

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

“Concordância entre a técnica parasitológica e nPCR na detecção *Cryptosporidium* spp. em amostras de fezes de bovinos leiteiros infectados naturalmente.”

Jaqueline Carias Barboza

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Ituiutaba - MG

Dezembro – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

“Concordância entre a técnica parasitológica e nPCR na detecção *Cryptosporidium* spp. em amostras de fezes de bovinos leiteiros infectados naturalmente.”

Jaqueline Carias Barboza

Karine Rezende de Oliveira

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Ituiutaba - MG

Dezembro – 2019

**Concordância entre a técnica parasitológica e nPCR na detecção *Cryptosporidium* spp.
em amostras de fezes de bovinos leiteiros infectados naturalmente**

Jaqueline Carias Barboza¹; Pâmela Aparecida Cândido²; Anderson de Oliveira Vieira²; Ana Letícia Silveira²; Márcia Benedita de Oliveira Silva²; Karine Rezende de Oliveira¹

Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Ponto, Universidade Federal de Uberlândia, Ituiutaba¹

Departamento de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba²

Resumo

A criptosporidíose é uma doença zoonótica causada por protozoários do gênero *Cryptosporidium*, sua transmissão é via fecal-oral através da disseminação de oocistos esporulados no ambiente, por hospedeiros infectados, contaminando água e alimentos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bovinos leiteiros de três fazendas diferentes. Os dados foram obtidos através da análise de amostras de fezes de bovinos que foram submetidas à técnica de Ziehl-Neelsen modificado e ao processo de purificação e extração de DNA através da Nested-PCR. De 344 amostras analisadas, pôde-se observar a positividade em 31,7% amostras pela técnica de ZNm. Destas amostras positivas, 28 foram submetidas a nPCR, das quais 20 (71,4%) foram positivas nesta técnica. Embora técnicas moleculares sejam mais sensíveis, apresentam limitações. A não amplificação de oito amostras pode ser consequência da presença de inibidores. As amostras positivas na nPCR foram guardadas para identificação da espécie em outro momento. A prevalência de *Cryptosporidium* em bovinos é de aproximadamente 1/3 da amostra estudada, o que pode provocar perdas econômicas importantes pela diminuição de produção de leite se medidas de controle, prevenção e tratamento não forem tomadas.

Palavras-chave: *Cryptosporidium*; Bovinos leiteiros; Prevalência.

Abstract

Cryptosporidiosis is a zoonanthroponic disease caused by protozoa of the genus *Cryptosporidium*, its transmission is via fecal-oral route through the spread of sporulated oocysts in the environment by infected hosts, contaminating water and food. This study aimed to evaluate the occurrence of *Cryptosporidium* spp. in fecal samples of dairy cattle from three different farms. The data were obtained through the analysis of cattle feces samples that were submitted to the modified Ziehl-Neelsen technique and to the process of purification and extraction of DNA through Nested-PCR. From 344 samples analyzed, it was possible to observe the positivity in 31.7% samples by the ZNm technique. Of these positive samples, 28 were submitted to nPCR, of which 20 (71.4%) were positive in this technique. Although molecular techniques are more sensitive, they have limitations. Failure to amplify eight samples may result from the presence of inhibitors. Positive nPCR samples were saved for species identification at another time. The prevalence of *Cryptosporidium* in cattle is approximately 1/3 of the studied sample, which can cause significant economic losses due to reduced milk production if control, prevention and treatment measures are not taken.

Keywords: *Cryptosporidium*; Dairy cattle; Prevalence.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
2. MATERIAL E MÉTODOS	8
2.1. Considerações éticas	8
2.2. População e área de estudo	8
2.3. Coleta de fezes	9
2.4. Pesquisa de oocistos	9
2.5. Extração de DNA	9
2.6. ‘ <i>Nested</i> ’ Reação em Cadeia da Polimerase	10
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
4. AGRDECIMENTOS	13
5. REFERÊNCIAS	13
ANEXO: (normas da revista)	21
APENDICE	34

INTRODUÇÃO

Cryptosporidium foi originalmente descrito em 1907 por Ernest Edward Tyzzer, no entanto, apenas em 1971, estudos veterinários direcionaram-se para este parasita, após os primeiros relatos de infecção em bovinos (PANCIERA et al., 1971; FAYER et al., 1990). O incentivo de estudos e o desenvolvimento de medidas de controle e prevenção da criptosporidíose ganhou ênfase no ano de 1993 em Milwaukee nos Estados Unidos, após um surto da doença veiculado pela água em que 403.000 pessoas foram afetadas. Dentre estas medidas destacou-se principalmente a remoção de protozoários em águas de abastecimento, sendo que os mesmos foram reconhecidos como uma ameaça para a saúde pública (MATOS et al., 2004; FRANCO, 2007).

O gênero *Cryptosporidium* é constituído por protozoários parasitas intracelulares obrigatórios, pertencentes ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoasida, Subclasse Coccidiasina, Ordem

Eucoccidiorida, Subordem Eimeriina e Família Cryptosporidiidae (LEVINE, 1988; FAYER, 2008). Atualmente são descritos 30 espécies e 61 genótipos descritos (SMITH & NICHOLS, 2010), que acometem diversas espécies como mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes (XIAO et al., 2004).

Todas as espécies do gênero são parasitas intracelulares obrigatórios, monoxênicos, e apresentam as fases assexuada e sexuada de reprodução no mesmo hospedeiro. Este parasita possui morfologia esférica de aproximadamente 3 a 8 µm de diâmetro, quatro esporozoítos haploides e parede de duas camadas altamente resistente (FAYER, 2008; USEPA, 2012).

A transmissão ocorre pela via fecal-oral através da disseminação de oocistos esporulados, sua forma infectante, por hospedeiros infectados e pela contaminação do ambiente, dos alimentos ou da água, principalmente por consequência das atividades agropecuárias

que são tão expressivas no mundo e a alta ineficiência dos serviços de coleta e tratamento de esgoto (SATO et al., 2013). Também podem ser ingeridos ou inalados (KOSEK et al., 2001).

O ciclo de vida desse parasita possui seis estágios de desenvolvimento: excitação dos oocistos, merogonia, gametogonia, fertilização, formação da parede dos oocistos e esporogonia (SMITH & ROSE, 1998). No decorrer destes estágios desde a ingestão até a eliminação de oocistos esporulados varia de dois a sete dias (PEREIRA et al., 2010) e a cada geração, o parasita pode se desenvolver e amadurecer entre 12 e 14 horas (FAYER, 1997).

Quando ocorre a infecção, o oocisto atinge o trato intestinal do organismo hospedeiro e se anexa às células epiteliais (ALLEN & FETTERER, 2002). Durante o processo de divisão, 80% dos oocistos de parede espessa são liberados nas fezes na forma esporulada (CACCIÒ & PUTIGNANI, 2014) e mostram alta

resistência às condições ambientais, sendo o único estágio exógeno. A taxa de produção de oocistos varia entre 2×10^6 a 2×10^8 g/fezes, dessa forma, a eliminação no ambiente potencializa uma disseminação importante desses protozoários (MCCUIN, 2003; ONGERTH, 2013). Cerca de 20% dos oocistos de parede fina, que se rompe facilmente, permanecem no hospedeiro e são responsáveis pela autoinfecção, liberando esporozoítos no tubo digestivo (XIAO; FAYER, 2008; SMITH et al., 2007).

Segundo Hunter & Thompson (2005) o alto potencial zoonótico desse parasita em animais selvagens e domésticos apresenta grande importância na avaliação da susceptibilidade a infecção entre seres humanos e outros animais.

