

ALEX AKIRA NAKAMURA

Ocorrência e caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em aves domésticas e em aves exóticas mantidas em cativeiro no Brasil

**São Paulo
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ALEX AKIRA NAKAMURA

Ocorrência e caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em aves domésticas e em aves exóticas mantidas em cativeiro no Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles

São Paulo
2008

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

8/

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP

22/7/08

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2017
FMVZ

Nakamura, Alex Akira

Ocorrência e caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em aves domésticas e em aves exóticas mantidas em cativeiro no Brasil / Alex Akira Nakamura. – São Paulo : A. A. Nakamura, 2008.
88 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2008.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles.

1. *Cryptosporidium*. 2. Aves domésticas. 3. Aves exóticas.
4. Caracterização molecular. 5. Ocorrência. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Assistência Acadêmica

Comissão de Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Ocorrência e caracterização molecular de *Cryptosporidium sp.* Em aves domésticas e aves silvestres e exóticas mantidas em cativeiro", protocolo nº654/2005, utilizando número indeterminado de aves, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Solange Maria Gennari, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium sp* in domestic birds and in captive wild and exotic birds", protocol number 654/2005, utilizing indeterminate number of birds, under the responsibility of Prof. Dr. Solange Maria Gennari, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 16 de maio de 2005


Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: NAKAMURA, Alex Akira

Título: Ocorrência e caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em aves domésticas e em aves exóticas mantidas em cativeiro no Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

Aos meus pais

pela educação, incentivo e apoio em todas as minhas decisões,

Ao meu irmão

pelo apoio e consideração

E aos meus avôs (in memoriam) e avós

pelo imenso carinho e amor.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – FMVZ-USP pela oportunidade da realização desse mestrado

À Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Araçatuba, por possibilitar a realização da parte prática desse experimento.

Ao Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles, pela orientação, grandes ensinamentos, amizade, incentivo, apoio prestado sempre que solicitado, voto de confiança e acima de tudo, pela paciência.

À Prof^a. Dr^a. Solange Maria Gennari, pela orientação pontual, apoio, ensinamentos, incentivo, paciência e pela confiança em mim depositada.

Ao Prof. Dr. Sílvio Arruda Vasconcellos por ter aberto as portas do VPS, respeito, ensinamentos e por toda ajuda fornecida.

À Prof^a. Dr^a. Cárís Maroni Nunes, pelos ensinamentos, amizade, apoio e pela disponibilização do laboratório de Bioquímica para a realização do sequenciamento das amostras deste trabalho.

Aos estagiários do Laboratório de Ornitopatologia – UNESP Araçatuba, que contribuíram para este experimento, Valéria, Renata, Rômulo, Paula, Danilo, Érica e Daniel, pelos bons momentos de trabalho e convivência.

Aos amigos da República Toca do Predador, Heitor, Tiago, Rubens e Rogério, pelos bons momentos vividos, convivência e respeito.

Aos pós-graduandos da UNESP – Araçatuba, Heitor Ferrari, Cristiano, Leandro Kanamaru, Natália, Luciana, Karline, Nandressa e Flávia.

Aos amigos que fiz no VPS-FMVZ-USP, Patrícia, Aldo, Luciana Bandini, Valéria, José Márcio, Andreas, Renata, Thiago, Jonas, Anaiá e André.

Aos grandes amigos Maurício Yuji, Rafael Kawakami, Silmara, Maria Carolina, Marcelo Miura, Marcelo Carvalho (Bocó), Rodrigo, Jesualdo, Leandro Kanamaru, Márcio Tsugao, Fábio Ishida, Ricardo Shigueo, Priscila Midori, Marcos Okada, Valter Minoru, Jesualdo e Juliano, por todos os bons momentos que compartilhamos.

À amiga de graduação, Michele, pelos oito anos de convivência e amizade, que apesar agora da distância continua sempre presente.

Aos amigos colegas de profissão, Rogério Arno, Herika, Sandra e Ricardo, pela amizade, apoio e consideração.

Aos funcionários das Bibliotecas Virginie Buff D' Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e Honório Monteiro acervo do curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista campus de Araçatuba, sempre prestativos e educados, pela ajuda em pesquisas e na normalização deste trabalho.

Aos funcionários da secretaria, professores, e funcionários da UNESP – Araçatuba, sem exceção, por toda ajuda prestada, com atenção especial aos professores e funcionários do Laboratório de Ornitopatologia e da Patologia

A todos os funcionários da secretaria, professores, pós-graduandos, residentes, estagiários e funcionários do VPS-FMVZ, por toda ajuda prestada.

À funcionária da Secretaria da Pós-graduação do VPS Tânia Delonero, por toda a atenção, ajuda e esclarecimentos de dúvidas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de Mestrado (processo nº. 05/57625-6) e pelo auxílio financeiro para realização deste projeto de pesquisa (processo nº. 05/53809-5)

A todos os responsáveis pelos locais de colheita de amostras, sem exceção, por fornecer gentilmente as amostras para a análise, em especial à Clínica Vida Livre, ao Ambulatório de Aves da FMVZ-USP, ao Setor de Animais Silvestres do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, da UNESP campus Jaboticabal (FCAV-UNESP), aos Zoológicos de Bauru, São José do Rio Preto e Goiânia, ao Parque das Aves em Foz do Iguaçu e ao Orquidário de Santos.

E por fim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, participaram e auxiliaram-me no desenvolvimento deste trabalho.

“Muito do que é relevante para o desenvolvimento das idéias em ciência não está nas publicações especializadas.”

Alexander R. Todd, 1977 (prêmio Nobel de Química de 1957, pelo seu trabalho em síntese e estrutura de nucleotídeos e de ácidos nucléicos; estabeleceu a ligação 5'-d-ribose-fosfato-3'-d-ribose no DNA)

RESUMO

NAKAMURA, A. A. **Ocorrência e caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em aves domésticas e em aves exóticas mantidas em cativeiro no Brasil.** [Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic and exotic birds kept in captivity in Brazil]. 2008. 88 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

A criptosporidiose é considerada uma das principais infecções por protozoários em aves, e já foi descrita em mais de 30 espécies de aves de várias Ordens, como Anseriformes, Charadriiformes, Columbiformes, Galliformes, Passeriformes, Psittaciformes e Struthioniformes. Três espécies de *Cryptosporidium* infectam aves: *Cryptosporidium baileyi*, *Cryptosporidium galli* e *Cryptosporidium meleagridis*. Além dessas espécies, há vários genótipos distintos geneticamente das espécies de *Cryptosporidium* já descritas em aves, como os genótipos I, II, III e IV de aves. Há vários relatos de infecção por *Cryptosporidium* nos tratos gastrintestinal, respiratório e na bursa de Fabricius, resultando em perdas econômicas e mortalidade. O objetivo desse estudo foi a detecção de *Cryptosporidium* e sua caracterização molecular, em amostras de fezes de aves domésticas e de aves exóticas mantidas em cativeiro no Brasil. Foram coletadas 966 amostras de fezes de 18 famílias de aves. As amostras foram conservadas em solução de dicromato de potássio 2,5% a 4° C, até o processamento. Para purificação e concentração dos oocistos, foi utilizada a técnica de centrífugo-flutuação em solução de Sheather seguida de análise microscópica, em 463 amostras, por meio da técnica de coloração negativa com verde malaquita e de extração do DNA genômico dos oocistos, em amostra positivas à microscopia, ou, alternativamente, a extração de DNA foi realizada, sem a realização prévia de microscopia, em outras 503 amostras. A análise molecular foi realizada por meio da reação de *nested*-PCR, para amplificação de fragmentos da subunidade 18S do gene do RNA ribossômico e do gene da actina. Foi observada amplificação para *Cryptosporidium* em 47 (4,86 %) amostras. O sequenciamento dos fragmentos amplificados possibilitou a identificação das três espécies que infectam aves: *C. galli* em canário (*Serinus canaria*), galinha doméstica (*Gallus gallus domesticus*) e calopsita (*Nymphicus hollandicus*), *C. meleagridis* e *C. baileyi* em galinha doméstica (*G. g. domesticus*), *Cryptosporidium* genótipo I de aves em pavão azul (*Pavo*

cristatus) e canário (*Serinus canaria*), *Cryptosporidium* genótipo III de aves em agapornis (*Agapornis roseicollis*) e calopsita (*N. hollandicus*) e *Cryptosporidium* genótipo II de aves em avestruzes (*Struthio camelus*).

Palavras-chave: *Cryptosporidium*. Aves domésticas. Aves exóticas. Caracterização molecular. Ocorrência.

ABSTRACT

NAKAMURA, A. A. **Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic and exotic birds kept in captivity in Brazil.** [Ocorrência e caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em aves domésticas e em aves exóticas mantidas em cativeiro no Brasil]. 2008. 88 f.. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Cryptosporidiosis is considered a major protozoan infection in birds, and has been described in more than 30 species of birds of various orders, as Anseriformes, Charadriiformes, Columbiformes, Galliformes, Passeriformes, Psittaciformes and Struthioniformes. Three species of *Cryptosporidium* are considered valid in birds: *Cryptosporidium baileyi*, *Cryptosporidium galli* and *Cryptosporidium meleagridis*. Besides these species, there are several genotypes genetically distinct from the species of *Cryptosporidium* described in birds, as avian genotypes I, II, III and IV. There are several reports of gastrointestinal, respiratory and bursa of Fabricius infections in birds, resulting in major economic losses and mortality. The aim of this study was the detection and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in fecal samples of domestic birds and in exotic birds kept in captivity in Brazil. A total of 966 samples from 18 families of birds were collected and stored in 2.5% potassium dichromate solution at 4° C until processing. Oocysts were purified in Sheather sugar solution following microscopic analyses, in 463 samples, by malachite green negative stain and extraction of genomic DNA of oocysts in samples positive by microscopy or, alternatively, DNA extraction was accomplished without previous microscopic analyses in another 503 samples. Molecular analyses were performed using n-PCR for amplification of fragments of the 18S subunit of rRNA gene and of the actin gene. It was observed amplification for *Cryptosporidium* DNA fragments in 47 (4.86%) samples. Sequencing of amplified fragments and phylogenetic analyses allowed the identification of the three species that infect birds: *C. galli* in canaries (*Serinus canaria*), domestic chicken (*Gallus gallus domesticus*) and calopsita (*Nymphicus hollandicus*), *C. meleagridis* and *C. baileyi* in domestic chicken (*G. g. domesticus*), *Cryptosporidium* avian genotype I in peacock (*Pavo cristatus*) and canary (*Serinus canaria*), *Cryptosporidium* avian genotype III in agapornis (*Agapornis roseicollis*) and

cockatiel (*N. hollandicus*), and *Cryptosporidium* avian genotype II in ostriches (*Struthio camelus*).

Key words: *Cryptosporidium* spp., Domestic birds, Exotic birds, Molecular characterization, Occurrence.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Árvore filogenética de seqüências do gene do 18S rRNA de *Cryptosporidium* de aves identificados neste experimento e de outras espécies de *Cryptosporidium* disponíveis no *GenBank*. Árvore de consenso utilizando-se o método de agrupamento de vizinhos. Os números à esquerda das ramificações indicam os valores de *bootstrap* acima de 50%. A escala indica distância genética de 0,02 nucleotídeos por posição na seqüência..... 65
- Figura 2 - Árvore filogenética de seqüências do gene da actina de *Cryptosporidium* de aves identificados neste experimento e de outras espécies de *Cryptosporidium* disponíveis no *GenBank*. Árvore de consenso utilizando-se o método de agrupamento de vizinhos. Os números à esquerda das ramificações indicam os valores de *bootstrap* acima de 50%. A escala indica distância genética de 0,02 nucleotídeos por posição na seqüência..... 65
- Figura 3 - Amostra de fezes de calopsita com um oocisto de *C. galli*. Coloração negativa com verde malaquita – 40 X..... 56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Espécies de <i>Cryptosporidium</i> spp. atualmente descritas (Adaptado de SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008).....	27
------------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Pesquisa de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> em fezes de aves domésticas e de aves exóticas, pela técnica de coloração negativa com verde malaquita.....	57
Tabela 2 -	Resultado da <i>nested</i> -PCR para o gene da subunidade 18S do rRNA em amostras de fezes de aves domésticas e de aves exóticas, positivas para oocistos de <i>Cryptosporidium</i> , por meio de microscopia.....	58
Tabela 3 -	Resultado da <i>nested</i> -PCR para o gene da subunidade 18S do gene do rRNA em amostras de fezes de aves domésticas e de aves exóticas, sem realização prévia de microscopia.....	59
Tabela 4 -	Total de amostras positivas para o gene da subunidade 18S do gene rRNA, correspondentes a aves domésticas e a aves exóticas.....	60
Tabela 5 -	Identificação de <i>Cryptosporidium</i> em fezes de aves domésticas e de aves exóticas, pela PCR para os genes da subunidade 18S do gene do rRNA e da actina e sequenciamento dos fragmentos amplificados.....	62
Tabela 6 -	Número de pares de base de fragmentos resultantes de amplificação por <i>nested</i> -PCR, dos genes da actina e da subunidade 18s do gene do rRNA, obtidos neste experimento e dos publicados no <i>GenBank</i> , referentes aos genótipos de aves I, II e III.....	63
Tabela 7 -	Alinhamento das sequências de <i>C. galli</i> , mostrando os sítios de polimorfismo no gene da subunidade 18S do gene do rRNA.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
ELISA	ensaio imunoenzimático
g	grama
<i>g</i>	gravidade terrestre
HE	hematoxilina e eosina
HCl	ácido clorídrico
HSP	heat shock protein – proteína do choque térmico
KOH	hidróxido de potássio
M	molar
mg	miligrama
μL	microlitro
mL	mililitro
μm	micrômetro
mM	milimolar
μM	micromolar
nM	nanomolar
n-PCR	<i>nested</i> -PCR
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia pela polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
PVP	polivinilpirrolidona

RFLP	restriction fragment length polymorphism – “polimorfismo dos fragmentos gerados por enzimas de restrição”
RNA	ácido ribonucléico
rRNA	ácido ribonucléico ribossômico
rpm	rotações por minuto
s	segundos
SDS	dodecil sulfato de sódio
TE	tampão Tris-EDTA
U	unidade
v/v	volume a volume
X	vezes
18S rRNA	gene da subunidade 18S do gene do rRNA

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
-	menos
° C	graus Celsius
+	mais
~	aproximadamente
®	marca registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
1.1	Agente Etiológico	25
1.2	Ciclo Biológico	27
1.3	Especificidade por Hospedeiros	29
1.4	Epidemiologia	30
1.5	Patogenia, Sinais Clínicos e Lesões Macroscópicas	32
1.5.1	Infecção no Trato Respiratório.....	33
1.5.2	Infecção no Trato Gastrointestinal.....	34
1.5.3	Infecção em Galinha Doméstica.....	35
1.5.4	Infecção em Perus.....	36
1.5.5	Infecção em Codornas.....	37
1.5.6	Infecção em Aves Selvagens.....	38
1.5.7	Infecção em Avestruzes.....	40
1.5.8	Infecção em Seres Humanos.....	40
1.6	Diagnóstico	44
1.6.1	Detecção de Oocistos.....	44
1.6.2	Detecção de Estágios Evolutivos.....	45
1.6.3	Sorologia e Biologia Molecular.....	45
2	OBJETIVOS	48
3	MATERIAL E MÉTODO	49
3.1	Amostras de Fezes	49
3.2	Concentração e Purificação de Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp.	50
3.3	Pesquisa de Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> por meio da Coloração Negativa com Verde Malaquita (ELLIOT et al., 1999).	51
3.4	Extração de DNA Genômico de Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp.	51
3.5	Reação de n-PCR para Amplificação de Fragmento da 18S rRNA (XIAO et al., 1999a; 1999b e 2000b).	53

3.6	Reação de n-PCR para Amplificação de Fragmento do Gene da Actina (SULAIMAN et al., 2002).....	53
3.7	Sequenciamento dos Fragmentos Amplificados.....	54
3.8	Alinhamento e Tradução das Seqüências de Nucleotídeos e Edição Final.....	54
3.9	Obtenção das Árvores Genealógicas.....	55
4	RESULTADOS.....	56
5	DISCUSSÃO.....	66
6	CONCLUSÃO.....	72
	REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

O primeiro relato de infecção por *Cryptosporidium* foi feito por Tyzzer (1907), que encontrou o parasito em glândulas gástricas de camundongos de laboratório, observou a formação de oocistos e descreveu a transmissão fecal do protozoário. A partir dessa descrição, 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., 2000a; MORGAN et al., 2001).

Somente em 1929 houve a primeira descrição de criptosporidiose em aves, por Tyzzer (1929), que encontrou, em epitélio cecal de galinhas, todos os estágios de desenvolvimento de *Cryptosporidium*. Slavin (1955) descreveu uma nova espécie de *Cryptosporidium* causando mortalidade em perus jovens e a classificou com *Cryptosporidium meleagridis*. Posteriormente, Current et al. (1986) descreveram, em frangos, o ciclo de vida de *Cryptosporidium baileyi*. Após esses relatos, infecção por *Cryptosporidium* spp. assumiu importância crescente, principalmente para a indústria avícola, manifestando-se geralmente com sinais de infecções respiratórias (BLAGBURN et al., 1987), gastrintestinais e na bursa de Fabricius, tanto em aves domésticas quanto em aves selvagens (SRÉTER; VARGA, 2000), especialmente em frangos de corte (*Gallus gallus domesticus*) (GOODWIN, 1989), como uma entidade primária ou secundária (BLAGBURN et al., 1987). Recentemente Ryan et al. (2003) descreveram *Cryptosporidium galli* infectando diversas espécies de aves.

Protozoários do gênero *Cryptosporidium* são parasitos coccídios que foram recentemente reconhecidos como patógenos de seres humanos e de muitas outras espécies de vertebrados. Completam seu ciclo biológico nos microvilos da superfície de células epiteliais dos tratos gastrintestinal, respiratório e urinário de mamíferos, aves, répteis e peixes (CHERMETTE; BOUFASSA-OUZROUT, 1988; CAREY et al., 2004; XIAO; RYAN, 2006; SMITH et al., 2007). Antes de 1980, infecções por *Cryptosporidium* eram consideradas raras em animais, e em humanos eram consideradas como resultado de infecções oportunistas em indivíduos imunossuprimidos. Somente no início da década de 80 o conceito a respeito desse

parasito mudou, sendo atualmente considerado como um importante agente etiológico de diarreia em humanos imunocomprometidos e imunocompetentes e em alguns animais domésticos e selvagens (CURRENT, 1999; SRÉTER; VARGA, 2000; ASHBOLT, 2004; XIAO et al., 2004).

