

OCORRÊNCIA DE *CRYPTOSPORIDIUM SP.* EM PAVÃO (*PAVO CRISTATUS*), CALOPSITA (*NIMPHYCUS HOLLANDRICUS*) E AVESTRUZ (*STRUTHIO CAMELUS*). Rômulo Godik Antunes, Daniel Castendo Simões, Marcelo Vasconcelos Meireles-Interáreas-Medicina Veterinária-Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal – Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Campus de Araçatuba
Curso de Medicina Veterinária-FOA-UNESP

INTRODUÇÃO

Protozoários do gênero *Cryptosporidium* são parasitos que completam seu ciclo biológico na superfície de células epiteliais dos tratos gastrintestinal, respiratório e urinário de mamíferos, aves, répteis e peixes (CHERMETTE & BOUFASSA-OUZROUT, 1988).

Após o primeiro relato de TYZZER (1907), mais de 20 espécies do gênero *Cryptosporidium* foram descritas em várias espécies animais (LEVINE, 1984; CURRENT, 1985), incluindo 152 espécies de mamíferos (FAYER et al., 2000) e mais de 30 espécies de aves (MORGAN et al., 2001).

Apesar de não haver consenso para classificação definitiva das espécies do *Cryptosporidium*, através de experimentos utilizando-se transmissão cruzada entre espécies e, principalmente, técnicas de biologia molecular como genotipagem e estudos filogenéticos, alguns autores sugerem a existência de pelo menos quinze espécies: *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. canis*, *C. felis*, *C. hominis*, *C. muris*, *C. parvum*, *C. suis* e *C. wrairi* em mamíferos, *C. baileyi*, *C. galli* e *C. meleagridis* em aves, *C. saurophilum* e *C. serpentis* em répteis e *C. molnari* em peixes (MORGAN et al., 2002; THOMPSON, 2002; TZIPORI & WARD, 2002; LEAV et al., 2003; RYAN et al., 2003; SITJÁ-BOBADILLA & ALVAREZ-PELLITERO, 2003; MORGAN et al, 2004; XIAO et al. 2004).

Existe ainda a classificação desse parasito como genótipos adaptados a diversos hospedeiros. Esses genótipos, apesar de morfológicamente semelhantes a algumas espécies já classificadas, diferem dessas espécies na composição genética. Devido à ausência de dados relacionados a outras características biológicas desses isolados, ainda não foi possível sua classificação em nível de espécie (XIAO et al, 2002).

METODOLOGIA

As amostras foram coletadas de espécies de aves domésticas de regiões do Brasil sendo armazenadas em recipientes de plástico ou em microtubos tipo eppendorf em solução de bicromato de potássio 2,5%. Dois de fezes foram adicionados a um tubo de 15 ml para concentração e purificação de oocistos por centrífugo-flutuação em solução de Sheather .

Vinte microlitros do sedimento resultante do processo de purificação foram homogeneizados com 20 µl de água e examinados em microscopia óptica com objetiva de 20 x e 40 x.

As amostras positivas na microscopia foram transferidas para um tubo de 1,5 ml, lavadas por centrifugação com solução TE (10mM Tris-Cl, 1 mM EDTA) e congeladas a - 20° C para posterior extração de DNA genômico dos oocistos.

Para extração do DNA genômico os oocistos foram incubados em tampão composto por chelex 100 (Bio-rad), polivinilpirrolidona (PVP) e tampão TE, seguido-se a digestão alcalina dos oocistos e posterior extração com solução contendo isotiocianato de guanidina e triton X-100. Os oocistos foram recuperados através da adição de sílica e posterior eluição do DNA com água ultra-pura. Este método ainda está sendo aperfeiçoado e consiste em uma adaptação das técnicas descritas por MCLAUCHLIN et al. (2000), XIAO et al. (2004) e COUPE et al., (2005).

Para amplificação de fragmentos do gene da subunidade 18 S do RNA ribossômico foi utilizada a técnica de nested-PCR com os primers 5' TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG 3' e 5' CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA 3' para a reação primária (~1325 bp) e 5' GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG 3' e 5' AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A 3' para a reação secundária (826-840 bp) (XIAO et al., 2000). As amostras foram submetidas à desnaturação inicial do DNA a 94° C por 3 minutos, seguida de 34 ciclos, cada um consistindo em desnaturação a 94°C por 45 s, 45 s de anelamento a 50°C e 60 s de extensão a 72°C, com extensão final a 72°C por 7 min.

O fragmento resultante da reação secundária de PCR para o gene da subunidade 18 S do gene do RNA ribossômico, foi purificado utilizando-se o kit de purificação de DNA “GFX PCR DNA band purification” (Pharmacia®) e submetidos a sequenciamento utilizando-se o “ABI Prism® Dye Terminator Cycling Sequence kit” (Applied Biosystems). As reações de sequenciamento foram realizadas em duplicata e nas duas direções, utilizando-se os primers da reação secundária.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na microscopia foram observados no máximo três oocistos por lâmina. Os oocistos apresentavam-se com um brilho característico e de formato oval ou circular, contrastando contra um fundo verde.

