidium* encontrada no estudo e seus respectivos locais de coleta. 78
- Figura 24** – Árvore filogenética contruída a partir do sequenciamento (*18S*) de espécimes de *Cryptosporidium* encontrados parasitando bezerros em três propriedades leiteiras no Estado do Rio de Janeiro. A análise utilizada na construção da árvore foi a ‘Neighbor-Joining’ e os valores de ‘bootstrap’ encontram-se acima de 97%. 79
- Figura 25** – Percentual das espécies de *Cryptosporidium* encontradas em bezerros leiteiros de diferentes faixas etárias. 80
- Figura 26** - Reação de Nested- PCR utilizando gene *GP60* visualizado em gel de agarose a 1% corado com *GelRedTM*. Tempo de exposição à luz ultravioleta foi de 0,9 segundos. M: marcador; C-: controle negativo da reação; C+: controle positivo da reação; 1 a 11: amostras coletadas na propriedade A; 12 a 17: amostras coletadas na propriedade B; 18 a 28: amostra coletadas na propriedade C. Seta aponta para bandas de aproximadamente 400pb. As amostras 2; 6; 15; 18 e 19 não foram utilizadas pois não foi possível a amplificação do DNA extraído através da PCR-Nested utilizando o gene *18S*. 82

- Figura 27** – Foto via satélite da propriedade estudada. Observa-se em destaque as áreas onde eram mantidos os animais. Seta amarela: local do antigo bezerreiro (primeira coleta); Seta vermelha: local do novo bezerreiro (segunda e terceira coletas). 93
- Figura 28** – Local de manejo A da propriedade estudada. Destacando as instalações dos animais e o local de escoamento da água de limpeza das baias. 94
- Figura 29** – Local de manejo B da propriedade estudada. Destacando as novas instalações dos animais, a proximidade entre os animais de diferentes faixas etárias e o local de escoamento da água. 94
- Figura 30** - Reação de Nested- PCR utilizando gene 18S visualizado em gel de agarose a 1% corado com GelRedTM. M: marcador; C+: controle positivo da reação; C-: controle negativo da reação; 1 a 11: amostras diagnosticadas como positivas na microscopia. 96
- Figura 31** – Alinhamento das sequências de *Cryptosporidium parvum* e *C. andersoni*, utilizando gene 18S, encontradas parasitando bezerros de diferentes faixas etárias. Sequências alinhadas através do programa Clustal W 2.1 (LARKIN et al., 2007; GOUJON et al., 2010), destacando as diferenças entre cada sequência (cinza); região de polimorfismo (—); região de intenso polimorfismo (↑) e variação dentro da espécie *C. andersoni* (preto). 97-104
- Figura 32** – Árvore filogenética contruída a partir do sequenciamento (18S) de espécimes de *Cryptosporidium* encontrados parasitando bezerros em uma propriedade leiteira no Estado do Rio de Janeiro. A análise utilizada na construção da árvore foi a ‘Neighbor-Joining’ e os valores de ‘bootstrap’ são de 100%. 105
- Figura 33** – Reação de Nested- PCR utilizando gene *GP60* visualizado em gel de agarose a 1% corado com GelRedTM. Tempo de exposição à luz ultravioleta foi de 0,9 segundos. M: marcador; C-: controle negativo da reação; C+: controle positivo da reação; 1 a 7: amostras coletadas sob o sistema de manejo A; 8 a 11: amostras coletadas sob o sistema de manejo B. Seta aponta para bandas de aproximadamente 400pb. As amostras 2 e 6 não foram utilizadas pois não foi possível a amplificação do DNA extraído através da PCR-Nested utilizando o gene 18S. 106
- Figura 34** – Taxa da infecção por *Cryptosporidium* spp. em bezerros, levando em consideração a alteração do local do bezerreiro na propriedade. 107

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Variações morfométricas dos oocistos descritos na literatura para *Cryptosporidium parvum*. 10
- Quadro 2** – Subtipos de *Cryptosporidium parvum* parasitando diversos hospedeiros. 12
- Quadro 3** – Sequências utilizadas para serem comparadas com as obtidas no estudo. 59

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Criptosporidiose Bovina	3
2.2. Diagnóstico da Criptosporidiose Bovina	4
2.2.1. Diagnóstico através da microscopia	5
2.2.2. Diagnóstico por ensaio imunoenzimático	6
2.2.3. Diagnóstico através da biologia molecular	6
2.3. Espécies de <i>Cryptosporidium</i> Diagnosticadas em Bovinos	8
2.3.1. <i>Cryptosporidium parvum</i>	9
2.3.1.1. Os subtipos de <i>Cryptosporidium parvum</i>	10
2.3.2. <i>Cryptosporidium andersoni</i>	12
2.3.3. <i>Cryptosporidium bovis</i>	13
2.3.4. <i>Cryptosporidium ryanae</i>	14
2.4. A Influência da Idade dos Animais e a Espécie de <i>Cryptosporidium</i>	14
2.5. O Manejo dos Animais e a Criptosporidiose	15
2.6. A Contaminação Ambiental por <i>Cryptosporidium</i> sp	16
2.7. A Transmissão e Importância como Zoonose	16
2.7.1. <i>Cryptosporidium parvum</i> x <i>Cryptosporidium hominis</i>	18
2.8. <i>Cryptosporidium</i> sp. em Bovinos no Brasil	19
2.9. Estudos Filogenético	19
3. CAPÍTULO I - PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO DE DNA E DA TÉCNICA DA PCR UTILIZADA PARA O DIAGNÓSTICO DE <i>Cryptosporidium</i> EM FEZES DE BEZERROS	23
RESUMO	24
ABSTRACT	25
3.1. INTRODUÇÃO	26
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.2.1. Origem das Amostras, seu Processamento e Diagnóstico Microscópico	28
3.2.2. Extração de DNA	28
3.2.2.1. Protocolo de extração I	28
3.2.2.2. Protocolo de extração II	29
3.2.3. Qualidade do DNA Extraído	29
3.2.4. Métodos de Coloração de Géis de Agarose	30
3.2.5. Controles Positivo e Negativo da Reação de PCR Primário e PCR-Nested	30
3.2.6. Padronização das Reações de PCR Primária e Nested-PCR para o Gene <i>I8S</i>	31
3.2.7. Padronização das Reações da PCR Primária e Nested-PCR para o Gene <i>GP60</i>	32
3.2.8. Purificação e Quantificação	33

3.3. RESULTADOS	34
3.3.1. Extração das Amostras	34
3.3.2. Gradiente de Temperatura	34
3.3.2.1. Gene alvo <i>18S</i>	34
3.3.2.2. Gene alvo <i>GP60</i>	39
3.3.2.3. PCR e PCR-Nested do controle positivo – Genes alvo <i>18S</i> e <i>GP60</i>	44
3.4. DISCUSSÃO	48
3.4.1. Extração do DNA	48
3.4.2. Gradiente de Temperatura	48
3.4.3. Brometo de Etídio x GelRed TM	49
3.5. CONCLUSÃO	51
4. CAPÍTULO II - ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO POR <i>Cryptosporidium</i> spp. EM BEZERROS DESTINADOS A EXPLORAÇÃO LEITEIRA E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DAS ESPÉCIES DIAGNOSTICADAS	52
RESUMO	53
ABSTRACT	54
4.1. INTRODUÇÃO	55
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	57
4.2.1. Locais de Realização do Estudo	57
4.2.2. Etapas do Estudo	57
4.2.3. Análise Estatística	57
4.2.4. Coleta das Amostras Fecais	57
4.2.5. Procedimentos Laboratoriais das Amostras Fecais	58
4.2.6. Sequenciamento Gene <i>SSUrRNA (18S)</i>	58
4.2.7. Sequenciamento Gene <i>GP60</i>	59
4.2.8. Análise Filogenética	59
4.3. RESULTADOS	60
4.3.1. Descrição dos Locais de Coleta de Amostras	60
4.3.1.1. Propriedade A	60
4.3.1.2. Propriedade B	61
4.3.1.3. Propriedade C	62
4.3.2. Diagnóstico Microscópico e PCR-Nested Utilizando Gene Alvo <i>18S</i>	63
4.3.3. Sequenciamento Utilizando Gene Alvo <i>18S</i>	68
4.3.4. Filogenia Gene Alvo <i>18S</i>	78
4.3.5. Faixa Etária dos Bezerros e Espécie de <i>Cryptosporidium</i> Prevalente	80
4.3.6. PCR-Nested Utilizando Gene Alvo <i>GP60</i>	81
4.4. DISCUSSÃO	83
4.4.1. Prevalência das Diferentes Espécies de <i>Cryptosporidium</i> e a Idade dos Animais	83
4.4.2. Microscopia x PCR	84

4.4.3. Relação entre a Presença de Diarréia e a Infecção por <i>Cryptosporidium</i> spp.	85
4.5. CONCLUSÃO	86
5. CAPÍTULO III - A INFLUÊNCIA DO MANEJO NA PREVALENCIA DE <i>Cryptosporidium</i> spp. EM BEZERROS DESTINADOS A EXPLORAÇÃO LEITEIRA	87
RESUMO	88
ABSTRACT	89
5.1. INTRODUÇÃO	90
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	91
5.2.1. Etapas do Estudo	91
5.2.2. Análise Estatística	91
5.2.3. Coleta das Amostras Fecais	91
5.2.4. Processamento, Sequenciamento e Análise Filogenética das Amostras	91
5.3. RESULTADOS	92
5.3.1. Os Animais e a Propriedade	92
5.3.2. Diagnóstico Microscópico e PCR-Nested Utilizando Gene <i>18S</i>	95
5.3.3. Sequenciamento Utilizando o Gene <i>18S</i>	96
5.3.4. Filogenia Gene Alvo <i>18S</i>	105
5.3.5. PCR-Nested Utilizando Gene Alvo <i>GP60</i>	106
5.3.6. Alteração no Local da Instalação dos Animais	106
5.4. DISCUSSÃO	108
5.4.1. Potencial Zoonótico das Espécies Encontradas no Brasil	108
5.4.2. A Influência do Manejo x Percentual de Infecção por <i>Cryptosporidium</i> spp.	108
5.5. CONCLUSÕES	110
6. CONCLUSÕES GERAIS	111
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112

1. INTRODUÇÃO GERAL

A criação de bovinos em nosso país teve início por volta dos anos de 1530 onde hoje se encontra o Estado de São Paulo. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE – 2009), o Brasil possui o segundo maior rebanho bovino do mundo, tendo sido ultrapassado em 2008 pela Índia, que hoje ocupa o primeiro lugar no ranking.

A região Sudeste possui o terceiro maior percentual de bovinos representando 18,5% do rebanho nacional, sendo o Estado de Minas Gerais o maior produtor leiteiro, com 26,8% da produção (IBGE – 2009). O Sudeste brasileiro possui a maior bacia leiteira do país e é responsável pelo abastecimento dos principais mercados consumidores de laticínios do Brasil.

A produção de leite do Estado do Rio de Janeiro atingiu um crescimento considerável, de acordo com o Censo Agropecuário (IBGE - 2006) o estado produziu 422.129 mil litros de leite, sendo responsável por 6% da produção regional. Os rebanhos leiteiros do Estado encontram-se difundidos em todo o território, porém a maior concentração de propriedades leiteiras está distribuída entre o Vale do Paraíba e o Norte Fluminense.

Um dos principais problemas encontrado na produção leiteira está relacionado ao aspecto sanitário das criações. Diversas doenças entéricas são diagnosticadas comprometendo o desempenho do rebanho em várias partes do Brasil. As doenças parasitárias são consideradas de grande relevância, destacando-se as causadas por protozoários, na qual a criptosporidiose tem sido responsável por perdas econômicas significativas, relacionada à morbidade e mortalidade dos animais.

A infecção por *Cryptosporidium* sp. está associada a um quadro clínico de diarreia intensa e, dependendo do manejo da propriedade, das condições nutricionais do animal, e da presença infecções concomitantes, pode em pouco tempo acarretar a morte do hospedeiro.

O gênero *Cryptosporidium* tem sido classificado junto com outros coccídios entéricos na ordem Eucoccidiorida com base nas similaridades das características morfológicas do oocisto e de seu ciclo de vida. Sendo que, as similaridades na morfologia dos oocistos, não sustentam uma classificação segura para espécies.

O gênero *Cryptosporidium* possui espécies com a capacidade de infectar vários hospedeiros animais, tanto domésticos quanto silvestres, além de algumas espécies infectarem o homem. A infecção ocorre através da ingestão de oocistos provenientes das fezes de hospedeiros infectados, onde a veiculação hídrica é a principal rota de transmissão e através da ingestão de água e alimentos contaminados ocorre a infecção para hospedeiros susceptíveis.

A importância relativa dessas rotas de transmissão na epidemiologia da criptosporidiose não é totalmente esclarecida, em grande parte devido as tradicionais ferramentas de diagnóstico não terem a capacidade de diferenciar as fontes do protozoário, e os inquéritos epidemiológicos serem raros.

Na última década, porém, inúmeras técnicas da biologia molecular foram desenvolvidos para detectar e diferenciar *Cryptosporidium* spp. em espécies, genótipos e subtipos. Essas ferramentas são cada vez mais utilizadas em estudos epidemiológicos de criptosporidiose em áreas endêmicas e epidêmicas, o que melhorou significativamente a compreensão da transmissão da criptosporidiose em humanos e animais.

No hospedeiro, bovino, têm sido registrados dez espécies de *Cryptosporidium* e um genótipo adicional, embora somente quatro espécies sejam diagnosticadas rotineiramente, *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium bovis*, *Cryptosporidium andersoni* e *Cryptosporidium ryanae* (anteriormente conhecido como o genótipo ‘deer-like’). Sendo que

cada uma destas quatro espécies apresentam um padrão diferente de prevalência em relação à idade do animal.

É muito importante a partir de uma perspectiva de saúde pública a identificação das espécies de *Cryptosporidium* que infectam bovinos, devido ao fato destes animais poderem estar parasitados pela espécie *C. parvum* que apresenta potencial zoonótico.

A identificação das espécies de *Cryptosporidium* baseia-se em métodos moleculares que inclui diagnóstico utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase– PCR (‘Polymerase Chain Reaction’) seguido pela Técnica do Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição – RFLP (‘Restriction Fragment Length Polimorfism’) e pelo sequenciamento de DNA.

Diversos genes alvo são descritos na literatura como eficientes para identificar as diferentes espécies de *Cryptosporidium*, porém o mais utilizado e mais confiável até o momento é o gene *SSUrRNA* (‘small subunit RNA’) também conhecido como *18S*.

A maioria das técnicas de PCR utiliza ‘primers’, ou iniciadores, com regiões que são conservadas para todas as espécies de *Cryptosporidium*. Aparentemente isto é um fator limitante para o diagnóstico, pois, rotineiramente apenas a espécie que apresenta uma maior quantidade de oocistos na amostra é diagnosticada. Dessa forma, quando o hospedeiro apresenta-se infectado por mais de uma espécie (infecções concomitantes) torna-se difícil diagnosticar a espécie de *Cryptosporidium* que apresenta menor quantidade de oocistos nas amostras. Isso pode prejudicar a capacidade de compreensão da epidemiologia de *Cryptosporidium* sp. em bovinos e também em outros hospedeiros, já que um único hospedeiro pode estar parasitado por mais de uma espécie.

Os estudos realizados com a genotipagem de amostras brasileiras de *Cryptosporidium* spp. utilizando o hospedeiro bovino são escassos, havendo uma grande necessidade da identificação das espécies que infectam esses animais no país.

O principal objetivo do estudo foi diagnosticar a presença de *Cryptosporidium* spp. em bezerros criados em propriedades leiteiras, localizadas no Estado do Rio de Janeiro. Através da utilização de técnicas moleculares para o diagnóstico de espécies de *Cryptosporidium* presentes nessas criações, realizar o sequenciamento e a análise filogenética dos espécimes encontrados, incluindo o depósito das sequências de *Cryptosporidium* no ‘GenBank’, além de verificar possíveis fatores de risco associados à infecção de espécie/genótipo de *Cryptosporidium* estabelecendo a sua importância zoonótica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Criptosporidiose Bovina

A criptosporidiose bovina foi relatada pela primeira vez em 1971, onde foram observados diferentes estágios do protozoário *Cryptosporidium* infectando células intestinais do jejuno de uma novilha da raça Santa Gertrudes de aproximadamente oito meses de idade, que apresentava anorexia, fraqueza e ataxia, além de um quadro de diarreia crônica (PANCIERA et al., 1971).

Desde então, a doença vem sendo descrita infectando bovinos em diversas partes do mundo, sendo que *Cryptosporidium* spp. tem sido diagnosticado tanto em rebanhos leiteiros quanto naqueles destinados produção de carne (BECHER et al., 2004; HAJDUŠEK et al., 2004; ABE et al., 2006; ALVES et al., 2006; CASTRO-HERMIDA et al., 2007; GEURDEN et al., 2007; MENDONÇA et al., 2007; KESHAVARZ et al., 2009; COKLIN et al., 2010; DÍAZ et al., 2010; FAYER et al., 2010a; KHAN et al., 2010; MEIRELES et al., 2011; NAZEMALHOSSEINI-MOJARAD et al., 2011).

A transmissão da criptosporidiose ocorre devido à ingestão de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em água e/ou alimentos contaminados e através do contato direto com material fecal de indivíduos infectados que estejam eliminando a forma infectante (FENG et al., 2007; LAGKJÆR et al., 2007; COKLIN et al., 2009; BOYER; KUCZYNSKA, 2010; CHAKO et al., 2010; CHALMERS; GILES, 2010; DIXON et al., 2011).

A criptosporidiose bovina pode acometer animais em diversas faixas etárias, podendo ou não apresentar sintomatologia clínica e geralmente ocasionando grandes perdas econômicas (FARIZAWATI et al., 2005; GEURDEN et al., 2007; CASTRO-HERMIDA et al., 2009; DE WAELE et al., 2011; KHAN et al., 2010; DAS et al., 2011).

Os animais mais jovens são considerados mais suscetíveis à infecção e também a apresentarem sintomas clínicos (CHAKO et al., 2010). Em bezerras com até três meses de idade a doença geralmente pode acarretar intensa diarreia, ocasionando morbidade e em alguns casos até a morte (FARIZAWATI et al., 2005; SANTÍN; TROUT, 2007; CHAKO et al., 2010). Animais assintomáticos também podem ser responsáveis pela infecção de outros hospedeiros e pela contaminação ambiental (FARIZAWATI et al., 2005), tendo em vista que é necessária a ingestão de uma pequena quantidade de oocistos para que um novo hospedeiro seja infectado e se torne um disseminador da forma infectante (BOYER; KUCZYNSKA, 2010).

Os sintomas da infecção, além de sua severidade geralmente estão associados à espécie de *Cryptosporidium* e ao estado de saúde do hospedeiro (BROGLIA et al., 2008; XIAO, 2010).

Bovinos acometidos pela criptosporidiose e que apresentam fezes diarreicas são capazes de eliminar grandes quantidades de oocistos no ambiente durante o período patente da doença, tornando-se um grande dispersor do protozoário no ambiente (SANTÍN; TROUT, 2007).

2.2. Diagnóstico da Criptosporidiose

O diagnóstico da criptosporidiose não deve ser baseado apenas na observação da sintomatologia clínica, pois muitas outras enterites gastrointestinais podem apresentar sintomas clínicos semelhantes. Dessa forma faz-se necessário a utilização de técnicas específicas para a detecção de *Cryptosporidium* sp. (KAR et al., 2011).

Existem inúmeras formas de diagnosticar a presença de *Cryptosporidium* sp. em um hospedeiro com suspeita de criptosporidiose, porém todas as metodologias descritas na literatura apresentam vantagens e desvantagens (SMITH, 2007; CHALMERS, 2009) (Tabela 1).

Inicialmente, o diagnóstico da criptosporidiose era feito a partir da observação microscópica de amostras obtidas em material de biópsia, hoje os exames utilizados para identificar a presença de *Cryptosporidium* sp. são na maioria das vezes coproparasitológicos (MAGI et al., 2006).

A metodologia utilizada para o diagnóstico pode variar desde um simples exame de fezes através da microscopia, a um sofisticado exame utilizando técnicas moleculares. A escolha do método a ser empregado depende de vários fatores, porém dois podem ser considerados principais: Primeiro é a especificidade do diagnóstico com a necessidade de classificar o protozoário até espécie, onde devem ser instituídas várias ferramentas moleculares como as técnicas 'Polymerase Chain Reaction', mais conhecido como PCR, além do RFLP ('Restriction Fragment Length Polimorphism') e do sequenciamento. Porém, se a finalidade for apenas diagnosticar a presença de oocistos de *Cryptosporidium* sp. em exames fecais de rotina, a microscopia seria uma metodologia suficiente (HUBER, 2007).

Outro fator a ser observado antes da escolha da metodologia é a infra-estrutura laboratorial, visando por exemplo evitar a contaminação do material, além da capacitação de pessoal na realização da emissão de um diagnóstico correto (HUBER, 2007).

Tabela 1- Métodos de diagnóstico de *Cryptosporidium* utilizando amostras fecais.

PROCEDIMENTO	ALVO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Microscopia	Oocisto	Baixo custo	Necessita pessoal treinado para diagnóstico, possui baixa sensibilidade e especificidade, detecta outros patógenos.
Imunoensaio	Antígeno	Não necessita pessoal treinado, pode ser utilizado a campo	Alto custo pode apresentar resultados falsos positivos e negativos.
Biologia Molecular	DNA	Alta especificidade	Alto custo, restrito a laboratórios especializados.

Fonte: Modificado de SMITH, 2007; CHALMERS, 2009.

2.2.1. Diagnóstico através da microscopia

Durante muito tempo a microscopia foi o único método utilizado para diagnosticar a presença de oocistos de *Cryptosporidium* sp. em amostras fecais (FAYER, 2007).

Diversas tecnologias microscópicas podem ser utilizadas para identificação de *Cryptosporidium* sp., dentre elas podemos citar a de campo claro, o contraste de fase, o contraste de interferência diferencial (DIC) e a de imunofluorescência (IFA) (FAYER, 2007; SMITH, 2007).

Em todos os tipos de diagnóstico microscópico podem ser utilizadas técnicas de concentração como a flutuação e sedimentação, além de colorações dos esfregaços fecais para auxiliar a visualização dos oocistos (FAYER et al., 2000; SMITH, 2007). No entanto, apesar das técnicas de coloração auxiliar na visualização da forma infectante, pode haver interpretação errônea quando a carga parasitária estiver baixa, gerando falso negativo.

Além disso, no material fecal existem várias estruturas com as mesmas afinidades tintoriais que os oocistos, o que pode dificultar o diagnóstico dependendo do microscopista. Um bom observador consegue distinguir tais estruturas com segurança, porém um observador pouco treinado faria a emissão de um diagnóstico positivo. Outro problema referente à coloração seria a obtenção de dados morfométricos não fidedígnos, pelo fato de muitas técnicas usarem o calor para fixação dos corantes, acarretando o aparecimento de distorções no formato dos oocistos. Uma exceção seria a utilização de coloração em imunofluorescência onde os oocistos podem ser mensurados com uma precisão razoável (SMITH, 2007).

O diagnóstico laboratorial de *Cryptosporidium* sp. realizado através da observação de esfregaço fino de fezes em lâmina, pode apresentar uma pequena quantidade de oocistos, principalmente se o indivíduo infectado for assintomático. Na tentativa de melhorar a precisão do diagnóstico, técnicas de concentração podem ser empregadas, possibilitando um aumento no número de oocistos a serem observados. As técnicas mais comumente utilizadas são as técnicas de flutuação em solução saturada de açúcar, a concentração em formol-éter, a flutuação em solução saturada de cloreto de sódio e sulfato de zinco (HUBER et al., 2004; HUBER, 2007; SMITH, 2007).

A técnica de flutuação em solução saturada de açúcar é considerada uma excelente metodologia de concentração para obtenção de oocistos em amostras fecais, principalmente se o hospedeiro estiver uma carga parasitária alta. Já se o indivíduo apresentar uma infecção subclínica, eliminando poucos oocistos, a técnica poderá facilitar o diagnóstico da criptosporidiose (GARCIA et al., 1983; HUBER et al., 2004). Porém, a leitura microscópica das amostras em lâminas utilizando essa técnica, deve ser realizada rapidamente, isto porque, os oocistos após um intervalo de aproximadamente 15 minutos perdem sua coloração rósea, característica da técnica quando observado em microscopia de campo claro, e começam a deformar com facilidade perdendo o formato esférico (HUBER et al., 2004).

Para o diagnóstico microscópico se faz necessário o uso de muito tempo e pessoal capacitado para fazer a identificação do gênero do protozoário, pois as similaridades morfológicas dos oocistos entre as espécies tornam impossíveis sua identificação específica (FAYER et al., 2000; HUBER et al., 2004; FAYER, 2007; SMITH, 2007; FAYER, 2010; XIAO, 2010).

2.2.2. Diagnóstico por ensaio imunoenzimático

Os ensaios enzimáticos mais comumente utilizados na detecção da infecção por *Cryptosporidium* sp. são o ELISA ('Enzyme Linked Immunosorbent Assay') e o ensaio imunocromatográfico (SMITH, 2007). Porém ainda podem ser utilizados testes com anticorpo policlonal fluorescente, reação de aglutinação em látex, imunofluorescência com anticorpos monoclonais, hemaglutinação passiva reversa e imunoserologia usando a detecção por imunofluorescência (FAYER et al., 2000).

A utilização de kits enzimáticos pode ser uma ferramenta de grande utilidade no diagnóstico da criptosporidiose, pois os antígenos de *Cryptosporidium* podem ser detectados em suspensão fecal que contenha ou não as formas infectantes. Ou seja, possuem uma boa sensibilidade, podendo detectar a presença do protozoário mesmo que este não esteja sendo eliminado nas fezes. Além disso, a utilização do kit demanda menos tempo para a obtenção do diagnóstico e ao contrário do que ocorre na microscopia, não necessita de pessoal treinado para utilizá-lo (SMITH, 2007). Apesar disso, as metodologias baseadas em anticorpos podem apresentar problemas devido à reação cruzada com outros microrganismos (FAYER et al., 2000). Devido a sua rapidez e alta sensibilidade essa metodologia vem sendo introduzida em alguns laboratórios, principalmente aqueles com um grande volume de análises, como um novo diagnóstico de rotina (CHALMERS, 2009).

2.2.3. Diagnóstico através da biologia molecular

Nos últimos anos, as técnicas de biologia molecular utilizadas para a detecção de *Cryptosporidium* sp. se desenvolveram, sendo eficazes não apenas no diagnóstico das espécies e genótipos, mas identificando os espécimes inclusive em subtipos, propiciando um melhor entendimento da biologia e da epidemiologia do protozoário (XIAO; RYAN, 2007; XIAO, 2010). Tal metodologia é utilizada principalmente para fins de pesquisa, já que seu custo é extremamente elevado para ser utilizado como exame de rotina laboratorial (MAGI et al., 2006).

Através da utilização dessas ferramentas, espécies como *Cryptosporidium parvum* mantiveram seu status de espécie além de ter seus subtipos melhor reagrupados, outras como *C. andersoni*, *C. bovis* e *C. ryanae* foram renomeadas e consideradas como novas espécies (LINDSAY et al., 2000; FAYER et al., 2005; FAYER et al., 2008; XIAO, 2010).

Diversos genes alvos são utilizados para caracterizar genotipicamente as espécies pertencentes ao gênero *Cryptosporidium*, dentre eles podemos citar o *SSUrRNA* ('small subunit ribosomal RNA'), *COWP* ('oocyst wall protein'), *HSP70* ('70-kDa heat shock protein') e o gene codificante da Actina como os escolhidos com maior frequência (XIAO; RYAN, 2007).

O principal gene alvo utilizado para o diagnóstico de criptosporidiose, através da aplicação das técnicas de PCR-RFLP é o gene *SSUrRNA* (também conhecido como *18S*), estando presente em 98% dos estudos desenvolvidos por vários autores (FAYER, 2007; XIAO, 2010).

A ampla utilização do gene *SSUrRNA* para a genotipagem de *Cryptosporidium* é devido principalmente a sua natureza de cópia- múltipla, além da presença de regiões semi-conservadas e hiper-variáveis o que facilita o desenho de 'primers' específicos para o gênero (XIAO, 2010).

A subtipagem também vem sendo amplamente utilizada em diversos estudos, principalmente no que se refere à *Cryptosporidium hominis* e *C. parvum*, e uma das ferramentas mais utilizadas é o gene alvo '60 kDa glicoprotein' (*GP60*, também chamado de *GP40/15*) na PCR-Nested (PENG et al., 2001; SULAIMAN et al., 2005; ABE et al., 2006; ALVES et al., 2006; FAYER, 2007; GEURDEN et al., 2007; GEURDEN et al., 2008; JEX; GASSER, 2008; DÍAZ et al., 2010; XIAO, 2010; MEIRELES et al., 2011; NAZEMALHOSSEINI-MOJARAD et al., 2011).

O gene *GP60* é responsável por codificar duas glicoproteínas da superfície celular do protozoário, a *GP40* e a *GP15*, que aparentemente estão envolvidas na fixação dos esporozoítas responsáveis pela invasão dos enterócitos (JEX; GASSER, 2008). As glicoproteínas *GP40* e *GP15* estão localizadas em diferentes sítios do esporozoíto de *Cryptosporidium parvum*. Estudos realizados por CEVALLOS et al. (2000) sugerem que a *GP40* encontra-se localizada no complexo apical, enquanto que a *GP15* pode ser encontrada por toda a superfície do esporozoíto.

A importância da utilização do gene alvo *GP60* vai além da identificação de subtipos de *C. parvum* e *C. hominis*, estudos sugerem que as proteínas codificadas por esse gene podem ser utilizadas futuramente como alvos para prevenção ou para fins terapêuticos (CEVALLOS et al., 2000; JEX; GASSER, 2008).

Além dos genes mencionados anteriormente, diversos outros genes alvo podem ser utilizados na identificação das diferentes espécies de *Cryptosporidium* (SMITH, 2007) (Tabela 2).

Tabela 2 – Genes alvos, utilizados em técnicas moleculares no diagnóstico de *Cryptosporidium*.

GENE ALVO	TÉCNICA MOLECULAR	DIAGNÓSTICO
<i>SSUrRNA (18S)</i>	PCR, PCR-nested, sequenciamento, PCR-RFLP, PCR-tempo real, microarranjo	Identificação de espécies e genótipos
<i>HSP70</i>	PCR, PCR-nested, sequenciamento, PCR-tempo real, microarranjo	Identificação de espécies e genótipos
<i>COWP</i>	PCR, PCR-nested, sequenciamento, PCR-RFLP, microarranjo	Identificação de espécies e genótipos
Gene codificante da Actina	PCR, PCR-nested, sequenciamento	Identificação de espécies e genótipos
<i>β-tubulina</i>	PCR, PCR-nested, sequenciamento, PCR-RFLP	Identificação de espécies e genótipos
<i>GP60</i>	PCR, PCR-nested, sequenciamento	Identificação de subgenótipos
Microsatélites	PCR, PCR-nested, sequenciamento, tipificação de fragmento	Identificação de subgenótipos
Minisatélites	PCR, PCR-nested, sequenciamento, tipificação de fragmento	Identificação de subgenótipos
RNA fita dupla extracromossomal	Transcriptase reversa, PCR, sequenciamento, ensaio de mobilidade heteroduplex	Identificação de subgenótipos

Fonte: Modificado de SMITH, 2007

2. 3. Espécies de *Cryptosporidium* Diagnosticadas em Bovinos

O hospedeiro bovino pode se infectar por diversas espécies de *Cryptosporidium*, entre elas: *Cryptosporidium parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni*, *C. ryanae*, *C. hominis*, *C. suis*, *C. suis-like*, *C. felis*, *C. canis*, e *C. ubiquitum* (GEURDEN et al., 2007; FAYER et al., 2009;

SANTÍN; TROUT, 2007; FAYER, 2010; FAYER et al., 2010b). Porém, as espécies comumente encontradas parasitando bovinos são *Cryptosporidium parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni* e *C. ryanae* (CASTRO-HERMIDA et al., 2007; FENG et al., 2007; GEURDEN et al., 2007; LAGKJÆR et al., 2007; COKLIN et al., 2009; FAYER et al., 2008; SANTÍN; TROUT, 2007; KESHAVARZ et al., 2009; CHAKO et al., 2010; CHALMERS; GILES, 2010; FAYER, 2010; FAYER et al., 2010a; KHAN et al., 2010; KVÁČ et al., 2011; XIAO, 2010; DAS et al., 2011; DIXON et al., 2011; MEIRELES et al., 2011).

2.3.1. *Cryptosporidium parvum*

A primeira descrição da espécie conhecida como *Cryptosporidium parvum* foi realizada em 1912 por Ernest Edward Tyzzer, onde foram observados as formas infectantes e os aspectos biológicos do ciclo de vida do protozoário que foi encontrado parasitando o intestino delgado de camundongos (MORGAN-RYAN et al., 2002; ŠLAPETA, 2009).

Antes do desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, a identificação das espécies de *Cryptosporidium* era realizada basicamente através dos caracteres morfológicos com a utilização da microscopia, observando principalmente dados de biometria, o local de parasitismo do protozoário associando-se as espécies de hospedeiro a qual era diagnosticada (COKLIN et al., 2009; SANTÍN; TROUT, 2007; FAYER, 2010).

TYZZER (1912) descreveu a espécie *Cryptosporidium parvum* como sendo um coccídio muito semelhante à *Cryptosporidium muris*, que o mesmo autor identificou e nomeou-a como uma nova espécie em 1907.

Apesar das similaridades morfológicas entre *C. parvum* e *C. muris* algumas diferenças entre ambas as espécies foram relatadas. Análises histopatológicas evidenciaram uma diferença entre elas tendo como base a observação do local de parasitismo no hospedeiro, as formas sexuadas e assexuadas de *C. parvum* puderam ser observadas parasitando a região apical do epitélio intestinal, sendo encontradas principalmente no intestino delgado (TYZZER, 1912; SANTÍN; TROUT, 2007; FAYER, 2010), enquanto que *C. muris* geralmente era encontrado parasitando as glândulas gástricas (TYZZER, 1907; FAYER, 2010).

As formas infectantes, oocistos, podem ser observadas nas fezes do indivíduo infectado, apresentando formato ovóide ou esférico e não ultrapassam 4,5µm de diâmetro maior (variando de 4,0 x 3,3µm a 4,5 x 3,0µm) (TYZZER, 1912; FAYER, 2007), sendo ligeiramente menor do que *C. muris* (TYZZER, 1907; FAYER, 2010). Pode-se ainda observar quatro esporozoítas dentro do oocisto sem a presença de um esporocisto, além de uma massa residual chamada de resíduo do oocisto (TYZZER, 1912).

Alguns autores descreveram variações morfométricas para o oocisto de *C. parvum* (Quadro 1). Tais oocistos foram descritos infectando mais de 150 hospedeiros distintos, e recentemente após estudos biológicos e moleculares algumas dessas formas infectantes foram consideradas como novas espécies pertencentes ao gênero *Cryptosporidium* (FAYER et al., 2005).

Cryptosporidium parvum pode infectar bovinos em diferentes faixas etárias, acometendo principalmente os animais mais novos, em fase de pré-desmame (CASTRO-HERMIDA et al., 2007; SMITH, 2007; BAJER, 2008; BROOK et al., 2008; COKLIN et al., 2009; KESHAVARZ et al., 2009; CHAKO et al., 2010; COKLIN et al., 2010; FAYER et al., 2010a; XIAO, 2010). A infecção por esta espécie de *Cryptosporidium* em bezerros

geralmente é caracterizada por uma diarreia aquosa, profusa e de início agudo (SANTÍN; TROUT, 2007; CHAKO et al., 2010).

A eliminação de oocistos nas fezes de bovinos é variável sendo mais intensa em animais que apresentam fezes diarréicas (SMITH, 2007). Um bezerro infectado por *C. parvum* e que apresente um quadro de diarreia pode eliminar durante o período patente da infecção entre 10^7 e 10^{10} oocistos por grama de fezes (SANTÍN; TROUT, 2007).

Alguns estudos relatam a correlação entre a presença de fezes diarréicas e a infecção por *C. parvum* (CASTRO-HERMIDA et al., 2007; DÍAZ et al., 2010), porém esta não é a única sintomatologia descrita, além delas podemos observar depressão, anorexia e fraqueza (SANTÍN; TROUT, 2007).

A infecção por *C. parvum* é considerada de alto potencial zoonótico, podendo infectar o homem através da eliminação de oocistos tanto pelos bovinos quanto pelo próprio homem (ALVES et al., 2006; CHAKO et al., 2010; DÍAZ et al., 2010; XIAO, 2010; DIXON et al., 2011).

Quadro 1 – Variações morfométricas dos oocistos descritos na literatura para *Cryptosporidium parvum*.

AUTOR	DIÂMETRO MAIOR (µm)	DIÂMETRO MENOR (µm)	MÉDIA (µm)	IM
UPTON; CURRENT, 1985	4,5 – 5,4	4,2 – 5,0	5,0 x 4,5	1,1
FAYER et al., 2001	4,7 – 6,0	4,4 – 5,0	5,0 x 4,7	1,06
FALL et al., 2003	5,0 – 5,5	3,7 – 5,0	5,2 x 4,3	1,20

IM = ÍNDICE MORFOMÉTRICO

2.3.1.1. Os subtipos de *Cryptosporidium parvum*

A espécie *Cryptosporidium parvum* é a de maior prevalência em bovinos (FAYER et al., 2009), porém pode ser encontrada infectando diversos outros mamíferos inclusive o homem (CHALMERS et al., 2011; FAYER, 2010; XIAO, 2010; DAS et al., 2011). Dessa forma diversos estudos vêm sendo realizados para identificar a presença de genótipos zoonóticos de *C. parvum* em bovinos (XIAO, 2010).

A maioria dos estudos envolvendo subgenotipagem de *C. parvum*, sendo eles em bovinos de leite, bovinos de corte ou no homem, vem utilizando o gene alvo *GP60* (PENG et al., 2001; SULAIMAN et al., 2005; ABE et al., 2006; ALVES et al., 2006; GEURDEN et al., 2007; BROGLIA et al., 2008; FAYER et al., 2009; XIAO, 2010; NAZEMALHOSSEINI-MOJARAD et al., 2011).

Sequências representativas de alguns subgenótipos de *C. parvum* foram descritas por XIAO (2010) (Tabela 3).

Diferentes estudos realizados em países industrializados revelou que a maioria dos bovinos encontram-se infectados pelo subtipo Ila que possui elevado potencial zoonótico (XIAO, 2010).

Tabela 3 – Famílias subtipos de *Cryptosporidium parvum* identificadas através da genotipagem utilizando o gene alvo *GP60*.

ESPÉCIE	FAMÍLIAS SUBTIPOS	SUBTIPO MAIS COMUM
<i>C. parvum</i>	IIa	IIaA15G2R1, IIaA15G2R2
	IIb	IIbA14
	IIc	IIcA5G3a, IIcA5G3b, IIcA5G3c, IIcA5G3d
	IId	IIdA18G1
	IIe	IIeA12G1
	IIf	IIfA6
	IIg	IIgA9
	IIh	IIhA7G4
	IIi	IIiA10
	IIk	IIkA14
	III	IIIA18

Fonte: Modificado de XIAO, 2010.

Além de serem encontradas parasitando bovinos, alguns subtipos de *Cryptosporidium parvum* foram descritas infectando outros hospedeiros em diferentes países (Quadro 2).