Os relatos de criptosporidiose, nos últimos 30 anos, aumentaram consideravelmente em várias espécies animais e no ser humano, gerando, proporcionalmente, um aumento do número de pesquisas visando à elucidação de vários aspectos relacionados a essa parasitose, principalmente no que se refere à sua taxionomia, especificidade, epidemiologia, patogenia, diagnóstico e tratamento.

1.1 Agente Etiológico

Taxonomicamente, protozoários do gênero *Cryptosporidium* possuem similaridade a outros coccídios que infectam outros mamíferos e aves, tais como *Toxoplasma gondii*, *Hamondia*, *Eimeria* e *Isospora*. Assim, *Cryptosporidium* spp. são organismos Protistas pertencentes ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoasida, Subclasse Coccidiasina, Ordem Eucoccidiorida, Subordem Eimeriorina, Família Cryptosporidiidae, contendo um único gênero, o *Cryptosporidium* (SRÉTER; VARGA, 2000). Todas as espécies conhecidas são monoxênicas e possuem características próprias que distinguem esse gênero de outros coccídios, como oocistos sem esporocistos e com quatro esporozoítos, ocorrência de auto-infecção (excitação de oocistos de parede fina) e a presença de um vacúolo parasitóforo (localização intracelular extracitoplasmática) na célula hospedeira (WARD; WANG, 2001).

Por meio 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 vários genótipos e de pelo menos 16 espécies de *Cryptosporidium*: *Cryptosporidium andersoni*, *Cryptosporidium bovis*, *Cryptosporidium canis*, *Cryptosporidium felis*, *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium muris*, *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium suis* e *Cryptosporidium wrairi* em mamíferos, *Cryptosporidium*

serpentis e *Cryptosporidium saurophilum* em répteis, *Cryptosporidium molnari* e *Cryptosporidium scophthalmi* em peixes e *C. baileyi*, *C. meleagridis* e *C. galli*, em aves (MORGAN et al., 2002; THOMPSON, 2002; TZIPORI; WARD, 2002; LEAV et al., 2003; RYAN et al., 2003, SITJÀ-BOBADILLA; ALVAREZ-PELLITERO, 2003; ALVAREZ-PELLITERO et al., 2004; RYAN et al., 2004; XIAO et al., 2004; FAYER et al., 2005; SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008; XIAO; FENG, 2008). Ainda, segundo Xiao e Fayer (2008) e Fayer et al., (2008), mais quatro espécies deste protozoário seriam válidas: *Cryptosporidium macropodum* em canguru gigante, *Cryptosporidium fayeri* em canguru vermelho, *Cryptosporidium ryanae* em bovinos e *Cryptosporidium varanii* em lagartos (Quadro 1).

Cryptosporidium pode ainda ser classificado como genótipos adaptados a diversos hospedeiros. Esses genótipos, apesar de morfologicamente semelhantes a algumas espécies já classificadas, diferem das mesmas em sua composição genética. Devido à ausência de dados relacionados a diversas características biológicas desses isolados, ainda não foi possível sua classificação em nível de espécie (XIAO et al., 2002). Segundo Smith et al. (2007), Xiao e Fayer (2008) e Xiao e Feng (2008), pode haver mais de 33 novos genótipos, mas ainda sem classificação em nível de espécie.

Além das três espécies consideradas válidas para aves, *C. baileyi*, *C. galli* e *C. meleagridis* (RYAN et al., 2003; XIAO et al., 2004), recentemente foram encontrados novos genótipos de *Cryptosporidium* em diversas espécies de aves (JOSEPHINE et al., 2006), incluindo avestruzes (SANTOS et al., 2005; MEIRELES et al., 2006) e gansos (JELLISON et al., 2004).

Espécie	Hospedeiro	Autor
<i>C. andersoni</i>	Bovino (A)	Lindsay et al. (2000)
<i>C. bovis</i>	Bovino (ID)	Fayer et al. (2005)
<i>C. canis</i>	Canino (ID)	Fayer et al. (2001)
<i>C. felis</i>	Felino (ID)	Iseki (1979)
<i>C. hominis</i>	Humanos (ID)	Morgan-Ryan et al. (2002)
<i>C. muris</i>	Roedor (E)	Tyzzer (1910)
<i>C. parvum</i>	Camundongo, bovino, humano (ID)	Tyzzer (1912)
<i>C. suis</i>	Suíno (ID, IG)	Ryan et al. (2004)
<i>C. wrairi</i>	Cobaio (<i>Cavia porcellus</i>) (ID)	Vetterling et al. (1991)
<i>C. serpentis</i>	Lagarto, serpente (E)	Levine (1980) (Brownstein et al., 1977)
<i>C. saurophilum</i>	Lagarto (E, ID)	Koudela & Moudri (1998)
<i>C. baileyi</i>	Galinha (B, C)	Current et al. (1986)
<i>C. meleagridis</i>	Peru, humano (ID)	Slavin (1955)
<i>C. galli</i>	Várias espécies de aves (P)	Pavlassek (1999); Ryan (2003)
<i>C. molnari</i>	Peixe (E)	Alvarez-Pellitero & Sitja-Bobadilla (2002)
<i>C. ryanae</i>	Bovino*	Fayer et al. (2008)
<i>C. scophthalmi</i>	Peixe (E, ID)	Alvarez-Pellitero et al. (2004)
<i>C. macropodum</i>	Canguru gigante (<i>Macropus giganteus</i>)	Power & Ryan (2008)
<i>C. varanii</i>	Monitor esmeralda (<i>Varanus prasinus</i>)	Pavlassek et al. (1995)
<i>C. fayeri</i>	Canguru vermelho (<i>Macropus rufus</i>)	Ryan et al. (2008)

Principais sítios de infecção do parasita no hospedeiro: A-abomaso; B-bursa; C-cloaca; E-estômago; ID-intestino delgado; IG-intestino grosso; P-proventrículo ; *D-Desconhecido

Quadro 1 - Espécies de *Cryptosporidium* atualmente descritas (Adaptado de SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008)

1.2 Ciclo Biológico

Todos os estágios evolutivos de *Cryptosporidium* são muito semelhantes aos de outros coccídios pertencentes à subordem Eimeriorina, assim como seu ciclo biológico. O ciclo de vida de *Cryptosporidium* possui seis estágios de desenvolvimento dentro do organismo do hospedeiro infectado, que são: a excitação dos oocistos, merogonia, gametogonia, fertilização, formação da parede dos oocistos e a esporogonia (SMITH; ROSE, 1998).

O ciclo se inicia com a eliminação de oocistos esporulados por um hospedeiro infectado, geralmente em fezes ou em secreções respiratórias. O hospedeiro susceptível então irá se infectar pela ingestão, e em menor escala pela inalação desses oocistos presentes na água, alimentos ou em fômites. Assim, haverá

excistação, liberação de quatro esporozoítos e a adesão desses esporozoítos na superfície das células epiteliais dos tratos gastrintestinal ou respiratório, onde serão englobados pelas microvilosidades, formando um vacúolo parasitóforo (localização intracelular extracitoplasmática). Haverá assim a diferenciação dos esporozoítos em trofozoítos, iniciando a multiplicação assexuada ou merogonia (CURRENT, 1999; SRÉTER; VARGA, 2000; SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008).

Assim, trofozoítos irão originar merontes tipo I contendo oito merozoítos em seu interior, que podem possibilitar uma reinfecção no animal, ou originar merontes tipo II, com quatro merozoítos em seu interior, os quais irão originar microgametócitos e macrogametócitos, que são os estágios sexuais do parasito (SMITH et al., 2007). No caso do ciclo de vida de *C. baileyi*, os merontes tipo I irão passar por desenvolvimento cíclico (autoinfecção), originando novamente os trofozoítos ou então resultando em merontes tipo II que, liberando suas formas invasivas, irão se desenvolver em merontes tipo III, e assim possibilitar a formação dos estágios sexuais (CURRENT et al., 1986).

Após a fertilização, ocorrerá a formação de dois tipos de oocistos: os de parede fina e os de parede espessa. Ambos os tipos possuem a capacidade de esporulação dentro do hospedeiro, contendo em seu interior quatro esporozoítos livres. Oocistos de parede fina sofrem excistação na luz do trato gastrintestinal ou do trato respiratório, onde são capazes de iniciar uma autoinfecção, enquanto que os oocistos de parede espessa são eliminados, na forma infectante, em fezes e são altamente resistentes em condições ambientais (CURRENT, 1999; SRÉTER; VARGA, 2000; XIAO et al., 2004; SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008).

Os sítios de infecção variam de acordo com a espécie de *Cryptosporidium*. Enquanto *C. baileyi* infecta os epitélios do trato respiratório, da bursa de Fabricius e da cloaca (GOODWIN, 1989), *C. meleagridis* fica restrito ao intestino delgado (SLAVIN, 1955); já *C. galli* está associado a infecções no proventrículo (RYAN et al., 2003).

Oocistos de *Cryptosporidium* geralmente apresentam morfologia subesférica a ovóide e diâmetros polar e equatorial de 6.2 x 4.6 micrômetros (μm), 8.2 x 6.3 μm

e 5.2 x 4.6 µm, respectivamente para *C. baileyi*, *C. galli* e *C. meleagridis* (SNYDER et al., 1988; LINDSAY et al., 1989; RYAN et al., 2003).

1.3 Especificidade por Hospedeiros

Criptosporidiose em aves é uma enfermidade cosmopolita, com relatos em vários países, como Austrália, Brasil, Canadá, República Checa, Dinamarca, Alemanha, Japão, Espanha, e África do Sul. Segundo alguns estudos, houve positividade sorológica variando entre 22-88% em galinhas, 10-100% em frangos, 6-10% em poedeiras, 50-59% em patos e gansos, 20-60% em faisões e 22-100% em andorinhas (SRÉTER; VARGA, 2000).

Infecções por *C. baileyi*, por *C. galli* e por outros genótipos deste parasito estão presentes em vários casos relatados em aves, enquanto que o número de relatos de infecção por *C. meleagridis* é baixo (SRÉTER; VARGA, 2000; JOSEPHINE et al., 2006).

A transmissão de criptosporidiose, entre as espécies de aves, pode ocorrer naturalmente. Sendo assim, a transmissão de *C. baileyi* provenientes de isolados de galinhas pode acometer uma ampla variedade de espécies de aves, enquanto que a infecção de *C. meleagridis* isolado de perus ou galinhas está restrita apenas a aves domésticas, como galinhas, perus e patos (SRÉTER; VARGA, 2000). Já a transmissão entre mamíferos e aves e entre répteis e aves não ocorre, exceto em relato feito por Ditrich et al. (1991) que relataram o primeiro caso de infecção por *C. baileyi* em humanos. No entanto, nesse relato não foi realizada classificação molecular do parasito.

C. meleagridis pode ser encontrado infectando o ser humano (PEDRAZADIAS et al., 2000; MORGAN et al., 2000b; GUYOT et al., 2001; TIANGTIP; JONGWUTIWES, 2002; ALVES et al., 2003; CAMA et al., 2003; GATEI et al., 2003), em alguns países com freqüência semelhante ou superior a infecções por *C. parvum* (XIAO et al., 2001; CAMA et al., 2003). Essa espécie é considerada primariamente

um parasita de células epiteliais do intestino de várias espécies de aves, particularmente de perus (SLAVIN, 1955; SRÉTER; VARGA, 2000). No entanto, ainda não há definição sobre a participação de aves na cadeia epidemiológica de infecções humanas por *C. meleagridis* (SRÉTER; VARGA, 2000; DARABUS, 1997; DARABUS; OLARIU, 2003).

Os hospedeiros naturais de *C. galli*, reconhecidos até o momento, são o flamingo cubano (*Phoenicopterus ruber ruber*), várias espécies de tentilhões (Spermestidae e Fringillidae), galinha doméstica (*Gallus gallus domesticus*), tetraz (*Tetrao urogallus*), hazel hen (*Tetrastes bonasia rupestris*), galo de campina (*Paroaria dominicana*), calau (*Buceros rhinoceros*), periquito turquesa (*Neophema pulchella*), pintarroxo de bico (*Pinicola enucleator*), canário (*Serinus canaria*) e calopsita (*Nymphicus hollandicus*) (RYAN et al., 2003; ANTUNES et al., 2006; JOSEPHINE et al., 2006; SIMÕES et al., 2006).

1.4 Epidemiologia

Cryptosporidium tem sido detectado em superfície de águas, seja de redes de esgotos ou em redes públicas de fornecimento de água. Surtos de criptosporidiose têm sido relatados em populações humanas por todo o mundo e algumas das possíveis explicações seriam: a grande quantidade de oocistos que são excretados por hospedeiros infectados, dose pequena de oocistos requerida para a infecção (menos de 10 oocistos), baixa especificidade por hospedeiros mamíferos (particularmente *C. parvum*), o pequeno tamanho dos oocistos, o fato dos oocistos serem resistentes à inativação em condições ambientais e à ação do cloro utilizado no tratamento de água, à baixa velocidade de sedimentação na água e ao fato dos oocistos já serem eliminados esporulados nas fezes e, conseqüentemente, na forma infectante (OKHUYSEN, 1999; SRÉTER; VARGA, 2000). Como surtos de criptosporidiose humana podem ter como origem água de bebida e destinada a lazer, animais domésticos e silvestres, sejam mamíferos ou aves, podem atuar como fontes de infecção deste parasito para o ser humano, por meio de contaminação de

reservatórios de água (DILLINGHAMA et al., 2002; OLSON et al., 2004; GRACZYK et al., 2007).

Análises epidemiológicas têm indicado alta prevalência de infecção por *Cryptosporidium* em aves. Tzipori e Campbell (1981) utilizando o teste de imunofluorescência indireta, encontraram positividade de 88% em galinha doméstica. Snyder et al. (1988), analisando soros de 18 lotes de frangos de corte, por meio da técnica de ELISA indireta, encontraram, em média, 24% de animais positivos por lote.

Em estudo realizado por Goodwin e Brown (1988), 6,4% dos frangos de corte analisados foram positivos para *Cryptosporidium*, sendo a criptosporidiose a segunda infecção, por protozoários, mais prevalente.

A ocorrência de *Cryptosporidium* em várias espécies de aves foi estudada também por Ley et al. (1988), pela coloração de esfregaços de fezes com a técnica da auramina O, observando-se positividade em 27 entre 197 frangos de corte, quatro entre 113 matrizes de corte, uma entre 75 poedeiras comerciais, um entre dois pavões, seis entre 33 psitacídeos e um entre dois anseriformes examinados.

Cryptosporidium meleagridis foi relatado recentemente na Espanha, em surto envolvendo perdiz vermelha (*Alectoris rufa*), com morbidade entre 60-70% e mortalidade superior a 50%, e com sinais clínicos de diarreia e tosse (PAGÈS-MANTÉ et al., 2007).

No Brasil, há relatos de infecção por *C. baileyi* em galinha doméstica (MEIRELES; FIGUEIREDO, 1992; CARDOZO et al., 2005), em avestruzes (SANTOS et al., 2005) e em codornas e patos (HUBER et al., 2007). Jacobsen et al. (2006) relataram infecção por *Cryptosporidium* em intestinos, bursa de Fabricius e traquéia de frangos, sem classificação da espécie de *Cryptosporidium*. Infecção por um novo genótipo de *Cryptosporidium* foi relatada em avestruzes que apresentavam prolapso de cloaca (SANTOS et al., 2005).

Em estudo epidemiológico mais recente, envolvendo várias espécies de aves, na Austrália, Josephine et al. (2006) encontraram positividade de 6,25% para

Cryptosporidium, em um total de 430 amostras fecais analisadas pela reação em cadeia de polimerase (PCR).

1.5 Patogenia, Sinais Clínicos e Lesões Macroscópicas

Os animais domésticos geralmente se infectam entre a primeira e a quarta semanas de vida, com duração da infecção em torno de duas semanas (OLSON et al., 2004).

A patogenia da criptosporidiose está diretamente relacionada com a invasão e lise de enterócitos, provavelmente como resultado de resposta imunológica. Há presença de hiperplasia de células das criptas intestinais, com infiltrado de células inflamatórias em lâmina própria, diminuição de microvilos e atrofia de vilosidades, em grau variado (CLARK; SEARS, 1996). Alterações digestivas e de transporte de nutrientes podem estar relacionadas com aumento na secreção de cloro, induzida por um componente secretório, que pode ocasionar assim o aparecimento de sinais clínicos como diarreia, dores abdominais, apatia e anorexia (ARGENZIO et al., 1993).

Criptosporidiose em aves pode se manifestar sob a forma de doença respiratória ou gastrintestinal. Infecção por *C. baileyi* é considerada como parte do complexo respiratório das aves, particularmente da galinha doméstica, como uma enfermidade primária ou secundária (BLAGBURN et al., 1987; GOODWIN et al., 1996; SRÉTER; VARGA, 2000). O significado da infecção no proventrículo por *C. galli*, no intestino por *C. meleagridis* e na bursa de Fabricius e cloaca por *C. baileyi* permanece indefinido para a maioria das espécies aviárias, embora o parasitismo intestinal possa provocar doença clínica e aumento da mortalidade em perus (SLAVIN, 1955) e codornas (HOERR et al., 1986), e a infecção no proventrículo possa estar relacionada à infecção crônica, geralmente associada a infecções por outros agentes etiológicos (ANTUNES et al., 2008).

1.5.1 Infecção no Trato Respiratório

Criptosporidiose em aves pode acometer o trato respiratório e o principal agente é o *C. baileyi*. A enfermidade acomete galinhas, perus, patos, faisões, codornas e algumas espécies de aves criadas como animais de estimação (SRÉTER; VARGA, 2000).

O parasito pode infectar o trato respiratório alto, lesionando os seios nasais, nasofaringe, sinus e laringe ocasionando casos de sinusite ou o trato respiratório inferior, lesionando a traquéia, brônquios, sacos aéreos e pulmões, com aumento de mortalidade e sinais clínicos de letargia, anorexia, tosse, espirros, murmúrios, dispnéia e conjuntivite (SRÉTER; VARGA, 2000). Pode haver ainda aerossaculite, presença de exsudato mucóide em sacos conjuntivais, na passagem nasal, nos sinus e traquéia, quemose e pneumonia.

