

Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em animais exóticos de companhia no Brasil

[Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in exotic animals raised as pets in Brazil]

M.S. de Souza, B.R. Vieira, H.G. Riva, C.G. Homem, D.C. da Silva,
A.A. Nakamura, M.V. Meireles*

Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Estadual Paulista – Unesp – Araçatuba, SP

RESUMO

A infecção por algumas espécies ou genótipos de *Cryptosporidium* representa um risco em potencial para a saúde pública, principalmente por causa de morbidade e mortalidade em crianças de zero a cinco anos de idade e em pacientes imunodeprimidos. Embora existam alguns relatos de infecção por *Cryptosporidium* em animais de companhia, sua participação na epidemiologia da criptosporidiose humana é incerta, e a literatura sobre esse tema ainda é bastante escassa. O objetivo deste estudo foi determinar a ocorrência e realizar a classificação molecular de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de animais exóticos criados como animais de estimação no Brasil. Um total de 386 amostras de seis espécies de animais foi colhido e armazenado em solução de dicromato de potássio 5% a 4°C. Os oocistos foram purificados por centrifugo-sedimentação em água/éter, seguindo-se a extração de DNA genômico e a realização da *nested* PCR para amplificação de fragmento parcial do gene da subunidade 18S do rRNA. Positividade para *Cryptosporidium* spp. foi observada em 11,40% (44/386) das amostras. O sequenciamento de fragmentos amplificados permitiu a identificação de *Cryptosporidium tyzzeri* em camundongos, *Cryptosporidium muris* em camundongos, hamster e chinchila, *Cryptosporidium parvum* em chinchila, *Cryptosporidium* genótipo hamster em hamster e *Cryptosporidium* sp. em porquinho-da-índia. Os resultados deste estudo mostram que há uma variedade de espécies de *Cryptosporidium* presentes em animais exóticos de companhia no Brasil. Os dados sugerem que esses animais podem participar da epidemiologia da criptosporidiose humana, particularmente por seu estreito convívio.

Palavras-chave: PCR, saúde pública, zoonoses

ABSTRACT

Infection by some species or genotypes of *Cryptosporidium* represents a potential risk to public health, mainly because of the morbidity and mortality in children from zero to five years of age and in immunocompromised patients. Although there are some reports of *Cryptosporidium* infection in animals raised as pets, their participation in the epidemiology of human cryptosporidiosis is uncertain and studies on this topic are still scarce. The aim of this study was to determine the occurrence, as well as to perform the molecular classification of *Cryptosporidium* spp. in faecal samples of exotic animals raised as pets in Brazil. A total of 386 faecal samples from six species of animals was collected and stored in a solution 5% potassium dichromate at 4°C. The oocysts were purified by centrifugal sedimentation in water-ether, followed by genomic DNA extraction and the performance of the nested-PCR to amplify a partial fragment of 18S rRNA gene. Positivity for *Cryptosporidium* spp. was obtained in 11.40% (44/386) of samples. The sequencing of the amplified fragments allowed the identification of *Cryptosporidium tyzzeri* in mice, *Cryptosporidium muris* in mice, hamster and chinchilla, *Cryptosporidium parvum* in chinchilla, *Cryptosporidium hamster* genotype in hamster and *Cryptosporidium* sp. in guinea pig. The results of this study show that there is a variety of species of *Cryptosporidium* present in exotic animals raised as pets in Brazil. The data suggest that these animals may have zoonotic potential and participate in the epidemiology of human cryptosporidiosis.

Keywords: PCR, public health, zoonosis

Recebido em 13 de março de 2014

Aceito em 27 de março de 2015

*Autor para correspondência (corresponding author)

E-mail: marcelo@fmva.unesp.br

INTRODUÇÃO

O gênero *Cryptosporidium* é constituído por protozoários coccídios que infectam mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes. Animais domésticos e selvagens são susceptíveis à infecção causada por diversas espécies e genótipos desse coccídio, muitos dos quais são encontrados em humanos (Fayer e Xiao, 2008).

A infecção em seres humanos comumente é causada por *C. hominis* e *C. parvum*. No entanto, há relatos de infecção por *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. felis*, *C. ubiquitum*, *C. fayeri*, *C. muris*, *C. andersoni*, *C. suis*, *C. tyzzeri*, *C. cuniculus* e *C. viatorum* em humanos, o que demonstra que animais domésticos e selvagens podem atuar como reservatórios e representar fontes de infecção desse parasito para o homem, favorecendo a contaminação de fontes de água, alimentos ou a infecção por contato direto (Fayer, 2010; Robinson et al., 2010; Elwin et al., 2012).