Quadro 2 – Subtipos de *Cryptosporidium parvum* parasitando diversos hospedeiros.

HOSPEDEIRO	FAMÍLIAS SUBTIPOS	PAÍS	AUTORES
Ovinos	Ila	Bélgica	GEURDEN et al., 2008
	Ila e IId	Espanha	QUÍLEZ et al., 2008
	Ila e IId	Portugal	ALVES et al., 2006
	Ila	Inglaterra e País de Gales	SMITH et al., 2010
Caprinos	Ila e IId	Bélgica	GEURDEN et al., 2008
	Ila e IId	Espanha	QUÍLEZ et al., 2008
Cervos	Ila	Portugal	ALVES et al., 2006
Ruminantes de zoológicos	Ila	Portugal	ALVES et al., 2006
Equinos	Ila	Austrália	GRINBERG et al., 2008
Suínos	Ila	Inglaterra e País de Gales	SMITH et al., 2010
Cães	Ila	Inglaterra e País de Gales	SMITH et al., 2010
Humanos	Ila	Portugal	ALVES et al., 2006
	Ila	Austrália	NG et al., 2008
	Ila, IIc e III	Eslovênia	SOBA; LOGAR, 2008
	Ila e IId	Holanda	WIELINGA et al., 2008
	Ila e IId	Iran	NAZEMALHOSSEINI-MOJARAD et al., 2011

2.3.2. *Cryptosporidium andersoni*

Originalmente a espécie *Cryptosporidium andersoni* não foi corretamente identificada em bovinos (FAYER, 2010). A identificação do protozoário era realizada baseada principalmente na morfometria do oocisto e no local de parasitismo. Dessa forma, estruturas semelhantes às descritas por TYZZER (1907; 1910) foram observadas nas fezes de bovinos leiteiros e de corte, sendo nomeadas como *Cryptosporidium muris* (UPTON; CURRENT, 1985).

Cryptosporidium andersoni é comumente encontrado parasitando a superfície das microvilosidades das células epiteliais presentes no abomaso de bovinos jovens e adultos (LINDSAY et al., 2000; FAYER, 2010). Aparentemente a infecção por *C. andersoni* não possui sintomatologia clínica (MORGAN et al., 2000; KVÁČ et al., 2007), porém, o parasitismo pode retardar a produção de ácidos gástricos pelo hospedeiro, diminuindo a digestão de proteínas e conseqüentemente a produção de leite (MORGAN et al., 2000).

O oocisto de *C. andersoni* possui um formato elipsoidal, medindo aproximadamente 7,4 µm de diâmetro maior e 5,5 µm de diâmetro menor, sendo um pouco menor do que o oocisto de *C. muris*. A parede do oocisto possui ainda uma sutura longitudinal, presente apenas em um dos seus pólos. Dentro do oocisto ainda podem ser observados a presença do resíduo do oocisto além de quatro esporozoítos (LINDSAY et al., 2000).

Análises moleculares tendo como base os genes alvos *SSUrRNA*, *HSP70* e *ITS1* ('Internal Transcribed Spacer region' ou Espaçador Transcrito Interno) e estudos filogenéticos demonstraram que a espécie observada em bovinos é geneticamente distinta de *C. muris* presentes em outros hospedeiros (LINDSAY et al., 2000; MORGAN et al., 2000; KVÁČ et al., 2007; FAYER, 2010).

Alguns estudos sugerem que os oocistos de *C. andersoni* não são infectantes para algumas linhagens de camundongos, dentre eles o BALB/C e o SCID (LINDSAY et al., 2000; KVÁČ et al., 2007; FAYER, 2010), porém trabalhos recentes demonstraram a possibilidade de infecção experimental em camundongos da espécie *Mastomys coucha*, o que facilitaria o estudo sobre a infecção por *C. andersoni* (KVÁČ et al., 2007).

Além dos bovinos, *C. andersoni* foi encontrado parasitando um ovino na Austrália (RYAN et al., 2005) e camelos (*Camelus bactrianus*) na China (WANG et al., 2008).

Os oocistos eliminados nas fezes de camelos são semelhantes aos encontrados infectando a maioria dos bovinos, porém apesar da semelhança estes não são capazes de infectar bovinos e roedores, com exceção do gerbil da Mongólia e dos camundongos da espécie *Mastomys coucha* (WANG et al., 2008).

Estudos realizados na Inglaterra e no Malawi descreveram a infecção por *C. andersoni* em humanos. Na Inglaterra foi observada a presença de um isolado semelhante a *C. andersoni* em pacientes infectados com o vírus HIV (LEONI et al., 2006). No Malawi, o estudo da infecção por *Cryptosporidium* sp. foi realizado em crianças de até 5 anos de idade. A presença de *C. andersoni* foi detectada em apenas uma das amostras, onde foram observadas bandas semelhantes às descritas como padrão para a espécie utilizando a reação de RFLP, usando a enzima DdeI (MORSE et al. 2007).

2.3.3. *Cryptosporidium bovis*

Assim como aconteceu com outras espécies, *Cryptosporidium bovis* antes de ser reconhecida como uma nova espécie foi considerada por muito tempo como um genótipo do gênero *Cryptosporidium* (genótipo bovino B) (FAYER, 2010).

As semelhanças morfológicas entre *C. parvum* e *C. bovis*, tornam a identificação da espécie através de microscopia praticamente impossível (FAYER et al., 2005; FAYER, 2010). A diferenciação entre ambas as espécies de *Cryptosporidium* foi possível apenas através da utilização de técnicas de biologia molecular (utilizando os genes *SSUrRNA*, *HSP70* e *Actina*) e estudos biológicos, onde foi observado que a espécie *C. bovis* era incapaz de infectar camundongos BALB/C neonatos, o que não ocorria com *C. parvum* (FAYER et al., 2005; FAYER, 2010).

Os oocistos de *C. bovis*, medem aproximadamente 4,89 µm de diâmetro maior e 4,63 µm de diâmetro menor (FAYER et al., 2005).

Bovinos infectados por *C. bovis* não apresentam diarreia, sintomatologia clínica característica da criptosporidiose, como acontece em infecções ocasionadas por *C. parvum* (FAYER et al., 2005).

A espécie *C. bovis* além de infectar bovinos de leite e de corte podem também ser encontrados parasitando ovinos (FAYER et al., 2005; RYAN et al., 2005; FAYER, 2010).

2.3.4. *Cryptosporidium ryanae*

Anteriormente a espécie era denominada *Cryptosporidium* genótipo 'deer-like', pois as sequências do seu gene *SSUrRNA* eram muito semelhante ao genótipo do cervo (FAYER et al., 2008; FAYER, 2010). A espécie tem sido diagnosticada em bovinos destinados a exploração leiteira em várias partes do mundo (FENG et al., 2007; COKLIN et al., 2009; FAYER et al., 2008; KESHAVARZ et al., 2009; FAYER, 2010; FAYER et al., 2010a; KVÁČ et al., 2011; DAS et al., 2011; DIXON et al., 2011; MEIRELES et al., 2011).

O oocisto desta espécie é considerado o de menor tamanho dentre todas as que infectam mamíferos (FAYER, 2010), tendo uma média de 3,73 µm de diâmetro maior e 3,16 µm de diâmetro menor (FAYER et al., 2008).

Através da microscopia podem ser observados, em diferentes planos, um ou dois esporozoítos dentro do oocisto, porém não se pode observar com clareza o número total dos mesmos (FAYER et al., 2008).

Ainda não se conhecem outros hospedeiros além dos bovinos, pois a infecção experimental em roedores e cordeiros não obteve sucesso (FAYER et al., 2008; FAYER, 2010).

2.4. A Influência da Idade dos Animais e a Espécie de *Cryptosporidium*

A relação entre a idade dos animais e a espécie de *Cryptosporidium* envolvida na infecção é relatada em diversos estudos (SANTÍN et al., 2004; FAYER et al., 2006; STARKEY et al., 2006; FAYER et al., 2007; FENG et al., 2007; THOMPSON et al., 2007; BROOK et al., 2008; SANTÍN et al., 2008; SZONYI et al., 2008; ONDRÁČKOVÁ et al., 2009; FAYER et al., 2010a; SILVERLÅS et al., 2010a; SILVERLÅS et al., 2010b; WANG et al., 2011a; KVÁČ et al., 2011; MUHID et al., 2011; WANG et al., 2011b).

A criptosporidiose pode acometer bovinos em diferentes faixas etárias, sendo descrita uma alta prevalência em animais jovens na fase pré-desmame, onde a intensidade de eliminação de oocistos é grande (BROGLIA et al., 2008; BROOK et al., 2008). A prevalência da infecção tende a decrescer com o aumento da idade dos animais, diminuindo gradativamente em bezerros na fase pós-desmame, novilhas e vacas em produção (FAYER et al., 2007).

Bezerros jovens, na fase pré-desmame (até dois meses de idade), são infectados principalmente pela espécie *Cryptosporidium parvum*, que possui alto potencial zoonótico (BROOK et al., 2008; WANG et al., 2011a).

Bezerros na fase pós-desmame (entre três e 11 meses de idade) são infectados principalmente por *Cryptosporidium bovis*, *C. ryanae* e *C. andersoni* (SANTÍN et al., 2004).

Cryptosporidium parvum infecta o intestino de animais jovens ocasionando enterite aguda e diarreia (SANTÍN et al., 2004; CHAKO et al., 2010; KVÁČ et al., 2011; WANG et al., 2011b). Esta espécie de *Cryptosporidium* pode infectar os bezerros logo após o nascimento e eliminar grande quantidade de oocistos até aproximadamente a terceira semana de vida, quando começa a ocorrer um decréscimo na taxa de eliminação dos mesmos (SANTÍN et al., 2004). Além disso, *C. parvum* pode ser responsável também pelo pequeno

percentual de infecção em bezerros na fase pós-desmame e novilhas (FAYER et al., 2007; MUHID et al., 2011).

Cryptosporidium andersoni está associado à infecção de animais jovens e adultos, porém geralmente sem a presença de sintomatologia clínica, como pode ser observado em *C. parvum* (SANTÍN et al., 2004). Animais infectados por *C. andersoni* podem apresentar sintomas de gastrite, diminuição da produção de leite e baixo ganho de peso (WANG et al., 2011b). Picos de infecção por *C. andersoni* podem ser observados principalmente em bezerros entre três e sete meses de idade (SANTÍN et al., 2004), porém podem ser encontrados comumente parasitando animais entre três e 11 meses de idade (WANG et al., 2011b).

Cryptosporidium bovis e *C. ryanae* normalmente podem ser encontrados infectando bezerros desmamados e novilhos, sendo a infecção por *C. bovis* considerada como mais comum que a por *C. ryanae*, ambas sem apresentar sintomatologia clínica (WANG et al., 2011b; KVÁČ et al., 2011; MUHID et al., 2011).

A prevalência de *C. bovis* pode variar de um local para o outro, um estudo conduzido na China observou a presença desta espécie em bezerros na faixa etária entre três e 11 meses enquanto que nos EUA esta espécie foi encontrada em animais a partir de dois meses de vida (WANG et al., 2011b).

Cryptosporidium ryanae pode ser encontrado infectando bezerros nas fases pré e pós-desmame, apresentando maior prevalência em animais com mais de três meses de idade (FAYER et al., 2007; SZONYI et al., 2008).

2.5. O Manejo dos Animais e a Criptosporidiose

Problemas gastrintestinais são muito comuns em bovinos, principalmente em bezerros com menos de 12 meses de idade, podendo acarretar diversas perdas econômicas devido a baixa produtividade dos animais por apresentarem-se debilitados (GULLIKSEN et al., 2009; BARTELS et al., 2010). Para que os bezerros se tornem animais adultos produtores de leite é imprescindível que estes cresçam sem problemas de saúde (BARTELS et al., 2010). Dessa forma, faz-se necessário a adoção de algumas medidas profiláticas, tendo em vista a baixa eficácia de medicamentos no tratamento da criptosporidiose bovina (HARP; GOFF, 1998; NYDAM; MOHAMMED, 2005; COSENDEY et al., 2008; DE WAELE et al., 2010).

O tratamento da criptosporidiose em bovinos se restringe a estudos laboratoriais, mas até o momento não existem drogas específicas para serem administradas, não só em bovinos mas em qualquer outro hospedeiro. Em um hospedeiro com sintomatologia clínica de criptosporidiose é preconizado a reposição de fluidos e eletrólitos, dessa forma torna-se importante minimizar a exposição dos bezerros ao protozoário através da adoção de medidas profiláticas (HARP; GOFF, 1998).

Algumas medidas importantes devem ser adotadas em relação ao manejo dos animais, dentre elas podemos citar o uso adequado do colostro para auxiliar na construção da imunidade dos bezerros, a higienização e a lotação adequada das baias, além da separação de animais infectados (que apresentem ou não sintomas clínicos) (HARP; GOFF, 1998; GULLIKSEN et al., 2009; DE WAELE et al., 2010).

Sabe-se ainda que os oocistos de *Cryptosporidium* são altamente resistentes a ação de desinfetantes e algumas variáveis ambientais (HARP; GOFF, 1998; NYDAM; MOHAMMED, 2005; DE WAELE et al., 2010), porém estes estão susceptíveis a altas variações de temperatura e a desidratação (HARP; GOFF, 1998). Dessa forma, outra maneira

de diminuir a quantidade de oocistos no ambiente seria manter os animais confinados em locais livres de umidade (HARP; GOFF, 1998; NYDAM; MOHAMMED, 2005).

O estabelecimento de medidas para o controle da infecção por *Cryptosporidium parvum* em bezerros torna-se muito importante, pois além de minimizar os impactos econômicos na cadeia produtiva do leite também auxilia na redução dos problemas relativos à saúde pública e a contaminação ambiental (HARP; GOFF, 1998; DE WAELE et al., 2010).

2.6. A Contaminação Ambiental por *Cryptosporidium* sp.

Estudos epidemiológicos apontam a contaminação ambiental por *Cryptosporidium* como uma das principais fontes de infecção para os animais e para o ser humano (BAJER, 2008; CHAKO et al., 2010). Acredita-se que os animais, em especial os de produção, desempenham papel importante na contaminação do meio ambiente, pois o protozoário é abundantemente encontrado em diversos tipos de criações (BAJER, 2008).

O transporte dos oocistos de *Cryptosporidium* é facilmente feito pela água, porém ainda não se sabe ao certo como eles chegam às fontes hídricas (HUNTER; THOMPSON, 2005; BOYER; KUCZYNSKA, 2010). Supõe-se três rotas distintas de contaminação dos reservatórios, a primeira seria a deposição das fezes diretamente na água ou em suas proximidades (BOYER; KUCZYNSKA, 2010), seja ela feita por animais que estejam a pasto mantidos próximos a aguadas ou pela fertilização de pastagens e plantações as margens de fontes hídricas utilizadas para irrigação (FARIZAWATI et al., 2005; BAJER, 2008; BOYER; KUCZYNSKA, 2010). Outras duas maneiras de contaminação seriam pelo carreamento dos oocistos para o leito dos rios através da lixiviação do terreno e por último pela infiltração da água no solo juntamente com as formas infectantes (BOYER; KUCZYNSKA, 2010).

Os animais não são os únicos culpados pela contaminação do meio ambiente, o esgoto humano 'in natura' despejado diretamente em reservatórios e fontes de água também são responsáveis pela ampla contaminação ambiental e por ocasionar graves surtos de criptosporidiose como o ocorrido em Milwaukee nos EUA em 1993 (CHAKO et al., 2010).

2.7. A Transmissão e Importância Como Zoonose

A criptosporidiose é adquirida pelo hospedeiro através da ingestão de oocistos. A infecção possui diferentes rotas de transmissão, podendo ocorrer direta ou indiretamente através do contato pessoa-pessoa, animal-animal, homem-animal e através da ingestão de água e alimentos contaminados (FAYER et al., 2000; FELTUS et al., 2006; NICHOLS, 2007; XIAO; RYAN, 2007; NG et al., 2008; HILL et al., 2011; CHALMERS; GILES, 2010). As principais rotas de transmissão de *C. parvum* foram descritas por NICHOLS (2007) e encontram-se representadas na figura 1.

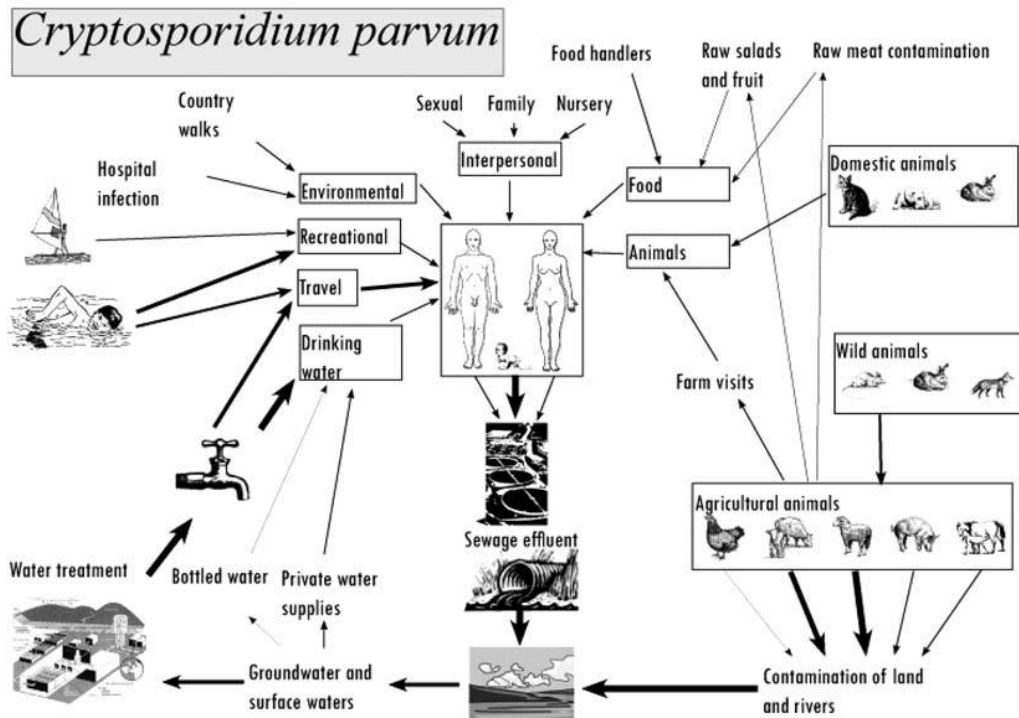


Figura 1 – As possíveis rotas de transmissão de *Cryptosporidium parvum* (NICHOLS, 2007).

Desde a década de 80, os bovinos vêm sendo considerados como os grandes responsáveis pela criptosporidiose zoonótica (XIAO; FENG, 2008). O contato com bezerros infectados por *Cryptosporidium* é apontado como sendo a principal causa de pequenos surtos de criptosporidiose (HILL et al., 2011; CHALMERS; GILES, 2010), especialmente em estudantes de veterinária, pesquisadores, tratadores e crianças que frequentam feiras rurais e acampamentos (NICHOLS, 2007; XIAO; FENG, 2008; CHALMERS; GILES, 2010; DIXON et al., 2011). Porém, o papel dos animais, em especial os de produção e de companhia, na transmissão da criptosporidiose humana ainda não foi completamente definido. Tal incerteza provavelmente está relacionada às similaridades morfológicas entre os oocistos que infectam ou não o homem (XIAO; FENG, 2008).

Recentes estudos epidemiológicos e microbiológicos defendem a hipótese de que o contato direto com bovinos, principalmente bezerros, é a principal forma de infecção do homem por *C. parvum* (HILL et al., 2011).

Ao contrário dos bovinos, o papel dos animais de companhia na transmissão da criptosporidiose humana é de pouca importância. Animais de companhia são mais frequentemente infectados com espécies específicas (XIAO; FAYER, 2008). Desta forma, os cães são quase que exclusivamente infectados com *Cryptosporidium canis* e gatos com *C. felis*.

O papel de cães e gatos na transmissão da criptosporidiose humana parece bastante limitado. De fato, infecções por *C. canis* e *C. felis* são raramente relatados em seres humanos, apesar da proximidade com os mesmos (XIAO; FAYER, 2008). Durante muito tempo acreditou-se que animais como os cães teriam grande parcela de culpa na doença transmitida aos humanos, no entanto, tal fato era baseado principalmente na observação da transmissão

direta de *C. parvum* de bezerros para o homem e na crença errônea de que a espécie, *C. parvum*, é responsável pela criptosporidiose em todos os mamíferos (XIAO; FENG, 2008).

Acreditava-se que *Cryptosporidium parvum* é uma das únicas espécies zoonóticas capaz de infectar humanos imunocompetentes e imunocomprometidos (FELTUS et al., 2006; XIAO; FENG, 2008). Porém, indivíduos imunocomprometidos podem ser acometidos por outras espécies de *Cryptosporidium* como *C. canis*, *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. andersoni*, *C. suis*, dentre outros (XIAO; FENG, 2008; CHALMERS; GILES, 2010).

Humanos imunocompetentes, principalmente crianças, podem esporadicamente ser acometidos por outras espécies de *Cryptosporium* além de *C. parvum*. Estudos moleculares realizados em diversas partes do mundo demonstraram a infecção de indivíduos adultos HIV-soronegativos e crianças por *C. canis*, *C. felis* e *C. meleagridis* (XIAO; FENG, 2008; CHALMERS; GILES, 2010).

Em crianças, a infecção por *C. canis*, *C. felis* e *C. meleagridis* pode ser acompanhada por quadros de diarreia. Geralmente a infecção por estas espécies acomete a população de países em desenvolvimento, onde a co-infecção por espécies/genótipos de *Cryptosporidium* é relativamente comum (CHALMERS; GILES, 2010). Tais espécies consideradas incomuns em humanos podem emergir como importantes zoonoses quando mudanças socioeconômicas e ambientais favorecerem a sua transmissão (XIAO; FENG, 2008).

2.7.1. *Cryptosporidium parvum* x *Cryptosporidium hominis*

A criptosporidiose em humanos vem sendo relatada desde 1976, quando foram descritas as primeiras infecções (MORGAN-RYAN et al., 2002). A partir daí, a infecção já foi documentada em 95 países, geralmente sendo atribuída a dois genótipos de *Cryptosporidium parvum*, o genótipo antroponótico humano I (subtipo I_h) e ao genótipo zoonótico bovino II (subtipo II_c) (MORGAN-RYAN et al., 2002; CHAKO et al., 2010; CHALMERS; GILES, 2010). Após diversos estudos baseados na transmissão experimental da infecção pode-se concluir que o genótipo humano e o genótipo bovino de *C. parvum* possuíam características biológicas distintas, sendo assim deveriam ser classificados como espécies diferentes. Dessa forma, em 2002 foi proposta uma nova nomenclatura para o genótipo humano de *C. parvum*, passando a ser designado como a espécie *Cryptosporidium hominis* (MORGAN-RYAN et al., 2002).

Cryptosporidium parvum, juntamente com *C. hominis* são responsáveis por aproximadamente 90% dos casos de criptosporidiose registrados em humanos (NG et al., 2008; XIAO; FENG, 2008; CHALMERS; GILES, 2010). A prevalência das espécies pode variar de acordo com o local em que elas se encontram além das características sócio-econômicas do mesmo (XIAO; FENG, 2008; CHALMERS; GILES, 2010). Ambas as espécies podem acometer indivíduos imunocompetentes e imunodeprimidos em diversos países, apenas apresentando variação na prevalência entre elas. Em países como a Inglaterra, País de Gales, Irlanda do Norte, França, Suíça, Portugal, Eslovênia e Nova Zelândia o percentual da doença em humanos atribuído a *C. parvum* é ligeiramente maior do que o descrito para *C. hominis*. (XIAO; FENG, 2008; CHAKO et al., 2010). Em contrapartida, na América do Sul, África, Estados Unidos, Canadá, Austrália e Japão a infecção por *C. hominis* é mais prevalente do que a infecção atribuída a *C. parvum* (NG et al., 2008; XIAO; FENG, 2008; CHAKO et al., 2010).

Geralmente, a maioria dos casos de criptosporidiose relacionados à infecção por *C. parvum* é observado em áreas rurais, devido, principalmente, a elevada concentração de

bovinos jovens (NG et al., 2008; XIAO; FENG, 2008). Já a infecção causada por *C. hominis*, normalmente, é mais prevalente em áreas urbanas, pois está relacionada, principalmente, ao consumo de água potável contaminada e sua utilização para o lazer (XIAO; FENG, 2008; CHAKO et al., 2010).

2.8. *Cryptosporidium* sp. em Bovinos no Brasil

Poucos estudos a respeito da criptosporidiose bovina foram desenvolvidos no Brasil utilizando ferramentas moleculares para a identificação das possíveis espécies causadoras da infecção nestes animais (HUBER et al., 2007; THOMAZ et al., 2007; SEVÁ et al., 2010; MEIRELES et al., 2011). Tais estudos se tornam ainda mais escassos quando nos referimos à identificação de genótipos/subtipos de *Cryptosporidium* (MEIRELES et al., 2011).

Em um estudo realizado no Estado de São Paulo, utilizando bezerros com até 30 dias de idade, foram observadas as quatro espécies principais de *Cryptosporidium* descritas em bovinos. *Cryptosporidium parvum* foi a espécie de maior prevalência, e todos os seus genótipos foram diagnosticados, utilizando o gene alvo *GP60*, como pertencentes ao subtipo IIaA15G2R1. O estudo relatou ainda o primeiro registro de *C. ryanae* no país (MEIRELES et al., 2011).

Tendo em vista a escassez de registros relacionados à infecção de bovinos pelo protozoário, faz-se necessário a realização de novos estudos para avaliarmos principalmente o potencial zoonótico das espécies de *Cryptosporidium* existentes no país e os riscos que estas trazem a população e ao meio ambiente.

2.9. Estudos Filogenético

A utilização de ferramentas moleculares no estudo da criptosporidiose vem contribuindo para uma melhor compreensão da biologia e epidemiologia do protozoário, pois auxilia no diagnóstico da protozoose e principalmente na diferenciação das espécies/genótipos de *Cryptosporidium* (XIAO; RYAN, 2007).

Através do desenvolvimento de tais ferramentas, diversos estudos foram conduzidos visando caracterizar genotipicamente as espécies de *Cryptosporidium*, criando assim a oportunidade de serem realizadas pesquisas sobre a filogenia do parasito (BARTA; THOMPSON, 2006).

Em particular, o gene *SSUrRNA* possui algumas propriedades que o faz ser altamente informativo no que se refere a afinidade filogenética entre os diferentes níveis taxonômicos, sendo este amplamente utilizado para analisar diversos grupos dentro do filo Apicomplexa (CARRENO et al, 1999). As vantagens inerentes ao gene *SSUrRNA* são: Seu elevado número de cópias e a presença de regiões conservadas intercaladas com regiões de elevado polimorfismo, o que facilita o desenho de 'primers'. Porém, alguns cuidados devem ser tomados em relação à escolha das sequências a serem utilizadas para amplificar as espécies de *Cryptosporidium*, pois estas são frequentemente conservadas entre organismos eucariotos, podendo assim ser amplificadas por outros parasitos apicomplexos (XIAO; RYAN, 2007).

Alguns estudos filogenéticos demonstraram que o gênero *Cryptosporidium* não se encontra tão intimamente relacionado aos coccídios como se suspeitava anteriormente, estando estes mais próximo as gregrarinas (CARRENO et al, 1999; LEANDER et al., 2003; BARTA; THOMPSON, 2006; FAYER, 2007; STOCKDALE et al., 2007). Segundo

CARRENO et al. (1999), a árvore filogenética na qual o gênero *Cryptosporidium* encontra-se inserido esta representado na figura 2.

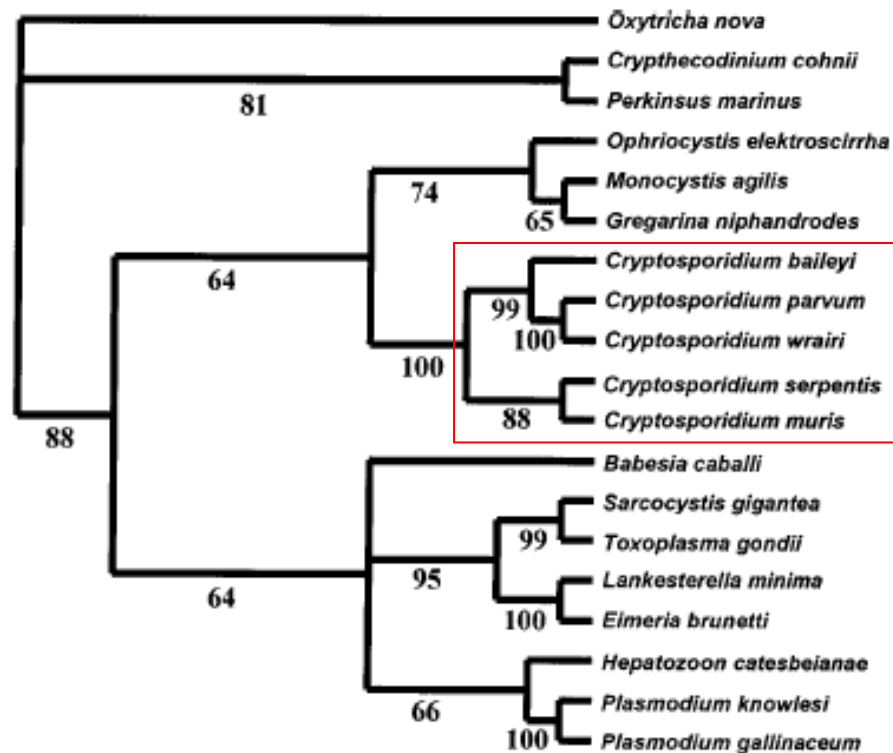


Figura 2 – Árvore consenso, utilizando máxima parcimônia, retratando a relação entre gregarinas, *Cryptosporidium* e outros representantes do filo Apicomplexa (CARRENO et al., 1999).

Através do estudo da árvore filogenética apresentada por CARRENO et al (1999) pode-se observar a proximidade entre as gregarinas, representadas pelos gêneros *Gregarina*, *Monocystis* e *Ophriocystis*, e o grupo monofilético formado pelas diferentes espécies do gênero *Cryptosporidium*. Barta; Thompson, (2006) descreveram um panorama semelhante, onde as espécies de *Cryptosporidium* encontram-se intimamente relacionadas às gregarinas devido à presença de um ancestral comum pertencente ao superfilo Alveolata. Tal ancestral também seria comum à subclasse Coccidia, que possuiria uma relação mais distante com as gregarinas e o gênero *Cryptosporidium*.

A distante relação filogenética entre o gênero *Cryptosporidium* e os demais coccídios poderia explicar por que ambos possuem características tão distintas (tabela 4) (BARTA; THOMPSON, 2006).

Tabela 4 – Diferenças entre o gênero *Cryptosporidium* e os demais grupos de coccídios.

CARACTERÍSTICA	<i>Cryptosporidium</i>	OUTROS GRUPOS DE COCCÍDIOS
Localização dentro da célula do hospedeiro	Intracelular, porém extracitoplasmático	Completamente intracelular
Organela de fixação/alimentação	Presente	Não está presente
Morfologia da parede de oocistos	Dois tipos: com parede espessa e parede fina	Somente parede espessa
Tamanho do oocisto	Pequeno (5-7,4 µm x 4,5-5,6 µm)	Grande (9-38 µm x 7-39 µm)
Esporocisto e micrúpila	Ausente	Presente
Desenvolvimento extracelular	Sim	Não
Sizígia em estágios extracitoplasmático	Sim	Não
Apicoplasto	Perdido	Presente
Complexidade das vias biossintéticas	Simplificado	Mais complexo
Sensibilidade a drogas anticoccídias	Sem sensibilidade	Sensível
Especificidade por hospedeiro	Baixa	Alta
Patogenicidade	Ainda não é bem definida	Definida

Fonte: Modificado de BARTA; THOMPSON, 2006

Além da utilização do gene *SSUrRNA*, o gene alvo, *GP60*, vem sendo utilizado em estudos epidemiológicos e filogenéticos (XIAO; RYAN, 2007). O gene alvo *GP60* pode ser considerado um microsatélite, possuindo repetições ‘tandem’ dos trinucleotídeos TCA/TCG/TCT na extremidade 5’ do gene, responsáveis pela codificação da serina. Além das variações no número de repetições dos trinucleotídeos, existem diferenças na sequência

em regiões não repetitivas, o que caracteriza cada família de subtipo de *C. parvum* e *C. hominis* (XIAO; RYAN, 2007; XIAO, 2010). As famílias de subtipos de *Cryptosporidium* são diferenciadas entre si através de uma sequência primária. Os membros destas famílias de subtipos se diferem principalmente devido ao número de repetições dos trinucleotídeos TCA, TCG e TCT. O gene *GP60* é considerado o marcador polimórfico mais identificado dentro do genoma de *Cryptosporidium*, e por isso, este está sendo amplamente utilizado para a subtipagem das espécies (XIAO; RYAN, 2007). As famílias de subtipos de *Cryptosporidium* mais comumente identificados estão representadas na figura 3.

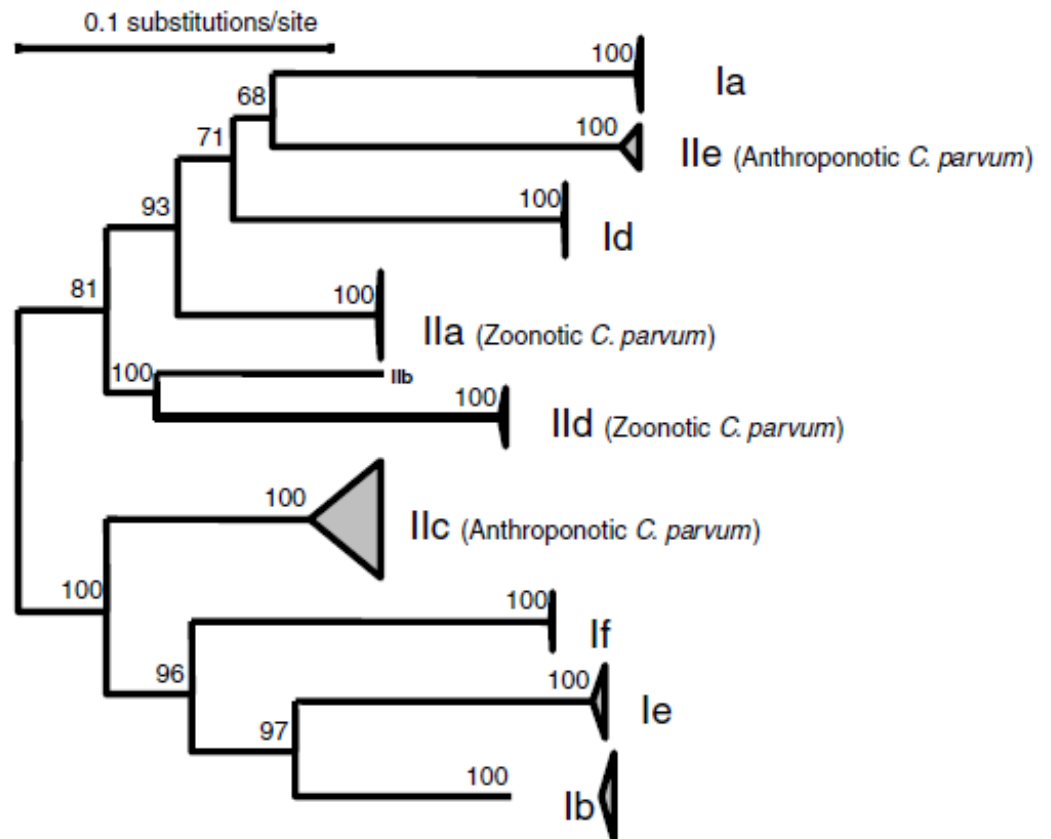


Figura 3 – Relações filogenéticas entre os principais subtipos de *C. parvum* (II) e *C. hominis* (I) baseado na análise Neighbor-Joining, utilizando o gene alvo *GP60* (XIAO; RYAN, 2007).

Observando a relação filogenética entre os subtipos de *Cryptosporidium* é possível verificar que *C. parvum* e *C. hominis* são grupos polifiléticos, onde algumas famílias de subtipos de *C. parvum* encontram-se mais próximas a *C. hominis* do que a outros subtipos do próprio *C. parvum* (XIAO; RYAN, 2007).

No entanto, apesar de tais evidências a classificação do gênero *Cryptosporidium* continua com várias controversas, ainda necessitando de muitos estudos para sua elucidação.

3. CAPÍTULO I

PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO DE DNA E DA TÉCNICA DA PCR UTILIZADA PARA O DIAGNÓSTICO DE *Cryptosporidium* EM FEZES DE BEZERROS

RESUMO

A diferenciação entre espécies e subtipos de *Cryptosporidium* exclusivamente através da microscopia é impossível. Dessa forma, para obtermos um diagnóstico preciso do protozoário devemos lançar mão de ferramentas moleculares. No entanto, para que o uso de tais ferramentas seja satisfatório deve haver uma padronização das técnicas a serem empregadas. No presente estudo, foram comparadas duas técnicas moleculares utilizadas para diagnosticar com precisão a infecção por *Cryptosporidium* em bovinos com a finalidade de padronizá-las. Dentre elas foram testadas duas técnicas de extração de DNA, uma com kit de extração comercial (protocolo I) e outra um protocolo adaptado pelos pesquisadores (protocolo II); diversas temperaturas de anelamento para as reações de PCR-Nested utilizando como genes alvo o *18S* e *GP60* e dois tipos de coloração de fragmentos de DNA em gel de agarose, utilizando brometo de etídio e gelred como corantes. Através dos resultados obtidos neste estudo foi observado que o protocolo I apresentou maior grau de pureza do DNA extraído do que o protocolo II. Foram estabelecidas novas temperaturas para uma otimização das técnicas de PCR-Nested tanto para o gene *18S* quanto para o *GP60*; foi observada maior sensibilidade do corante gelred quando comparado ao brometo de etídio, além disso, sua baixa toxicidade facilita o seu manuseio e descarte reduzindo a contaminação ambiental.

Palavras-chave: Gene *18S*, gene *GP60*, brometo de etídio, Gelred, padronização.

ABSTRACT

The differentiation of species and subtypes of *Cryptosporidium* exclusively through microscopy is impossible. Thus, to obtain an accurate diagnosis of the protozoa molecular tools should be used. However, to have a satisfactory use of such tools a standardization should be employed. In the present study, two molecular techniques routinely used in diagnosis of *Cryptosporidium* in cattle were compared in order to evaluate and standardize them. Among them were tested two techniques for DNA extraction, a commercial kit for DNA extraction (protocol I) and a protocol adapted by researchers (protocol II); various annealing temperatures for PCR and Nested reactions using as gene targets the *18S* and *GP60*, and two types of DNA fragments staining in agarose gel, ethidium bromide and gelred. Due the results of this study, could be observed that the protocol I had a higher purity when compared to protocol II in DNA extraction of *Cryptosporidium* spp. New annealing temperatures were standardized to increase the PCR-Nested techniques using the gene targets *18S* and *GP60*; a greater sensibility of the dye gelred was noted when compared with ethidium bromide, in addition, its low toxicity facilitate the handling and the discard, consequently reducing the environmental contamination.

Key words: Gene *18S*, gene *GP60*, ethidium bromide, Gelred, standardization

3.1. INTRODUÇÃO

A criptosporidiose é uma doença entérica causada pelo protozoário do gênero *Cryptosporidium* (MEIRELES et al., 2011). A infecção pode acometer diversas espécies de vertebrados, dentre elas os bovinos e o homem (LAGKJÆR et al., 2007).