A criptosporidíose, causa atrofia das vilosidades intestinais com consequente hipersecreção e síndrome da má absorção e má digestão, cujos principais sintomas são a gastroenterite, diarreia, síndromes gripais, mal-estar, dor abdominal, anorexia, náusea,

flatulência, vômitos, febre baixa e perda de massa. (ARGENZIO, 1985; CRITTENDEN & HARZA, 2005).

A primeira notificação brasileira de criptosporidíose em bovinos aconteceu em 1988, na cidade de Botucatu, no estado de São Paulo, quando um lote de 23 bezerros apresentou positividade para a presença de oocistos nas fezes (MODOLO et al., 1988). Esta doença é caracterizada por diarreia grave em bezerros com idades de 4 a 30 dias (FAYER et al., 1990), com picos de prevalência por volta de duas semanas de vida (PEREIRA, 2007), frequentemente é observada por contribuir com o comprometimento no desenvolvimento desses animais, e quando não tratada pode levar a um quadro de desidratação intensa e causar grandes perdas econômicas (FAYER et al., 1990; GARCIA; LIMA, 1993; ÇABALAR et al., 2001). A incidência em animais jovens é devido a imaturidade de seu sistema imunológico, associado à possibilidade de contaminação das mamas de suas mães (DELGADO et al., 2003) ou

ainda pelo contato com outros animais (NETA et al. 2010).

Tendo em vista a gravidade desta parasitose, diagnósticos parasitológicos precisos são extremamente importantes para o controle, prevenção e tratamento (RODRIGUES et al., 2016). Os métodos mais recomendados para o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. são os que permitem a identificação de oocistos nas fezes (ALMEIDA, 2006).

Segundo Sterling & Arrowood (1993) técnicas de concentração do material fecal, através da flutuação com a utilização de soluções saturadas de sacarose, sal ou sulfato de zinco, ou por sedimentação com formaldeído-éter e coloração ácidos-resistentes, como o Ziehl-Neelsen Modificado (ZNM) aumentam as chances de encontrar oocistos, principalmente em animais assintomáticos, comparados a animais sintomáticos. Além disso, as técnicas de flutuação e sedimentação apresentam facilidade de execução, geralmente de baixo custo

(O'DONOUGHUE, 1995) e eliminam a maioria dos detritos fecais e em algumas técnicas, apresentam o protozoário inalterado, facilitando sua identificação (DE CARLI, 1994). Porém, demandam intenso trabalho e significativa quantidade de oocistos para detecção positivas. (RAMIREZ & SREEVATSAN, 2006).

As técnicas de biologia molecular tornaram-se ferramentas de diagnóstico de diversos agentes infecciosos (CUNHA, 2019).

Segundo Ramirez & Sreevatsan (2006) a técnica para amplificação de DNA do tipo PCR demonstra maior sensibilidade e especificidade quando comparada as demais técnicas, a desvantagem é seu alto custo e a alta susceptibilidade a contaminação e inibidores que estão contidos nas fezes.

Mesmo com os avanços da indústria farmacêutica em busca de novos tratamentos para a criptosporidíose, não há nenhum tratamento de cura totalmente eficaz para esta doença. (ARMSON et al.

2003; HEIGES et al., 2006). Um dos responsáveis pela falta de eficácia de medicamentos comumente utilizados (BOWMAN, 2010), é a localização intracelular do *Cryptosporidium*.

O objetivo desta pesquisa é identificar a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bovinos leiteiros através das técnicas de Ziehl-Neelsen modificado (ZNm) e Reação em Cadeia da Polimerase 'PCR' tipo *Nested* (nPCR).

MATERIAIS E MÉTODOS

Considerações éticas

O presente trabalho foi submetido ao comitê de ética para a utilização de amostras fecais de animais em outubro de 2019, sob o processo nº 23085.007.384/2019-12.

População e área de estudo

Foram utilizadas cerca de sete gramas de amostras fecais de bovinos leiteiros, sendo provenientes de três fazendas diferentes situadas em Minas

Gerais, região sudeste do Brasil. Dessas amostras, 332 foram coletadas de indivíduos recém-nascidos e 12 de indivíduos adultos. O número de animais por fazenda foi diverso, sendo 172 com maior número e 45 com menor.

Coleta de fezes

A coleta foi realizada por funcionários das fazendas, que coletaram de 20 a 50 gramas de fezes diretamente do reto dos bovinos. As amostras foram separadas, identificadas com os dados do animal (número, data de coleta, curral, fazenda) e transportadas para o Laboratório de Coccídios no Departamento de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Essas amostras foram armazenadas com Dicromato de Potássio a 2,5% (proporção 1:1) e mantidas em temperatura de refrigeração a 6°C até serem analisadas, evitando assim a proliferação de fungos, aumentando a sua conservação e tornando a sua consistência mais pastosa.

Pesquisa de oocistos

As amostras de fezes foram submetidas ao método de Centrífugo-flutuação com Solução Saturada de Sacarose modificada (SHEATHER et al., 1923), considerado como padrão-ouro na detecção de oocistos, utilizada principalmente para flutuá-los e concentrá-los. Como podem ser de difícil visualização por métodos habituais de rotina, para estimar a quantidade de oocistos (em 100 campos) por lâmina, foi utilizada a técnica de coloração de Ziehl-Neelsen Modificado (HENRIKSEN & POHLENZ, 1981) segundo o protocolo de GARCIA & LIMA (1993). Para cada amostra, foram feitas de uma a duas lâminas, que foram coradas com o corante de Kinyoun a frio e Verde Malaquita a 5%. Após a etapa de coloração foi realizada a leitura de toda a lâmina em microscópio óptico utilizando objetiva de aumento em 100x/1.25 e óleo de imersão.

Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada em 28 amostras positivas pelo método parasitológico por apresentarem melhor

aspecto, maior quantidade de sedimento e riqueza de oocistos em comparação as outras amostras positivas por ZNM. Para a extração do DNA de *Cryptosporidium* spp. foi utilizado o Protocolo de Extração Kit MagaZorb® DNA Mini-Prep, que fornece uma técnica fácil, rápida e econômica para isolar o DNA com qualidade de PCR, como descrito pelo fabricante (Promega, USA).

Reação em Cadeia de Polimerase 'PCR'

Para a detecção de DNA de *Cryptosporidium* spp. foi realizada uma *Nested* PCR. Na primeira reação foram utilizados os primers 18SX1F: 5' TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG 3' e 18SX1R: 5' CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA 3' que amplificaram um fragmento de 1325 pb da região hipervariável da subunidade menor (SSU) do gene 18S rRNA (Xiao et al, 1999; Xiao et al, 2000). A reação de amplificação foi realizada num volume final de 30 µl, contendo 2 nM de MgCl₂; 0,4 nM de dNTPs; 1X de tampão providenciado com a Taq Polymerase (Promega, USA); 0,2 µM de cada primer e 1U de GoTaq

Polimerase (Promega, USA) e 2 ng de DNA. A amplificação aconteceu nas seguintes condições: dissociação a 95°C por cinco minutos, seguido de 40 (dissociação a 95°C por um minuto, anelamento a 60°C por um minuto e extensão a 72°C por um minuto), extensão final a 72°C por cinco minutos.

Na segunda reação foram utilizados os primers 18SX2F: 5' GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG 3' e 18SX2R: 5' AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A 3' (XIAO et al, 1999) que amplificaram um fragmento de 819-825 pb. A reação foi realizada num volume final de 30 µl contendo 2 mM de MgCl₂; 0,4 mM de dNTPs; 1X de tampão providenciado com a Taq Polimerase; 0,2 µM de cada primer e 1 U de GoTaq Polimerase e 2 ng de DNA amplificado na primeira reação. A amplificação aconteceu nas seguintes condições: dissociação a 95°C por cinco minutos, seguido de 40 (dissociação a 95°C por um minuto, anelamento a 60°C por um

minuto e extensão a 72°C por um minuto), extensão final a 72°C por cinco minutos.