Com a realização de infecções experimentais pôde ser estabelecido o potencial patogênico primário do *C. baileyi* induzindo infecção respiratória em galinhas e perus, com presença de sinais clínicos respiratórios severos. Inoculação oral com *C. baileyi* não causa sinais clínicos, entretanto esse parasito foi encontrado colonizando a nasofaringe, laringe, íleo, cloaca e a bursa de Fabricius (CURRENT et al., 1986; MEIRELES; FIGUEIREDO, 1992; MEIRELES et al., 1998a; MEIRELES et al., 1999; SRÉTER; VARGA, 2000).

À microscopia podem ser encontradas alterações na quantidade de muco superficial e detritos celulares, hiperplasia/hipertrofia cística glandular, necrose, congestão e presença de inflamação purulenta em cortes de trato respiratório (SRÉTER; VARGA, 2000).

1.5.2 Infecção no Trato Gastrintestinal

Cryptosporidium pode ainda acometer o trato gastrintestinal de aves, e os principais sítios de infecção são o epitélio de glândulas salivares e esofágicas, o proventrículo, o intestino delgado, o ceco, o cólon, a cloaca e a bursa de Fabricius. A sintomatologia clínica inclui letargia, diminuição de ganho de peso, baixa pigmentação, diarreia e distensão intestinal. Na microscopia há destacamento de enterócitos, atrofia de vilos do intestino delgado, hipertrofia de criptas, atrofia de microvilos, hipertrofia e hiperplasia das células epiteliais da bursa, inflamação purulenta e atrofia linfocelular leve na bursa de Fabricius (SRÉTER; VARGA, 2000).

Inoculação com oocistos de *C. baileyi*, por via oral, não ocasiona manifestações clínicas. Apesar de relato de atrofia de bursa de Fabricius em galinhas, após infecção experimental com *C. baileyi* (RHEE et al., 1997), essa espécie aparentemente não é um agente importante de imunossupressão em aves (MEIRELES et al., 1998b).

São raros os relatos de infecção por *Cryptosporidium* em aves no território brasileiro. *C. baileyi* foi detectado em cortes histológicos da bursa de Fabricius nos Estados de São Paulo (LUVIZOTTO et al., 1990; KONDO et al., 1994) e Rio de Janeiro (MEIRELES et al., 1990; MEIRELES; FIGUEIREDO, 1992).

Em tentilhões já foi encontrada infecção no epitélio da mucosa dos ductos e das glândulas do proventrículo de aves com diarreia aguda, emagrecimento, apatia e presença de infiltração de células inflamatórias e necrose no epitélio deste órgão (BLAGBURN et al., 1990; CLUBB, 1997). O isolado presente no proventrículo tentilhões, causando mortalidade, foi classificado posteriormente como *C. galli* (RYAN et al., 2003). Ainda não está definida a importância de infecções por *C. galli* em aves, apesar de essa espécie causar infecção crônica no proventrículo (ANTUNES et al., 2008).

Infecções severas na cloaca e na bursa de Fabricius, com o genótipo II de aves, podem ser responsáveis por casos de prolapso de falo e de cloaca em

avestruzes (GARDINER; IMES, 1984; SANTOS et al., 2005).

1.5.3 Infecção em Galinha Doméstica

C. baileyi infecta o trato respiratório, bursa de Fabricius e cloaca da galinha doméstica e de outras aves (CURRENT et al., 1986; MEIRELES; FIGUEIREDO, 1992; MEIRELES et al., 1999; SRÉTER; VARGA, 2000).

Gorham et al. (1987) examinaram a incidência de criptosporidiose e aerossaculite em frangos de corte e correlacionaram a infecção por *C. baileyi* com o índice de mortalidade. Nesse estudo, *C. baileyi* foi encontrado, na bursa de Fabricius, em dois entre oito lotes pesquisados, sendo que os maiores índices de mortalidade foram observados nos dois lotes infectados.

Correlação semelhante foi efetuada por Snyder et al. (1988) que, pesquisando *C. baileyi* em 18 lotes de frangos de corte, observaram média de 24% de aves positivas por lote. Os animais com sorologia negativa apresentavam relação, coincidente ou não, com melhor desempenho zootécnico, que poderia ser devido não somente à ausência de exposição a *C. baileyi*, mas também a um conjunto de medidas de manejo sanitário que impediram exposição a outros agentes etiológicos.

Goodwin et al. (1996), analisando a correlação entre traqueíte em frangos de corte, causada por *C. baileyi*, com o desenvolvimento ponderal e a condenação de carcaças em abatedouros, encontraram infecção por essa espécie em 10-60% dos lotes infectados, havendo correlação positiva entre o grau de traqueíte com o percentual de queda de ganho de peso, a presença de aerossaculite e a porcentagem de condenação de carcaças.

A influência da infecção por *C. baileyi*, após inoculação via oral ou intratraqueal, nos parâmetros zootécnicos de frangos de corte alojados em gaiolas, foi estudada por Meireles et al. (1998). Nessa ocasião houve redução transitória do ganho de peso das aves infectadas, no período em que foi observada maior eliminação de oocistos nas fezes. Quando experimento semelhante foi realizado,

mas com alojamento das aves em piso, além de inoculação experimental de *Escherichia coli*, via respiratória, foi observado que *C. baileyi* predispõe as aves à infecção secundária por *E. coli*, além de ser agente primário de enfermidade respiratória severa (MEIRELES et al., 1999).

Egyed et al. (2002) demonstraram, após infecção experimental via intratraqueal, com *C. baileyi*, em galinhas, a presença de sinais clínicos respiratórios como dispnéia e espirros e redução no ganho de peso. Nesse mesmo experimento não houve comprometimento do ganho de peso nem sinais clínicos em aves inoculadas por via oral, apesar da presença do parasito em cloaca e bursa de Fabricius.

Na galinha doméstica são escassos os relatos de infecção natural no intestino delgado (GOODWIN, 1988; NACIRI; MAZZELA, 1988, GOODWIN; BROWN, 1989), ceco (TYZZER, 1929; ITAKURA et al., 1984) e reto (GOODWIN; BROWN, 1989). Nestes relatos, a infecção era sempre assintomática.

1.5.4 Infecção em Perus

Slavin (1955) relatou infecção por *C. meleagridis* em perus, de 10 a 14 dias de idade, com quadro clínico de diarreia e mortalidade. Com auxílio de raspados de mucosas e cortes histológicos, o autor demonstrou o parasito em grande número no terço distal do intestino delgado.

Infecção no trato respiratório por *Cryptosporidium* sp. foi relatada por Glisson et al. (1984), em perus de sete semanas de idade, que apresentavam aumento de volume bilateral dos seios infra-orbitários, conjuntivite serosa e morbidade de 5 a 10%. À necropsopia, os seios nasais estavam distendidos por 1-1,5 mililitros (mL) de fluido viscoso, claro e espumoso. Lesões similares foram descritas por Tarwid et al. (1985), em dois lotes de perus, de quatro a cinco semanas de idade, evidenciando-se, à necropsia, excesso de muco na traquéia e nos seios infra-orbitários, além de aumento de mortalidade.

A criptosporidiose intestinal em perus, após o relato de Slavin (1955), foi diagnosticada somente por Goodwin e Brown (1988). Nessa ocasião as aves apresentavam diarreia e o intestino delgado distendido por gás e conteúdo mucoso. *Cryptosporidium* sp. foi encontrado nas porções média e distal do intestino delgado, concentrado nos dois terços distais das vilosidades e ausente nas criptas.

Gharagozlou et al. (2006) relataram infecção por *Cryptosporidium* sp. em 35,3% em perus de uma a sete semanas de idade, que apresentavam emaciação, diarreia, letargia e redução no ganho de peso; os oocistos foram visualizados nas criptas do epitélio intestinal, principalmente jejuno e íleo.

1.5.5 Infecção em Codornas

O primeiro relato de criptosporidiose em codornas foi feito por Tham et al. (1982). Um lote de 1000 aves de quatro semanas de idade apresentava sinais clínicos caracterizados por depressão, espirros e dificuldade respiratória, com morbidade de 50% e mortalidade de 10%.

Alto índice de mortalidade foi registrado em codornas por Hoerr et al. (1986), em um lote de 2.500 animais. Em cinco lotes anteriores e sucessivos, as aves apresentavam diarreia.

Murakami et al. (2002) relataram a presença de conjuntivite, traqueíte e sinusite com presença de *Cryptosporidium* sp., associado a *Mycoplasma* sp., em sete de dezessete codornas de uma granja com 75.000 matrizes.

Cardozo et al. (2005) encontraram oocistos de *Cryptosporidium* sp. em bursa de Fabricius e cloaca de codornas, após inoculação experimental com o protozoário originado de frangos naturalmente infectados.

1.5.6 Infecção em Aves Selvagens

Proctor e Kemp (1974) detectaram *Cryptosporidium* sp. no intestino grosso de cinco gansos de 14 dias de idade. Foram observados somente esquizontes e macrogametas aderidos à superfície epitelial, que apresentava perda ou encurtamento das microvilosidades no ponto de adesão do parasito e em áreas adjacentes.

Em patos já foi encontrada criptosporidiose associada à conjuntivite (MASON, 1986) e a sintomas respiratórios com presença de excesso de muco na traquéia, cavidade nasal e seios infra-orbitais (O'DONOGHUE et al., 1987).

Em pesquisa de oocistos em aves de vida livre, Graczyk et al. (1998) demonstraram que gansos (*Branta canadensis*) podem atuar como fonte de contaminação ambiental, por meio de eliminação de oocistos de *C. parvum* nas fezes.

Zhou et al. (2004) constataram que 23,4% de amostras de fezes de gansos (*B. canadensis*) analisadas eram positivas para *Cryptosporidium* sp.. Entre as espécies identificadas estavam os genótipos I e II de ganso, genótipo de pato, *C. parvum* e *C. hominis*.

Mais recentemente, Jellison et al. (2004) identificaram mais cinco novos genótipos de *Cryptosporidium* em gansos (*B. canadensis*) no Canadá. Também no Canadá, nessa mesma espécie, foi encontrada prevalência de 81,8% a 90% de *Cryptosporidium* sp. nas amostras de fezes pesquisadas pela técnica de imunofluorescência (KASSA et al., 2004).

Na literatura há alguns relatos de casos de criptosporidiose em Passeriformes (LINDSAY et al., 1991; CLUBB, 1997), mas não há nenhum trabalho sobre características clínicas ou epidemiológicas da criptosporidiose nessas aves.

Em relação à Ordem Psitaciformes, Morgan et al. (2000a) constataram infecção por *C. meleagridis* em epitélio das vilosidades do intestino delgado em um “Ring-neck” (*Psitacula krameri*). Doster e Mahafey (1979), mediante utilização de microscopias ótica e eletrônica, descreveram estágios evolutivos de *Cryptosporidium* sp. na cloaca de papagaios diadema (*Amazona autumnalis*).

Infecção intestinal por *Cryptosporidium* sp., associada a sinais clínicos, foi encontrada em periquitos australianos (GOODWIN; KRABILL, 1989), calopsitas (GOODWIN; KABRILL, 1989; LINDSAY et al., 1990) e , com alto índice de mortalidade, em agapornis (*Agapornis* sp.) (BELTON; POWEL, 1987).

Criptosporidiose no trato respiratório foi diagnosticada em um pavão azul de duas semanas de idade que apresentava tosse espirros e corrimento óculo-nasal (MASON; HARTLEY, 1980).

Em faisões, *Cryptosporidium* sp. foi detectado no trato respiratório associado a problemas respiratórios e na conjuntiva associado a conjuntivite (RANDALL, 1986), sendo que em ambos os casos não foram isolados outros agentes patogênicos.

Ley et al. (1988), utilizando a coloração de esfregaços de fezes, de várias espécies aviárias, com a técnica de Auramina O, relataram pela primeira vez a infecção por *Cryptosporidium* sp. em periquitos, araras e cisnes.

Em tentilhões já foi encontrada infecção renal associada a *Cryptosporidium* sp., com presença de alterações microscópicas caracterizadas por hiperplasia do epitélio uretral e dos ductos coletores e presença de necrose (GARDINER; IMES, 1984) e ainda, infecção no epitélio da mucosa dos ductos e das glândulas do proventrículo de aves com diarreia aguda (BLAGBURN et al., 1990). Esta espécie foi posteriormente classificada como *C. galli* (RYAN et al., 2003).

1.5.7 Infecção em Avestruzes

No estado de São Paulo foram encontrados avestruzes apresentando prolapso de cloaca, associado à presença de mortalidade. Essas aves apresentavam infecção nos epitélios do reto, cloaca e bursa de Fabricius e oocistos com características morfológicas e moleculares (PCR-RFLP) semelhante às de *C. baileyi* (RIEIRA et al., 2003; SANTOS et al., 2005). Análise molecular posterior demonstrou que o isolado de avestruz provavelmente representa uma nova espécie de *Cryptosporidium* relacionada filogeneticamente a *C. baileyi* (MEIRELES et al., 2006).

1.5.8 Infecção em Seres Humanos

Infecção em seres humanos comumente é causada por uma espécie exclusiva do homem, *C. hominis* ou por *C. parvum*, caracterizando uma infecção zoonótica, com inúmeros casos descritos na literatura (MILLARD et al., 1994; SULAIMAN et al., 1998; FAYER et al., 2000; THURSTON-ENRIQUEZ et al., 2002; PREISER et al., 2003).

No entanto, pela utilização de técnicas de biologia molecular, foi possível a identificação de *C. canis* (PIENIAZEK et al., 1999; PEDRAZA-DIAS et al., 2001; CAMA et al., 2003; SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008; XIAO; FENG, 2008) *C. felis* (PEDRAZA-DIAS et al., 2001; CAMA et al., 2003; SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008; XIAO; FENG, 2008), *C. meleagridis* (MCLAUCHLIN et al., 2000; PEDRAZA-DIAS et al., 2000; XIAO et al., 2001; CAMA et al., 2003; SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008; XIAO; FENG, 2008) *C. muris* (GUYOT et al., 2001; TIANGTIP; JONGWUTWES, 2002; SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008), *Cryptosporidium suis* (SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008) e os genótipos suíno (CAMA et al., 2003; XIAO; FAYER, 2008; XIAO; FENG, 2008), cervídeo (ONG et al., 2002; SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008; XIAO; FENG, 2008) e macaco (SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008; XIAO; FENG, 2008) de *Cryptosporidium*

causando infecção em seres humanos, o que demonstra que animais domésticos e silvestres, sejam mamíferos ou aves, podem atuar como fontes de infecção deste parasito para o ser humano, pela contaminação de fontes de água, alimentos, ou para animais domésticos (OLSON et al., 2004; SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008).

Apesar de não haver definição sobre a participação de aves na cadeia epidemiológica de infecções por *C. meleagridis* no homem, essa espécie é considerada como um importante patógeno humano, sendo responsável por vários relatos de infecções no homem (DARABUS, 1997; SRÉTER; VARGA, 2000; CAMA et al., 2003; DARABUS; OLARIU, 2003; XIAO; FENG, 2008). Trabalhos utilizando infecção experimental demonstraram que oocistos de *C. meleagridis* são infectantes para camundongos, ratos, coelhos e bovinos (DARABUS, 1997; SRÉTER; VARGA, 2000; DARABUS; OLARIU, 2003), evidenciando que essa espécie, além de infectar aves, também pode promover infecção em mamíferos. Akiyoshi et al. (2003) demonstraram que um isolado de *C. meleagridis* de origem humana promoveu infecção em camundongos, suínos e bovinos, com infectividade e virulência iguais as de *C. parvum*.

Há relatos de criptosporidiose humana em mais de 90 países localizados em seis continentes (UNGAR, 1990; XIAO et al., 2004; XIAO; FAYER, 2008). Dentre os surtos documentados 31 envolveram mais de 10.000 pessoas, após exposição à água de piscinas (DILLINGHAMA et al., 2002), e um ocorreu na cidade de Milwaukee, nos Estados Unidos, envolvendo aproximadamente 400.000 pessoas, tendo como origem água de bebida contaminada (MACKENZIE et al., 1994).

A ocorrência de vários surtos de criptosporidiose em seres humanos se deve ao fato dos oocistos serem resistentes à inativação em condições ambientais e à ação do cloro utilizado no tratamento de água, ao pequeno tamanho dos oocistos, à baixa dose infectante (menos de 10 oocistos) (OKHUYSEN et al., 1999; SMITH et al., 2007) e ao fato dos oocistos já serem eliminados esporulados nas fezes e, conseqüentemente, na forma infectante. Essas características tornam essa parasitose uma importante causa de surtos relacionados à água de bebida e destinada a lazer, como água de piscinas, a alimentos contaminados, hospitais,

creches e em pessoas que tem contato direto com animais (DILLINGHAMA et al., 2002).

A facilidade de transmissão desse parasito para o ser humano, aliada ao fato da inexistência de um tratamento efetivo para a criptosporidiose, faz com que essa parasitose continue a ser uma importante causa de morbidade e mortalidade, principalmente em seres humanos imunossuprimidos e crianças em países em desenvolvimento (LEAV et al., 2003; ASHBOLT, 2004; XIAO; FAYER, 2008).

A contaminação da água de bebida provém de várias fontes, como esgoto, rios, lagos (FAYER et al., 2000) e fezes de animais, como bovinos (PENG et al., 1997) e possivelmente animais silvestres (GRACZYK et al. 1997a,b, 1998).

Segundo Anderson (1985); Fayer et al. (1998) e Jenkins et al. (2003) os oocistos eliminados nas fezes permanecem infectantes no meio ambiente por até seis meses em temperatura de 20° C, três meses entre 25-30° C e sete meses quando armazenados em água a 15° C, o que demonstra que as fezes podem representar uma importante forma de veiculação de oocistos entre os animais domésticos ou silvestres, a água destinada à bebida ou recreação e alimento humanos (DUFFY; MORIARTY, 2003).

Existem inúmeros relatos de criptosporidiose em seres humanos no Brasil, principalmente em crianças e pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (SAUDA et al., 1993; OSHIRO et al., 2000; PEREIRA et al., 2002; BRANTLEY et al., 2003). Schnack et al. (2003), encontraram positividade em 85% das amostras fecais de crianças analisadas na cidade de Criciúma-SC. Newman et al., 1993, em estudo realizado em uma favela em Fortaleza-CE, endêmica para criptosporidiose, detectaram oocistos de *Cryptosporidium* sp. nas fezes de animais domésticos e na água de bebida. Por meio da utilização do teste de ELISA, Silva et al. (2003) encontraram positividade de 5,8% em pacientes humanos portadores do vírus da imunodeficiência adquirida na cidade de Uberlândia – MG.