O protozoário, em bovinos, dependendo da espécie de *Cryptosporidium*, pode infectar a mucosa intestinal ou estomacal (KVÁČ et al., 2006) sendo considerado uma importante parasitose do ponto de vista da produção animal e principalmente de saúde pública (BECHER et al., 2004).

O hospedeiro bovino pode se infectar com diversas espécies de *Cryptosporidium*, porém quatro são descritas como principais *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. bovis* e *C. ryanae* (GEURDEN et al., 2007; FAYER, 2010). Dentre elas, *Cryptosporidium parvum* é a mais preocupante devido ao seu potencial zoonótico (DÍAZ et al., 2010).

A diferenciação entre as espécies de *Cryptosporidium* e o diagnóstico de genótipos zoonóticos de *C. parvum*, apenas pela microscopia é impossível devido as similaridade morfológicas existentes entre os oocistos das diferentes espécies e genótipos (JEX; GASSER, 2008; FAYER, 2010; DAS et al., 2011). Por esse motivo, as técnicas de biologia molecular vêm sendo cada vez mais utilizadas na tentativa de detectar e diferenciar espécies e genótipos de *Cryptosporidium* (XIAO, 2010). Dentre elas a técnica da PCR é considerada a que apresenta maior sensibilidade para detecção do protozoário. Pois, mesmo que a amostra utilizada apresente pequena quantidade de DNA de *Cryptosporidium* após extração, o material genético obtido pode ser amplificado milhares de vezes (LENG et al., 1996; MORGAN; THOMPSON, 1998).

Nas últimas décadas, os bovinos vêm sendo alvo de investigações em diversas partes do mundo, pois estes são considerados um dos principais hospedeiros de *Cryptosporidium parvum*, espécie que possui subtipos com capacidade de infectar o homem. (ALVES et al., 2006; CASTRO-HERMIDA et al., 2007; MENDONÇA et al., 2007; BROGLIA et al., 2008; COKLIN et al., 2009; DIXON et al., 2011; MEIRELES et al., 2011; NAZEMALHOSSEINI-MOJARAD et al., 2011). Devido ao seu elevado potencial zoonótico, a genotipagem do protozoário vem sendo realizada principalmente através de técnicas de PCR-Nested e sequenciamento, utilizando diferentes métodos de extração de DNA e genes alvos distintos (BECHER et al., 2004; ALVES et al., 2006; CASTRO-HERMIDA et al., 2007; FENG et al., 2007; GEURDEN et al., 2007; LAGKJÆR et al., 2007; MENDONÇA et al., 2007; BROGLIA et al., 2008; BROOK et al., 2008; COKLIN et al., 2009; KESHAVARZ et al., 2009; COKLIN et al., 2010; DÍAZ et al., 2010; FAYER et al., 2010a; FAYER et al., 2010b; DAS et al., 2011; DIXON et al., 2011; MEIRELES et al., 2011; NAZEMALHOSSEINI-MOJARAD et al., 2011), sendo os genes *18S* e *GP60* os mais frequentemente utilizados (XIAO, 2010).

O processo de extração de DNA é o primeiro passo para a caracterização molecular de uma espécie, sendo esta, uma etapa primordial para o sucesso da reação enzimática a ser empregada (ROMANO; BRASILEIRO, 1999). Diferentes metodologias estão sendo utilizadas para a obtenção de DNA de *Cryptosporidium* sp., proveniente de amostras fecais de bovinos. Os métodos de extração de DNA de *Cryptosporidium* descritos na literatura são diversos, podendo ser utilizados protocolos desenvolvidos pelos próprios pesquisadores, kits comerciais de extração de DNA ou até mesmo a associação entre ambos (BECHER et al., 2004; CASTRO-HERMIDA et al., 2007; FENG et al., 2007; GEURDEN et al., 2007; LAGKJÆR et al., 2007; MENDONÇA et al., 2007; BROGLIA et al., 2008; COKLIN et al., 2009; KESHAVARZ et al., 2009; COKLIN et al., 2010; DÍAZ et al., 2010; FAYER et al.,

2010a; FAYER et al., 2010b; DAS et al., 2011; DIXON et al., 2011; MEIRELES et al., 2011; NAZEMALHOSSEINI-MOJARAD et al., 2011).

Além do protocolo de extração, deve-se escolher corretamente a substância utilizada no processo de coloração dos fragmentos de DNA em gel de agarose obtidas durante a PCR. Existem no mercado diversas substâncias com essa finalidade, dentre elas podemos citar o brometo de etídio, SYBR Gold, SYBR Green, GoldView, GeneFinder, GoldStar, Gelgreen e Gelred (HUANG; FU, 2005; HUANG et al., 2010).

Apesar das desvantagens da utilização do brometo de etídio, como elevado nível de toxidez, grande potencial mutagênico (HUANG; FU, 2005) e difícil descontaminação ambiental, este corante ainda é o mais comumente utilizado na visualização de fragmentos de DNA de *Cryptosporidium* spp. (GEURDEN et al., 2007; BROGLIA et al., 2008; COKLIN et al., 2009; FAYER et al., 2010a; DAS et al., 2011).

Gelred é um corante de ácidos nucleicos, vermelho fluorescente, visível em luz ultravioleta do mesmo espectro utilizado para visualização de brometo de etídio (HUANG et al., 2010). Por fazer parte de uma nova geração de corantes, possui características químicas desenvolvidas para minimizar a possibilidade de interação do produto com o ácido nucleico de células vivas, sendo considerado de baixa toxicidade e pouco mutagênico. Além destas características, possui ainda a vantagem de apresentar baixos níveis de contaminação ambiental (HUANG et al., 2010; manual do fabricante: <http://www.biotium.com>). Estudos utilizando gelred ainda são escassos, sendo inexistentes relatos de sua utilização como método de coloração de fragmentos de DNA de *Cryptosporidium* sp. em gel de agarose.

O presente estudo teve por objetivo a comparação de dois métodos de extração de DNA em amostras fecais positivas no diagnóstico microscópico para presença de oocisto de *Cryptosporidium* sp., provenientes de bezerros; comparar dois métodos de coloração de fragmentos de DNA obtidos dessas amostras em gel de agarose e estabelecer as melhores condições para amplificação de fragmentos de DNA de *Cryptosporidium* sp. utilizando como genes alvo o *18S* e *GP60*.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Origem das Amostras, seu Processamento e Diagnóstico Microscópico

Amostras fecais foram obtidas de três bezerros naturalmente infectados e considerados positivos para *Cryptosporidium* spp. pela microscopia óptica. As fezes, contendo os oocistos de *Cryptosporidium*, utilizadas na fase inicial do estudo foram processadas no Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

As amostras foram identificadas, homogeneizadas com água destilada e filtradas com o auxílio de um tamis plástico descartável revestido com gaze para a retirada de resíduos grosseiros. Após a filtração a solução foi distribuída em quatro tubos de ensaio cônicos e centrifugados durante 10 minutos a 402,4 xg. Após este procedimento, o sobrenadante foi descartado restando apenas o sedimento.

Um tubo de cada amostra foi selecionado e homogeneizado novamente com solução saturada de açúcar (densidade específica de 1,30 g/ml) ao passo que o restante dos tubos foi armazenado sob refrigeração a uma temperatura aproximada de 4°C. Após a homogeneização com a solução saturada de açúcar, o material passou por uma nova centrifugação durante 10 minutos a 402,4 xg.

Posteriormente, a segunda centrifugação os tubos referentes a cada amostra, foram completados com solução saturada de açúcar até formar um menisco na superfície. Estes foram cobertos com uma lamínula de vidro por um período de cinco minutos. Logo após, a lamínula foi retirada da superfície do tubo e colocada sobre uma lâmina de vidro e levada para avaliação microscópica. As amostras foram consideradas positivas para *Cryptosporidium* spp. pela observação de oocistos na microscopia óptica de campo claro e contraste de fase. As amostras foram quantificadas de acordo com o número de oocistos observados no campo visual.

3.2.2. Extração de DNA

Para cada amostra foram utilizados dois protocolos distintos de extração visando à comparação entre ambos. O primeiro protocolo utilizado (Protocolo de Extração I) foi o kit comercial da Qiagen ('QIAamp DNA Stool Mini Kit') (GEURDEN et al., 2007; LAGKJÆR et al., 2007; COKLIN et al., 2009; DAS et al., 2011). O segundo protocolo de extração (Protocolo de Extração II) utilizado foi adaptado por HUBER et al., (2007).

3.2.2.1. Protocolo de extração I

A utilização do kit comercial 'QIAamp DNA Stool Mini Kit' (GEURDEN et al., 2007; LAGKJÆR et al., 2007; COKLIN et al., 2009; DAS et al., 2011), seguiu as recomendações especificada pelo fabricante, com pequenas modificações.

Os dois períodos de incubação do material foram realizados a uma temperatura de 95°C, porém para incubação mais longa (10 minutos) foi utilizado um agitador com controle de temperatura, a uma rotação de 1000 rpm para auxiliar na homogeneização das amostras.

Ao final da extração as amostras foram eluídas em 100 µl de tampão AE (fornecido pelo fabricante) ao invés de 200 µl como sugeria o manual de instruções (FAYER et al., 2010a).

3.2.2.2. Protocolo de extração II

Para a execução do protocolo de extração, foram utilizados 200 µl da suspensão fecal, obtida através de centrífugo-sedimentação e mantidas sob refrigeração a aproximadamente 4°C. O material fecal foi transferido para um microtubo de 1,5 ml, onde foram adicionados 500 µl de DNAzol® (Invitrogen), 70 µl de solução de polivinilpirrolidona a 10% (PVP, Sigma) e aproximadamente 0,2 g de pérolas de vidro com 425-600 µm de diâmetro (Sigma). Cada tubo foi agitado três vezes com o auxílio de um agitador durante dois minutos a 2000 rpm. Ao ser retirado do agitador, o material foi incubado por 60 minutos em termobloco a uma temperatura de 96°C. Após aquecimento, o material foi centrifugado por 20 segundos a 14.000 rpm e o sobrenadante transferido para outro microtubo de 1,5 ml com o auxílio de uma pipeta. O microtubo contendo o sobrenadante foi centrifugado por 20 minutos a 14.000 rpm.

Em um novo microtubo, de 1,5 ml, foram pipetados 50 µg de glicogênio (20 mg/ml - Invitrogen). Onde foram transferidos, aproximadamente, 600 µl do sobrenadante obtido na centrifugação anterior. O material foi precipitado utilizando 1 ml de etanol absoluto (Merck). O microtubo foi levemente homogeneizado e centrifugado por cinco minutos a 14.000 rpm. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi descartado.

O sedimento obtido posteriormente a centrifugação foi lavado com 500 µl de etanol 95% (Merck) e o material centrifugado durante cinco minutos a 14.000 rpm. Sendo este processo repetido após seu término.

O sobrenadante foi descartado após a repetição do processo, e o pellet formado no microtubo ressuspense em 500 µl de DNAzol® e homogeneizado com o auxílio de um agitador.

O material foi centrifugado por 10 minutos a 14000 rpm e o sobrenadante transferido para outro microtubo de 1,5 ml com o auxílio de uma pipeta onde foi precipitado novamente com 500 µl de etanol absoluto. O conteúdo do microtubo foi levemente homogeneizado e centrifugado por cinco minutos a 14.000 rpm.

O sobrenadante obtido após a centrifugação foi descartado e o sedimento lavado com 500 µl de etanol 95% e centrifugado por cinco minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o processo repetido.

Após a última centrifugação o sobrenadante foi descartado e o excesso de álcool dos tubos secos com o auxílio de um papel toalha. Os microtubos foram colocados com as tampas abertas no termobloco a 56°C até que o álcool evaporasse por completo.

O sedimento foi ressuspense em 100 µl de Tris-EDTA (Phoneutria). Os microtubos contendo o DNA foram mantidos a -20° C até serem utilizados.

3.2.3. Qualidade do DNA Extraído

Após a realização dos protocolos de extração (I e II), 10 µl de cada amostra foram aplicados em gel de agarose a 1% (100V por 40 minutos), utilizando o sistema de eletroforese (Mupid-ex UMini-gel Basic System/MEX-002), para observar a integridade do DNA extraído. Todo o material foi corado com GelRedTM (10X) e brometo de etídio (5µg/ml). A

visualização do DNA foi feita sob luz ultravioleta, e os géis analisados e fotografado através do sistema de captura Bio-Rad.

Além disso, a qualidade do DNA também foi observada com o auxílio do espectrofotômetro (Nanodrop 2000), onde foi quantificada a relação de absorbância 260/280, de cada amostra.

3.2.4. Métodos de Coloração de Géis de Agarose

Duas metodologias de coloração foram utilizadas para evidenciar o DNA de *Cryptosporidium* spp. em gel de agarose, sendo a primeira delas através da coloração por brometo de etídio e a segunda por *GelRed*TM.

As soluções estoque de brometo de etídio e *GelRed*TM utilizadas no estudo foram respectivamente 5mg/ml e 10.000X.

A coloração dos fragmentos de DNA por brometo de etídio foi feita através da imersão do gel de agarose, após corrida, em uma solução de uso a uma concentração de 5µg/ml por dez minutos.

A solução de uso de *GelRed*TM utilizada no estudo encontrava-se 10X concentrada. Para cada 5 µl de amostra de DNA foram aplicados 2µl de *GelRed*TM 10X juntamente com 1 µl do tampão de amostra 'loading buffer' 6X – tipo III (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) na amostra.

Ambos os corantes foram visualizados através da utilização de um transiluminador de luz ultravioleta, com comprimento de onda na faixa de 548-630 nm e utilizando filtro de cor âmbar, compatível para visualização de fragmentos de DNA utilizando brometo de etídio e *Gelred*TM.

3.2.5. Controles Positivo e Negativo da Reação de PCR Primário e PCR-Nested

Para a padronização das reações de PCR primária e PCR-Nested foi utilizado um controle positivo de *Cryptosporidium parvum*, previamente sequenciado e depositado no 'GenBank' sob número de acesso DQ885333 (HUBER et al., 2007).

Cada reação de PCR e Nested-PCR possuía um controle positivo, onde eram utilizados 1 µl da amostra concentrada para *C. parvum*.

Com a finalidade de estabelecer um limite de detecção seguro do controle positivo de ambas as reações, foram efetuadas cinco diluições do controle utilizando água ultrapura ('Nuclease-free water' – Promega) (Tabela 5).

Tabela 5 – Controle positivo para *Cryptosporidium*, suas diluições e concentrações de DNA.

AMOSTRAS	CONTEUDO DO MICROTUBO	CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO (ng/ μ m)
Concentrada	15 μ l de material purificado contendo DNA de <i>Cryptosporidium parvum</i>	17,0
Diluição 1	45 μ l de água ultrapura + 5 μ l da amostra concentrada	3,5
Diluição 2	45 μ l de água ultrapura + 5 μ l da diluição 1	0,6
Diluição 3	45 μ l de água ultrapura + 5 μ l da diluição 2	0,0
Diluição 4	45 μ l de água ultrapura + 5 μ l da diluição 3	0,0
Diluição 5	45 μ l de água ultrapura + 5 μ l da diluição 4	0,0

A amostra concentrada e suas diluições foram amplificadas e purificadas para posteriormente serem quantificadas através do espectrofotômetro (Nanodrop 2000).

Como controle negativo da reação foi utilizado 1 μ l de água ultrapura ('Nuclease-free water' – Promega).

3.2.6. Padronização das Reações de PCR Primária e Nested-PCR para o Gene *18S*

A reação em cadeia da polimerase, mais conhecida como a PCR, pode utilizar dois pares de iniciadores ou 'primers'. Na primeira reação de PCR tendo como gene alvo o *SSUrRNA* ou *18S*, utilizando os 'primers' 18SF: 5'- TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG-3' ('forward') e 18SR: 5'- CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA-3' ('reverse'), espera-se obter amplicons com 1.325 pb (XIAO et al., 1999a; FAYER et al., 2010a).

Para a Nested-PCR, tendo o mesmo gene como alvo e utilizando os 'primers' 18SNF: 5'- GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG-3' ('forward') e 18SNR: 5'- AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A-3' ('reverse'), espera-se obter amplicons de aproximadamente 830 pb (826 a 864 pb), dependendo da espécie de *Cryptosporidium* diagnosticada (XIAO et al., 1999a; FAYER et al., 2010a).

Na realização da PCR primária, foram utilizados 4 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 0,2 μ M de cada 'primer' (18SF e 18SR – Invitrogen), Tampão Taq 1X (Invitrogen), 200 μ M de cada desoxirribonucleotídeo (dNTPs – Invitrogen), 1,0 U 'Platinum Taq Polymerase' (Invitrogen), 1 μ l de DNA da amostra e água ultrapura ('Nuclease-free water' – Promega) até completar o volume final de 25 μ l.

Para a reação da Nested-PCR foram utilizadas as mesmas condições da PCR primário, exceto pela diminuição da concentração de MgCl₂ que passou a ser 2 mM e a utilização de 0,2 μ M do 'primer' 18SNF e 0,2 μ M do 'primer' 18SNR.

Os ciclos termais utilizados para a realização das reações da PCR-Nested tiveram como ponto de partida a temperatura de 94°C por três minutos ('hot start'), seguida de um

total de 35 ciclos onde ocorreu a desnaturação do DNA a 94°C por 45 segundos, hibridização dos oligonucleotídeos através de um gradiente de temperatura que variou de 55° a 60°C por 45 segundos e a extensão da cadeia de DNA dos produtos formados a 72°C por um minuto. Ao final dos 35 ciclos foi realizada uma etapa de extensão a 72°C por sete minutos.

Após a execução de todos os ciclos, os microtubos contendo 25 µl de amostra foram retirados do termociclador e 5 µl do material visualizado através da eletroforese em gel de agarose a 1% (100V por 40 minutos), corado com brometo de etídio (5µg/ml) e GelRedTM (1X).

O tampão de amostra utilizado foi 'loading buffer' 6X – tipo III (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e o marcador usado como peso molecular foi '1Kb Plus DNA Ladder' (Invitrogen).

Os géis de agarose foram posteriormente observados sob luz ultravioleta, analisados e fotografados.

3.2.7. Padronização das Reações da PCR Primária e Nested-PCR para o Gene *GP60*

O controle positivo para esta reação, foi o mesmo utilizado para o Gene *18S*, passando assim por mais uma nova reação da Nested-PCR, desta vez utilizando o gene alvo *GP60* (60 *kDa glycoprotein*).

Os 'primers' utilizados na reação de PCR foram AL3531: 5'-ATA GTC TCC GCT GTA TTC-3' ('forward') e AL3534: 5'-GCA GAG GAA CCA GCA TC-3' ('reverse'), esperando-se obter amplicons com 950 pb (PENG et al., 2003).

Para o Nested-PCR, tendo o mesmo gene como alvo e utilizando os 'primers' AL3532: 5'-TCC GCT GTA TTC TCA GCC-3' ('forward') e AL3533: 5'-GAG ATA TAT CTT GGT GCG-3' ('reverse'), esperando-se obter amplicons de aproximadamente 550 pb (PENG et al., 2003).

Os ciclos termais utilizados para a realização das reações de PCR-Nested utilizando o gene *GP60* tiveram como ponto de partida a temperatura de 95°C por três minutos ('hot start'), seguida de um total de 35 ciclos onde ocorreu a desnaturação do DNA a 94°C por 45 segundos, hibridização dos oligonucleotídeos através de um gradiente de temperatura que variou de 50° a 60°C por 45 segundos e a extensão da cadeia de DNA dos produtos formados a 72°C por um minuto. Ao final dos 35 ciclos foi realizada uma etapa de extensão a 72°C por dez minutos.

Para a visualização dos fragmentos de DNA obtidos na PCR primária e no Nested-PCR foram utilizados os mesmos protocolos descritos anteriormente para as reações com o gene *SSUrRNA*.

Quando a identificação do espécime utilizando os 'primers' descritos acima foi falha tentou-se amplificar um fragmento menor (~ 400 pb) do mesmo gene, *GP 60*, através do uso dos 'primers' AL3531 e AL3533 na primeira reação de PCR e dos 'primers' AL3532 e LX0029 (5' -CGA ACC ACA TTA CAA ATG AAG T- 3' - 'reverse') no Nested-PCR (SULAIMAN et al., 2005), utilizando o mesmo ciclo padronizado anteriormente.

Todos os pares de 'primers' utilizados nas reações para o gene alvo *GP60* foram adquiridos na empresa Invitrogen.

3.2.8. Purificação e Quantificação

A purificação do material obtido na reação de Nested-PCR foi realizada através a utilização do 'kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-up System' (Promega).

A quantificação do material purificado obtido foi realizada como auxílio de espectrofotômetro, Nanodrop 2000.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Extração das Amostras

Ambos os protocolos de extração de DNA (I e II) utilizados neste estudo foram capazes de romper as paredes dos oocistos de *Cryptosporidium* sp., obtidos a partir amostras fecais de bezerros, e expor o material genético do protozoário.

A qualidade do DNA obtido foi avaliada de duas maneiras distintas, sendo primeiramente observada a relação de absorvância obtida pela quantificação do material e a segunda através da degradação de DNA presente no gel de agarose.

As concentrações do DNA extraído assim como a relação de absorvância através da quantificação encontram-se descritos na tabela 6.

No gel de agarose não foi observada a presença de DNA para o protocolo de extração I. Já, para o protocolo de extração II foi observado degradação do material extraído.

Tabela 6 – Quantificação e relação de absorvância do DNA extraído de oocistos de *Cryptosporidium* sp. obtidos em amostras fecais de bezerros.

AMOSTRA	PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO	CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS (ng/μl)	RELAÇÃO 260/280
1	I	14,1	1,8
2		4,9	2,0
3		8,3	1,8
1'	II	35,9	1,9
2'		13,7	1,8
3'		100,2	1,3

3.3.2. Gradiente de Temperatura

3.3.2.1. Gene alvo *18S*

Todas as amostras, contendo o DNA de *Cryptosporidium* foram extraídas utilizando o protocolo de extração I, e submetidas à reação de PCR primário e Nested-PCR, com gradiente de temperatura.

Baseado na visualização dos produtos amplificados em gel de agarose, a melhor temperatura de anelamento para a reação da PCR primária foi de 58°C (Figuras 4 e 5) e para a reação da Nested-PCR a temperatura de anelamento escolhida foi de 59°C (Figuras 6 e 7).

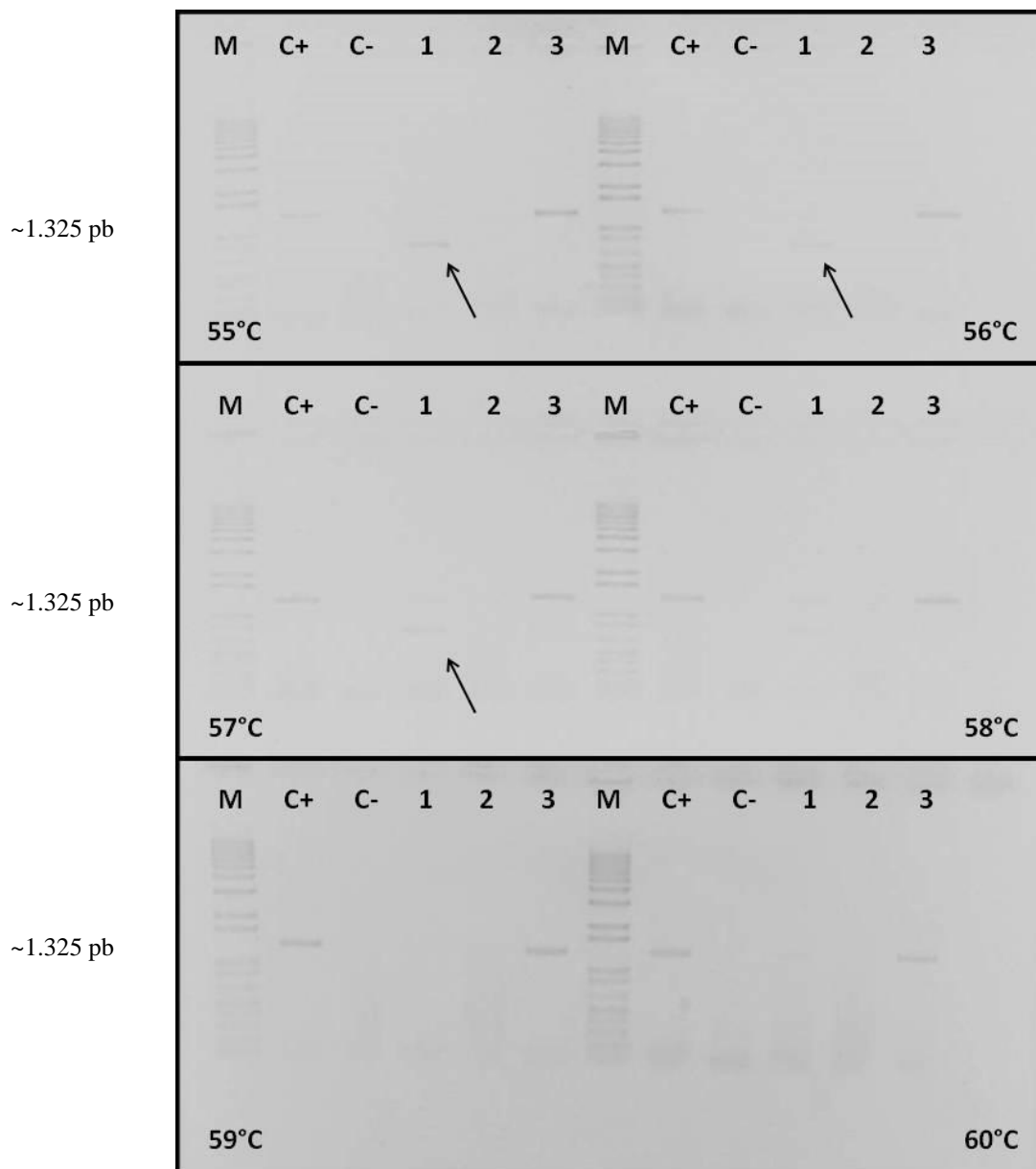


Figura 4 – Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, reação da PCR com gradiente de temperatura variando entre 55° e 60°C, gene *18S*. As setas apontam para bandas inespecíficas. Tempo de exposição à luz ultravioleta foi de aproximadamente 1 segundo. M: marcador; C+: controle positivo da reação; C-: controle negativo da reação; 1: amostra 1; 2: amostra 2 e 3: amostra 3.

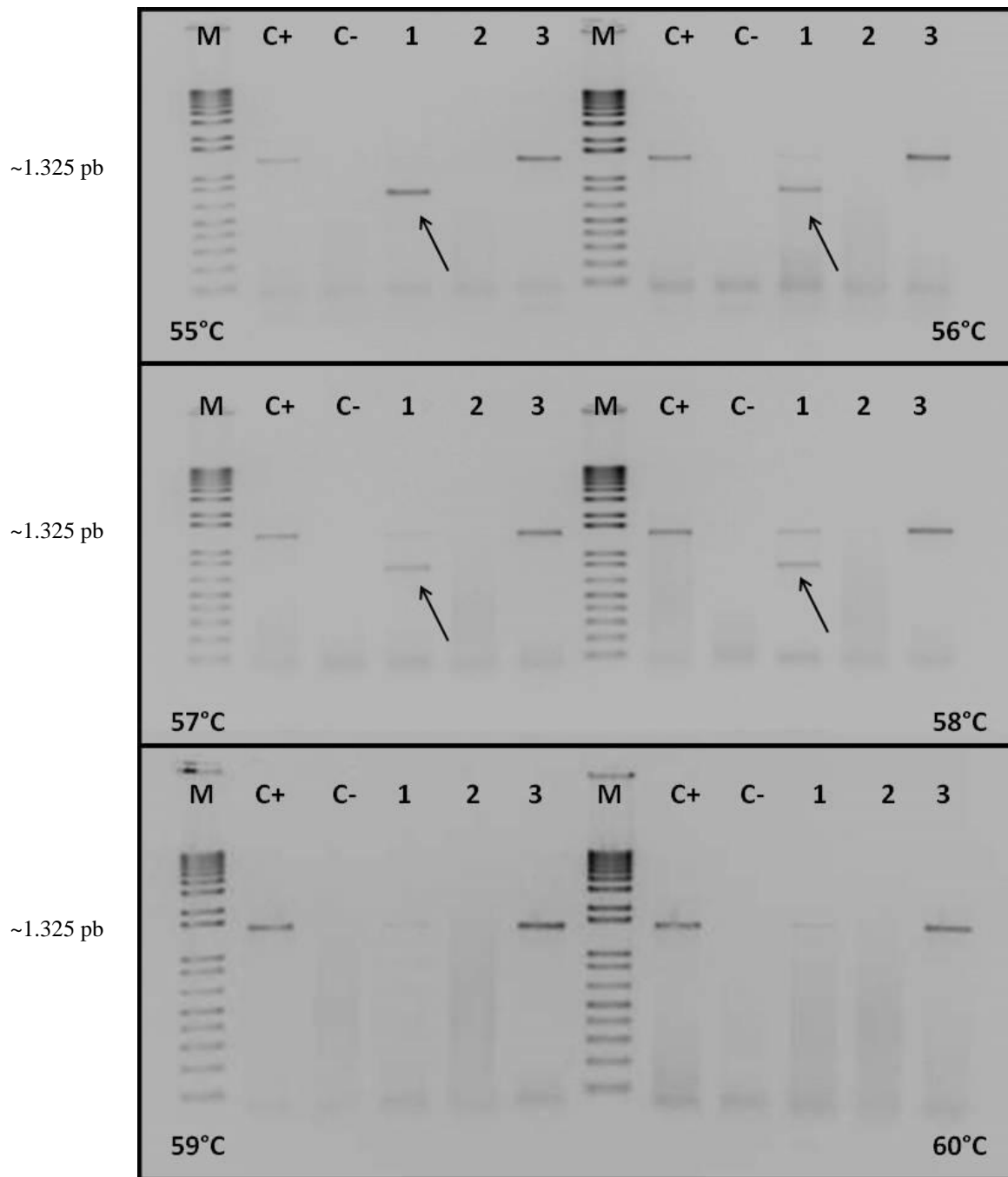


Figura 5 – Gel de agarose a 1% corado com GelRedTM, reação de PCR com gradiente de temperatura variando entre 55° e 60°C, gene *18S*. As setas apontam para bandas inespecíficas. Tempo de exposição à luz ultravioleta foi de aproximadamente 1 segundo. M: marcador; C+: controle positivo da reação; C-: controle negativo da reação; 1: amostra 1; 2: amostra 2 e 3: amostra 3.

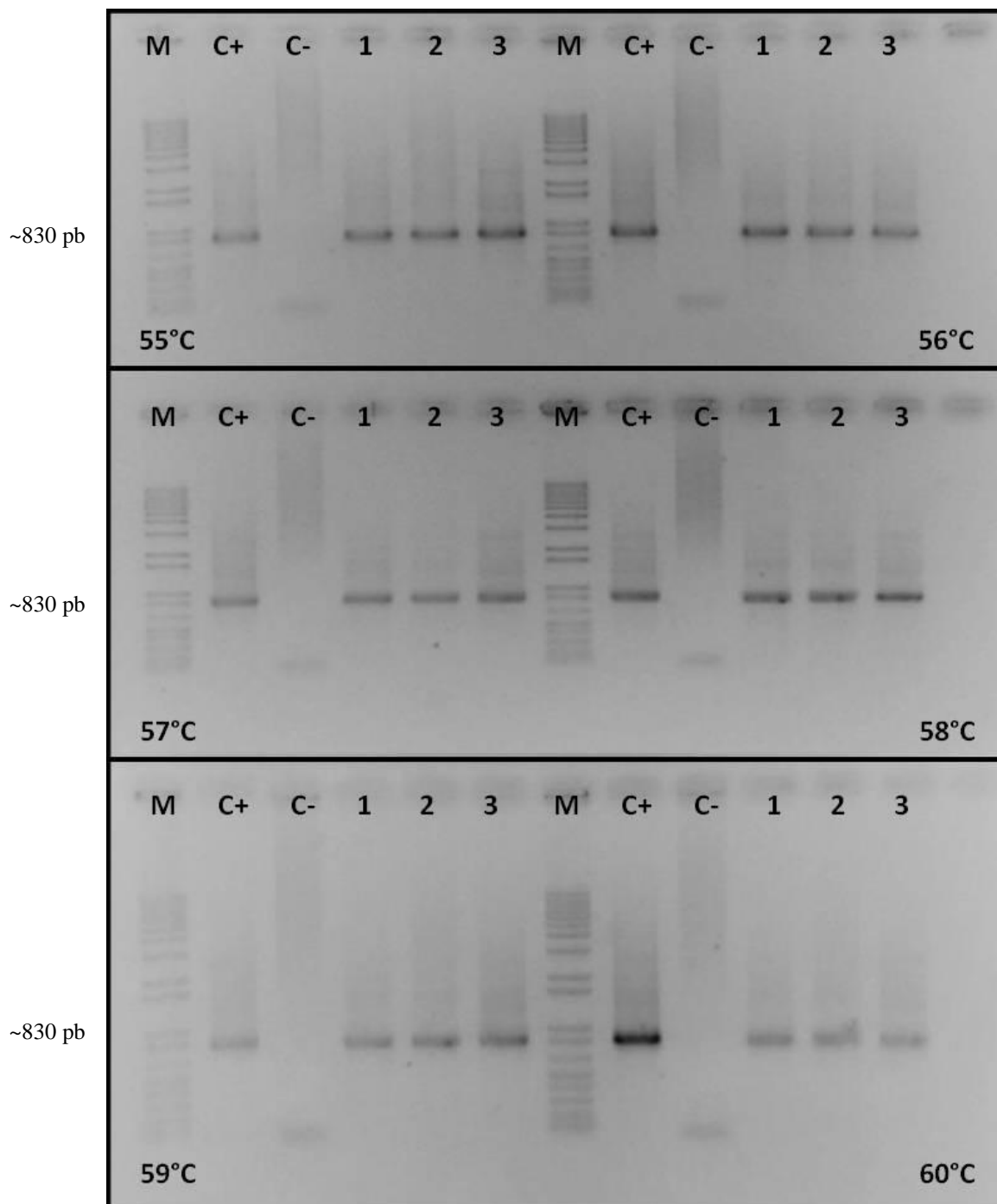


Figura 6 – Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, reação de Nested- PCR com gradiente de temperatura variando entre 55° e 60°C, gene *18S*. Tempo de exposição à luz ultravioleta foi de aproximadamente 1 segundo. M: marcador; C+: controle positivo da reação; C-: controle negativo da reação; 1: amostra 1; 2: amostra 2 e 3: amostra 3.

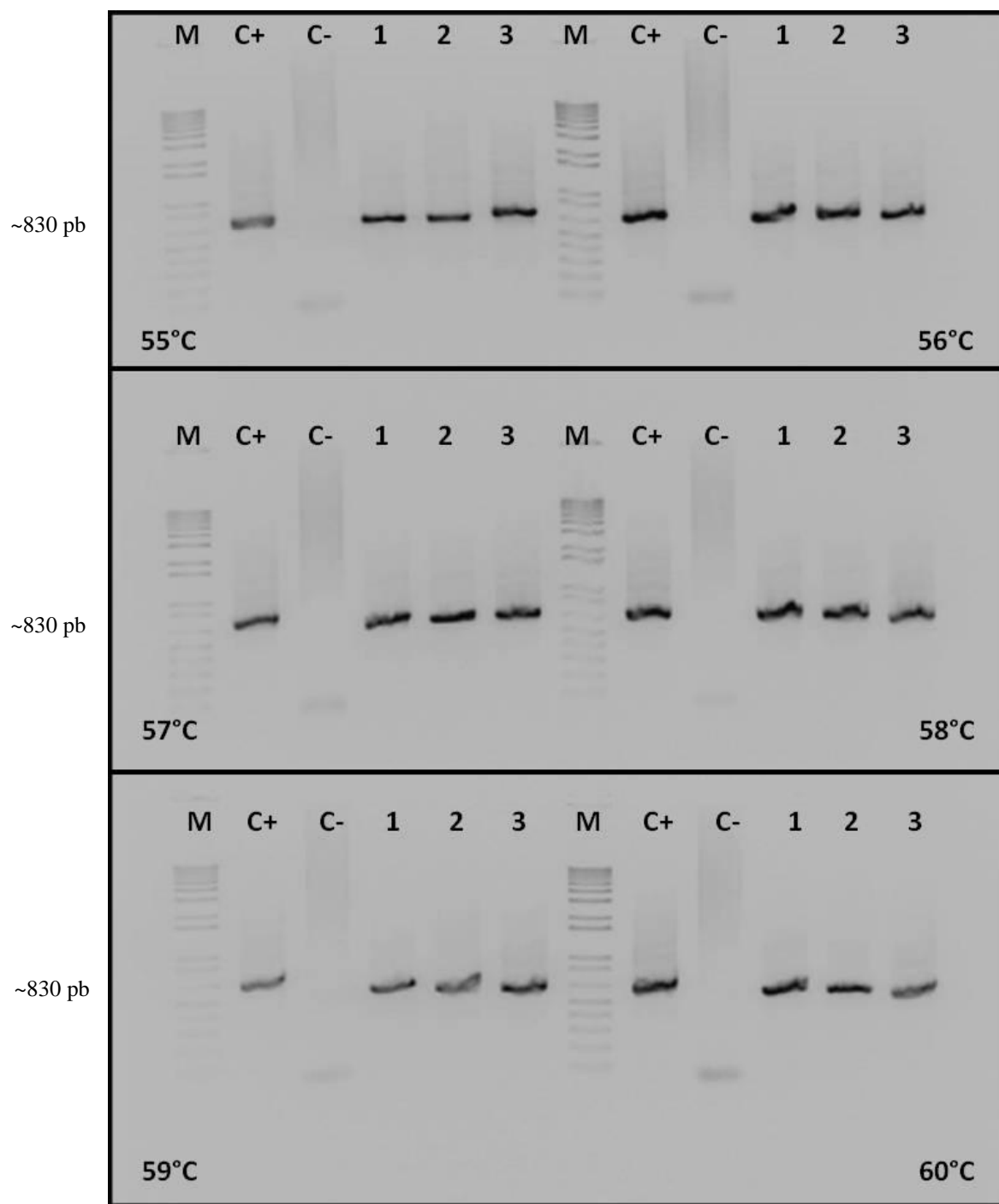


Figura 7 – Gel de agarose a 1% corado com GelRedTM, reação de Nested- PCR com gradiente de temperatura variando entre 55° e 60°C, gene *I8S*. Tempo de exposição à luz ultravioleta foi de aproximadamente 1 segundo. M: marcador; C+: controle positivo da reação; C-: controle negativo da reação; 1: amostra 1; 2: amostra 2 e 3: amostra 3.

3.3.2.2. Gene alvo *GP60*

As reações de PCR primária e Nested-PCR realizadas para o gene *GP60* utilizaram o controle positivo e suas duas primeiras diluições como amostras.

Testes utilizando os pares de 'primers' descritos por PENG et al. (2003) não demonstraram a eficiência esperada para as condições disponíveis no laboratório, dessa forma, foram utilizados os 'primers' descritos por SULAIMAN et al. (2005) que corresponderam bem as condições laboratoriais utilizadas.

Com base nos resultados apresentados pelas figuras 8, 9, 10 e 11 a temperatura de anelamento mais adequadas para as reações de PCR primária e Nested-PCR foi 56,8°C.