Após a amplificação foi realizada a eletroforese 100V em gel de poliacrilamida 6% e corado com nitrato de prata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a análise microscópica, as 344 lâminas coradas através da técnica de Ziehl-Neelsen modificado (ZNM) foram classificadas em positivas, negativas e inconclusivas. Os resultados obtidos por essa técnica mostraram que 109 (31,7%) das amostras foram positivas; 112 (32,6%) negativas e 123 (35,8%) inconclusivas, que serão necessárias refazer. A prevalência foi de 29,36% independentemente da técnica, sendo esta porcentagem superior às descritas por Feitosa et al. (2004); Garcia e Lima (1994) e Mtambo et al. (1997), porém, inferiores as descritas por Ortolani (1988). A criptosporidíose em bovinos tem sido encontrada em todo o mundo e estudos tem mostrado uma ampla variação na

prevalência (MALDONADO-CAMARGO et al., 1998).

As amostras que foram categorizadas como ‘inconclusivas’ não apresentaram condições de observação nem micro e nem macroscopicamente, impossibilitando a visualização de oocistos nas lâminas. As amostras positivas apresentaram um ou mais oocistos. As negativas não apresentaram nenhum vestígio de oocisto.

Os resultados obtidos pela técnica de *Nested* PCR, mostram que o fragmento de 827 pb, característico de *Cryptosporidium* spp., ocorreu em 20/28 (18,3%) amostras testadas, contra 8 (7,3%) negativas. Representadas na figura 1A, 2B e 3C. As 81 (74,3%) amostras positivas por ZNM restantes não foram amplificadas.

As amostras que foram negativas pela nPCR podem implicar em resultados falso-positivos pela microscopia ou degradação do DNA ou RNA durante a extração ou até conter resquícios de inibidores fecais, que podem interferir

principalmente na interação DNA-DNA Polimerase, reduzindo muito a sensibilidade da reação (JOHNSON et al., 1995), sendo recomendável a adição de agentes antioxidantes, como a BSA (albumina de soro bovino), ao tampão de extração por aumentar a especificidade da PCR e facilitar a amplificação de sequências de DNA ricas em G e C, como o *Cryptosporidium* spp. (FUNADA, 2009; CARVALHO-ALMEIDA, 2005).

A ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. por fazenda através das técnicas de Ziehl-Neelsen e nPCR pode ser observada na Tabela 1.

As técnicas utilizadas apresentaram especificidade de 52,40% e sensibilidade de 47,41%, sendo a especificidade maior que a sensibilidade (Tabela 2). A prevalência estimada foi de 45,70%, o que se assemelha aos resultados descritos por Meireles (2010); Brook et al. (2008) e Ortolani (1988).

Quando comparados, a técnica de *Nested*-PCR apresenta maior sensibilidade

(71,6%) em relação a técnica de Ziehl-Neelsen modificado (31,6%), mostrando que estudos comparativos entre diferentes técnicas são necessários para garantir que seja utilizada a melhor (padrão-ouro) na detecção de oocistos nas fezes (FUNADA, 2009).

Embora neste trabalho não tenha sido realizada a caracterização molecular, o que impossibilitou na identificação da fonte de infecção e responsáveis pela contaminação dos animais, sua realização é recomendável devido a variação genética do *Cryptosporidium*.

Pode-se concluir que as técnicas utilizadas neste trabalho possuem vantagens e desvantagens. A técnica de Ziehl-Neelsen apesar de seu baixo custo, fácil metodologia e execução, e bom contraste, é uma técnica que demanda trabalho e requer a presença de grande quantidade de oocistos para evitar assim resultados falso-positivos (RAMIREZ & SREEVATSAN, 2006). A técnica de *Nested*-PCR apresenta vantagem na sensibilidade, especificidade e

genotipagem. Sua desvantagem, porém, é o alto custo, a alta susceptibilidade a contaminação e a presença de inibidores nas fezes.

Entretanto, a técnica de nPCR apresenta melhor desempenho do que a técnica de Ziehl-Neelsen modificado por apresentar alta sensibilidade diagnóstica, alta especificidade e maior eficiência na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp., sendo está de extrema importância tanto na detecção quanto na epidemiologia deste parasita.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Coccídios e a todos os colaboradores deste trabalho.

REFERÊNCIAS

ALLEN, P. C.; FETTERER, R. H. Recent Advances in Biology and Immunobiology of *Eimeria* Species and Diagnosis and Control of Infection with these Coccidian Parasites of Poultry. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 58-65, 2002.

ALMEIDA, A. J. D. S. Diagnóstico e fatores de risco da criptosporidiose bovina na microrregião de Campos dos Goytacazes-RJ, e identificação de *Cryptosporidium parvum* através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Tese de Doutorado, Campos dos Goytacazes. Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2006.

ARGENZIO, R. A. Pathophysiology of neonatal calf diarrhea. The Veterinary Clinics of North America. **Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 1, n. 3, p. 461-469, 1985.

ARMSON, A. et al. A review of chemotherapeutic approaches to the treatment of cryptosporidiosis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v.1, n. 2, p. 297-305. 2003.

BOWMAN, D. D. Parasitologia Veterinária de Georgis. **Saunders Elsevier**, Rio de Janeiro, p. 432. 2010.

BRETERNITZ, B. S. Ocorrência e identificação de *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras de água superficial destinada ao abastecimento público do estado de São Paulo. Tese de Doutorado, São Paulo. Universidade de São Paulo; 2018. Disponível em: <<https://teses.usp.br/teses/disponiveis/6/6143/tde-23042018-131236/publico/BrunaSuellenBreternitzREVISADA.pdf>>.

BROOK, E. J. et al. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in fresh and frozen cattle faeces: comparison of three methods. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 26-31, 2008.

ÇABALAR, M. et al. Prevalence of rotavirus, *Escherichia coli* K99 and O157:H7 in healthy dairy cattle herds in Van, Turkey. **TURKEY Journal of Veterinary and Animal Science**, v. 25, n. 2, p. 191-196, 2001.

CACCIÒ, S. M.; PUTTIGNANI, L. Epidemiology of human *Cryptosporidiosis* in CACCIÒ, S. M.; WIDMER, G. (Ed.), 2014. *Cryptosporidium: parasite and disease*. **Springer Science & Business Media**, 2013.

CARVALHO-ALMEIDA, T. T. Padronização e avaliação de métodos moleculares para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* sp. (Apicomplexa: *Cryptosporidiidae*) em amostras fecais: extração de DNA genômico e PCR (reação em cadeia pela polimerase. **Revista do Instituto Adolfo Lutz** (Impresso), v. 64, n. 1, p. 145-145, 2005.

CRITTENDEN, J. C.; HARZA, B. M. W. Water treatment: principles and design. 2ª Edição, **John Wiley & Sons**, Inc. 1948 p., 2005.

CUNHA, F. S. et al. New insights into the detection and molecular characterization of *Cryptosporidium* with emphasis in

Brazilian studies: a review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 61, 2019.

DE CARLI, G. A. Diagnóstico laboratorial das parasitoses humanas: métodos e técnicas. 1 ed. Rio de Janeiro: **Medsa**, p. 313, 1994.

DELGADO, E. et al. Cryptosporidium spp. in ruminants at the Lisbon Zoo. **Journal of Zoo Wildlife Medicine**, v. 34, p. 352-357, 2003.