Infecções por *Cryptosporidium* em humanos podem ser assintomáticas ou resultar em doença clínica, principalmente na forma de diarreia, que pode durar até três semanas, embora seja autolimitante em pessoas saudáveis. Entretanto, enfermidade prolongada pode ser fatal em pacientes imunocomprometidos (Fayer e Xiao, 2008). *Cryptosporidium* spp. constitui importante causa de morbimortalidade em crianças abaixo de cinco anos de idade, sendo responsável por cerca de 1,5 milhão de mortes anualmente, sobretudo em países subdesenvolvidos (Unicef, 2008; Kotloff et al., 2013).

Com a crescente utilização de *hamsters*, coelhos, furões, porquinhos-da-índia e chinchilas como animais domésticos, tem-se discutido o potencial desses *pets* como reservatórios e veiculadores de parasitoses que acometem humanos, principalmente crianças (Thompson e Smith, 2011). Várias espécies de animais domésticos e selvagens são parasitadas por espécies zoonóticas de *Cryptosporidium* e têm sido consideradas como reservatórios do protozoário e fonte de contaminação ambiental, constituindo um problema de saúde pública importante em todos os continentes (Xiao et al., 2000).

O objetivo deste trabalho foi determinar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de animais exóticos de estimação e realizar a classificação molecular para determinação da espécie ou do genótipo do protozoário nas amostras positivas.

MATERIAL E MÉTODOS

De acordo com a disponibilidade, em uma amostragem de conveniência foram colhidas 386 amostras: 186 amostras de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), 78 de chinchilas (*Chinchilla lanigera*), 12 de *hamsters*-chineses (*Cricetulus griseus*), 40 de *hamsters*-sírios (*Mesocricetus auratus*), 33 de porquinhos-da-índia (*Cavia porcellus*), 22 de furões (*Mustela putorius*) e 15 de camundongos (*Mus musculus*), de diferentes idades, aparentemente saudáveis e sem histórico de doença anterior. As amostras, constituídas por aproximadamente 3g de fezes, foram colhidas em criatórios comerciais, *pet shops*, clínicas veterinárias e em residências, em algumas cidades do estado de São Paulo, Brasil. As amostras foram armazenadas a 4°C, em recipientes de plástico de 50 mL, em solução de bicromato de potássio 2,5% (concentração final), e submetidas à purificação pela técnica de centrifugo-sedimentação em água/éter (Meloni e Thompson, 1996).

A extração de DNA foi realizada com utilização do QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Alemanha), de acordo com protocolo sugerido pelo fabricante, após passo inicial de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em *termomixer* por 95°C, por 5x, em tampão ASL, incluído no *kit* de extração.

A *nested* PCR foi realizada nas 386 amostras para determinar a espécie ou o genótipo de *Cryptosporidium* presente nos animais. Desse modo, foi feita a amplificação de fragmentos do gene da subunidade 18S do RNA ribossômico utilizando-se os *primers* 5' TTCTAGAGCTAATACATGCG 3' e 5' CCCATTTCTTCGAAACAGGA 3', para a reação primária (~1325 pb), e 5' GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG 3' e 5' AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA 3', para a reação secundária (826-840 pb) (Xiao et al., 2000), nas seguintes condições de reação: preparação de 25µL de solução contendo 2,5µL de tampão para PCR 1x, 2,5mM MgCl₂, 1U de

Taq DNA polimerase, 200µM de cada desoxirribonucleotídeo, 200 nM de cada *primer* e 2,5µL de DNA alvo. Água ultrapura e DNA de *Cryptosporidium serpentis* foram utilizados, respectivamente, como controle negativo e positivo.

As amostras foram submetidas à desnaturação inicial a 94°C por três minutos, seguida de 34 ciclos, cada um constituindo em desnaturação a 94°C por 45 segundos, 45 segundos de anelamento a 55°C e 60 segundos de extensão a 72°C, com extensão final a 72°C por sete minutos.

A identificação dos produtos das reações foi feita por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. Os fragmentos resultantes da *nested* PCR foram purificados utilizando-se o *kit* QIAquick® Gel Extraction (Qiagen, Alemanha) e submetidos ao sequenciamento bidirecional no Centro de Sequenciamento e Genômica Funcional da Unesp, Campus de Jaboticabal, mediante o uso do ABI Prism® Dye Terminator 3.1 (Applied Biosystems, EUA), em sequenciador automático ABI 3730XL (Applied Biosystems, EUA).