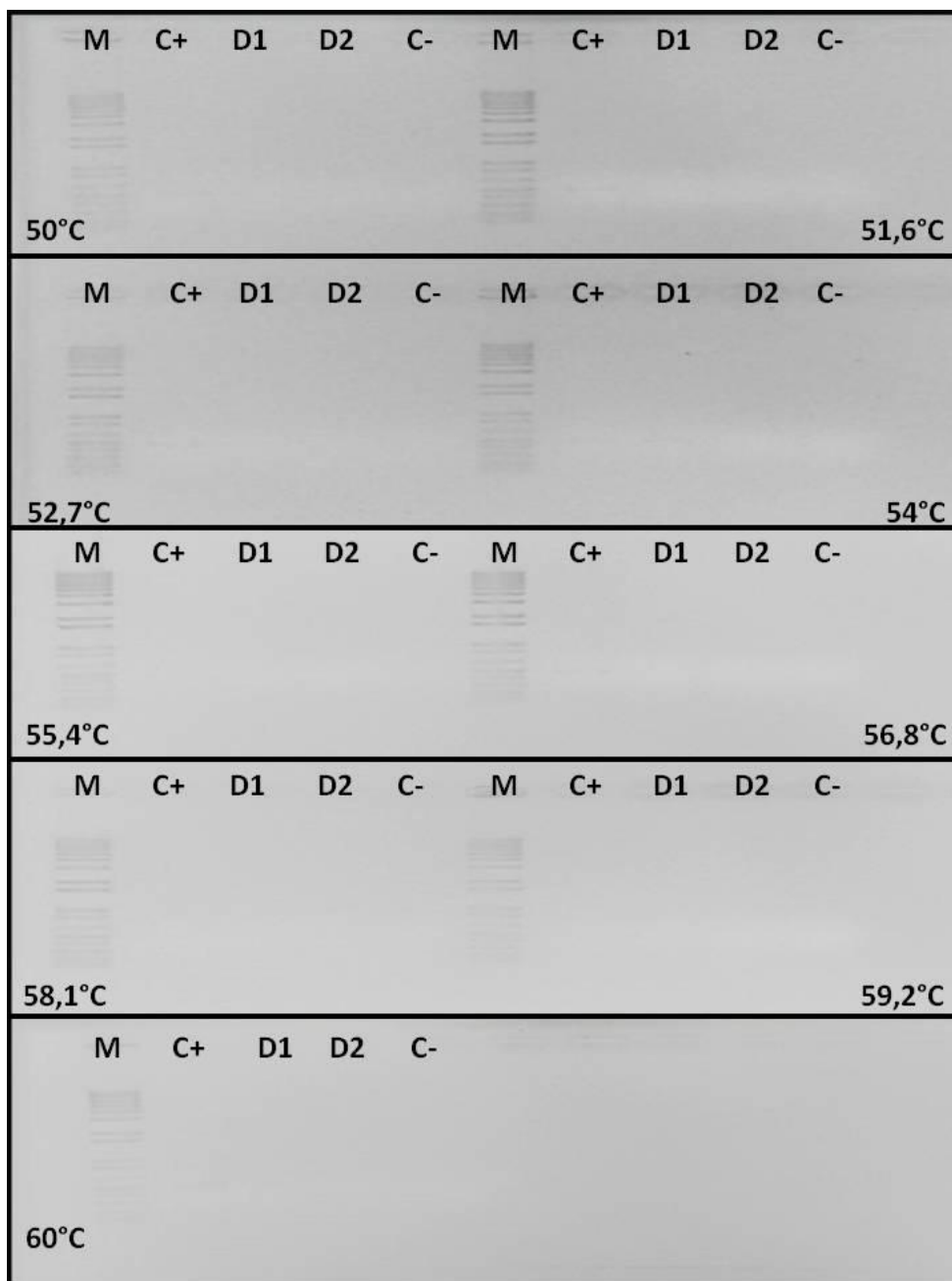


Figura 8 – Gradiente de temperatura, variando entre 50° e 60°C, utilizado nas reações de PCR para o gene *GP60* em gel de agarose 1% utilizando brometo de etídio. O tempo de exposição à radiação UV foi de aproximadamente 0,9 segundos. M: marcador; C+: amostra concentrada do controle positivo, D1: diluição 1; D2: diluição 2 e C-: controle negativo. com gradiente de temperatura.

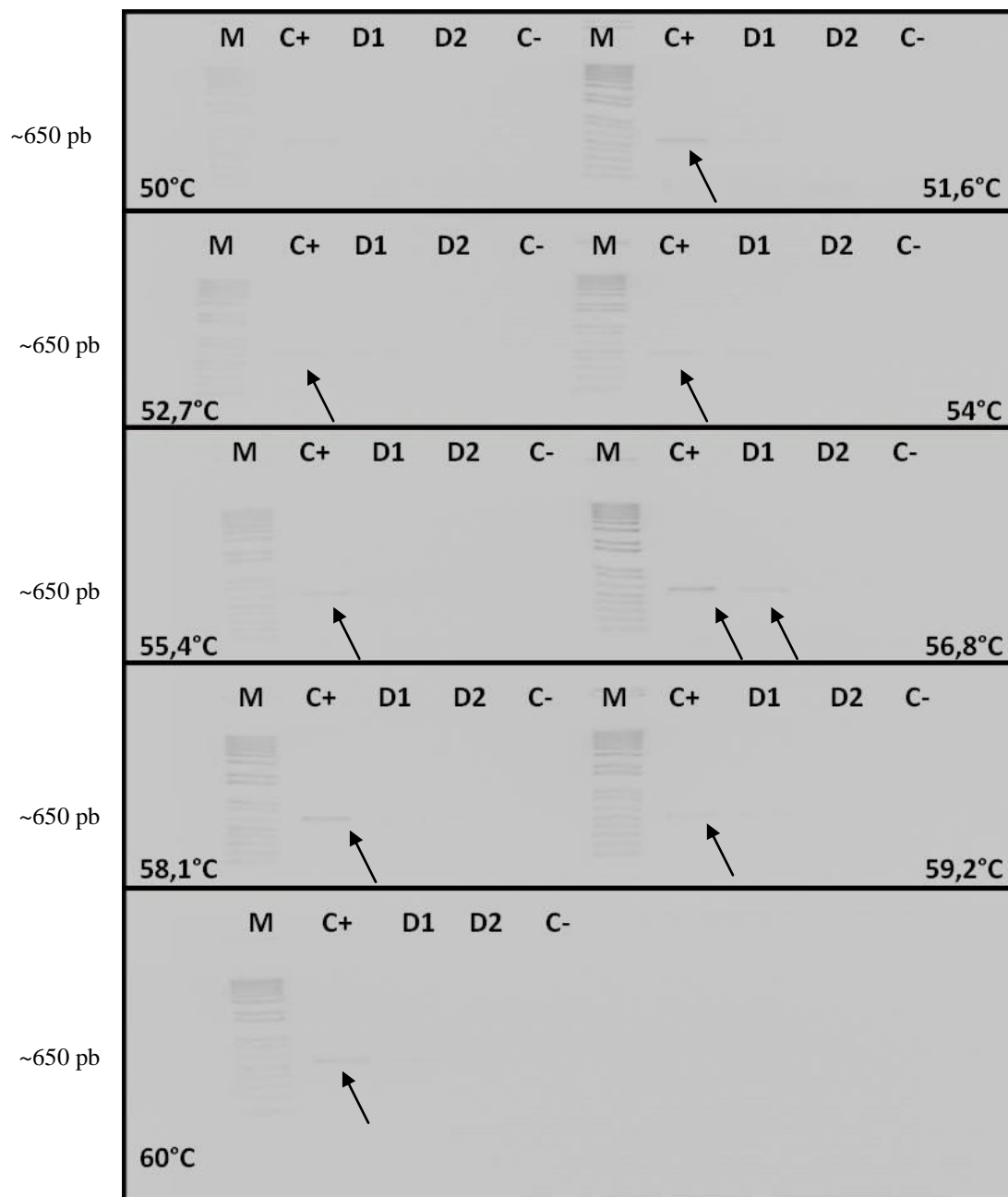


Figura 9 – Gradiente de temperatura, variando entre 50° e 60°C, utilizado nas reações de PCR para o gene *GP60* em gel de agarose 1% utilizando *GelRed™*. Seta aponta para banda de aproximadamente 650 pb. O tempo de exposição à radiação UV foi de aproximadamente 0,9 segundos. M: marcador; C+: amostra concentrada do controle positivo, D1: diluição 1; D2: diluição 2 e C-: controle negativo.

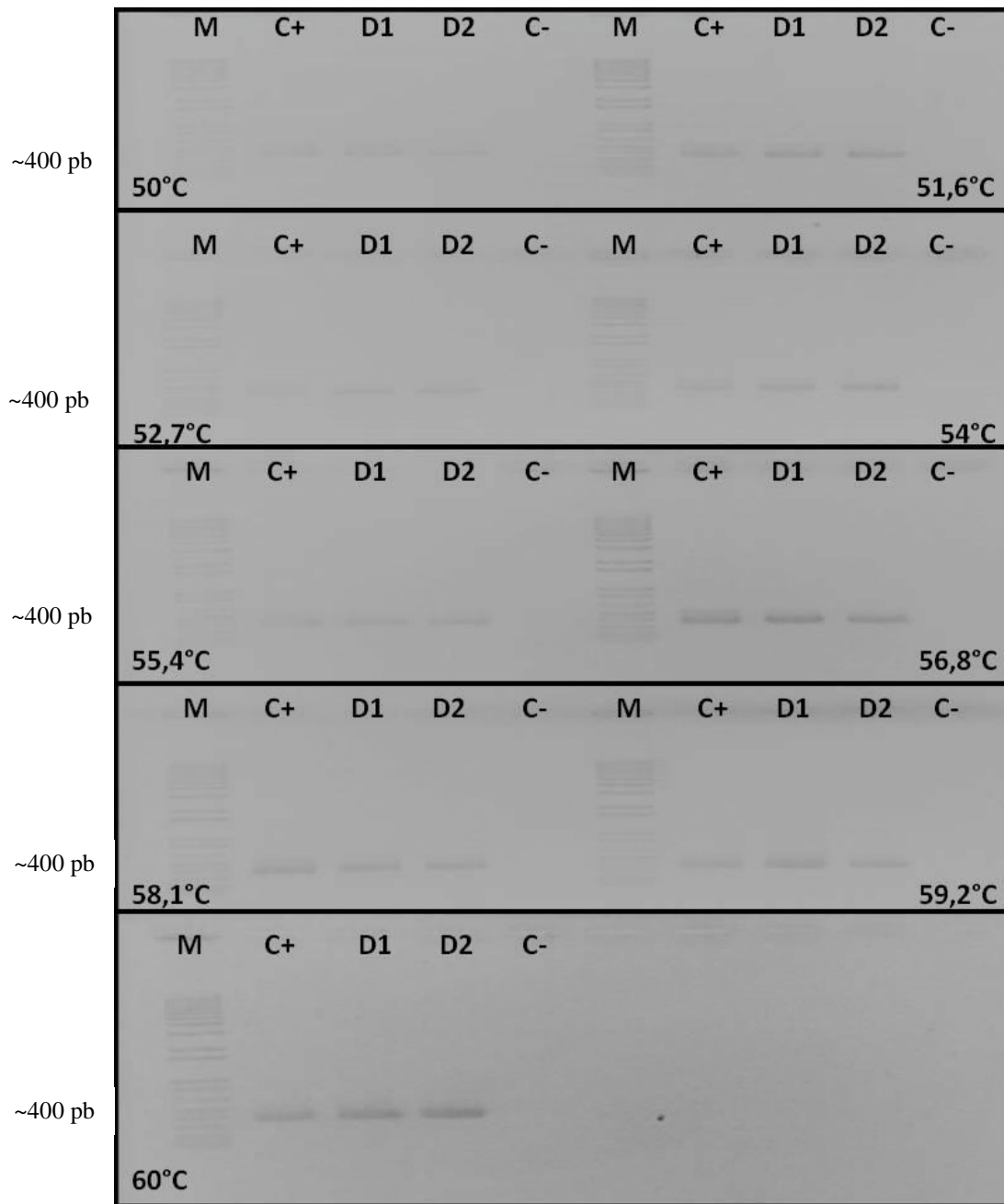


Figura 10 – Gradiente de temperatura, variando entre 50° e 60°C, utilizado nas reações de Nested-PCR para o gene *GP60* em gel de agarose 1% utilizando brometo de etídio. O tempo de exposição à radiação UV foi de aproximadamente 0,9 segundos. M: marcador; C+: amostra concentrada do controle positivo, D1: diluição 1; D2: diluição 2 e C-: controle negativo.

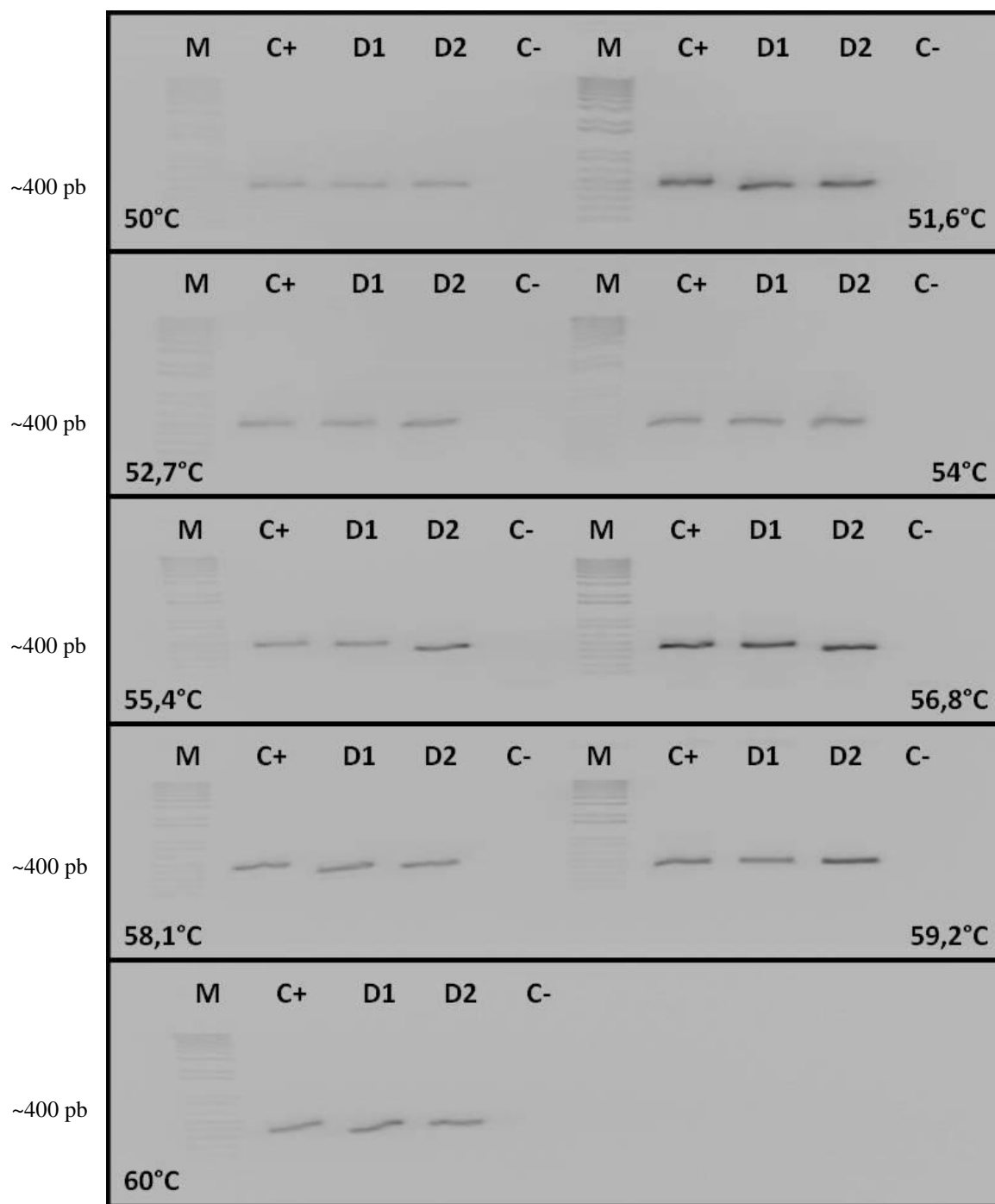


Figura 11 – Gradiente de temperatura, variando entre 50° e 60°C, utilizado nas reações de Nested-PCR para o gene *GP60* em gel de agarose 1% utilizando *GelRedTM*. O tempo de exposição à radiação UV foi de aproximadamente 0,9 segundos. M: marcador; C+: amostra concentrada do controle positivo, D1: diluição 1; D2: diluição 2 e C-: controle negativo.

3.3.2.3. PCR e PCR-Nested do controle positivo – Genes alvo *I8S* e *GP60*

O comportamento da amostra de DNA de *Cryptosporidium parvum* purificada utilizada como controle positivo da reação e suas diluições, além do controle negativo da reação podem ser observadas nas figuras 12 e 13 para o gene *I8S* e nas figuras 14 e 15 para o gene *GP60*.

As temperaturas utilizadas para verificar o limite de detecção de DNA dos controles positivos das reações da PCR e da Nested-PCR foram as mesmas determinadas anteriormente pelo gradiente de temperatura.

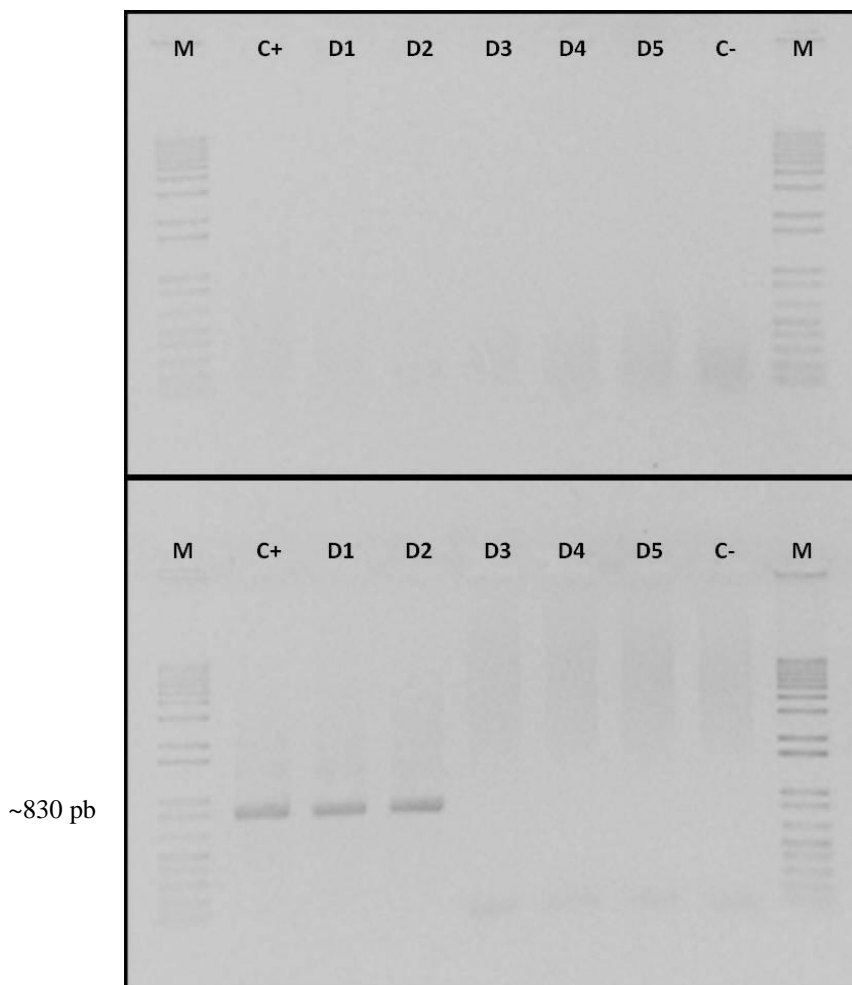


Figura 12 – Controles positivos e negativos das reações da PCR-Nested em gel de agarose 1% utilizando brometo de etídio para o gene *I8S*. O tempo de exposição a radiação UV foi de aproximadamente 0,9 segundos. A: reação da PCR primária; B: reação da Nested-PCR. M: marcador; C+: amostra concentrada do controle positivo, D1: diluição 1; D2: diluição 2; D3: diluição 3; D4: diluição 4; D5: diluição 5 e C-: controle negativo da reação.

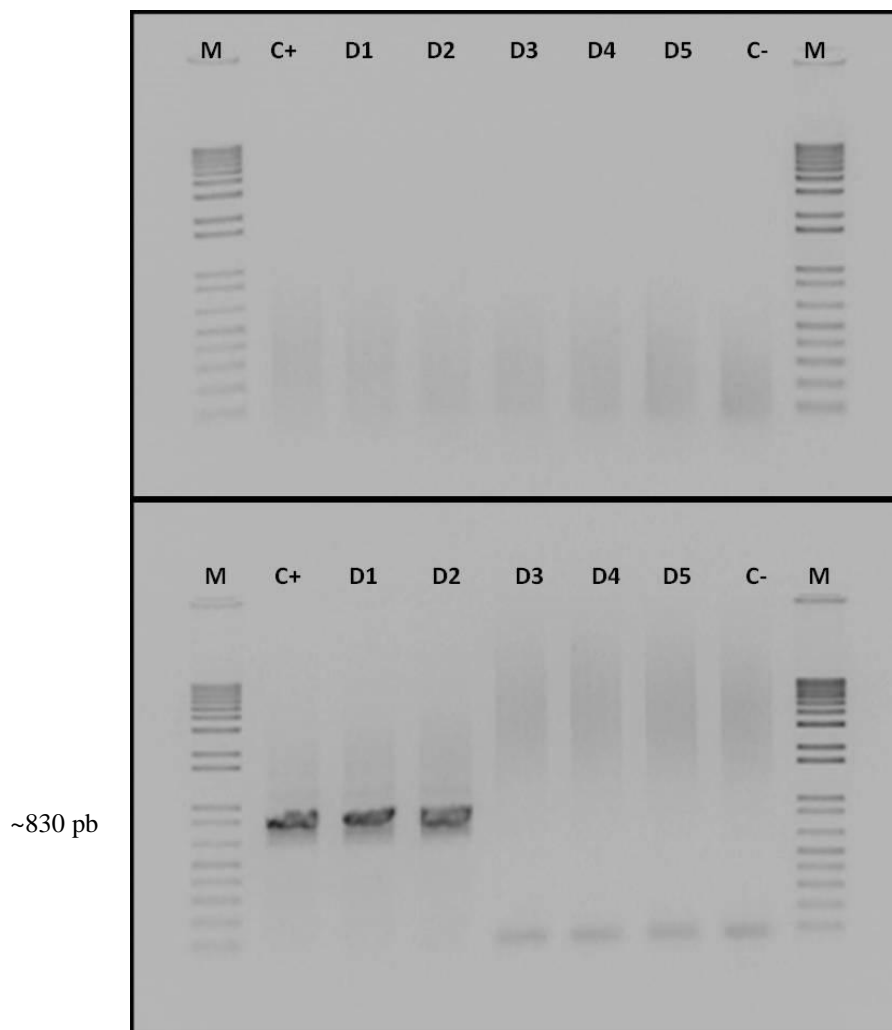


Figura 13 – Controles positivos e negativos das reações de PCR-Nested em gel de agarose 1% utilizando GelRedTM para o gene *18S*. O tempo de exposição a radiação UV foi de aproximadamente 0,9 segundos. A: reação da PCR primária; B: reação da Nested-PCR. M: marcador; C+: amostra concentrada do controle positivo, D1: diluição 1; D2: diluição 2; D3: diluição 3; D4: diluição 4; D5: diluição 5 e C-: controle negativo da reação.

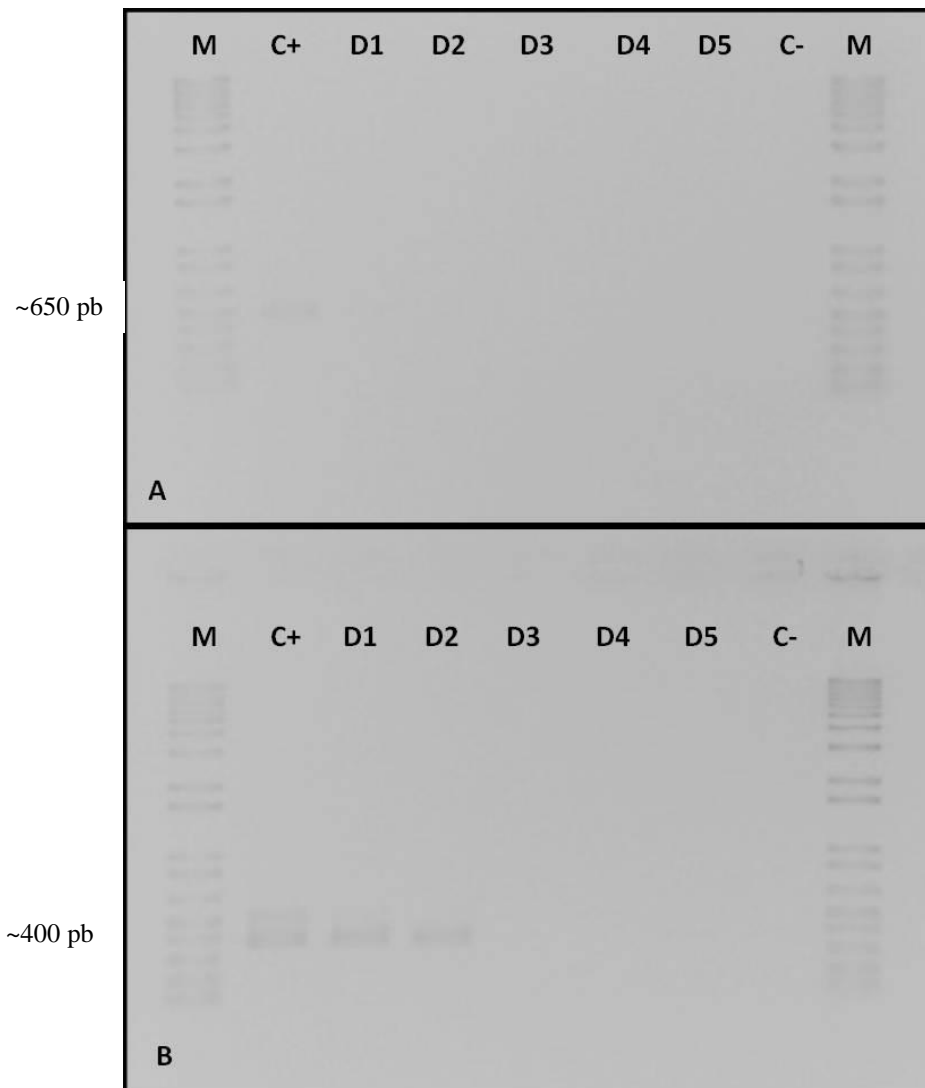


Figura 14 – Controles positivos e negativos das reações da PCR-Nested em gel de agarose 1% utilizando brometo de etídio para o gene *GP60*. O tempo de exposição a radiação UV foi de aproximadamente 0,9 segundos. A: reação da PCR primária; B: reação da Nested-PCR. M: marcador; C+: amostra concentrada do controle positivo, D1: diluição 1; D2: diluição 2; D3: diluição 3; D4: diluição 4; D5: diluição 5 e C-: controle negativo da reação.

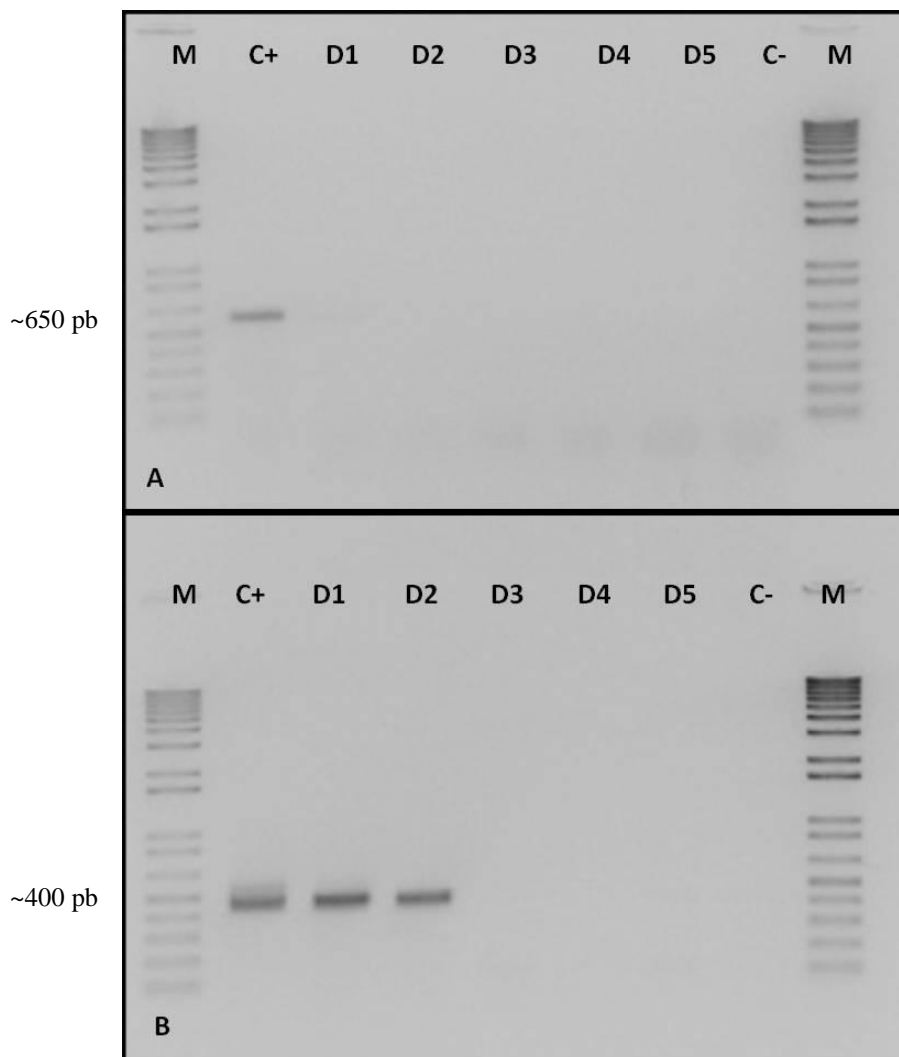


Figura 15 – Controles positivos e negativos das reações de PCR-Nested em gel de agarose 1% utilizando GelRedTM para o gene *GP60*. O tempo de exposição a radiação UV foi de aproximadamente 0,9 segundos. A: reação da PCR primária; B: reação da Nested-PCR. M: marcador; C+: amostra concentrada do controle positivo, D1: diluição 1; D2: diluição 2; D3: diluição 3; D4: diluição 4; D5: diluição 5 e C-: controle negativo da reação.

3.4. DISCUSSÃO

3.4.1. Extração do DNA

A qualidade do material genético obtido através do processo de extração é um ponto primordial para se obter sucesso na amplificação do DNA (CHIARI et al., 2009). As amostras devem apresentar o mínimo de impurezas para não inibir os tratamentos enzimáticos ou causar interferências nos padrões de migração em gel de agarose (ROMANO; BRASILEIRO, 1999). Dessa forma, quanto mais pura estiver a amostra extraída, melhor será o resultado final da amplificação através da PCR-Nested. A escolha do melhor protocolo de extração utilizado pode ter como base dois parâmetros: a qualidade do DNA em gel de agarose e a quantificação da relação de absorbância 260/280. Razões entre 1,8 e 2,0 indicam pureza do DNA, enquanto que razões abaixo de 1,8 apontam contaminação do material por proteínas e razões acima de 2,0 indicam contaminação por fenóis (ROMANO; BRASILEIRO, 1999). A escolha do protocolo de extração de amostras para posterior amplificação através das técnicas da PCR-Nested do presente estudo levou em consideração a observação da qualidade do DNA em gel de agarose e os valores obtidos na relação de absorbância utilizando o ‘nanodrop’.

Observando o DNA obtido através da utilização do protocolo de extração I, todas as amostras apresentaram menor quantidade de DNA total, porém a quantidade obtida permitiu a realização da amplificação do material genético e o mesmo se manteve dentro do limite de pureza descrito como ideal para a razão 260/280, o que não aconteceu com todas as amostras quando se utilizou o protocolo de extração II. Por esta razão o protocolo de extração I foi escolhido para a aplicação das técnicas da PCR-Nested.

Quando avaliamos a integridade do DNA em gel de agarose podemos observar degradação nas amostras que utilizaram o protocolo de extração II, por não aparecer uma banda definida de DNA. O grau de degradação do DNA não pôde ser avaliado através da visualização em gel de agarose no protocolo de extração I, provavelmente devido à menor quantidade do DNA total obtido. Tal quantidade reduzida possivelmente está associada ao fato de o kit utilizado realizar uma purificação das amostras juntamente com o procedimento de extração. Este fato foi observado em outros estudos, onde o este mesmo kit comercial é utilizado para purificar DNA obtido após extração (SULAIMAN et al., 2005; FENG, et al., 2007).

Além dos fatores técnicos, outro ponto que influenciou na escolha do protocolo de extração I, foi o tempo de execução do procedimento. Esta extração possui menos etapas até chegar ao produto final, diminuindo a probabilidade de erros durante o procedimento. Sendo ainda considerada uma técnica mais rápida e de maior praticidade do que o protocolo de extração II. Além destas características o protocolo de extração I apresenta um menor custo quando comparado ao II.

3.4.2. Gradiente de Temperatura

Os dois pares de ‘primers’ para o gene alvo *18S* utilizados no estudo apresentaram-se eficientes para a identificação do gênero *Cryptosporidium*, após um processo de otimização da reação através da realização de um gradiente de temperatura.

Os ‘primers’ possuem uma temperatura teórica de anelamento, porém esta pode variar de acordo com as condições utilizadas no laboratório, como reagentes e equipamentos. Por

isso, geralmente encontramos dificuldades em reproduzir resultados descritos por outros autores.

Através da utilização de um gradiente de temperatura podemos observar o comportamento das amostras mediante a variação térmica, escolhendo assim a temperatura mais adequada para as nossas condições de uso.

Baixas temperaturas de anelamento podem produzir produtos inespecíficos, já em temperaturas elevadas esse problema é resolvido, porém, há uma diminuição no número de produtos obtidos através da PCR (HANFELD-VIEIRA et al., 2001).

Alguns autores (XIAO et al., 1999a; HUBER et al., 2007; CASTRO-HERMIDA et al., 2009; KHAN et al., 2010) utilizaram 55°C como temperatura ideal de anelamento dos 'primers' *I8S*, para a PCR primária e Nested-PCR. Tal temperatura para as condições utilizadas no laboratório onde este estudo foi realizado não foram muito eficientes, pois foram gerados anelamentos não específicos na reação de PCR primária, observados em gel de agarose.

A utilização de temperaturas mais elevadas nas reações da PCR primária e Nested-PCR resolveu o problema do anelamento inespecífico das amostras de *Cryptosporidium* sp. analisadas. Temperaturas mais elevadas também foram utilizadas por Feltus et al. (2006); Fayer et al. (2006; 2010 a); Coklin et al. (2010), porém estas divergiram do presente estudo em um grau acima para a reação da PCR primária e um grau abaixo para a Nested-PCR. No presente trabalho foi utilizada a temperatura de 58°C na reação primária da PCR visando restringir a produção de anelamento inespecífico sem reduzir muito a quantidade de moléculas de DNA produzidas, já na reação da Nested-PCR a temperatura usada foi 59°C, o que tornou a reação ainda mais específica.

Para o gene alvo *GP60* foi adotado o mesmo procedimento, sendo realizado um gradiente de temperatura para cada uma das reações de amplificação de DNA.

A temperatura de anelamento utilizada nos estudos conduzidos por Peng et al. (2003) e Sulaiman et al. (2005) foram pouco satisfatórias para as condições laboratoriais descritas neste estudo, produzindo uma quantidade de fragmentos de DNA pouco evidente em gel de agarose. A elevação da temperatura em 6,8°C proporcionou um melhor desempenho no anelamento dos 'primers' para as condições reacionais utilizadas no presente estudo, tal fato foi evidenciado através da observação dos fragmentos de DNA em gel de agarose.

3.4.3. Brometo de Etídio x GelRedTM

A coloração por brometo de etídio é amplamente utilizada na visualização de fragmentos de DNA de *Cryptosporidium* sp. obtidos através de eletroforese em gel de agarose (XIAO et al., 1999a; 1999b; XIAO et al., 2001; MAGI et al., 2006; GEURDEN et al., 2007; BROGLIA et al., 2008; COKLIN et al., 2009; FAYER et al., 2005; 2006; 2008; DÍAZ et al., 2010; FAYER et al., 2010a; 2010b; KHAN et al., 2010; DAS et al., 2011; NAZEMALHOSSEINI-MOJARAD et al., 2011). No presente estudo, através da comparação dos géis onde foram observados o limite de detecção do controle positivo para os genes *I8S* e *GP60*, pôde-se observar a superioridade do GelRedTM para evidenciar a presença do DNA e seus fragmentos, demonstrando sua elevada sensibilidade em relação ao brometo de etídio.

Poucos estudos foram realizados na tentativa de demonstrar as vantagens da utilização do GelRedTM em relação a outros métodos de coloração, porém Huang et al., (2010) destaca dentre elas o baixo custo do produto, a ausência de alteração na mobilidade do fragmento de

DNA, o grande período de estocagem sem alterar sua eficácia, a melhor visualização das bandas de DNA utilizando transiluminador UV e a baixa toxicidade do produto.

A utilização de GelRedTM 10X concentrado, ao invés de 100X como foi descrito por Huang et al. (2010) pode ser interessante do ponto de vista econômico, pois isso reduz ainda mais o custo do reagente e não acarretaria modificações na sensibilidade do corante. Tal fato foi observado no presente estudo, onde a utilização do GelRedTM 10X concentrado continuou sendo eficiente para a evidência de fragmentos de DNA em gel de agarose.

Huang et al. (2010) menciona que a utilização de GelRedTM a uma concentração de 100X não modifica a mobilidade do fragmento de DNA em gel de agarose, porém, tal fato não foi observado no presente estudo onde foi utilizado GelRedTM 10X concentrado. Analisando os fragmentos de DNA produzidos pelas reações de PCR-Nested pode-se observar que geralmente as bandas visualizadas nos géis oriundos das reações de PCR primária produzem um comportamento retilíneo enquanto que as obtidas a partir das reações de Nested-PCR não adotam o mesmo comportamento. Diversos fatores podem influenciar no comportamento migratório dos fragmentos de DNA, dentre eles podemos ressaltar o tamanho do fragmento de DNA produzido, a concentração do gel de agarose, a voltagem e o tipo de tampão de eletroforese utilizado na corrida. O manual do fabricante (<http://www.biotium.com>) descreve ainda que pelo fato de a molécula de GelRedTM ser 10 vezes maior do que a de brometo de etídio elas interagem com maior afinidade ao ácido nucléico e se ligam ao mesmo em maior quantidade, o que muitas vezes pode ocasionar atraso na migração, principalmente para fragmentos maiores que 400pb.

3.5. CONCLUSÃO

No presente estudo foram observadas as diversas vantagens na utilização do protocolo de extração I (kit comercial da Qiagen). Dentre elas podemos destacar a pureza do material genético obtido, a rapidez na execução do procedimento e a redução do custo na aquisição de reagentes.