DIAS, V. F. et al. Positividade de Cryptosporidium spp. em cascavéis da espécie Crotalus durissus collilineatus (Serpentes, Viperidae) pertencentes ao Setor de Répteis da Universidade Federal de Uberlândia. 2018. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/23084/5/PositividadeCryptosporidiumSerpentes.pdf>>.

FAYER, R. et al. General biology of Cryptosporidium. In: DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; FAYER, R. (Ed.) Cryptosporidiosis of man and animals. Boca Raton: CRC Press, p. 1-29, 1990.

FAYER, R. et al. Potential Role of the Eastern Oyster, Crassostrea virginica, in the Epidemiology of Cryptosporidium parvum. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 2086-2088, 1997.

FAYER, R. General Biology. In: FAYER, R.; XIAO, L. Cryptosporidium and Cryptosporidiosis. Boca Raton: CRC; p. 1-42, 2008.

FEITOSA, F. L. F. et al. Prevalência de criptosporidiose em bezerros na região de Araçatuba, Estado de São Paulo, Brasil, **Ciência Rural**, v. 34, n.1, p. 189-193, 2004.
FRANCO, R. M. B. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em saúde pública. **Revista Panamericana de**

Infectologia, São Paulo, v. 9, n. 4, p. 36-43, 2007.

FUNADA, M. R. Avaliação de métodos de extração de DNA de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais e comparação de nested PCR com o método coproparasitológico de centrífugo-flutuação em sacarose. Tese de Doutorado, São Paulo. Universidade de São Paulo; 2009.

GARCIA, A. M.; LIMA, J. D. Frequência de *Cryptosporidium* em bezerros lactentes de rebanhos leiteiros de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 45, n. 2, p. 193-198, 1993.

GARCIA, A. M.; LIMA, J. D. Prevalência de *Cryptosporidium* spp. em rebanhos leiteiros de Pará de Minas (MG) e sua relação com práticas de manejo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 3, n. 1, p. 23-28, 1994.

GUIMARÃES, L. B. et al. Comportamento da excreção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e de cistos de *Giardia* spp. em bezerros infectados naturalmente. In: **Ciência Animal Brasileira** – Suplemento 1 – Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria, p. 660-665, 2009.

HALOCUR. MSD-Saúde Animal. Disponível em: <https://www.msd-animal-health.pt/Binaries/Halocur_tcm61-162304.pdf> Acesso em: 3 de dezembro de 2019.

HEIGES, M. et al. CryptoDB: a *Cryptosporidium* bioinformatics resource update. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. suppl_1, p. 419-422, 2006.

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

HOMEM, C. G. Identificação do gênero e espécies de *Cryptosporidium* em cães e gatos. 2016. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/144981>>.

HUNTER, P. R.; THOMPSON, R. C. A. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 144-12, p. 1181-1190, 2005.

JOHNSON, D. W. et al. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 11, p. 3849-3855, 1995.

KOSEK, M. et al. Cryptosporidiosis: an update. **The Lancet infectious diseases**, v. 1, n. 1, p. 262-269, 2001.

LEVINE, N. The Protozoan Phylum Apicomplexa. Volume 1. **Chemical**

Rubber Company press. Inc., Boca Raton, Florida, 35(4), 518–520. 1988.

MADRID, D. M. C. et al. Emergência da criptosporidiose e impactos na saúde humana e animal. 2015.

MALDONADO-CAMARGO, S. et al. Prevalence of and risk factors for shedding of *Cryptosporidium parvum* in Holstein Freisian dairy calves in central Mexico. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 36, n. 2, p. 95-107, 1998.

MATOS, O. et al. *Cryptosporidium felis* and *C. meleagridis* in persons with HIV, Portugal. **Emerging and Infectious Diseases**, v. 10, p. 2256, 2004.

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.

MODOLO, J.R. et al. Ocorrência de criptosporidiose em bezerros na região de Botucatu/SP. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 10, n. 1, p. 9-10, 1988.

MTAMBO, M. M. A. et al. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in cattle and wildlife in Morogoro region, Tanzania. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 31, n. 3-4, p. 185-190, 1997.

MCCUIN, R. M.; CLANCY, J. L. Modifications to United States Environmental Protection Agency methods 1622 and 1623 for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 267-274, 2003.

NETA, E. S. M. et al. Comparação das técnicas de Ziehl-Neelsen modificada e contraste de fase na detecção de oocistos do gênero *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em

bovinos assintomáticos. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 32, n. 4, p. 201-204, 2010.

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

ONGERTH, J. E. The concentration of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water - The role and importance of recovery efficiency. **Water Research**, v. 47, p. 2479-2488, 2013.

ORTOLANI, E. L. Padronização da técnica de Ziehl-Neelsen para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium*: estudo de alguns aspectos epidemiológicos de criptosporidiose em bezerros de rebanhos leiteiros no Estado de São Paulo. Tese de Doutorado em Ciências – Parasitologia, São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 1988.

PEREIRA, J. T. et al. C. *Cryptosporidium* spp.: Para controlar é necessário conhecer **Revista Saúde e Ambiente**, v. 10, n. 2, p. 13-25, 2010.

PEREIRA, J. T., Métodos de desinfecção em água contendo *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa: *Cryptosporidiidae*) e sua detecção por técnica de biologia molecular. 92 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia, Patologia) - Setores de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

QUEIROZ, D. K. S. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em cães da área metropolitana de Belém, Pará. Tese de Doutorado. UFPA, 2012.

RAMIREZ, N. E.; SREEVATSAN, S. Development of a sensitive detection system for *Cryptosporidium* in environmental samples. **Veterinary**

Parasitology, v. 136, n. 3-4, p. 201-213, 2006.

RODRIGUES, R. D. et al. Comparação da eficiência das colorações de Ziehl-Neelsen Modificado e Safranina Modificada na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Eucoccidiorida, *Cryptosporidiidae*) A partir de amostras fecais de bezerros de 0 a 3 meses. **Ciência Animal Brasileira**, v. 17, n. 1, p. 119-125, 2016.

SATO, M. I. Z. et al. Assessing the infection risk of *Giardia* and *Cryptosporidium* in public drinking water delivered by surface water systems in Sao Paulo State, Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 442, p. 389-396, 2013.

SHEATHER, A. L. et al. The Detection of Intestinal Protozoa and Mange Parasites by a Floatation Technique. **Journal of Pathology and Therapy**, v. 36, n. pt. 4, 1923.

SMITH, H. V. et al. Cryptosporidium and Giardia as foodborne zoonoses. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 1-2, p. 29-40, 2007.

SMITH, H. V.; NICHOLS, R. A. B. Cryptosporidium: Detection in water and food. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 61–79, 2010.

SMITH, H. V.; ROSE, J. B. Waterborne Cryptosporidiosis: current status. **Parasitology Today**, v. 14, n. 1, p.14-22, 1998.

STERLING, C. R.; ARROWOOD, M.J. Cryptosporidia. In: Parasitic Protozoa, 2^a ed. San Diego: Academic Press, v. 6, p. 159-225, 1993.

USEPA, United States Environmental Protection Agency. Method 1623.1: Cryptosporidium and Giardia in Water by Filtration/IMS/FA. Office of Water (MS-140) EPA 816-R-12-001, 2012.

XIAO, L. et al. Genetic diversity within Cryptosporidium parvum and related Cryptosporidium species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3386-3391, 1999.

XIAO, L. et al. Cryptosporidium taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 1, p. 72-97, 2004.

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.