Franco et al. (2001) encontraram oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* na água de um rio que abastece a cidade de Campinas-SP, pela utilização

da técnica de imunofluorescência. Utilizando essa mesma técnica Franco e Cantusio Neto (2002) detectaram oocistos de *Cryptosporidium* sp. em água mineral comercializada na cidade de Campinas – SP.

A contaminação da água pode ter como origem oocistos presentes nas fezes humanas ou animais. O’Handley et al. (1999) observaram que bovinos infectados com *C. parvum* podem eliminar até 10 bilhões de oocistos por grama de fezes.

Meireles et al. (2006) encontraram oocistos de *C. parvum* em fezes de capivaras, indicando que esses animais, ao defecar na água de rios e lagos, também poderiam servir como fonte de infecção do *C. parvum* para o homem. Esses oocistos foram posteriormente classificados como pertencentes a um subtipo zoonótico de *C. parvum* (MEIRELES et al., 2007).

Além da contaminação da água, surtos de criptosporidiose podem se originar após ingestão de alimentos contaminados. Oocistos de *Cryptosporidium* sp. já foram encontrados em mariscos (JOHNSON et al., 1995), mexilhões, ostras (FAYER et al, 1999; GRACZYK et al., 1999), leite (GELLETLIE et al., 1997), legumes e vegetais como coentro, alface, rabanete, tomate, pepino, cenoura (MONGE; CHINCHILA, 1996), manjeriço, repolho, aipo, cebolinha, pimenta malagueta, alho poró e salsa (ORTEGA et al., 1991). Surtos de criptosporidiose podem estar inclusive relacionados a alimentos industrializados, como bebidas (MILLARD et al., 1994).

Não existe nenhum estudo mais abrangente na literatura sobre a epidemiologia da infecção por *Cryptosporidium* sp. em aves domésticas, silvestres ou exóticas. Esses animais, além de apresentarem morbidade e mortalidade na presença de criptosporidiose, possivelmente poderiam servir como fonte de infecção de *Cryptosporidium* para o homem, particularmente *C. meleagridis*.

1.6 Diagnóstico

A experiência é um fator fundamental e deve ser levada em conta para diagnóstico de criptosporidiose, uma vez que dentro o filo Apicomplexa, os oocistos e outros estágios de desenvolvimento do gênero *Cryptosporidium* estão entre os menores entre os coccídios que infectam aves e também pelo fato de que os oocistos são muito similares a leveduras em tamanho e forma, podendo levar a resultados falso-positivos (SRÉTER; VARGA, 2000; FAYER et al., 2001; XIAO et al., 2004).

1.6.1 Detecção de Oocistos

O método mais barato e geralmente de escolha para a detecção de oocistos a partir de amostras fecais é o método de centrífugo-flutuação em solução de Sheather (CURRENT, 1990). As amostras devem ser examinadas rapidamente, uma vez que longas exposições dos oocistos a soluções de alta densidade podem resultar em resultados errôneos devido à ocorrência de distorções ou rompimento da parede dos oocistos. Para visualização dos oocistos, pode ser utilizada a microscopia óptica de campo claro ou de contraste de fase (XIAO; FENG, 2008). Os oocistos são visualizados como corpos brilhantes contendo grânulos negros, quando visualizados em contraste de fase; em microscópio de campo claro, os oocistos aparecem translúcidos, muitas vezes como estruturas levemente róseas, contendo grânulos em seu interior. A diferenciação de leveduras nesse tipo de leitura é fácil, uma vez que não irão apresentar essa coloração rósea típica de *Cryptosporidium* e nem grânulos interiores (CURRENT, 1999; SRÉTER; VARGA, 2000).

Outras técnicas utilizadas para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* são a coloração negativa com verde malaquita, na qual os oocistos são visualizados como corpos brilhantes envoltos por um fundo verde (ELLIOT et al., 1999), e a técnica de Kinyoun (álcool ácido resistente), na qual os oocistos apresentam coloração rósea a vermelha, contra um fundo verde.

Apesar de oocistos de *C. baileyi*, *C. galli* e *C. meleagridis* apresentarem morfologia e morfometria distintas, não é possível a definição da espécie somente pela análise de características morfológicas ou morfométricas.

A análise morfológica de oocistos do gênero *Cryptosporidium* não é definitiva para diagnóstico, pois os oocistos são muito pequenos (4-8 μm), com pequena variação morfológica ou mesmo idênticos entre as diferentes espécies, sem esporocistos e difíceis de serem visualizados (MORGAN et al., 1999; FAYER et al., 2000). Além disso, os antígenos presentes na parede de oocistos são conservados para todo o gênero *Cryptosporidium*, não sendo possível a diferenciação entre espécies, por testes imunológicos (FAYER et al., 2000).

1.6.2 Detecção de Estágios Evolutivos

Várias técnicas de coloração podem ser empregadas para visualização de *Cryptosporidium* em tecidos. A técnica mais utilizada para coloração de cortes histológicos é a hematoxilina-eosina (HE), na qual os estágios evolutivos podem ser visualizados como corpos esféricos basófilos, de 2,0 - 7,5 μm , na superfície das células epiteliais (dependendo do estágio do ciclo biológico). Outras técnicas que podem ser utilizadas são colorações à base de prata e ácido periódico de Schiff. A microscopia eletrônica de transmissão pode ser utilizada para visualização de morfologia ultra-estrutural desse parasito (SRÉTER; VARGA, 2000).

1.6.3 Sorologia e Biologia Molecular

A análise da especificidade por espécies é útil no estudo da taxionomia do gênero *Cryptosporidium*, mas requer grande quantidade de oocistos e disponibilidade de animais e instalações para manutenção das várias espécies a serem infectadas (FAYER et al., 2000).

Vários métodos podem ser utilizados para o diagnóstico de criptosporidiose. Dentre esses métodos, se destacam o ensaio imunoenzimático (ELISA) (FAYER et al., 2000; SILVA et al., 2003; JEX et al., 2008), utilizado como uma boa ferramenta em estudos epidemiológicos, e o teste de imunofluorescência direta (FAYER et al., 2000; BIALEK et al., 2002; JEX et al., 2008), ambos baseados em princípios imunológicos. Métodos baseados em princípios moleculares também podem ser utilizados, e dentre eles podemos citar a PCR (BALATBAT et al., 1996; MORGAN; THOMPSON, 1998; JEX et al., 2008).

O custo geralmente elevado de técnicas de biologia molecular e sorológicas, quando comparado ao custo de métodos de identificação morfológica de *Cryptosporidium*, em amostras fecais, faz com que métodos diagnósticos baseados em princípios imunológicos e principalmente moleculares, para diagnóstico de *Cryptosporidium* spp., não sejam utilizados rotineiramente em laboratórios de diagnóstico.

Levando em consideração a baixa sensibilidade do diagnóstico coprológico e a impossibilidade de diferenciação entre espécies pelos métodos imunológicos, as técnicas baseadas em técnicas moleculares, como a PCR, e a técnica de poliformismo no comprimento de fragmentos de Ácido Desoxirribonucléico gerados por enzimas de restrição (RFLP) e/ou sequenciamento automático de ácidos nucleicos, podem oferecer uma alternativa eficiente para diferenciação das espécies de *Cryptosporidium* (SRÉTER; VARGA, 2000; JEX et al., 2008). O único método de diferenciação confiável, entre as diferentes espécies de *Cryptosporidium*, é a caracterização genética dos isolados (SARGENT et al., 1998; MORGAN et al., 1999; JEX et al., 2008).

A caracterização molecular de *Cryptosporidium* é realizada mais comumente por meio da PCR e suas variantes, seguida da técnica de RFLP ou de sequenciamento dos fragmentos amplificados. Os *loci* utilizados com mais frequência são o gene da subunidade 18S do gene do rRNA (18S rRNA), que apresenta cinco cópias por genoma e menor polimorfismo, pelo fato de apresentar evolução mais lenta, sendo portanto, o *locus* de escolha para amostras de animais que podem estar infectados por espécies ou genótipos ainda não classificados (SPANNO et al., 1998; XIAO et al., 1999a; MORGAN et al., 2000a; XIAO et al., 2000).

Outros *loci* que podem ser utilizados são aqueles com maior polimorfismo, como os genes da actina e da proteína do choque térmico (HSP-70 (MORGAN et al., 1999; XIAO et al., 1999b; XIAO et al.; 2000; MORGAN-RYAN et al., 2002). Esses dois *loci* apresentam alto polimorfismo intra-espécies e, conseqüentemente, são muito úteis na análise genética de espécies ou genótipos geneticamente similares como *C. baileyi* e *Cryptosporidium* sp. de avestruzes (XIAO et al., 2004).

2 OBJETIVOS

O projeto teve com objetivo geral determinar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de aves domésticas e de aves exóticas mantidas em cativeiro, provenientes de várias regiões do Brasil, e realizar sua caracterização molecular.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Amostras de Fezes

Foi colhido um total de 905 amostras de aves domésticas e 61 amostras de aves exóticas. As amostras foram colhidas em criatórios comerciais nos municípios de Araçatuba, Guaraçaí, Magé, Promissão e São Paulo, de criatórios conservacionistas no município de Mairiporã e de *pet shops* nos municípios de Araçatuba, Santos e São Paulo. Também foram obtidas amostras de Clínicas Veterinárias particulares, nas cidades de Curitiba-PR e São Paulo-SP, da rotina de atendimento do laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Odontologia da UNESP campus de Araçatuba (FO-UNESP), do Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da FMVZ-USP, do Ambulatório de Aves do Hospital Veterinário da FMVZ – USP (HOVET-USP), do Setor de Animais Silvestres do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, campus Jaboticabal (FCAV-UNESP), dos Zoológicos de Bauru e de São José do Rio Preto, no estado de São Paulo, do Zoológico de Goiânia, em Goiás, do Parque das Aves em Foz do Iguaçu, do Orquidário de Santos e do Sanear (Saneamento de Araçatuba), além de propriedades rurais dos municípios de Araçatuba, Itatiba, Magé, Marília, Pedro de Toledo e Valparaíso.

A escolha das espécies a serem pesquisadas teve como critérios a possibilidade de transmissão de *Cryptosporidium* de forma direta ou indireta para o ser humano ou, ainda, foram escolhidas espécies que apresentam problemas clínicos ou mortalidade devido à infecção por *Cryptosporidium*, como avestruzes, codornas, faisões, galinha doméstica e perus e algumas espécies de psitacídeos e passeriformes. Em relação às aves exóticas, foram colhidas amostras de espécies disponibilizadas durante o experimento. Assim, as amostras foram provenientes de 18 famílias de aves (Anatidae, Cardinalidae, Casuariidae, Cathartidae, Columbidae, Cracidae, Estrildidae, Fringillidae, Gruidae, Musophagidae, Numididae, Passeridae, Phasianidae, Psittacidae, Strigidae, Struthionidae, Sturnidae e Timaliidae).

Como não há dados sobre a ocorrência de *Cryptosporidium* em aves domésticas, silvestres ou exóticas, no Brasil, o maior número possível de amostras foi colhido, de acordo com a disponibilidade.

As amostras de fezes foram processadas no Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal (DCCRA) da Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária, da Universidade Estadual Paulista (FOA-UNESP) campus de Araçatuba.

3.2 Concentração e Purificação de Oocistos de *Cryptosporidium* spp.

As amostras foram coletadas em frascos coletores universais de 100 mL, em tubos tipo Falcon de 15 mL ou de 50 mL ou em microtubos tipo Eppendorf de 1,5 mL e 2,0 mL, de acordo com a quantidade disponível, e armazenadas em solução de bicromato de potássio 2,5% (concentração final), sob refrigeração a 4°C. As amostras de aves de galinha doméstica e de avestruz, devido ao maior volume, foram previamente coadas utilizando-se peneiras de plástico descartáveis. Para concentração e purificação de oocistos foi utilizada a técnica de centrífugo-flutuação em solução de Sheather (CURRENT, 1990), como descrito a seguir. Uma alíquota de aproximadamente 1 a 2 gramas (g) de fezes diluídas em 0,1% Tween 20, com volume final de 2,5 mL, foi adicionada a um tubo tipo Falcon de 15 mL e homogeneizada vigorosamente em vortex. A esse tubo foram adicionados 7,5 mL de solução de Sheather, até o volume de 10 mL (proporção 1:4), seguindo-se homogeneização em vortex e centrifugação a 800 g, por 10 minutos, em temperatura ambiente. Cerca de 1,5 mL da parte superior do sobrenadante foi transferido para outro tubo tipo Falcon de 15 mL, já adicionado de 13,5 mL de 0,1% Tween 20, homogeneizado por inversão e centrifugado a 2.000 g, por 10 minutos, com posterior descarte do sobrenadante e recuperação do sedimento, ao qual foram adicionadas duas gotas de 0,1% Tween 20.

3.3 Pesquisa de Oocistos de *Cryptosporidium* pela Coloração Negativa com Verde Malaquita (ELLIOT et al., 1999)

No sedimento resultante do processo de purificação, a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. foi pesquisada em 436 amostras de aves domésticas e em 27 amostras de aves exóticas, por meio da técnica de coloração negativa com verde malaquita (ELLIOT et al., 1999), na qual 20 microlitros (μL) de cada amostra foram homogeneizados com 20 μL de verde malaquita 5% e examinados em microscopia óptica com objetiva de 20 X e 40 X.

As amostras positivas à microscopia foram transferidas para um microtubo de 1,5 mL, lavadas por centrifugação com solução Tampão Tris-EDTA (TE) (10 milimolar (mM) Tris-Cl, 1mM Ácido Etileno Diamino Tetracético (EDTA)) a 12.000 gravidades (*g*), por três minutos, até o desaparecimento completo de qualquer resquício da solução de bicromato de potássio, e o sedimento resultante após o último descarte do sobrenadante foi congelado a -20°C , para posterior extração de DNA genômico de *Cryptosporidium* spp.

3.4 Extração de DNA Genômico de Oocistos de *Cryptosporidium* spp.

O DNA genômico de oocistos foi extraído por meio de técnica descrita por Meireles et al. (2007), com adaptações no volume final (150 μL), conforme descrição a seguir.

O sedimento resultante do processo de concentração e purificação em solução de Sheather foi diluído em 200 μL de tampão de lise [(12,5% chelex 100[®] Bio-rad, Hercules, Califórnia, USA), 1% polivinilpirrolidona (PVP) K-90 (USB, Cleveland, Ohio, USA), 10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA] + 10 μL de 10% dodecil sulfato de sódio (SDS) e vortexado vigorosamente. Os microtubos foram incubados a 99°C , por 20 minutos, com agitação a 900 rotações por minuto (rpm), e em

seguida foram adicionados 30 μL de 10% PVP (em 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA), 66,6 μL de hidróxido de potássio (KOH) 1M e 18,6 μL de dithiothreitol 1 M, com agitação dos tubos em vortex e incubação a 65° C, por 20 minutos, sob agitação constante a 900 rpm, seguindo-se a neutralização do potencial hidrogeniônico (pH) da suspensão com 8,5 μL de 25% ácido clorídrico (HCl). Para remoção de proteínas e lipídeos, 1000 μL de tampão L6 (4 molar (M) isotiocianato de guanidina (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA), 1% triton X-100) foram adicionados à suspensão, que foi incubada em temperatura ambiente, por 10 minutos, e em seguida centrifugada a 12.000 g por três minutos, para remover o chelex e os debris. O sobrenadante resultante foi recolhido e transferido para outro microtubo, ao qual foram adicionados 100 μL de sílica (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), seguindo-se incubação, em temperatura ambiente, por 10 minutos, com homogeneização periódica, por inversão. Após esse período os microtubos foram centrifugados a 12.000 g, por três minutos, e o sobrenadante foi descartado em seguida. Assim, a sílica presente no sedimento foi lavada 2 vezes, por centrifugação a 12.000g, com 200 μL de tampão L2 (4M isotiocianato de guanidina), 2 vezes com 200 μL de 80% etanol e 1 vez com 200 μL de 100% acetona. O microtubo foi invertido para descarte da acetona e colocado em termomixer a 58° C por 10 minutos, com a tampa aberta, para evaporação da acetona restante no sedimento. Com o objetivo de recuperação do DNA, 150 μL de água ultra-pura foram adicionados à sílica, com incubação por 10 minutos a 58° C, sob agitação a 900 rpm. Após esse processo, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por três minutos e o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para outro microtubo e armazenado a -20° C.

O DNA extraído de amostras puras de *C. parvum* BR-01 (isolado de bovinos no Brasil) foi utilizado como controle positivo na *nested*-PCR (n-PCR). Água ultra-pura foi utilizada como controle negativo.

3.5 Reação de n-PCR para Amplificação de Fragmento da 18S rRNA (XIAO et al., 1999a; 1999b e 2000b)

A pesquisa de DNA de *Cryptosporidium* spp. foi realizada em 47 amostras submetidas à realização prévia de microscopia, com resultado positivo para oocistos de *Cryptosporidium*, e em outras 503 amostras, sem realização prévia de microscopia.

Para amplificação de fragmentos do gene da 18S rRNA foi utilizada a técnica de n-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 pares de bases (pb)) 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 pb), nas seguintes condições de reação: preparação de 25 µL de solução contendo 2,5 µL de tampão para PCR 1 x, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 unidade (U) de Taq DNA polimerase, 200 micromolar (µM) de cada desoxiribonucleotídeo, 100 nanomolar (nM) de cada oligonucleotídeo (*primer*), 5 µL de DNA alvo na reação primária e 2,5 µL de DNA na reação secundária. As amostras foram submetidas à desnaturação inicial de DNA a 94° C por 3 minutos, seguida de 34 ciclos, cada um consistindo em desnaturação a 94° C por 45 segundos (s), 45 s de anelamento a 50° C e 60 s de extensão a 72° C, com extensão final a 72° C por 7 minutos.

3.6 Reação de n-PCR para Amplificação de Fragmento do Gene da Actina (SULAIMAN et al., 2002)

A PCR para amplificação de fragmento do gene da actina foi realizada em amostras previamente positivas, na PCR, para o gene da subunidade 18S do rRNA.

Foi utilizada a técnica de n-PCR com os *primers* 5' ATG RGW GAA GAA GWA RYW CAA GC 3' e 5' AGA ARC AYT TTC TGT GKA CAA T 3', para a reação

primária (~1095 pb) e 5'CAA GCW TTR GTT GTT GAY AA 3' e 5' TTT CTG TGK ACA ATW SWT GG 3' para a reação secundária (~1066 pb), nas seguintes condições de reação: preparação de 25 µL de solução contendo 2,5 µL de tampão para PCR 1x, 3,0 mM MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase, 200 µM de cada desoxiribonucleotídeo, 200 nM de cada oligonucleotídeo (*primer*), 5 µL de DNA alvo na reação primária e 2,5 µL de DNA na reação secundária. As amostras foram submetidas à desnaturação inicial do DNA a 94° C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos, cada um consistindo em desnaturação a 94° C por 45 s, 45 s de anelamento a 45° C e 60 s de extensão a 72° C, com extensão final a 72° C por 10 minutos.