Através da utilização do gradiente de temperatura para as reações de PCR-Nested foi possível escolher as temperaturas ideais para a amplificação de DNA de *Cryptosporidium*. Melhorando a qualidade dos fragmentos de DNA obtidos nas reações de PCR-Nested para os genes *18S* e *GP60*.

A superioridade do *Gelred*TM em relação ao brometo de etídio foi observada neste estudo, ressaltando principalmente sua maior sensibilidade para evidenciar os fragmentos de DNA, a maior facilidade para o descarte do material devido a sua baixa toxicidade e maior segurança na sua manipulação.

4. CAPÍTULO II

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO POR *Cryptosporidium* spp. EM BEZERROS DESTINADOS A EXPLORAÇÃO LEITEIRA E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DAS ESPÉCIES DIAGNOSTICADAS

RESUMO

A criptosporidiose bovina pode ser ocasionada principalmente por quatro espécies distintas: *Cryptosporidium parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* e *C. andersoni*. Destas, a primeira é motivo de grande preocupação tanto para a pecuária quanto para a saúde pública. No que se refere à saúde pública, a espécie é alvo de diversos estudos devido ao seu elevado potencial zoonótico. Já, na pecuária é descrita como causadora de intensa diarreia nos animais, dentre outros sintomas clínicos, acarretando diversas perdas dentro da cadeia produtiva. O objetivo deste estudo é determinar a ocorrência das diferentes espécies e genótipos de *Cryptosporidium* através das técnicas de PCR-Nested para os genes alvo *18S* e *GP60*. A ocorrência de espécies de *Cryptosporidium* em bezerros com até um ano de idade foi determinada a partir da avaliação de 143 animais em três propriedades leiteiras localizadas no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. As amostras fecais utilizadas no estudo foram coletadas diretamente da ampola retal dos bezerros e foram processadas através da técnica de centrífugo-flutuação em solução saturada de açúcar antes de serem avaliadas microscopicamente. Das 28 amostras positivas na microscopia, 23 tiveram seu diagnóstico confirmado através da técnica de PCR utilizando como gene alvo o *18S*. Após o sequenciamento foi observada a presença de três espécies de *Cryptosporidium* infectando os bezerros em diferentes faixas etárias. Na fase pré-desmame (< 2 meses) 10% dos bezerros encontravam-se infectados por *C. parvum*, enquanto que os animais na fase pós-desmame (\geq 2 meses) apresentaram-se infectados por *C. andersoni* (15%) e *C. ryanae* (2%). Todas as amostras positivas estão sendo submetidas a uma nova reação de PCR utilizando como gene alvo o *GP60*. Um novo sequenciamento será realizado com as amostras positivas de *C. parvum* utilizando o *GP60* com o objetivo de diagnosticar os subtipos prevalentes na região.

Palavras-chave: Bezerros, *Cryptosporidium*, fase pré e pós-desmame, gene *18S*, gene *GP60*.

ABSTRACT

The bovine cryptosporidiosis is caused mainly by four different species, *Cryptosporidium parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* and *C. andersoni*. The first one is of great concern for both livestock and public health. With regard to public health, the species is the subject of several studies due to its high zoonotic potential. Already, in cattle is reported to cause severe diarrhea, among other clinical symptoms, leading to many economic losses. The aim of this study is to determine the occurrence of *Cryptosporidium* species and subtypes in calves up to one year of age, throughout PCR technique using *18S* and *GP60* as gene target. The occurrence of *Cryptosporidium* species in calves up to 1-year-old was determined for 143 animals on three dairy farms on the state of Rio de Janeiro, Brazil. A fecal samples collected directly from each calf rectum was processed to concentrate oocysts using the centrifugal flotation technique in saturated sugar solution before being evaluated microscopically. Of the 28 positive samples in microscopy, 23 were confirmed by Nested-PCR using gene *18SrRNA*. After each PCR-positive specimen was sequenced, the presence of three species of *Cryptosporidium* was observed infecting calves at different ages. Pre-weaned calves were infected with *C. parvum* (10%), whereas post-weaned calves were infected with *C. andersoni* (15%) and *C. ryanae* (2%). All positive samples are being submitted to a second Nested-PCR using gene *GP60* as target. A new sequencing will be made for *C. parvum* positive samples, to observe the most prevalent subtype in the area.

Key words: Calves, *Cryptosporidium*, pre- and post-weaned, 18S and GP60.

4.1. INTRODUÇÃO

Protozoários pertencentes ao gênero *Cryptosporidium* são descritos como importantes patógenos do trato gastrointestinal e respiratório de diversos hospedeiros, dentre estes podemos citar os animais de produção, de companhia e silvestres, além disso, dentro dessa cadeia epidemiológica algumas espécies do gênero podem parasitar o homem (CASTRO-HERMIDA et al., 2007; BROOK et al., 2008; COKLIN et al., 2009).

Em geral, a sintomatologia clínica da criptosporidiose em bovinos é bastante variável, sendo dependente, principalmente, da espécie infectante e do estado imunológico do hospedeiro (HAJDUŠEK et al., 2004; BROGLIA et al., 2008; BROOK et al., 2008; COKLIN et al., 2009). Alguns animais infectados podem apresentar-se assintomáticos, porém geralmente a doença se caracteriza clinicamente por diarreia, morbidade e até mortalidade, principalmente em bezerros neonatos (KVÁČ et al., 2006; CASTRO-HERMIDA et al., 2007; FAYER, 2007; MENDONÇA et al., 2007; BROGLIA et al., 2008; DE WAELE et al., 2010), ocasionando grandes perdas econômicas aos produtores (CASTRO-HERMIDA et al., 2007; FAYER, 2007; MENDONÇA et al., 2007; DÍAZ et al., 2010).

Onze espécies do gênero *Cryptosporidium* são consideradas como parasitas de mamíferos (FAYER, 2010), destas *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* e *C. andersoni* comumente são encontrados infectando bovinos em diferentes faixas etárias (CASTRO-HERMIDA et al., 2007; FENG et al., 2007; GEURDEN et al., 2007; BROGLIA et al., 2008; KESHAVARZ et al., 2009; FAYER et al., 2010b; DIXON et al., 2011; DAS et al., 2011; MEIRELES et al., 2011).

Dentre as quatro espécies citadas a mais comumente diagnosticada em bovinos é *C. parvum*, considerada de baixa especificidade em relação ao hospedeiro e alguns genótipos são considerados de elevado potencial zoonótico (COKLIN et al., 2009; DIXON et al., 2011). As outras três espécies, *C. bovis* e *C. ryanae* não foram consideradas zoonóticas e apresentam alta especificidade pelos bovinos. Já *C. andersoni* pode ser encontrado parasitando outros ruminantes e raramente o homem (COKLIN et al., 2009; FAYER, 2010; DIXON et al., 2011).

A prevalência das espécies de *Cryptosporidium* encontradas infectando bovinos leiteiros pode estar diretamente relacionada à idade do hospedeiro. Geralmente, encontramos *C. parvum* infectando bezerros jovens monogástricos, na fase pré-desmame (< 2 meses de idade). Com o passar do tempo ocorre o desenvolvimento ruminal, devido à mudança no hábito alimentar do bezerro, e a espécie infectante vai sendo gradativamente substituída. Durante a fase pós-desmame (2 – 11 meses) pode-se observar uma diminuição da prevalência de *C. parvum* e um aumento na infecção por *C. bovis* e *C. ryanae*, que começa a decrescer à medida que o bovino atinge a maturidade. A prevalência da infecção por *C. andersoni* em animais na fase pré-desmame é relativamente baixa, sendo a maior taxa de infecção observada principalmente em animais mais velhos, acima de 12 meses de idade (FAYER et al., 2006; CASTRO-HERMIDA et al., 2007; FAYER et al., 2007; BROOK et al., 2008; COKLIN et al., 2009; FAYER et al., 2010a; DIXON et al., 2011).

A espécie *C. parvum* é constituída por 11 famílias de subtipos (IIa, IIb, IIc, IId, IIe, II f, IIg, IIh, Ili, Ili e III), onde os subtipos IIa e IId são considerados zoonóticos. Dentre todas as famílias de subtipo supracitadas, a IIa é considerada a mais prevalente em bovinos (XIAO, 2010).

A identificação das espécies de *Cryptosporidium* não deve ser baseada apenas em dados obtidos através de microscopia, devido às similaridades nas características morfométricas existentes entre as espécies descritas até o momento. Dessa forma, ferramentas

moleculares vêm sendo amplamente utilizadas na identificação das diferentes espécies e subtipos, tornando-se determinantes para a correta classificação taxonômica de *Cryptosporidium* spp. (FAYER, 2010).

Estudos recentes apontam a utilização do gene codificador da glicoproteína de 60kDa ('60kDa Glycoprotein' - GP60) como uma ferramenta de grande importância para a subgenotipagem de *C. parvum*, auxiliando na determinação da dinâmica da transmissão do protozoário (NAZEMALHOSSEINI-MOJARAD et al., 2011).

A determinação das espécies/subtipos de *Cryptosporidium* de amostras provenientes de bovinos leiteiros vem sendo alvo de estudo em vários países, porém no Brasil estes estudos ainda são escassos. Desta forma, o presente estudo visa através da avaliação clínica de bezerros com até um ano de idade, juntamente com o diagnóstico microscópico positivo para *Cryptosporidium* spp. e o diagnóstico molecular, à caracterização das espécies/subtipos de *Cryptosporidium* provenientes de propriedades leiteiras no Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Locais de Realização do Estudo

O processamento das amostras fecais coletadas e o diagnóstico microscópico de *Cryptosporidium* spp. foram realizados no Laboratório de Protozoologia, localizado no Departamento de Parasitologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

O procedimento de extração de DNA e as técnicas de PCR-Nested foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular, no Departamento de Parasitologia Animal e no Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas, no Departamento de Solos, ambos pertencentes à UFRRJ.

O sequenciamento das amostras positivas para o gênero *Cryptosporidium* foi realizado pela empresa coreana Macrogen INC., em Seul, Coréia do Sul.

As sequências consenso e as análises filogenéticas foram realizadas no Laboratório de Protozoologia Departamento de Parasitologia Animal, UFRRJ.

4.2.2. Etapas do Estudo

A prevalência da infecção por *Cryptosporidium* spp. em bezerros com menos de 12 meses de idade foi avaliada durante o período de 2009 a 2011 em três propriedades leiteiras no Estado do Rio de Janeiro.

O presente estudo possuiu duas etapas distintas. Durante a primeira fase foram realizadas coletas de amostras fecais, o processamento do material coletado, e posterior diagnóstico microscópico da infecção por *Cryptosporidium* spp.

A segunda etapa do estudo consistiu na confirmação e identificação das espécies e genótipos de *Cryptosporidium*. Todas as amostras diagnosticadas positivamente através da microscopia óptica tiveram seu diagnóstico validado através da utilização de técnicas moleculares.

Após a identificação das amostras através do sequenciamento foram realizadas as sequências consenso e a análise filogenética das espécies encontradas.

4.2.3. Análise Estatística

A avaliação da relação entre a idade dos animais e a infecção pelo protozoário foi realizada através da aplicação do teste não paramétrico de Qui-quadrado ($p < 0.05$) (AYRES et al., 2005). Além disso, no estudo foi calculado o percentual da prevalência da infecção levando em consideração as diferentes espécies de *Cryptosporidium* diagnosticadas.

4.2.4. Coleta das Amostras Fecais

Amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal de 143 bezerros, com idade variando entre três dias e 12 meses, distribuídos entre três propriedades leiteiras no Estado do Rio de Janeiro.

A maioria das amostras de fezes obtidas dos bezerros estavam dentro dos padrões de normalidade, porém, 32 animais apresentaram um quadro de diarreia, que variou de leve a intenso, durante o período de coleta.

As amostras após coletadas foram identificadas com os dados de cada animal e armazenadas sob refrigeração até a chegada no Laboratório de Protozoologia.

No laboratório, as amostras foram catalogadas, processadas e diagnosticadas através da microscopia óptica quanto à presença de *Cryptosporidium* spp.

4.2.5. Procedimentos Laboratoriais das Amostras Fecais

O processamento das amostras de fezes foi dividido em duas etapas. A primeira etapa consistia na catalogação do material obtido de cada animal, filtragem e homogeneização do mesmo para posterior leitura em microscopia óptica.

A segunda etapa consistiu na extração de DNA do material positivo utilizando o kit comercial QIAamp, 'DNA Stool Mini Kit' e realização da PCR-Nested utilizando dois genes alvos, *18S* e *GP60*.

Ambos os procedimentos encontram-se descritos detalhadamente no capítulo 1.

4.2.6. Sequenciamento Gene *SSUrRNA* (*18S*)

Todas as amostras obtidas através da reação da Nested-PCR foram coradas com GelredTM e observadas em gel de agarose, sendo posteriormente purificadas utilizando o kit 'Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System' (Promega).

Após purificação e quantificação todo o material obtido foi enviado a Magrogen INC. onde foi efetuado o sequenciamento. As amostras purificadas foram quantificadas utilizando o Nanodrop, e a quantidade mínima de DNA exigida para o sequenciamento por amostra foi de 50 ng/µl, em um volume de 20 µl (http://dna.macrogen.com/eng/support/seq/data/Macrogen_Single_Pass_Sequencing_Sample_Submission_Guide_english.pdf).

Os 'primers' utilizados no sequenciamento dos espécimes obtidos foram o 18SNF e 18SNR, estes foram diluídos em 20 µl de água ultrapura ('nuclease-free water' – Promega) apresentando uma concentração final de 10 pmoles/µl (http://dna.macrogen.com/eng/support/seq/data/Macrogen_Single_Pass_Sequencing_Sample_Submission_Guide_english.pdf).

O sequenciamento das amostras de *Cryptosporidium* obtidas a partir da reação de Nested-PCR foi realizado pela Macrogen INC. utilizando o kit 'BigDye® v.3.1 terminator cycling' compatível para o sequenciador automático 'Applied biosystems' 3730XL, (<http://dna.macrogen.com/eng/service/seq/custom/customseq.jsp#pcr>).

O alinhamento das sequências e seus ajustes manuais foram feitos utilizando o programa Clustal W (LARKIN et al., 2007; GOUJON et al., 2010), as sequências foram analisadas através do 'software' MEGA 5 (TAMURA et al., 2011). As análises dos cromatogramas foram realizadas através do programa CROMOS LITE.

Na plataforma BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foi realizada uma busca de todas as sequências obtidas através do sequenciamento dos espécimes utilizando o gene *SSUrRNA* para determinar suas identidades e possíveis homologias e similaridades com espécies previamente depositadas no 'GenBank'.

4.2.7. Sequenciamento Gene *GP60*

Todo o protocolo descrito para o sequenciamento das amostras de *Cryptosporidium* utilizando o gene *SSUrRNA* foi novamente seguido para a realização sequenciamento dos genótipos de *C. parvum*, desta vez utilizando o gene *GP60*. A única modificação no protocolo foi a escolha dos ‘primers’ enviados para o sequenciamento.

Os ‘primers’ utilizados no novo sequenciamento foram AL3532 e LX0029 diluídos em 20 µl de água ultrapura (‘nuclease-free water’ – Promega) contendo 10 pmoles/µl, conforme orientação da Macrogen INC. que efetuou o sequenciamento.

Um novo alinhamento das sequências será realizado também utilizando o programa Clustal W (LARKIN et al., 2007; GOJON et al., 2010) e ajustes manuais serão efetuados quando necessário. A análise das sequências será realizada utilizando o ‘software’ MEGA 5 (TAMURA et al., 2011) e os cromatogramas foram analisados através do programa CROMAS LITE.

Uma nova busca será realizada no BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) a procura de homologias e similaridades entre as sequências de *Cryptosporidium* obtidas através do sequenciamento do gene *GP60* e espécies já depositadas no ‘GenBank’.

4.2.8. Análise Filogenética

As análises filogenéticas foram conduzidas utilizando-se o ‘software’ MEGA 5 (TAMURA et al., 2011).

Como teste filogenético foi realizado ‘bootstrap’ com 1000 réplicas, das quais foram construídas as árvores consenso pelo método ‘Neighbor-Joining’, utilizando-se o algoritmo Kimura 2, para os dois genes alvo, *18S* e *GP60*. Durante a construção da árvore consenso através do método ‘Neighbor-Joining’ foi efetuada a deleção completa dos ‘gaps’.

As sequências do presente trabalho serão depositadas no ‘Genbank’, utilizando-se o programa computacional SeqIn, disponibilizado pelo banco de dados.

As sequências registradas no ‘Genbank’ utilizadas como parâmetro de comparação com as sequências consenso obtidas no presente estudo estão descritas no quadro 3.

Quadro 3 – Sequências utilizadas para serem comparadas com as obtidos no estudo.

ESPÉCIE	GENE ALVO	SEQUÊNCIA	AUTOR	LOCAL
<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>18S</i>	AF164102	BLEARS et al., 2000	EUA
		HM622120	MEIRELES et al., 2011	Brasil
	<i>GP60</i>	HM622119	MEIRELES et al., 2011	Brasil
<i>C. andersoni</i>	<i>18S</i>	HQ007049	FIUZA et al., 2011	Brasil
		GU831569	FAYER et al., 2010a	EUA
		FJ463187	LIU, et al., 2009	China
		GU831568	FAYER et al., 2010a	EUA
<i>C. bovis</i>	<i>18S</i>	AY741305	FAYER et al., 2005	EUA
		HM622121	MEIRELES et al., 2011	Brasil
<i>C. ryanae</i>	<i>18S</i>	EU410344	FAYER et al., 2008	EUA
		HM622123	MEIRELES et al., 2011	Brasil

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Descrição dos Locais de Coleta de Amostras

4.3.1.1. Propriedade A

Propriedade leiteira de pequeno porte localizada em Cacaria, micro-região do Vale do Paraíba, Sul Fluminense, onde foram avaliados 79 animais da raça mestiço holandês. Nesta propriedade os animais encontravam-se agrupados de acordo com a faixa etária, onde os bezerros até 12 meses de idade eram mantidos em um mesmo local.

Inicialmente o bezerreiro consistia em uma instalação semi-aberta, localizada em uma área muito úmida, próximo as margens de um rio. As instalações e o manejo dos bezerros não eram adequados. Os bebedouros e comedouros eram localizados dentro das baias e junto ao piso, o que favorecia o pisoteio e a contaminação da água e do alimento pelas fezes dos animais. O piso dentro das baias era úmido e constantemente encontrava-se coberto por fezes (figura 16).



Figura 16 – Animais utilizados no estudo provenientes da propriedade A e as instalações onde eles eram acondicionados.

Posteriormente a localização do bezerreiro foi alterada, sendo transferido para uma área mais ampla e ensolarada, porém muito próximo ao local onde os animais adultos eram mantidos. Neste novo local, os bezerros eram mantidos presos por correntes em abrigos individuais e os comedouros e bebedouros passaram a ser suspensos para evitar pisoteio.

Nesta propriedade foram avaliados 79 animais com um escore corporal variado. Os bezerros mais novos encontravam-se mais debilitados, onde 11 animais apresentaram fezes diarréicas e em alguns outros indivíduos foi observada dificuldade de locomoção.

Outras espécies de animais foram encontradas circulando livremente na propriedade, cães e gatos eram regularmente vistos próximos a sala de ordenha e bezerreiros.

4.3.1.2. Propriedade B

Pequena propriedade leiteira localizada no Município de Queimados, Estado do Rio de Janeiro, onde foram avaliados 32 bezerros da raça girolando. Os animais também se encontravam divididos por faixa etária. Todos os bezerros até seis meses de idade eram mantidos separados dos bezerros mais velhos. O piquete onde os bezerros mais velhos estavam alojados era bastante úmido e não havia bebedouros e comedouros adequados. A instalação onde os bezerros mais novos estavam alojados era bem ventilada e não apresentava superlotação de animais. O comedouro e bebedouro localizavam-se dentro do bezerreiro, instalados de tal forma que dificultava o pisoteio dos animais, porém o bebedouro encontrava-se com formação de algas em seu interior.

A higienização das baias era realizada diariamente, porém as fezes se acumulavam com frequência sobre o piso da baia (figura 17).



Figura 17 - Animais utilizados no estudo provenientes da propriedade B e as instalações onde eles eram acondicionados.

A maioria dos bezerros estudados na propriedade encontrava-se com baixo escore corporal. Em nove dos 32 animais presentes na propriedade foram coletadas fezes fora dos padrões de normalidade ou diarréicas e alguns dos animais apresentavam sinais de fraqueza, como dificuldade de locomoção.

A propriedade possuía outros animais, como cães, suínos, patos, galinhas e ovelhas, porém estes eram mantidos separados dos bezerros, com exceção de alguns equinos, usados para serviço, que circulavam livremente pela propriedade.

4.3.1.3. Propriedade C

Propriedade leiteira de pequeno porte também localizada no Município de Queimados, na Baixada Fluminense, onde foram avaliados 32 bezerros da raça girolando. Nesta propriedade não havia separação dos animais por faixa etária, os bezerros eram mantidos juntamente com animais adultos (figura 18).

O bezerreiro ainda estava em construção, como instalações havia apenas um curral que estava localizado em uma área de baixada que se encontrava com umidade excessiva. Os animais eram mantidos a pasto, presos em um piquete com algumas áreas alagadas.

Comedouros e bebedouros localizavam-se dentro do piquete dos animais, porém, estes se encontravam em péssimo estado de conservação, além de não serem utilizados de forma adequada.

Nesta propriedade foram avaliados 32 animais de até 12 meses de idade. Os bezerros mais novos, com até quatro meses, apresentavam um quadro severo de subnutrição. Os animais estavam magros e alguns praticamente não se locomoviam.



Figura 18 - Animais utilizados no estudo provenientes da propriedade C e as instalações onde eles eram mantidos.

Os animais mais velhos, próximos de completar um ano, apresentavam um escore corporal um pouco melhor, porém nove destes bovinos apresentaram fezes fora dos padrões de normalidade ou diarréicas.

Diversos animais como cães, gatos, aves e suínos se deslocavam livremente pela propriedade, inclusive dentro dos piquetes dos bovinos.

4.3.2. Diagnóstico Microscópico e PCR-Nested Utilizando Gene Alvo *18S*

Um total de 143 bezerros, oriundos de três propriedades leiteiras no Estado do Rio de Janeiro, foram avaliados através de microscopia e diagnóstico molecular para a presença de *Cryptosporidium* sp.

Dentre os animais estudados a presença de *Cryptosporidium* spp. foi diagnosticada, através de microscopia de campo claro e contraste de fase, em 28 (26,6%) bezerros nas três

propriedades estudadas. O número de bezerros positivos para *Cryptosporidium* spp. e o percentual de positividade dos animais em cada propriedade está representado na figura 19.

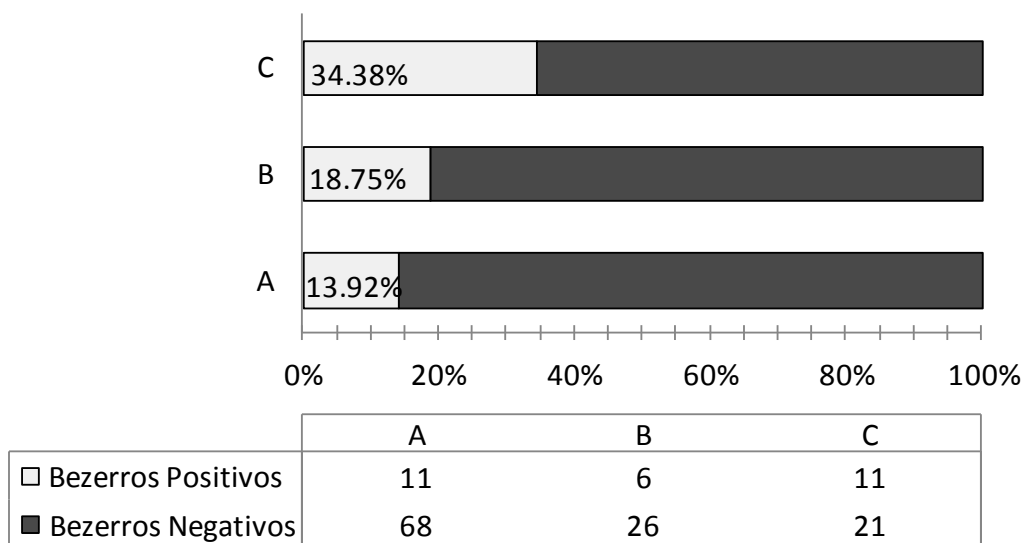


Figura 19 – Percentual de bezerros positivos para *Cryptosporidium* spp. baseado em microscopia óptica de campo claro e contraste de fase.

O maior percentual de positividade obtido através da microscopia pode ser observado na propriedade C, onde 34,38% dos animais encontravam-se infectados por pelo menos uma espécie de *Cryptosporidium*. O menor percentual de infecção foi observado na propriedade A (13,92%).

Dos 143 bezerros estudados apenas 32 apresentaram diarreia (figura 20 e tabela 7), que variou de leve a intensa. Dentre os 32 animais (22,4%) descritos com diarreia somente 11 bezerros (34,4 %) foram diagnosticados positivos para a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp., através de exame coproparasitológico (tabela 8). Além da presença de *Cryptosporidium* spp., 104 (72,7%) bezerros foram diagnosticados com *Eimeria* spp. outro agente causador de diarreias. Destes animais, 19 (18,3%) encontraram-se positivos para *Cryptosporidium* spp. e *Eimeria* spp. Porém, dentre os bezerros considerados positivos para as duas protozooses apenas sete (36,8%) apresentaram sintomas clínicos de diarreia.

Tabela 7 – Ocorrência de diarreia em bezerros nas três propriedades estudadas.

PROPRIEDADE	ASPECTO DO MATERIAL FECAL		TOTAL DE ANIMAIS
	COM DIARRÉIA	SEM DIARRÉIA	
A	11 (13,92%)	68 (86,08%)	143
B	8 (25%)	24 (75%)	
C	13 (40,62%)	19 (59,38%)	
A, B e C	32 (22,4%)	111 (77,6%)	143

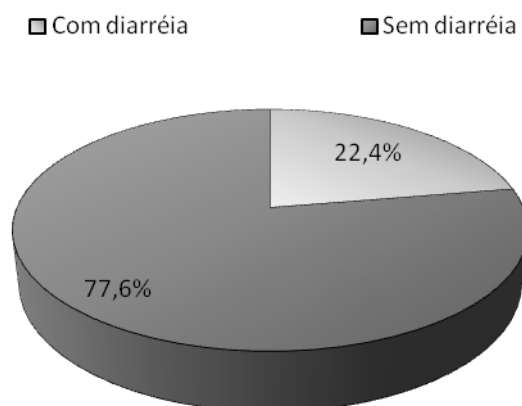


Figura 20 – Percentual de todos os animais com sintomas de diarreia nas três propriedades estudadas.

Os resultados positivos obtidos na microscopia foram submetidos a uma confirmação através da técnica de PCR-Nested utilizando o gene *18S*. Das 28 amostras consideradas positivas pela microscopia 23 tiveram seu diagnóstico confirmado pela PCR-Nested (tabela 8 e figura 21).

Tabela 8 – Amostras fecais positivas para *Cryptosporidium* sp. provenientes de bezros de acordo com a idade, presença ou ausência de diarreia, utilizando o diagnóstico microscópico e o molecular, em cada uma das três propriedades estudadas.

PROPRIEDADES	AMOSTRAS	IDADE	PRESENÇA DE DIARRÉIA	DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO	DIAGNÓSTICO PELA PCR (gene 18S)
A	1	15 dias	Sim	+	+
	2	8 dias	Não	+	-
	3	1 mês	Não	+	+
	4	3 meses	Não	+	+
	5	2 meses	Não	+	+
	6	1 meses	Não	+	-
	7	2 meses	Não	+	+
	8	15 dias	Sim	+	+
	9	2 meses	Não	+	+
	10	5 meses	Não	+	+
	11	2 meses	Não	+	+
B	12	2 meses e meio	Não	+	+
	13	2 meses e meio	Não	+	+
	14	2 meses e meio	Sim	+	+
	15	2 meses	Sim	+	-
	16	5 meses	Não	+	+
	17	2 meses	Não	+	+
C	18	12 meses	Sim	+	-
	19	12 meses	Sim	+	-
	20	12 meses	Sim	+	+
	21	2 meses	Não	+	+
	22	2 meses	Sim	+	+
	23	4 meses	Sim	+	+
	24	2 meses	Não	+	+
	25	10 meses	Sim	+	+
	26	2 meses	Não	+	+
	27	8 meses	Sim	+	+
	28	8 meses	Não	+	+

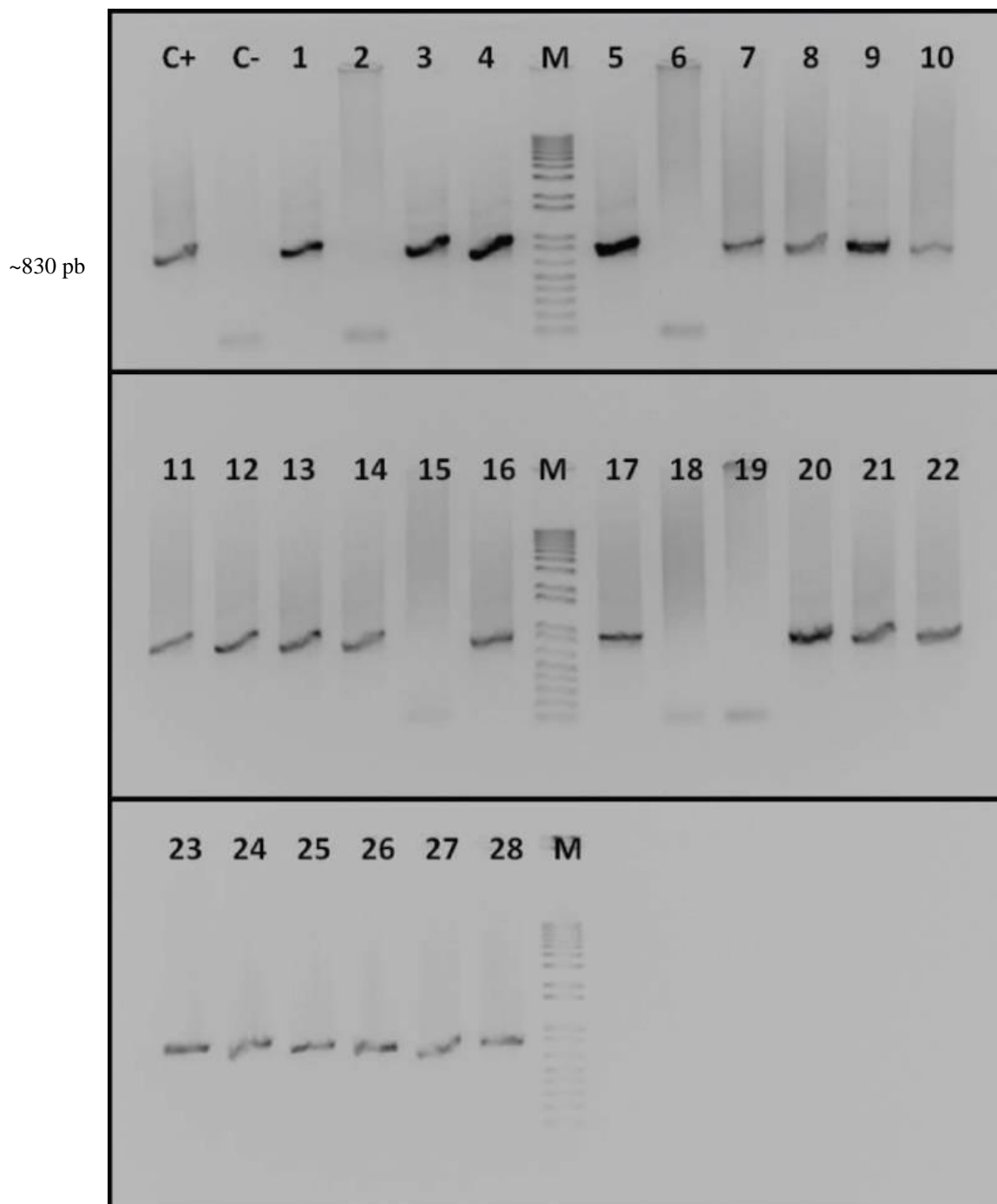


Figura 21 - Reação de Nested- PCR utilizando gene *18S* visualizado em gel de agarose a 1% corado com *GelRedTM*. Tempo de exposição à luz ultravioleta foi de 0,9 segundos. M: marcador; C+: controle positivo da reação; C-: controle negativo da reação; 1 a 11: amostras coletadas na propriedade A; 12 a 17: amostras coletadas na propriedade B; 18 a 28: amostra coletadas na propriedade C.

Durante o estudo foram observadas algumas divergências entre o diagnóstico microscópico e a PCR-Nested no que se refere à presença de oocistos de *Cryptosporidium*

spp. nas fezes dos animais (tabela 9). Onde, cinco amostras diagnosticadas como positivas para microscopia não foram confirmadas através das reações de PCR-Nested. Das cinco amostras negativas na PCR-Nested, duas foram observadas na propriedade A, uma na propriedade B e duas na propriedade C.

4.3.3. Sequenciamento Utilizando Gene Alvo 18S

Todas as 23 amostras consideradas positivas na reação de PCR-Nested foram enviadas a Macrogen INC. para serem sequenciadas utilizando os ‘primers’ 18SNF e 18SNR, esperando-se obter sequências com aproximadamente 830 pb. Destas, 21 amostras obtiveram sequências de boa qualidade tornando possível a identificação da espécie de *Cryptosporidium*. Duas amostras não obtiveram um sequenciamento de boa qualidade, não sendo possível realizar a identificação das espécies obtidas.

Três espécies foram diagnosticadas nas propriedades estudadas, sendo elas *Cryptosporidium parvum*, *C. andersoni* e *C. ryanae*. Todas as sequências obtidas foram depositadas no ‘GenBank’. As espécies diagnosticadas através do sequenciamento, suas respectivas sequências e os números de acesso no ‘GenBank’ estão descritos a seguir (tabela 9 e figura 22).

Tabela 9 – Amostras sequenciadas, suas respectivas espécies de *Cryptosporidium* e número de acesso no ‘GenBank’, de acordo com as propriedades analisadas e a idade dos animais.