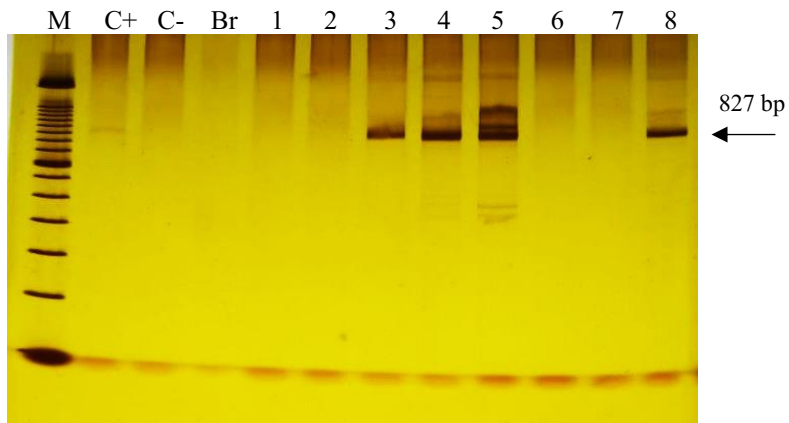
ANEXOS

Tabela 1: Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. pela técnica de Ziehl-Neelsen Modificado e pela técnica de *Nested* PCR, em amostras fecais de bovinos leiteiros infectados naturalmente.

Técnicas							
Ziehl-Neelsen Modificado					PCR		
Fazenda	Positivo	Negativo	Refazer	Total	Positivo	Negativo	Total
Fazenda 1	84	58	30	172	8	1	9
Fazenda 2	10	20	15	45	7	2	9
Fazenda 3	15	34	78	127	5	5	10
TOTAL	109	112	123	344	20	8	28

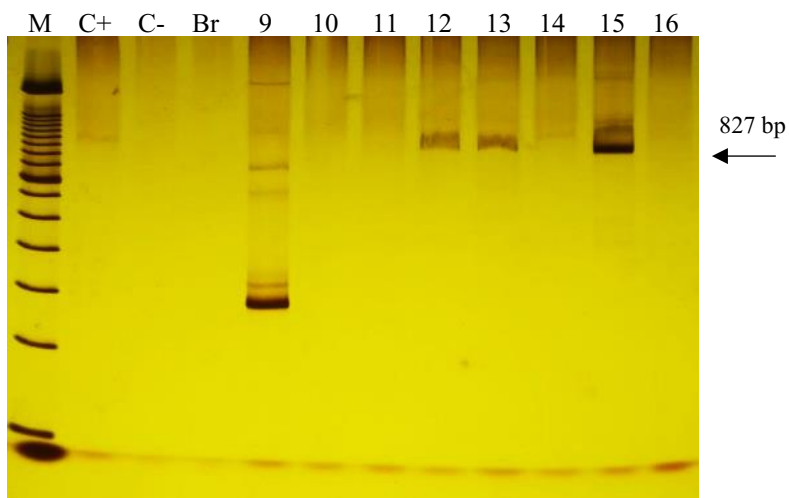
Tabela 2: Valores da sensibilidade e especificidade das técnicas de Ziehl-Neelsen e *Nested* PCR na ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bovinos leiteiros infectados naturalmente.

Técnica	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Ziehl-Neelsen modificado	47,41	52,40
<i>Nested</i> -PCR		



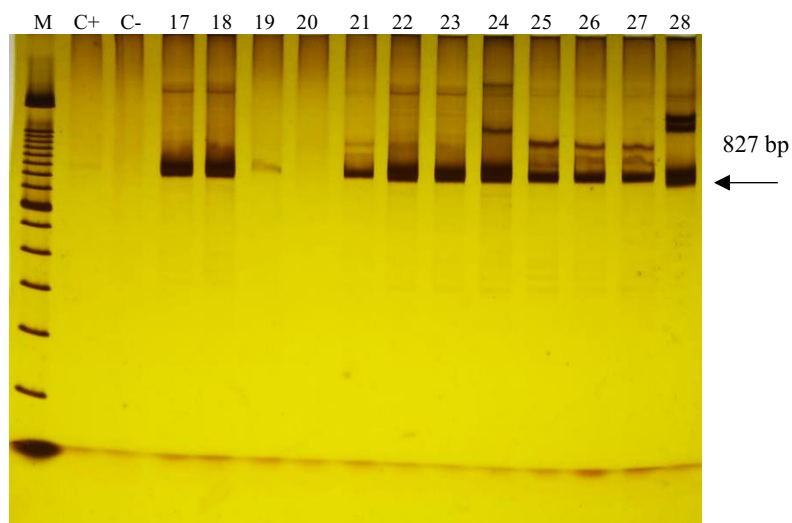
(1A)

Figura 1A: Gel de Poliacrilamida corado com nitrato de prata. A seta indica o fragmento de 827 pb específico de *Cryptosporidium* spp. (M) marcador de peso molecular Ladder (Invitrogen®) 100 pb; (C+) controle positivo; (C-) controle negativo; (Br) H₂O; N° das amostras. Sendo 3, 4, 5 e 8 positivas.



(2B)

Figura 2B: Gel de Poliacrilamida corado com nitrato de prata. A seta indica o fragmento de 827 pb específico de *Cryptosporidium* spp. (M) marcador de peso molecular Ladder (Invitrogen®) 100 pb; (C+) controle positivo; (C-) controle negativo; (Br) H₂O; N° das amostras. Sendo 9, 12, 13, 14 e 15 positivas.



(3C)

Figura 3C: Gel de Poliacrilamida corado com nitrato de prata. A seta indica o fragmento de 827 pb específico de *Cryptosporidium* spp. (M) marcador de peso molecular Ladder (Invitrogen®) 100 pb; (C+) controle positivo; (C-) controle negativo; (Br) H₂O; N° das amostras. Sendo 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 e 28 positivas.

Normas da Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

“BRAZILIAN JOURNAL OF VETERINARY PARASITOLOGY”

REVISTA BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA

APRESENTAÇÃO

A Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária é um órgão oficial de divulgação do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária (CBPV). Tem como objetivo publicar temas relativos a Helmintos, Protozoários, Artrópodes e agentes transmitidos por Artrópodes, bem como assuntos correlatos. A revista tem periodicidade trimestral. São aceitas submissões de manuscritos, em inglês, de pesquisadores de qualquer país, associados ou não ao CBPV. Este periódico oferece a todos os pesquisadores acesso eletrônico livre para consulta de todos os trabalhos, desde seu primeiro volume publicado em 1992.

POLÍTICA EDITORIAL

Os artigos submetidos à Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária deverão caracterizar-se como científicos e originais, essencialmente sobre parasitas de animais em geral.

A RBPV atribui a seus artigos as categorias de:

Artigo Original: deve relatar dados de pesquisa original, não tendo sido publicado em nenhum outro periódico.

Comunicação Científica: para essa categoria, o artigo submetido só será aceito desde que possua alto grau de ineditismo e originalidade, trazendo resultados novos de importância evidente, atribuindo ao Editor-chefe a continuidade da submissão ou não.

Artigo de Revisão: condicionado a submissão e a solicitação por convite do editor-chefe. Revisões não solicitadas serão avaliadas pelo editor-chefe ou editores científicos assistentes, desde que sejam escritas por pesquisadores especialistas no tópico escolhido.

Submissão de trabalhos:

A submissão de trabalhos na RBPV é online pelo sistema ScholarOne (<https://mc04.manuscriptcentral.com/rbpv-scielo>). O autor correspondente deve fornecer um ID ORCID (Open Researcher and Contributor ID, <http://orcid.org/>) no momento da submissão inserindo-o no perfil do usuário no sistema de submissão. Recomendamos que seja feito o mesmo para os coautores.