A determinação da sequência consenso foi realizada por meio do *software* Codoncode Aligner v. 1.5.2. (CodonCode Corp., EUA). Somente foram considerados nucleotídeos com valores de qualidade de sequenciamento maior ou igual a 20. Após determinação da sequência consenso dos fragmentos amplificados por PCR, foi realizado seu alinhamento com auxílio dos programas Clustal W (Thompson *et al.*, 1997) e BioEdit® Sequence Alignment Editor (Hall, 1999), tomando-se como base sequências homólogas disponíveis no *GenBank*.

As sequências de nucleotídeos descritas neste trabalho foram publicadas no *Genbank*, sob os códigos KJ569795 a KJ569799.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 386 amostras submetidas à *nested* PCR, 44 (11,40%) amostras foram positivas para *Cryptosporidium* spp. Dentre elas, 25 (56,82%) foram de coelhos, seis (13,64%) de *hamsters*,

cinco (11,36%) de chinchilas, quatro (9,09%) de porquinhos-da-índia e quatro (9,09%) de camundongos. Todas as amostras de furões foram negativas pela *nested* PCR. A maior ocorrência encontrada foi em camundongos: das 15 amostras, quatro foram positivas. A ocorrência em coelhos foi de 13,44% (25/186), seguida dos porquinhos-da-índia com 12,12% (4/33), *hamsters* 11,54% (6/52) e chinchilas 6,41% (5/78) (Tab. 1).

Dentre 44 amostras positivas, 11 resultaram em amplificação de DNA em quantidade suficiente para possibilitar o sequenciamento do fragmento amplificado, o que permitiu a identificação de *Cryptosporidium tyzzeri* em camundongos, *C. muris* em camundongos, *hamsters* e chinchila, *C. parvum* em chinchila, *Cryptosporidium* genótipo *hamster* em *hamster* e *Cryptosporidium* sp. em porquinho-da-índia (Tab. 1). As sequências analisadas apresentaram 100% de similaridade genética com as sequências de espécies ou genótipos já identificados, com exceção de duas amostras: *Cryptosporidium* sp. de porquinho-da-índia, que apresentou cinco inserções de nucleotídeos em relação à sequência DQ885337, e uma substituição e uma inserção de nucleotídeos quando comparada à sequência DQ885338, ambas publicadas por Huber *et al.* (2007), e *Cryptosporidium* genótipo *hamster*, que apresentou duas substituições de nucleotídeos quando comparada à sequência GQ121023 (Lv *et al.*, 2009).

A *nested* PCR utilizada neste trabalho permite apenas a identificação do gênero *Cryptosporidium*; a determinação da espécie do protozoário só é possível após sequenciamento dos fragmentos amplificados. A amplificação de pequena quantidade de DNA, após a realização de *nested* PCR para *Cryptosporidium* spp., é comumente causada pela presença de inibidores da PCR em DNA extraído das amostras fecais ou pela presença de pequena quantidade de oocistos nas amostras fecais (Schrader *et al.*, 2012). Como a técnica de extração de DNA utilizada é específica para amostras fecais e promove a remoção da maioria dos agentes inibidores da PCR, o mais provável é que nessas amostras houvesse pequena quantidade de oocistos.

Tabela 1. Resultado da *nested* PCR e identificação por sequenciamento de *Cryptosporidium* spp. em animais exóticos de companhia no Brasil

Hospedeiro	Nº. de amostras	Nº de amostras positivas (%)	Identificação por sequenciamento
Camundongo	15	4 (26,67%)	<i>C. tyzzeri</i> (3)* <i>C. muris</i> (1)
Coelho	186	25 (13,44%)	-
Porquinho-da-índia	33	4 (12,12%)	<i>Cryptosporidium</i> sp. (1)
<i>Hamster</i> -chinês	12	4 (33,33%)	<i>C. muris</i> (2) Genótipo <i>hamster</i> (1)
<i>Hamster</i> -sírio	40	2 (5%)	<i>C. muris</i> (1)
Chinchila	78	5 (6,41%)	<i>C. parvum</i> (1) <i>C. muris</i> (1)
Furão	22	0	-
Total	386	44 (11,40%)	11

*Número de amostras identificadas.