PROPRIEDADES	AMOSTRAS POSITIVAS PCR-NESTED	IDADE	PRESENÇA DE DIARRÉIA	ESPÉCIE DE <i>Cryptosporidium</i> E NÚMERO DE ACESSO NO ‘GENBANK’
A	1	15 dias	Sim	<i>C. parvum</i> – JX198271
	3	1 mês	Não	<i>C. parvum</i> – JX198272
	4	3 meses	Não	<i>C. andersoni</i> – JX198256
	5	2 meses	Não	<i>C. andersoni</i> – JX198257
	7	2 meses	Não	<i>C. ryanae</i> – JX198274
	8	15 dias	Sim	<i>C. parvum</i> – JX198273
	9	2 meses	Não	<i>C. andersoni</i> – JX198258
	10	5 meses	Não	<i>C. andersoni</i> – JX198259
	11	2 meses	Não	<i>C. andersoni</i> – JX198260
B	12	2 meses e meio	Não	<i>C. andersoni</i> – JX198261
	13	2 meses e meio	Não	<i>C. andersoni</i> – JX198262
	14	2 meses e meio	Sim	<i>C. ryanae</i> – JX198275
	16	5 meses	Não	<i>C. andersoni</i> – JX198263
	17	2 meses	Não	<i>C. andersoni</i> – JX198264
C	20	12 meses	Sim	<i>C. andersoni</i> – JX198265
	21	2 meses	Não	<i>C. andersoni</i> – JX198266
	22	2 meses	Sim	Não foi possível diagnosticar espécie
	23	4 meses	Sim	<i>C. andersoni</i> – JX198255
	24	2 meses	Não	<i>C. andersoni</i> – JX198267
	25	10 meses	Sim	<i>C. andersoni</i> – JX198268
	26	2 meses	Não	<i>C. andersoni</i> – JX198269
	27	8 meses	Sim	Não foi possível diagnosticar espécie
	28	8 meses	Não	<i>C. andersoni</i> – JX198270

C.andersoni GU831568 TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGCGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 100
C.andersoni FJ463187 TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGCGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 100
Bezerro 23 JX198255 TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGCGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 100
Bezerro 28 JX198270 TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGCGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 100
Bezerro 26 JX198269 TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGCGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 100
Bezerro 25 JX198268 TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGCGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 100
Bezerro 24 JX198267 TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGCGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 100
Bezerro 21 JX198266 TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGCGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 100
Bezerro 20 JX198265 TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGCGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 100
Bezerro 17 JX198264 TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGCGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 100
Bezerro 16 JX198263 TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGCGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 100
Bezerro 13 JX198262 TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGCGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 100
Bezerro 12 JX198261 TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGCGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 100
Bezerro 11 JX198260 TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGCGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 100
Bezerro 10 JX198259 TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGCGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 100
Bezerro 9 JX198258 TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGCGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 100
Bezerro 5 JX198257 TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGCGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 100
Bezerro 4 JX198256 TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGCGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 100
C.andersoni HQ007049 TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGCGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 100
C.andersoni GU831569 TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGCGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 100
C.parvum AF164102 TAATAACTTTACGGATCACATTAA--ATGTGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGG 98
C.parvum HM622120 -----GTGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGG 72
Bezerro 1 JX198271 TAATAACTTTACGGATCACATTAA--ATGTGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGG 98
Bezerro 3 JX198272 TAATAACTTTACGGATCACATTAA--ATGTGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGG 98
Bezerro 8 JX198273 TAATAACTTTACGGATCACATTAA--ATGTGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGG 98
C.ryanae EU410344 TAATAACTTTACGGATCACACTA----TGTGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 96
C.ryanae HM622123 -----TTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 55
Bezerro 7 JX198274 TAATAACTTTACGGATCACACTA----TGTGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 96
Bezerro 14 JX198275 TAATAACTTTACGGATCACACTA----TGTGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 96
C.bovis AY741305 TAATAACTTTACGGATCACATTAA----TGTGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 96
C.bovis HM622121 ---TAACTTTACGGATCACATTAA----TGTGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 93

C.andersoni GU831568 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACA 200
C.andersoni FJ463187 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACA 200
Bezerro 23 JX198255 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACA 200
Bezerro 28 JX198270 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACA 200
Bezerro 26 JX198269 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACA 200
Bezerro 25 JX198268 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACA 200
Bezerro 24 JX198267 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACA 200
Bezerro 21 JX198266 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACA 200
Bezerro 20 JX198265 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACA 200
Bezerro 17 JX198264 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACA 200
Bezerro 16 JX198263 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACA 200
Bezerro 13 JX198262 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACA 200
Bezerro 12 JX198261 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACA 200
Bezerro 11 JX198260 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACA 200
Bezerro 10 JX198259 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACA 200
Bezerro 9 JX198258 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACA 200
Bezerro 5 JX198257 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACA 200
Bezerro 4 JX198256 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACA 200
C.andersoni HQ007049 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACA 200
C.andersoni GU831569 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACA 200
C.parvum AF164102 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACA 198
C.parvum HM622120 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACA 172
Bezerro 1 JX198271 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACA 198
Bezerro 3 JX198272 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACA 198
Bezerro 8 JX198273 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACA 198
C.ryanae EU410344 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACA 196
C.ryanae HM622123 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACA 155
Bezerro 7 JX198274 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACA 196
Bezerro 14 JX198275 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACA 196
C.bovis AY741305 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACA 196
C.bovis HM622121 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACA 193
***** * **

C.andersoni GU831568 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCCTAACGGTCTTGTAATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCCTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGT 300
 C.andersoni FJ463187 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCCTAACGGTCTTGTAATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCCTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGT 300
 Bezerra 23 JX198255 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCCTAACGGTCTTGTAATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCCTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGT 300
 Bezerra 28 JX198270 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCCTAACGGTCTTGTAATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCCTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGT 300
 Bezerra 26 JX198269 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCCTAACGGTCTTGTAATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCCTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGT 300
 Bezerra 25 JX198268 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCCTAACGGTCTTGTAATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCCTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGT 300
 Bezerra 24 JX198267 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCCTAACGGTCTTGTAATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCCTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGT 300
 Bezerra 21 JX198266 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCCTAACGGTCTTGTAATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCCTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGT 300
 Bezerra 20 JX198265 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCCTAACGGTCTTGTAATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCCTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGT 300
 Bezerra 17 JX198264 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCCTAACGGTCTTGTAATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCCTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGT 300
 Bezerra 16 JX198263 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCCTAACGGTCTTGTAATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCCTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGT 300
 Bezerra 13 JX198262 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCCTAACGGTCTTGTAATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCCTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGT 300
 Bezerra 12 JX198261 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCCTAACGGTCTTGTAATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCCTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGT 300
 Bezerra 11 JX198260 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCCTAACGGTCTTGTAATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCCTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGT 300
 Bezerra 10 JX198259 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCCTAACGGTCTTGTAATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCCTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGT 300
 Bezerra 9 JX198258 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCCTAACGGTCTTGTAATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCCTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGT 300
 Bezerra 5 JX198257 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCCTAACGGTCTTGTAATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCCTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGT 300
 Bezerra 4 JX198256 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCCTAACGGTCTTGTAATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCCTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGT 300
 C.andersoni HQ007049 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCCTAACGGTCTTGTAATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCCTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGT 300
 C.andersoni GU831569 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCCTAACGGTCTTGTAATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCCTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGT 300
 C.parvum AF164102 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTATCAATTGGAGGGCAAGT 298
 C.parvum HM622120 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTATCAATTGGAGGGCAAGT 272
 Bezerra 1 JX198271 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTATCAATTGGAGGGCAAGT 298
 Bezerra 3 JX198272 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTATCAATTGGAGGGCAAGT 298
 Bezerra 8 JX198273 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTATCAATTGGAGGGCAAGT 298
 C.ryanae EU410344 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGAGCCTTACGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTAAACAAGTATCAATTGGAGGGCAAGT 296
 C.ryanae HM622123 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGAGCCTTACGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTAAACAAGTATCAATTGGAGGGCAAGT 255
 Bezerra 7 JX198274 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGAGCCTTACGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTAAACAAGTATCAATTGGAGGGCAAGT 296
 Bezerra 14 JX198275 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGAGCCTTACGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTAAACAAGTATCAATTGGAGGGCAAGT 296
 C.bovis AY741305 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGAACCTTACGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTAAACAAGTATCAATTGGAGGGCAAGT 296
 C.bovis HM622121 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGAACCTTACGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTAAACAAGTATCAATTGGAGGGCAAGT 293
 ***** * * *** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

C.andersoni GU831568 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAATTTT---A 397
C.andersoni FJ463187 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAATTTT---A 397
Bezerro 23 JX198255 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAATTTT---A 397
Bezerro 28 JX198270 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAATTT---A 396
Bezerro 26 JX198269 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAATTT---A 396
Bezerro 25 JX198268 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAATTT---A 396
Bezerro 24 JX198267 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAATTT---A 396
Bezerro 21 JX198266 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAATTT---A 396
Bezerro 20 JX198265 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAATTT---A 396
Bezerro 17 JX198264 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAATTT---A 396
Bezerro 16 JX198263 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAATTT---A 396
Bezerro 13 JX198262 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAATTT---A 396
Bezerro 12 JX198261 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAATTT---A 396
Bezerro 11 JX198260 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAATTT---A 396
Bezerro 10 JX198259 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAATTT---A 396
Bezerro 9 JX198258 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAATTT---A 396
Bezerro 5 JX198257 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAATTT---A 396
Bezerro 4 JX198256 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAATTT---A 396
C.andersoni HQ007049 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAATTT---A 396
C.andersoni GU831569 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAATTT---A 396
C.parvum AF164102 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTA-ATAATTTATATA 397
C.parvum HM622120 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTA-ATAATTTATATA 371
Bezerro 1 JX198271 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTA-ATAATTTATATA 397
Bezerro 3 JX198272 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTA-ATAATTTATATA 397
Bezerro 8 JX198273 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTA-ATAATTTATATA 397
C.ryanae EU410344 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTAATTTTCTGTTA-ATT-TTTATATA 394
C.ryanae HM622123 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTAATTTTCTGTTA-ATT-TTTATATA 353
Bezerro 7 JX198274 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTAATTTTCTGTTA-ATT-TTTATATA 394
Bezerro 14 JX198275 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTAATTTTCTGTTA-ATT-TTTATATA 394
C.bovis AY741305 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTAATTTTCTGTTA-ATT-TTTATATA 394
C.bovis HM622121 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTAATTTTCTGTTA-ATT-TTTATATA 391

***** ** *** *

C. andersoni GU831568 GCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGTCTTTCTTATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGGTTAATAGGGACAGTT 593
C. andersoni FJ463187 GCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGTCTTTCTTATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGGTTAATAGGGACAGTT 593
 Bezerra 23 JX198255 GCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGTCTTTCTTATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGGTTAATAGGGACAGTT 593
 Bezerra 28 JX198270 GCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGTCTTTCTTATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGGTTAATAGGGACAGTT 592
 Bezerra 26 JX198269 GCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGTCTTTCTTATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGGTTAATAGGGACAGTT 592
 Bezerra 25 JX198268 GCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGTCTTTCTTATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGGTTAATAGGGACAGTT 592
 Bezerra 24 JX198267 GCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGTCTTTCTTATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGGTTAATAGGGACAGTT 592
 Bezerra 21 JX198266 GCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGTCTTTCTTATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGGTTAATAGGGACAGTT 592
 Bezerra 20 JX198265 GCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGTCTTTCTTATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGGTTAATAGGGACAGTT 592
 Bezerra 17 JX198264 GCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGTCTTTCTTATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGGTTAATAGGGACAGTT 592
 Bezerra 16 JX198263 GCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGTCTTTCTTATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGGTTAATAGGGACAGTT 592
 Bezerra 13 JX198262 GCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGTCTTTCTTATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGGTTAATAGGGACAGTT 592
 Bezerra 12 JX198261 GCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGTCTTTCTTATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGGTTAATAGGGACAGTT 592
 Bezerra 11 JX198260 GCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGTCTTTCTTATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGGTTAATAGGGACAGTT 592
 Bezerra 10 JX198259 GCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGTCTTTCTTATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGGTTAATAGGGACAGTT 592
 Bezerra 9 JX198258 GCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGTCTTTCTTATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGGTTAATAGGGACAGTT 592
 Bezerra 5 JX198257 GCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGTCTTTCTTATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGGTTAATAGGGACAGTT 592
 Bezerra 4 JX198256 GCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGTCTTTCTTATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGGTTAATAGGGACAGTT 592
C. andersoni HQ007049 GCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGTCTTTCTTATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGGTTAATAGGGACAGTT 592
C. andersoni GU831569 GCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGTCTTTCTTATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGGTTAATAGGGACAGTT 592
C. parvum AF164102 GCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAT-TAAAGATTTTATCTTTCTTATTGGTTCTAAGATAAGAATAATGATTAATAGGGACAGTT 594
C. parvum HM622120 GCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAT-TAAAGATTTTATCTTTCTTATTGGTTCTAAGATAAGAATAATGATTAATAGGGACAGTT 568
 Bezerra 1 JX198271 GCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAT-TAAAGATTTTATCTTTCTTATTGGTTCTAAGATAAGAATAATGATTAATAGGGACAGTT 594
 Bezerra 3 JX198272 GCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAT-TAAAGATTTTATCTTTCTTATTGGTTCTAAGATAAGAATAATGATTAATAGGGACAGTT 594
 Bezerra 8 JX198273 GCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAT-TAAAGATTTTATCTTTCTTATTGGTTCTAAGATAAGAATAATGATTAATAGGGACAGTT 594
C. ryanae EU410344 GCAGGCTATTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAT-TAAGGATTTTATTCTTCTTATTGGTTCTAGAATAAAAAATAATGATTAATAGGGACAGTT 582
C. ryanae HM622123 GCAGGCTATTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAT-TAAGGATTTTATTCTTCTTATTGGTTCTAGAATAAAAAATAATGATTAATAGGGACAGTT 541
 Bezerra 7 JX198274 GCAGGCTATTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAT-TAAGGATTTTATTCTTCTTATTGGTTCTAGAATAAAAAATAATGATTAATAGGGACAGTT 582
 Bezerra 14 JX198275 GCAGGCTATTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAT-TAAGGATTTTATTCTTCTTATTGGTTCTAGAATAAAAAATAATGATTAATAGGGACAGTT 582
C. bovis AY741305 GCAGGCTATTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAT-TAAGGATTTTATTCTTCTTATTGGTTCTAGAATAAAAAATAATGATTAATAGGGACAGTT 582
C. bovis HM622121 GCAGGCTATTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAT-TAAGGATTTTATTCTTCTTATTGGTTCTAGAATAAAAAATAATGATTAATAGGGACAGTT 579



C.andersoni GU831568 GGGGGCATTCTGATTTAACAGCCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAA 693
 C.andersoni FJ463187 GGGGGCATTCTGATTTAACAGCCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAA 693
 Bezerra 23 JX198255 GGGGGCATTCTGATTTAACAGCCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAA 693
 Bezerra 28 JX198270 GGGGGCATTCTGATTTAACAGCCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAA 692
 Bezerra 26 JX198269 GGGGGCATTCTGATTTAACAGCCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAA 692
 Bezerra 25 JX198268 GGGGGCATTCTGATTTAACAGCCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAA 692
 Bezerra 24 JX198267 GGGGGCATTCTGATTTAACAGCCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAA 692
 Bezerra 21 JX198266 GGGGGCATTCTGATTTAACAGCCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAA 692
 Bezerra 20 JX198265 GGGGGCATTCTGATTTAACAGCCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAA 692
 Bezerra 17 JX198264 GGGGGCATTCTGATTTAACAGCCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAA 692
 Bezerra 16 JX198263 GGGGGCATTCTGATTTAACAGCCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAA 692
 Bezerra 13 JX198262 GGGGGCATTCTGATTTAACAGCCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAA 692
 Bezerra 12 JX198261 GGGGGCATTCTGATTTAACAGCCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAA 692
 Bezerra 11 JX198260 GGGGGCATTCTGATTTAACAGCCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAA 692
 Bezerra 10 JX198259 GGGGGCATTCTGATTTAACAGCCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAA 692
 Bezerra 9 JX198258 GGGGGCATTCTGATTTAACAGCCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAA 692
 Bezerra 5 JX198257 GGGGGCATTCTGATTTAACAGCCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAA 692
 Bezerra 4 JX198256 GGGGGCATTCTGATTTAACAGCCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAA 692
 C.andersoni HQ007049 GGGGGCATTCTGATTTAACAGCCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAA 692
 C.andersoni GU831569 GGGGGCATTCTGATTTAACAGCCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAA 692
 C.parvum AF164102 GGGGGCATTCTGATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACAAACTAATGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAA 694
 C.parvum HM622120 GGGGGCATTCTGATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACAAACTAATGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAA 668
 Bezerra 1 JX198271 GGGGGCATTCTGATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACAAACTAATGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAA 694
 Bezerra 3 JX198272 GGGGGCATTCTGATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACAAACTAATGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAA 694
 Bezerra 8 JX198273 GGGGGCATTCTGATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACAAACTAATGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAA 694
 C.ryanae EU410344 GGGGGCATTCTGATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACAAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAA 682
 C.ryanae HM622123 GGGGGCATTCTGATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACAAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAA 641
 Bezerra 7 JX198274 GGGGGCATTCTGATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACAAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAA 682
 Bezerra 14 JX198275 GGGGGCATTCTGATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACAAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAA 682
 C.bovis AY741305 GGGGGCATTCTGATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACAAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAA 682
 C.bovis HM622121 GGGGGCATTCTGATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACAAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAA 679

C.andersoni GU831568	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	724
C.andersoni FJ463187	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	724
Bezerro 23 JX198255	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	724
Bezerro 28 JX198270	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	723
Bezerro 26 JX198269	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	723
Bezerro 25 JX198268	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	723
Bezerro 24 JX198267	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	723
Bezerro 21 JX198266	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	723
Bezerro 20 JX198265	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	723
Bezerro 17 JX198264	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	723
Bezerro 16 JX198263	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	723
Bezerro 13 JX198262	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	723
Bezerro 12 JX198261	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	723
Bezerro 11 JX198260	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	723
Bezerro 10 JX198259	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	723
Bezerro 9 JX198258	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	723
Bezerro 5 JX198257	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	723
Bezerro 4 JX198256	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	723
C.andersoni HQ007049	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	723
C.andersoni GU831569	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	723
C.parvum AF164102	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	725
C.parvum HM622120	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	699
Bezerro 1 JX198271	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	725
Bezerro 3 JX198272	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	725
Bezerro 8 JX198273	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	725
C.ryanae EU410344	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	713
C.ryanae HM622123	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	672
Bezerro 7 JX198274	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	713
Bezerro 14 JX198275	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	713
C.bovis AY741305	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	713
C.bovis HM622121	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	710

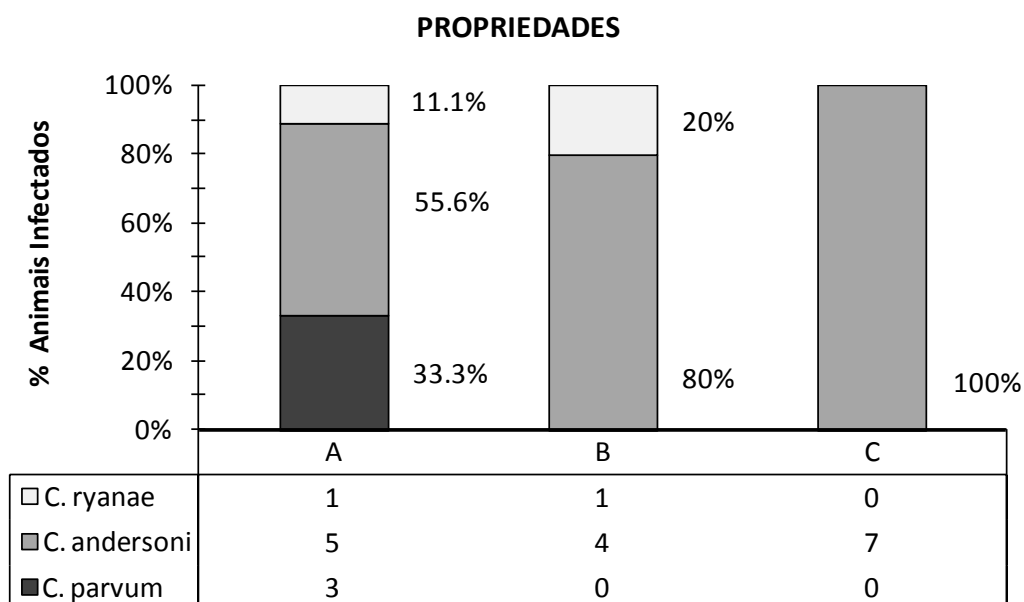
Figura 22 – Alinhamento das sequências de *Cryptosporidium parvum*, *C. andersoni* e *C. ryanae*, utilizando gene *18S*, encontradas parasitando bezerros de diferentes faixas etárias. Sequências alinhadas através do programa Clustal W 2.1 (LARKIN et al., 2007; GOUJON et al., 2010), destacando as diferenças entre cada sequência (cinza); região de polimorfismo (—); região de intenso polimorfismo (↑) e variação dentro da espécie *C. andersoni* (preto).

O percentual de infecção por *C. parvum*, *C. andersoni* e *C. ryanae* foi variável em cada propriedade. Sendo o maior percentual de infecção registrado pela espécie *C. andersoni*, na propriedade C, onde 100% dos animais positivos estavam infectados por esta espécie.

A presença da infecção por *C. ryanae* foi observada nas propriedades A e B, sendo este, o primeiro relato da infecção por esta espécie no Estado do Rio de Janeiro.

Os valores percentuais das três espécies encontradas, com base na reação de PCR-Nested e no sequenciamento utilizando o gene *18S*, durante o período do estudo e os respectivos locais de coleta podem ser observados na figura 23.

Figura 23 – Percentual de infecção de cada espécie de *Cryptosporidium* encontrada no estudo e seus respectivos locais de coleta.



4.3.4. Filogenia Gene Alvo *18S*

As similaridades apresentadas pelas espécies *Cryptosporidium parvum*, *C. andersoni* e *C. ryanae* quando comparadas as sequências já existentes no ‘GenBank’ foram avaliadas através do método de ‘Neighbor-Joining’ utilizando o algoritmo Kimura-2, com ‘bootstrap’ de 1000 repetições e deleção total dos ‘gaps’ presentes nas sequências. A árvore consenso contruída encontra-se representada na figura 24.

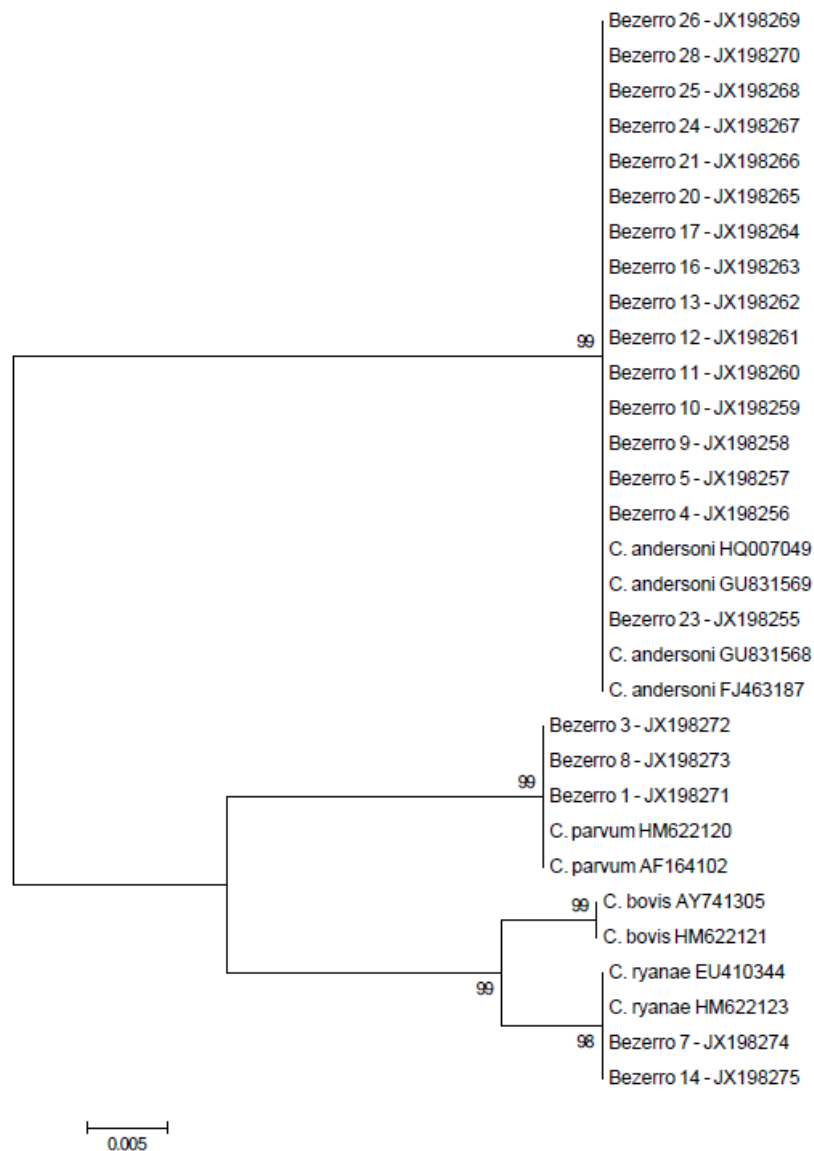


Figura 24 – Árvore filogenética contruida a partir do sequenciamento (*18S*) de espécimes de *Cryptosporidium* encontrados parasitando bezerros em três propriedades leiteiras no Estado do Rio de Janeiro. A análise utilizada na construção da árvore foi a ‘Neighbor-Joining’ e os valores de ‘bootstrap’ encontram-se acima de 97%.

As distâncias genéticas entre os espécimes encontrados nas três propriedades e as sequências obtidas no ‘GenBank’ foram comparadas utilizando o algoritmo Kimura-2. A análise comparativa realizada demonstrou a elevada similaridade entre as espécies de *Cryptosporidium* encontradas no presente estudo e as sequências existentes no ‘Genbank’. Onde a maior distância observada foi entre as espécies *C. andersoni* e *C. ryanae* (0.073).

4.3.5. Faixa Etária dos Bezerros e Espécie de *Cryptosporidium* Prevalente

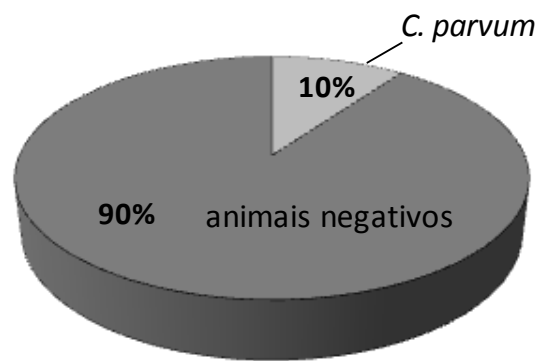
Quando analisamos a incidência da infecção nos bezerros, por *Cryptosporidium* spp., em relação a idade dos mesmos (tabela 10), utilizando o teste de independência do qui-quadrado com um nível de significância de 5%, podemos notar a ausência de relação significativa entre a presença da infecção e a idade dos animais ($p\text{-valor} > 0,05$). Dessa forma, todos os animais, independente da faixa etária, encontram-se susceptíveis a infecção por *Cryptosporidium* spp.

Tabela 10 – Distribuição da ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp. nas propriedades estudadas de acordo com a faixa etária dos bezerros.

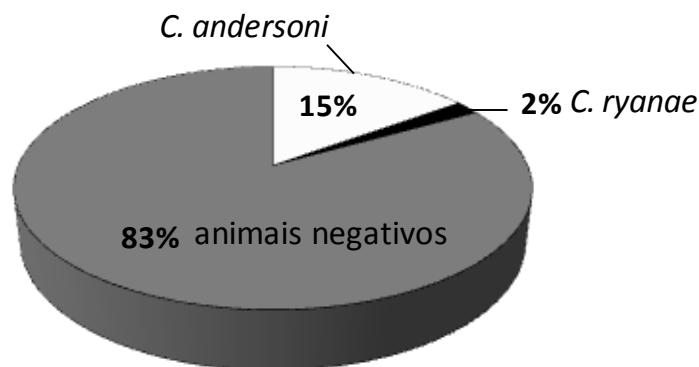
IDADE DOS ANIMAIS	PROPRIEDADES					
	A		B		C	
	Positivo PCR	Negativo	Positivo PCR	Negativo	Positivo PCR	Negativo
< 2 meses	3 (3,8%)	22 (27,8%)	0	5 (15,6%)	0	0
≥ 2 meses	6 (7,6%)	48 (60,8%)	6 (18,8%)	21 (65,6%)	10 (31,3%)	22 (68,7%)
TOTAL	9 (11,4%)	70 (88,7%)	6 (18,8%)	26 (81,2%)	10 (31,3%)	22 (68,7%)

A taxa de infecção por *Cryptosporidium* spp. foi variável nas duas faixas etárias em todas as propriedades estudadas, onde o maior percentual de infecção para animais com menos de dois meses de vida foi de 3,8% e para bezerros entre dois e 12 meses de idade foi 31,3% (tabela 10).

Através do sequenciamento utilizando o gene *18S* foi possível observar a infecção de animais na fase pré-desmame (com até dois meses de idade) apenas pela espécie *Cryptosporidium parvum*, enquanto que animais entre dois e 12 meses de vida (fase pós-desmame) foram geralmente infectados por *C. andersoni*. Durante o estudo foi possível identificar apenas dois bezerros, na fase pós-desmame, infectados pela espécie *C. ryanae*. O percentual de infecção dos animais de acordo com a espécie diagnosticada pode ser observado na figura 25.



Bezerros com < 2 meses de idade



Bezerros entre 2 e 12 meses de idade

Figura 25 – Percentual das espécies de *Cryptosporidium* encontradas em bezerros leiteiros de diferentes faixas etárias.

4.3.6. PCR-Nested Utilizando Gene Alvo *GP60*

Todas as amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. na PCR-Nested utilizando o gene *18S*, foram submetidas a uma nova amplificação através da PCR primária e Nested-PCR para o gene alvo *GP60*.

A submissão de todas as amostras a nova reação utilizando o *GP60*, e não apenas as amostras sequenciadas para *C. parvum*, teve por objetivo averiguar a presença de diferentes espécies de *Cryptosporidium* infectando um mesmo animal. Além das bandas já esperadas (C+, 1, 3 e 8), outras amostras também foram amplificadas. O resultado da nova reação de PCR-Nested pode ser observado na figura 26.

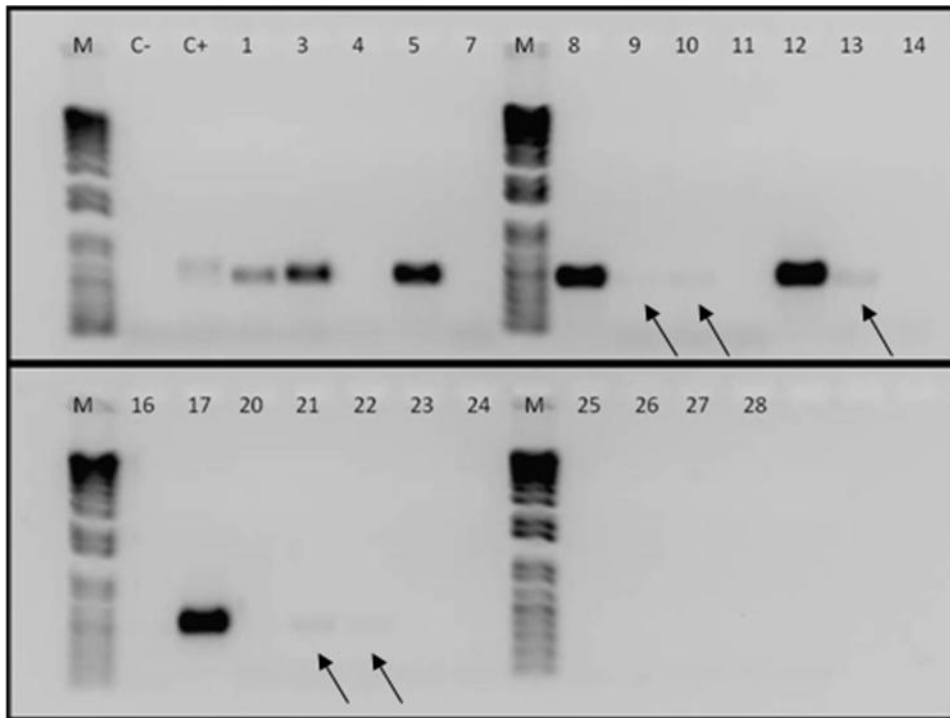


Figura 26 - Reação de Nested- PCR utilizando gene *GP60* visualizado em gel de agarose a 1% corado com GelRedTM. Tempo de exposição à luz ultravioleta foi de 0,9 segundos. M: marcador; C-: controle negativo da reação; C+: controle positivo da reação; 1 a 11: amostras coletadas na propriedade A; 12 a 17: amostras coletadas na propriedade B; 18 a 28: amostra coletadas na propriedade C. Seta aponta para bandas de aproximadamente 400pb. As amostras 2; 6; 15; 18 e 19 não foram utilizadas pois não foi possível a amplificação do DNA extraído através da PCR-Nested utilizando o gene *18S*.

4.4. DISCUSSÃO

4.4.1. Prevalência das Diferentes Espécies de *Cryptosporidium* e a Idade dos Animais

Com base nos dados obtido a partir do sequenciamento das amostras utilizando o gene alvo *SSUrRNA*, três espécies de *Cryptosporidium* foram diagnosticadas entre as 23 amostras fecais positivas no Nested-PCR, dentro do total de 143 amostras coletadas.

As três espécies diagnosticadas no presente estudo, *C. parvum*, *C. andersoni* e *C. ryanae*, encontram-se entre as quatro principais responsáveis pela criptosporidiose bovina. Apenas *C. bovis* não foi diagnosticado entre os animais estudados. Estes resultados diferem dos obtidos por Meireles et al. (2011), em estudo semelhante realizado no Estado de São Paulo, Brasil. Onde foi observada a presença das quatro espécies principais que acometem bovinos.

Dentre as três espécies diagnosticadas no presente estudo, *C. andersoni* apresentou o maior percentual de ocorrência entre os bezerros (15%), divergindo de resultados obtidos por Meireles et al. (2011), que observaram uma maior ocorrência de *C. parvum*. No entanto, a ocorrência de *C. andersoni* em bezerros foi relatada por Sevá et al. (2010) como sendo a única espécie a infectar bezerros com até três meses de idade em Teodoro Sampaio, no Estado de São Paulo.

Em um estudo conduzido no Irã por Keshavarz et al. (2009) foram encontradas três espécies de *Cryptosporidium* infectando bovinos de até 20 semanas de idade, destinados a produção leiteira. As espécies diagnosticadas através da RFLP e do sequenciamento foram *C. parvum*, *C. andersoni* e *C. bovis*.

Em Prince Edward Island, Canadá, Coklin et al. (2009) avaliou microscopicamente a prevalência de *Cryptosporidium* spp. em bezerros com até seis meses de idade. O estudo relatou uma baixa prevalência do protozoário na região. Das 38 amostras positivas aproximadamente 23% foram encaminhadas para análises moleculares e destas 55,5% foram positivas unicamente para *C. parvum*.

No que se refere a idade do animal e a espécie de *Cryptosporidium* mais com maior ocorrência os resultados do presente estudo concordam com os obtidos por Keshavarz et al (2009), onde a espécie *C. parvum* foi a mais observada entre os bovinos na fase pré-desmame (19,5%) e *C. andersoni* na fase pós-desmame (8,2%).

Assim como observado neste estudo, Meireles et al. (2011) destaca a baixa prevalência de espécies diferentes de *C. parvum* em animais com até dois meses de idade. Ainda concordando com este fato, um estudo realizado na Alemanha por Broglia et al. (2008) avaliou bezerros na faixa etária de 3-15 dias e observou apenas a presença de *C. parvum* infectando os animais.

Coklin et al. (2009) apontam uma idade de infecção dos animais por *C. parvum* maior do que a observada no presente estudo, onde os bezerros infectados apresentavam aproximadamente seis meses de vida. Keshavarz et al (2009) também relata este fato ao descrever a baixa prevalência de *C. parvum* em animais na fase pós-desmame (3,1%), onde foram estudados animais na faixa de 2-11 meses de idade.

A elevada prevalência da infecção por *C. parvum* em bezerros destinados a produção leiteira também foi descrita por Langkjær et al. (2007) na Dinamarca. Onde 82% dos animais com até um mês de vida encontravam-se infectados pela espécie zoonótica. Além disso, foi observada ainda um alto percentual de infecção por *C. bovis* em animais entre 3 e 12 meses de idade. Resultados semelhantes foram observados na

Bélgica por Geurden et al. (2007). Tais resultados discordam dos encontrados no presente estudo, onde a infecção por *C. parvum* foi de apenas 7% e não foi observada a presença da espécie *C. bovis* parasitando os animais.

Fayer et al., 2007 descreve a prevalência da infecção em animais com até dois anos de idade, onde bezerros na fase pré-desmame (< 2 meses) são acometidos por todas as espécies, sendo *C. parvum* a mais prevalente (85%), seguido de *C. bovis* (9%), *C. ryanae* (5%) e *C. andersoni* (1%). À medida que os animais são desmamados e se enquadram na categoria pós-desmame (3-11 meses) essa prevalência é alterada. Onde a infecção por *C. bovis* se torna mais comum (55%), seguida por *C. ryanae* (31%), *C. andersoni* (13%) e por fim, *C. parvum* (1%). No presente estudo este padrão não foi observado, pois na fase pré-desmame foram encontrados apenas animais infectados por *C. parvum*. Já na fase pós-desmame a maioria dos bezerros foram diagnosticados como positivos para *C. andersoni*. Apenas um espécime de *C. ryanae* foi descrito como infectando os animais acima de 2 meses de idade e a espécie *C. bovis* não foi observada.

A prevalência das espécies de *Cryptosporidium* vem sendo avaliadas também em bovinos destinados a produção de carne. Fayer et al. (2010a), que estudaram a taxa de infecção por *Cryptosporidium* spp. em bovinos de corte entre seis e 18 meses de idade diagnosticaram a presença de *C. andersoni*, *C. ryanae* e *C. bovis*, não encontrando a espécie de maior potencial zoonótico, *C. parvum*.

Geurden et al. (2007) também avaliaram a prevalência das espécies de *Cryptosporidium* em bovinos de corte, onde *C. parvum* foi descrito como mais prevalente, porém em uma proporção menor do que a encontrada em rebanhos leiteiros. No entanto, não foi observado com clareza uma relação entre a idade do animal e a espécie infectante. Os autores sugerem a baixa prevalência da infecção nos animais destinados a produção de carne devido a estes animais serem mais velhos, quando comparados aos bezerros destinados a exploração leiteira. Mencionam ainda que as diferentes práticas de manejo adotadas pelos dois tipos de produção podem influenciar na taxa de infecção dos animais.

4.4.2. Microscopia x PCR

A Reação em Cadeia da Polimerase é uma técnica descrita como altamente sensível para a o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. (SANTÍN et al., 2008). No presente estudo, a microscopia apresentou um número maior de amostras positivas na detecção do protozoário do que as técnicas moleculares utilizadas. Resultados comparativos obtidos por Díaz et al. (2010), onde a microscopia foi superior aos métodos moleculares empregados. Este autores, sugerem que tal fato possa estar relacionado ao pequeno número de oocistos existentes nas amostras analisadas. Fato semelhante foi descrito por Fayer et al. (2007), onde mencionam que amostras positivas que continham menos de 10 oocistos por grama de fezes podem não ser amplificadas através da reação de PCR.

Além da baixa densidade de oocistos ser um problema para a detecção do protozoário utilizando a técnica de PCR, Magi et al. (2006) mencionam ainda que a distribuição heterogênea da formas infectante nas fezes pode ocasionalmente gerar resultados falsos-negativos. Os autores ainda sugerem que a presença de um elevado número de parasitos observados na microscopia não garante que na confirmação do diagnóstico através da PCR seja observado um resultado positivo. Principalmente devido ao fato dos oocistos serem danificados antes e durante o processo de extração, o

que pode ocasionar uma diminuição no número de alvos disponíveis no DNA, que são utilizados na técnica de PCR, reduzindo assim sua eficácia.

Outra hipótese para justificar o resultado obtido no presente estudo seria a presença de elevadas concentrações de substâncias inibidoras presentes no material fecal de bezerros, o que limitaria a eficiência do diagnóstico molecular (SILVA et al., 2010).

Dessa forma, não se pode sugerir uma melhor metodologia a ser utilizada, o ideal é que uma técnica funcione de forma complementar a outra.

4.4.3 – Relação Entre a Presença de Diarréia e a Infecção por *Cryptosporidium* spp.

Alguns autores apontam a diarréia como um sintoma característico da criptosporidiose ocasionada por *Cryptosporidium parvum* (SANTÍN; TROUT, 2007; CHAKO et al., 2010). No presente estudo, pôde-se observar que 34,4 % (11/32) dos animais que apresentaram diarréia encontraram-se infectados por pelo menos uma das quatro espécies de *Cryptosporidium* mais prevalentes em bovinos. Porém, apenas dois destes animais foram diagnosticados, através do sequenciamento para o gene *18S* e do PCR-Nested utilizando *GP60*, como infectado pela espécie *C. parvum*. Apenas um bezerro com sintomas de diarréia apresentou-se positivo para a espécie *C. parvum* através da Nested-PCR para o gene *GP60*. No entanto tal resultado ainda deve ser confirmado através do sequenciamento utilizando este gene alvo, já que não foi possível a identificação da espécie de *Cryptosporidium* infectando este animal utilizando o gene *18S*.

Silverlås et al. (2010) relataram a presença de diversos enteropatógenos como possíveis causadores de diarréia em bovinos. A espécie de *Cryptosporidium* predominante nestes animais foi *Cryptosporidium parvum*-like spp., seguido de *C. bovis* e *C. parvum*, diferindo dos resultados observados no presente estudo.

Um trabalho realizado na Argentina apresentou um percentual de infecção relacionado a presença de diarréia mais elevado, 17% (DEL COCO et al., 2008), porém não houve uma correlação a especificamente nenhuma espécie de *Cryptosporidium*. Os autores apenas relacionaram a presença de fezes diarréicas a infecção por *Cryptosporidium* spp. Resultados similares foram descritos por Maikai et al. (2011) na Nigéria, onde 25% dos bovinos avaliados apresentavam sintomas de diarréia relacionada a alguma espécie de *Cryptosporidium*.

Em um estudo realizado na Noruega, Gulliksen et al. (2009) observou a presença de diarréia ocasionada pela infecção de *Cryptosporidium* spp. e *Eimeria* spp., onde 8,8% dos bovinos estudados encontravam-se infectados por ambos os protozoários. Tal fato também foi observado no presente estudo, porém o percentual de infecção obtido foi maior (18,3%) do que o descrito por Gulliksen et al. (2009).

4.5. CONCLUSÃO

No estudo foi observada a importância da utilização de técnicas complementares, como a microscopia e a PCR-Nested, para o diagnóstico preciso das espécies de *Cryptosporidium*.

Foram diagnosticadas através de técnicas moleculares três espécies de *Cryptosporidium*. *C. parvum*, espécie de grande relevância devido ao seu elevado potencial zoonótico. *C. andersoni*, espécie importante para a produção leiteira. Além de *C. ryanae*, sendo o primeiro relato desta espécie infectando bezerros no Estado do Rio de Janeiro e a segunda descrição da espécie no Brasil.

O diagnóstico de espécies diferentes de *C. parvum* causando diarreia nos animais, sugere o envolvimento de infecção mista com outras espécies *Cryptosporidium* e/ou infecções com outros agentes etiológicos.