O(s) autor(res) deverá(ão) anexar uma carta, responsabilizando-se por todo o processo de tramitação e originalidade do artigo, salvo resumo(s) apresentado(s) em eventos científicos, não submetidos à publicação em outros periódicos. Trabalhos com número excessivo de autores deverão ser avaliados pelos editores científicos assistentes, em relação ao protocolo experimental. É necessária a colaboração substancial de todos os autores no planejamento do estudo, obtenção, análise e interpretação de resultados, confecção do artigo e aprovação da versão final submetida e aceita. Colaboradores que não tiveram participação ativa em todo o processo descrito acima poderão ser listados na seção de agradecimentos. Poderá haver agradecimento a pessoa ou instituição que forneceu auxílio técnico, sugestões, correção ou sugestão na escrita ou que de alguma forma colaborou para a elaboração do trabalho.

Junto ao trabalho submetido anexar o certificado de revisão de inglês, emitido por um dos revisores credenciados pela revista (<http://rbpv.org.br/guia-do-autor>). Os pesquisadores deverão assumir os custos da revisão. Caso um dos coautores seja estrangeiro nativo da língua inglesa, este deverá revisar o inglês do trabalho. O autor correspondente deverá enviar

correspondência para revista confirmando que essa revisão foi feita por um dos autores nativos da língua inglesa.

Processo de avaliação pelos pares

O processo de avaliação do trabalho dependerá da observância das Normas Editoriais, dos Pareceres do Corpo Editorial e/ou do Relator ad-hoc. Nesse processo, o editor-chefe e os editores científicos assistentes poderão sugerir ou solicitar as modificações necessárias, apesar de ser de responsabilidade dos autores os conceitos emitidos. Os artigos submetidos serão avaliados por, no mínimo, 2 revisores anônimos, selecionados pelo editor-chefe. Em caso de um parecer conflitante, o artigo será enviado a um terceiro revisor.

O relator deverá preencher o formulário de avaliação da RBPV, disponível no sistema on-line de submissão (<http://mc04.manuscriptcentral.com/rbpv-scielo>). Tendo recebido a avaliação de pelo menos 2 dos revisores selecionados, o(s) autor(es) receberá (ão) o formulário de avaliação e possíveis correções feitas diretamente no texto. Cabe aos autores responderem o questionamento ou correções sugeridos pelos revisores, individualmente. O avaliador poderá corrigir novamente o artigo, se necessário. Após o aceite pelos revisores ad-hocs, porém antes do aceite final, o artigo passará pela análise de um dos Editores Científicos Assistentes. Lembrando que, o Editor Científico Assistente possui autonomia para sugerir correções e/ou rejeitar a publicação do artigo, mesmo com a aprovação dos relatores. Ainda nesta etapa, caso necessário, o manuscrito é encaminhado a um dos revisores de métodos estatísticos da RBPV. Após diagramação e editoração, o editor-chefe faz as correções finais.

Transferência de direitos autorais:

Se o artigo for aceito, o (s) autor (es) transfere (m) os direitos autorais para o periódico. Em qualquer uso subsequente de partes do texto, figuras e tabelas, a Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária deve ser citada como fonte.

ÉTICA

Experimentos que utilizam animais deverão ser conduzidos obedecendo às normas aprovadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (<http://www.cobea.org.br>), devendo os autores apresentarem o número de protocolo de submissão e aprovação dos trabalhos em Comissão de Ética e Bem-Estar Animal. Para autores estrangeiros, experimentos com animal também são previstos no "International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals" emitido pelo "Council for the International Organizations of Medical Sciences" (<http://www.cobea.org.br>), devendo os autores apresentarem o número de protocolo de submissão e aprovação dos trabalhos.

APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO

Na elaboração do texto serão observadas as seguintes normas:

Os trabalhos devem ser submetidos em inglês, de forma concisa, com linguagem impessoal e com os sinais de chamadas de rodapé em números arábicos, lançados ao pé da página em que estiver o respectivo número e em ordem crescente. Os trabalhos deverão ser apresentados em formato Word, fonte "Times New Roman", tamanho 12, com margem superior e inferior de 2,5 cm, esquerda e direita com 3 cm e espaçamento entre linhas de 1,5 cm com as páginas numeradas. Os Artigos Originais devem ser organizados obedecendo à seguinte sequência: **Título Original (inglês), Título Traduzido (português), Título resumido (inglês), Autor(es), Filiação Institucional, Abstract (Keywords) (inglês), Resumo (Palavras-chave) (português), Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões (ou combinação destes três últimos), Agradecimentos (facultativo) e Referências Bibliográficas.** As tabelas e ilustrações deverão ser apresentadas separadas do texto e anexadas ao final do trabalho, sem legendas. As respectivas legendas deverão vir no texto logo após as referências bibliográficas. As Comunicações Breves obedecem à sequência acima sem a

necessidade de se destacar os tópicos, sendo escritas em texto corrido, e não devem exceder 6 páginas, quando da diagramação final.

Características dos elementos de um trabalho científico

Título Original/Título Traduzido

O título “cheio” e o subtítulo (se houver) não devem exceder 20 palavras. Não deverá aparecer nenhuma abreviatura, e os nomes de espécies ou palavras em latim deverão vir em itálico. Evitar (por exemplo) títulos que iniciem com: Estudos preliminares; Observações sobre. Não usar o nome do autor e data de citação em nomes científicos.

Autor(es)/Filiação Institucional

Na identificação, deve constar: nome completo e por extenso de todos os autores (sem abreviação), separados por ponto e vírgula. A Filiação Institucional deve informar os nomes próprios de todas as instituições e não suas traduções: Laboratório, Departamento, Faculdade ou Escola, Instituto, Universidade, Cidade, Estado e País, exatamente nessa ordem. No rodapé, deve constar as informações do autor para correspondência: Endereço completo, telefone, e-mail atualizado e ORCID, nessa ordem.

Abstract/ Resumo

Devem conter no máximo 400 palavras, em um só parágrafo sem deslocamento. Não devem conter citações bibliográficas. Siglas e abreviações de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso, por exemplo, Indirect Fluorescence Assay (IFA). Devem ser informativos, apresentando o objetivo do trabalho, metodologia sucinta, os resultados mais relevantes e a conclusão. O abstract

redigido em língua inglesa e o resumo em língua portuguesa, ambos seguidos por keywords e palavras-chave, respectivamente.

Keywords/ Palavras-chave

As palavras-chave devem expressar com precisão o conteúdo do trabalho. São limitadas em no máximo 6 (seis), e separadas por vírgula.

Introdução

Explicação clara e objetiva do estudo, da qual devem constar a relevância e objetivos do trabalho, restringindo as citações ao necessário.

Material e Métodos

Descrição concisa, sem omitir o essencial para a compreensão e reprodução do trabalho. Métodos e técnicas já estabelecidos devem ser apenas citados e referenciados. Métodos estatísticos devem ser explicados ao final dessa seção.

Resultados

O conteúdo deve ser informativo e não interpretativo: sempre que necessário devem ser acompanhados de tabelas, figuras ou outras ilustrações autoexplicativas.

Discussão

Deve ser limitada aos resultados obtidos no trabalho e o conteúdo deve ser interpretativo. Poderá ser apresentada como um elemento do texto ou juntamente aos resultados e conclusão. Enfatizar a importância de novos achados e novas hipóteses identificadas claramente com os resultados.

Conclusões

As conclusões podem estar inseridas na discussão ou em resultados e discussão, conforme a escolha dos autores. Nesse caso, esse item não será necessário.

Agradecimentos

Quando necessário, limitados ao indispensável.