3.7 Sequenciamento dos Fragmentos Amplificados

Os fragmentos resultantes das reações secundárias da n-PCR, para os genes da 18S rRNA e da actina, foram purificados utilizando-se o *kit* de purificação de DNA "GFX PCR DNA band purification[®]" (GE Health Sciences, Champaign, Illinois, USA) e submetidos a sequenciamento utilizando-se o DYEnamic[®]ET *dye terminator Cycle Sequencing Kit[®]* (GE Health Sciences, Champaign, Illinois, USA). As reações de sequenciamento foram realizadas em sequenciador automático MegaBACE[®] (GE Health Sciences, Champaign, Illinois, USA), em duplicata e nas duas direções, utilizando-se os *primers* da reação secundária da n-PCR.

3.8 Alinhamento e Tradução das Seqüências de Nucleotídeos e Edição Final

A determinação das seqüências consenso foi realizada por meio do programa Codoncode Aligner v. 2.0.4 (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts, USA). Foram considerados somente os nucleotídeos com valor de qualidade de sequenciamento maior ou igual a 20.

Após a determinação das seqüências consenso, as mesmas foram alinhadas manualmente com o auxílio dos programas Clustal W (THOMPSON et al., 1997) e BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999), tomando-se como base seqüências homólogas disponíveis no *GenBank*.

3.9 Obtenção das Árvores Genealógicas

As análises genealógicas, incluindo as seqüências de nucleotídeos das amostras de *Cryptosporidium* obtidas neste trabalho, bem como as seqüências de outros isolados de origem humana e animal, disponíveis no *GenBank*, foram conduzidas utilizando-se o programa MEGA versão 3.0 (KUMAR et al., 2004).

Para análise genealógica foi utilizado o método de agrupamento de vizinhos, após cálculo de distância genética com o método de Kimura 2-parâmetros. Na construção das árvores genealógicas, *Eimeria tenella* e *Plasmodium falciparum* foram utilizados como grupo externo para o gene do rRNA e da actina, respectivamente.

A determinação da confiabilidade da topologia resultante da análise filogenética foi conduzida com o cálculo de valores de *bootstrap*, utilizando-se 1000 réplicas.

4 RESULTADOS

As amostras de fezes foram colhidas de acordo com a disponibilidade de espécies e da idade das aves presentes nos diversos locais de colheita. Desse modo, a grande maioria das amostras foi proveniente de aves adultas, e quando possível de aves mais jovens.

De acordo com a Tabela 1, pela análise microscópica, de 436 amostras provenientes de aves domésticas, 45 (10,32%) apresentaram resultado positivo (Figura 3) e 391 (89,68%) foram negativas para a presença de oocistos de *Cryptosporidium*. De um total de 27 amostras provenientes de aves exóticas, duas (7,41%) apresentaram resultado positivo e 25 (92,59%) foram negativas para a presença de oocistos de *Cryptosporidium*. Assim, o número de amostras positivas à microscopia foi de 47 (10,15%) amostras de um total de 463 amostras de fezes examinadas.

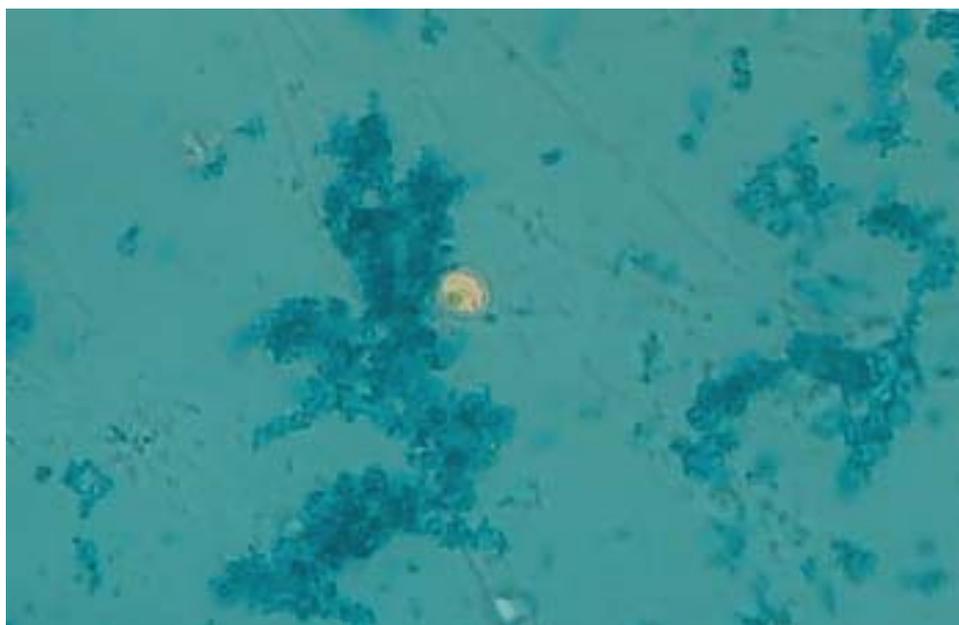


Figura 3 – Amostra de fezes de calopsita com um oocisto de *C. galli*. Coloração negativa com verde malaquita – 40 X.

Tabela 1 - Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* em fezes de aves domésticas e de aves exóticas, pela técnica de coloração negativa com verde malaquita.

(continua)

Espécie	Amostras examinadas	Amostras Positivas	Amostras Negativas
<i>Acryllium vulturinum*</i>	1	-	1
<i>Agapornis roseicollis</i>	7	-	7
<i>Agapornis personata</i>	2	-	2
<i>Aix galericulata</i>	3	1	2
<i>Aix sponsa</i>	1	-	1
<i>Alectoris chukar</i>	1	1	-
<i>Anas platyrhynchos</i>	5	1	4
<i>Anas SP.</i>	5	1	4
<i>Anser SP.</i>	12	-	12
<i>Cacatua Alba*</i>	1	-	1
<i>Cacatua goffini*</i>	2	-	2
<i>Cacatua tenuirostris*</i>	5	-	5
<i>Cairina moschata</i>	10	2	8
<i>Chloebia gouldiae</i>	2	-	2
<i>Chrysolophus amherstiae</i>	3	-	3
<i>Chrysolophus pictus</i>	13	4	9
<i>Columba Livia</i>	1	-	1
<i>Coturnix coturnix</i>	2	-	2
<i>Ecletus roratus*</i>	2	-	2
<i>Eos bornea*</i>	2	-	2
<i>Gallus gallus domesticus</i>	135	17	118
<i>Geopelia cuneata</i>	5	-	5
<i>Gracula religiosa*</i>	3	-	3
<i>Lonchura striata domestica</i>	1	-	1
<i>Lophura nycthemera</i>	3	-	3
<i>Lophura swinhoii*</i>	1	-	1
<i>Lorius cardinalis*</i>	1	-	1
<i>Lorius chlorocercus*</i>	3	2	1
<i>Meleagris gallopavo</i>	13	1	12
<i>Melopsitacus undulatus</i>	22	-	22
<i>Neophema bourkii</i>	1	-	1
<i>Numida meleagris</i>	4	-	4
<i>Nymphicus hollandicus</i>	29	3	26
<i>Padda oryzivora</i>	4	-	4
<i>Passer domesticus</i>	1	-	1
<i>Pavo cristatus</i>	21	1	20
<i>Pavo muticus</i>	2	-	2
<i>Phasianus colchicus</i>	7	1	6
<i>Phasianus versicolor</i>	2	-	2
<i>Pintagol híbrido</i>	2	-	2
<i>Psephotus haematonotus</i>	3	-	3
<i>Psittacula cyanocephala*</i>	2	-	2
<i>Psittacula krameri</i>	4	-	4
<i>Serinus canaria</i>	79	3	76
<i>Struthio camelus</i>	26	7	19
<i>Syrnaticus reevesii</i>	2	1	1
<i>Tadorna SP.</i>	2	1	1

(conclusão)

Espécie	Amostras examinadas	Amostras Positivas	Amostras Negativas
<i>Taeniopygia guttata</i>	1	-	1
<i>Trichoglossus capistratus</i> *	1	-	1
<i>Trichoglossus haematodus</i> *	2	-	2
<i>Turaco sp.</i> *	1	-	1
Total	463 (100%)	47 (10,15%)	416 (89,85%)

*Aves exóticas

Todas as amostras positivas à microscopia foram submetidas à extração de DNA com posterior amplificação pela n-PCR. Das 47 amostras de aves, positivas à microscopia, 24 (51,06%) foram positivas na n-PCR (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultado da *nested*-PCR para o gene da subunidade 18S do rRNA em amostras de fezes de aves domésticas e de aves exóticas, positivas para oocistos de *Cryptosporidium*, por meio de microscopia

Espécie	Amostras positivas na Microscopia	Amostras positivas na PCR	Resultados falso negativos na PCR
<i>Aix galericulata</i>	1	1	-
<i>Alectoris chukkar</i>	1	-	1
<i>Anas platyrhynchos</i>	1	-	1
<i>Anas sp.</i>	1	1	-
<i>Cairina moschata</i>	2	-	2
<i>Chrysolopus pictus</i>	4	3	1
<i>Gallus domesticus</i>	17	10	7
<i>Lorius chlorocercus</i> *	2	-	2
<i>Meleagris gallopavo</i>	1	-	1
<i>Nymphicus hollandicus</i>	3	1	2
<i>Pavo cristatus</i>	1	1	-
<i>Phasianus colchicus</i>	1	-	1
<i>Serinus canaria</i>	3	1	2
<i>Struthio camelus</i>	7	6	1
<i>Syrnaticus reevesii</i>	1	-	1
<i>Tadorna sp.</i>	1	-	1
Total	47 (100%)	24 (51,06%)	23 (48,94%)

*Aves exóticas

No decorrer do experimento optou-se por realizar a extração de DNA, sem a realização prévia de microscopia. Dessa forma, 503 amostras de fezes de foram submetidas à concentração e purificação de oocistos, extração de DNA e PCR, sem realização prévia de microscopia. Dessas amostras, 22 em 469 (4,57%),

correspondentes a aves domésticas apresentaram positividade para DNA de *Cryptosporidium*, enquanto uma em 23 (2,94%) amostras de aves exóticas, apresentou positividade, resultando em 23 (4,57%) amostras positivas em um total de 503 amostras fecais examinadas por meio de extração direta do DNA, seguida da n-PCR para o 18S rRNA (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultado da *nested*-PCR para o gene da subunidade 18S do rRNA, em amostras de fezes de aves domésticas e de aves exóticas, sem realização prévia de microscopia

(continua)

Espécie	Amostras examinadas	Amostras Positivas	Amostras Negativas
<i>Acryllium vulturinum*</i>	1	-	1
<i>Agapornis roseicollis</i>	7	1	6
<i>Agapornis personata</i>	3	-	3
<i>Agapornis SP.</i>	12	-	12
<i>Aix galeruculata</i>	2	-	2
<i>Aix sponsa</i>	1	-	1
<i>Anser SP.</i>	9	3	6
<i>Balearica pavonina*</i>	2	-	2
<i>Cacatua Alba*</i>	1	-	1
<i>Cacatua goffini*</i>	1	1	-
<i>Cacatua molucencis*</i>	1	-	1
<i>Cacatua tenuirostris*</i>	1	-	1
<i>Cairina moschata</i>	1	-	1
<i>Cardinalis cardinalis*</i>	1	-	1
<i>Casuarius bennetti*</i>	3	-	3
<i>Chloebia gouldiae</i>	3	-	3
<i>Chrysolophus pictus</i>	1	1	-
<i>Columba livia</i>	1	-	1
<i>Coturnix japônica</i>	4	-	4
<i>Crax rubra*</i>	2	-	2
<i>Cyanoliseus patagonus*</i>	1	-	1
<i>Cygnus atratus</i>	2	-	2
<i>Dromaius novaehollandiae*</i>	3	-	3
<i>Ecletus roratus*</i>	6	-	6
<i>Gallus gallus domesticus</i>	147	10	137
<i>Geopelia cuneta</i>	1	-	1
<i>Gracula religiosa*</i>	1	-	1
<i>Leiothrix lútea</i>	1	-	1
<i>Lonchura striata domestica</i>	4	-	4
<i>Lophura nycthemera</i>	3	1	2
<i>Melopsittacus undulatus</i>	43	1	42
<i>Nymphicus hollandicus</i>	61	2	59
<i>Numida meleagridis</i>	1	-	1
<i>Padda oryzivora</i>	2	-	2
<i>Passer domesticus</i>	1	-	1

(conclusão)

Espécie	Amostras examinadas	Amostras Positivas	Amostras Negativas
<i>Pavo cristatus</i>	5	-	5
<i>Pavo muticus</i>	4	-	4
<i>Pintagol híbrido</i>	2	-	2
<i>Poephila SP.</i>	2	-	2
<i>Psephotus haematonotus</i>	2	-	2
<i>Psittacula krameri</i>	1	-	1
<i>Psittacus erithacus*</i>	1	-	1
<i>Pulsatrix koeniswaldiana</i>	1	-	1
<i>Serinus canaria</i>	121	3	118
<i>Serinus mozambicus</i>	1	-	1
<i>Struthio camelus</i>	15	-	15
<i>Taeniopygia guttata</i>	6	-	6
<i>Tragopan temmincki</i>	1	-	1
<i>Turaco persa</i>	5	-	5
<i>Vultur gryphus</i>	2	-	2
Total	503 (100%)	23 (4,57%)	480 (95,43%)

*Aves exóticas

Totalizando o número de amostras examinadas pelos dois métodos, 966 foram submetidas à pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium*, sendo que 47 (5,08%) amostras foram positivas na PCR para a subunidade 18S do rRNA (Tabela 4).

Tabela 4 - Total de amostras positivas para o gene da subunidade 18S do rRNA, correspondentes a aves domésticas e a aves exóticas

Espécie	Amostras examinadas	Amostras Positivas	%
Aves domésticas	905	46	5,08
Aves exóticas	61	1	1,64
Total	966	47	4,86

As amostras positivas na n-PCR, para o gene da 18S rRNA, foram submetidas à análise para o gene da actina, com resultado positivo em 37 amostras (Tabela 5).

Nas tabelas 5 e 6 estão representados os resultados do sequenciamento dos fragmentos amplificados pela PCR. Foi realizado sequenciamento de 17 amostras para o gene da subunidade 18S do rRNA e de 19 amostras para o gene da actina.

Foi possível a identificação das três espécies que infectam aves: *C. galli* foi identificado em canário (*Serinus canaria*), em galinha doméstica (*Gallus gallus domesticus*) e em calopsita (*Nymphicus hollandicus*) e *C. meleagridis* e *C. baileyi* em galinha doméstica (*G. g. domesticus*). Foram identificados ainda *Cryptosporidium* genótipo II de aves em avestruzes (*Struthio camelus*), *Cryptosporidium* genótipo I de aves em pavão (*Pavo cristatus*) e em canário (*Serinus canaria*) e *Cryptosporiduium* genótipo III de aves em agapornis (*Agapornis roseicollis*) e em calopsita (*N. hollandicus*).

Tabela 5 - Identificação de *Cryptosporidium* em fezes de aves domésticas e de aves exóticas, pela nested-PCR para os genes da subunidade 18S do rRNA e da actina e sequenciamento dos fragmentos amplificados

Amostra	Espécie de ave	Resultado da PCR		Espécie identificada no sequenciamento	
		18S rRNA	ACTINA	18S rRNA	ACTINA
D131	<i>Struthio camelus</i>	+	+	Genótipo II de aves	Genótipo II de aves
D140	<i>Pavo cristatus</i>	+	+	Genótipo I de aves	Genótipo I de aves
D220	<i>Gallus gallus domesticus</i>	+	-	<i>C. galli</i>	-
D233	<i>G. g. domesticus</i>	+	-	SD	-
D 238	<i>S. camelus</i>	+	+	Genótipo II de aves	Genótipo II de aves
D245	<i>S. camelus</i>	+	+	Genótipo II de aves	Genótipo II de aves
D246	<i>S. camelus</i>	+	+	Genótipo II de aves	Genótipo II de aves
D 250	<i>Nymphicus hollandicus</i>	+	+	<i>C. galli</i>	<i>C. galli</i>
D 256	<i>S. camelus</i>	+	+	Genótipo II de aves	Genótipo II de aves
D 258	<i>S. camelus</i>	+	+	Genótipo II de aves	Genótipo II de aves
D285	<i>Chrysolophus pictus</i>	+	-	SD	-
D286	<i>G. g. domesticus</i>	+	+	SD	SD
D299	<i>C. pictus</i>	+	+	SD	SD
D309	<i>G. g. domesticus</i>	+	+	SD	SD
D312	<i>G. g. domesticus</i>	+	+	SD	SD
D314	<i>G. g. domesticus</i>	+	-	SD	-
D317	<i>G. g. domesticus</i>	+	+	SD	SD
D322	<i>C. pictus</i>	+	+	SD	SD
D341	<i>Anas sp.</i>	+	+	SD	SD
D342	<i>G. g. domesticus</i>	+	+	SD	SD
D354	<i>Aix galericulata</i>	+	+	SD	SD
D356	<i>G. g. domesticus</i>	+	+	SD	SD
D357	<i>C. pictus</i>	+	+	SD	SD
D358	<i>G. g. domesticus</i>	+	+	SD	SD
D 370	<i>Serinus canaria</i>	+	+	<i>C. galli</i>	<i>C. galli</i>
D413	<i>N. hollandicus</i>	+	-	SD	-
D425	<i>Agapornis roseicollis</i>	+	+	Genótipo III de aves	SD
D430	<i>S. canaria</i>	+	+	Genótipo I de aves	Genótipo I de aves
D439	<i>Anser SP.</i>	+	+	SD	SD
D450	<i>S. canaria</i>	+	-	SD	-
D459	<i>Anser SP.</i>	+	+	SD	SD
D460	<i>Anser SP.</i>	+	+	SD	SD
D462	<i>G. g. domesticus</i>	+	+	SD	SD
D464	<i>L. nycthemera</i>	+	+	SD	SD
D483	<i>N. hollandicus</i>	+	-	Genótipo III de aves	-
D503	<i>Serinus canaria</i>	+	-	SD	-
D638	<i>Melopsittacus undulatus</i>	+	+	SD	SD
E106	<i>Cacatua goffini</i>	+	-	SD	-
MS 13	<i>G. g. domesticus</i>	+	+	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>
MS 14	<i>G. g. domesticus</i>	+	+	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>
MS 15	<i>G. g. domesticus</i>	+	+	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>
MS 16	<i>G. g. domesticus</i>	+	+	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>
MS17	<i>G. g. domesticus</i>	+	+	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>
MS 18	<i>G. g. domesticus</i>	+	-	SD	SD
PR 09	<i>G. g. domesticus</i>	+	+	SD	<i>C. meleagridis</i>
PR13	<i>G. g. domesticus</i>	+	+	SD	<i>C. baileyi</i>
PR14	<i>G. g. domesticus</i>	+	+	SD	<i>C. baileyi</i>

SD DNA amplificado em quantidade insuficiente para realização de sequenciamento.