5. CAPÍTULO III

A INFLUÊNCIA DO MANEJO NA PREVALÊNCIA DE *Cryptosporidium* spp. EM BEZERROS DESTINADOS A EXPLORAÇÃO LEITEIRA

RESUMO

A criptosporidiose bovina é motivo de grande preocupação, em especial para os produtores de leite. Bovinos infectados por *Cryptosporidium* podem apresentar um baixo desempenho produtivo além de eliminar uma elevada carga parasitária no ambiente, especialmente se estiverem apresentando um quadro clínico de diarreia. No presente estudo, foram avaliados 79 bezerros de até um ano de idade em uma propriedade leiteira no Vale do Paraíba, Rio de Janeiro. Durante o período experimental foram adotados dois manejos (A e B) distintos. No primeiro momento, utilizando o manejo A, 29,9% amostras foram diagnosticadas como positivas para *Cryptosporidium* através do PCR utilizando *18S*. Após a mudança para o manejo B, este percentual diminuiu para 8,5%. Através do sequenciamento, utilizando *18S*, foram diagnosticadas três espécies, *C. parvum*, *C. ryanae* e *C. andersoni*. Todas as amostras passarão por uma nova reação de PCR utilizando o gene *GP60*, onde as diagnosticadas como positivas para *C. parvum* serão novamente sequenciadas para determinação dos subtipos da espécie zoonótica. No estudo foi observado que a implantação de algumas mudanças no manejo da propriedade pode ser de grande ajuda na tentativa de diminuir a disseminação da doença entre os animais e reduzir a contaminação ambiental.

Palavras-chave: Bezerros, *Cryptosporidium*, manejo, gene *18S*, gene *GP60*

ABSTRACT

Bovine cryptosporidiosis is a major concern, especially for dairy farmers. Cattle infected with *Cryptosporidium* may present low productive performance and eliminates a high parasite load in the environment, especially if they are presenting diarrhea. In the present study 79 calves, up to 1-year-old, were evaluated in a dairy property in Vale do Paraíba, Rio de Janeiro. During the experimental period two animal managements (A and B) were adopted. Initially, when the management A was used, 29.9% of the calves were diagnosed as positive for *Cryptosporidium* sp. by PCR using gene *18S*. Then, changing to management B, the percentage of infection decreased to 8.5%. The sequencing data showed the presence of three species, *C. parvum*, *C. ryanae* and *C. andersoni*. All samples undergo a second PCR reaction using the *GP60* gene, where the *C. parvum* samples will be sequenced with *GP60* to determine the subtypes of this zoonotic specie. The study demonstrated that some changes in the management of property may be of great help in trying to reduce the spread of disease among animals and environmental contamination.

Key words: Calves, *Cryptosporidium*, management, *18S* e *GP60*

5.1. INTRODUÇÃO

A criação de bovinos pode ser considerada uma das principais atividades desenvolvidas no Brasil. Ao longo da última década o país se firmou como grande produtor de carne e leite (LUCENA et al., 2010) sendo considerado o segundo maior criador mundial de bovinos de acordo com pesquisa realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE – 2009).

Diversos são os enteropatógenos causadores de diarreia em bovinos, onde as doenças parasitárias adquirem destaque, pois estão relatadas como as mais prevalentes (LUCENA et al., 2010). Dentre estas as causadas por protozoários apresentam grande relevância. Das várias espécies consideradas como válidas do gênero *Cryptosporidium*, *C. parvum*, é considerada responsável por causar sintomatologia clínica principalmente em bezerros jovens, com aproximadamente um mês de idade (NYDAM; MOHAMMED, 2005; STARKEY et al., 2006; CARDOSO et al., 2008; GULLIKSEN et al., 2009).

Devido à importância econômica, a criptosporidiose está sendo muito estudada na pecuária leiteira (IMRE; DĂRĂBUȘ, 2011). A presença de bovinos com surtos diarreicos acarreta diversos prejuízos financeiros, pois, a sintomatologia está diretamente relacionada a uma redução do ganho de peso, a queda na produtividade e aumento na taxa de mortalidade (NYDAM; MOHAMMED, 2005; GULLIKSEN et al., 2009; DÍAZ et al., 2010). A duração dos sintomas depende de inúmeros fatores, dentre eles os níveis de contaminação ambiental, a virulência e a infectividade da espécie envolvida, a susceptibilidade do hospedeiro e a idade a primeira infecção (FEITOSA et al., 2008).

A taxa de prevalência da infecção por *C. parvum* em bovinos é bastante variável, podendo ser observados entre 13% e 100% de positividade nos animais (STARKEY et al., 2006). Esta variação pode sofrer influência direta de alguns fatores, como a idade do hospedeiro, as características da região estudada, e a metodologia utilizada no estudo (STARKEY et al., 2006; BROOK et al., 2008; FEITOSA et al., 2008).

No Brasil, a taxa de prevalência da infecção por *Cryptosporidium* spp. em bovinos destinados a produção de leite varia entre 0,6% e 72,13% sendo a maior ocorrência em animais com menos de dois meses de idade (MEIRELES, 2010).

As condições sanitárias presentes na propriedade podem influenciar diretamente na cadeia de transmissão da criptosporidiose. Quanto piores forem às condições sanitárias encontradas no ambiente, em especial nos bezerreiros, maior será o risco de infecção dos animais (FEITOSA et al., 2004).

Algumas práticas simples de manejo como a criação de bezerros em baias individuais, podem diminuir a taxa de infecção, reduzindo conseqüentemente à contaminação do meio ambiente (FEITOSA et al., 2004).

O presente estudo teve por objetivo determinar a taxa de infecção por *Cryptosporidium* spp. em bezerros de até 12 meses de idade em uma propriedade leiteira no Sul Fluminense através do diagnóstico da microscopia óptica; caracterização genotípica das espécies encontradas, avaliando a existência ou não do potencial zoonótico e através de modificações no manejo da criação de bezerros avaliar possíveis alterações na ocorrência da infecção.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Etapas do Estudo

A prevalência da infecção por *Cryptosporidium* spp. em bezerros com menos de 12 meses de idade foi avaliada durante o período de 2009 a 2011 em uma propriedade leiteira no Sul do Estado do Rio de Janeiro.

O estudo foi dividido em duas etapas, onde na primeira foram realizadas as coletas de material fecal e o processamento das amostras para avaliação utilizando microscopia óptica de campo claro e contraste de fase. O processamento das amostras e o diagnóstico para *Cryptosporidium* spp. foram realizados no Laboratório de Protozoologia, Departamento de Parasitologia Animal, UFRRJ.

A segunda etapa do estudo consistiu na confirmação e identificação das espécies e subtipos de *Cryptosporidium* através de técnicas moleculares. O procedimento de extração de DNA e as técnicas de PCR-Nested foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular, no Departamento de Parasitologia Animal e no Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas, no Departamento de Solos, ambos pertencentes à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

O sequenciamento das amostras positivas para o gênero *Cryptosporidium* foi realizado pela empresa coreana Macrogen INC., em Seul, Coreia do Sul.

As sequências consenso e as análises filogenéticas foram realizadas no Laboratório de Protozoologia Departamento de Parasitologia Animal, UFRRJ.

5.2.2. Análise Estatística

O comportamento da infecção por *Cryptosporidium* spp., devido a alteração do manejo da propriedade, foi avaliada através da aplicação do teste não-paramétrico de tendência do Qui-quadrado ($p < 0.05$) (AYRES et al., 2005).

5.2.3. Coleta das Amostras Fecais

As amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal de 79 bezerros distintos, com idade variando entre três dias e 12 meses, em uma pequena propriedade leiteira no Vale do Paraíba, Estado do Rio de Janeiro.

5.2.4. Processamento, Sequenciamento e Análise Filogenética das Amostras

Todo o procedimento para o processamento das amostras foi descrito previamente no segundo capítulo deste estudo, assim como toda a metodologia adotada para o sequenciamento e análise filogenética das mesmas.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Os Animais e a Propriedade

A propriedade situava-se próxima às margens de um rio (Figuras 27 e 28). A descrição da propriedade em questão foi realizada no capítulo II (Propriedade A).

Os animais encontravam-se agrupados de acordo com a faixa etária, onde os bezerros de até um mês de idade eram mantidos em baias individuais. Acima desta idade até 12 meses os bezerros eram mantidos em baias coletivas. Os dois tipos de baias eram mantidas na mesma instalação considerada como bezerreiro.

A maioria dos animais utilizados, durante o período de coleta, apresentavam fezes dentro dos padrões de normalidade, porém, em 11 bezerros foram observados a presença de fezes diarréicas, que variava de moderada a intensa.

Inicialmente a propriedade mantinha os animais em um bezerreiro onde as condições sanitárias eram precárias com manejo inadequado (Manejo A). Posteriormente foi sugerida ao proprietário a mudança do local onde estes animais eram acondicionados, juntamente com algumas modificações no manejo (Manejo B).

Durante a primeira coleta de material fecal (Manejo A), os 32 bezerros utilizados encontravam-se em uma instalação semi-aberta, muito úmida e com a presença constante de fezes. Os bebedouros e comedouros eram localizados dentro das baias e junto ao piso, o que favorecia o pisoteio e a contaminação da água e do alimento pelas fezes dos animais.

As mudanças na localização dos bezerreiros foram atendidas e foi realizada uma segunda coleta de material fecal (Manejo B), onde foram avaliados 27 animais diferentes dos utilizados na primeira amostragem. Posteriormente, neste mesmo local foi realizada uma terceira coleta de material fecal, de animais diferentes das duas coletas anteriores, utilizando 20 bezerros. Desta forma, totalizaram 47 amostras do manejo B.

Esta nova localização, era uma área mais ampla e ensolarada (Figura 27), porém os animais estavam instalados em um local muito próximo onde os animais adultos eram mantidos.

No novo local, os bezerros foram mantidos presos por correntes em abrigos individuais e os comedouros e bebedouros foram suspensos para evitar pisoteio (Figura 29).

O escore corporal dos animais era variado. Os bezerros mais novos encontravam-se mais debilitados, alguns apresentando fezes diarréicas e dificuldade de locomoção.

Animais de companhia como cães e gatos eram encontrados circulando livremente em várias áreas da propriedade e inclusive próximos aos bovinos jovens e adultos.

As amostras após serem coletadas foram identificadas com os dados do animal e armazenadas sob refrigeração até a chegada no Laboratório de Protozoologia. No laboratório, as amostras foram catalogadas, processadas e diagnosticadas quanto à presença de *Cryptosporidium* spp.



Fonte: Google Earth

Figura 27 – Foto via satélite da propriedade estudada. Observa-se em destaque as áreas onde eram mantidos os animais. Seta amarela: local do antigo bezerreiro (primeira coleta); Seta vermelha: local do novo bezerreiro (segunda e terceira coletas).

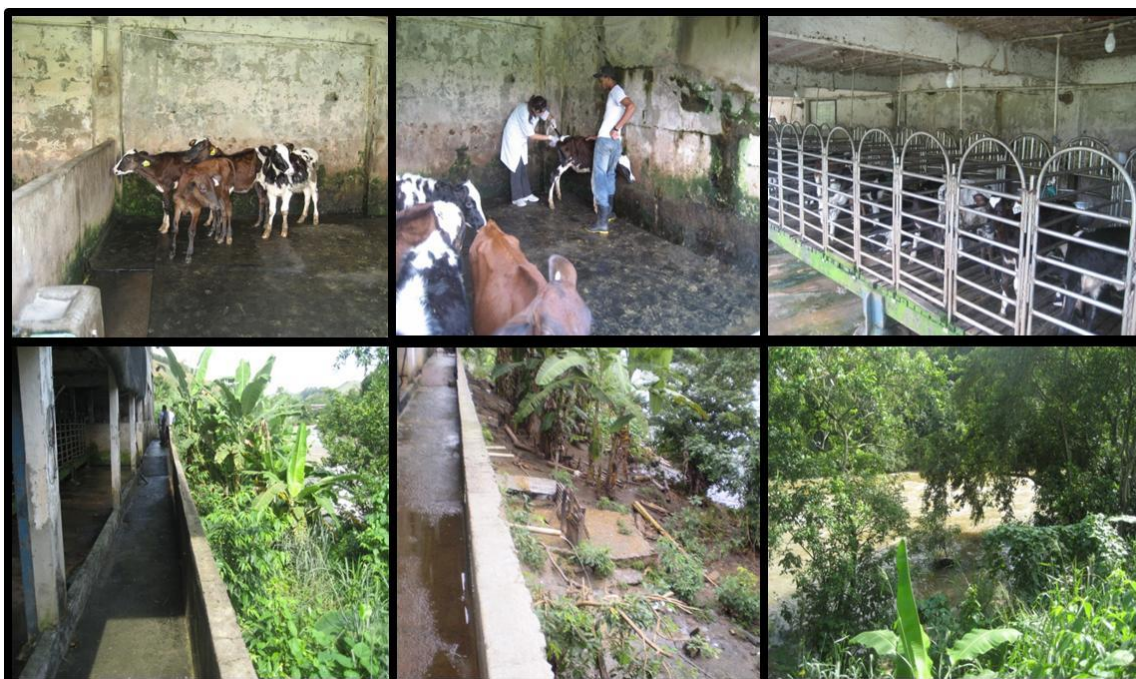


Figura 28 – Local de manejo A da propriedade estudada. Destacando as instalações dos animais e o local de escoamento da água de limpeza das baias.

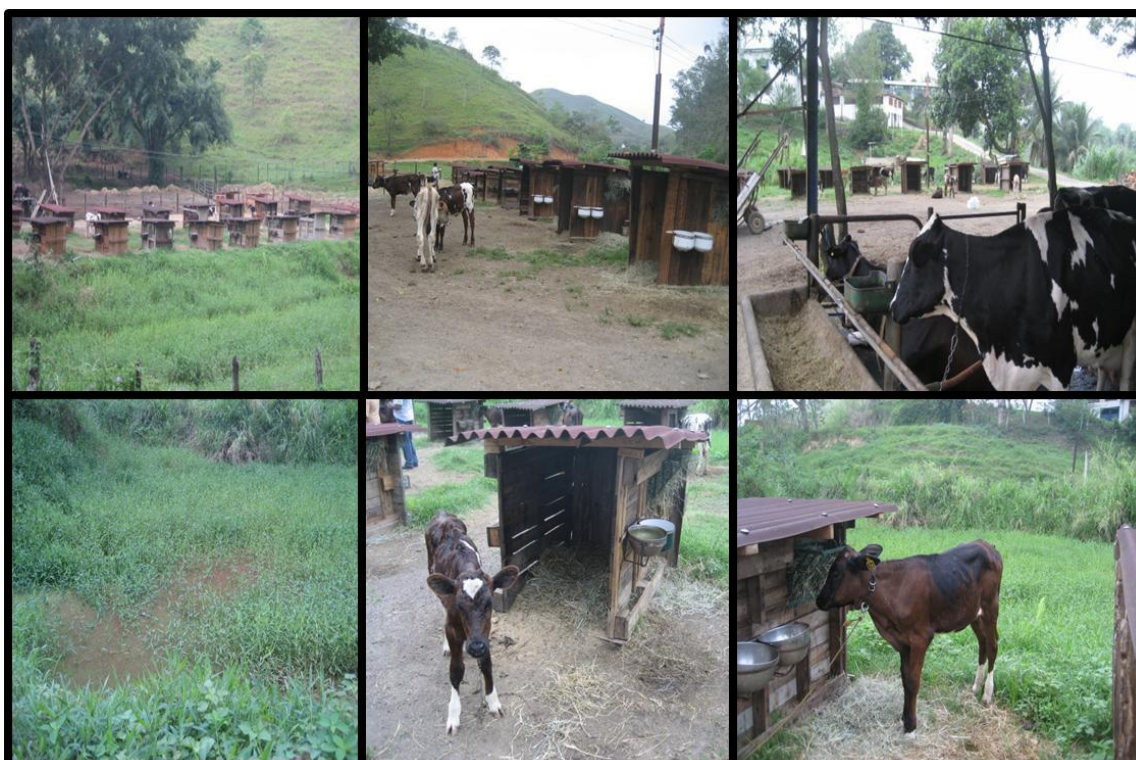


Figura 29 – Local de manejo B da propriedade estudada. Destacando as novas instalações dos animais, a proximidade entre os animais de diferentes faixas etárias e o local de escoamento da água.

5.3.2. Diagnóstico Microscópico e PCR-Nested Utilizando Gene 18S

A presença de *Cryptosporidium* spp. foi primeiramente diagnosticada na propriedade, através de microscopia de campo claro e contraste de fase (tabela 11).

Os resultados obtidos através da microscopia foram submetidos a técnicas de PCR-Nested utilizando o gene alvo *SSUrRNA* para confirmação do diagnóstico. Dos 11 animais positivos identificados na microscopia, nove tiveram o diagnóstico confirmado pela biologia molecular (tabela 11 e figura 30).

Tabela 11 – Número de bezerros positivos para infecção por *Cryptosporidium* spp. na propriedade durante as diferentes coletas de amostras fecais.

COLETA	MANEJO	BEZERROS POSITIVOS (MICROSCOPIA)	BEZERROS POSITIVOS (PCR- NESTED)	TOTAL DE ANIMAIS
1	A	7 (21,9%)	5 (15,6%)	32
2	B	3 (11,1%)	3 (11,1%)	27
3	B	1 (5%)	1 (5%)	20

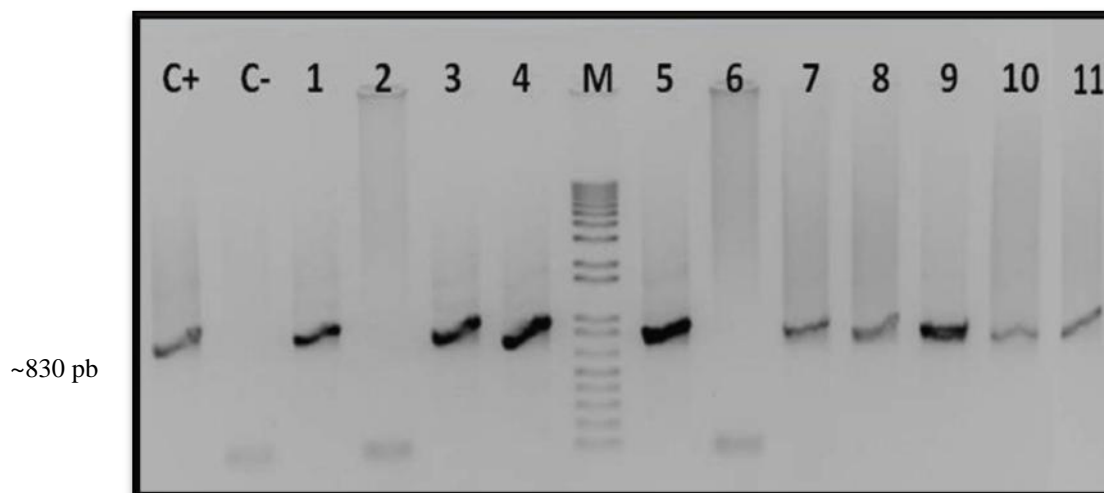


Figura 30 - Reação de Nested- PCR utilizando gene 18S visualizado em gel de agarose a 1% corado com GelRedTM. M: marcador; C+: controle positivo da reação; C-: controle negativo da reação; 1 a 11: amostras diagnosticadas como positivas na microscopia.

5.3.3. Sequenciamento Utilizando o Gene 18S

O sequenciamento das nove amostras positivas no Nested-PCR foi realizado pela empresa coreana Macrogen INC. A identificação das espécies encontradas foi realizada utilizando os ‘primers’ 18SNF e 18SNR para o gene alvo *SSUrRNA*, esperando-se obter aproximadamente 830 pb. As nove amostras enviadas para o sequenciamento apresentaram seqüências de boa qualidade. Através deste procedimento foram diagnosticadas três espécies de *Cryptosporidium* infectando os animais (tabela 12). Todas as seqüências obtidas a partir do sequenciamento do gene 18S foram depositadas no ‘GenBank’.

O número de acesso de cada seqüência, assim como o sequenciamento de cada amostra encontram-se representados na tabela 12 e na figura 31.

Tabela 12 – Amostras sequenciadas, suas respectivas espécies de *Cryptosporidium* e número de acesso no ‘GenBank’.

AMOSTRAS	IDADE BEZERRA	ESPÉCIE DE <i>Cryptosporidium</i> E NÚMERO DE ACESSO NO ‘GENBANK’
1	15 dias	<i>C. parvum</i> – JX198271
3	1 mês	<i>C. parvum</i> – JX198272
4	3 meses	<i>C. andersoni</i> – JX198256
5	2 meses	<i>C. andersoni</i> – JX198257
7	2 meses	<i>C. ryanae</i> – JX198274
8	15 dias	<i>C. parvum</i> – JX198273
9	2 meses	<i>C. andersoni</i> – JX198258
10	5 meses	<i>C. andersoni</i> – JX198259
11	2 meses	<i>C. andersoni</i> – JX198260

C.andersoni GU831568	TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGCGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG	100
C.andersoni FJ463187	TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGCGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG	100
Bezerro 11 JX198260	TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGCGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG	100
Bezerro 10 JX198259	TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGCGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG	100
Bezerro 9 JX198258	TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGCGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG	100
Bezerro 5 JX198257	TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGCGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG	100
Bezerro 4 JX198256	TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGCGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG	100
C.andersoni HQ007049	TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGCGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG	100
C.andersoni GU831569	TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGCGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG	100
C.parvum AF164102	TAATAACTTTACGGATCACATTAA--ATGTGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGG	98
C.parvum HM622120	-----GTGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGG	72
Bezerro 1 JX198271	TAATAACTTTACGGATCACATTAA--ATGTGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGG	98
Bezerro 3 JX198272	TAATAACTTTACGGATCACATTAA--ATGTGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGG	98
Bezerro 8 JX198273	TAATAACTTTACGGATCACATTAA--ATGTGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGG	98
C.ryanae EU410344	TAATAACTTTACGGATCACACTA----TGTGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG	96
C.ryanae HM622123	-----TTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG	55
Bezerro 7 JX198274	TAATAACTTTACGGATCACACTA----TGTGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG	96
C.bovis AY741305	TAATAACTTTACGGATCACATTAA----TGTGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG	96
C.bovis HM622121	---TAACTTTACGGATCACATTAA----TGTGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG	93

C.andersoni	GU831568	GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACA	200
C.andersoni	FJ463187	GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACA	200
Bezerro 11	JX198260	GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACA	200
Bezerro 10	JX198259	GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACA	200
Bezerro 9	JX198258	GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACA	200
Bezerro 5	JX198257	GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACA	200
Bezerro 4	JX198256	GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACA	200
C.andersoni	HQ007049	GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACA	200
C.andersoni	GU831569	GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACA	200
C.parvum	AF164102	GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACA	198
C.parvum	HM622120	GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACA	172
Bezerro 1	JX198271	GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACA	198
Bezerro 3	JX198272	GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACA	198
Bezerro 8	JX198273	GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACA	198
C.ryanae	EU410344	GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACA	196
C.ryanae	HM622123	GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACA	155
Bezerro 7	JX198274	GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACA	196
C.bovis	AY741305	GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACA	196
C.bovis	HM622121	GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACA	193
		*****	***

C.andersoni GU831568 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAATTT---A 397
C.andersoni FJ463187 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAATTT---A 397
Bezerro 11 JX198260 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAATTT---A 396
Bezerro 10 JX198259 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAATTT---A 396
Bezerro 9 JX198258 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAATTT---A 396
Bezerro 5 JX198257 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAATTT---A 396
Bezerro 4 JX198256 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAATTT---A 396
C.andersoni HQ007049 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAATTT---A 396
C.andersoni GU831569 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAATTT---A 396
C.parvum AF164102 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTA-ATAATTTATATA 397
C.parvum HM622120 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTA-ATAATTTATATA 371
Bezerro 1 JX198271 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTA-ATAATTTATATA 397
Bezerro 3 JX198272 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTA-ATAATTTATATA 397
Bezerro 8 JX198273 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTA-ATAATTTATATA 397
C.ryanae EU410344 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTAATTTTCTGTTA-ATT-TTTATATA 394
C.ryanae HM622123 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTAATTTTCTGTTA-ATT-TTTATATA 353
Bezerro 7 JX198274 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTAATTTTCTGTTA-ATT-TTTATATA 394
C.bovis AY741305 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTAATCTTCTGTTA-ATT-TTTATATA 394
C.bovis HM622121 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTAATCTTCTGTTA-ATT-TTTATATA 391

***** ** ** *

C.andersoni GU831568	GCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGTCTTTCTTATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGGTTAATAGGGACAGTT	593
C.andersoni FJ463187	GCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGTCTTTCTTATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGGTTAATAGGGACAGTT	593
Bezerro 11 JX198260	GCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGTCTTTCTTATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGGTTAATAGGGACAGTT	592
Bezerro 10 JX198259	GCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGTCTTTCTTATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGGTTAATAGGGACAGTT	592
Bezerro 9 JX198258	GCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGTCTTTCTTATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGGTTAATAGGGACAGTT	592
Bezerro 5 JX198257	GCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGTCTTTCTTATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGGTTAATAGGGACAGTT	592
Bezerro 4 JX198256	GCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGTCTTTCTTATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGGTTAATAGGGACAGTT	592
C.andersoni HQ007049	GCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGTCTTTCTTATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGGTTAATAGGGACAGTT	592
C.andersoni GU831569	GCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGTCTTTCTTATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGGTTAATAGGGACAGTT	592
C.parvum AF164102	GCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAT-TAAAGATTTTTATCTTTCTTATTGGTTCTAAGATAAGAATAATGATTAATAGGGACAGTT	594
C.parvum HM622120	GCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAT-TAAAGATTTTTATCTTTCTTATTGGTTCTAAGATAAGAATAATGATTAATAGGGACAGTT	568
Bezerro 1 JX198271	GCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAT-TAAAGATTTTTATCTTTCTTATTGGTTCTAAGATAAGAATAATGATTAATAGGGACAGTT	594
Bezerro 3 JX198272	GCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAT-TAAAGATTTTTATCTTTCTTATTGGTTCTAAGATAAGAATAATGATTAATAGGGACAGTT	594
Bezerro 8 JX198273	GCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAT-TAAAGATTTTTATCTTTCTTATTGGTTCTAAGATAAGAATAATGATTAATAGGGACAGTT	594
C.ryanae EU410344	GCAGGCTATTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAT-TAAGGATTTTTATCTTCTTATTGGTTCTAGAATAAAAATAATGATTAATAGGGACAGTT	582
C.ryanae HM622123	GCAGGCTATTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAT-TAAGGATTTTTATCTTCTTATTGGTTCTAGAATAAAAATAATGATTAATAGGGACAGTT	541
Bezerro 7 JX198274	GCAGGCTATTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAT-TAAGGATTTTTATCTTCTTATTGGTTCTAGAATAAAAATAATGATTAATAGGGACAGTT	582
C.bovis AY741305	GCAGGCTATTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAT-TAAGGATTTTTATCTTCTTATTGGTTCTAGAATAAAAATAATGATTAATAGGGACAGTT	582
C.bovis HM622121	GCAGGCTATTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAT-TAAGGATTTTTATCTTCTTATTGGTTCTAGAATAAAAATAATGATTAATAGGGACAGTT	579



C.andersoni GU831568 GGGGGCATTTCGTATTTAACAGCCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAA 693
C.andersoni FJ463187 GGGGGCATTTCGTATTTAACAGCCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAA 693
Bezerro 11 JX198260 GGGGGCATTTCGTATTTAACAGCCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAA 692
Bezerro 10 JX198259 GGGGGCATTTCGTATTTAACAGCCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAA 692
Bezerro 9 JX198258 GGGGGCATTTCGTATTTAACAGCCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAA 692
Bezerro 5 JX198257 GGGGGCATTTCGTATTTAACAGCCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAA 692
Bezerro 4 JX198256 GGGGGCATTTCGTATTTAACAGCCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAA 692
C.andersoni HQ007049 GGGGGCATTTCGTATTTAACAGCCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAA 692
C.andersoni GU831569 GGGGGCATTTCGTATTTAACAGCCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAA 692
C.parvum AF164102 GGGGGCATTTCGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACAACTAATGCGAAAGCATTGCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAA 694
C.parvum HM622120 GGGGGCATTTCGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACAACTAATGCGAAAGCATTGCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAA 668
Bezerro 1 JX198271 GGGGGCATTTCGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACAACTAATGCGAAAGCATTGCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAA 694
Bezerro 3 JX198272 GGGGGCATTTCGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACAACTAATGCGAAAGCATTGCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAA 694
Bezerro 8 JX198273 GGGGGCATTTCGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACAACTAATGCGAAAGCATTGCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAA 694
C.ryanae EU410344 GGGGGCATTTCGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACAACTACTGCGAAAGCATTGCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAA 682
C.ryanae HM622123 GGGGGCATTTCGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACAACTACTGCGAAAGCATTGCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAA 641
Bezerro 7 JX198274 GGGGGCATTTCGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACAACTACTGCGAAAGCATTGCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAA 682
C.bovis AY741305 GGGGGCATTTCGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACAACTACTGCGAAAGCATTGCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAA 682
C.bovis HM622121 GGGGGCATTTCGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACAACTACTGCGAAAGCATTGCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAA 679

C.andersoni GU831568	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	724
C.andersoni FJ463187	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	724
Bezerro 11 JX198260	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	723
Bezerro 10 JX198259	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	723
Bezerro 9 JX198258	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	723
Bezerro 5 JX198257	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	723
Bezerro 4 JX198256	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	723
C.andersoni HQ007049	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	723
C.andersoni GU831569	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	723
C.parvum AF164102	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	725
C.parvum HM622120	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	699
Bezerro 1 JX198271	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	725
Bezerro 3 JX198272	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	725
Bezerro 8 JX198273	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	725
C.ryanae EU410344	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	713
C.ryanae HM622123	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	672
Bezerro 7 JX198274	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	713
C.bovis AY741305	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	713
C.bovis HM622121	CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA	710

Figura 31 – Alinhamento das sequências de *Cryptosporidium parvum* e *C. andersoni*, utilizando gene *18S*, encontradas parasitando bezerros de diferentes faixas etárias. Sequências alinhadas através do programa Clustal W 2.1 (LARKIN et al., 2007; GOUJON et al., 2010), destacando as diferenças entre cada sequência (cinza); região de polimorfismo (—); região de intenso polimorfismo (↑) e variação dentro da espécie *C. andersoni* (preto).

5.3.4. Filogenia Gene Alvo 18S

As similaridades apresentadas pelas espécies *Cryptosporidium parvum*, *C. andersoni* e *C. ryanae* quando comparadas as sequências já existentes no 'GenBank' foram avaliadas através do método de 'Neighbor-Joining' utilizando o algoritmo Kimura-2, com 'bootstrap' de 1000 repetições e deleção total dos gaps presentes nas sequências.

A árvore consenso contruída encontra-se representada na figura 32.

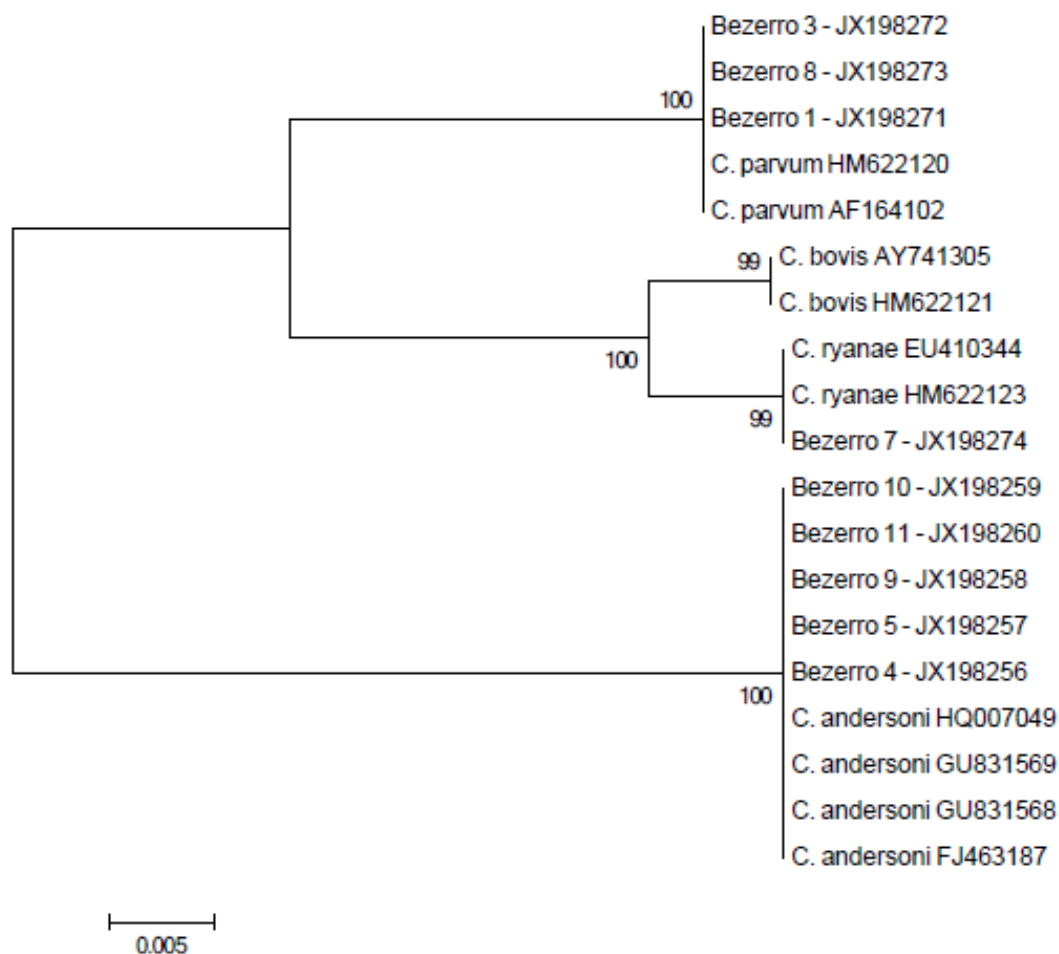


Figura 32 – Árvore filogenética contruída a partir do sequenciamento (18S) de espécimes de *Cryptosporidium* encontrados parasitando bezerros em uma propriedade leiteira no Estado do Rio de Janeiro. A análise utilizada na construção da árvore foi a 'Neighbor-Joining' e os valores de 'bootstrap' são de 100%.

As distâncias genéticas entre os espécimes encontrados na propriedade e as sequências obtidas no 'GenBank' foram comparadas utilizando o algoritmo Kimura-2. A análise comparativa realizada demonstrou a elevada similaridade entre as espécies de *Cryptosporidium* encontradas no presente estudo e as sequências existentes no 'Genbank'. Onde a maior distância observada foi entre as espécies *C. andersoni* e *C. ryanae* (0.073).

5.3.5. PCR-Nested Utilizando Gene Alvo *GP60*

Todas as nove amostras, foram submetidas a uma nova reação de PCR-Nested utilizando o *GP60* como gene alvo para observar a presença da espécie *C. parvum* e posteriormente determinar seus subtipos. O resultado da reação pode ser observado na figura 33.

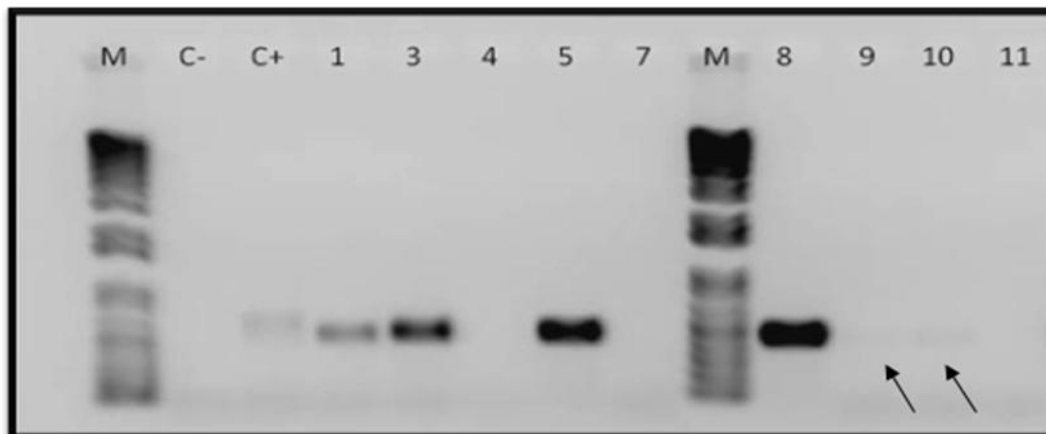


Figura 33 - Reação de Nested- PCR utilizando gene *GP60* visualizado em gel de agarose a 1% corado com GelRedTM. Tempo de exposição à luz ultravioleta foi de 0,9 segundos. M: marcador; C-: controle negativo da reação; C+: controle positivo da reação; 1 a 7: amostras coletadas sob o sistema de manejo A; 8 a 11: amostras coletadas sob o sistema de manejo B. Seta aponta para bandas de aproximadamente 400pb. As amostras 2 e 6 não foram utilizadas pois não foi possível a amplificação do DNA extraído através da PCR-Nested utilizando o gene *18S*.

5.3.6. Alteração no Local da Instalação dos Animais

As taxas de infecção por *Cryptosporidium* spp. na propriedade podem ser observada na figura 34. Onde se pode notar uma diminuição do percentual de animais infectados com a alteração do local do bezerreiro onde os animais eram mantidos.

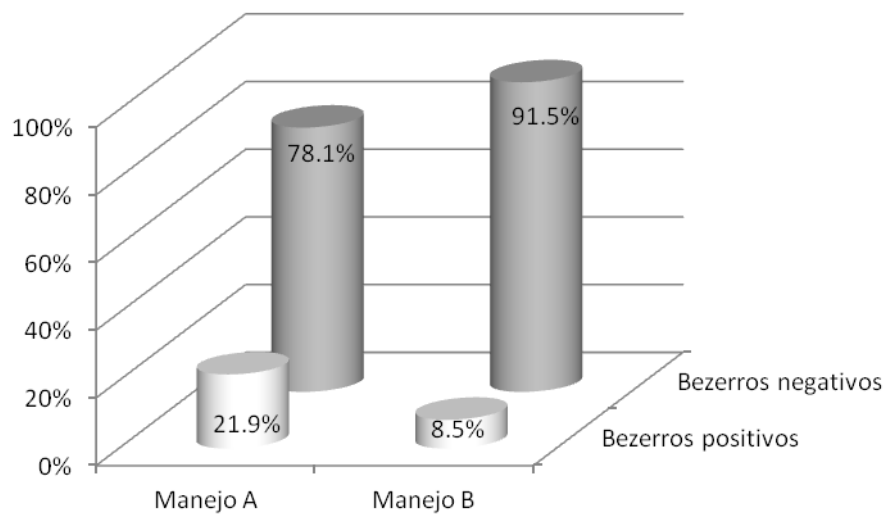


Figura 34 – Taxa da infecção por *Cryptosporidium* spp. em bezerros, levando em consideração a alteração do local do bezerreiro na propriedade.

Apesar de notarmos uma redução no percentual de infecção dos animais estudados (figura 34), quando analisamos a influência da mudança do local do bezerreiro sobre a taxa de infecção dos animais, utilizando o teste de tendência do qui-quadrado com um nível de significância de 5%, podemos notar a inexistência de associação entre os eventos durante o período da investigação ($p\text{-valor} > 0,05$).

5.4. DISCUSSÃO

5.4.1. Potencial Zoonótico das Espécies Encontradas no Brasil

Foram diagnosticadas três espécies de *Cryptosporidium* através do sequenciamento, utilizando o gene *18S*, na propriedade estudada. Sendo estas, *C. parvum*, considerada de elevado potencial zoonótico, *C. andersoni*, que já foi descrita infectando humanos com imunodeficiência (LEONI et al., 2006) e *C. ryanae*, sendo este o segundo relato da espécie no Brasil.