Há somente um relato de presença de infecção por *Cryptosporidium* em chinchilas (Yamini e Raju, 1986). Em estudos epidemiológicos relacionados à criptosporidiose em roedores, não houve detecção *Cryptosporidium* spp. em chinchilas no Brasil ou em outros países (Gurgel et al., 2005; Lv et al., 2009). Entretanto, neste trabalho, *Cryptosporidium* foi identificado em 6,41% das amostras de chinchilas, e em duas amostras foi possível a identificação de *C. parvum* e *C. muris*. *C. parvum* é uma das principais espécies que acometem os humanos, e a veiculação hídrica pode atingir facilmente um grande contingente da população, podendo provocar inúmeros surtos (Fayer e Xiao, 2008; Yoder et al., 2012).

Embora *C. muris* já tenha sido identificado em muitos roedores, como ratos, ratazanas, camundongos, *hamsters* e esquilos, além de aves e mamíferos, incluindo humanos (Muthusamy et al., 2006; Ng et al., 2006; Kvac et al., 2008; Lupo et al., 2008; Feng et al 2011), este é o primeiro relato dessa espécie em chinchilas. Seria importante o desenvolvimento de novos estudos para esclarecer se chinchilas são uma fonte de infecção importante de espécies zoonóticas de *Cryptosporidium*.

Neste trabalho, *C. tyzzeri* foi identificado em camundongos pela primeira vez no Brasil. Essa espécie era anteriormente denominada *Cryptosporidium* genótipo I de camundongos, mas recentemente foi classificada por Ren et al. (2012). Em humanos, *C. tyzzeri* foi encontrado em uma criança no Kuwait (Sulaiman et al., 2005) e em uma mulher com caso grave de

criptosporidiose com infecção mista por *C. tyzzeri* e *C. parvum*, provavelmente transmitida por roedores selvagens, demonstrando que *C. tyzzeri* possui vários hospedeiros e apresenta potencial zoonótico (Rasková et al., 2013).

Cryptosporidium wrairi não foi observado neste trabalho. A espécie é descrita como agente de infecção apenas em porquinho-da-índia, o que sugere alta especificidade para esse hospedeiro. Em um feito realizado no Brasil, a análise filogenética realizada de amostras de porquinhos-da-índia identificou um novo genótipo de *Cryptosporidium* (Huber et al., 2007), similar ao encontrado neste trabalho.

Cryptosporidium genótipo de *hamster* foi encontrado em uma amostra de *hamster*- chinês. Não há informação sobre a importância clínica ou em saúde pública de *Cryptosporidium* genótipo *hamster*, que foi descrito somente uma vez, em *hamster*- siberiano (*Phodopus sungorus*), na China (Lv et al., 2009).

Não foi possível fazer a identificação da espécie *Cryptosporidium* em coelhos devido à quantidade insuficiente de DNA para sequenciamento. Coelhos podem se infectar por *C. parvum*, *C. meleagridis* e *C. cuniculus*. Todas essas espécies já foram descritas em humanos e apresentam importância em saúde pública. Como *C. cuniculus* foi descoberto recentemente como um importante agente etiológico de enfermidade clínica em humanos (Robinson et al., 2008; Molloy et al., 2010), e há raros estudos relacionados a esse parasito, em estudos futuros seria importante classificar os isolados de

coelhos em nível de espécie, e não somente de gênero.

Cryptosporidium spp. não foi detectado em nenhuma das amostras de furão, embora *Cryptosporidium* genótipo furão já tenha sido encontrado em furões e esquilos- vermelhos (*Sciurus vulgaris*) (Kvác *et al.*, 2008) e *C. parvum* tenha sido identificado no Japão em furões assintomáticos (Abe e Iseki, 2003).

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostram que há uma variedade de espécies de *Cryptosporidium* spp. presente em animais exóticos de companhia no Brasil, o que sugere que estes podem apresentar potencial zoonótico e participar da epidemiologia da criptosporidiose humana.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), pelo auxílio (2011/08814-1), bem como pela concessão de bolsa de mestrado (2011/02730-0).