Tabela 6 - Número de pares de base de fragmentos resultantes de amplificação pela nested-PCR, dos genes da actina e da subunidade 18s do rRNA, obtidos neste experimento e dos publicados no *GenBank*, referentes aos genótipos de aves I, II e III

Identificação	Genótipo	Espécie de ave	Gene ^c		Referência Bibliográfica
			Actina	18S rRNA	
DQ650339 ^a	I	<i>Serinus canaria</i>	-	360	Josephine et al. (2006)
DQ650346 ^a	I	<i>S. canaria</i>	493	-	Josephine et al. (2006)
D140 ^b	I	Pavo cristatus	938	673	-
D430 ^b	I	<i>S. camelus</i>	910	770	-
DQ002931 ^a	II	<i>S. camelus</i>	-	653	Meiros et al. (2006)
DQ650340 ^e	II	<i>Eclectus roratus</i> / <i>Eolophus roseicapilla</i>	-	360	Josephine et al. (2006)
D131 ^b	II	<i>S. camelus</i>	-	705	-
D238 ^b	II	<i>S. camelus</i>	971	692	-
D256 e D258 ^b	II	<i>S. camelus</i>	966/984	710 / 711	-
DQ002930 ^a	II	<i>S. camelus</i>	1005	-	Meiros et al. (2006)
DQ650347 ^e	II	<i>E. roratus</i> / <i>E. roseicapilla</i>	493	-	Josephine et al. (2006)
DQ650348 ^a	II	<i>S. camelus</i>	971	-	-
D238 ^b	II	<i>S. camelus</i>	966	-	-
D256 ^b	II	<i>S. camelus</i>	984	-	-
D258 ^b	II	<i>S. camelus</i>	-	-	-
DQ650342 ^e	III	<i>Aratinga solstitialis</i> / <i>Nymphicus hollandicus</i>	-	362	Josephine et al., 2006
DQ650343 ^a	III	<i>Agapornis sp.</i>	-	724	-
D425 ^b	III	<i>N. hollandicus</i>	-	733	-

^a Identificação no *GenBank*.

^b Amostras deste experimento.

^c Número de pares de base.

A análise filogenética dos fragmentos amplificados pela PCR, para os genes da 18S rRNA e da actina (Figuras 1 e 2), para determinar a relação genética entre os isolados de *Cryptosporidium* deste experimento e de outras espécies deste protozoário, pelo método de agrupamento de vizinhos, demonstrou que todos os isolados, com exceção de *C. galli* e do genótipo III de aves, se localizaram juntamente com os parasitas intestinais na árvore filogenética.

Os sete isolados de galinha doméstica foram agrupados juntamente com *C. baileyi* e apresentaram 100% de similaridade genética com essa espécie. Um

isolado de galinha doméstica apresentou similaridade de 100% com *C. meleagridis*, apesar de ter havido uma substituição (transição) do nucleotídeo C para o nucleotídeo T, na posição 846, correspondente à sequência AF382351, publicada no *GenBank*.

Para os dois genes, os isolados de agapornis e de calopsita apresentaram similaridade genética de 100% com o genótipo III de aves; já os isolados de pavão e canário apresentaram similaridade genética de 100% com o genótipo I de aves, o que explica a sua localização ao lado desses genótipos, nas árvores filogenéticas. Os seis isolados de avestruzes apresentaram similaridade genética de 100% com o genótipo II de aves. Os três isolados de *C. galli* de galinha doméstica, calopsita e canário apresentaram similaridade genética de 99,99% a 100%, no gene da subunidade 18S do rRNA (Tabela 7) e de 100% no gene da actina, inclusive com sequências de outros isolados de *C. galli*, presentes no *GenBank*.

Tabela 7 - Alinhamento das sequências de *C. galli*, mostrando os sítios de polimorfismo no gene da subunidade 18S do rRNA

Sequência	Alinhamento					
	144	154	314	324	524	534
AY168846
AY168846	ACAGGGCCTACCGGTCTTGTA		ATTATCACCAAGGTAATAATA		ACAGTCAGAG-TGAAATT	
AY168847T.....G.....
AY168848-.....
D220G.....
D250A.....T.....T.....G.....
D370T.....G.....

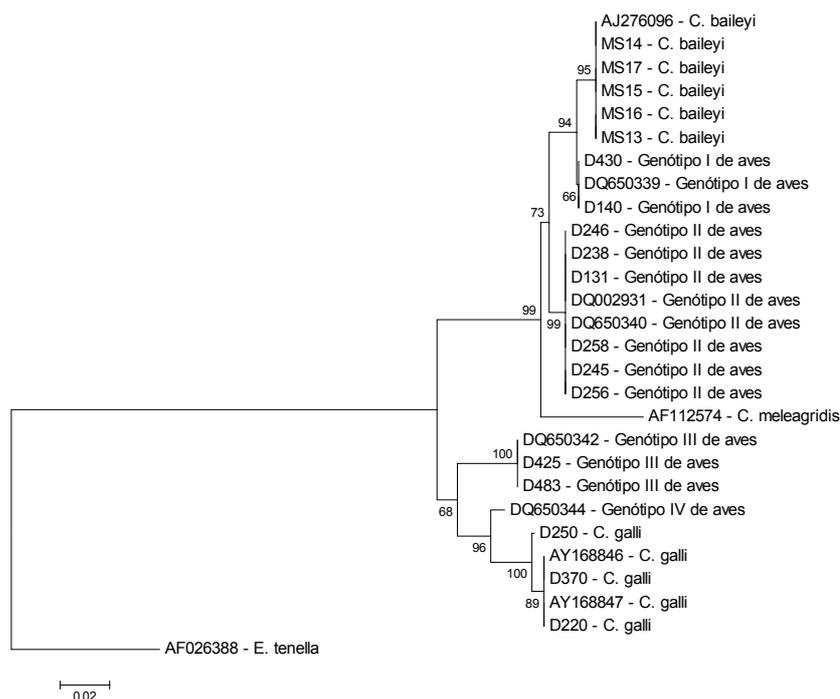


Figura 1 – Árvore filogenética de seqüências do gene do 18S rRNA de *Cryptosporidium* de aves identificados neste experimento e de outras espécies de *Cryptosporidium* disponíveis no *GenBank*. Árvore de consenso utilizando-se o método de agrupamento de vizinhos. Os números à esquerda das ramificações indicam os valores de *bootstrap* acima de 50%. A escala indica distância genética de 0,02 nucleotídeos por posição na seqüência.

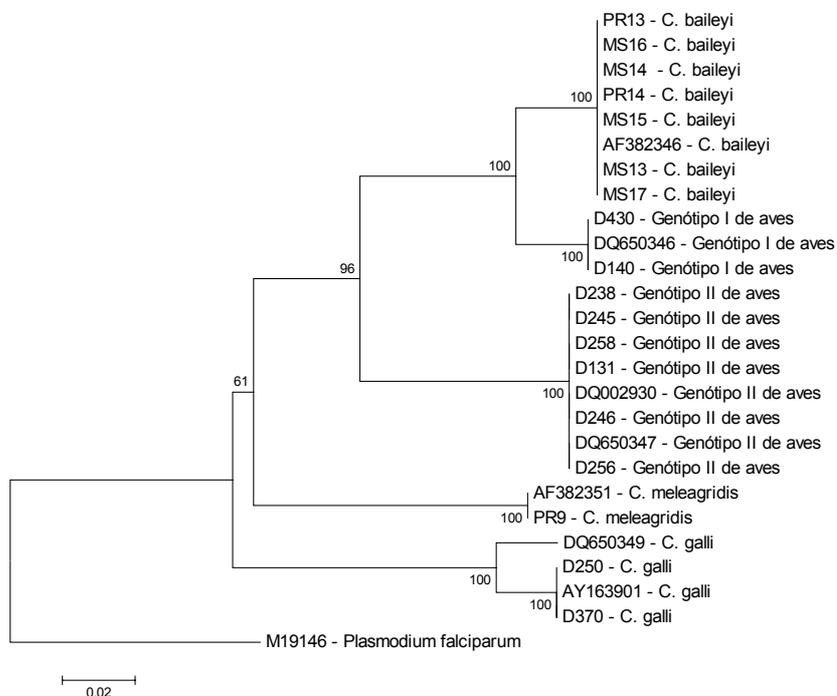


Figura 2 – Árvore filogenética de seqüências do gene da actina de *Cryptosporidium* de aves identificados neste experimento e de outras espécies de *Cryptosporidium* disponíveis no *GenBank*. Árvore de consenso utilizando-se o método de agrupamento de vizinhos. Os números à esquerda das ramificações indicam os valores de *bootstrap* acima de 50%. A escala indica distância genética de 0,02 nucleotídeos por posição na seqüência.

5 DISCUSSÃO

Devido à baixa ocorrência de positividade nas primeiras amostras observadas à microscopia, foram colhidas, quando possível, amostras de aves mais jovens, já que estas, por serem mais sensíveis à infecção por este protozoário (SRÉTER; VARGA, 2000), eliminam maior quantidade de oocistos nas fezes.

Não há informações na literatura sobre a idade de maior ocorrência de infecção por *C. galli* e *C. meleagridis* em aves. Lindsay et al. (1988) demonstraram maior sensibilidade à criptosporidiose em galinhas de dois a 14 dias de idade, após infecção experimental com *C. baileyi*. No entanto, infecções por algumas espécies de *Cryptosporidium* podem ocorrer com mais frequência em animais adultos, como observado por Fayer et al. (2005) em bovinos naturalmente infectados por *C. bovis*.

Para algumas espécies como perus (*Meleagris gallopavo*), apesar de repetidos esforços para colheita de amostras, foi possível somente a obtenção de pequena quantidade de amostras, uma vez que o acesso às criações comerciais desta espécie é extremamente restrito. Outra dificuldade encontrada se refere às amostras de fezes de codornas (*Coturnix coturnix*), pois é difícil encontrar criações comerciais com animais jovens (4 a 5 semanas de idade) e criados em piso, onde é mais provável que ocorra infecção por *Cryptosporidium* sp., sendo possível a colheita das amostras existentes apenas em *pet shops* que vendem essa espécie de ave.

A técnica de coloração negativa com verde malaquita apresentou resultados satisfatórios para detecção de pequeno número de oocistos no exame direto. Segundo Elliot et al. (1999) essa técnica apresenta sensibilidade para detectar aproximadamente 100 oocistos por grama de fezes e permite identificação de oocistos devido ao brilho característico e morfologia. No entanto, a análise morfológica não permite a identificação precisa da espécie (XIAO et al., 2004; JOSEPHINE et al., 2006; JEX et al., 2008), além de requerer habilidade para detectar os oocistos e consumir muito tempo para o exame (JEX et al., 2008). Desse modo, para identificação da espécie, é necessária a realização de técnicas de

identificação molecular, como a PCR seguida de sequenciamento dos fragmentos amplificados (XIAO et al., 2004; JOSEPHINE et al., 2006).

No presente experimento, entretanto, como muitas vezes a quantidade de fezes era pequena e devido ao baixo número de oocistos em todas as amostras positivas à microscopia (no máximo 2 por lâmina), optou-se então por realizar a extração do DNA sem a realização prévia de microscopia, após concentração e purificação de oocistos pela técnica de centrífugo-flutuação em solução de Sheather, uma vez que resultados obtidos pela microscopia poderiam ser falso-negativos pela presença de pequena quantidade de oocistos por amostra. De acordo com Morgan et al., 1998b e Ramirez et al., 2004, a PCR apresenta maior sensibilidade quando comparada às técnicas convencionais de microscopia.

A análise dos resultados de amostras positivas somente pela microscopia (10,15%), das amostras positivas na PCR em relação ao total de amostras submetidas à microscopia (5,18%) e da PCR realizada sem realização prévia de microscopia (4,57%), demonstrou que, nas condições deste experimento, a microscopia foi mais sensível para detecção de infecção por *Cryptosporidium*. A opção pela realização de microscopia, em estudos epidemiológicos, depende da relação custo-benefício, pois a realização da PCR somente em amostras previamente positivas implica em menor custo, já que os reagentes utilizados para classificação molecular são caros. No entanto, a análise microscópica demanda muito tempo e exige experiência por parte do examinador, o que praticamente inviabiliza sua utilização em estudos com número muito grande de amostras, além do fato de que esse tipo de análise não discrimina a espécie do parasito.

Resultados semelhantes, com baixa ocorrência de infecção, foram relatados na Austrália, no único trabalho publicado sobre epidemiologia molecular de *Cryptosporidium* em aves (JOSEPHINE et al., 2006), no qual foi encontrada positividade para *Cryptosporidium* em 6,25% de um total de 430 amostras de aves examinadas, diretamente por meio da PCR, para os genes da subunidade 18S do rRNA e da actina. Nesse mesmo experimento os autores descreveram quatro novos genótipos de aves (I, II, III e IV), geneticamente distintos das espécies e dos genótipos já identificados.

Os resultados negativos na PCR realizada com DNA extraído de amostras positivas à microscopia provavelmente estão relacionados a substâncias que tem propriedades de inibir a reação de PCR e são co-purificadas com DNA extraído de amostras de fezes, como metais pesados, polifenóis, ácido húmico, dentre outros (CAREY et al., 2004). Além disso, todas as amostras positivas à microscopia apresentaram, no máximo, dois oocistos por lâmina examinada, o que torna extremamente difícil a detecção deste parasito pela PCR, principalmente quando são utilizadas técnicas de extração de DNA sem a utilização de reagentes que removem ou neutralizam substâncias inibidoras da reação de PCR (ROBINSON et al., 2006).

A técnica de extração de DNA adotada neste experimento, utilizando chelex 100 e PVP, para remover inibidores da reação de PCR, lise alcalina da parede dos oocistos, extração de DNA com isotiocianato de guanidina e recuperação do DNA extraído com sílica ativada apresentou excelente sensibilidade, sendo possível, em alguns casos, amplificação positiva em amostras contendo apenas um oocisto presente na lâmina observada à microscopia, o que corresponde a aproximadamente, dependendo da amostra, 1×10^2 a 1×10^4 oocistos presentes no sedimento, após a purificação e concentração de oocistos. No entanto, mesmo com a utilização de inibidores da reação da PCR, no processo de extração, várias amostras positivas à microscopia apresentaram-se negativas na PCR.

Com o intuito de aumentar a sensibilidade da PCR foram realizadas algumas modificações nessa técnica, como aumento na quantidade de DNA genômico adicionado à reação primária, de 2,5 μ L para 5 μ L, diminuição da temperatura de anelamento de 55° C para 50° C e adição de albumina sérica bovina.

As análises morfométrica e morfológica dos oocistos não foram realizadas pelo fato de que, em alguns casos, a quantidade de fezes era pequena e a maioria das amostras positivas à microscopia e na *nested*-PCR apresentava, no máximo dois oocistos por lâmina, impossibilitando assim a classificação morfológica dos oocistos.

No presente estudo foram identificadas as três espécies de *Cryptosporidium* (*C. baileyi*, *C. meleagridis* e *C. galli*) que acometem aves. Apesar de já haver relatos no Brasil sobre a ocorrência de *C. baileyi* infectando galinhas domésticas (*G. g. domesticus*) (MEIRELES; FIGUEIREDO, 1992; CARDOZO et al., 2005), esse é o primeiro relato de identificação molecular nessa espécie no Brasil (MEIRELES; FIGUEIREDO, 1992). Huber et al. (2007) relataram *C. baileyi* infectando codornas e patos.

C. meleagridis foi encontrado em apenas uma amostra de galinha doméstica. Apesar da primeira descrição de infecção por essa espécie estar relacionada a perus (SLAVIN, 1955), *C. meleagridis* também infecta outros mamíferos, incluindo humanos (CAMA et al., 2003; GATEI et al. 2003, XIAO et al., 2004). Xiao et al. (2004), por meio de análise filogenética, sugerem que *C. meleagridis* seja uma espécie originalmente de mamíferos que, posteriormente, através de adaptação a diferentes hospedeiros, adquiriu a capacidade de infectar aves.

Foi possível ainda a identificação *C. galli*, espécie ainda não encontrada em território brasileiro. Os isolados de *C. galli*, conforme esperado, se localizaram juntamente com os parasitas que parasitam o proventrículo, inclusive com outros isolados de *C. galli*, com os quais apresentaram similaridade genética de 99,99%.

Ainda foi possível a identificação de genótipos descritos por Josephine et al. (2006), o genótipo I de aves, encontrado nesse estudo em pavão azul e em canário, e em estudo anterior também em canário, e o genótipo III de aves, encontrado nesse estudo em agapornis e anteriormente encontrado em jandaia sol, cacatua gala e calopsita. Este é o primeiro relato desses genótipos infectando aves, no Brasil.

Em avestruzes foi identificado, em seis aves, um genótipo descrito por Meireles et al. (2006), no estado de São Paulo. Esse mesmo genótipo foi encontrado em calopsitas, cacatuas, papagaio, cacatua gala e jandaia sol na Austrália, sendo denominado genótipo II de aves por Josephine et al. (2006).

Não foi possível identificar algumas espécies de *Cryptosporidium*, por meio da reação de sequenciamento, mesmo em amostras positivas na PCR (Tabela 6). Isso se deve ao fato de que, em muitos casos, quando há um número muito pequeno de

oocistos na amostra, a quantidade de DNA amplificada pela PCR é muito pequena, o que resulta em uma banda fraca na eletroforese e em quantidade insuficiente de DNA para realização da reação de sequenciamento, particularmente quando o número de pares de base dos fragmentos amplificados é alto (actina: ~ 1005 pb; 18S rRNA: ~ 830 pb) (ROBINSON et al., 2006).