No Brasil poucos estudos foram realizados utilizando ferramentas moleculares para o diagnóstico das espécies de *Cryptosporidium*. Dentre eles Sevá et al. (2009) e Fiuza et al. (2011) diagnosticaram apenas a presença de *C. andersoni*, diferentemente do que foi observado no presente estudo. Além disso, Meireles et al. (2011) relataram a presença de *C. andersoni*, *C. parvum*, *C. bovis* e *C. ryanae*, em bovinos destinados a produção leiteira. Os autores destacaram a baixa prevalência de *C. parvum* em animais com mais de dois meses de idade, o mesmo foi observado neste estudo. Ressaltaram ainda a importância de *C. parvum* como responsável pela infecção em humanos e outros animais além de bovinos.

5.4.2. A Influência do Manejo x Percentual de Infecção por *Cryptosporidium* spp.

A importância da redução da exposição de bezerros ao protozoário do gênero *Cryptosporidium*, em especial a espécie *C. parvum* é descrita por Harp; Goff (1997). Como ponto primordial os autores destacaram a grande relevância das condições sanitárias dos locais onde são criados os animais e o cuidado no manejo de bovinos infectados.

No presente estudo foram avaliadas algumas práticas de manejo adotadas na propriedade e em especial as instalações onde os bezerros encontravam-se alojados. Apesar de não significativa, uma redução no percentual de infecção dos animais foi observada após a alteração de algumas práticas de manejo juntamente com a mudança do bezerreiro do local A para o local B.

Devido à elevada taxa de infecção dos bezerros por *Cryptosporidium* spp. supõe-se que algumas condições sanitárias encontradas durante a utilização do manejo A foram altamente favoráveis a infecção de *Cryptosporidium* aos animais. Dentre elas, a permanência de fezes contendo oocistos nas baias coletivas associada à elevada umidade existente no local, podendo favorecer a disseminação da infecção por entre os bovinos. Após a transferência dos animais para o local de manejo B foi observada uma redução no percentual da infecção dos bezerros, provavelmente devido à diminuição da umidade ambiental e a utilização de abrigos individuais.

A alteração da utilização de baias coletivas para abrigos individuais pode ter auxiliado na redução do percentual da infecção dos bezerros. Pois, esta mudança minimizou o contato entre os animais diminuindo consequentemente uma possível transmissão animal-animal.

Acredita-se ainda que a alteração na disposição dos comedouros e bebedouros, dentro da nova instalação (manejo B), também pode ter auxiliado na redução da infecção dos animais. Estes foram colocados a uma altura mais elevada, o que diminuiu

a contaminação da água/alimentos pelas fezes dos bezerros, através de pisoteio, e consequentemente a autoinfecção dos mesmos.

O percentual da infecção por *Cryptosporidium* spp. em bovinos leiteiros também foi estudado por Silva-Júnior et al. (2011). Os autores avaliaram diversos fatores relacionados à infecção de bezerros, dentre eles os descritos como mais relevantes como sendo a influência da resposta imune de cada animal, nutrição, exposição ao agente infeccioso, e o manejo da propriedade. Diversos fatores de risco associados à infecção por *Cryptosporidium* spp. foram relatados por Silva-Júnior et al. (2011) que descreveram a existência de grande probabilidade de infecção para bezerros jovens mantidos em instalações coletivas, concordando com os resultados obtidos no presente estudo.

Um novo problema poderia estar relacionado ao manejo B, seria a proximidade dos bezerros com animais mais velhos. O contato entre animais muito jovens e adultos poderia acarretar infecções descritas como incomuns para faixa etária dos bezerros. Tal fato pode ser sugerido principalmente pela presença da infecção da maior parte dos animais por *C. andersoni* (5/7), espécie descrita comumente em animais acima de 10 meses de idade (FAYER et al., 2007; FAYER et al., 2010a).

Durante a utilização do manejo A foi observado o descarte inadequado dos dejetos dos bezerros mantidos em baias coletivas. Durante a limpeza do bezerreiro fezes de animais infectadas por *Cryptosporidium* spp. era lavado e lançado 'in natura' diretamente no rio que passava na propriedade. Tal prática de manejo pode acarretar diversos problemas, dentre eles a contaminação ambiental e a ocorrência de possíveis surtos de criptosporidiose em outras áreas. Dependendo da carga parasitária dos animais e da espécie/subtipo, surtos da doença podem ocorrer inclusive no homem. Tal fato pode ser sugerido devido à presença da espécie de elevado potencial zoonótico, *C. parvum*, diagnosticada na propriedade. Situação semelhante foi observada na Malásia por Farizawati et al. (2005) que descreveram a contaminação de rios, próximos a propriedades rurais, devido a práticas inadequadas de manejo dos dejetos de bovinos.

Apesar da mudança de manejo na propriedade, supõe-se que o problema da contaminação ambiental não foi resolvido. Pois, muito próximo ao novo local onde os bezerros são mantidos existia uma aguada, que em épocas de chuva provavelmente recebia água contaminada pelas fezes oriundas dos bezerreiros. O reservatório em questão está diretamente ligado ao rio que passa pela propriedade, mantendo dessa forma a disseminação da forma infectante, fazendo com que o possível problema descrito anteriormente continue a existir.

5.5. CONCLUSÕES

Foi possível observar ainda que mudanças nas práticas de manejo dentro de uma propriedade podem alterar o percentual de infecção dos animais com *Cryptosporidium* spp.

Durante o presente estudo foi possível diagnosticar a presença de duas espécies de *Cryptosporidium* consideradas de grande relevância na pecuária leiteira, *C. parvum* e *C. andersoni*. Sendo que a primeira, dependendo do subtipo diagnosticado considerada de potencial zoonótico.

Ainda são necessários mais estudos a respeito da influência do manejo em propriedades com infecção por *Cryptosporidium*, além de trabalhos utilizando diagnósticos moleculares para a identificação das espécies do protozoário envolvidos nessa cadeia epidemiológica.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Durante a padronização das metodologias utilizadas no estudo foram observadas algumas vantagens do protocolo de extração I, utilizando kit comercial, em relação ao protocolo de extração II, destacando a maior rapidez do procedimento e a redução os custos com material.

A escolha das temperaturas de anelamento para as reações de PCR-Nested utilizando como genes alvo o *I8S* e *GP60* foram realizadas com êxito. Melhorando assim a obtenção dos fragmentos de DNA.

Diversas vantagens foram descritas em relação ao uso do GelredTM, dentre elas a elevada sensibilidade, a baixa toxicidade que facilita o manuseio e o descarte do material.

Através da utilização da microscopia foi possível diagnosticar a infecção por *Cryptosporidium* spp. Sendo que, através do diagnóstico molecular foram identificadas as seguintes espécies: *C. parvum*, *C. andersoni* e *C. ryanae*.

O quadro clínico de diarreia aparentemente não estava relacionado com as espécies dignosticadas neste estudo.

A mudança no manejo de uma propriedade leiteira é uma prática sugestiva para desencadear alterações na ocorrência de infecção por *Cryptosporidium* spp. na criação de bovinos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, N.; MATSUBAYASHI, M.; KIMATA, I.; ISEKI, M. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from humans and animals in Japan using the 60-kDa glycoprotein gene sequences. *Parasitology Research*, v. 99, n. 3, p. 303-305, 2006.
- ALVES, M.; XIAO, L.; ANTUNES, F.; MATOS, O. Distribution of *Cryptosporidium* subtypes in humans and domestic and wild ruminants in Portugal. *Parasitology Research*, v. 99, n.3 ,p. 287-292, 2006.
- AYRES, M.; Jr AYRES, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. *BioEstat 4.0 – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*, 4. Ed. Belém: IOEPA, 2005. 324 p.
- BAJER, A. *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. infections in humans, animals and the environment in Poland. *Parasitology Research*, v. 104, n.1 , p. 1-17, 2008.
- BARTA, J.R.; THOMPSON, A. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. *Trends in Parasitology*, v. 22, n. 10, p. 463-468, 2006.
- BARTELS, C. J. M.; HOLZHAUER, M.; JORRITSMA, R.; SWART, W.A.J.M.; LAM, T.J.G.M. Prevalence, prediction and risk factors on enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 93, n.2-3 , p. 162-169, 2010.
- BECHER, K.A.; ROBERTSON, I.D.; FRASER, D.M.; PALMER, D.G.; THOMPSON, R.C.A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dairy calves originating from three sources in Western Australia. *Veterinary Parasitology*, v. 123, n.1-2 , p.1-9, 2004.
- BLEARS, M.J.; POKOMY, 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 of Parasitology*, v. 86, n. 4, p. 838-841, 2000.
- BOYER, D.G.; KUCZYNSKA, E. Prevalence and concentration of *Cryptosporidium* oocysts in beef cattlenpaddock soils and forage. *Foodborn Pathogens and Disease*, v. 7, n. 8, p. 893-900, 2010.
- BROGLIA, A.; RECKINGER, S.; CACCIÓ, S.M.; NÖCKLER, K. Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in Germany. *Veterinary Parasitology*, v. 154, n. 1-2, p. 8-13, 2008.
- BROOK, E.; HART, C.A.; FRENCH, N.; CHRISTLEY, R. Prevalence and risk factors for *Cryptosporidium* spp. infection in young calves. *Veterinary Parasitology*, v. 152, n. 1-2, p. 46-52, 2008.
- CARDOSA, J.M.S.; SILVEIRA, F.L.; ARAÚJO, A.J.U.S.; CARVALHO, J.C.; KANAMURA, H.Y. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em um rebanho bovino leiteiro no município de Caçapava, Estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, Suplemento n. 1, p. 239-242, 2008.

- CARRENO, R.A.; MARTIN, D.S.; BARTA, J.R. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidian as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitology Research*, v. 85, n. 11, p. 899-904, 1999.
- CASTRO-HERMIDA, J.A.; ALMEIDA, A.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; COSTA, J.M.C.; RUMBO-LORENZO, C.; MEZO, M. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in healthy adult domestic ruminants. *Parasitology Research*, v. 101, n. 5, p. 1443-1448, 2007.
- CASTRO-HERMIDA, J.A.; GARCÍA-PRESEDO, I.; ALMEIDA, A.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; COSTA, J.M.C.; MEZO, M. Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in surface water: A health risk for humans and animals. *Water Research*, v. 43, n. 17, p. 4133-4142, 2009.
- CEVALLOS, A.M.; ZHANG, X.; WALDOR, M.K.; JAISON, S.; ZHOU, X.; TZIPORI, S.; NEUTRA, M.R.; WARD, H.D. Molecular cloning and expression of a gene encoding *Cryptosporidium parvum* glycoproteins gp40 and gp15. *Infection and Immunity*, v. 68, n. 7, p. 4108-4116, 2000.
- CHAKO, C.Z.; TYLER, J.W.; SCHULTZ, L.G.; CHIGUMA, L.; BEERNTSEN, B.T. Cryptosporidiosis in people: It's not just about the cows. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 24, n. 1, p. 37-43, 2010.
- CHALMERS, R.M. Advances in diagnosis: Is microscopy still the benchmark? In: ORTEGA-PIERRES, M.G.; CACCIÒ, S.; FAYER, R.; MANK, T.; SMITH, H.; THOMPSON, R.C.A. (Eds). *Giardia and Cryptosporidium from molecules to disease*. Oxfordshire: CABI, 2009. p. 147-157.
- CHALMERS, R.M.; GILES, M. Zoonotic cryptosporidiosis in the UK – challenges for control. *Journal of Applied Microbiology*, v. 109, n. 5, p. 1487-1497, 2010.
- CHALMERS, R.M.; SMITH, R.; ELWIN, K.; CLIFTON-HADLEY, F.A.; GILES, M. Epidemiology of anthroponotic and zoonotic human cryptosporidiosis in England and Wales, 2004-2006. *Epidemiology and Infection*, v. 139, n. 5, p. 700-712, 2011.
- CHIARI, L.; VALLE, J.V.R.; RESENDE, R.M.S. Comparação entre três métodos de extração de DNA genômico para análises moleculares em *Stylosanthes guianensis*. *Embrapa Gado de Corte-Circular Técnica*, v. 36, p. 1-6, 2009. Disponível em: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/ct/ct36/CT36.pdf>>. Acesso em: 20 de outubro de 2010.
- COKLIN, T.; UEHLINGER, F.D.; FARBER, J.M.; BARKEMA, H.W.; O'HANDLEY, R.M.; DIXON, B.R. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves from 11 farms in Prince Edward Island, Canada. *Veterinary Parasitology*, v.160, n. 3-4, p. 323-326, 2009.
- COKLIN, T.; FARBER, J.M.; PARRINGTON, L.J.; COKLIN, Z.; ROSS, W.H.; DIXON, B.R. Temporal changes in the prevalence and shedding patterns of *Giardia duodenalis* cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in a herd of dairy calves in Ontario. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 51, n. 8, p. 841-846, 2010.

COSENDEY, R.; FIUZA, V.R.S.; OLIVEIRA, F.C.R. Importância do manejo na criptosporidiose em criações de ovinos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, Suplemento n. 1, 209-214, 2008.

DAS, G.; CHANGKIJA, B.; SARKAR, S.; DAS, P. Genotyping of *Cryptosporidium parvum* isolates in bovine population in Kolkata and characterization of new bovine genotypes. *Research in Veterinary Science*, v. 91, n. 2, p. 246-250, 2011.

DE WAELE, V.; SPEYBROECK, N.; BERKVEN, D.; MULCAHY, G.; MURPHY, T.M. Control of cryptosporidiosis in neonatal calves: Use of halofuginone lactate in two different calf rearing systems. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 96, n. 3-4, p. 143-151, 2010.

DE WAELE, V.; BERZANO, M.; BERKVEN, D.; SPEYBROECK, N.; LOWERY, C.; MULCAHY, G.M.; MURPHY, T.M. Age-stratified Bayesian analysis to estimate sensitivity and specificity of four diagnostic tests for the detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in neonatal calves. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 49, n. 1, p. 76-84, 2011.

DEL COCO, V.F.; CÓRDOBA, M.A.; BASUALDO, J.A. Cryptosporidium infection in calves from a rural área of Buenos Aires, Argentina. *Veterinary Parasitology*, v. 158, n. 1-2, p. 31-35, 2008.

DÍAZ, P.; QUÍLEZ, J.; CHALMERS, R.M.; PANADERO, R.; LÓPEZ, C.; SÁNCHEZ-ACEDO, C.; MORRONGO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P. Genotype and subtype analysis of *Cryptosporidium* isolates from calves and lambs in Galicia (NW Spain). *Parasitology*, v. 137, n. 8, p. 1187-1193, 2010.

DIXON, B.; PARRINGTON, L.; COOK, A.; PINTAR, K.; POLLARI, F.; KELTON, J.; FARBER, J. The potential for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. from beef and dairy cattle in Ontario, Canada. *Veterinary Parasitology*, v.175, n. 1-2, p. 20-26, 2011.

FALL, A.; THOMPSON, R.C.A.; HOBBS, R.; MORGAN-RYAN, U. Morphology is not a reliable tool for delimiting species within *Cryptosporidium*. *The Journal of Parasitology*, v. 89, n. 2, p. 399-402, 2003.

FARIZAWATI, S.; LIM, Y.A.L.; AHMAD, R.A.; FATIMAH, C.T.N.I.; SITI-NOR, Y. Contribution of cattle farms towards river contamination with *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in Sungai Langat Basin. *Tropical Biomedicine*, v. 22, n. 2, p. 89-98, 2005.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S.J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, v. 30, n. 12-13, p. 1305-1322, 2000.

FAYER, R.; TROUT, J.M.; XIAO, L.; MORGAN, U.M.; LAL, A.A.; DUBEY, J.P. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *The Journal of Parasitology*, v. 87, n. 6, p. 1415-1422, 2001.

- FAYER, R.; SANTÍN, M.; XIAO, L. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *The Journal of Parasitology*, v. 91, n. 3, p. 624-629, 2005.
- FAYER, R.; SANTÍN, M.; TROUT, J.M.; GREINER, E. Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in eastern United States. *Veterinary Parasitology*, v.135, n. 2, p. 105-112, 2006.
- FAYER, R. General biology. In: FAYER, R.; XIAO, L. (Eds). *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. Florida: CRC Press, 2007. p. 1-42.
- FAYER, R.; SANTÍN, M.; TROUT, J.M. Prevalence of *Cryptosporidium* species and genotypes in mature dairy cattle on farms in eastern United States compared with younger cattle from the same locations. *Veterinary Parasitology*, v.145, n. 3-4, p. 260-266, 2007.
- FAYER, R.; SANTÍN, M.; TROUT, J.M. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos Taurus*). *Veterinary Parasitology*, v.156, n. 3-4, p. 191-198, 2008.
- FAYER, R.; SANTÍN, M.; TROUT, J.M. *Cryptosporidium* in cattle: From observing to understanding. In: ORTEGA-PIERRES, M.G.; CACCIÒ, S.; FAYER, R.; MANK, T.; SMITH, H.; THOMPSON, R.C.A. (Eds). *Giardia and Cryptosporidium from molecules to disease*. Oxfordshire: CABI, 2009. p. 12-24.
- FAYER, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Experimental Parasitology*, v. 124, n. 1, p. 90-97, 2010.
- FAYER, R.; SANTÍN, M.; DARGATZ, D. Species of *Cryptosporidium* detected in weaned cattle on cow-calf operations in the United States. *Veterinary Parasitology*, v.170, n. 3-4, p. 187-192, 2010a.
- FAYER, R.; SANTÍN, M.; MACARISIN, D. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Veterinary Parasitology*, v.172, n. 1-2, p. 23-32, 2010b.
- FEITOSA, F.L.F.; SHIMAMURA, G.M.; ROBERTO, T.; MEIRELES, M.V.; NUNES, C.M.; CIARLINI, P.C.; BORGES, A.S. Prevalência de criptosporidiose em bezerros na região de Araçatuba, estado de São Paulo, Brasil. *Ciência Rural*, v.34, n.1, p. 189-193, 2004
- FEITOSA, F.L.F.; SHIMAMURA, G.M.; ROBERTO, T.; MENDES, L.C.N.; PEIRÓ, J.R.; FÉRES, F.C.; BOVINO, F.; PERRI, S.H.V.; MEIRELES, M.V. Importância de *Cryptosporidium* spp. como causa de diarreia em bezerros. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.28, n. 10, p. 452-456, 2008.
- FELTUS, D.C.; GIDDINGS, C.W.; SCHNECK, B.L.; MONSON, T.; WARSHAUER, D.; MCEVOY, J.M. Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* spp. in Wisconsin. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 12, p. 4303-4308, 2006.
- FENG, Y.; ORTEGA, Y.; HE, G.; DAS, P.; XU, M.; ZHANG, X.; FAYER, R.; GATEI, W.; CAMA, V.; XIAO, L. Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Veterinary Parasitology*, v.144, n. 1-2, p. 1-9, 2007.

- FIUZA, V.R.; ALMEIDA, A.J.; FRAZÃO-TEIXEIRA, E.; SANTIN, M.; FAYER, R.; OLIVEIRA, F.C. Occurrence of *Cryptosporidium andersoni* in brazilian cattle. *The Journal of Parasitology*, v. 97, n. 5, p. 952-953, 2011.
- GARCIA, L.S.; BRUCKNER, D.A.; BREWER, T.C.; SHIMIZU, R.Y. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 18, n. 1, p. 185-190, 1983.
- GEURDEN, T.; BERKVEN, D.; MARTENS, C.; CASAERT, S.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOU, E. Molecular epidemiology with subtype analysis of *Cryptosporidium* in calves in Belgium. *Parasitology*, v.134, Pt. 14, p. 1981-1987, 2007.
- GEURDEN, T.; THOMAS, P.; CASAERT, S.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOU, E. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in lambs and goat kids in Belgium. *Veterinary Parasitology*, v.155, n. 1-2, p. 142-145, 2008.
- GOUJON, M.; MCWILLIAM, H.; LI, W.; VALENTIN, F.; SQUIZZATO, S.; PAERN, J.; LOPEZ, R. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic acids research*, v. 38, suplemento W, p. w695-699, 2010.
- GRINBERG, A.; LEARMONTH, J.; KWAN, E.; POMROY, W.; VILLALOBOS, N.L.; GIBSON, I.; WIDMER, G. Genetic diversity and zoonotic potential of *Cryptosporidium parvum* causing foal diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, n. 7, p. 2396-2398, 2008.
- GULLIKSEN, S.M.; JOR, E.; LIE, K.I.; HAMNES, I.S.; LØKEN, T.; ÅKERSTEDT, J.; ØSTERÅS, O. Enteropathogens and risk factors for diarrhea in Norwegian dairy calves. *Journal of Dairy Science*, v. 92, n. 10, p. 5057-5066, 2009.
- HALFELD-VIEIRA, B.A.; SOUZA, R.M.; FIGUEIRA, A.R.; BOARI, A.J. Identificação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* através da técnica de PCR. *Fitopatologia Brasileira*, v. 26, n. 4, p. 737-740, 2001.
- HAJDUŠEK, O.; DITRICH, O.; ŠLAPETA, J. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, v.122, n. 3,p. 183-192, 2004.
- HARP, J.A.; GOFF, J.P. Strategies for the control of *Cryptosporidium parvum* infection in calves. *Journal of Dairy Science*, v. 81, n. 1, p. 289-294, 1998.
- HILL, A.; NALLY, P.; CHALMERS, R.M.; PRITCHARD, G.C.; GILES, M. Quantitative risk assessment for zoonotic transmission of *Cryptosporidium parvum* infection attributable to recreational use on farmland. *Zoonose and Public Health*, v. 58, n. 5, p. 323-333, 2011.
- HUANG, Q.; FU, W. Comparative analysis of the DNA staining efficiencies of different fluorescent dyes in preparative agarose gel electrophoresis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v. 43, n. 8, p. 841-842, 2005.
- HUANG, Q.; BAUM, L.; FU, W. Simple and practical staining of DNA with GelRed in agarose gel electrophoresis. *Clinical Laboratory*, v. 56, n. 3-4, p. 149-152, 2010.

HUBER, F.; BOMFIM, T.C.; GOMES, R.S. Comparação da eficiência da coloração pelo método da safranina a quente e da técnica de centrífugo-flutuação na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras fecais de animais domésticos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 13, n. 2, p. 81-84, 2004.

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

HUBER, F.; SILVA, S.; BOMFIM, T.C.B.; TEIXEIRA, K.R.S.; BELLO, A.R. Genotypic characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 150, n. 1-2, p. 65-74, 2007.

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

Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. *Anuário estatístico*. Brasília: IBGE, 2006. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 13 de julho de 2010.

Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. *Anuário estatístico*. Brasília: IBGE, 2009. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 13 de julho de 2010.

JEX, A.R.; GASSER, R.B.; Analysis of the genetic diversity within *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* from imported and autochthonous cases of human cryptosporidiosis by mutation scanning. *Electrophoresis*, v. 29, n. 20, p. 4119-4129, 2008.

KÁLMÁN, I.; DĂRĂBUȘ, G. Distribution of *Cryptosporidium* species, Genotypes and *C. parvum* subtypes in cattle in European countries. *Scientific Parasitology*, v.12, n. 1, p. 1-9, 2011.

KAR, S.; GAWLOWSKA, S.; DAUGSCHIES, A.; BANGOURA, B. Quantitative comparison of different purification and detection methods for *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Veterinary Parasitology*, v.177, n. 3-4, p. 366-370, 2011.

KESHAVARZ, A.; HAGHIGHI, A.; ATHARI, A.; KAZEMI, B.; ABADI, A.; MOJARAD, N. Prevalence and molecular characterization of bovine *Cryptosporidium* in Qazvin province, Iran. *Veterinary Parasitology*, v.160, n. 3-4, p. 316-318, 2009.

KHAN, S.M.; DEBNATH, C.; PRAMANIK, A.K.; XIAO, L.; NOZAKI, T.; GANGULY, S. Molecular characterization and assessment of zoonotic transmission of *Cryptosporidium* from dairy cattle in West Bengal, India. *Veterinary Parasitology*, v.171, n. 1-2, p. 41-47, 2010.

KVÁČ, M.; KOUBA, M.; VÍTOVEC, J.; Age-related and housing-dependence of *Cryptosporidium* infection of calves from dairy and beef herds in South Bohemia, Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, v.137, n. 3-4, p. 202-209, 2006.

KVÁČ, M.; ONDRÁČKOVÁ, Z.; KVĚTOŇOVÁ, D.; SAK, B.; VÍTOVEC, J. Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern

- multimammate mouse (*Mastomys coucha*). *Veterinary Parasitology*, v.143, n. 3-4, p. 229-233, 2007.
- KVÁČ, M.; HROMADOVÁ, N.; KVĚTOŇOVÁ, D.; ROST, M.; SAK, B. Molecular characterization of cryptosporidium spp. in pre-weaned dairy calves in Czech Republic: Absence of *C. ryanae* and management-associated distribution of *C. andersoni*, *C. bovis* and *C. parvum* subtypes. *Veterinary Parasitology*, v.177, n. 3-4, p. 378-382, 2011.
- LANGKJÆR, R.B.; VIGRE, H.; ENEMARK, H.L.; MADDOX-HYTTEL, C. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. *Parasitology*, v. 137, Pt. 3, p. 339-350, 2007.
- LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics*, v.23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.
- LEANDER, B.S.; CLOPTON, R.E.; KEELING, P.J. Phylogeny of gregarines (Apicomplexa) as inferred from small-subunit rDNA and β -tubulin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, Pt. 1, p. 345-354, 2003.
- LENG, X.; MOSIER, D.A.; OBERST, R.D. Simplified method for recovery and PCR detection of *Cryptosporidium* DNA from bovine feces. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 2, p. 643-647, 1996.
- LEONI, F.; AMAR, C.; NICHOLS, G.; PEDRAZA-DÍAZ, S.; MCLAUCHLIN, J. Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhea in England between 1985 and 2000. *Journal of Medical Microbiology*, v. 55, Pt. 6, p. 703-707, 2006.
- LINDSAY, D.S.; UPTON, S.J.; OWENS, D.S.; MORGAN, U.M.; MEAD, J.R.; BLAGBURN, B.L. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, v.47, n. 1, p. 91-95, 2000.
- LIU, A.; WANG, R.; LI, Y.; ZHANG, L.; SHU, J.; ZHANG, W.; FENG, Y.; XIAO, L.; LING, H. Prevalence and distribution of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Heilongjiang Province, China. *Parasitology Research*, v. 105, n. 3, p. 797-802, 2009.
- LUCENA, R.B.; PIEREZAN, F.; KOMMERS, G.D.; IRIGOYEN, L.F.; FIGHERA, R.A.; BARROS, C.S.L. Doenças de bovinos no Sul do Brasil: 6.706 casos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 30, n. 5, p. 428-434, 2010.
- MAGI, B.; CANOCCHI, V.; TORDINI, G.; CELLESI, C. BARBERI, A. *Cryptosporidium* infection: diagnostic techniques. *Parasitology Research*, v.98, n. 2, p. 150-152, 2006.
- MAIKAI, B.V.; UMOH, J.U.; KWAGA, J.K.; LAWAL, I.A.; MAIKAI, V.A.; CAMA, V.; XIAO, L. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in native breeds of cattle in Kaduna State, Nigeria. *Veterinary Parasitology*, v. 178, n. 3-4, p. 241-245, 2011.

MEIRELES, M.V. *Cryptosporidium* infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 19, n. 4, p. 197-204, 2010.

MEIRELES, M.V.; OLIVEIRA, F.P.; TEIXEIRA, W.F.P.; COELHO, W.M.D.; MENDES, L.C.N. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves from the state of São Paulo, Brazil. *Parasitology Research*, v. 109, n. 3, p. 949-951, 2011.

MENDONÇA, C.; ALMEIDA, A.; CASTRO, A.; DELGADO, M.L.; SOARES, S.; COSTA, J.M.C.; CANADA, N. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal. *Veterinary Parasitology*, v. 147, n. 1-2, p.47-50, 2007.

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, U.M.; XIAO, L.; MONIS, P.; SULAIMAN, I.; PAVLASEK, I.; BLAGBURN, B.; OLSON, M.; UOTON, S.J.; KHRAMTSOV, N.; LAL, A.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R.C.A. Molecular and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium muris* from various hosts. *Parasitology*, v. 120, Pt. 5, p. 457-464, 2000.

MORGAN-RYAN, U.M.; FALL, A.; WARD, L.A.; HIJJAWI, N.; SULAIMAN, I.; FAYER, R.; THOMPSON, R.C.A.; OLSON, M.; LAL, A.; XIAO, L. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 49, n.6, p. 433-440, 2002.

MORSE, T.D.; NICHOLS, R.A.B.; GRIMASON, A.M.; CAMPBELL, B.M.; TEMBO, K.C.; SMITH, H.V. Incidence of cryptosporidiosis species in paediatric patients in Malawi. *Epidemiology and Infection*, v. 135, n. 8, p. 1307-1315, 2007.

MUHID, A.; ROBERTSON, I.; NH, J.; RYAN, U. Prevalence of and management factors contributing to *Cryptosporidium* sp. infection in pre-weaned and post-weaned calves in Johor Malaysia. *Experimental Parasitology*, v. 127, n. 2, p. 534-538, 2011.

NAZEMALHOSSEINI-MOJARAD, E.; HAGHIGHI, A.; TAGHIPOUR, N.; KESHAVARZ, A.; MOHEBI, S.R.; ZALI, M.R.; XIAO, L. Subtype analysis of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* isolates from humans and cattle in Iran. *Veterinary Parasitology*, v. 179, n. 1-3, p. 250-252, 2011.

NG, J.; EASTWOOD, K.; DURRHEIM, D.; MASSEY, P.; WALKER, B.; ARMSON, A.; RYAN, U. Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* in rural New South Wales. *Experimental Parasitology*, v. 119, n. 1, p. 192-195, 2008.

NICHOLS, G. Epidemiology. In: FAYER, R.; XIAO, L. (Eds). *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. Florida: CRC Press, 2007. p. 79-118.

NYDAM, D.V.; MOHAMMED, H.O. Quantitative risk assessment of *Cryptosporidium* species infection in dairy calves. *Journal of Dairy Science*, v. 88, n. 11, p. 3932-3943, 2005.

ONDRÁČKOVÁ, Z.; KVÁC, M.; SAK, B; KVĚTOŇOVÁ, D.; ROST, M. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in South

Bohemia, the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, v. 165, n. 1-2 ,p. 141-144, 2009.

PANCIERA, R.J.; THOMASSEN, R.W.; GARNER, F.M. Cryptosporidial infection in a calf. *Veterinary Pathology*, v.8, p.479-484, 1971.

PENG, M.M.; MATOS, O.; GATEL, W.; DAS, P.; STANTIC-PAVLINIC, M.; BERN, C.; SULAIMAN, I.M.; GLABERMAN, S.; LAI, A.A.; XIAO, L. A comparison of *Cryptosporidium* subgenotypes from several geographic regions. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, Suplemento, p. 28S-31S, 2001.

PENG, M.M.; WILSON, M.L.; HOLLAND, R.E.; MESHNICK, S.R.; LAL, A.A.; XIAO, L. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in cattle in Michigan: implications for understanding the transmission dynamics. *Parasitology Research*, v. 90, n. 3, p. 175-180, 2003.

QUÍLEZ, J.; TORRES, E.; CHALMERS, R.M.; HADFIELD, S.J.; DEL CACHO, E.; SÁNCHEZ-ACEDO, C. *Cryptosporidium* genotypes and subtypes in lambs and goat kids in Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 19, p. 6026-6031, 2008.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A.C.M.; Extração de DNA de plantas: Soluções para problemas comumente encontrados. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, ano. 2, n. 9, p. 40-43, 1999. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio09/extracao.pdf>>. Acesso em: 20 de outubro de 2010.

RYAN, U.M.; BATH, C.; ROBERTSON, I.; READ, C.; ELLIOT, AILEEN, E.; MCINNES, L.; TRAUB, R.; BESIÉ, B. Sheep may not be an important zoonotic reservoir for *Cryptosporidium* and *Giardia* parasites. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 9, p. 4992-4997, 2005.

SAFETY REPORT OF GELRED AND GELGREEN. In: *Nucleic Acid Detection Technologies*. Biotium (Eds), 2008. Disponível em: <<http://www.biotium.com>>. Acesso em: 17 de dezembro de 2010.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. p.

SANTÍN, M.; TROUT, J.M.; XIAO, L.; ZHOU, L.; GREINER, E.; FAYER, R. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Veterinary Parasitology*, v. 122, n. 2, p. 103-117, 2004.

SANTÍN, M.; TROUT, J.M. Livestock. In: FAYER, R.; XIAO, L. (Eds). *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. Florida: CRC Press, 2007.p. 451-484.

SANTÍN, M.; TROUT, J.M.; FAYER, R. A longitudinal study of *Cryptosporidiosis* in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Veterinary Parasitology*, v. 155, n. 1-2 ,p. 15-23, 2008.

SEVÁ, A.P.; FUNADA, M.R.; SOUZA, S.O.; NAVA, A.; RICHTZENHAIN, L.J.; SOARES, R.M. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from domestic animals in a rural area surrounding Atlantic dry forest fragments

in Teodoro Sampaio municipality, state of São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 19, n. 4, p. 249-253.

SILVA, D.G.; SILVA, D.R.; SILVA, P.R.L.; CÍCERO, E.A.S.; FERRAZ, A.L.J.; LEMOS, M.V.F.; FAGLIARI, J.J. Avaliação da reação em cadeia da polimerase e do isolamento bacteriológico convencional na detecção de Salmonella Dublin em amostras de fezes de bezerros infectados experimentalmente. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 62, n. 3, p. 752-756, 2010.

SILVA-JUNIOR, F.A.; CARVALHO, A.H.O.; ROCHA, C.M.B.M.; GUIMARÃES, A.M. Fatores de risco associados à infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia duodenalis* em bovinos leiteiros na fase de cria e recria na mesorregião de Campos das Vertentes de Minas Gerais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 31, n. 8, p. 690-696, 2011.

SILVERLÅS, C.; NÄSLUND, K.; BJÖRKMAN, C.; MATTSSON, J.G. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from Swedish dairy cattle in relation to age, diarrhea and region. *Veterinary Parasitology*, v. 169, n. 3-4, p. 289-295, 2010a.

SILVERLÅS, C.; VERDIER, K.; EMANUELSON, U.; MATTSSON, J.G.; BJÖRKMAN, C. *Cryptosporidium* infection in herds with and without calf diarrheal problems. *Parasitology Research*, v. 107, n. 6, p. 1435-1444, 2010.

ŠLAPETA, J. Centenary of the genus *Cryptosporidium*: From morphological to molecular species identification. In: ORTEGA-PIERRES, M.G.; CACCIÒ, S.; FAYER, R.; MANK, T.; SMITH, H.; THOMPSON, R.C.A. (Eds). *Giardia and Cryptosporidium from molecules to disease*. Oxfordshire: CABI, 2009. p. 31-50.

SMITH, H. Diagnostics. In: FAYER, R.; XIAO, L. (Eds). *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. Florida: CRC Press, 2007. p. 173-208.

SMITH, R.P.; CHALMERS, R.M.; MUELLER-DOBLIES, D.; CLIFTON-HADLEY, F.A.; ELWIN, K.; WATKINS, J.; PAIBA, G.A.; HADFIELD, S.J.; GILES, M. Investigation of farms linked to human patients with cryptosporidiosis in England and Wales. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 94, n. 1-2, p. 9-17, 2010.

SOBA, B.; LOGAR, J. Genetic classification of *Cryptosporidium* isolates from humans and calves in Slovenia. *Parasitology*, v. 135, n. , p. 1263-1270, 2008.

STARKEY, S.R.; ZEIGLER, P.E.; WADE, S.E.; SCHAAF, S.L.; MOHAMMED, H.O. Factors associated with shedding of *Cryptosporidium parvum* versus *Cryptosporidium bovis* among dairy cattle in New York. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 229, n. 10, p. 1623-1626, 2006.

STOCKDALE, H.D.; SPENCER, J.A.; BLAGBURN, B.L. Prophylaxis and chemotherapy. In: FAYER, R.; XIAO, L. (Eds). *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. Florida: CRC Press, 2007. p. 255-288.

SULAIMAN, I.M.; HIRA, P.R.; ZHOU, L.; AL-ALI, F.M.; AL-SHELAHI, F.A.; SHWEIKI, H.M.; IQBAL, J.; KHALID, N.; XIAO, L. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 6, p. 2805-2809, 2005.

SZONYI, B.; KANG'ETHE, E.K.; MBAE, C.K.; KAKUNDI, E.M.; KAMWATI, S.K.; MOHAMMED, H.O. First report of *Cryptosporidium* deer-like genotype in Kenyan cattle. *Veterinary Parasitology*, v. 153, n. 1-2, p. 172-175, 2008.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. Mega 5: Molecular evolutionary genetics analyses using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

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

THOMPSON, H.P.; DOOLEY, J.S.G.; KENNY, J.; MCCOOY, M.; LOWERY, C.J.; MOORE, J.E.; XIAO, L. Genotypes and subtypes of *Cryptosporidium* spp. in neonatal calves in Northern Ireland. *Parasitology Research*, v. 100, n. 3, p. 619-624, 2007.

TYZZER, E.E. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 5, p.12-13, 1907.

TYZZER, E.E. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of common mouse. *Archives fur Protistenkunde*, v. 26, p. 394-412, 1912.

UPTON, S.J.; CURRENT, W.L. The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. *The Journal of Parasitology*, v. 71, n. 5, p. 625-629, 1985.

WIELINGA, P.R.; VRIES, A.; VAN DER GOOT, T.H.; MANK, T.; MARS, M.H.; KORTBEEK, L.M.; VAN DER GIESSEN, J.W.B. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in the Netherlands. *International Journal of Parasitology*, v. 38, n. 7, p. 809-817, 2008.

WANG, R.; ZHANG, L.; NING, C.; FENG, Y.; JIAN, F.; XIAO, L.; LU, B.; AI, W.; DONG, H. Multilocus phylogenetic analysis of *Cryptosporidium andersoni* (Apicomplexa) isolated from a bactrian camel (*Camelus bactrianus*) in China. *Parasitology Research*, v. 102, n. 5, p. 915-920, 2008.

WANG, R.; WANG, H.; SUN, Y.; ZHANG, L.; JIAN, F.; QI, M.; NING, C.; XIAO, L. Characteristics of *Cryptosporidium* transmission in preweaned dairy cattle in Henan, China. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 49, n. 3, p. 1077-1082, 2011a.

WANG, R.; MA, G.; ZHAO, J.; LU, Q.; WANG, H.; ZHANG, L.; JIAN, F.; NING, C.; XIAO, L. *Cryptosporidium andersoni* is the predominant species in post-weaned and adult dairy cattle in China. *Parasitology International*, v. 60, n. 1, p. 1-4, 2011b.

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. *American Society for Microbiology*, v. 65, n. 8, p. 3386-3391, 1999a.

XIAO, L.; ESCALANTE, L.; YANG, C.; SULAIMAN, I.; ESCALANTE, A.A.; MONTALI, R.J.; FAYER, R.; LAL, A. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium*

parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 4, p. 1578-1583, 1999b.

XIAO, L.; SINGH, A.; LIMOR, J.; GRACZYK, T.K.; GRADUS, S.; LAL, A. Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 3, p. 1097-1101, 2001.

XIAO, L.; RYAN, U.M. Molecular epidemiology. In: FAYER, R.; XIAO, L. (Eds). *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. Florida: CRC Press, 2007. p. 119-172.

XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International Journal for Parasitology*, v. 38, n. 11, p. 1239-1255, 2008.

XIAO, L.; FENG, Y. Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 52, n. 3, p. 309-323, 2008.

XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Experimental Parasitology*, v. 124, n. 1, p. 80-89, 2010.