Referências bibliográficas

Citações

As citações devem seguir o sistema autor-data:

Um autor: nome do autor e ano de publicação

Levine (1985) ou (LEVINE, 1985)

Dois autores: os nomes dos autores e ano da publicação Paim e Souza (2011) ou (PAIM & SOUZA, 2011)

Três ou mais autores: nome do primeiro autor seguido de "et al." e o ano de publicação

Araújo et al. (2002) ou (ARAÚJO et al., 2002)

Só serão admitidas referências de fácil acesso aos leitores. Referências de difícil acesso poderão ser solicitadas aos autores, e em caso de não disponibilidade, deverão ser retiradas do texto. Não serão aceitas citações de trabalhos publicados em anais de congressos, e as teses devem estar disponíveis para consulta em sites oficiais, por exemplo, Banco de Teses da Capes: <http://www.capes.gov.br/servicos/banco-de-teses>. Todas as citações no texto devem ser cuidadosamente checadas em relação aos nomes dos autores e datas, exatamente como aparecem nas referências. Apresentar a lista de referências em ordem alfabética e, se necessário, em ordem cronológica. Mais de uma referência do(s) mesmo(s) autor(es) no mesmo ano deve

ser identificada pelas letras "a", "b", "c", etc., inseridas após o ano de publicação. Títulos de periódicos devem ser abreviados conforme Index Medicus - <http://www2.bg.am.poznan.pl/czasopisma/medicus.php?lang=eng>. Para referências com 6 ou mais autores, apresentar os seis primeiros nomes seguidos da expressão et al.:

Livros

Levine JD. Veterinary protozoology. Ames: ISU Press; 1985.

Capítulo de livro

Menzies PI. Abortion in sheep: diagnosis and control. In: Youngquist RS, Threlfall WR. Current therapy in large animal theriogenology. 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 2007. p. 667-680.

Artigo de periódico

Munhoz AD, Simões IGPC, Calazans APF, Macedo LS, Cruz RDS, Lacerda LC, et al. Hemotropic mycoplasmas in naturally infected cats in Northeastern Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 2018; 27(4): 446-454. <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-296120180074>

Tese e Dissertação

Araujo MM. Aspectos ecológicos dos helmintos gastrintestinais de caprinos do município de patos, Paraíba - Brasil [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2002.

Documento eletrônico

Centers for Disease Control and Prevention. Epi Info [online]. 2002 [cited 2003 Jan 10]. Available from: <http://www.cdc.gov/epiinfo/ei2002.htm>.

Tabelas

Elaboradas apenas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e no final. A legenda (título) é precedida da palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismos arábicos,

devendo ser descritivas, concisas e inseridas acima das mesmas. As tabelas devem estar limitadas a um número mínimo necessário.

Figuras

As figuras, tais como: desenho, fotografia, prancha, gráfico, fluxograma e esquema, devem ser enviadas em formato .tif, .eps ou .pdf, com no mínimo de 300 dpi de resolução e numeradas consecutivamente. Só serão admitidas figuras de alta qualidade. As legendas devem ser precedidas da palavra Figura, seguida da numeração em algarismo arábico e inseridas abaixo das mesmas. Listar as legendas numeradas com os respectivos símbolos e convenções, em folha separada em espaço duplo. Fotografias digitais deverão ser enviadas em arquivos separados, como foram obtidas. Se a escala for dada às figuras, utilizar a escala BAR em todas as ilustrações ao invés de numérica, que pode ser alterada com a redução das figuras.

Prova Gráfica

O trabalho diagramado em formato pdf., será enviado por e-mail ao autor correspondente. Alterações no artigo, quando aceitos para publicação, devem ser realizadas nesse estágio, com permissão do editor-chefe. Portanto, o trabalho deve ser cuidadosamente corrigido antes de responder ao editor, pois inclusões de correções subsequentes (indicação de novo autor, mudança de parágrafos inteiros ou tabelas) não podem ser garantidas.

Taxa de publicação:

Após o aceite do artigo, será cobrada as seguintes taxas de publicação:

R\$ 500,00 (associados do CBPV em dia com as anuidades);

R\$ 1.000,00 (não-associados do CBPV).

US\$ 300,00 (autores estrangeiros)

Dados bancários para depósito:

Nome: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária/ Revista

Banco do Brasil (001)

Agência: 0269-0

Conta Corrente: 28848-9

Para autores estrangeiros:

IBAN: BR46000000000002690000288489C1

SWIFT BRASBRRJSBO

Endereço: Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, Zona Rural. CEP: 14884-900.

Jaboticabal – SP, Brasil.

APENDICE

Método de Sedimentação por Centrifugo-flutuação (Sheather modificada, 1923):

A realização desse método consistiu em aplicar a proporção de 3 por 1, onde, em cada tubo Falcon de 15 ml, identificados igualmente aos tubos de 50 ml, foi colocado 7 ml da amostra. Em seguida, adicionou-se 3 ml de Éter (Solução Éter Alcoolizado 35%) totalizando 10 ml, que foram homogeneizados e colocados para centrifugar por 10 minutos a 1500 Rpm. Depois da centrifugação, os sobrenadantes foram desprezados. Junto ao sedimento restante, foi adicionado Solução Saturada de Sacarose (densidade de 1.235 a 1.500) até chegar a 15 ml. Foram homogeneizados em seguida. Novamente foram centrifugados por 10 minutos, porém a 3000 Rpm. Após a centrifugação, aos tubos, foi adicionado a mesma solução de sacarose até formar um menisco na borda. Aguardou-se por 10 a 15 minutos. Durante o tempo de espera algumas lâminas foram separadas, lavadas com álcool 70 (Álcool à 70%), secas e identificadas. Cada lâmina foi invertida sobre os tubos e deixadas de repouso por 10 a 15 minutos. Logo após o tempo de repouso, as lâminas foram colocadas sobre papel interfolha. Ao conteúdo de cada uma, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, foi pipetado uma gota do próprio sedimento (não centrifugado) e uma gota de sedimento negativo (amostra previamente analisada). O sedimento coletado do tubo facilita a fixação dos oocistos na lâmina. Com a própria pipeta realizou-se o esfregão. As lâminas com o esfregão fresco foram colocadas para secar. Após a secagem do esfregão em temperatura ambiente, adicionou-se Metanol (Álcool Metílico) para a sua fixação.

Coloração das amostras com Ziehl-Neelsen Modificado (Método de Henriksen & Pohlenz, 1981)

Após a fixação com metanol, foi pipetado individualmente gotas do corante Fucsina de Ziehl por 15 minutos, que foram enxaguadas em água corrente por alguns segundos até que todo o corante saísse. Em seguida, foram descoradas com Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) à 5% por

aproximadamente 3 minutos e enxaguadas em água corrente por alguns segundos. Logo depois foram contra coradas com Verde Malaquita (5%) por 2 minutos, enxaguadas e colocadas para secar. Após a etapa de coloração foi realizada a leitura dessas lâminas em microscópio óptico utilizando objetiva de aumento em 100x/1.25 e óleo de imersão.

Finalizada a visualização microscópica, os tubos Falcon com as amostras positivas foram enumeradas de 1 a 28 para a realização da lavagem e extração do DNA.

Procedimento para lavagem de amostras fecais

De cada amostra positiva foi coletado 5 ml e adicionado aos tubos Falcon de 15 ml identificados. Adicionou-se 7 ml de Solução Salina (Cloreto de Sódio 0,9%), totalizando 12 ml, que foram homogeneizados e centrifugados por 10 minutos a 3000 Rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado. Ao sedimento restante foi adicionado de 8 a 9 ml de solução salina até chegar a 10 ml, que foram homogeneizados. Centrifugados outra vez por 10 minutos a 3000 Rpm, o sobrenadante foi descartado após a centrifugação. Ao sedimento restante, novamente adicionou-se solução salina até a marca de 10 ml e os homogeneizou. Foram centrifugados igual ao passo anterior e descartado o sobrenadante.