REFERÊNCIAS

- ABE, N.; ISEKI, M. Identification of genotypes of *Cryptosporidium parvum* isolates from ferrets in Japan. *Parasitol. Res.*, v.89, p.422-424, 2003.
- COUNTDOWN to 2015: maternal, newborn and child survival. Tracking progress in maternal, neonatal and child survival: the 2008 report. New York, NY: UNICEF; 2008.
- ELWIN, K.; HADFIELD, S.J.; ROBINSON, G. *et al.* *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007-2011. *Int. J. Parasitol.*, v.42, p.675-682, 2012.
- FAYER, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp. Parasitol.*, v.124, p.90-97, 2010.
- FAYER, R.; XIAO, L. *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. 560p.
- FENG, Y.; LAL, A.A.; LI, N.; XIAO, L. Subtypes of *Cryptosporidium* spp. in mice and other small mammals. *Exp. Parasitol.*, v.127, p.238-242, 2011.
- GURGEL, A.C.F.; SARTORI, A.S.; ARAÚJO, F.A.P. Protozoan parasites in captive chinchillas (*Chinchilla lanigera*) raised in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Parasitol. Latinoam.*, v.60, p.186-188, 2005.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, v.41, p.95-98, 1999.
- HUBER, F.; SILVA, S.; BOMFIM, T.C.B. *et al.* Genotypic characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.150, p.65-74, 2007.
- KOTLOFF, K.L.; NATARO, J.P.; BLACKWELDER, W.C. *et al.* Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet*, v.13, p.60844-60842, 2013.
- KVÁC, M.; HOFMANNOVÁ, L.; BERTOLINO, S. *et al.* Natural infection with two genotypes of *Cryptosporidium* in red squirrels (*Sciurus vulgaris*) in Italy. *Folia Parasitol. (Praha)*, v.55, p.95-99, 2008.
- LUPU, P.J.; LANGER-CURRY, R.C.; ROBINSON, M. *et al.* *Cryptosporidium muris* in a Texas canine population. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.78, p.917-921, 2008.
- LV, C.; ZHANG, L.; WANG, R. *et al.* *Cryptosporidium* spp. in wild, laboratory, and pet rodents in china: prevalence and molecular characterization. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.75, p.7692-7699, 2009.
- MELONI, B.P.; THOMPSON, R.C.A. Simplified methods for obtaining purified oocysts from mice and for growing *Cryptosporidium parvum* in vitro. *J. Parasitol.*, v.82, p.757-762, 1996.
- MOLLOY, S.F.; SMITH, H.V.; KIRWAN, P. *et al.* Identification of a high diversity of *Cryptosporidium* species genotypes and subtypes in a pediatric population in Nigeria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.82, p.608-613, 2010.

- MUTHUSAMY, D.; RAO, S.S.; RAMANI, S. *et al.* Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* sp. isolates from human immunodeficiency virus-infected individuals in South India. *J. Clin. Microbiol.*, v.44, p.632-634, 2006.
- NG, J.; PAVLASEK, I.; RYAN, U. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.72, p.7548-7553, 2006.
- RASKOVÁ, V.; KVETONOVÁ, D.; SAK, B. *et al.* Human cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium tyzzeri* and *C. parvum* isolates presumably transmitted from wild mice. *J. Clin. Microbiol.*, v.51, p.360-362, 2013.
- REN, X.; ZHAO, J.; ZHANG, L. *et al.* *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Exp. Parasitol.*, v.130, p.274-281, 2012.
- ROBINSON, G.; ELWIN, K.; CHALMERS, R.M. Unusual *Cryptosporidium* genotypes in human cases of diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.*, v.14, p.1800-1802, 2008.
- ROBINSON, G.; WRIGHT, S.; ELWIN, K. *et al.* Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Morphology, biology and phylogeny. *Int. J. Parasitol.*, v.40, p.1539-1548, 2010.
- SCHRADER, C.; SCHIELKE, A.; ELLERBROEK, L.; JOHNE, R. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.*, v.113, p. 1014-1026, 2012.
- SULAIMAN, I.M.; HIRA, P.R.; ZHOU, L. *et al.* Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. *J. Clin. Microbiol.*, v.43, p.2805-2809, 2005.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F. *et al.* The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality tools. *Nucleic Acids Res.*, v.24, p.4876-4882, 1997.
- THOMPSON, R.C.A.; SMITH, A. Zoonotic enteric protozoa. *Vet. Parasitol.*, v.182, p. 70-78, 2011.
- XIAO, L.; ALDERISIO, K.; LIMOR, J. *et al.* 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, p.5492-5498, 2000.
- YAMINI, B.; RAJU, N.R. Gastroenteritis associated with a *Cryptosporidium* sp. in a chinchilla. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.189, p.1158-1159, 1986.
- YODER, J.S.; WALLACE, R.M.; COLLIER, S.A. *et al.* Cryptosporidiosis surveillance – United States, 2009-2010. *Surveill. Summ.*, v.61, p.1-12, 2012.