A técnica de coloração negativa com verde malaquita tem apresentados resultados satisfatórios para detecção de um pequeno número de oocistos no exame direto. No entanto, a análise morfológica não permite a identificação precisa da espécie, e, além da imprecisão da análise morfológica de oocistos para determinação da espécie, vários genótipos ainda não classificados podem infectar aves, sendo então necessária a realização da técnica de PCR (XIAO et al., 2004).

Das amostras observadas através da técnica da coloração verde malaquita foi observada presença de oocistos de *Cryptosporidium* sp. em um pavão (*Pavo cristatus*), que através do análise genética através de sequenciamento foi classificado como o *Cryptosporidium galli*. Em uma calopsita (*Nymphicus hollandicus*), devido a pequena quantidade de oocistos presentes na amostra de fezes, ainda não foi possível a realização do sequenciamento. Na amostra de fezes de avestruz (*Struthio camelus*) a reação de PCR com posterior sequenciamento revelou que o isolado presente na amostra apresenta similaridade genética de 100% com o *Cryptosporidium* sp. genótipo avestruz GenBank DQ002929, DQ002930, e DQ002931.

Bolsa: FAPESP número do processo: 05/59173-5

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAREY, C.M.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Research*, v. 38, p. 818-862, 2004.
- CHERMETTE, R.; BOUFASSA-OUZROUT, S. *Cryptosporidiosis: a Cosmopolitan Disease in Animals and in Man*. 2. ed. Paris: OIE, 1988. 122p.
- CURRENT, W.L. Cryptosporidiosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 187, p. 1334-1338, 1985.
- ELLIOT, A.; MORGAN, U.M.; THOMPSON, R.C.A. Improved staining method for detecting *Cryptosporidium* oocysts in stools using malachite green. *J Gen Appl Microbiol.*, v. 45, p. 139-142, 1999.
- FAYER, R.; MORGAN, U.M.; UPTON, S.J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int. J. Parasitol.*, v. 30, p. 1305-1322, 2000.
- LEAV, B.A.; MACKAY, M.; WARD, H.D. *Cryptosporidium* species: new insights and old challenges. *Clin. Infect. Dis.*, v. 36, p. 906-913, 2003.
- LEVINE, N.D. Taxonomy and review of coccidia genus *Cryptosporidium* (Protozoa: Apicomplexa). *J. Protozool.*, v. 31, p. 94-98, 1984.
- MCLAUCHLIN, J.; AMAR, C.; PEDRAZA-DIAZ, S.; NICHOLS, G.L. Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. *J. Clin. Microbiol.*, v. 38, p. 3984-3990, 2000.
- MORGAN, U.M.; MONIS, P.T.; XIAO, L.; LIMOR, J.; SULAIMAN, I.; RAIDAL, S.; O'DONOGHUE, P.; GASSER, R.; MURRAY, A.; FAYER, R.; BLAGBURN, B.L.; LAL, A.A.; THOMPSON, R.C.A. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* from birds. *Int. J. Parasitol.*, v. 31, 289-296, 2001.
- MORGAN, U.M.; FALL, A.; WARD, L.; HIJAWI, N.; SULAIMAN, I.; FAYER, R.; THOMPSON, A.R.C.; OLSON, M.; LAL, A.; XIAO, L. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporididae) from Homo sapiens. *J. Eukaryotic. Microbiol.*, v. 49, p. 433-440, 2002.
- RYAN, U.M.; XIAO, L.; READ, C.; SULAIMAN, M.; MONIS, P.; LAL, A.A.; FAYER, R.; PAVLASEK, I. A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporididae) from birds. *J. Parasitolol.*, v. 89, p. 809-813, 2003.
- SRÉTER, T.; VARGA, I. Cryptosporidiosis in birds – a review. *Vet. Parasitol.*, v. 87, p. 261-279, 2000.
- SITJÀ-BOBADILLA, A.; ALVAREZ-PELLITLERO, P. Experimental transmission of *Cryptosporidium molnari* (Apicomplexa: Coccidia) to gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Parasitol. Res.*, v. 91, p. 209-214, 2003.
- THOMPSON, R.C.A. Presidential address: rediscovering parasites using molecular tools – towards

- revising the taxonomy of *Echinococcus*, *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Int. J. Parasitol.*, v. 32, p. 493-496, 2002.
- TYZZER, E.E. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 5, p. 12-13, 1907.
- TZIPORI, T.; WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection*. v. 4, p. 1047-1058, 2002.
- XIAO, L.; ALDERISIO, K.; LIMOR, J.; ROYER, M.; LAL, A.A. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. *Appl Environ Microbiol.*, v. 66, 5492-5498, 2000.
- XIAO, L.; SULAIMAN, I.M.; RYAN, U.M.; ZHOU, L.; ATWILL, E.R.; TISCHLER, M.L.; ZHANG, XIAO, L.; FAYER, R.; LAL, A.A. Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. *Int. J. Parasitol.*, v. 32, p. 1773-1785, 2002.
- XIAO, L.; RYAN, U.M.; GRACZYK, T.K.; LIMOR, J.; LI, L.; KOMBERT, M.; JUNGE, R.; SULAIMAN, M.; ZHOU, L.; ARROWOOD, M.J.; KOUDELA, B.; MODRÝ, D.; LAL, A.A. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in captive reptiles. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, p. 891-899, 2004.