Foi adicionado até 3 ml de solução salina ao sedimento restante para a sua ressuspensão, homogeneizados e guardados na geladeira.

Polymerase Chain Reaction 'PCR' (Reação em Cadeia da Polimerase)

Para a extração do DNA foi utilizado o Protocolo de Extração Kit MagaZorb® para Fezes e para a PCR, utilizou-se o Protocolo da PCR Reactions: gene 18S SSU rRNA Nested (nPCR) descrito por XIAO et al., 1999 e 2000.

Extração do DNA

Lise

Foram separados 32 tubos Eppendorfs de 2 ml, que foram enumerados de um a vinte e oito e feito dois controles positivos e dois controles negativos. Aos tubos, foram colocadas 0,3 g de Zircônia e 200 µl das amostras de fezes que estavam armazenadas. Após, adicionou-se 20 µl de proteinase (PK), em seguida, as amostras foram misturadas no vórtex em velocidade baixa por aproximadamente 15 segundos. Adicionou-se 200 µl de tampão de lise e foram misturadas no vórtex em velocidade baixa por 15 segundos novamente. Depois foram incubadas em banho maria a 56°C durante 10 minutos. Foram misturadas no vórtex, dessa vez, em velocidade máxima por 15 minutos. Foram incubadas em banho maria a 95°C por 10 minutos e vortexadas por mais 15 minutos. Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas a 10.000xg (10.444 Rpm) por 1 minuto. O sobrenadante foi transferido para outros Eppendorfs de 2 ml igualmente identificados.

Ligação

A cada tubo foi adicionado 500 µl de tampão de ligação e misturados no vórtex em velocidade baixa por 15 segundos. Adicionou-se 20 µl de reagente MagaZorb®, que foi homogeneizado vigorosamente no vórtex em alta velocidade. Todas as amostras também foram misturadas no vórtex, porém, em velocidade baixa por 15 segundos e incubadas em banho maria a 37°C por 10 minutos, sendo invertidas a cada 2 minutos. Os tubos foram secos por fora e colocados na estante magnética, sendo invertidos de 2 a 3 vezes sem tira-los da estante. Aguardou-se de 1 a 1 minuto e 30 segundos. Ainda na estante, o sobrenadante foi aspirado.

Lavagem

Adicionou-se 1000 µl de tampão de lavagem nas amostras. Em seguida, os tubos foram retirados da estante, invertidos algumas vezes e colocados na estante novamente. O sobrenadante foi aspirado e descartado. Foi repetido mais duas vezes essa etapa.

Eluição

Adicionou-se 100 µl de tampão de eluição. Os tubos foram misturados suavemente invertendo após serem retirados do ímã. Foram incubar a 37°C por 10 minutos, invertidos a cada 2 minutos e colocados novamente na estante. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 0,5 ml e identificado.

Foram feitas 4 alíquotas de 20 µl para cada amostra. Uma foi mantida a 4°C e as demais a 20°C.

Amplificação

As misturas para a reação foram feitas utilizando kit para amplificação de DNA *Cryptosporidium* spp. por Nested-PCR (Go TAQ Polimerase). Foi preparada uma primeira mistura, chamada de Mix 1, com as substâncias necessárias para o início da amplificação.

As reações foram feitas para um volume de 25 µl por tubo + 5 µl de cada amostra de DNA, sendo o volume final de 30 µl. A amplificação do DNA foi realizada em equipamento termociclador automático por cerca de 2 horas. O programa de amplificação utilizado foi: 94°C por 3:00 minutos, 94°C por 00:45 segundos, 55°C por 00:45 segundos, 72°C por 01:00 minuto, seguido de 35 ciclos de: 94°C por 00:45 segundos; 55°C por 00:45 segundos e 72° por 1:00 minuto, depois um ciclo 72°C por escrever o número quando for menor que 10 (7) minutos e uma extensão final de 4,0° por aproximadamente 15 minutos. Após a incubação, foi realizada a preparação da mistura final, para a amplificação, o Mix 2. As reações do Mix 2 foram feitas para um volume de 28 µl por tubo + 2 µl de cada amostra do Mix 1, sendo o volume final de 30 µl. A amplificação do DNA também foi realizada em equipamento termociclador automático por cerca de 2 horas. O programa de amplificação utilizado foi: 94°C por três minutos, 94°C por 00:45 segundos, 55°C por 00:45 segundos, 72°C por um minuto, seguido de 35 ciclos de: 94°C por 00:45 segundos; 55°C por 00:45 segundos e 72° por um minuto, depois um ciclo 72°C por sete minutos e uma extensão final de 4,0° por aproximadamente 15 minutos. A cada

conjunto de reações de PCR foi sempre incluído um controle negativo (sem DNA), um controle positivo (DNA purificado com amostra de fezes de um bezerro que foi previamente infectado) e um branco (água de injeção com os Mix1 e 2). Conforme pôde ser observado nas tabelas.

Tabela 3: Cálculo de substâncias para a realização do Mix 1.

PCR 1			
Reagentes	Concentração estoque	Concentração final	/por tubo
Tampão	10x	1x	6 µl
MgCl ₂	50 mM	2 mM	7,2 µl
dNTP	10 mM	0,4 mM	2,4 µl
Primer 18 X1F	10 µl	0,2 µM	0,2 µl
Primer 18 X1R	10 µl	0,2 mM	0,2 µl
GoTaq-polimerase	5 U/µl	1 U/µl	0,5 µl
H ₂ O	-	-	8,5 µl
Amostra DNA	-	-	5 µl
Total			30 µl

Tabela 4: Cálculo de substâncias para a realização do Mix 2.

PCR 2			
Reagentes	Concentração estoque	Concentração final	/por tubo
Tampão	10x	1x	6 µl
MgCl ₂	50 mM	2 mM	3,6 µl
dNTP	10 mM	0,4 mM	2,4 µl
Primer 18 X2F	10 µl	0,2 µM	0,2 µl
Primer 18 X2R	10 µl	0,2 mM	0,2 µl
GoTaq-polimerase	5 U/µl	1 U/µl	0,5 µl
H ₂ O	-	-	15,1 µl
Amostra DNA	-	-	2 µl
Total			30 µl

Eletrforese - Gel de Acrilamida a 6%

A solução de acrilamida (C₃H₅NO), polímero em forma de pó, foi suspenso em água deionizada. Depois de ser dissolvido completamente no tampão de corrida Solução Tris-Borato-

EDTA (TBE 10x), foi colocado em um molde entre duas placas de vidro orientado verticalmente, onde foram feitos pequenos poços com um 'pente' em uma de suas extremidades, esses poços são feitos para receberem os produtos da nPCR. Após o processo de polimerização, o gel foi colocado em uma cuba de eletroforese com dois eletrodos conectados em cada extremidade, sendo um com polo positivo (ânodo) e um com polo negativo (cátodo). A cuba foi coberta pelo tampão de corrida TBE 10x e aplicado a uma voltagem que variou entre 90 e 100 V.

Em cada banda (poços) foi adicionado 8 µl de cada amostra com nitrato de prata, em seguida, a aplicação da corrente elétrica na cuba por aproximadamente 75 minutos. Após a eletroforese, o gel foi imerso na Solução Fixadora sob um agitador, em velocidade lenta, por 15 minutos. Logo depois a solução foi aspirada. Em seguida, foi submerso em Solução de Nitrato de Prata e mantido sob agitação lenta por mais 15 minutos, a solução foi aspirada no final e o gel enxaguado com água destilada. Depois foi adicionada a Solução Reveladora até a visualização das bandas positivas.