Na tentativa de solucionar este problema foi realizada PCR utilizando-se “rampa”, na reação para os genes da subunidade 18S do rRNA e actina, com o intuito de aumentar a sensibilidade da PCR, já que com esta técnica a PCR, em alguns casos, apresenta maior sensibilidade, no entanto, com menor especificidade. Desse modo, foi utilizada redução da temperatura de desnaturação em 1°C/segundo até atingir a temperatura de anelamento de 45° C, a qual após 45 segundos foi elevada 1°C/segundo até atingir a temperatura de extensão a 72°C. Mesmo com essa modificação, as amostras que haviam apresentado bandas fracas na eletroforese continuaram apresentando o mesmo resultado.

A utilização de PCR para amplificação de fragmentos dos genes do 18S rRNA foi utilizada pelo fato do mesmo apresentar baixo polimorfismo, permitindo assim a identificação de todas as espécies e genótipos descritos até o momento, e ampliando a possibilidade de detecção de novos genótipos. A PCR para o gene da actina se justifica pelo fato de que esse gene apresenta alto polimorfismo intra-espécies, o que permite diferenciação mais precisa entre as espécies e genótipos de *Cryptosporidium*. Além disso, a mais recente (e única publicação) de seqüências de novos isolados de aves disponibilizou, no *GenBank*, seqüências de fragmentos dos genes da subunidade 18S do rRNA e da actina (JOSEPHINE et al., 2006), o que permitiu a comparação da composição nucleotídica dos isolados do presente trabalho com seqüências já publicadas.

Por meio dessa comparação foi observado que as seqüências obtidas neste experimento, para ambos os genes analisados, apresentam número de pares de base superior aos encontrados no *GenBank*, para os genótipos I, II e III de aves (Tabela 6).

Os resultados do presente estudo reforçam o conceito de que o gênero *Cryptosporidium* possui grande variedade de genótipos e que alguns genótipos e espécies desse parasito infectam várias espécies de aves.

6 CONCLUSÃO

Infecção por *C. galli*, *C. baileyi*, *C. meleagridis* e por *Cryptosporidium* genótipos I, II e III de aves está presente em aves domésticas e em aves exóticas criadas em cativeiro no Brasil.

A ocorrência de infecção por *Cryptosporidium* em amostras das aves examinadas neste experimento foi baixa.

REFERÊNCIAS

- AKIYOSHI, D. E.; DILO, J.; PEARSON, C.; CHAPMAN, S.; TUMWINE, J.; TZIPORI, S. Characterization of *Cryptosporidium meleagridis* of human origin passaged through different host species. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 1828-1832, 2003.
- ALVAREZ-PELLITERO, P.; QUIROGA, M. I.; SITJÀ-BOBADILLA, A.; REDONDO, M. J.; PALENZUELA, O.; PADRÓS, F.; VÁSQUEZ, S.; NIETO, J. M. *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 62, p. 133-145, 2004.
- ALVES M. A.; XIAO, L.; SULAIMAN, I.; LAL, A. A.; MATOS, O.; ANTUNES, F. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 2744-2747, 2003.
- ANDERSON, B. C. Moist heat inactivation of *Cryptosporidium* sp. **American Journal of Public Health**. v. 75, p. 133-1434, 1985.
- ANTUNES, R. G.; SIMÕES, D. C.; MEIRELES, M. V. Ocorrência de *Cryptosporidium* sp. em pavão (*Pavo cristatus*), calopsita (*Nymphicus hollandicus*) e avestruz (*Struthio camelus*). In: CONGRESSO E XV ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SELVAGENS, 10, 2006, São Pedro. **Anais...** 2006, p. 79.
- ANTUNES, R.G.; SIMÕES, D.C.; NAKAMURA, A.; MEIRELES, M.V. Natural infection with *Cryptosporidium galli* in canaries (*Serinus canaria*), in a cockatiel (*Nymphicus hollandicus*) and in lesser seed-finches (*Oryzoborus angolensis*) from Brazil. **Avian Diseases**, 2008 (in press).
- ARGENZIO, R. A.; LECCE, J.; POWELL, D. W. Prostanoids inhibit intestinal NaCl absorption in experimental porcine cryptosporidiosis. **Gastroenterology**. v. 104, p. 440-447, 1993.
- ASHBOLT, N. J. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. **Toxicology**, v. 198, p. 229-238, 2004.
- BALATBAT, A. B.; JORDAN, G. W.; TANG, Y. J.; SILVA JR., J. Detection of *Cryptosporidium parvum* DNA in human feces by nested PCR. **Journal Clinical Microbiology**, v. 34, p. 1769-1772, 1996.
- BELTON, D. J.; POWEL, I. B. Cryptosporidiosis in love birds (*Agapornis* sp.). **New Zealand Veterinary Journal**, v. 35, p. 15, 1987.

BIALEK, R.; BINDER, N.; DIETZ, K. Comparison of fluorescence, antigen and PCR assays to detect *Cryptosporidium parvum* in fecal specimens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 43, p. 283 - 288, 2002.

BLAGBURN, B. L.; LINDSAY, D. S.; GIAMBRONE, J. J.; SUNDERMANN, C. A.; HOERR, F. J. Experimental cryptosporidiosis in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 66, p. 442-449, 1987.

BLAGBURN, B. L.; LINDSAY, D. S.; HOERR, F. J.; ATLAS, A. L.; TOIVIO-KINNUCAN, M. *Cryptosporidium* sp. infection in the proventriculus of an Australian diamond firetail finch (*Staganoplera bella*: passeriformes, estrilgidae). **Avian Diseases**, v. 34, p. 1027-1030, 1990.

BRANTLEY, R. K.; WILLIAMS K. R.; SILVA T. M.; SISTROM M.; THIELMAN, N. M.; WARD, H.; LIMA, A. A.; GUERRANT, R. L. AIDS-Associated Diarrhea and Wasting in Northeast Brazil is Associated With Subtherapeutic Plasma Levels of Antiretroviral Medications and With Both Bovine and Human Subtypes of *Cryptosporidium parvum*. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 7, p. 16-22, 2003.

CAMA, V. A.; BERN, C.; SULAIMAN, I. M.; GILMAN, R. H.; RICONA, E.; VIVAR, A.; KAWAI, V.; VARGAS, D.; ZHOU, L.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species and genotypes in HIV-positive patients in Lima, Peru. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 50, p. 531-533, 2003.

CARDOZO, V. S.; TEIXEIRA FILHO, W. L.; LOPES, C. W. G. Transmissão experimental de *Cryptosporidium baileyi* (Apicomplexa: Criptosporidiidae) isolado de frango de corte à codorna japonesa (*Coturnix japonica*). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 14, p. 119-124, 2005.

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, p. 122.

CLARK, D. P.; SEARS, C. L. The pathogenesis of cryptosporidiosis. **Parasitology Today**, v. 12, n. 6, p. 221-225, 1996.

CLUBB, S. L. Cryptosporidiosis in the Gouldian finch. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 11, p. 41-42, 1997.

CURRENT, W. L. Cryptosporidiosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 187, p. 1334-1338, 1985.

- CURRENT, W. L. *Cryptosporidium* Species. In: FOWLER, M. E.; MILLER, R. E. **Zoo and wild animal medicine current therapy** 4th ed. Philadelphia, Pennsylvania: W.B Saunders Company, 1999, p. 121-131.
- CURRENT, W. L. Techniques and laboratory maintenance of *Cryptosporidium*. In: DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; FAYER, R. **Cryptosporidiosis of man and animals**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 59-82.
- CURRENT, W. L.; UPTON, S. J.; HAYNES, T. B.: The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. s. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. **Journal of Protozoology**, v. 33, p.289-296, 1986.
- DARABUS, G. Experimental studies of inter and intraspecific transmission of *Cryptosporidium parvum* and *C. meleagridis*. **Revista Romana de Medicina Veterinaria**, v. 7, p. 155-160, 1997.
- DARABUS, G.; OLARIU, R. The homologous and interspecies transmission of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium meleagridis*. **Polish Journal of Veterinary Science**, v. 6, p. 225-228, 2003.
- DILLINGHAMA, R. A.; LIMAB, A. A.; GUERRANT, R. L. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. **Microbes and Infection**. v. 4, p. 1059-1066, 2002.
- DITRISH, O.; PALKOVIC, L.; STERBA, J.; PROKOPIC, J.; LOUDOVÁ, J.; GIBODA, M.: The first finding of *Cryptosporidium baileyi* in man **Parasitology Research**, v. 77, p. 44-47, 1991.
- DOSTER, A. R.; MAHAFFEY, E. A. Cryptosporidia in the cloacal coprodeum of red-lore parrots (*Amazona autumnalis*). **Avian Diseases**, v. 23, p. 654-661, 1979.
- DUFFY, G.; MORIARTY, E. M. *Cryptosporidium* and its potential as a food-borne pathogen. **Animal Health Research Reviews**., v. 4, p. 95-107, 2003.
- EGYED, Z.; SRÉTER, T.; SZELL, Z.; BESZTERI, B.; DOBOS-KOVACS, M.; MARIALIGETI, K.; CORNELISSEN, W. C. A.; VARGA, I. Polyphasic typing of *Cryptosporidium baileyi*: a suggested model for characterization cryptosporidia. **Journal of Parasitology**, v. 88, p. 237-243, 2002.
- ELLIOT, A.; MORGAN, U. M.; THOMPSON, R. C. A. Improved staining method for detecting *Cryptosporidium* oocysts in stools using malachite green. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 45, p. 139-142, 1999.
- FAYER, R.; LEWIS, E. J.; TROUT, J. M. *Cryptosporidium parvum* in oysters from commercial harvesting sites in the Chesapeake bay. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, p. 706-710, 1999.

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

FAYER, R.; SANTÍN, M.; TROUT, J.M. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). **Veterinary Parasitology**, 2008 (in press).

FAYER, R.; SANTIN, M.; XIAO, L. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos Taurus*). **Journal of Parasitology**, v. 91, p. 624-629, 2005.

FAYER, R.; TROUT, J. M.; JENKINS, M. C. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. **Journal of Parasitology**, v. 84, p. 1165-1169, 1998.

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

FRANCO, R. M. B.; CANTUSIO NETO, R. Occurrence of Cryptosporidial Oocysts and *Giardia* Cysts in Bottled Mineral Water Commercialized in the City of Campinas, State of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 205-207, 2002.

FRANCO, R. M. B.; ROCHA-EBERHARDT, R.; CANTUSIO NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia river, Campinas, SP. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 43, p. 109-111, 2001.

GARDINER, C. H.; IMES, G. D. *Cryptosporidium* sp. in the kidneys of a black-throated finch. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 185, p. 1401-1402, 1984.

GATEI, W.; GREENSILL, J.; ASHFORD, R. W.; CUEVAS, L. E.; PARRY, C. M.; CUNLIFFE, N. A.; BEECHING, N. J.; HART, C. A. Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 1458-1462, 2003.

GELLETLIE, R.; STUART, J.; SOLTANPOOR, N.; ARMSTRONG, R.; NICHOLS, G. Cryptosporidiosis associated with school milk. **The Lancet**, v. 350, p. 1005-1006, 1997.

GHARAGOZLOU, M. J.; DEZFOULIAN, O.; RHABARI, S.; BOKAIE, S.; JAHANZAD, I.; RAZAVI, N. E. Intestinal cryptosporidiosis in turkeys in Iran. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 53, p. 282-258, 2006.

GLISSON, J. A.; BROWN, J. R.; BRUGH, T. P.; PAGE, R. K.; KLEVEN, S. H.; DAVIS, R. B. Sinusitis in turkeys associated with respiratory cryptosporidiosis. **Avian Diseases**, v.28, p. 783-790, 1984.

GOODWIN, M. A. Cryptosporidiosis in birds: a review. **Avian Pathology**, v. 18, p. 365-384, 1989.

GOODWIN, M. A. Small-intestinal cryptosporidiosis in a chicken. **Avian Diseases**, v. 32, p. 844-848, 1988.

GOODWIN, M. A.; BROWN, J. Intestinal cryptosporidiosis in chickens. **Avian Diseases**, v. 33, p. 770-777, 1989.

GOODWIN, M. A.; BROWN, J. Histologic incidence and distribution of *Cryptosporidium* sp. infection in chickens: 68 cases in 1986. **Avian Diseases**, v. 32, p. 365-369, 1988.

GOODWIN, M. A.; BROWN, J.; RESURRECION, R. S.; SMITH, A. J. Respiratory coccidiosis (*Cryptosporidium baileyi*) among Northern Georgia broilers in one company. **Avian diseases**, v. 40, p. 572-575, 1996.

GOODWIN, M. A.; KRABILL, U. A. Diarrhea associated with small-intestinal cryptosporidiosis in a budgerigar and in a cockatiel. **Avian Diseases**, v. 33, p. 829-833, 1989.

GORHAM, S. L.; MALLINSON, E. T.; SNYDER, D. B.; ODOR, E. M. Cryptosporidia in the bursa of Fabricius - a correlation with mortality rates in broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 16, p. 205-211, 1987.

GRACZYK, T. K.; CRANFIELD, M. R.; FAYER, R.; TROUT, J.; GOODALE, H. J. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts is retained upon intestinal passage through a migratory water-fowl species (Canada goose *Branta canadensis*). **Tropical Medicine & International Health**, v. 2, p. 341-347, 1997a.

GRACZYK, T. K.; FAYER, R.; CRANFIELD, M. R. Zoonotic transmission of *Cryptosporidium parvum*: implications for water-borne cryptosporidiosis. **Parasitology Today**, v. 13, p. 348-351, 1997b.

GRACZYK, T. K.; FAYER, R.; LEWIS, E. J.; TROUT, J. M.; FARLEY, C. A. *Cryptosporidium* oocysts in bent mussels (*Ischadium recurvum*) in the Chesapeake bay. **Parasitology Research**, v. 85, p. 518-520, 1999.

GRACZYK, T. K.; FAYER, R.; TROUT, J. M. *Giardia* sp. cysts and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in the feces of migratory Canada geese (*Branta canadensis*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 2736-2738, 1998.

GRACZYK, T. K.; SUNDERLAND, D.; TAMANG, L.; SHIELDS, T. M.; LUCY, F. E.; BREYSEE, P. N.: Quantitative evaluation of the impact of bather density on levels of human-virulent microsporidian spores in recreational water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73. p. 4095–4099, 2007.

GUYOT, K.; FOLLET-DUMOULIN, A.; LELIEVRE, E.; SARFATI, C.; RABODONIRINA, M.; NEVEZ, G.; CAILLIEZ, J. C.; CAMUS, D.; DEI-CAS, E. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3472-3480, 2001.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p. 95-98, 1999.

HOERR, F. J.; CURRENT, W. L.; HAYNES, T.B. Fatal cryptosporidiosis in a quail. **Avian Diseases**, v. 30, p. 421-425, 1986.

HUBER, F.; SILVA, S.; BONFIM, 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, p. 65-74, 2007.

ITAKURA, C.; GORYO, M.; UEMURA, T. Cryptosporidial infection in chickens. **Avian Pathology**, v. 13, p. 487-499, 1984.

JACOBSEN, G.; BARCELOS, A. S.; FLORES, M. L.; SEGABINAZI, S. D.; LAGAGGIO, V. R. A. *Cryptosporidium* sp. em intestinos, bursa de Fabricius e traquéia de frangos (*Gallus gallus*). **Ciência Rural**, v. 36, p. 682-684, 2006.

JELLISON, K. L.; DISTEL, D. L.; HEMOND, H. F.; SCHAUER, D. B. Phylogenetic analyses of the hypervariable region of the 18s rRNA gene of *Cryptosporidium* oocysts in feces of Canadá Geese (*Branta Canadensis*): Evidence for five novel genotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 452-458, 2004.

JENKINS, M.; TROUT, J. M.; HIGGINS, J.; DORSHC, M.; VEAL, D.; FAYER, R. Comparison of tests for viable and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Parasitology Research**, v. 89, p. 1-5, 2003.

JEX, A. R.; SMITH, H. V.; MONIS, P. T.; CAMPBELL, B. E.; GASSER, R. B. *Cryptosporidium* – Biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. **Biotechnology Advances** (2008), doi:

10.1016/j.biotechadv.2008.02.003. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18430539>>. Acesso em: 22/05/2008.

JOHNSON, D. C.; REYNOLDS, K. A.; BERBA, C. P. Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in marine waters. **Water Science and Technology**, v. 31, p. 439-442, 1995.

JOSEPHINE, N. G.; PAVLASEK, I.; RYAN, U. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 7548-7553, 2006.

KASSA H.; HARRINGTON B. J.; BISESI, M. S. Cryptosporidiosis: a brief literature review and update regarding *Cryptosporidium* in feces of Canada geese (*Branta canadensis*). **Journal of Environmental Health.**, v. 66, p. 34-40, 2004.

KONDO, N.; SEQUEIRA, J. L.; BORETTI, L. P.; BANDARRA, E. P. *Cryptosporidium* sp. em bursa de Fabricius de frango de corte. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23., 1994, Olinda, **Anais...** 1994. p. 320.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Brief Bioinform**, v. 5, p. 150-163, 2004.

LEAV, B. A.; MACKAY, M.; WARD, H. D. *Cryptosporidium* species: new insights and old challenges. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, p. 906-913, 2003.

LEVINE, N. D. Taxonomy and review of coccidia genus *Cryptosporidium* (Protozoa: Apicomplexa). **Journal of Protozoology**, v. 31, p. 94-98, 1984.

LEY, D. H.; LEVY, M. G.; HUNTER, L.; CORBETT, W.; BARNES, H. J. Cryptosporidia-positive rates of avian necropsy accessions determined by examination of Auramine O-stained fecal smears. **Avian Diseases**, v. 32, p. 108-113, 1988.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L.; HOERR, F. J. Small intestinal cryptosporidiosis in cockatiels associated with *Cryptosporidium baileyi*-like oocysts. **Avian Diseases**, v. 34, p. 791-793, 1990.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L.; HOERR, F. J.; SMITH, P. C. Cryptosporidiosis in zoo and pet birds. **Journal of Protozoology**, v. 38, p. 180S-181S, 1991.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L.; SUNDERMANN, C. A. Morphometric comparison of the oocysts of *Cryptosporidium baileyi* and *Cryptosporidium meleagridis* from birds. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v. 56, p. 91-92, 1989.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L.; SUNDERMANN, C. A.; GIAMBRONE, J. J. Effect of broiler chicken age on susceptibility to experimentally induced *Cryptosporidium baileyi* infection. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n.8, p. 1412-1413, 1988.

LUVIZOTTO, M. C. R.; MEIRELES, M. V.; ANDREATTI FILHO, R. L.; BORETTI, L. P. Alterações histopatológicas na bursa de fábricius de frangos de corte determinadas por *Cryptosporidium* spp. In: JORNADA CIENTÍFICA DA ASSOCIAÇÃO DOS DOCENTES DO CAMPUS DE BOTUCATU-UNESP, 1989, Botucatu, **Anais...** 1989. p. 120.

MACKENZIE, W. R.; HOXIE, N. J.; PROCTOR, M. E.; GRADUS, M. S.; BLAIR, K. A.; PETERSON, D. E.; KAZMIERCZAK, J. J.; ADDISS, D. G.; FOX, K. R.; ROSE, J. B.; DAVIS, J. P. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. **New England Journal of Medicine**, v. 331, p. 161-167, 1994.

MASON, R. W. Conjuntival cryptosporidiosis in a duck. **Avian Diseases**, v. 30, p. 598-600, 1986.

MASON, R. W.; HARTLEY, W. J. Respiratory cryptosporidiosis in a peacock chick. **Avian Diseases**, v. 24, p. 771-776, 1980.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3984-3990, 2000.

MEIRELES, M. V. Ocorrência e caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. Em mamíferos silvestres de vida livre e aves sinantrópicas. 2005. 33 f. Relatório (Pós-doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MEIRELES, M. V.; FIGUEIREDO, P. C. Isolamento e identificação de *Cryptosporidium baileyi*, Current et al., (1986 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em frangos de corte. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 1,2, p. 125-130, 1992.

MEIRELES, M. V.; PAULILLO, A. C.; SILVA, G. S.; COSTA, A. J.; DORETTO JÚNIOR, L.; MACHADO, R. Z. Infecção experimental por *Cryptosporidium baileyi* em aves de corte - Aspectos clínicos, parasitológicos e zootécnicos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** v. 7, p. 11-14, 1998a.

MEIRELES, M. V.; PAULILLO, A. C.; SILVA, G. S.; COSTA, A. J.; LUVIZOTTO, M. C. R.; DORETTO JUNIOR,; AVILA, F. A. Influência da infecção experimental com *Cryptosporidium baileyi* na resposta imune de frangos de corte vacinados contra a doença de Newcastle. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 5, p. 15-19, 1998b.

MEIRELES, M. V.; PAULILLO, A. C.; SILVA, G. S.; LUVIZOTTO, M. C. R.; COSTA, A. J.; ANDREATTI FILHO, R. L. Experimental infection with *Cryptosporidium baileyi* in floor-pen raised broilers. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 1, p. 37-42, 1999.

MEIRELES, M. V.; RODRIGUES, R. L.; CARVALHO, E. C. Q. Criptosporidiose em frangos de corte no município de Bom Jardim, RJ. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.12, nº único, p. 41-42, 1990.

MEIRELES, M. V.; SOARES, R. M.; BONELLO, F.; GENARI, S. M. Natural infection with zoonotic subtype of *Cryptosporidium parvum* in capybara (*Hydrocoerus hydrochaeris*) in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v 147, p. 166-170, 2007.

MEIRELES, M. V.; SOARES, M. R.; SANTOS, M. M. A. B. dos; GENNARI, S. M.; Biological studies and molecular characterization of a *Cryptosporidium* isolate from ostrich (*Struthio camelus*). **Journal of Parasitology**, v. 92, p. 623-626, 2006.

MILLARD, P. S.; GENSHEIMER, K. F.; ADDISS, D. G.; SOSON, D. M.; BECKETT, G. A.; HOUCK-JANKOSKI, A.; HUDSON, A. An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider. **Journal of the American Medical Association**, v. 272, p. 1592-1196, 1994.

MONGE, R.; CHINCHILLA, M. Presence of *Cryptosporidium* oocysts in fresh vegetables. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 202-203, 1996.

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

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. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 289-296, 2001.

MORGAN, U. M.; PALLANT, L.; DWYER, B. W.; FORBES, D. A.; RICH, G.; THOMPSON, R. C. A. Comparison of PCR and Microscopy for detection of

Cryptosporidium parvum in human fecal specimens: clinical trial. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 995-998, 1998b.

MORGAN, U. M.; THOMPSON, R. C. A. PCR detection of *Cryptosporidium*: the way forward? **Parasitology Today**, v. 14, p. 241-245, 1998.

MORGAN, U. M.; XIAO, L.; FAYER, R.; LAL, A. A.; THOMPSON, R. C. A. Variation in *Cryptosporidium*: towards a taxonomic revision of the genus. **International Journal for Parasitology**, v. 29, 1733-1751, 1999.

MORGAN, U. M.; XIAO, L.; LIMOR, J.; GELIS, S.; RAIDAL, S. R.; FAYER, R.; LAL, A.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R. C. *Cryptosporidium meleagridis* in an Indian ring-neck parrot (*Psittacula krameri*). **Australian Veterinary Journal**, v. 78, p. 182-183, 2000a.

MORGAN, U.; WEBER, R.; XIAO, L.; SULAIMAN, I.; THOMPSON, R. C.; NDIRITU, W.; LAL, A.; MOORE, A.; DEPLAZES, P. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1180-1183, 2000b.

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*. **Journal Eukaryotic Microbiology**, v. 49, p. 433-440, 2002.

MURAKAMI, S.; MIYAMA, M.; OGAWA, A.; SHIMADA, J.; NAKANE, T. Occurrence of conjunctivitis, sinusitis and upper region tracheitis in Japanese quail (*Coturnix coturnix*), possibly caused by *Mycoplasma gallisepticum* accompanied by *Cryptosporidium* sp. infection. **Avian Pathology**, v. 31, p. 363-370, 2002.

NACIRI, M. ; MAZZELA, O. Association cryptosporidiose et maladie de Marek chez des poulets nains. **Recueil Médecine Vétérinaire**, v. 164, p. 311-312, 1988.

NEWMAN, R. D.; WUHIB, T.; LIMA, A. A.; GUERRANT, R. L.; SEARS, C. L. Environmental sources of *Cryptosporidium* in an urban slum in northeastern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, p. 270-275, 1993.

O'DONOGHUE, P. J.; THAM, V. L.; SARAM W. G. de; PAULL, K. L.; MCDERMOTT, S. *Cryptosporidium* infections in birds and mammals and attempted cross-transmission studies. **Veterinary Parasitology**, v. 26, p. 1-11, 1987.

O'HANDLEY, R. M.; COCKWILL, C.; MCALLISTER, T. A.; JELINSKI, M.; MORCK, D. W.; OKHUYSEN, P. C.; CHAPPELL, C. L.; CRABB, J. H.; STERLING, C. R.; DUPONT, H. L. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for

healthy adults. **Journal of Infectious Diseases**, v. 180, p. 1275-1281, 1999.

OKHUYSEN, P. C.; CHAPPELL, C. L.; CRABB, J. H.; STERLING, C. R.; DUPONT, H. L. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. **Journal of Infectious Diseases**, v. 180, p. 1275 – 1281, 1999.

OLSON, M. E.; O'HANDLEY, R. M.; RALSTON, B. J.; MCALLISTER, T. A.; THOMPSON, R. C. A. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. **Trends in Parasitology**, v. 20, p. 185-191, 2004.

ONG, C. S. L.; EISLER, D. L.; ALIKHANI, A.; FUNG, V. W. K.; TOMBLIN J.; BOWIE, W. R.; ISSAC-RENTON, J. L. Novel *Cryptosporidium* genotypes specific in sporadic cryptosporidiosis cases: first report of human infections with a cervine genotype. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 263-268, 2002.

ORTEGA, Y. R.; SHEEHY, R. R.; CAMA, V. A.; OISHI, K. K.; STERLING, C. R. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates of bovine and human origin. **Journal of Protozoology**, v. 38, p. 40S-41S, 1991.

OSHIRO, E. T.; DORVAL, M. E. C.; NUNES, V. L. B.; SILVA, M. A. A.; SAID, L. A. M. Prevalência de *Cryptosporidium parvum* em crianças abaixo de 5 anos, residentes na zona urbana de Campo Grande, MS, Brasil, 1996. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 22, p. 277-280, 2000.

PAGÈS-MANTÉ, A.; PAGÈS-BOSCH, M.; MAJÓ-MASFERRER, N.; GÓMEZ-COUSO H.; ARES-MAZÁS, E. An outbreak of disease associated with cryptosporidia on a red-legged partridge (*Alectoris rufa*) game farm. **Avian Pathology**, v. 36, n. 4, p. 275-278, 2007.

PEDRAZA-DIAS, S.; AMAR, C.; MCLAUCHLIN, J. The identification and characterisation of an unusual genotype of *Cryptosporidium* from human faeces as *Cryptosporidium meleagridis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 189, p. 189-194, 2000.

PEDRAZA-DIAS, S.; AMAR, C.; IVERSEN, A. M.; STANLEY, P. J.; MCLAUCHLIN, J. Unusual *Cryptosporidium* species recovered from human faeces: first description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium* 'dog type' from patients in England. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, p. 293-296, 2001.

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

- PEREIRA, M. D.; ATWILL, E. R.; BARBOSA, A. P.; SILVA, S. A.; GARCIA-ZAPATA, M. T. Intra-familial and extra-familial risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiânia, Goiás, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, p. 787-793, 2002.
- PIENIAZEK, N. J.; BORNAY-LLINARES, F. J.; SLEMENDA, S. B.; DA SILVA, A. J.; MOURA, I. N.; ARROWOOD, M. J.; DITRICH, O.; ADDISS, D. G. New *Cryptosporidium* genotypes in HIV-infected persons. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, p. 444-449, 1999.
- PREISER, G.; PREISER, L.; MADEO, L. An outbreak of cryptosporidiosis among Veterinary Science students who work with calves. **Journal of the American College of Health**, v. 51, p. 213-215, 2003.
- PROCTOR, J. S.; KEMP, R. L. *Cryptosporidium anserinum* sp. n. (Sporozoa) in a domestic goose *Anser anser* L., from Iowa. **Journal of Protozoology**, v. 21, p. 654-666, 1974.
- RAMIREZ, N. E.; WARD, L. A.; SREEVATSAN, S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. **Microbes and Infections**, v. 6, n. 8, p. 773-785, 2004.
- RANDALL, C. J. Conjunctivitis in pheasants associated with cryptosporidial infection. **Veterinary Record**, v. 118, p. 211, 1986.
- RHEE, J. K.; KIM, H. C.; PARK, B. C.: Effects of *Cryptosporidium baileyi* on the bursa of Fabricius in chickens. **Korean Journal of Parasitology**, v. 35, p. 181-187, 1997.
- RIERA, R. F.; SANTOS, M. M. A. B.; ROBERTO, L. O.; MEIRELES, M. V. Detecção de *Cryptosporidium* sp. em avestruzes (*Struthio camelus*). XXX CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA. 2003, Manaus, 1 CD ROM.
- ROBINSON, G.; THOMAS, A. L.; DANIEL, R. G.; HADFIELD, S. J.; ELWIN, K.; CHALMERS, R. M. Sample prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium andersoni* within a dairy herd in the United Kingdom. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 163-167, 2006.
- 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: Cryptosporidiidae) from birds. **Journal of Parasitology**, v. 89, p. 809-813, 2003.
- RYAN, U. M.; MONIS, P.; ENEMARK, H. L.; SULAIMAN, I.; SAMARASINGHE, B.; READ, C.; BUDLE, R.; RBERTSON, I.; ZHOU, L.; THOMPSON, R. C. A.; XIAO, L.

Cryptosporidium suis n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). **Journal of Parasitology**, v. 4, p. 769-773, 2004.

SANTOS, M. M. A. B.; PEIRÓ, J. R.; MEIRELES, M. V. *Cryptosporidium* infection in ostriches (*Struthio camelus*) in Brazil: clinical, morphological and molecular studies. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 7, n. 2, p. 113-117, 2005.

SARGENT, K. D.; MORGAN, U. M.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R. C. A. Morphological and genetic characterization of *Cryptosporidium* oocysts from domestic cats. **Veterinary Parasitology**, v. 77, p. 221-227, 1998.

SAUDA, F. C.; ZAMARIOLI, L. A.; EBNER FILHO, W.; MELLO, L. B. Prevalence of *Cryptosporidium* sp. and *Isospora belli* among AIDS patients attending Santos Reference Center for AIDS, Sao Paulo, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 79, p. 454-456, 1993.

SCHNACK, F. J.; FONTANA, L. M.; BARBOSA, P. R.; SILVA, L. S. M.; BAILLARGEON, C. M. M.; BARICHELLO, T.; POVOA, M. M.; CAVASINI, C. E.; MACHADO, R. L. D. Enteropathogens associated with diarrheal disease in infants (< 5 years old) in a population sample in Greater Metropolitan Criciuma, Santa Catarina State, Brazil. **Caderno de Saude Publica**, v. 19, p. 1205-1208, 2003.

SILVA, C. V.; FERREIRA, M. S.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; COSTA-CRUZ, J. M. Detection of *Cryptosporidium* - specific coproantigen in human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome patients by using a commercially available immunoenzymatic assay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 1097-1099, 2003.

SMITH, H. V.; CACCIÒ, S. M.; COOK, N.; NICHOLS, R. A. B.; TAIT, A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 29-40, 2007.

SIMÕES, D. C.; ANTUNES, R. G.; MEIRELES, M. V. Infecção por *Cryptosporidium* sp. no proventrículo de canários (*Serinus canaria*). In: CONGRESSO E XV ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SELVAGENS, 10., 2006, São Pedro, **Anais...** 2006. p. 33.

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.). **Parasitology Research**, v. 91, p. 209-214, 2003.

SLAVIN, D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). **Journal of Comparative Pathology**, v. 65, p. 262-266, 1955.

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

SNYDER, D. B.; CURRENT, W. L.; COHEN, E. R. Serologic incidence of *Cryptosporidium* in Delmarva broiler flocks. **Poultry Science**, v. 67, p. 730-735, 1988.

SPANO, F.; PUTIGNANI, L.; CRISANTI, A.; SALLICANDRO, P.; MORGAN, U. M.; LE BLANCO S. M.; TCHACK, L.; TZIPORI, S.; WIDMER, G. Multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from different hosts and geographical origins. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 11, p. 3255-3259, 1998.

SRÉTER, T.; KOVACS, G.; SILVA, A. J.; PIENIAZEK, N. J.; SZELL, Z.; DOBOS-KOVACS, M.; MARIALIGETI, K.; VARGA, I. Morphologic, host specificity, and molecular characterization of a Hungarian *Cryptosporidium meleagridis* isolate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 735-738, 2000.

SRÉTER, T.; VARGA, I. Cryptosporidiosis in birds - A review. **Veterinary Parasitology**, v. 87, p. 261-279, 2000.

SULAIMAN, I. M.; LAL, A. A.; XIAO, L. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. **Journal of Parasitology**, v. 88, p. 388-394, 2002.

SULAIMAN, I. M.; XIAO, L.; YANG, C.; ESCALANTE, L.; MOORE, A.; BEARD, C. B.; ARROWOOD, M. J.; LAL, A. A. Differentiating human from animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, p. 681-685, 1998.

TARWID, J. N.; LAWTHORN, R. J.; RIDDELL, C. Cryptosporidiosis in the respiratory tract of turkeys in Saskatchewan. **Avian Diseases**, v. 29, p. 528-532, 1985.

THAM, V. L.; KNIESBERG, S.; DIXON, B. R. Cryptosporidiosis in quails. **Avian Pathology**, v. 11, p. 619-626, 1982.

THOMPSON, R. C. A. Presidential address: rediscovering parasites using molecular tools – towards revising the taxonomy of *Echinococcus*, *Giardia* and *Cryptosporidium*. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 493-496, 2002.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality tools. **Nucleic Acids Researchs**, v. 24, p. 4876-4882, 1997.

THURSTON-ENRIQUEZ, J. A.; WATT, P.; DOWD, S. E.; ENRIQUEZ, R.; PEPPER, I. L.; GERBA, C. P. Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation

waters used for crop production. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 378-382, 2002.

TIANGTIP, R.; JONGWUTIWES, S. Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV-infected patients in Thailand. **Tropical Medicine and International Health**, v. 7, p. 357-364, 2002.

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. Coccidiosis in gallinaceous birds. **American Journal of Hygiene**, v. 10, p. 269, 1929.

TZIPORI, S.; CAMPBELL, I. Prevalence of *Cryptosporidium* antibodies in 10 animal species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 14, p. 455-456, 1981.

TZIPORI, T.; WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 1047-1058, 2002.

UNGAR, B. L. P.; Cryptosporidiosis in humans (*Homo sapiens*). In: DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; FAYER, R. Cryptosporidiosis of man and animals, Boca Raton: CRC Press, 1990, p. 59-82.

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. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5492-5498, 2000b.

XIAO, L.; BERN, C.; LIMOR, J.; SULAIMAN, I.; ROBERTS, J.; CHEKLEY, W.; CABRERA, L.; GILMAN, R. H.; LAL, A. A. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima. Peru. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, p. 492-497, 2001.

XIAO, L.; ESCALANTE, L.; YANG, C.; SULAIMAN, I.; ESCALANTE, A. A.; MONTALI, R. J.; FAYER, R.; LAL, A. 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, 1999a.

XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterisation of species and genotypes or *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. **International Journal for Parasitology**, 2008, doi:10.1016/j.ijpara.2008.03.006.
Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18479685?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2>

[.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum>](#). Acesso em: 22/05/2008.

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S. J. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n.1, p. 72-97, 2004.

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

XIAO, L.; LIMOR, J.; MORGAN, U. M.; SULAIMAN, I. M.; THOMPSON, R. C. A.; LAL, A. A. Sequence differences in the diagnostic target region of the oocysts wall protein gene of *Cryptosporidium* parasites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5499- 5502, 2000a.

XIAO, L.; MORGAN, U. M.; LIMOR, J.; ESCALANTE, A.; ARRWOOD, M.; SHULAW, W.; THOMPSON, R. C. A.; FAYER, R.; LAL, A. A. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3386-3391, 1999b.

XIAO, L.; RYAN, M. A. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. **Current Opinions in Infectious Diseases**, v. 17, p. 483-490, 2006.

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

ZHOU, L.; KASSA, H.; TISCHLER, M. L. XIAO, L. Host-adapted *Cryptosporidium* spp. in Canada geese (*Branta Canadensis*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 4211-4215, 2004.

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

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)